

03062
2eje 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DE UNA ENZIMA MEMBRANAL INVOLUCRADA EN LA DEGRADACION
DE LA HORMONA LIBERADORA DE LA TIROTROPINA (TRH) EN CEREBRO
DE RATA

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

Presenta

la Q.F. Beatriz Garat

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, 1984



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

COMITE TUTORIAL:

Dra. Rebeca Franco Bourland

Dr. Alfonso González Noriega

Dra. Patricia Joseph Bravo. Director de Tesis.

INDICE

INTRODUCCION	1
CARACTERISTICAS DEL TRH	3
ANTECEDENTES	11
OBJETIVO	16
MATERIALES Y METODOS	17
RESULTADOS	
- Caracterización de los productos de degradación del TRH en membranas totales	29
- Cuantificación de la actividad enzimática - en diferentes condiciones	36
- Estudio del efecto de detergentes en la fracción membranar	41
- Reducción de la asociación de protefmas no membranales a membranas plasmáticas	43
- Clasificación de la actividad de piroglutamilaminopeptidasa membranar	45
- Estudio de la especificidad de la actividad de piroglutamilaminopeptidasa	51
- Origen del metabolito His-Pro	54
- Ubicación regional de la piroglutamilaminopeptidasa membranar	59
DISCUSION	62

BIBLIOGRAFIA	74
ABREVIATURAS	92
ARTICULO sometido a publicación en el J. Neurosc.	93

INTRODUCCION

En 1949 se sugirió la participación del hipotálamo en la regulación de las funciones adenohipofisarias (Green y Harris, 1949). Posteriormente se encontró que la adenohipófisis de los mamíferos está regulada por el hipotálamo a través de factores de liberación o neurohormonas, secretadas por neuronas peptidérgicas (Reichlin, 1973; - Blackwell y Guillemin, 1973). A su vez, las neuronas peptidérgicas del hipotálamo están reguladas por neurotransmisores de tal manera que funcionan como traductores del sistema nervioso al endócrino (Wurtman, - 1971).

Hasta la fecha se han aislado cinco de estos factores:

- Hormona liberadora de la tirotrópina, TRH (Schally et al 1966).
- Hormona liberadora de la hormona luteinizante y folículo estimulante, LHRH (Matsuo et al, 1971).
- Hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento, SRIF (Brazeau et al, 1973).
- Hormona liberadora de corticotropina, CRF (Vale et al, 1981).
- Hormona liberadora de la hormona del crecimiento, GRF (Bolten et al, 1983).

Además de cumplir su función hormonal, se han detectado en otras

áreas del cerebro donde probablemente tengan actividades neuromoduladoras (Jackson, 1978; Barber y Smith, 1980) e incluso, como en el caso de TRH y SRIF, fuera del sistema nervioso central (SNC) (Arimura et al, 1975; Jackson y Reichlin, 1977; Morley et al, 1977; Patel y Reichlin, 1978). Por su localización y la presencia de receptores, así como por sus efectos en el SNC, se ha postulado que estos neuropéptidos pueden funcionar, ellos mismos, como neurotransmisores (Martin et al, 1975).

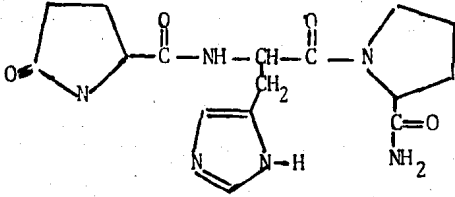
CARACTERISTICAS DEL TRH

El TRH es un tripéptido que se caracteriza, al igual que otros neuropéptidos, por tener bloqueados sus dos extremos, el aminoterminal debido a la ciclización del glutámico para dar piroglutámico, y en el carboxilo terminal, debido a la presencia de una amida (Figura 1A) (Boyer et al, 1969; Nair et al, 1970).

Se ha observado que el TRH produce la secreción de tirotropina (TSH) en todas las especies de mamíferos ensayados hasta la fecha, independientemente de la edad, sexo o vía de administración (Guillemin et al, 1963; Burgus et al, 1970; Bowers et al, 1971). En ciertas condiciones fisiológicas es capaz de causar la liberación de prolactina (Tashjian et al, 1971; Grosvenor y Mena, 1980) y de hormona de crecimiento (Kato et al, 1975). Hasta el momento se acepta que el sitio de regulación de las hormonas tiroideas es a nivel de adenohipofisis (Blackwell y Guillemin, 1973; Bowers et al, 1978) aunque ambas hormonas son capaces de penetrar en el SNC (Taurog et al, 1956).

En el cerebro de rata se encuentran aproximadamente 20 pg/mg de tejido de TRH, en el parénquima extrahipotalámica (tallo cerebral, cerebelo, diencefalo, lóbulo olfatorio y corteza cerebral) y aproximadamente 3,800 pg/mg de tejido en el complejo hipotálamo-hipofisiario, dentro del cual el 95% del TRH se encuentra en la eminencia media (Winokur

A.-



B.-

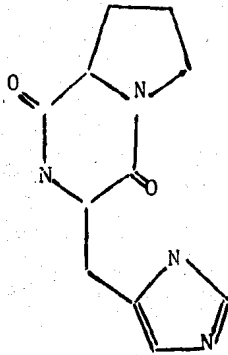


FIGURA 1. A.- Estructura del TRH

B.- Estructura de la His-Pro Diketopiperacina

y Utiger, 1974; Kubek et al, 1977; Jackson y Reichlin, 1979). Pero, el TRH también se encuentra ampliamente distribuido, ya que se halla en tracto digestivo, islotes de páncreas, tracto reproductor y placenta (aproximadamente 75%). Es importante notar que estos reportes están hechos en base a radioinmunoensayos y que por lo tanto es más correcto hablar de sustancias semejantes al TRH frente al anticuerpo usado para el ensayo. Por medio de criterios cromatográficos más rigurosos se ha podido concluir que en algunos casos la sustancia con inmunoreactividad semejante al TRH no era p-Glu-His-ProNH₂ (Youngblood et al, 1978) aunque en otros, se ha verificado que se trata de TRH (Spinder y Wurtman, 1980).

El TRH no parece ser sintetizado en el área en que se encuentra en mayor concentración, terminales nerviosas de eminencia media, (Brownstein et al, 1975). Ultimamente se ha observado que la mayoría del TRH presente en esta zona es producido por neuronas del núcleo paraventricular (Brownstein et al, 1982).

A nivel subcelular el TRH se encuentra en terminaciones nerviosas (Hockfelt et al, 1975) en pequeñas vesículas resistentes a condiciones hipoosmóticas (Barnea et al, 1976 y 1978). Posteriormente se ha demostrado que en algunos casos el TRH coexiste en una misma neurona con otros posibles neurotransmisores, como sustancia P y serotonina (Johanson et al, 1981).

En principio se postuló la existencia de un mecanismo enzimático de biosíntesis, semejante al que opera para el glutatión y algunos antibióticos (Mitnick y Reichlin, 1971 y 1972) pero, posteriormente se demostró la necesidad de purificar a un grado mayor el TRH y de hacer otras pruebas para corroborar la identidad del péptido - (Mc Kelvy, 1974). Siguiendo esta metodología se llegó a la conclusión de que la biosíntesis del TRH se ve afectada por la presencia de inhibidores ribosomales (Mc Kelvy et al, 1980) aunque hasta la fecha no se ha podido caracterizar la molécula precursora.

El TRH es liberado por depolarización dependiente de Ca^{+2} en sistemas in vitro así como por neurotransmisores (Warburg et al, 1977; Joseph-Bravo et al, 1979a).

Se ha detectado unión específica del TRH a receptores de células normales o tumorales de adenohipófisis (Grant et al, 1972; Hinkle et al, 1973). A pesar de que se sugirió que el AMP cíclico mediaría la acción del TRH en la liberación de TSH y prolactina (Pr1) (Naor et al, 1980) posteriormente se encontró que se realizaba por un mecanismo independiente (Gershengom et al, 1980) probablemente asociado al metabolismo de fosfolípidos (Sutton y Martin, 1982). Algunas de las características del receptor de TRH como: dependencia de temperatura y la conversión de las formas de alta y baja afinidad lo asemejan al receptor citosólico para el estradiol (Hinkle y Hinsella, 1982). Por otro lado

se ha observado que el TRH es capaz de regular el número de sus receptores en adenohipófisis (Hinkle y Tashjian, 1975).

Burt y Snyder (1975) demostraron la existencia de dos tipos de receptores para el TRH en cerebro: uno de alta afinidad (50 nM) que se asemeja al de adenohipófisis y otro de baja afinidad (5 μ M). Posteriormente se caracterizó y aisló el receptor de alta afinidad (Ogawa et al, 1982) encontrándose que se halla concentrado a nivel subcelular en membranas sinápticas y a nivel regional en el núcleo accumbens (Burt y Taylor, 1980).

En el SNC el TRH tiene múltiples efectos: afecta la excitabilidad neuronal (Renaud et al, 1975), altera el efecto de fármacos que actúan a este nivel, está involucrado en la regulación térmica (Prange et al, 1979) y modifica la transmisión monoaminérgica (Rastogi et al, 1979).

Debido a sus múltiples efectos a nivel de SNC y al hecho de encontrarse concentrado a nivel de terminales nerviosas, se ha postulado como posible neurotransmisor.

Sin embargo, es necesario aclarar que la relevancia del TRH a nivel del SNC no es demasiado clara ya que las dosis a las que se ha usado el TRH para ver los efectos a este nivel, son muy grandes (mucho mayores que las usadas para la estimulación de TSH y Pr1). Por lo tan-

to, esas respuestas pueden ser producto de efectos del TRH en sitios donde normalmente no se encuentra. De cualquier manera es posible que esas altas dosis se requieran para superar la gran degradación que sufre el TRH cuando se administra en forma parenteral (Prange y Utiger, 1981).

Existen muchos criterios para clasificar una sustancia como neurotransmisor, aunque éstos fueron establecidos en base al comportamiento de la acetil colina y no son necesariamente cumplidos por otras moléculas que también son considerados neurotransmisores. En la tabla 1, se resumen los criterios de Werman (1966) para establecer que una sustancia se comporta como neurotransmisor. Para el caso del TRH, hasta la fecha sólo podemos asegurar que se cumple el 2do. y 5to. criterio, o sea que el TRH está presente en terminales nerviosas y es liberado por mecanismos específicos. Ya sea que el TRH actúe a nivel de -SNC como neurotransmisor o tenga una función parácrina, resulta necesaria la existencia de un mecanismo de inactivación. Para neurotransmisores se conocen dos mecanismos principales: recaptura y degradación, ya sea en forma aislada o conjunta, y, en algunos casos se suma la difusión.

Para el TRH se ha estudiado la posibilidad de que la recaptura sea el mecanismo de inactivación. Los primeros indican que el TRH no es captado por sinaptosomas de cerebro de rata (Parker et al, 1977).

Sin embargo, estudios posteriores realizados en rebanadas de cerebelo (Pacheco et al, 1981) y de hipotálamo (Charli et al 1983) indican que hay un proceso de captura, aunque éste procede a muy baja velocidad - por lo que es difícil que explique por sí sólo la inactivación del péptido.

En este trabajo se pretendió caracterizar la ubicación de las enzimas que degradan al TRH, para poder definir a posteriori si la - - inactivación del péptido una vez liberado, procede vía degradación enzimática.

CRITERIOS PRESINAPTICOS

- 1.- EXISTENCIA DE UN MECANISMO DE INACTIVACION.
- 2.- PRESENCIA DE LA SUSTANCIA EN LA TERMINAL NERVIOSA.
- 3.- PRESENCIA DEL PRECURSOR DEL NEUROTRANSMISOR.
- 4.- SER SUSCEPTIBLE DE RECOLECCION LUEGO DE LIBERADO.
- 5.- PRESENCIA DE UN MECANISMO DE LIBERACION.

CRITERIOS POSTSINAPTICOS

- 6.- ACCION IDENTICA: LA APLICACION DE LA SUSTANCIA DEBE TENER LOS MISMOS EFECTOS QUE LA ESTIMULACION NERVIOSA.
- 7.- DEBE PRODUCIR CAMBIOS SEMEJANTES A LOS QUE PRODUCE LA ESTIMULACION ELECTRICA.
- 8.- IDENTIDAD FARMACOLOGICA: LOS FARMACOS QUE BLOQUEAN LA ACCION DE LA SUSTANCIA, DEBEN BLOQUEAR LOS EFECTOS DE LA ESTIMULACION NERVIOSA.

TABLA 1: CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE NEUROTRANSMISORES

(Werman, 1966).

ANTECEDENTES

El TRH es susceptible de rápida degradación cuando se incuba con homogenados de cerebro o con suero (Bauer y Lipmann, 1976).

La rápida degradación del péptido en suero se debe fundamentalmente a la existencia de una piroglutamilaminopeptidasa específica para el TRH (tiroliberinasa, PM 26,000) (Bauer, 1983). El alto grado de especificidad por el sustrato, junto con el hecho de que es regulada por hormonas tiroideas (Bauer, 1976), sus drásticos cambios con alteraciones en el desarrollo (Neary et al, 1976) y su comportamiento ontogénico (Jeffcoate et al, 1983) sostienen la hipótesis de que esta enzima está controlando la concentración de TRH que llega a la adenohipófisis.

Con respecto a la degradación del TRH en cerebro, hasta el momento se han caracterizado dos pasos principales (Figura 2):

- 1.- Por una enzima desamidasa soluble (Prasad y Peterkofsky, 1976) caracterizada actualmente como una enzima que corta a la derecha del carboxilo de la prolina (post-proline cleavage enzyme, PPCE) (E.C. 3.4.21.26) de PM 76,000, pH óptimo 7.4 a 8.3, pI 4.5 a 4.8, clasificada como serinproteínasa, que da lugar a TRH ácido (TRH^{OH}) el que es inactivo y estable a nivel de SNC (Rupnow et al, 1979; Hersh y Mc Kelvy, 1979; Tate, 1981). Esta enzima es capaz de degradar otros péptidos co

mo ocitocina, angiotensina II, neurotensina, sustancia P, insulina B, bradiquinina, LHRH, pero no se encontró actividad contra mioglobina o albúmina bovina. Está ampliamente distribuida en tejidos animales, encontrándose en hígado, testículos, músculo esquelético, cerebro y pulmón .

- 2.- Por una piroglutamilaminopeptidasa (PGA) soluble (E.C. 3.4.11.8) de PM 26,000, que da lugar a His-ProNH₂. Este dipéptido puede subsecuente, ciclizarse en forma no enzimática para dar histidil-prolil-dicetopiperacina (His-Pro) (Prasad y Peterkofsky, 1976; Bauer, 1983) o ser degradada para dar histidil-prolina mediante una enzima que corta a la derecha del carboxilo de la prolina sólo en dipéptidos - (post proline dipeptidylamino peptidase, PPDA), descrita en adenohipófisis y riñón (Bauer y Kleinkauf, 1980). También se puede formar prolinamida por acción de una histidilprolininidopeptidasa (Matsui et al, 1979).

Esta PGA requiere de DTT y EDTA para expresar su actividad, y es inhibida por agentes bloqueantes de los de los grupos tioles. Es capaz de actuar sobre otros neuropéptidos naturales: LHRH, neurotensina, y gastrina, así como sobre péptidos sintéticos tales como: p-Glu-Ala, p-Glu-His o p-Glu β naftilamida. Usando este sustrato se ha demostrado que esta enzima está ampliamente distribuida en tejidos animales (Szewzuk y Kwiatowska, 1970).

Una de las características importantes en la degradación del TRH por esta última enzima es la formación de His-Pro-dicetopiperacina, un metabolito vinculado a numerosas acciones biológicas a nivel endócrino y de sistema nervioso central (Peterkofsky et al, 1982) (Figura 1B). En algunos casos la His-Pro dicetopiperacina es antagonista del TRH - (termogénesis) (Prasad et al, 1977 y 1978), pero en otros es un fuerte agonista (reversión de la narcosis etflica) (Mori et al, 1982). Por - - otro lado, la His-Pro dicetopiperacina ejerce in vitro un efecto inhibitorio sobre la liberación de la prolactina a partir de adenohipófisis - (Bauer et al, 1978; Enjalbert, 1979), en forma contraria al TRH (Grosve nor y Mena, 1980).

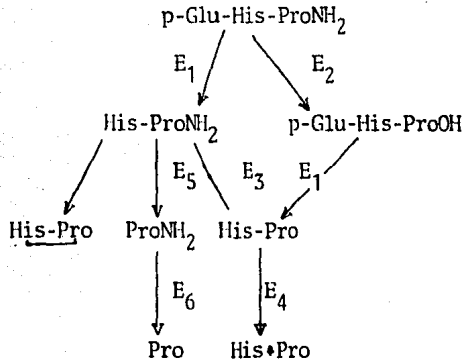
Se sabe que el 80% de la actividad degradativa contra TRH en ce rebro es soluble (Prasad y Peterkofsky, 1976; Joseph-Bravo et al, 1979b; Busby et al, 1982). Tanto la PPCE como la PGA han sido purificadas del sobrenadante (Prasad y Peterkofsky, 1976; Hersh y Mc Kelvy, 1979; Rupnow et al, 1979); Bauer y Kleinkauf, 1980). La PGA purificada de fracción so luble es muy sensible a oxidación necesitándose trabajar con protectores de los grupos tioles para mantenerla activa (Bauer y Nowak, 1979; Busby et al, 1982). Este hecho la diferencia notoriamente de la enzima análogo de suero ya que esta última es inhibida por EDTA y DTT. Sin embargo, algunos autores sostienen que la PGA cerebral se encuentra sólo en la -- fracción membranal (Hayes et al, 1979; Griffiths et al, 1980; Greaney et al, 1980). Es importante recalcar que Griffiths no hace ningún tipo de

control de contaminantes solubles y, no encuentra la actividad de PGA - soluble descrita por Bauer (Bauer y Nowak, 1979). No obstante esto podría ser explicado por el hecho de que durante la homogenización de te ji do ner vioso se forman numerosas vesículas que pueden atrapar componen tes solubles quedando de esta manera protegidos de la oxidación y que - se expresaría en la fracción particulada. En el caso de Greaney, donde sí se realizan los controles adecuados de contaminación por diferentes fracciones, se encuentra una PGA membranal aunque no se observa la acti vidad de PGA soluble, pero este autor, al igual que Griffiths, trabaja sin DTT ni EDTA.

En general se ha visto que las enzimas degradativas, cuando están en forma soluble, participan en la degradación del neurotransmisor sólo en forma subsecuente a un proceso de recaptura. En cambio, cuando en el espacio sináptico se encuentran enzimas membranales, éstas son - las responsables de la inactivación como única forma o conjuntamente - con otros mecanismos de inactivación.

Es de hacer notar que existen metaloproteasas a nivel membranal de terminales nerviosas vinculadas a mecanismos de neurotransmisión, cu yas últimas funciones se desconocen (De Martino y Criall, 1982; Baxter et al, 1983). Por otro lado, se ha reportado la existencia de metalo pro teasas específicas, ubicadas en la fracción membranal, para otros candi datos a neurotransmisores: encefalinas (Schwartz et al, 1981), LHRH (Elkabet al, 1981), Sustancia P (Lee et al, 1981), y neurotensina (Mc Dermott et al, 1983).

ENZIMAS CEREBRALES



ENZIMAS SERICAS

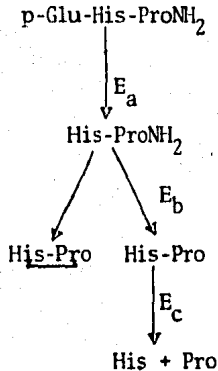


FIGURA 2. Catabolismo del TRH según Bauer y Kleinkauf, 1981

E_1 : piroglutamilaminopeptidasa, E_2 : enzima que corta después del carboxilo de la prolina PPCEE $_3$: enzima que corta después del carboxilo de la prolina en dipeptidos, PPDA, E_4 : imidodipeptidasa, E_5 : histidil-prolin imino peptidasa, E_6 : iminopeptidasa, E_a : tiroliberinasa, E_b : desamidasa, E_c : imidodipeptidasa.

OBJETIVO

Dada la controversia mencionada en cuanto a la localización de las enzimas que degradan al TRH, en particular de la PGA, y debido al hecho de la potencial importancia de la ubicación membranal de enzimas capaces de degradar al TRH, se decidió estudiar la degradación del péptido especialmente a este nivel.

Para caracterizar una enzima como membranal, resulta sumamente importante evitar la contaminación soluble o reducirla a un mínimo. Es ta puede ser controlada siguiendo el comportamiento de un marcador (De Duve, 1963). Trabajando de ésta manera se puede lograr una ubicación - más acertada de las enzimas que intervienen en la degradación y con es tos datos podemos especular sobre la importancia fisiológica de la degradación.

En este trabajo se pretendió:

- 1.- Evaluar la existencia de enzimas capaces de degradar al TRH en mem branas totales de cerebro.
- 2.- Clasificar esta actividad en función del mecanismo de catálisis de sus centros activos (Barrett, 1980).
- 3.- Comparar esta actividad con la de las enzimas conocidas capaces de degradar al TRH.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Para estos experimentos se usaron ratas macho Wistar (200-300 g) mantenidas en condiciones controladas de luz (10 horas al día) y alimentadas ad libitum.

El (L-prolina-2,3,4,5-³H) TRH (100 Ci/nmol) se compró en New England Nuclear Co, Boston Ma., el TRH y sus metabolitos, así como los análogos y el LHRH, en los laboratorios Península, San Carlos Ca. Los demás reactivos usados a lo largo del estudio fueron adquiridos a Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. o a J.T. Baker, México.

Se usaron dos tipos de placas de cromatografía en capa delgada:

- 1) de alta resolución (Whatman HPKF) para la purificación de (³H-Pro) TRH.
- 2) de sílica gel G (Merck 5724) para el análisis de los productos de degradación.

También se hicieron cromatografías en papel de fosfato de celulosa (Whatman P 81).

Todo el material de vidrio y plástico, usado para trabajar con (³H-Pro) TRH fue previamente siliconizado (5% de Surfácil-Pierce en acetona).

PURIFICACION DEL (^3H -PRO) TRH

Para los experimentos de degradación es de suma importancia partir de un reactivo lo más puro posible ya que la existencia de un alto contenido de un metabolito puede llegar a enmascarar su producción durante la incubación, sobre todo si ésta se da en bajos niveles. Por otro lado, el TRH es fácilmente degradado por bacterias (Szewezuck y Mulczyk, 1969) por lo que debe almacenarse en condiciones que prevengan la contaminación. De cualquier manera, previo a los ensayos de degradación, se purificó al TRH de forma de acarrear la menor cantidad posible de metabolitos.

En principio, se purificó el (^3H -Pro) TRH siguiendo un procedimiento normalizado previamente, sin embargo, se pudo comprobar que simplificando este método se obtenía (^3H -Pro) TRH en una pureza semejante y, con mejores rendimientos. Se probaron tres métodos.

METODO DE PURIFICACION 1.-

El (^3H -Pro) TRH se pasa por una columna de intercambio iónico (SPC 25 Sephadex), se eluye, primero con agua y luego con HCl 1N, se secan las alícuotas y las correspondientes al (^3H -Pro)TRH se cromatografían en capa delgada de alta resolución en sistema de acetona, agua (80:20) (Sistema I). Se aplica también una muestra de solución patrón -

de TRH ($R_f = 0.40$) el que se revela con el reactivo de Pauli (Dawson et al, 1978). Se recorta la zona correspondiente del carril del reactivo marcado, se extrae dos veces con metanol 90% y se evapora a sequedad.

METODO DE ANALISIS

Se verifica la pureza del ($^3\text{H-Pro}$) TRH así obtenido, mediante cromatografía en capa fina en placas de Sílica gel G en el sistema: cloroformo, metanol, hidróxido de amonio, 125,75,25 (Sistema II) ($R_f = 0.67$). Se determina rendimiento y pureza por conteo de centelleo usando la solución de Bray (Bray, 1970). La eficiencia de conteo encontrada fue de 30% aproximadamente.

La pureza del ($^3\text{H-Pro}$) TRH obtenida siguiendo este método osciló entre 94 y 96% y el rendimiento entre 60 y 70%.

METODO DE PURIFICACION 2.-

El ($^3\text{H-Pro}$) TRH se pasa por una columna de intercambio iónico - idem anterior, se eluye primero con agua y luego con NH_4OH 2N. Se procede en forma análoga a los métodos previos.

La pureza obtenida siguiendo este método fue de 90-93% y el rendimiento de 45-66%.

METODO DE PURIFICACION 3.-

El (^3H -Pro) TRH se aplica directamente sobre placa delgada de alta resolución, que se corre en el Sistema II y se procede en forma análoga a los casos anteriores.

La pureza obtenida fue de 95% y el rendimiento osciló entre - 80-85%.

La sustitución del ión cloruro por el ión oxhidrilo volátil - (Bauer y Kleinkauf, 1980) se usó para mejorar el proceso de secado y evitar así pérdidas durante ese proceso, sin embargo, el rendimiento no se vió seriamente afectado. Por otro lado, al haber suprimido el pasaje por la columna de intercambio iónico, no se afectó la pureza final, pero sí mejoró sensiblemente el rendimiento y el tiempo de la preparación, por lo que se decidió purificar el (^3H -Pro) TRH siguiendo - este último método.

FUENTES ENZIMATICAS

OBTENCION DE MEMBRANAS PLASMATICAS

Los animales se decapitaron y se disecaron sus cerebros, los - que fueron inmediatamente colocados en solución amortiguadora de Tris 50

mM pH 7.4 (Amortiguador I) o Tris 50 mM pH 7.4 con DTT 2 mM y EDTA 1 mM (Amortiguador II) en frío a 4°C. Se homogenizaron al 10% peso en volumen en dichos amortiguadores usando un homogenizador Potter-Elvehjem. El pistón del homogenizador ofrecía una separación de 0.15 mm con las pa redes del tubo de vidrio (clearance).

Los homogenados se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos, la pastilla así obtenida se rehomogenizó en la mitad del volumen original, y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Los sobrenadantes obtenidos en ambas centrifugaciones se juntaron. Esta fracción contiene los constituyentes celulares solubles más organelos y membranas, mientras que en la pastilla quedan principalmente núcleos. Al estar en condiciones hiposmóticas se previene la formación de vesículas que pudieran quedar en la fracción soluble, y se rompen vesículas sensibles a cambios osmóti cos. Por otro lado se obtienen gran cantidad de hojas y fantasmas membra nales (Evans, 1980).

Los sobrenadantes se centrifugaron a 100,000 g durante 60 minutos, para precipitar la fracción membranal. Los fragmentos largos sedimentan primero, junto con la fracción mitocondrial cruda y luego los fragmentos más pequeños con la fracción mitocondrial posterior (Marchbanks, 1975) y de Duve et al, 1955).

Los sobrenadantes de esta centrifugación constituyen la fracción

soluble usada en los experimentos de degradación.

La pastilla, se rehomogenizó en el amortiguador correspondiente, se recentrifugó a 100,000 g y por último se resuspendió en el amortiguador, constituyendo lo que se llamó fracción membranal.

OBTENCION DE SUERO

Se desangró a los animales, la sangre colectada se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3,000 g durante 30 minutos. Luego de la aspiración y recentrifugación del suero, se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM (Bauer y Nowak, 1979).

El suero así obtenido, se distribuyó en alícuotas y se almacenó a -80°C.

CONDICIONES DE LOS EXPERIMENTOS DE DEGRADACION

Las fracciones membranal, soluble y sérica se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos con (³H-Pro) TRH purificado ($2 \cdot 10^5$ dpm) en un volumen final de 25 µl. La concentración de proteínas fue: 1 a 2 mg/ml para el suero, 0.3 a 1.0 mg/ml para la fracción soluble, y 2.5 a 5 mg/ml para la fracción membranal. Los tiempos de incubación elegidos fueron: -

15 minutos para el suero, 30 minutos para la fracción soluble, y 60 minutos para la fracción membranal. Las reacciones fueron frenadas - por el agregado de ácido acético al 20% (100 μ l).

La concentración de proteínas y los tiempos de incubación fueron elegidos de tal manera de obtener una cantidad de metabolito suficiente como para no inducir un gran error en su determinación y por -- otro lado, permanecer dentro de las condiciones de linealidad para la desaparición de TRH.

Por otro lado, es de hacer notar que, en estas condiciones de incubación el sustrato no se encuentra en condiciones de saturación - (la concentración final de (3 H-Pro) TRH en los experimentos es de 120 mN), sin embargo repitiendo estos experimentos con una mayor concentración de TRH frío (10^{-4} M) no se llega a observar la presencia de metalitos radioactivos.

Para la incubación se ensayaron diferentes soluciones amortiguadoras: Amortiguador I, Amortiguador II, Tris 50 mM pH 7.4 DIT 2 mM (Amortiguador III) y Tris 50 mM pH 7.4 EDTA 1 mM (Amortiguador IV).

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION

Las suspensiones con ácido acético se centrifugaron a 1,000 g -

durante 30 minutos para separar proteínas y otras macromoléculas, luego se extrajeron dos veces con éter saturado en agua para eliminar los lípidos, y por último, se llevaron a 90% vol/vol en metanol. En esta solución el TRH y sus metabolitos son solubles pero precipitan todavía algunas proteínas. Luego de separados los precipitados por centrifugación, los sobrenadantes se evaporaron a sequedad y se resuspendieron en 10 μ l de agua. Se aplicaron en placas para cromatografía de sílica gel G y se corrieron en el Sistema II ascendente por 15 cm, junto con los patrones para el TRH y sus metabolitos. Después de secadas las placas, se revelaron los patrones con el reactivo de Pauli (Dawson et al, 1978), salvo para la prolina y la prolinamida que no se tifican con este reactivo. Para estos aminoácidos se usó la tinción con isatin (Dawson et al, 1978). Por otro lado, los carriles conteniendo los productos de incubación se recortaron en rectángulos de 2 cm de ancho por 1 cm de largo, incluyéndose 1 cm por debajo del origen. La sílica correspondiente a cada rectángulo se extrajo con 1 ml de metanol al 90% y posteriormente se agregó 5 ml de Bray para su conteo por centelleo (Bray, 1970).

Los valores de Rf para los estándares fueron: Pro: 0.24, His-Pro: 0.30, TRHOH: 0.54, TRH: 0.67, Pro NH₂: 0.80, His-pro: 0.87.

Por otro lado se hicieron varios controles sobre la naturaleza de las sustancias radioactivas que migran con esos Rf.

En primer lugar, un metabolito posible del TRH, aunque según-

varios autores de existencia efímera, es el His-pro NH_2 . En caso de existir migraría junto con el TRH, en este sistema, y la forma de discernir su existencia es sustituir la cromatografía en capa delgada por una cromatografía en papel de fosfato de celulosa ascendente por 15 cm en ácido acético 1 M (Sistema IV) (Bauer y Nowak, 1979).

En segundo lugar, se estudió la naturaleza de las sustancias que comigran con el Rf de Pro o His-pro y ProNH_2 o His-pro, que por las características del procedimiento de análisis (recorte en rectángulo de 1 cm de alto) pueden quedar incluidas en el mismo frasco. Estos picos se recromatografiaron en placas de Sílica gel G en un segundo sistema (Sistema III): isopropanol, agua, hidróxido de amonio, 80:29:1, ascendente por 10 cm. Los valores de Rf en este sistema fueron: Pro: 0.20, ProNH_2 : 0.36, His-pro: 0.58, His-pro: 0.66.

CARACTERIZACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

ESTUDIO DEL EFECTO DE DETERGENTES EN LA FRACCION MEMBRANAL

Se estudió el efecto de algunos detergentes en concentraciones tales que generaran la solubilización de las membranas para expresar así la totalidad de la actividad enzimática contra TRH.

Se usaron cuatro sustancias: Tritón X-100 (detergente no iónico),

Deoxicolato de sodio (sal biliar), CHAPS (detergente combinado de los del tipo sulfobetáinico y biliar) y Saponinas (sapogenina más glicona). Las concentraciones usadas fueron las necesarias para producir el efecto deseado sin provocar la desnaturalización de proteínas (Helenius et al, 1979; Hjemeland, 1980).

La fracción membranal fue preincubada 10 minutos con los detergentes a la concentración final indicada (Tabla 5), se inició la reacción por agregado de ($^3\text{H-Pro}$) TRH y se procedió como siempre.

REDUCCION DE LA ASOCIACION DE PROTEINAS NO MEMBRANALES A MEMBRANALES PLASMATICAS.

Para la caracterización de la ubicación subcelular de las enzimas capaces de degradar al TRH (soluble o membranal), resultó de gran importancia reducir el pegado de proteínas no membranales a membranas plasmáticas, que se produce durante la preparación de las mismas. Esto se logra mediante la incubación con altas concentraciones de electrolitos, de tal forma de reducir enlaces electrostáticos (Evans, 1980).

Las membranas obtenidas según lo indicado, fueron rehomogenizadas en el amortiguador correspondiente con NaCl a una concentración final de 1 M y recentrifugadas. Posteriormente, las membranas así tratadas, fueron lavadas dos veces con amortiguador sin NaCl, para quitar -

los iones que pudieran haber quedado atrapados, evitando así la posibilidad de que éstos afecten la actividad de las enzimas que degradan al TRH.

CLASIFICACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Para la clasificación de las actividades enzimáticas se usaron diferentes inhibidores en varias concentraciones, teniendo en cuenta el rango usual. Los inhibidores y las concentraciones respectivas se especifican en la Tabla 7.

La fuente enzimática se preincubó por 10 minutos con los inhibidores, posteriormente se inició la reacción añadiendo ($^3\text{H-Pro}$) TRH y se procedió como de costumbre.

ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LAS ACTIVIDADES DEGRADATIVAS CONTRA TRH

Para una ulterior caracterización de estas actividades se estudió el efecto de análogos del TRH en la degradación. En estos ensayos la reacción se empezó por agregado simultáneo del sustrato ($^3\text{H-Pro}$) TRH y sus análogos. Los análogos usados y su concentración se indican en la tabla 8 y 9. La concentración se eligió en función de los valores de K_M reportados comúnmente para peptidasas (10^{-5} M), pero hasta el momento se desconoce el K_M de la PGA de membrana.

Las mezclas de incubación se trataron como siempre.

UBICACION REGIONAL DE LA PIROGLUTAMILAMINOPEPTIDASA DE MEMBRANA

Dada la potencial importancia de esta enzima, se estudió su -
distribución regional. Se eligieron tres zonas a comparar: cerebro, -
hipotálamo y adenohipófisis.

Las zonas disecadas se colocaron inmediatamente en el Amorti-
guador I en frío a 4°C y se procedió como de costumbre.

DETERMINACION DE LOS MARCADORES DE LAS PREPARACIONES

A lo largo de todas las preparaciones, la actividad de la enzi
ma láctico deshidrogenasa (marcador citosólico) fue medida según el mé
todo de Johnson et al, 1963.

La determinación de protefnas se hizo siguiendo el método de -
Lowry et al, 1951, usando albúmina de suero bovino (fracción V de Sig-
ma) como patrón.

RESULTADOS

CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL TRH EN MEMBRANAS TOTALES

Se estudió la degradación del TRH en la fracción soluble y membranal de homogenados de cerebro de rata usando diferentes condiciones.

Dada la controversia existente en cuanto a la ubicación de la piroglutamilaminopeptidasa (PGA) cerebral, y teniendo en cuenta que los artículos en los que defienden que esta enzima es soluble trabajan con DTT y EDTA, mientras que aquellos que sostienen que es membranal, no usan estos agentes, se decidió estudiar la degradación del TRH a nivel membranal en ambas condiciones.

El TRHOH es el principal metabolito, en la fracción soluble - - (Figura 3A), pero cuando esta fracción es incubada en presencia de DTT y EDTA aparece un pico de His-Pro dicetopiperacina (His-Pro) (Figura - 3C). Esto está de acuerdo con lo reportado previamente (Bauer y Nowak, 1979) calificando a la piroglutamilaminopeptidasa presente en esta fracción, como una enzima muy sensible a la oxidación de sus grupos tioles.

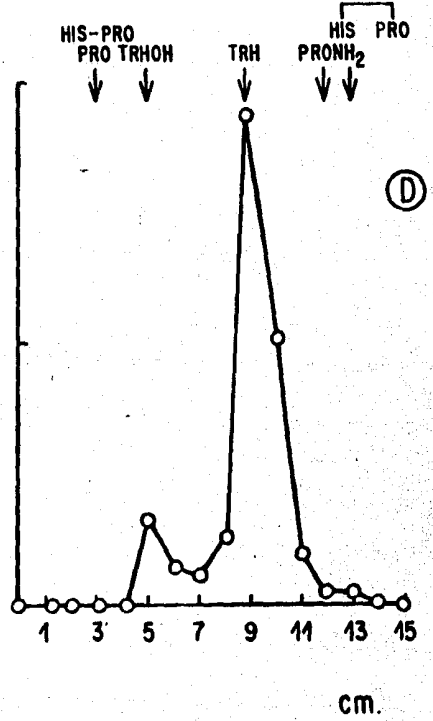
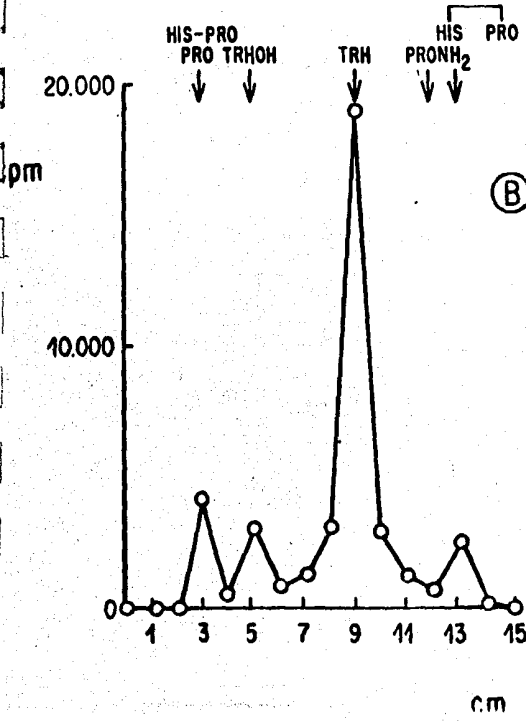
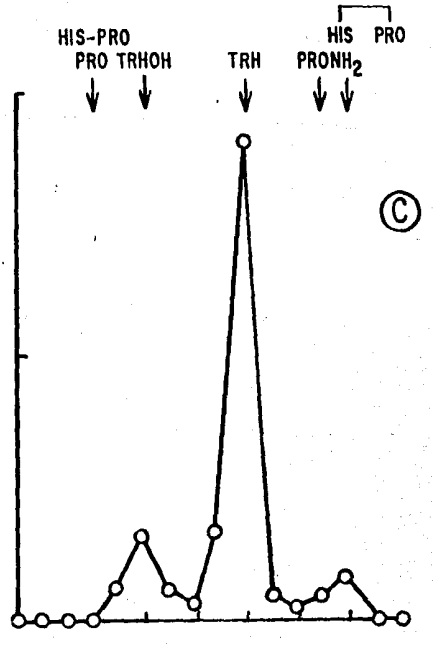
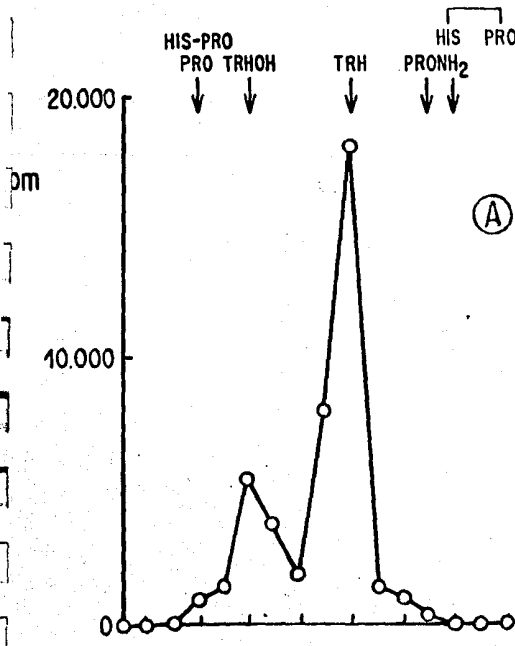
En la fracción membranal, se detecta TRHOH, His-Pro dicetopiperacina e His-Pro (Figura 3B), usando solución amortiguadora de Tris sin

FIGURA 3: Patrones de Degradación del (^3H -Pro)TRH en Cerebro de Rata, observados por Cromatografía en Capa Fina usando el Sistema I.

Las fracciones soluble y membranal se incubaron a 37°C en diferentes condiciones:

- A.- fracción soluble en solución amortiguadora I (Tris 50 mM pH 7.4) durante 30 minutos.
- B.- fracción membranal en solución amortiguadora I (Tris 50 mM pH 7.4) durante 60 minutos.
- C.- fracción soluble en solución amortiguadora II (Tris 50 mM DTT 2 mM EDTA 1 mM pH 7.4) durante 30 minutos.
- D.- fracción membranal en solución amortiguadora II (Tris 50 mM DTT 2 mM EDTA 1 mM pH 7.4) durante 60 minutos.

El análisis de los productos de degradación se hizo según lo indicado en Materiales y Métodos.



DTT ni EDTA (Amortiguador I). Pero, incubando en presencia de estos protectores, los niveles de His-Pro dicetopiperacina e His-Pro bajan notoriamente (Figura 3D).

Se probó que la identificación de los metabolitos era correcta, utilizando métodos alternativos. Dado que Pro e His-Pro migran muy cercanos en este sistema (Sistema II), se verificó la naturaleza de la sustancia que migra con ese Rf, por recromatografiado en otra mezcla de solventes (ver Materiales y Métodos) encontrándose que se trataba esencialmente de His-Pro (Figura 4).

De la misma manera se procedió con la sustancia que migra con el Rf de Pro NH₂ o His-Pro dicetopiperacina. En este caso, se encontró que la sustancia migra dando lugar a un pico ancho en ambos sistemas, con un Rf correspondiente al de la His-Pro diceto-piperacina (Figura 5). Esto puede ser debido a la presencia de dos isómeros de la His-Pro dicetopiperacina que han sido descritos y separados en condiciones alcalinas (Bauer y Kleinkauf, 1980) o a una contribución de Pro NH₂ no discernible.

Por otro lado, se estudió la posibilidad de la existencia de His-Pro NH₂ que, en el sistema usual, quedaría enmascarada dentro del pico correspondiente al TRH. Para ello, los metabolitos producto de degradación del TRH, se estudiaron por cromatografía en papel de fosfa

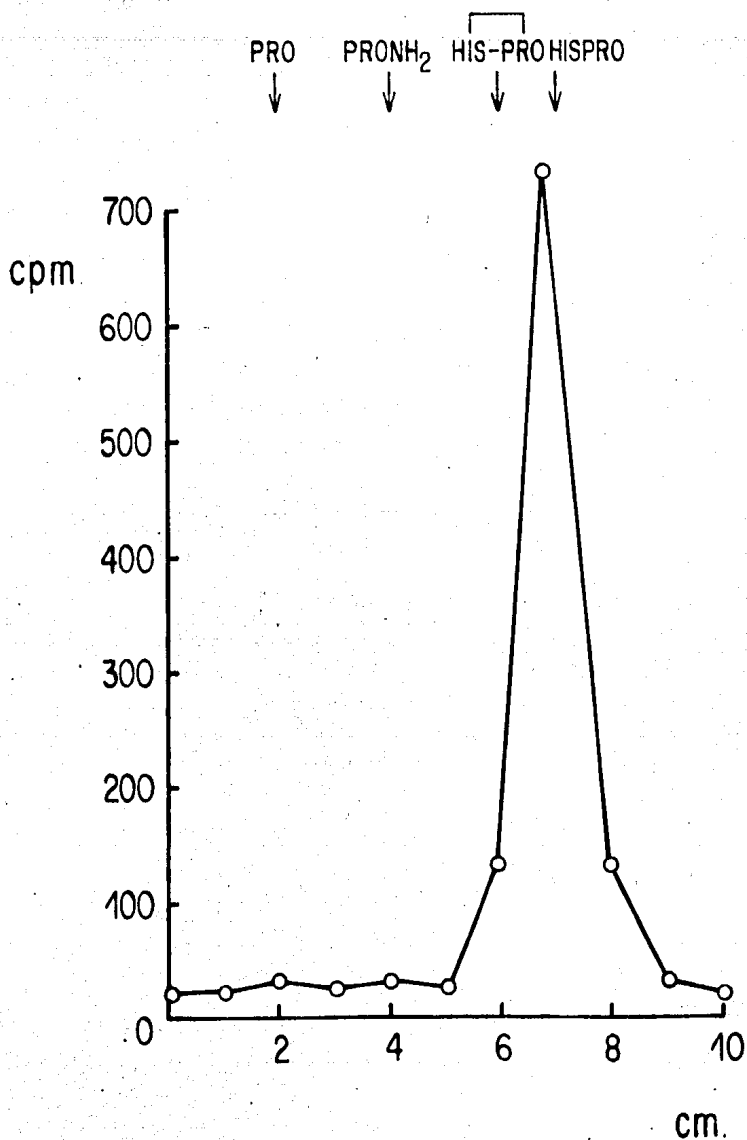


FIGURA 4. Verificación de la Naturaleza de la Sustancia que comigra con un Rf semejante al de Pro e His-Pro en fracción membranal.

El pico de radioactividad con el Rf de Pro e His-Pro, en el Sistema II, fue extraído y recromatografiado en el Sistema III (ver Materiales y Métodos).

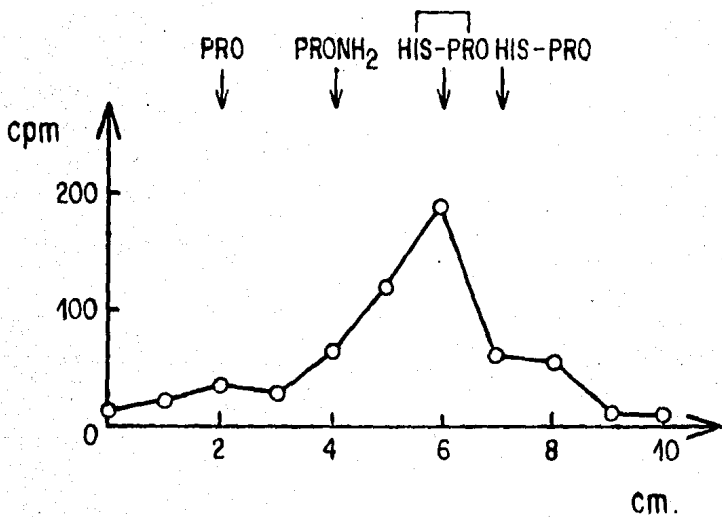


FIGURA 5. Verificación de la Naturaleza de la Sustancia que comigra con un Rf semejante al de ProNH_2 e His-Pro en fracción membranal.

Idem anterior.

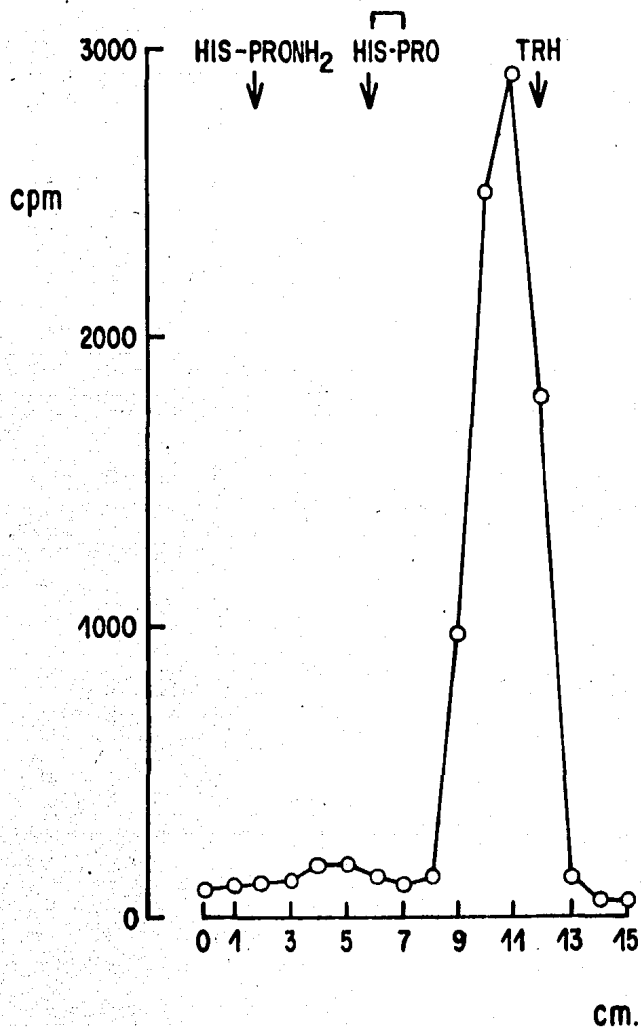


FIGURA 6. Comprobación de la ausencia de His-ProNH₂ como Metabolito en la fracción membranal.

Los productos de degradación del TRH se analizaron por cromatografía en papel de fosfato de celulosa en el Sistema IV (ver Materiales y Métodos).

to de celulosa (ver Materiales y Métodos). No se encontró His-Pro NH_2 en niveles detectables (Figura 6).

De esta forma, podemos concluir, a partir de los datos obtenidos, que los metabolitos del TRH producidos a nivel membranal en cerebro de rata comigran con: His-Pro, TRHOH e His-Pro dicetopiperacina.

CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN DIFERENTES CONDICIONES

En la tabla 2 se encuentran los valores de actividad enzimática capaces de producir metabolitos de TRH en las diferentes condiciones. Se midió también, la actividad de Láctico Deshidrogenasa para de terminar el nivel de contaminación soluble presente en la fracción mem branal. Como se muestra en dicha tabla, el comportamiento de la activi dad de la Láctico Deshidrogenasa (LDH) es muy semejante al de la actividad que genera TRHOH en ambos amortiguadores. También la actividad que genera His-Pro dicetopiperacina, medida en presencia de DTT y EDTA, muestra un comportamiento de enzima soluble. En todos estos casos se observa que en la fracción membranal, la contaminación soluble es del orden de un 10% de la actividad detectada en la fracción soluble (ó incluso menos).

El comportamiento soluble de la enzima que genera dicetopiperacina en presencia de DTT y EDTA fue también verificado por J. Miranda

	FRACCION SOLUBLE #	FRACCION MEMBRANAL #	R*	FRACCION SOLUBLE ##	FRACCION MEMBRANAL ##	R*
LACTICO DEHIDROGE NASA nmolas/min mg	130 \pm 15 (14)	15 \pm 2 (12)	11%	151 \pm 33 (14)	14 \pm 7 (14)	9%
FORMACION DE HIS-PRO pmolas/min mg	0 (20)	17 \pm 2 (22)	-	0 (10)	3 \pm 1 (10)	-
FORMACION TRH pmolas/min mg	118 \pm 11 (19)	6 \pm 1 (22)	5%	77 \pm 17 (10)	7 \pm 1 (10)	9%
FORMACION DE HIS-PRO	0 (20)	10 \pm 2 (20)	-	62 \pm 14 (9)	2 \pm 1 (12)	3%

Tabla 2. Actividad degradativa contra TRH en fracciones de cerebro de rata.

Las fracciones soluble y membranal fueron obtenidas e incubadas en la solución amortiguadora I (Tris 50 mM pH 7.4) # 6 en la solución amortiguadora II (Tris 50 mM DTT 2 mM EDTA 1 mM pH 7.4) ##, con 2×10^{-5} dpm de (3 H-Pro)TRH. Los productos de degradación se analizaron por cromatografía en capa fina como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados expresan la actividad específica como la media \pm la desviación estándar. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

* R es la relación de actividades específicas membranal sobre soluble.

trabajando con un sustrato sintético: p-Glu β naftilamida (Garat et al, 1984).

El efecto inhibitorio de la ausencia de DTT y EDTA en la preparación enzimática sobre la actividad de la PGA soluble es revertido completamente si se agregan estos agentes en el momento de la incubación (Tabla 3).

Se estudió el efecto de adicionar en forma independiente DTT o EDTA (Tabla 4). Se encontró que en las concentraciones usadas no afectan la actividad que genera TRHOH. Pero, se requieren ambos factores, para que se exprese la máxima actividad de PGA soluble. Sin embargo, ambos - y también en forma independiente, inhiben considerablemente la actividad de la PGA que se manifiesta en la fracción membranal. Además estos factores afectan la producción de His-Pro pero esto será discutido más adelante.

Con estos datos se concluyó que la enzima que genera TRHOH es una enzima soluble y que la PGA con grupos tioles sensibles, también es soluble. En cambio, como se muestra en la figura 3 y en la tabla 2, en ausencia de DTT y EDTA se observa una actividad que genera dicetopieracina en la fracción membranal, mientras que, en la soluble, no se encuentran niveles detectables. Este aumento de actividad no se correlaciona con un aumento de actividad de las otras enzimas (LDH y la que forma TRHOH), de

	FORMACION DE TRIIOH*		FORMACION DE HIS-PRO*		FORMACION DE HIS-PRO*	
	F. SOLUBLE	F. MEMBRANAL	F. SOLUBLE	F. MEMBRANAL	F. SOLUBLE	F. MEMBRANAL
CONDICION 1.	114.0	6.6	0	19.8	0	6.0
CONDICION 2.	103.2	9.6	0	28.8	68.4	3.6
CONDICION 3.	96.0	5.7	0	17.1	48.0	4.2

Tabla 3. Efecto activador de los protectores DTT y EDTA sobre la actividad de PGA soluble

Las fracciones soluble y membranaral fueron obtenidas e incubadas según lo indicado en Materiales y Métodos en cada una de las tres condiciones:

CONDICION 1. Obtención e incubación en la solución amortiguadora I (Tris 50 mM pH 7.4)

CONDICION 2. Obtención en el amortiguador I (Tris 50 mM pH 7.4) e incubación en el amortiguador II (Tris 50 mM DTT 2 mM EDTA 1 mM pH 7.4).

CONDICION 3. Obtención e incubación en la solución amortiguadora II (Tris 50 mM DTT 2 mM EDTA 1 mM pH 7.4)

* Actividad específica expresada en picomolas/min mg.

Se indica el promedio de dos determinaciones, los datos presentan un error de 10% aproximadamente.

	FORMACION DE TRIOH*		FORMACION DE HIS-PRO*		FORMACION DE HIS-PRO*	
	F. SOLUBLE	F. MEMBRANAL	F. SOLUBLE	F. MEMBRANAL	F. SOLUBLE	F. MEMBRANAL
CONDICION 1.	117 ± 15	7 ± 2	0	21 ± 2	0	10 ± 2
CONDICION 2.	101 ± 30	5 ± 1	0	1 ± 1	21 ± 10	2 ± 1
CONDICION 3.	122 ± 13	5 ± 1	0	7 ± 2	13 ± 9	4 ± 1
CONDICION 4.	125 ± 17	5 ± 2	0	1 ± 1	66 ± 15	1 ± 1

Tabla 4. Efecto de la presencia de DTT y EDTA en las soluciones amortiguadoras de incubación

Las fracciones soluble y membranar fueron obtenidas e incubadas según lo indicado en Materiales y Métodos en cada una de las cuatro condiciones:

CONDICION 1. Obtención e incubación en el amortiguador I (Tris 50 mM pH 7.4)

CONDICION 2. Obtención e incubación en el amortiguador IV (Tris 50 mM EDTA 1 mM pH 7.4)

CONDICION 3. Obtención e incubación en el amortiguador III (Tris 50 mM DTT 2 mM pH 7.4)

CONDICION 4. Obtención e incubación en el amortiguador II (Tris 50 mM EDTA 1 mM DTT 2 mM pH 7.4)

* Actividad específica expresada en pmolas/min mg.

Se indica la media y desviación estándar de 4 determinaciones

tal forma que no puede ser atribuido a la ruptura de algún tipo de vesículas osmoticamente resistentes. La actividad encontrada en membranas, tampoco puede ser considerada contaminación soluble debido a la diferencia de comportamientos entre la actividad de PGA soluble y membranal.

Por lo tanto, parece existir otra enzima PGA, con un comportamiento membranaral, carente de grupos tioles sensibles a oxidación e inhibida por DTT y EDTA.

ESTUDIO DEL EFECTO DE DETERGENTES EN LA FRACCION MEMBRANAL

Los experimentos anteriores indican la existencia de una PGA membranaral diferente a la PGA soluble. Sin embargo, esta actividad de PGA membranaral es muy pequeña comparada con las otras actividades degradativas contra el TRH. Esto puede ser debido a que la PGA membranaral se encontrara en vesículas osmoticamente resistentes, y en nuestras condiciones, no se estaria expresando toda su actividad enzimática. Por ésto, se decidió estudiar el efecto de algunos detergentes en condiciones tales que produjeran la solubilización de las membranas. Se usaron varios detergentes ya que no existe ninguno que pueda ser designado como el más efectivo, de hecho, el detergente óptimo para una protefna membranaral debe ser encontrado empíricamente.

	FORMACION DE HIS-PRO pmolas/min mg	FORMACION DE HIS-PRO pmolas/min mg
CONTROL	20.0 \pm 1.6 (4)	3.2 \pm 0.8 (4)
TRITON 0.1%	16.8 \pm 0.8 (4)	3.2 \pm 0.8 (4)
DOC 0.1%	4.0 \pm 0.8 (4)	2.4 \pm 0.8 (4)
CHAPS 10mM	14.4 \pm 1.6 (4)	3.2 \pm 0.8 (4)
Saponinas 0.1%	17.6 \pm 3.2 (4)	4.0 \pm 0.8 (4)

Tabla 5. Efecto de detergentes en la actividad degradativa a nivel membranar

Las muestras se preincubaron durante 10 minutos con cada detergente (en la tabla se indica la concentración final respectiva) luego se agregó el ($^3\text{H-Pro}$)TRH, y se procedió según lo indicado en Materiales y Métodos. Los datos expresan la media \pm la desviación estándar. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

Como se muestra en la tabla 5, en ninguno de los casos ensayados, se obtuvo un aumento significativo en la actividad degradativa. Es más, cuando se usa deoxicolato de Na (DOC) hay una disminución en la actividad que forma His-Pro dicetopiperacina, y ésta es más significativa para la actividad que genera His-Pro. Es importante notar que - el DOC es capaz de unirse a iones divalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} y de esta forma puede tener un papel semejante al del EDTA. Estos resultados son, en ese sentido, concordantes con los obtenidos en las tablas 2 y 4.

REDUCCION DE LA ASOCIACION DE PROTEINAS NO MEMBRANALES A MEMBRANAS PLASMATICAS

Las características encontradas hasta el momento hacen a la PGA de membranas muy semejante a la enzima de suero encontrada por Bauer (Bauer y Nowak, 1979) y capaz de cortar al TRH en forma muy específica a nivel del residuo piroglutamilo.

Por otro lado, se ha reconocido que la actividad enzimática de suero y la asociada a vasos sanguíneos, se encuentra en muchos casos - contaminando las preparaciones cerebrales (Shaw y Cook, 1978). Por lo tanto, resultó necesario estudiar si la actividad de PGA de la fracción membranal se encontraba en forma constitutiva o asociada.

	FRACCION MEMBRANAL CONTROL	FRACCION MEMBRANAL LAVADO	% DESAPARICION DE ACTIVIDAD
LACTICO DESHIDROGENASA (nmolas/min mg)	13.0 \pm 3.0 (4)	7.0 \pm 3.0 (4)	46
FORMACION DE HIS-PRO (pmolas/min mg)	13.5 \pm 4.5 (4)	20.7 \pm 9.0 (4)	-
FORMACION DE TRHOH (pmolas/min mg)	4.2 \pm 0.6 (4)	1.8 \pm 0.6 (4)	57
FORMACION DE HIS-PRO (pmolas/min mg)	4.5 \pm 2.7 (4)	7.2 \pm 4.5 (4)	-

Tabla 6. Efecto del lavado de la fracción membranar con NaCl 1 N.

La fracción membranar se dividió en dos alícuotas: una se rehomogenizó en el amortiguador I conteniendo NaCl (concentración final 1N) según se indica en Materiales y Métodos, la otra se trató como de costumbre. Los resultados se expresan como actividad específica media \pm desviación estándar, el número de determinaciones se indica entre paréntesis.

Se hizo la prueba t para diferencia de medias y se encontró que las diferencias de medias entre control y lavado para la formación de His-Pro y de His-Pro, no es significativa, mientras que sí lo es para la láctico deshidrogenasa y para la formación de TRHOH con $P < 0.05$.

Se observó que esta actividad no se encuentra unida a membranas mediante enlaces electrostáticos ya que es resistente a los lavados con NaCl, de la misma forma que la actividad que genera His-Pro (Tabla 6). La actividad del marcador citoplasmático: LDH, así como la actividad que genera TRHOH, reconocida como enzima soluble, después del tratamiento, son reducidas en un 50% aproximadamente, mostrando un comportamiento completamente diferente al de las dos enzimas anteriores.

Estos resultados sugieren que la actividad de PGA membranal, no proviene de contaminación sérica.

CLASIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE PIROGLUTAMILAMINOPEPTIDASA MEMBRANAL

Se trató de estudiar algunas características de la PGA membranal y compararla con las actividades enzimáticas semejantes de la fracción soluble y sérica.

Se preparó suero y se estudió el patrón de degradación del TRH (Figura 7). Se encontró que en las condiciones del ensayo, el metabolito más importante comigra con la His-Pro dicetopiperacina y que existe un pico menor de prolina. Estos datos están de acuerdo con lo reportado previamente (Bauer y Nowak, 1979). El hecho de haber encontrado prolina significa que no hemos inhibido completamente la actividad de imidopeptidasa presente en suero. De cualquier manera, esta formación de prolina pro

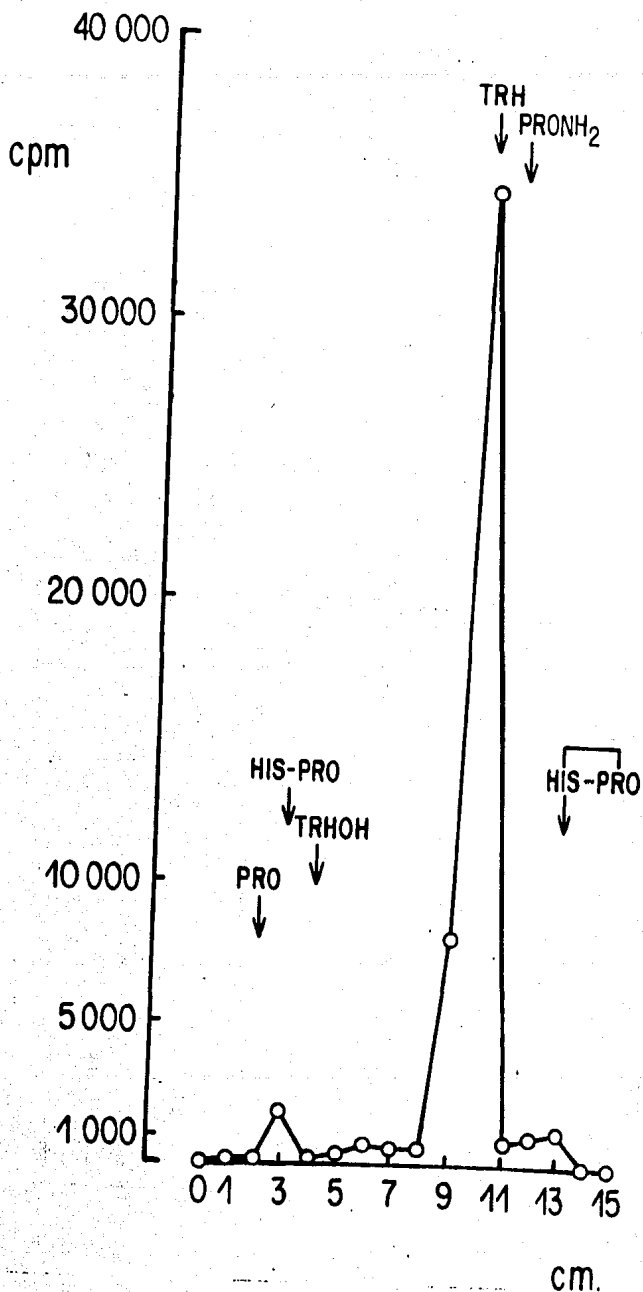


FIGURA 7. Patrón de Degradación del TRH al ser incubado con Suero.

El ³H-Pro)TRH se incubó con la fracción sérica durante 15 minutos en la solución amortiguadora I, según se indica en Materiales y Métodos.

	FRACCION SOLUBLE		FRACCION MEMBRANAL		FRACCION SERICA	
	FORM. TRH/H	FORM. HIS-PRO	FORM. HIS-PRO	FORM. HIS-PRO	FORM. PRO	FORM. HIS-PRO
CONTROL	100 \pm 5	100 \pm 5	100 \pm 20	100 \pm 5	100 \pm 18	100 \pm 22
EDTA 0.5 mM	n.m.	n.m.	100 \pm 6	75 \pm 7	54 \pm 18	94 \pm 30
EGTA 0.5 mM	n.m.	n.m.	80 \pm 8	67 \pm 7	61 \pm 5	148 \pm 15
1-10 F. 0.5 mM	n.m.	n.m.	64 \pm 5	33 \pm 7	0	6 \pm 6
DTT 5.0 mM	98 \pm 10	118 \pm 5	38 \pm 4	33 \pm 7	56 \pm 10	93 \pm 18
DTT 0.5 mM	n.m.	n.m.	84 \pm 28	50 \pm 20	102 \pm 2	98 \pm 12
IA 5.0 mM	30 \pm 20	0	76 \pm 2	100 \pm 25	118 \pm 4	126 \pm 40
IA 0.5 mM	270 \pm 20	0	40 \pm 10	73 \pm 20	102 \pm 20	143 \pm 30
PMSF 2.5 mM	43 \pm 2	128 \pm 44	110 \pm 10	150 \pm 25	190 \pm 10	146 \pm 24
PMSF 0.5 mM	100 \pm 15	124 \pm 15	135 \pm 10	112 \pm 12	n.m.	n.m.
Bac. 10.0 mM	20 \pm 5	40 \pm 10	0	140 \pm 12	0	82 \pm 29
Bac. 2.5 mM	30 \pm 5	126 \pm 10	0	300 \pm 12	n.m.	n.m.
Bac. 0.5 mM	37 \pm 5	147 \pm 10	0	325 \pm 25	0	365 \pm 90
I.T. 10,000 U/ml	21 \pm 6	150 \pm 5	100 \pm 5	100 \pm 7	175 \pm 10	131 \pm 10
I.T. 1,000 U/ml	95 \pm 5	110 \pm 15	108 \pm 5	92 \pm 7	167 \pm 5	141 \pm 22

Tabla 7. Efecto de diferentes inhibidores sobre las actividades enzimáticas contra TRH de cerebro y de suero

Las preparaciones enzimáticas se preincubaron durante 10 minutos con cada inhibidor (en la tabla se indica la concentración final respectiva) luego, se agregó el (³H-Pro)TRH. La fracción soluble se incubó en el amortiguador II (Tris 50 mM DTT 2 mM EDTA 1 mM pH 7.4) durante 30 minutos, la membranal en el amortiguador I (Tris 50 mM pH 7.4) durante 60 minutos y la sérica en el amortiguador I (Tris 50 mM pH 7.4) durante 15 minutos. Se procedió según lo indicado en Materiales y Métodos. Se hicieron 4 determinaciones en cada caso. Los datos indican la media \pm la desviación estándar. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad específica del control. n.m. = no medido.

viene de una subsecuente degradación de His-Pro NH_2 por lo que la actividad total de PGA debe ser considerada como la suma de la formación de ambos metabolitos.

La clasificación de las proteinasas se hace en función del mecanismo catalítico de sus centros activos, y esto se estudia mediante el uso de inhibidores (Barrett, 1975).

En la tabla 7 se indican los inhibidores usados así como su concentración.

Los cuatro primeros inhibidores señalados: EDTA, EGTA, 1-10 - fenantrolina 1-10 F y DTT son agentes quelantes de metales, indicados para la caracterización de metaloproteasas (E.C. 3.4.24). Como se indica en dicha tabla, estos cuatro factores producen una inhibición en la actividad de PGA membranal que oscila entre un 25 y un 65%, y que, correlaciona con una inhibición de la actividad que genera His-Pro (entre un 15 y un 60% de inhibición). A nivel soluble no fue medido el efecto de estas sustancias, pero para el análisis remitimos a las tablas 2 y 4, en donde queda claro que el efecto es opuesto, para el caso de la PGA, produciéndose una activación enzimática. Para el caso de la enzima que genera TRHOH, hemos visto que estos agentes no afectan la actividad enzimática a nivel soluble y, como se mencionó, hemos concluido que la actividad encontrada a nivel membranal es simplemente contaminación soluble. Por otro lado, resulta que a nivel sérico, los

quelantes usados en las concentraciones indicadas, no afectan significativamente la formación de dicetopiperacina, a excepción de la 1-10 F, con la que se encuentra una inhibición completa. Por otra parte, estos factores afectan la producción de prolina (inhibición de 50% aproximadamente) de donde deducimos indirectamente que están afectando a la PGA. La PGA sérica ha sido clasificada como metaloproteasa (Bauer, 1983). Con estos datos resulta que la PGA de membranas, al igual que la sérica, se comporta como una metalproteinasa.

La iodoacetamida (IA) es un agente alquilante que actúa a nivel de los grupos sulfhidrilos y se usa para caracterizar las tiolproteinasa (E.C. 3.4.22). Ha sido usada para inhibir la PGA soluble, sobre la que produce una inhibición completa (Tabla 7) (Bauer y Kleinkauf, 1980). A la concentración de 0.5 mM se observa una correlativa activación de la enzima que genera TRHOH (PPCE). Esto puede ser explicado debido al aumento en la disponibilidad de sustrato por la enzima (Bauer y Kleinkauf, 1981). Sin embargo, a una concentración mayor, produce una inhibición de esta enzima (PPCE), lo cual puede ser explicado en función de que recientemente se ha reconocido que se encuentran grupos sulfhidrilos vinculados al sitio activo de la enzima, a pesar de que ésta haya sido clasificada como una serinproteinasa (Bauer, 1983). Por otra parte, la IA no parece ejercer un efecto significativo sobre las actividades de PGA membranal y sérica.

El fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) reacciona con los grupos oxhidrilos, usándose, por lo tanto, para clasificar las serinproteinasas (E.C. 3.4.21). Esta molécula a concentración de 2.5 mM tiene un efecto inhibitorio sobre la PPCE, la que ya ha sido clasificada como serinproteinasas (Koida y Walter, 1976), aunque, en forma concordante con lo reportado previamente es incapaz de actuar inhibiendo a esta enzima. Se observa además, que no inhibe las demás actividades enzimáticas.

También se observó que la bacitracina es capaz de inhibir la actividad de la PPCE, como ha sido reportado previamente (Mc Kelvy, 1976). El aumento de actividad de PGA, puede ser explicado de la misma forma que para el caso de la IA, por la existencia relativa de mayor concentración de sustrato. Sin embargo, es de hacer notar que la actividad que genera His-pro en la fracción membranal, así como la que genera Pro en la sérica, se encuentran completamente inhibidas, al mismo tiempo que la cantidad de dicetopiperacina se halla notoriamente incrementada en ambos casos.

Se ensayó también el efecto del inhibidor de la tripsina de páncreas bovino, no encontrándose efecto inhibitorio para ninguna de las actividades degradativas contra TRH.

A partir de esta tabla (Tabla 7) se deduce que la PGA de mem-

brana se comporta como una metalproteínasa similar a la sérica. La magnitud de las inhibiciones de los quelantes de metales es diferente para cada enzima. Esta variación puede ser atribuida a la existencia de dos enzimas distintas o a la existencia de una enzima única localizada en dos lugares, ya que las diferentes características, componentes y concentración de la fracción membranal y sérica pueden promover una protección diferencial a las enzimas.

ESTUDIO DE LA ESPECIFICIDAD DE LA ACTIVIDAD DE PIROGLUTAMILAMINOPEPTIDASA

Con objeto de estudiar la especificidad de la PGA membranal, se investigó el efecto de análogos de TRH (Tabla 8). Análogos tales como -TRH_{OH}, MeHisTRH y LHRH son capaces de competir con las actividades de PGA en los tres casos. Sin embargo, hay que hacer notar que por las características del ensayo, sólo sabemos si estas moléculas compiten o no por la unión al sitio activo, pero no sabemos si son pasibles de ser degradadas. Por otro lado, de acuerdo a lo reportado previamente (Bauer - y Nowak, 1979) la enzima de suero es incapaz de reconocer al sustrato sintético p-gluβnaftilamida y tampoco lo es la PGA de membrana (Tabla 8).

En la tabla 9 se muestra el efecto de péptidos sintéticos con estructura semejante al TRH. En contraste con lo reportado para la PGA soluble que es capaz de reconocer cualquier sustrato que tenga el grupo p-glutamilo en su extremo amino terminal (Busby et al, 1982; Bauer, 1983),

	FRACCION SOLUBLE	FRACCION MEMBRANAL		FRACCION SERICA	
	FORM. HIS-PRO	FORM. HIS-PRO	FORM. HIS-PRO	FORM. PRO	FORM. HIS-PRO
CONTROL	100 \pm 2	100 \pm 25	100 \pm 7	100 \pm 2	100 \pm 47
TRH	23 \pm 5	18 \pm 5	15 \pm 10	0	0
TRHON	6 \pm 1	0	30 \pm 5	21 \pm 5	30 \pm 3
(MeHis)TRH	46 \pm 10	100 \pm 35	70 \pm 15	47 \pm 5	50 \pm 17
LHRH	66 \pm 13	60 \pm 25	60 \pm 10	27 \pm 6	33 \pm 27
p-glu naftilamida	8 \pm 2	150 \pm 25	100 \pm 30	104 \pm 10	117 \pm 33

Tabla 8. Efecto de análogos del TRH sobre las actividades de piroglutamilaminopeptidasa cerebral y sérica.

Las preparaciones enzimáticas fueron incubadas con cada competidor (concentración final $10^{-4}M$) y $(^3H-Pro)TRH$. El análisis de los productos de degradación obtenidos se hizo según lo indicado en Materiales y Métodos. Se hicieron dos determinaciones para cada caso, se indica media y dispersión. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad específica del control.

FORMACION DE HIS-PRO

CONTROL	100 <u>+</u> 7
TRH	30 <u>+</u> 10
Glu-TRH	130 <u>+</u> 30
p-Glu-His-Gli	110 <u>+</u> 10
p-Glu-His-GliNH ₂	100 <u>+</u> 10
p-Glu-His-Pro-GliNH ₂	100 <u>+</u> 10

Tabla 9. Estudio de especificidad de la piroglutamilamino peptidasa membranal

Las preparaciones enzimáticas fueron incubadas con cada competidor (concentración final $5 \cdot 10^{-5}M$) y (3H -Pro)TRH. El análisis de los productos de degradación se hizo según lo indicado en Materiales y Métodos. Se hicieron dos determinaciones para cada caso, se indica la media y la dispersión. Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad específica del control.

las moléculas ensayadas no tuvieron ningún efecto en la actividad de -
PGA membranal.

Estos resultados muestran que la PGA encontrada en la fracción
membranal posee un mayor grado de especificidad que la enzima soluble.

ORIGEN DEL METABOLITO HIS-PRO

Como se indica en las figuras 3 y 4, y en las tablas 2 a 9, en
las incubaciones de la fracción membranal se produce otro metabolito:
His-Pro. Este se encuentra en alta cantidad cuando se usa la solución
de Tris que carece de DTT y EDTA (Tabla 2) y parece ser debido a una en
zima de membrana ya que no se modifica su actividad después del lavado
de las membranas con NaCl (Tabla 6). Resulta imposible que provenga de
la acción de una única enzima actuando sobre el TRH. Por otro lado, a
partir de las figuras 8 y 9 se puede ver que aún a tiempos y concentra-
ciones de proteínas muy pequeñas se obtiene una gráfica curva en lugar
de la producción lineal del metabolito. Esto está de acuerdo con el he-
cho de que la enzima que produce His-Pro tiene una cantidad variable de
sustrato que va aumentando con el tiempo o con la concentración de pro-
teínas, a medida que progresa la reacción previa.

Este metabolito puede provenir por dos caminos diferentes (Figu-
ra 2).

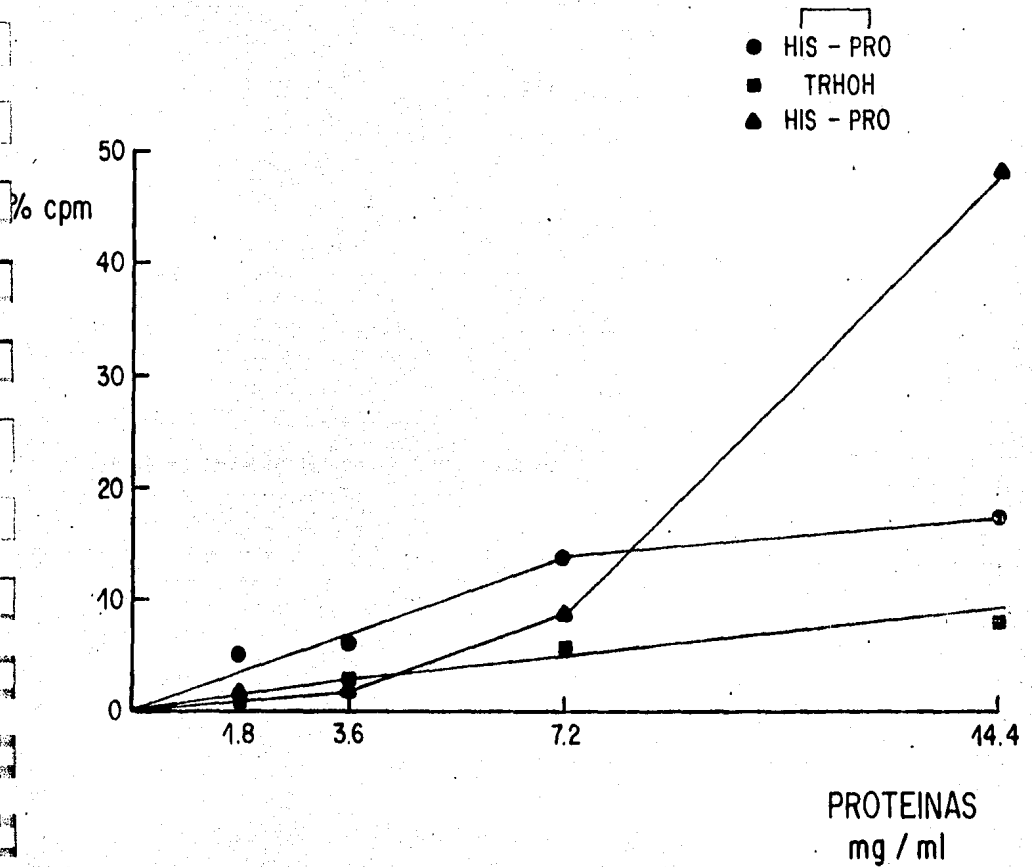


FIGURA 8. La fracción membranal se incubó durante 60 minutos en la solución amortiguadora I. Se muestra la aparición de los diferentes metabolitos correlacionada con la cantidad de proteína usada en la incubación. Los puntos indican promedio de duplicados.

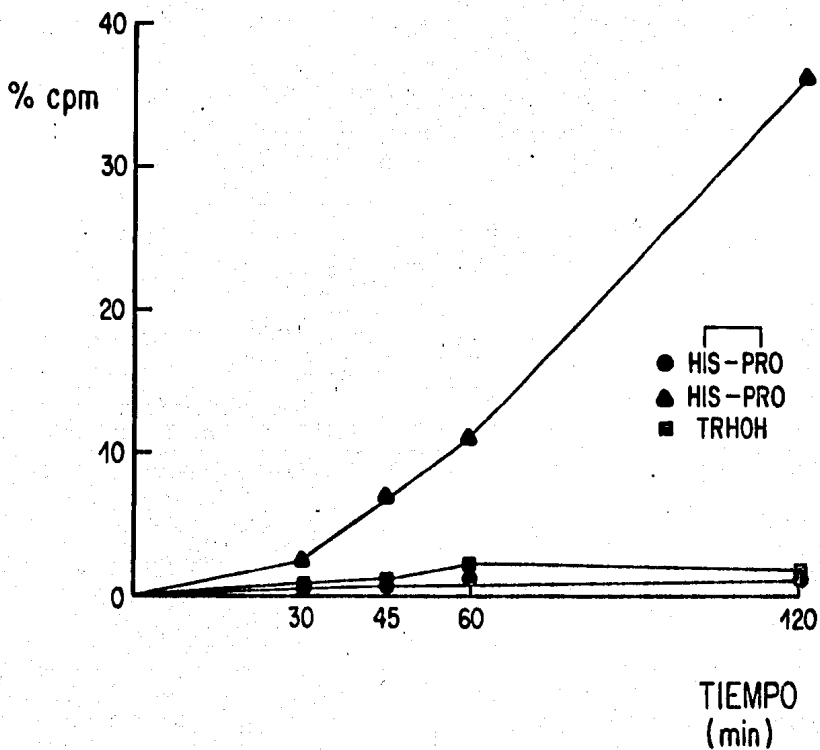


FIGURA 9. La fracción membranal (4.2 mg/ml) se incubó durante diferentes tiempos en solución amortiguadora I. Los puntos - indican promedio de duplicados.

- 1.- Acción de una PGA sobre el TRHOH
- 2.- Acción de una dipeptidildesaminasa (PPDA) sobre el His-Pro NH_2 , antes de que éste se ciclice para dar His-Pro dicetopiperacina (Bauer y Kleinkauf, 1980).

El primer camino parece poco probable, ya que los niveles de TRHOH en membrana son bajos, porque la enzima que lo produce se encuentra sólo como contaminante. Sin embargo, es importante notar que la PGA de membrana parece ser capaz de unirse al TRHOH y es posible que pueda actuar sobre éste para dar p-Glu y His-Pro, aunque existen reportes que califican al TRHOH como muy estable (Emerson et al, 1980).

El segundo camino parece más probable ya que por los resultados vistos hasta el momento, la formación de His-Pro sigue el comportamiento de la formación de His-Pro dicetopiperacina (Tablas 2 y 7) y se justifican además, los resultados encontrados para el inhibidor bacitracina (Tabla 7).

La PPCE y la PPDA, son muy semejantes en propiedades y sensibilidad a los inhibidores (Yoshimoto et al, 1978) y a partir de los resultados encontrados, parece ser que comparten la sensibilidad por la bacitracina. Al estar inhibida la PPDA, el His-Pro NH_2 pasa en forma espontánea y no enzimáticamente a dicetopiperacina únicamente. De esta manera se entiende que los niveles de dicetopiperacina están fuertemente incre-

mentados cuando la PPDA está inhibida.

Por otro lado, en los experimentos de lavados de membranas (Tabla 6), se observa que la producción de His-Pro permanece constante. Si éste proviniera del TRHOH debiera ocurrir una disminución significativa aún cuando la enzima fuera membranal.

Cuando se necesite medir la actividad de PGA en diferentes condiciones fisiológicas, resultará aconsejable inhibir la PPDA, y el inhibidor adecuado parece ser la bacitracina.

Es necesario aclarar que, para el análisis de estos experimentos, se tomó como actividad de PGA la aparición de His-Pro dicetopiperacina, pero como se deduce del análisis anterior, esto no es válido ya que la actividad de PGA produce His-Pro NH_2 y este metabolito en nuestras condiciones sufre dos metabolismos diferentes:

- 1.- en forma no enzimática se cicliza para dar His-Pro dicetopiperacina,
- 2.- por acción de la PPDA pasa a dar His-Pro.

En la mayoría de los casos la producción de His-Pro es mínima y por lo tanto, el error introducido también lo es, aunque, para el caso que más nos interesa (Amortiguador I), la actividad de PGA, se encuentra seriamente subvaluada. Aún así, ésta es la condición en la que se obser-

va el valor más alto de actividad.

UBICACION REGIONAL DE LA PIROGLUTAMILAMINOPEPTIDASA MEMBRANAL

Se compararon los niveles de degradación obtenidos en cerebro con los encontrados en hipotálamo y adenohipófisis. Se eligieron estas regiones porque tienen un alto contenido en TRH (Jackson y Reichlin, 1979). Por otro lado, el TRH está involucrado en la liberación de prolactina a partir de adenohipófisis (Grosvenor y Mena, 1980) y la His-Pro dicetopieracina ejerce in vitro un efecto inhibitorio (Bauer et al, 1978; Enjalbert et al, 1979). Por lo tanto, nos resultó interésante estudiar la distribución de la PGA membranaral en adenohipófi sis como posible fuente de His-Pro dicetopieracina.

En la tabla 10, se observa que el nivel en la formación de dicetopieracina en hipotálamo es muy semejante al de cerebro, aunque se ve una reducción en el nivel de formación de His-Pro. En términos generales, la degradación de adenohipófisis es menor que la observada para cerebro e hipotálamo, hecho que coincide con reportes previos (Loudes et al, 1978). Sin embargo, no parece haber correlación entre los niveles de sustrato o metabolito y niveles de actividad de la enzima (Tabla 11). De cualquier manera es probable que una gran parte de la His-Pro dicetopieracina presente en adenohipófisis provenga de la acción de la PGA sérica a nivel de sistema porta hipotálamo-hipofisiario.

	FORMACION DE HIS-PRO pmolas/min mg	FORMACION DE TRHOH pmolas/min mg	FORMACION DE HIS-PRO pmolas/min mg
ADENOHIPOFISIS	3.6 \pm 0.6 (4)	3.0 \pm 0.6 (4)	4.8 \pm 1.2 (4)
HIPOTALAMO	7.2 \pm 4.2 (10)	5.4 \pm 1.8 (10)	12.0 \pm 5.4 (10)
CEREBRO	17.1 \pm 1.8 (22)	6.0 \pm 1.2 (22)	9.9 \pm 1.8 (20)

Tabla 10. Comparación de los niveles degradativos membranales a nivel de adenohipófisis, hipotálamo y cerebro.

Las preparaciones membranales se hicieron como de costumbre en la solución amortiguadora I se procedió según lo indicado en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan como actividad específica media \pm desviación estándar. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

	TRH* pmolas/org	HIS-PRO pmolas/org.	PGA memb. # pmolas/min org.
ADENOHIPOFISIS	1.16	10.30	19.15
HIPOTALAMO	79.42	82.61	99.84

Tabla 11. Niveles de TRH, His-Pro Dicotopiperacina y Piroglutamil amino peptidasa membranal

* Datos tomados de Peterkofsky et al, 1982.

Se consideró que la actividad de PGA es equivalente a la suma de la formación de dicotopiperacina y de His-pro.

DISCUSION

A pesar de que un neuropéptido activo puede ser degradado por muchas peptidasas, lo importante es establecer cuál juega un papel regulatorio en la inactivación, es decir, aquella que tiene relevancia fisiológica.

Desde hace mucho tiempo se sabe que existen peptidasas capaces de actuar contra el TRH en suero y cerebro (Bauer y Lipmann, 1976). Se ha encontrado además que la mayor parte de esta actividad es soluble (80-90%) (Prasad y Peterkofsky, 1976; Joseph-Bravo et al, 1979, - Busby et al, 1982). Pero, a pesar de que las enzimas soluble muestran un cierto grado de especificidad hacia el sustrato, su accesibilidad cuestiona su importancia fisiológica.

Para que las enzimas solubles tengan relevancia en este sentido, una vez que el TRH sea liberado al espacio sináptico debe existir, o bien, una liberación concomitante de estas enzimas, o bien éstas deben actuar luego de un proceso de captura. El TRH puede ser recaptado en rebanadas de cerebelo (Pacheco et al, 1981) o de hipotálamo (Charli et al, 1983). Sin embargo, la velocidad máxima de este fenómeno es baja, por lo que la recaptura no puede explicar por sí sola la inactivación del péptido. Por otro lado, es importante hacer notar que ninguna de estas dos enzimas - muestran un patrón ontogénico semejante a los de las peptidasas clásicas

(Faivre-Baumann et al, 1981), ni son tejido específicas (Bauer, 1983).

En base a lo anterior, la presencia de una enzima específica en la fracción membranal de cerebro, resultaría muy importante. Además, se ha comprobado que para otros neuropéptidos como: encefalinas (Schwartz et al, 1981), LHRH (Elkabet al, 1981), sustancia P (Lee et al, 1981) y neurotensina (Mc Dermott et al, 1983) existen metaloproteinasas membranales específicas y que éstas posiblemente estén involucradas en los mecanismos de inactivación.

Nosotros hemos estudiado la degradación del TRH en las fracciones soluble y membranal de cerebro y verificamos que la actividad degradativa soluble es de mayor magnitud que la membranal, siendo necesario trabajar con la fracción membranal diez veces más concentrada (mg de proteína/ml) que la fracción soluble, e incluso incubando el doble de tiempo. Sin embargo, en función de lo antes expuesto, esta pequeña actividad degradativa ubicada a nivel membranal, puede tener una importancia fundamental.

Con respecto a las actividades solubles encontradas: desamidasa y piroglutamilaminopeptidasa, ambas corroboraron las características ya reportadas por otros autores (para una revisión ver Bauer, 1983).

En cuanto a las actividades degradativas membranales contra TRH,

UBICACION	SOLUBLE	MEMBRANAL	SERICA
PESO MOLECULAR	28,000	n. d.	260,000
QUELANTES DE METALES	ACTIVAN	INHIBEN	INHIBEN
IODOACETAMIDA	INHIBEN	SIN EFECTO	SIN EFECTO
p-GLUß NAFTIL-AMIDA	+	-	-

Tabla 12. Características de las PGA contra TRH

n. d. no determinado

+ - actúa como sustrato

- - no actúa como sustrato

encontramos que, en nuestras condiciones, se producen tres metabolitos: His-Pro, TRHOH y His-Pro dicetopiperacina, si se trabaja en ausencia de DTT y EDTA, mientras que los niveles de His-Pro dicetopiperacina e His-Pro son notoriamente inferiores en presencia de estos agentes.

Este hecho explica la controversia existente en la literatura en cuanto a la ubicación de la PGA cerebral (enzima responsable de la forma ción de His-Pro dicetopiperacina). De hecho, parecen existir dos actividades que se manifiestan en condiciones diferentes: una soluble sensible a oxidación y por lo tanto dependiente de la presencia de DTT para su expresión, y, otra membranal con características de metaloproteinasas que resulta inhibida por DTT y EDTA. La actividad membranal no puede ser considerada contaminación soluble debido a la diferencia de comportamiento y, si bien los constituyentes membranales podrían ejercer un efecto protector de la enzima soluble contaminante, y no requerirse así el agregado de DTT y EDTA para la expresión de su máxima actividad, no se justificaría que éstos tuvieran un efecto inhibitorio.

Atribuimos la existencia de TRHOH en esta fracción a una contaminación soluble, ya que los niveles de actividad de la desamidasa responsable de su producción (PPCE) correlacionan con los niveles de actividad del marcador soluble láctico deshidrogenasa y, además, son desplazable por altas concentraciones de iones, evidenciándose así, su asociación - electrostática a las membranas.

La PGA caracterizada como metaloproteínasa es la principal actividad enzimática detectada en este nivel. En la tabla 12 se resumen las propiedades de las tres PGA contra TRH: sérica, soluble y membranal. La PGA membranal es claramente diferente de la soluble, por su ubicación, clasificación y por su mayor grado de especificidad, siendo muy parecida a la de suero, por lo que, se verificó que la presencia de esta actividad a nivel membranal no proviene de contaminación sérica. De cualquier manera, con los datos obtenidos hasta el momento no podemos saber si realmente se trata de dos enzimas diferentes, o de la misma enzima ubicada en compartimentos distintos, ya que no se ha podido diferenciar claramente la enzima membranal y la sérica ni frente a inhibidores ni frente a competidores. Para ésto, es necesaria la purificación de la enzima membranal y, la posterior determinación de sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular, etc.).

Es importante hacer notar que muchos neuropéptidos tienen el residuo piroglutamilo en el extremo amino terminal (neurotensina, LHRH y bombesina) sin embargo, no se conoce, hasta el momento, el papel del piroglutámico en la degradación de estos neuropéptidos.

La PGA produce His-Pro NH_2 el que puede ciclizarse en forma no enzimática para dar His-Pro dicetopiperacina, o sufrir una hidrólisis enzimática por medio de la PPDA membranal para dar His-Pro. Este metabolito sigue el mismo comportamiento que la His-Pro dicetopiperacina

frente a inhibidores, competidores y frente a los lavados con NaCl, todo lo que hace pensar que proviene fundamentalmente de la acción enzimática sobre el His-Pro NH₂, producto de la PGA membranar. Por lo tanto, el nivel de dicetopiperacina producido en esta fracción es regulado por la actividad de la PGA y la PPDA.

Creemos que un mecanismo posible de inactivación del TRH, una vez que éste es liberado al espacio sináptico, es la degradación a partir de las enzimas membranales (Figura 10). Si bien nuestra preparación de membranas incluye membranas plasmáticas así como membranas de organelos, es necesario resaltar que en un trabajo previo (Greaney et al, 1980) trabajando en condiciones tales que se manifiesta la PGA membranar se observó que esta enzima se encuentra específicamente en membrana sinaptosomal. No podemos asegurar lo mismo para la PPDA, para la que no se han hecho estudios a nivel de membranas sinaptosomales, pero, sí sabemos que ésta es una enzima de membrana (Bauer y Kleinkauf, 1980). Todos estos datos apoyan nuestra hipótesis. Sin embargo, resulta importante estudiar la posibilidad de recaptura de los metabolitos del TRH involucrados, como mecanismo alternativo de control de dicetopiperacina, así como la influencia de enzimas solubles presentes en el espacio sináptico.

La diferencia del esquema de degradación propuesto con el de Bauer y Kleinkauf, 1981 (Figura 2) radica en el hecho de que en nuestro

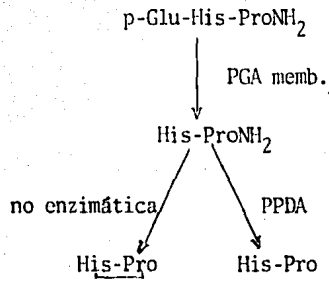


FIGURA 10. Mecanismo de Degradación del TRH propuesto a nivel de membranas plasmáticas de cerebro de rata.

caso estamos involucrando enzimas membranales solamente, mientras que ellos incluyen enzimas solubles y membranales obviando la ubicación - subcelular de cada una de ellas y posibles pasos de recaptura.

A pesar de que se han aislado muchas peptidasas para diferentes neuropéptidos, hasta el momento, no se conoce ninguna exclusiva del SNC. Para el TRH, se ha encontrado que las enzimas cerebrales solubles (PPCE y PGA) están ampliamente distribuidas. En este trabajo se estudió la actividad de la PGA membranal en relación al contenido de TRH e His-Pro-dicetopiperacina y se encontró que el nivel de actividad enzimática en adenohipófisis es inferior al de hipotálamo, aunque en ambos casos es muy alto comparado con los valores de sustrato y producto. En general, la actividad de las peptidasas de cerebro es muy alta, lo que explica - el bajo nivel de los péptidos en cerebro. De cualquier manera se requiere un mayor conocimiento en cuanto a la localización de esta enzima.

Con los datos obtenidos, no podemos todavía asegurar que la PGA membranal sea una enzima inactivante en condiciones fisiológicas. En la tabla 12 se enumeran una serie de criterios desarrollados para peptidasas que actúan contra las encefalinas para definir las como neuropeptidasas sinápticas (Schwartz et al, 1982). En forma análoga podemos relacionarlo con lo que se sabe para la PGA de membranas contra TRH.

El primer criterio, que busca la terminación de la actividad -

1. LOS PRODUCTOS DE HIDROLISIS SON BIOLOGICAMENTE INACTIVOS.
2. LA ENZIMA ESTA ESTRATEGICAMENTE UBICADA PARA PRODUCIR LA HIDROLISIS DE LOS NEUROPEPTIDOS LIBERADOS A LA SINAPSIS.
3. LA ESPECIFICIDAD POR EL SUSTRATO DA CUENTA DEL AUMENTO EN ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LOS ANALOGOS SINTETICOS.
4. LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DEBE EXHIBIR CAMBIOS ADAPTATIVOS PARA MODIFICAR LA NEUROTRANSMISION.
5. LA INHIBICION ENZIMATICA DEBE PROTEGER AL NEUROPEPTIDO LIBERADO A LA SINAPSIS.
6. LA INHIBICION ENZIMATICA DEBE REPRODUCIR LA ACCION BIOLOGICA DEL NEUROPEPTIDO.

Tabla 13. Criterios para la identificación de neuropeptidasas inactivantes (Schwartz et al, 1981).

biológica del neuropéptido, no parece ser cumplido por la PGA membranal ya que uno de los posibles productos, la His-Pro dicetopiperacina, tiene múltiples efectos a nivel de SNC, y si bien algunos de ellos son antagónicos, en otros la His-Pro dicetopiperacina es un fuerte agonista del TRH (Peterkofsky et al, 1982). Por lo tanto, la PGA membranal no podría ser la responsable única de la terminación de la acción, pero, ésta podría ser alcanzada si se diera por lo menos, alguna de estas condiciones.

- 1.- La His-Pro dicetopiperacina tiene una acción biológica contraria al TRH (en este caso la regulación por la PGA es de suma importancia).
- 2.- Inmediata recaptura del metabolito His-ProNH₂.
- 3.- Rápida acción de la PPDA.
- 4.- Ausencia de receptores para His-Pro dicetopiperacina en la sinapsis del TRH.

Para otros neurotransmisores como por ejemplo, las catecolaminas, existe además, la acción concordada de más de un proceso en su inactivación.

Creemos que, idealmente, uno debiera identificar la peptidasa en la sinapsis TRHérgica, de cualquier manera, los datos disponibles hasta el momento (presencia a nivel de membrana sinaptosomal, Greaney et al, 1980) apuntan en un buen sentido.

Se han hecho algunos estudios sobre degradación de análogos del TRH (Griffiths et al, 1983; Brewster et al, 1983; Richards et al, 1983) buscando comprender los mecanismos de acción y su propia actividad biológica. Uno de los análogos más importantes en ese sentido es el (3 Me-His) TRH que posee una mayor actividad biológica que el TRH (Oliver et al, 1978; Taylor y Burt, 1981). Griffiths (1982) encontró que este análogo es más resistente que el TRH a la degradación por la fracción membranal (trabajando en condiciones tales que se expresa la PGA membranal). Sin embargo, en otros estudios (Simasko y Horita, - 1982) se encontró que el análogo metilado tiene 7 veces más afinidad que el TRH por el receptor a nivel de SNC. Su mayor actividad puede provenir entonces, de la acción combinada de estos dos fenómenos.

En cuanto a los tres últimos criterios no hay datos en la literatura, por lo que se hace interesante estudiar los niveles de PGA membranal y PPDA en aquellos casos patológicos donde está modificada la relación de concentraciones de TRH y His-Pro dicetopiperacina (Prasad et al, 1977; 1978; Mori et al, 1982).

De la revisión de estos criterios para neuropeptidasas inactivantes resulta claro que se necesita realizar muchos estudios para poder asegurar que la PGA membranal pertenece a este grupo de enzimas. - Estos criterios fueron establecidos para aclarar cuales de las enzimas capaces de degradar a las encefalinas podían ser consideradas como neu-

ropeptidasas inactivantes, sin embargo, es probable que no se cumplan necesariamente para todos los neuropéptidos o que estos criterios adopten formas especiales según cada caso.

Por otro lado, es necesario considerar también, que la acción del TRH no se da a través de un mecanismo clásico de neurotransmisión, sino que está involucrada una comunicación parácrina y entonces los mecanismos de inactivación podrían ser diferentes a los que se esperarían para el primer caso.

En conclusión se puede decir que al presente, el conocimiento del papel de las proteinasas en el Sistema Nervioso Central, es muy escaso. Resulta necesario estudiar la localización subcelular y regional, la especificidad e influencias de activadores e inhibidores endógenos para poder así formular hipótesis sobre sus mecanismos de acción y su vinculación con la regulación del recambio de neuropéptidos. Esto a su vez, puede facilitar el desarrollo de agentes terapéuticos potentes a de larga duración que incrementen los efectos fisiológicos de los neuropéptidos.

BIBLIOGRAFIA

- Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nishi, N. y Schally, A.V. (1975) Somatostatin: Abundance of Immunoreactive Hormone in Rat Stomach and Pancreas. Science 199, 1007-1009.
- Barnea, A., Ben-Jonhattan, N. y Porter, J.C. (1976) Characterization of Hypothalamic Subcellular Particles Containing Luteinizing Hormone Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone, J. Neurochem. 27, 477-484.
- Barnea, A., Neares, W.B., Cho, G. y Porter, J.C. (1978) A Subcellular Pool of Hypoosmotically Resistant Particles Containing Thyrotropin Releasing Hormone, Melanocyte Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the Rat Hypothalamus J. Neurochem. 30, 937-948.
- Barker, J. Jr. y Smith, T.G. (1980) The Role of Peptides in Neuronal Functions. (M. Dekker ed), New York.
- Bauer, K. (1976) Regulation of the Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone by Thyroid Hormones. Nature. 259, 591-593.
- Bauer, K. y Lipmann, F. (1976) Attempts Toward the Biosynthesis of the Thyrotropin Releasing Hormone and Studies on its Breakdown in Hypothalamic Tissue Preparations. Endocrinology 99, 230-245.
- Bauer, K., Graf, K.J., Faivre-Baumann, A., Beier, S., Tixier-Vidal, A. y Kleinkauf, H. (1978) Inhibition of Prolactin Secretion by Histidil-Proline Diketopiperazine. Nature. 274, 174-177.

- Bauer, K. y Nowak, P. (1979) Characterization of a Thyroliberin Degrading Serum Enzyme Catalyzing the Hydrolysis of Thyroliberin at the Pyroglutamyl Histidine Bound, J. Biochem. 99, 239-246.
- Bauer, K. y Kleinkauf, H. (1980) Catabolism of Thyroliberin by Rat Adenohypophyseal Tissue Extract. J. Biochem. 106, 107-117
- Bauer, K., Kleinkauf, H. y Flohé, L. (1981) Degradation of TRF and TRF Analogues by Brain and Serum Enzymes. En Structure and Activity of Natural Peptides (W. Voelter y G. Weitzel ed) pp. 437-447, Walter de Gruyter, Berlín.
- Bauer, K. (1983) Biochemical Properties of TRH Inactivating Enzymes. En Thyrotropin Releasing Hormone. (F.C. Griffiths y G.W. Bennett ed.) pp 103-107. Raven Press, New York.
- Baxter, D.A., Johnston, D. y Strittmater, W.J. (1983) Protease Inhibitor Implicate Metalloendoprotease in Synaptic Transmission at the Mammalian Neuromuscular Junction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4174-4178.
- Barret, A.J. (1980) The Many Forms and Functions of Cellular Proteinases. Federation Proceedings. 39, 9-14.
- Blackwell, R.E. y Guillemin, R. (1973) Hypothalamic Control of Adenohypophyseal Secretion. Ann. Rev. Physiol. 35, 357-390.
- Bolten, P., Esch, F., Brazeau, P., Ling, N. y Guillemin, R. (1983) Isolation and Characterization of the Porcine Hypothalamic Growth Hormone Releasing Factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 726-734.

- Boler, J., Enzymann, F., Folders, K., Bowers, C.Y. y Schally, A.V. (1969) The Identity and Chemical Properties of TRH and Pyroglutamyl-Histidyl-Prolineamide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 705-710.
- Bowers, C.Y., Lev, K.L. y Scalli, A.V. (1968) A Study on the Interaction of the Thyrotropin Releasing Factor and L Triiodothyronine: Effects of Puromicine and Cicloheximide. Endocrinology. 82, 75-82.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J. y Guillemin, R. (1973) Hypothalamic Peptides that Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. Science. 197, 77-78.
- Bray, G.A. (1970) En The Current State of Liquid Scintillation Counting. (E.D. Brandson ed.) pp 170, Grune y Stratton, New York.
- Brewster, D. (1983) Species Variations in TRH Inactivation: Advantages of Stable Analogues, en Thyrotropin Releasing Hormone. (E.C. Griffiths y G.W. Bennett ed.) pp 109-118. Raven Press, New York.
- Brownstein, M.J., Utiger, R.D., Palkovitz, M. y Kizer, J.S. (1975) Effects of Hypothalamic Deafferentation on Thyrotropin Releasing Hormone Levels in Rat Brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 4177-4179.
- Brownstein, M.J., Eskay, R.L. y Palkovitz, M. (1982) Thyrotropin Releasing Hormone in the Median Eminence is in Processes of Paraventricular Nucleus Neurons. Neuropeptides. 2, 197-201.
- Burgus, R., Dunn, T.F., Desiderio, D., Ward, D., Vale, W. y Guillemin, R. (1970) Characterization of the Hypothalamic Hypophysiotropic TSH Releasing Factor (TRF) of Bovine Origin. Nature. 226, 321-325.

- Burt, D.R. y Snyder, S.H. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH): Apparent Receptor Binding in Rat Membranes. Brain Res. 93, 309-315.
- Burt, D.R. y Taylor, R.L. (1980) Binding Sites for Thyrotropin Releasing Hormone in Sheep Nucleus Accumbens Resemble Pituitary Receptors. Endocrinology. 106, 1416-1423,
- Busby, W.H. Jr., Youngblood, W.W. y Kizer, J.Z. (1982) Studies of Substrate Requirements Kinetic Properties and Competitive Inhibitors of the Enzyme Catabolizing TRH in Rat Brain. Brain Res. 242, 261-270.
- Charli, J.L., Ponce, G., Mc Kely, J.F. y Joseph-Bravo, P. (1983). Accumulation of Thyrotropin Releasing Hormone by Rat Hypothalamic Slices. J. Neurochem. en prensa.
- Dawson, R.M., Elliot, D.C., Elliot, W.H; y Jones, K.M. (1978) Methods for the Detection of Biochemical Compounds on Paper and Thin Layer Chromatography with Some Notes in Separation, en Data for Biochemical Research. (idem ed.) pp 509-591, Oxford University Press, Oxford.
- de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. y Appelmans, F. (1955) Tissue Fractionation Studies, Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in Rat Liver Tissue. Biochem. J. 60, 601-617.
- de Duve, C. (1963) The Separation and Characterization of Subcellular Particles Harvey Lectures. 59, 49-87.
- De Martino, G. y Croall, D. (1982) Calcium Dependent Proreases in Neuroblastoma Cells. J. Neurochem. 38, 1642-1648.

- Elkabes, S., Fridkin, M. y Koch, Y. (1981) Studies on the Enzymatic Degradation of Luteinizing Hormone Releasing Hormone by Rat Pituitary Plasma Membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 240-248.
- Emerson, C., Vogel, W., Curriel, L.B. y Okal, T. (1980) Concentration of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and Deamidase Activity in Brain. Endocrinology. 107, 443-449
- Enjalbert, A., Ruberg, M., Arancibia, S., Priam, M., Bauer, K. y Kordon, C. (1979) Inhibition of In Vitro Prolactin Secretion by Histidyl-Proline Diketopiperazine, a Degradation Product of TRH. Eur. J. Pharmacol. 58, 97-102.
- Evans, W.H. (1980)a Methods of Cell Breakage: Assessing their Suitability and Efficacy, en Preparation and Characterization of Mammalian Plasma Membranes (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology V 7) pp 30. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Evans, W.H. (1980)b General Methods for the Preparation of Plasma Membranes, en Preparation and Characterization of Mammalian Plasma Membranes, (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology V 7) pp 45. North Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Faivre-Bauman, A., Knisatchek, H., Tixier-Vidal, A. y Bauer, K. (1981) Ontogenesis of Neuropeptides Degrading Enzymes in the Mouse Brain. J. Neurosc. Res. 6, 63-74.
- Garat, B., Miranda, J., Charli, J.L. y Joseph-Bravo, P. (1984) Presence of a Membrane Bound Pyroglutamyl Amino Peptidase Degrading Specifically Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain. Sometido a publicación J. Neurosc.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Gershengorn, M.C., Rebecchi, M.J., Geras, E. y Arévalo, C.D. (1980) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Action in Mouse Thyrotropic Tumor Cell in Culture: Evidence against a Role for Adenosine 3'-5' Monophosphate as a Mediator of TRH Stimulated Thyrotropic Release. Endocrinology. 107, 665-670.
- Grant, G., Vale, W. y Guillemin, R. (1972) Interaction of Thyrotropin Releasing Factor with Membranes Receptors of Pituitary Cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 28-33.
- Greaney, A., Phelan, J. y O'Cuinn, G. (1980) Localization of Thyroliberin pyroglutamyl-aminopeptidase on Synaptosomal Membrane Preparation of Guinea Pig Brain Tissue. Biochem. Trans. 588th Meeting, Belfast, 483.
- Green, J.D. y Harris, G.W. (1949) Observation of the Hypophysoportal Vessels of the Living Rat. J. Physiol. (London) 108, 359.
- Griffiths, E.C., Kelly, J.A. White, N. y Jeffcoate, S.L. (1980) Further Studies on the Inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) by enzymes in the Rat Hypothalamus. Acta Endocrin. 93, 385-391.
- Griffiths, E.C., Mc Dermott, J.R. y Smith, A.I. (1982) Inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and (3Me-His)TRH by Brain Peptidases Studied by High-Performance Liquid Chromatography Neurosc. Letters. 28, 61-65.
- Griffiths, E.C., Mc Dermott, J.R. y Visser, T. (1983) Mechanism of TRH Inactivation: Physiological Significance of TRH Degrading Enzymes. en Thyrotropin Releasing Hormone. (E.C. Griffiths y G.W. Bennet ed.) pp 85-94, Raven Press, New York.

- Grosvenor, C.E. y Mena, F. (1980) Evidence that Thyrotropin Releasing Hormone and Hypothalamic Prolactin Releasing Factor may Function in the Release of Prolactin in the Lacting Rat. Endocrinology. 107, 863-868.
- Guillemin, R., Yamazaki, E., Gard, D.A., Justiss, M. y Sakiz, E. (1963) In Vitro Secretion of Thyrotropin (TSH), Stimulation by a Hypothalamic Peptide (TRF). Endocrinology. 73, 564-572.
- Hayes, D.J., Phelan, J.J. y O'Cuinn, G. (1979) The Metabolism of Thyrotropin Releasing Hormone by Guinea Pig Brain. Biochem. Soc. Transac. 58th Meeting, Galway, 59-62.
- Helenius, A., Mc Caslin, D.R., Fries, E. y Tandford, C. (1979) Properties of Detergents. en Methods in Enzymology. 56, 734-749.
- Hersh, K.B. y Mc Kely, J.F. (1979) Enzymes Involved in the Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and Luteinizing Hormone (LHRH) in Bovine Brain. Brain Res. 168, 553-564.
- Hinkle, P.M. y Tashjian, A.H. Jr. (1973) Receptors for Thyrotropin Releasing Hormone in Prolactin Producing Rat Pituitary Cells in Culture. J. Biol. Chem. 248, 6180-6185.
- Hinkle, P.M. y Tashjian, A.H. Jr. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone Regulates the Number of its Own Receptors in the GH₃ Strain of Pituitary Cells in Culture. Biochemistry. 14, 3845-3852.
- Hinkle, P.M. y Kinsella, P.A. (1982) Rapid Temperature Dependent Transformation of the Thyrotropin Releasing Hormone Receptor Complex in Rat Pituitary Tumor Cells. J. Biol. Chem. 257, 5462-5470.

- Hjelmeland, L.M. (1980) A Nondenaturing Zwitterionic Detergent for Membrane Biochemistry: Design and Synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6368-6370.
- Hockfelt, T., Fluxe, K., Johansson, O., Jeffcoate, S. y White, N. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Containing Nerve Terminals in Certain Brain Stem Nuclei and in the Spinal Cord. Neurosc. Letters 1, 133-139.
- Jackson, I.M.D. y Reichlin, S. (1977) Thyrotropin Releasing Hormone: Abundance in the Skin of the Frog Rana Pipiens. Science. 198, 414-415.
- Jackson, I.M.D. (1978) Extrahypothalamic and Phylogenetic Distribution of Hypothalamic Peptides. en The Hypothalamus (S. Reichlin, R. Baldessarini y J.B. Martin ed.) pp 217-231. Raven Press. New York.
- Jackson, I.M.D. y Reichlin, S. (1979) Distribution and Biosynthesis of TRH in the Nervous System. en Central Nervous Effects of Hypothalamic Hormones and other Peptides. (R. Collu, A. Barbeau, J.R. Ducharme y J.G. Rochefort ed.) pp 3-54, Raven Press, New York.
- Jeffcoate, S.L., Linton, E.A., Lira, O. y White, N. (1983) Age Dependent Changes in the Brain Content, Enzymic Inactivation and Hypophysiotropic Action of TRH in the Rat, en Thyrotropin Releasing Hormone (E.C. Griffiths y G.W. Bennett ed.) pp 145-155, Raven Press, New York.
- Johnson, N.K. y Whittaker, V.D. (1963) Lactate Dehydrogenase as a Cytoplasmic Marker in Brain. Biochem. J. 88, 404.

- Johansson, O., Hockfelt, T., Pernow, B., Jeffcoate, S.L., White, N., Steinbusch H.W.M., Verhofstad, A.A.J., Enson, P.C. y Spindel, E. (1981) Immunohistochemical Support for Three Putative Neurotransmitters in one Neuron: Coexistence of 5-HydroxyTryptamine, Substance P and Thyrotropin Releasing Hormone like Immunoreactivity in Medullary Neurons Projecting to the Spinal Cord. Neurosci. 6, 1857-1881.
- Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, P.M. y Kordon, C. (1979)a Effect of Neurotransmitters on the in vitro Release of Immunoreactive Thyrotropin Releasing Hormone from Rat Mediobasal Hypothalamus. Endocrinology. 104, 801-806.
- Joseph-Bravo, P., Loudes, C., Charli, J.L. y Kordon, C. (1979)b Subcellular Distribution of Brain Peptidases Degrading Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) and Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Brain Res. 166, 321-329.
- Kato, Y., Chiaia, K., Maada, K., Ohgo, S., Okanish, Y. e Imura, H. (1975) Plasma Growth Hormone Responses to TRH in the Urethane Anesthetized Rat. Endocrinology. 96, 1112-1114.
- Koida, M. y Walter, R. (1976) Post Proline Cleavage Enzyme: Purification of this Endopeptidase by Affinity Chromatography. J. Biol. Chem. 251, 7593-7599.
- Kubek, M.J., Lorincz, M.A. y Wilbur, J.F. (1977) The Identification of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) in Hypothalamic and Extrahypothalamic Loci of the Human Nervous System. Brain Res. 126, 196-200.

- Lee, C.M., Sandberg, B.E.B., Hanley, M.R. y Iversen, L.L. (1981)
Purification and Characterization of a Membrane Bound Substance
P Degrading Enzyme from Human Brain. Eur. J. Biochem. 114, 315-327
- Loudes, C., Joseph-Bravo, P., Leblanc, P. y Kordon, C. (1978) Specific
Activity of LHRH and TRH Degrading Enzymes in Various Tissues of
Normal and castrated Rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 83
921-926.
- Lowry, O.H. y Rosenbrough, N.J. (1951) Protein Measurements with Folin
Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Marchbanks, R.M. (1975) Subcellular Fractionation. en Methods in Brain
Research (P.B. Bradley ed.) pp 113-172, John Wiley and Sons Ltd,
London.
- Martin, J.B., Renaud, L.P. y Brazeau, P. (1975) Hypothalamic Peptides:
New Evidences for Peptidergic Pathways in the CNS. Lancet. 2,
303-395.
- Matsui, T., Prasad, C. y Peterkofsky, A. (1979) Metabolism of Thyrotropin
Releasing Hormone in Brain Extracts. J. Biol. Chem. 2439-2445.
- Matsuo, H., Bata, Y., Nair, R.M.G., Arimura, A. y Schally, A.V. (1971)
Structure of Porcine LH and FSH Releasing Hormone I. The proposed
Aminoacid Sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1334-1339.
- Mc Dermott, J.R., Smith, A.I., Dodd, P.R., Hardy, J.A. y Edwardson, J.A.
(1983) Mechanism of Degradation of LHRH and Neurotensin by
Synaptosomal Peptidases. Pentides. 4, 25-30.

- Mc Kelvy, J.F. (1974) Biochemical Neuroendocrinology. I. Biosynthesis of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) by Organ Cultures of Mammalian Hypothalamus. Brain Res. 65, 489-502.
- Mc Kelvy, J.F., Leblanc, P., Loudes, C., Perries, S., Grimm-Jorgensen, Y. y Kordon, C. (1976) The Use of Bacitracin as an Inhibitor of the Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone and Luteinizing Releasing Hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 507-515.
- Mc Kelvy, J.F., Lin, C.J., Chan, L., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Pacheco, M., Paulo, M., Neale, J. y Barker, J. (1979) Biosynthesis and Degradation of Peptides in the Nervous System. En Brain Peptides: A New Endocrinology (A.M. Gotto, E.J. Peck y A.E. Boyd ed.) pp 183-186, Elsevier, Amsterdam.
- Mitnick, M.A. y Reichlin, S. (1971) Thyrotropin Releasing Hormone Biosynthesis by Rat Hypothalamic Fragments In Vitro. Science. 172, 1241-1243.
- Mitnick, M.A. y Reichlin, S. (1972) Enzymatic Synthesis of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) by Hypothalamic "TRH" Synthetase. Endocrinology. 91, 1146-1153.
- Moro, M., Prasad, C. y Wilver, F.J. (1982) Chronic Alcohol Consumption Increase Cyclo (His-Pro)-Like Immunoreactivity in the Rat Brain. J. Neurochem. 38, 1785-1786.
- Morley, J.E., Garvim, T.J., Perkey, A.E. y Hershman, J.M. (1977) Tyrotropin Releasing Hormone in Gastrointestinal Tract. Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 314-318.

- Morré, D.J., Cine, G.B., Coleman, R., Evans, W.H., Glauman, H., Headon, D.R., Reid, E., Siebert, G. y Widnell, C.C. (1979) Markers for Membranous Cell Components. Eur. J. Cell Biol. 20, 195-199.
- Nair, R.M.G., Barret, J.F., Bowers, C.Y. y Schally, A.V. (1970) Structure of Porcine Thyrotropin Releasing Hormone. Biochemistry. 9, 1103-1106.
- Naor, Z., Snyder, G., Fawcett, C.P. y Mc Cam, S.M. (1980) Pituitary Cyclic Nucleotides and Thyrotropin Releasing Hormone Action: The Relationship of Adenosine 3'-5'-Monophosphate and Guanosine 3'-5'-Monophosphate to the Release of Thyrotropin and Prolactin. Endocrinology. 106, 1304-1310.
- Neary, J.T., Kieffer, J.D? Federico P., Mover, H., Maloof, F. y Soodak, M. (1976) Thyrotropin Releasing Hormone Development of Inactivation System During Maturation of the Rat. Science. 193, 403-405.
- Oliver, C., Gillioz, P., Giraud, P. y Coute-Devolx, B. (1978) Degradation of TRH and Brain Homogenates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 1097-1102.
- Ogawa, N., Yamawaki, Y., Kuroda, H., Nukina, I., Ota, Z., Fujino, M y Yanaihara, N. (1982) Characteristics of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Receptors in Rat Brain. Peptides. 3, 669-677.
- Orlowsky, M., Wilk, E., Pearce, S. y Wilk, S. (1979) Purification and Properties of a Prolyl Endopeptidase from Rabbit Brain. J. Neurochem. 33, 461-469.
- Pacheco, M.F., Woodward, D.J., Mc Kelvy, J.F. y Griffin, W.S.T. (1981) TRH in Rat Cerebellum. II. Uptake by Cerebellar Slices. Peptides. 2, 238-288.

- Parker, C.R. Jr., Neaves, W.B., Barnea, A. y Porter, J.C. (1979) Studies on the Uptake of ^3H -TRH and its Metabolites by Synaptosomes Preparations of the Rat Brain. Endocrinology, 101, 66-71.
- Patel, Y.C. y Reichlin, S. (1978) Somatostatin in Hypothalamus, Extrahypothalamic Brain and Periphereal Tissues of the Rat. Endocrinology. 102.
- Peterkofsky, A., Battaini, F., Koch, Y., Takahara, Y. y Dannies, P. (1982) Histidyl-Proline Diketopiperazine: Its Biological Role as a Regulatory Peptide. Molec. Cell. Biochem. 42, 45-63.
- Prange, A.J. Jr., Nemeroff, C.B., Loosen, P.L., Bessete, G., Osbarr, A.J., Wilson, J.C. y Lipton, M.A. (1979) Behavioural Effects of Thyrotropin Releasing Hormone in Animals and Man. en Central Nervous System Effects of Hypothalamus Hormones and Other Peptides (R. Collu, A. Barbeau, J.R. Ducharme y J.G. Rochefort ed.) pp 75-96. Raven Press, New York.
- Prange, A.J. Jr. y Utiger, R.D. (1981) What Does Brain Thyrotropin Releasin Hormone Really Do? New England J. Med. 305, 1098-1090.
- Prasad, C. y Peterkofsky, A. (1976) Demonstration of a Pyroglutamyl Peptidase and Amidase Activity Toward TRH in Hamster Hypothalamus Extracts. J. Biol. Chem. 251, 3229-3234.
- Prasad, C., Matsui, T. y Peterkofsky, A. (1977) Antagonism of Ethanol Narcosis by Histidyl-Proline Diketopiperazine. Nature. 268, 142-144.

- Prasad, C., Matsui, T., Williams, J. y Peterkofsky, A. (1978) Thermo-Regulation in Rats: Opposing Effects of Thyrotropin Releasing Hormone and Its Metabolite Histidyl- Proline Diketopiperazine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1582-1587.
- Rastogi, R.B. (1979) Thyrotropin Releasing Hormone Influences on Behaviour: Possible Involvement of Brain Monoaminergic System. en Central Nervous System Effects of Hypothalamus Hormones and Other Peptides (R. Collu, J.R. Ducharme, A. Barbeau y J.G. Rochefort ed.) pp 123-140. Raven Press, New York.
- Reichlin, S. (1973) Hypothalamic-Pituitary Function. en Proceedings of the 4th International Congress of Endocrinology. Washington. pp 1-15. International Congress Series 273, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Renaud, L.P. y Martin, J.B. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Depresant Action on Central Neuronal Activity. Brain. Res. 86, 150-154.
- Richards, C., Boersma, A., Han, K.K., Morier, E. y Ripo, R. (1983) Enzymatic Cleavage of Pyroglutamyl-Histidyl Dopamine, a TRH Related Pseudopeptide by Porcine Serum and Brain Homogenates. Neuropeptides. 3, 223-232.
- Rupnow, J.H., Taylor, W. y Dixon, J.E. (1979) Purification and Characterization of a Thyrotropin Releasing Hormone Deamidase Activity from Rat Brain. Biochemistry. 18, 1206-1212.
- Schally, A.V., Bowers, C.Y. y Redding, T.W. (1966) Purification of Thyrotropic Hormone Releasing Factor from Bovine Hypothalamus. Endocrinology. 78, 726-732.

- Shaw, S.G. y Cook, W.F. (1978) Localization and Characterization of Aminopeptidases in the Central Nervous System and the Hydrolysis of Enkephalin. Nature. 274, 816-817.
- Simasko, S. y Horita, A. (1982) Characterization and Distribution of Tritium Labelled 2-(3 Me-His)TRH Receptors in Brain. Life Sci. 30, 1793-1800.
- Spindel, E. y Wurtman, R.J. (1980) TRH Immunoreactivity in Rat Brain Regions, Spinal Cord and Pancreas. Validation by High Pressure Liquid Chromatography. Brain Res. 201, 279-288.
- Sutton, C.A. y Martin, T.F.J. (1982) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Selectively and Rapidly Stimulates Phosphatidyl Inositol Turnover in GH cells: A Possible Second Step of TRH Action. Endocrinology. 110, 1273-1280.
- Szewezuk, A. y Mulczyk, M. (1969) Pyrrolidonyl Peptidase in Bacteria. Eur. J. Biochem. 8, 63-68.
- Szewezuk, A. y Kwiatowska, J. (1970) Pyrrolidonyl Peptidase in Animals Plants and Human Tissues. Eur. J. Biochem. 15, 92-96.
- Tashjian, A.M. Jr., Barowsky, N.J. y Jensen, D.K. (1971) Thyrotropin Releasing Hormone: Direct Evidence for Stimulating of Prolactin Production by Pituitary Cells in Culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 516-523.
- Tate, S. (1981) Purification and Properties of a Bovine Brain Thyrotropin Releasing Hormone Factor Deamidase. A Post Proline Cleavage Enzyme of Limited Specificity. Eur. J. Biochem. 118, 17-23.

- Taylor, R.L. y Burt, D.R. (1981) Preparation of (^3H - 3 Me- His)TRH as an Improved Ligand for TRH Receptors. Neuroendocrinology. 32, 310-316.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. y Rivier, J. (1981) Characterization of a 41 Residues Ovine Hypothalamic Peptide that Stimulates Secretions of a Corticotropin and Endorphin. Science. 213, 1394-1397.
- Weberg, J., Escay, R.L., Barnea, A., Reynolds, R.C. y Porter, J.C. (1977) Release of LHRH and TRH from Synaptosomal Enriched Fractions of Hypothalamic Homogenates. Endocrinology. 100, 814-825.
- Werman, R. (1966) Criteria for the Identification of a Central Nervous System Transmitter. Comp. Biochem. Physiol. 18, 745-766.
- Winokur, A. y Utiger, R.D. (1974) Thyrotropin Releasing Hormone: Regional Distribution in Rat Brain. Science. 185, 265-266.
- Wurtman, R.J. (1971) Brain Monoamines and Endocrine Functions. Neurosc. Res. Prog. Bull. 9, 172-297.
- Yanagisawa, T., Prasad, C. y Peterkofsky, A. (1980) The Subcellular and Organ Distribution and Natural form of Histidyl- Proline Diketopiperazine in Rat Brain Determined by Specific Radioimmunoassay. J. Biol. Chem. 255, 10290-10295.
- Yoshimoto, T., Fischl, M., Orlowsky, R.C. y Walter, R. (1978) Post-Proline Cleaving Enzyme and Post-Proline Dipeptidyl Aminopeptidase. J. Biol. Chem. 253, 3708-3716.

Youngblood, W.W., Lipton, M.A. y Kizer, J.S. (1978) TRH Like
Immunoreactivity in Urine, Serum and Extrahypothalamic Brain
Non Identity with Synthetic Pyroglutamylhistidylprolineamide
(TRH) Brain Res. 151, 99-116.

ABBREVIATURAS

- CHAPS - 3 - ((3-colamidopropil)dimetilamonio) 1 propansulfonato
- DOC - deoxicolato de sodio
- DTT - ditiotreitól
- EDTA - etilendiaminotetraacético
- 1-10 F- 1-10 fenantrolina
- His-pro-His-pro dicetopiperacina
- His-proNH₂ - Histidilprolinamida
- IA - iodoacetamida
- IT - inhibidor de la tripsina de páncreas bovino (SIGMA)
- LHRH - hormona liberadora de la hormona luteinizante y folículo estimulante
- PGA - piroglutamilaminopeptidasa
- P-Glu -βNaftilamida - piroglutamilβnaftilamida
- pI - punto isoeléctrico
- PMSF - fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PPCE - enzima que corta después de la prolina- postproline cleaving enzyme
- PPDA - enzima que corta después de la prolina en dipéptidos-post proline dipeptidyl enzyme
- PRL - prolactina
- ProNH₂- prolinamida
- SNC - Sistema Nervioso Central
- TRH - hormona liberadora de la tirotrópina- pGlu-his-proNH₂
- Tris - tris(hidroximetil)aminometano
- TSH - tirotrópina

Artículo sometido a publicación en el J. Neurosc.
con los datos obtenidos en esta tesis.

PRESENCE OF A MEMBRANE BOUND PYROGLUTAMYL AMINO PEPTIDASE DEGRADING SPECIFICALLY THYROTROPIN RELEASING HORMONE IN RAT BRAIN.

Beatriz Garat, Juan Miranda, Jean-Louis Charli and Patricia Joseph-Bravo.
Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología and
Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Address correspondence and reprint requests to:

Dr. P. Joseph-Bravo

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología,

Apartado Postal No. 70-479, Ciudad Universitaria,

México D. F. 04510

México. Telephone: (915) 550-38-93

Abbreviations used:

TRH, Thyrotropin Releasing Hormone, L-pyroglu-L-his-L-prolineamide; PGA, pyroglutaryl amino peptidase; PPCE, post proline cleaving enzyme; PPDA; post-proline dipeptidyl aminopeptidase, acid TRH, TRH-OH, L-pyroglu-L-his L-pro; his-proNH₂, L-his-L-prolineamide; his-pro DKP, L-his-L-pro diketopiperazine; proNH₂, L-prolineamide, Me-his-TRH, [3-methyl-histidyl²]-TRH; DTT, dithiothreitol; PMSF, phenyl-methyl-sulphonyl-fluoride; LDH, lactic acid dehydrogenase; TLC, Thin layer chromatography; [³H-Pro]-TRH, [L-pro 2,3,4,5 ³H]-TRH, BSA, bovine serum albumin.

ABSTRACT

In the present work we studied the pattern of degradation of [^3H -Pro]-TRH by soluble and membrane fractions from rat brain. Demonstration of the membrane bound or soluble nature of the activities was obtained by comparing their distribution to that of lactate dehydrogenase and by looking at the effect of NaCl washes on the membrane fractions. We observed that the pyroglutamyl aminopeptidase activity detected in brain homogenates is a result of two different enzymes. One of them is a soluble enzyme, previously characterized; very sensitive to oxidation, that needs DTT and EDTA for its expression, is inhibited by SH-blocking agents such as iodoacetamide and utilizes p-glu- β -naphthylamide as a substrate. The other one, a membrane enzyme, is inhibited by chelating agents such as EDTA, is not affected by iodoacetamide and does not degrade p-glu- β -naphthylamide. The later presents a high degree of specificity as shown by competition experiments with TRH analogs. We were able to corroborate that the PPCE acting on TRH is a soluble enzyme. In membranes we demonstrated also the presence of a post-proline dipeptidyl aminopeptidase. The membrane bound PGA activity is a potential new source of his-pro-diketopiperazine in brain. The presence of a specific TRH degrading enzyme in membrane fractions is of particular importance in searching an inactivation mechanism of this peptide once it is released into the synaptic cleft.

Key words: TRH, degradation, membrane, rat brain, pyroglutamyl aminopeptidase.

Running title: Thyrotropin Releasing Hormone Degradation.

INTRODUCTION

TRH has been shown to act on the hypophysis stimulating the secretion of thyrotropin (Boler et al., 1969; Burgus et al., 1970) and prolactin (Grosvenor and Mena, 1980). This tripeptide is widely distributed in hypothalamic and extrahypothalamic areas (Jackson and Reichlin, 1979), concentrated in synaptic terminals (Hökfelt et al., 1975) and released upon depolarization in a Ca^{+2} dependent manner in in vitro systems (Charli et al., 1978; Joseph-Bravo et al., 1979a). In the central nervous system TRH has been shown to affect neuronal excitability (Renaud et al., 1975), to alter the behavioral effects to centrally acting drugs (Prange et al., 1979) and to modify monoaminergic transmission (Rastogi, 1979) for which it has been postulated as a neuromodulator.

If TRH does indeed play a role in synaptic transmission an inactivating mechanism must exist in the synaptic cleft. For classical neurotransmitters it has been observed that reuptake plays an important role in this inactivation. However, for neuroactive peptides, this phenomena has not been observed or else, seems to occur at such a low V_{max} that it may not account for the necessary inactivation (Charli et al., in press). Membrane peptidases have been postulated in the inactivation of released enkephalin (Schwartz et al., 1981) or substance P (Lee et al., 1981).

For TRH, it has been reported that synaptosomal membranes are active in its degradation but the enzyme involved was not characterized (Joseph-Bravo et al., 1979b).

TRH is susceptible to fast degradation when incubated with brain homogenates and serum. Two main different pathways of TRH catabolism in rat brain had been characterized. 1) A deamidating enzyme (Prasad and Peterkofsky, 1976) now recognized as post-proline cleaving enzyme (E.C. 3.4.21.26) that originates acid TRH (Rupnow et al., 1979; Hersh and McKelvy, 1979). 2) A pyroglutamyl amino peptidase (PGA) (E.C. 3.4.11.8) that gives rise to his-proNH₂ which can be subsequently cyclized by a non enzymatic way, to histidil-proline diketopiperazine (his-pro, DKP) (Prasad and Peterkofsky, 1976) or be further degraded to his-pro by a post-proline dipeptidyl aminopeptidase (PPDA) described in adenohipophysis (Bauer and Kleinkauf, 1980). Pro-NH₂ can also be formed by action of the histidil-proline imidopeptidase on the his-proNH₂ (Matsui et al., 1979). It is known that the enzymes catalyzing the breakdown of TRH in brain, are mainly soluble (over 80%) (Prasad and Peterkofsky, 1976; Busby et al., 1982), in particular the PPCE and PGA have been purified from a soluble 27000 xg supernatant (Prasad and Peterkofsky, 1976; Hersh and McKelvy, 1979; Rupnow et al., 1979; Bauer and Kleinkauf, 1980). Some authors, however, claim that the pyroglutamyl aminopeptidase is found only in the particulate fraction (Hayes et al., 1979; Griffiths et al., 1982).

Giving the existing controversy regarding the localization of these peptidases and the importance of a membrane enzyme with a possible localization in the synaptic cleft, we decided to characterize which was the one being expressed in brain membranes taking care of soluble contaminations. Furthermore, it has been reported (Bauer and Nowak, 1979; Busby et al., 1982) that the pyroglutamyl amino peptidase purified from soluble supernatant is a very susceptible enzyme containing SH groups; however, according to other reports this enzyme is only found in the particulate fraction when studied in the absence of DTT (Hayes et al., 1979; Greaney et al., 1980; Griffiths et al., 1982). This, together with the finding of metalloproteases present in membrane fractions (Lee et al., 1981) led us to compare the effect of DTT-EDTA in the buffer on the degradation of TRH in cerebral fractions.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS.

Male wistar rats (200-300 g) kept under controlled lighting conditions (10 hrs/day) and fed ad libitum were used in all experiments [L-proline-2,3,4,5,-³H]-TRH (100 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear Co., Boston, Ma. TRH, LHRH, TRH-OH, p-glu-his-glyNH₂, p-glu-his-pro-glyNH₂, p-glu-his-gly, were obtained from Peninsula Laboratories, San Carlos, Ca. All other chemicals were reagent grade from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., or J.T. Baker, México. TLC plates used in the analysis of degradation products were silica gel G (Merck 5724).

PURIFICATION OF [³H-pro]-TRH.

[³H-pro]-TRH was repurified to 95% radiochemical purity by TLC on HPTLC plates (Whatman HPKP) using system I: Chloroform: methanol: ammonium hydroxide, 125:75:25, before its use in degradation experiments.

PREPARATION OF ENZYME SOURCES.

The animals were decapitated and their brains excised and homogenized (10% w/v) in cold tris buffer 50 mM pH 7.4 (Buffer I) or in cold tris buffer 50 mM pH 7.4, 2 mM DTT, 1 mM EDTA (Buffer II). The homogenates were centrifuged at 1000 xg for 15 min. The pellet was resuspended in half the volume and recentrifuged. The supernatants were pooled and centrifuged at 100000 xg for 60 min. The supernatant was the soluble fraction used in the degradation experiment.

The pellet thus obtained, was rehomogenized with buffer and recentrifuged at 100000 xg. In some experiments, the membranes obtained after the first 100000 xg centrifugation were rehomogenized in buffer I with NaCl (final concentration 1 M) and centrifuged; they were further resuspended in buffer I and recentrifuged twice.

Rat blood was collected and allowed to stand for 30 min at room temperature. The serum was obtained by centrifugation at 3000 xg for 30 min. After aspiration and recentrifugation PMSF was added (final concentration 1 mM). The serum was then sampled and stored at -80°C.

INCUBATION MIXTURE.

The serum, soluble or membrane fractions were incubated at 37°C at different solutions (serum 1-2 mg of protein; supernatant: 0.3-1 mg of protein/ml; membrane 2.5-5 mg of protein/ml) with purified [³H-pro]-TRH, 2×10^5 dpm, in a final vol. of 25 μ l for 15 min for the serum, 30 min for the soluble fractions and 60 min for the pellets. The reactions were stopped by the addition of acetic acid (20% final concentration).

ANALYSIS OF THE DEGRADATION PRODUCTS OF [³H-Pro]-TRH.

The acidified solutions were centrifuged at 1000 xg for 30 min. The supernatants were then extracted twice with ether and once with methanol (90% w/v final concentration). After centrifugation the supernatants were evaporated, taken up in 10 μ l of water and applied to TLC plates. The plates were developed

with system I (ascending front: 15 cm). After drying, the standards were detected with the Pauli and Isatin stains (Dawson et al., 1978) and each lane of the plates was scrapped in rectangles of 2 cm (wide) 1 cm (long). The radioactivity was then extracted into 1 ml 90% methanol and measured by scintillation counting using Bray's solution (Bray, 1970). The counting efficiency was 30%. The R_f values of the standards were as follows: Pro: 0.24, His-Pro: 0.30, TRH-OH: 0.54, TRH: 0.67, ProNH₂: 0.80, His-Pro: 0.87. In some experiments the radioactivity migrating with the R_f of Pro or His-Pro and ProNH₂ or His-Pro was analyzed in a second TLC on system II: Isopropanol: water: ammonium hydroxide, 80:29:1, ascending for 10 cm. The R_f values in this system were: Pro 0.20, ProNH₂: 0.36, His-Pro: 0.58 and His-Pro: 0.66.

INHIBITION AND COMPETITION ASSAYS

The enzyme source was preincubated for 10 min with the inhibitors at the concentrations stated in Table 3. Then the reaction was started by adding [³H-pro]-TRH. The reaction was stopped and metabolites analyzed as stated previously.

For competition assays, the reaction was started by adding [³H-Pro]-TRH at the same time as the analog (10⁻⁴ M final concentration). The samples were assayed as stated before.

DEGRADATION OF PYROGLUTAMYL β-NAPHTHYLAMIDE.

The soluble and membrane fractions prepared as indicated

a substrate used for measuring the activity of soluble PGAs (Szewczuck et al., 1969), through fluorometric quantification of the released β -naphthylamide (Favre-Bauman et al., 1981). Protein determinations were performed according to Lowry et al., 1951 using BSA (Fraction V Sigma) as standard. The LDH activity was measured by the method of Johnson et al., 1963.

RESULTS

The degradation of TRH was followed in the soluble and membrane fractions of brain homogenates performed in tris buffer with or without DTT and EDTA. In the soluble fractions we found TRH-OH and, when DTT was present, DKP as the only metabolites; while in the membranes, we detected these two metabolites and his-pro also. We found no detectable His-ProNH₂. On the other hand we found that the molecule migrating with the Pro or His-Pro R_f was essentially His-Pro by rechromatography on system II, and that the DKP migrates as a large peak either in system I or II with the R_f corresponding to DKP. In order to determine if there was formation of His-ProNH₂, the 10 µl aliquots of some experimental points were applied on cellulose-phosphate paper and developed in 1 M acetic acid, ascending for 15 cm according to Bauer and Kleinkauf, 1979 but no his-proNH₂ was detected.

In order to determine the extent of soluble contamination present in the membrane fractions, the LDH activity was measured in all conditions. As can be observed in Table 1, the LDH activity follows the same distribution that the PPCE activity (followed by the formation of TRH-OH) in both buffers or the PGA activity (his-pro formation) in tris-DTT-EDTA buffer only. This behaviour is also observed when studying in buffer II the degradation of p-glu-β-naphthylamide, a substrate used for measuring PGA activity, and recognized by the brain soluble PGA (Faivre-Bauman et al., 1981). The activity level detected in the membrane fraction with the fluorogenic substrate was very low (0.028 nmoles/min/mg) compared

to the soluble fraction (0.230 nmoles/min mg). Although there is a greater maximum velocity for the soluble than for the membrane activity, both fractions had the same K_m ($\sim 18 \mu M$). The soluble to membrane ratio was similar to the one observed for the soluble marker LDH (data not shown). With this substrate we were able to corroborate the inactivation effect that the absence of DTT and EDTA has on soluble PGA activity. As for [3H -Pro]-TRH, this inactivation is of a reversible nature (data not shown). With these data we conclude that, as reported, the PPCE is a soluble enzyme (Rupnow et al., 1979) and the PGA with sensitive SH groups, that utilizes p-glu- β -naphthylamide as substrate, is also soluble.

(INCLUDE TABLE 1 HERE)

In contrast, as shown in Table 1, in absence of DTT-EDTA no DKP is found in the soluble fraction, while in the membrane its formation is markedly enhanced. The increase in activity of PGA was not observed with the PPCE nor the LDH activities, so it could not be due to rupture of some osmotic resistant vesicles (Table 2). Therefore, there seems to be another PGA present in the membrane which is not susceptible to SH oxidation but in fact, inhibited by DTT and EDTA and not able to degrade the p-glu- β -naphthylamide (data not shown). This activity was not bound electrostatically to the membrane as demonstrated by its resistancy to the NaCl wash, contrary to what is observed

with the PPCE and LDH activities measured in tris buffer (Table 2).

(INCLUDE TABLE 2 HERE)

To further demonstrate the existence of two different PGA we tested the effect of some inhibitors or TRH analogs. The PGA present in the membrane was strongly inhibited by DTT, 1-10 phenantroline, EDTA and EGTA (Table 3), pointing for a metalloprotease candidate, with almost identical properties to the serum PGA previously described as "thyroliberinase" (Bauer and Nowak, 1979). We found, as reported, a clear effect of agents specific for serine-enzymes as PMSF (Koida and Walter, 1976) and of bacitracin (McKelvy et al., 1976) on the PPCE (Table 3). The iodoacetamide completely inhibited the soluble PGA as reported (Bauer and Kleinkauf, 1980) but was ineffective on the membrane enzyme (Table 3).

(INCLUDE TABLE 3 HERE)

We tested the possible inhibitory effect of different analogues on TRH degradation with the three sources of PGA. In contrast to what has been reported for the soluble PGA that recognizes any substrate having pro-glu at the NH₂-terminus (Bauer, 1983; Busby et al., 1982) p-glu-his-gly, p-glu-gly-NH₂ and p-glu-his-pro-gly-NH₂ had no effect at 10⁻⁴ M final concentration on TRH degradation on membrane fractions measured in tris buffer (data not shown). Other analogs as TRH-OH or Me-His-TRH were able to compete in membrane fractions although to a lesser extent than what was observed with the soluble PGA (Table 4). In agreement with the inability of p-glu-β-naphtylamide to serve as a substrate for the serum (Bauer and Nowak, 1979) and membrane PGA (as previously mentioned) this compound was not inhibitory to these activities. Although it was reported that serum PGA does not recognize LHRH, this peptide showed a clear inhibitory effect on the three enzymes. These results show that the PGA found in the membrane fraction posses a higher degree of substrate specificity for TRH than does the soluble enzyme as occurs with the serum.

(INCLUDE TABLE 4 HERE)

In all these experiments, we have taken the appearance of DKP as representing the activity of PGA. This has been valid for all cases except membrane activity in tris buffer which, although it showed the highest PGA activity (Table 1), is underevaluated since some of the his-pronH₂ is further degraded to

his-pro. Nevertheless, for the characterization of its specificity and group classification this approach is still valid.

Incubation of TRH with the membranes produced another metabolite not observed in the soluble incubates: his-pro. This metabolite is observed in higher amounts when TRH is incubated without DTT and EDTA and is not liberated from the membranes after NaCl treatment (Table 1 and 2). This metabolite is probably produced by action of the reported membrane-bound enzyme: PPDA on his-proNH₂ before it cyclicizes (Bauer and Kleinkauf, 1980). The formation of his-pro seems to follow the activity of the membrane PGA (Table 1 and 3). The only discrepancy is its behavior towards inhibitors is that of bacitracin, which inhibits the PPCE and also inhibits this PPDA while it does not inhibit the membrane PGA (Table 5). This could explain the high levels of DKP found in membranes since in this case the his-proNH₂ formed will be only susceptible to the cyclicization. For measuring the activity of the PGA in different physiological conditions, one would need to inhibit this PPDA and bacitracin could be a good candidate.

DISCUSSION

In the search of a possible inactivating mechanism responsible for the clearance of TRH once it has been released into the synaptic cleft we have explored two possibilities: uptake or degradation by a membrane bound enzyme. Although TRH has been shown to be accumulated by hypothalamic (Charli et al., 1983) or cerebellar slices (Pacheco et al., 1981) the maximum velocity is so low that this phenomenon may not be the only responsible for inactivation (Charli et al., 1983). The PGA present in the membranes hereby characterized could be participating in this inactivation mechanism. This PGA shows more specificity towards TRH than the previously reported PGA found in the soluble supernatant of brain adenohypophysis; its behaviour resembles that of the serum thyroliberinase (Bauer and Nowak, 1979). This enzyme is probably localized in the synaptosomal membranes since we had shown that these membranes contain a peptide degrading TRH and in the conditions used in these experiments the membrane bound PGA would have expressed its full activity (Joseph-Bravo et al., 1979b). A careful subcellular distribution study is under progress. The presence of membrane peptidases and their involvement in the inactivation of neuroactive peptides has been shown also for enkephalin (Schwartz et al., 1981) and substance P (Lee et al., 1981) accumulating evidence in favour of this mechanism.

One can then propose a degradation pathway for TRH in brain membranes that originates first his-proNH₂ by action of the membrane PGA; this metabolite can either cyclicize to form DKP or be further degraded to his-pro by the PPDA. When TRH is in contact with membranes the availability of DKP depends then, on the activity of the PGA and the PPDA. Given the reported effects of DKP on CNS and adenohipophysial functions (Peterkofsky et al., 1982), the existence of these two enzymes cannot be overlooked. As has been shown (Yaganisawa et al., 1980) DKP is not concentrated in the nerve endings, as could be expected for a neuroactive substance. However, the soluble DKP could come from degradation of TRH in the synaptic cleft by the membrane bound PGA or from degradation by the soluble PGA of TRH once uptaken so that a large pool of DKP not intervening in synaptic transmission could mask a small releasable pool. Since this TRH metabolite seems to have a physiological function in some cases opposite to that of TRH, the enzymes involved in TRH catabolism could play a dual role. However, more work is needed to clarify whether their localization and the regulation of their activity justify their involvement not only in inactivating processes but also in a biosynthetic one.

REFERENCES

- Bauer K. and Nowak P. (1979) Characterization of a thyroliberin Degrading Serum Enzyme Catalyzing the Hydrolysis of Thyroliberin on the Pyroglutamyl-Histidine Bond. Eur. J. Biochem. 99, 239-246.
- Bauer K. and Kleinkauf H. (1980) Catabolism of Thyroliberin by Rat Adenohypophysial Tissue Extract. Eur. J. Biochem. 106, 107-117.
- Bauer K. (1983) Biochemical Properties of TRH Inactivating Enzymes, in Thyrotropin Releasing Hormone. (Griffiths E.C. and Bennett G.W. eds) pp. 103-107. Raven Press, New York.
- Boler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C.Y. and Scally A.V. (1969) The identity of chemical and hormonal properties of TRH and pyroglutamyl-histidyl-prolineamide. Biochem. Biophys. Res. commun. 37, 705-710.
- Bray G.A. (1970) in The Current States of Liquid Scintillation Counting. (Bransome E.D. eds) p. 170, Grune and Stratton, New York.
- Burgus R., Domo T.F., Desiderio D., Ward D., Vale W. and Guillemin R. (1970) Characterization of the hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor (TRF) of bovine origin. Nature. 226, 321-325.
- Busby W.H. Jr., Yougblood W.W. and Kizer J.S. (1982) Studies on Substrate Requirements, Kinetic Properties and Competitive Inhibitors of the Enzymes Catabolizing TRH in Rat Brain. Brain Research. 242, 261-270.

- Charli J.L., Joseph-Bravo P., Palacios J.M. and Kordon C. (1978) Histamine-Induced Release of Thyrotropin Releasing Hormone from Hypothalamic Slices. Eur. J. Pharmacol. 52, 401-403.
- Charli J.L., Ponce G., McKelvy J.F. and Joseph-Bravo P. (1983) Accumulation of Thyrotropin Releasing Hormone by Rat Hypothalamic Slices. J. of Neurochem., in press.
- Dawson R.M., Elliot D.C., Elliot W.H. and Jones K.M. (1978) Methods for the Detection of Biochemical Compounds on Paper and Thin Layer Chromatograms with some Notes in Separation, in Data for Biochemical Research (idem eds) pp. 509-591. Oxford University Press., Oxford.
- Faivre-Bauman A., Knisatchek H., Tixier-Vidal A. and Bauer K. (1981) Ontogenesis of Neuropeptide Degrading Enzymes in the Mouse Brain. J. of Neuroscience Research. 6, 63-74.
- Greaney A., Phelan J. and O'Cuinn G. (1980) Localization of Thyroliberin Pyroglutamyl Peptidase on Synaptosomal-Membrane Preparations of Guinea-Pig Brain Tissue. Biochem. Soc. Trans. 8, 423.
- Griffiths E.C., Mc Dermott J.R. and Smith A.I. (1982) Inactivation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and (³Me-His) TRH by Brain Peptidases Studied by High Performance Liquid Chromatography. Neuroscience Letters. 28, 61-65
- Grosvenor C.E. and Mena F. (1980) Evidence that Thyrotropin-Releasing Hormone and Hypothalamic Prolactin-Releasing Factor may Function in the Release of Prolactin in the Lactating Rat. Endocrinology. 107, 863-868.

- Hayes J.D., Phelan J.J. and O'Cuinn G. (1979) The Metabolism of Thyrotropin Releasing Hormone by Guinea-Pig Brain. Biochem. Soc. Trans. 7, 59-62.
- Hersh L., and McKelvy J.F. (1979) Enzymes Involved in the Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) in Bovine Brain. Brain Research. 168, 553-560.
- Hökfelt T., Fluze K., Johansson O., Jeffcoate S. and White N. (1975). Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)-containing nerve terminals in certain brain stem nuclei and in the spinal cord. Neurosci. Letters. 1, 133-139.
- Jackson I.M.D. and Reichlin S. (1979) Distribution and Biosynthesis of TRH in the Nervous System, in Central Nervous System Effect of Hypothalamic Hormones and Other Peptides. (Collu R., Barbeau A., Ducharme J.R. and Rochefort J.G. eds) pp. 3-54, Raven Press, New York.
- Johnson N.K. and Whittaker V.D. (1963) Lactate Dehydrogenase as a Cytoplasmic marker in Brain. Biochem. J. 88, 404.
- Joseph-Bravo P., Charli J.L., Palacios J.M. and Kordon C. (1979a) Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive Thyrotropin Releasing Hormone from Rat mediobasal hypothalamus. Endocrinology. 104, 801-806.
- Joseph-Bravo P., Loudes C., Charli J.L. and Kordon C. (1979b) Subcellular distribution of brain peptidases degrading Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) and Thyrotropin Releasing Hormone (TRH). Brain Research. 166, 321-329.

- Koida M. and Walter R. (1976) Post-Proline Cleaving Enzyme: Purification of this Endopeptidase by Affinity Chromatography. J. Biol. Chem. 251, 7593-7599.
- Lee C.M., Sandberg B.E.B., Hanley M.R. and Iversen L.L. (1981) Purification and Characterization of a Membrane Bound Substance P Degrading Enzyme from Human Brain. Eur. J. Biochem. 114, 315-327.
- Lowry O.H. and Rosenbrough N.J. (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Matsui T., Prasad C. and Peterkofsky A. (1979) Metabolism of Thyrotropin Releasing Hormone in Brain Extracts. J. Biol. Chem. 254, 2439-2445.
- McKelvy J.F., LeBlanc P., Loudes C. Perries S. Grimm-Jorgensen Y. and Kordon C. (1976) The use of Bacitracin as an inhibitor of the Degradation of Thyrotropin Releasing Factor and Luteinizing Releasing Factor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 507-515.
- Pacheco M.F., Woodward D.J., McKelvy J.F. and Griffin W.S.T. (1981) TRH in Rat Cerebellum: II Uptake by Cerebellar Slices. Peptides. 2, 283-288.
- Peterkofsky A., Battaini F., Koch Y., Takahara Y. and Dannies P. (1982) Histidyl-Proline Diketopiperazine: Its Biological Role as a Regulatory Peptide. Molecular and Cellular Biochemistry. 42, 45-63.
- Prange A.J., Jr., Nemeroff C.B., Loosen P.L., Bissette G. Osbarr A. J., Wilson J.C. and Lipton M.A. (1979) Behavioral Effects of Thyrotropin Releasing Hormone in Animals and Man, in Central Nervous System Effect of Hypothalamic Hormones and Other Peptides. (Collu R., Barbeau A., Ducharme J.R. and Rochefort J.G. eds) pp. 75-96, Raven Press. New York.

- Prasad and Peterkofsky A. (1976) Demonstration of a Pyroglutamyl Peptidase and Amidase Activities toward TRH in Hamster Hypothalamus Extracts. J. Biol. Chem. 251, 3229-3234.
- Rastogi R.B. (1979) Thyrotropin Releasing Hormone Influences on Behavior: Possible Involvement of Brain monoaminergic System, in Central Nervous System Effects of Hypothalamic and Other Peptides. (Collu R., Barbeau A., Ducharme J.R. and Rochefort J. eds) pp. 123-140 Raven Press, New York.
- Renaud L.P. and Martin J.B. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Depressant action on Central Neuronal Activity. Brain Res. 86, 150-154.
- Rupnow J.H., Taylor W. and Dixon J.E. (1979) Purification and Characterization of Thyrotropin Releasing Hormone Deamidase from Rat Brain. Biochemistry. 18, 1206-1212.
- Schwartz J.C., Malfroy B. and De la Baume S. (1981) Biological Inactivation of Enkephalin-Dipeptidyl Carboxi Peptidase ("Enkephalinase" as a Neuropeptidase. Life Science. 29, 1715-1740.
- Szewczuk A. and Mulczyk M. (1969) Pyrrolidonyl Peptidase in Bacteria. Eur. J. Biochem. 8, 63-68.
- Yanagisawa T., Prasad C. and Peterkofsky A. (1980) The Subcellular and Organ Distribution and Natural Form of Histidyl-Proline Diketopiperazine in Rat Brain Determined by a Specific Radioimmunoassay. J. Biol. Chem. 255, 10290.

ACKNOWLEDGEMENTS

The following work has been supported in part by grants from: CONACyT - PRONALSA (PCSANAL 800-590 and PCCABNA 001117), the Instituto Mexicano de Psiquiatría and Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada (Banco BCH). B. Garat was recipient of a CONACyT - Cuauhtémoc scholarship. We appreciate the helpful discussions with A. González and R. Franco. The generous aid of Dr. P. Pacheco in kindly providing the animals and Dr. R. Espejo in allowing the use of his equipment is gratefully acknowledged. We thank the technical aid of P. De la Torre and H. Torres as well as the skillful secretarial assistance of H. Anzures.

TABLE 1. Enzyme activities in rat brain fractions.

	TRIS BUFFER		TRIS-DTT-EDTA BUFFER	
	SOLUBLE	MEMBRANE	SOLUBLE	MEMBRANE
LACTATE DEHYDROGENASE nmoles NADH/min/mg	130 ± 15 (14)	15 ± 2 (14)	151 ± 33 (4)	14 ± 7 (4)
his-pro FORMATION pmoles/min/mg	0 (20)	17.1 ± 1.8 (22)	0 (10)	2.7 ± 0.9 (10)
TRH-OH FORMATION pmoles/min/mg	118.2 ± 10.8 (19)	6.0 ± 1.2 (22)	77.4 ± 16.8 (10)	7.2 ± 1.2 (10)
his-pro FORMATION pmoles/min/mg	0 (20)	9.9 ± 1.8 (20)	62.1 ± 13.5 (9)	1.8 ± 0.9 (12)

Soluble and membrane fractions were obtained and incubated in buffer I (tris buffer 50mM, pH 7.4) or II (tris buffer 2mM DTT, 1mM EDTA) in presence of 2×10^{-5} dpm [^3H -pro]-TRH and degradation products were analyzed in T.L.C. as indicated in materials and methods. Results are expressed as the mean ± S.E.M. The number of determinations is shown in parenthesis.

TABLE 2. EFFECT OF NaCl TREATMENT ON MEMBRANE ENZYMATIC ACTIVITIES.

	C O N T R O L	AFTER NaCl TREATMENT
LDH ACTIVITY nmoles/min/mg	13 ± 3 (4)	7 ± 3 (4) ^o
His-Pro FORMATION pmoles/min/mg	13.5 ± 4.5 (4)	20.7 ± 9.0 (4)*
TRH-OH FORMATION pmoles/min/mg	4.2 ± 0.6 (4)	1.8 ± 0.6 (4) ^o
His-Pro FORMATION pmoles/min/mg	4.5 ± 2.7 (4)	7.2 ± 4.5 (4)*

Once obtained, the membrane fraction was divided in two aliquots: one was rehomogenized in buffer I containing NaCl (1 M final concentration) as indicated in materials and methods, the other was treated as usually. The percentage of remaining activity after NaCl treatment was of 50% in LDH and TRH-OH. Results are expressed as the mean ± S.E.M. for the number of determinations in parenthesis.

t-test: *: non significative difference; ^o= p<0.05

TABLE 3. Effect of different inhibitors on enzymatic activities of brain fractions and serum.

		S O L U B L E		M E M B R A N E		S E R U M
		TRH-OH Formation	DKP Formation	DKP Formation	his-pro Formation	DKP Formatio
CONTROL		100 ± 5	100 ± 5	100 ± 5	100 ± 20	100 ± 22
EDTA	0.5mM	n.m.	n.m.	75 ± 7	100 ± 6	94 ± 30
EGTA	0.5mM	n.m.	n.m.	67 ± 7	80 ± 8	148 ± 15
1-10 Phenantroline	0.5mM	n.m.	n.m.	33 ± 7	64 ± 5	6 ± 6
DTT	5.0mM	98 ± 10	118 ± 5	33 ± 7	38 ± 4	93 ± 18
	0.5mM	n.m.	n.m.	50 ± 20	84 ± 28	98 ± 12
Iodoacetamide	5.0mM	30 ± 20	0	100 ± 25	76 ± 2	126 ± 40
	0.5mM	270 ± 20	0	73 ± 20	40 ± 10	143 ± 30
PMSF	2.5mM	43 ± 2	128 ± 44	150 ± 25	110 ± 10	146 ± 24
	0.5mM	100 ± 15	124 ± 15	112 ± 12	135 ± 10	n.m.
Bacitracin	10.0mM	20 ± 5	40 ± 10	140 ± 12	0	82 ± 29
	2.5mM	30 ± 5	126 ± 10	300 ± 12	0	n.m.
	0.5mM	37 ± 5	147 ± 10	325 ± 25	0	365 ± 90
Trypsin inhibitor						
from bovine	10,000 U/ml	21 ± 6	150 ± 5	100 ± 7	100 ± 5	131 ± 2
Pancreas (SIGMA)	1,000 U/ml	95 ± 5	110 ± 15	92 ± 7	108 ± 5	141 ± 22

The enzyme preparations were preincubated for 10 min with each inhibitor (final concentration indicated in the figure) and then with [³H-pro]-TRH the soluble fractions were incubated in buffer I for 30 min, membrane fraction in buffer II for 60 min and serum fraction in buffer I for 15 min. Metabolites were assayed in T.L.C. as stated in M. & M. Four determinations were done in each case, data indicate the mean ± S.E.M. (Results are expressed as percentage of control activity).

n.m. : not measured.

TABLE 4. Effect of TRH analogs on soluble, membrane and serum enzyme activities.

FORMATION OF:	SOLUBLE		MEMBRANE		SERUM			
	D	K P	D	K P	his-pro	D K P		
CONTROL	100	± 2	100	± 7	100	± 25	100	± 47
TRH	23	± 5	15	± 10	15	± 5	0	
TRH-OH	6	± 1	30	± 5	0		30	± 3
Me-His-TRH	46	± 10	70	± 15	100	± 35	50	± 17
LHRH	66	± 13	60	± 10	60	± 25	33	± 27
P-glu-β-naphtylamide	8	± 2	100	± 30	150	± 25	117	± 33

Enzyme mixtures were incubated with each competitor 10^{-9} M (final concentration) and [3 H-Pro]-TRH (2×10^5 dpm) added at the same time: the analysis of the degradation products was done as indicated in materials and methods. Two determinations were done in each case (results are expressed as percentage of total activity). Data indicate the mean \pm S.E.M.