



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENETICA Y FISIOLOGIA MOLECULAR**

*LA RELEVANCIA DE LA PIROGLUTAMIL
PEPTIDASA II (PPII) EN LA COMUNICACION MEDIADA
POR LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA
(TRH) EN LA ADENOHIPOFISIS DE LA RATA*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

JOSE RAYMUNDO CRUZ PEREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA



CUERNAVACA, MORELOS 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

Este trabajo se realizo en el laboratorio de Neuroendocrinología Celular y Molecular del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección del Dr. Jean Louis Charli.

COMITÉ TUTOTIAL

Dr. Luis Covarrubias Robles
Dr. Osvaldo Jorge Vindrola Asti
Dr. Jean Louis Charli Casalonga

JURADO DE EXAMEN

Presidente: Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Secretario: Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza
Vocal: Dra. María Eugenia Mendoza Garrido
Suplente: Dra. Susana Castro Obregon
Suplente: Dr. Jean Louis Charli Casalonga

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Dr. Jean Louis Charli su apoyo y asesoría para realizar mis estudios de doctorado.

A los Dres. Luis Covarrubias Robles, del Instituto de Biotecnología de la UNAM y Osvaldo Jorge Vindrola Asti, del Instituto de Fisiología de la BUAP, les agradezco haber formado parte de mi comité tutorial ya que gracias a sus observaciones y sugerencias logre concluir con este trabajo.

A los miembros de mi jurado de examen, Dres: Susana Castro Obregon, Maria Eugenia Mendoza Garrido, Ignacio Camacho Arroyo y Enrique Alejandro Reynaud Garza les agradezco las observaciones y sugerencias que me permitieron mejorar el trabajo escrito.

Mi agradecimiento a los Drs. Patricia Joseph-Bravo, Leonor Pérez-Martínez, Rosa María Uribe Villegas y Miguel Ángel Vargas Suarez del laboratorio de neuroendocrinología por su asesoría, comentarios, sugerencias y motivación que me permitieron concluir con mi proyecto doctoral.

Al QFB Miguel Cisneros Ramírez le agradezco mucho el haber realizado los radioinmunoensayos tan importantes para este proyecto doctoral.

Le agradezco a la Química Fidelia Romero Arteaga su apoyo en la optimización de los RT-PCR realizados en este trabajo.

Al laboratorista Manuel Villa Herrera le agradezco su valiosa ayuda en el sacrificio de los animales de experimentación y su disponibilidad en la preparación del material de laboratorio.

A todos mis compañeros y ex compañeros del laboratorio de neuroendocrinología les agradezco su interés, comentarios, críticas y apoyo para mi proyecto.

Un agradecimiento al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado a través de una beca (numero de apoyo 116990).

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
Introducción	5
Justificación	23
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Estrategia experimental	24
Materiales y métodos	26
Resultados	34
Discusión	45
Conclusiones	52
Perspectivas	52
Referencias	53
Anexos	66
Artículo 1	
Artículo 2	

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ACE	Enzima convertidora de angiotensina
Ang	Angiotensina
APA	Aminopectidasa A
APN/CD13	Aminopectidasa N
ASO	Oligonucleótido antisentido
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de calcio
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DTT	Ditiotreitol
FSH	Hormona estimulante del folículo
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
ICQ	Inmunocitoquímica
IP ₃	Inositol trifosfato
LH	Hormona luteinizante
MSH	Hormona estimulante de melanocitos
NEP	Nepresilina
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
ODN	Oligonucleótido
PEP	Protil endopeptidasa
PKC	Proteína cinasa C
PPI	Piroglutamil peptidasa I
PPII	Piroglutamil peptidasa II
PRL	Prolactina
SCO	oligonucleótido revuelto
SFB	Suero fetal bovino
T ₃	Triiodotironina
TR	Receptor para hormonas tiroideas
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TRHR	Receptor del TRH
TSH	Hormona estimulante de la tiroides

RESUMEN

La piroglutamil peptidasa II (PPII; E.C.3.4.19.6) es una metaloectopeptidasa de tipo II que se expresa en las neuronas y células adenohipofisarias. La evidencia actual sugiere que la PPII es la responsable de terminar con la actividad de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, pGlu-His-Pro-NH₂), secretada por las neuronas hipotalámicas, para modular la síntesis y secreción de la prolactina (PRL) y de la tirotrópina (TSH) en la pituitaria anterior. Con un procedimiento de fraccionamiento celular, se demostró que, en la adenohipófisis, la actividad de la PPII se detecta principalmente en los lactotrofos. Sin embargo, el papel de PPII para modular las actividades endocrinas del TRH no se ha determinado hasta el momento debido a que no se han definido el o los tipos celulares de la pituitaria que expresan a la PPII y a que no se cuenta con herramientas efectivas para manipular de manera selectiva la actividad de la enzima. Para determinar si la enzima influye en la eficacia y la duración de la señalización inducida por el TRH en la adenohipófisis, nosotros: a) mejoramos el conocimiento sobre la localización celular de la PPII y b) manipulamos selectivamente la actividad de la enzima.

Mientras que el 34±3% de las células de la adenohipófisis en cultivo son lactotrofos, los experimentos de hibridación *in situ* (HIS) demostraron que la PPII se expresa solo en un 5-6% de las células de la adenohipófisis. Para investigar en qué tipos celulares se expresa la PPII, realizamos HIS (ARNm de la PPII) combinada con inmunocitoquímica (PRL, GH o β-TSH). Únicamente el 66% de las células que expresan a la PPII son lactotrofos mientras que un 34% son somatotrofos y los tirotrofos no la expresan. La actividad de la PPII se suprimió de manera selectiva mediante el empleo de oligodeoxinucleótidos antisentido (ASO), diseñados con un procedimiento teórico, que en base a la predicción de la estructura secundaria del ARNm, sugiere sitios potencialmente accesibles para los ASO. Dos de los PPII-ASO diseñados son muy eficientes (hasta un 60% de supresión de los niveles del ARNm y hasta un 85% de la actividad enzimática), específicos para el ARNm de la PPII (no afectaron los niveles de los ARNm de la aminopeptidasa A, del receptor para el TRH, de la PRL y de la TSH) y específicos de la secuencia (los oligodeoxinucleótidos revueltos (SCO) no afectaron los niveles del ARNm de la PPII). Comparado con el control sin transfectar (mock) o con el control PPII-SCO, la inhibición de la PPII por el PPII-ASO incrementó la liberación de PRL liberada en respuesta al TRH. Sorprendentemente, la secreción TSH inducida por el TRH no se afectó perceptiblemente por el tratamiento antisentido. Estos resultados demuestran que la expresión de la PPII en los lactotrofos coincide con su capacidad de modular la liberación de PRL y puede desempeñar un papel especializado en la señalización de TRH en la pituitaria

anterior. Así, las ecto-peptidasas en la pituitaria anterior pueden tener funciones únicas de acuerdo a su expresión específica en las células.

ABSTRACT

Pyroglutamyl peptidase II (PPII; E.C.3.4.19.6) is a type II zinc metallo-ectopeptidase located on neuronal and adenohypophyseal cells. Current evidence indirectly suggests that PPII terminates the actions of neuronally released thyrotropin-releasing hormone (TRH, pGlu-His-Pro-NH₂), a neuropeptide that modulates synthesis and secretion of prolactin (PRL) and thyrotropin (TSH). Using cell fractionation, it was previously shown that in the adenohypophysis, PPII activity is detected principally in lactotrophs. However, the role of PPII in modulating the endocrine activities of TRH has not been determined yet because the cell types where it is expressed are poorly defined and due to the absence of effective tools to selectively manipulate the activity of the enzyme. To study whether the enzyme effectively influences the extent and duration of TRH signaling in adenohypophysis, we have: a) improved knowledge of its cellular distribution and b) selectively manipulated the activity of the enzyme.

While 34±3% of the adenohypophyseal cells in culture were lactotrophs, *in situ* hybridization (ISH) experiments showed that PPII mRNA is only expressed in 5-6 % of adenohypophyseal cells. To investigate in which cellular types PPII is expressed, we performed ISH (PPII mRNA) combined with immunocytochemistry (PRL, GH or β-TSH). Only 66% of PPII mRNA expressing cells were lactotrophs, 34% somatotrophs while none were thyrotrophs. To selectively reduce PPII activity, we performed knockdown experiments using phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides (ASO), designed through prediction of PPII mRNA secondary structure. Two of the PPII-ASO were very effective (up to 60% of PPII mRNA suppression and 85% of enzymatic activity), target-specific (aminopeptidase A, TRH-receptor1, PRL and TSH mRNA levels were not affected) and sequence specific (scrambled oligodeoxynucleotides (SCO) had no effect on PPII mRNA levels). Compared with mock or PPII-SCO treated controls, downregulation of PPII expression by antisense targeting significantly increased TRH -induced PRL secretion. Surprisingly, TRH-induced TSH secretion was not affected significantly by antisense treatment. These results demonstrate that PPII expression in lactotrophs coincides with its ability to control PRL release. It may play a specialized role in TRH signaling in the anterior pituitary. Anterior pituitary ecto-peptidases may fulfill unique functions associated with their restricted cell-specific expression.

INTRODUCCION

El Sistema Neuroendocrino

La vida, de los organismos multicelulares, depende de una elaborada red de comunicación celular que permite la coordinación de funciones tales como; la diferenciación, el metabolismo y el crecimiento. Esta comunicación permite establecer y mantener un ambiente interno controlado u homeostasis. La homeostasis es mantenida de manera muy importante por el sistema neuroendocrino, en el cual el sistema nervioso y el sistema endocrino se encuentran física y funcionalmente unidos por una región específica del cerebro: el hipotálamo (Schmid-Nilsen, 1986).

El hipotálamo es el centro de control de varias funciones nerviosas, entre las que destaca la regulación de la temperatura corporal y el control en el consumo del alimento y el agua. Además, este centro participa en el control del sistema endocrino. El control es ejercido hacia la pituitaria posterior o neurohipófisis vía proyecciones nerviosas directas y hacia la pituitaria anterior o adenohipófisis vía el sistema portahipofisiario (Schmid-Nilsen, 1986). La neurohipófisis está embriológicamente y anatómicamente unida con el hipotálamo. Las neuronas del hipotálamo proyectan sus axones a la pituitaria posterior por lo que la neurohipófisis está formada por axones y terminales nerviosas de las neuronas hipotalámicas. Las hormonas almacenadas en las terminales son liberadas a la circulación sanguínea en respuesta a un estímulo eléctrico. Las terminales nerviosas están rodeadas por astrocitos modificados llamados pituicitos que juegan un papel importante en el control local de la liberación de las hormonas oxitocina y vasopresina.

La adenohipófisis está separada físicamente del cerebro, pero unida funcionalmente al hipotálamo por un sistema especializado de vasos capilares llamado el sistema portahipofisiario (figura 1). Algunas de las neuronas del hipotálamo proyectan sus axones hacia la eminencia media en donde sus terminales secretan a las hormonas hipofisiotrópicas a un plexo capilar; estos capilares se conectan a un sistema de vasos portales que permiten la irrigación directa de la adenohipófisis. Este tipo de conexión permite que las neurohormonas lleguen a la adenohipófisis antes de ser diluidas en el sistema circulatorio. Se ha establecido la presencia de varias neurohormonas involucradas en el control de la adenohipófisis entre las que destacan las de naturaleza peptídica: la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que regula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropica (ACTH); la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que regula la síntesis y liberación de las hormonas

luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH); la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH), que modula la síntesis y liberación de la hormona de crecimiento (GH); y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que regula la síntesis y liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y de la prolactina (PRL). La liberación de las hormonas de la adenohipófisis también se regula por mecanismos de retroalimentación negativa por hormonas periféricas. Además, la comunicación entre las células de la adenohipófisis por mensajeros paracrinos y/o autocrinos permite un mecanismo de regulación adicional para modular la función de la glándula (Schwartz, 2000).

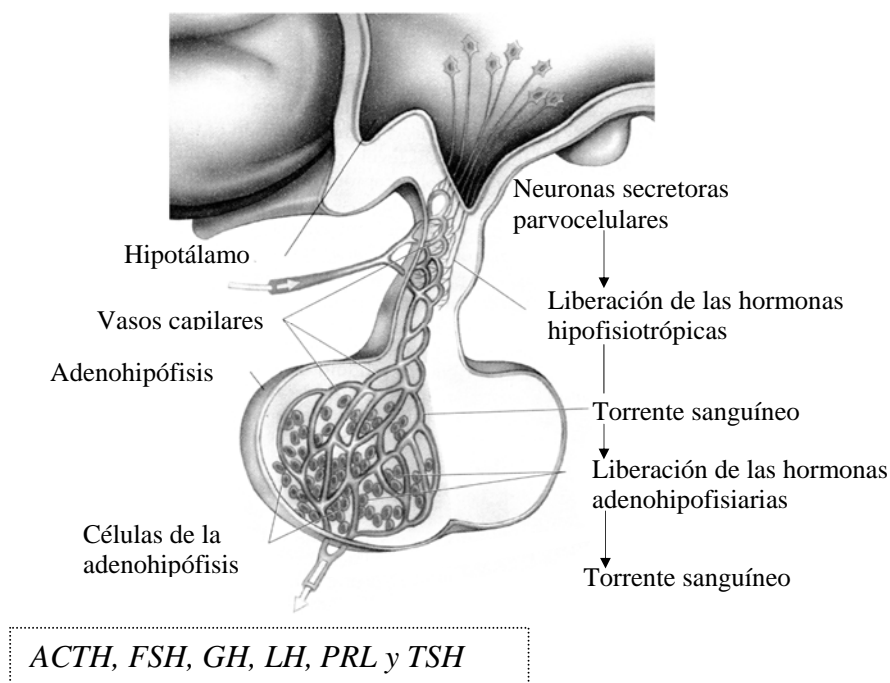


Figura 1. Representación esquemática del control hipotalámico de la adenohipófisis. Las neuronas parvocelulares proyectan sus terminales hacia la eminencia media en donde secretan a las hormonas hipofisiotrópicas a los capilares portahipofisarios. Estas hormonas alcanzan a la adenohipófisis donde disparan o inhiben la liberación de las hormonas adenohipofisiarias.

La adenohipófisis ejerce funciones críticas en el control homeostático en los vertebrados, en donde integra a un complejo mecanismo de retroalimentación, recibiendo información del cerebro y de los órganos endocrinos tales como la glándula tiroides, la glándula adrenal, las gónadas, por lo que esta glándula regula procesos vitales como el metabolismo, el crecimiento, la reproducción y el comportamiento (Treier y Rosenfeld, 1994). El control que ejerce la pituitaria sobre las glándulas endocrinas en el organismo ha permitido considerarla como la glándula maestra del sistema endocrino (Schmid-Nilsen, 1986; Bear *et al.*, 1996). La

adenohipófisis se deriva de la porción anterior de la cresta neural y surge como una invaginación de la capa del ectodermo oral llamada saco de Rathke (Treier y Rosenfeld, 1994; Dasen *et al.*, 1998). La adenohipófisis está conformada por cinco tipos celulares, definidos por las hormonas que producen y secretan. Los corticotropos secretan a la ACTH que regula la función adrenal, los gonadotropos secretan LH y FSH que influyen la función de las gónadas, los tirotropos secretan a la TSH que controla a la glándula tiroidea, los lactotropos secretan a la PRL que regula la producción de leche y otras numerosas actividades y los somatotropos secretan a la GH que regula el crecimiento (Treier y Rosenfeld, 1996; Dasen *et al.*, 1999). Las poblaciones de estos grupos celulares en la glándula no están representadas por igual y su cantidad depende de la especie, el sexo y la edad. Los grupos celulares más abundantes son los lactotropos y los somatotropos, que juntos representan aproximadamente del 52 al 76 % del total de células endocrinas; esto es, del 20-36 % son lactotropos y del 32-40 % son somatotropos (Ashworth y Hinkle, 1996; Yu *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1986; Konaka *et al.*, 1997; Song *et al.*, 1989; Bookfort *et al.*, 1986; Lloyd y Landefeld, 1986). El resto de los grupos celulares representa de un 24 a un 48 % en donde los tirotropos representan solo el 1.5-2 % en animales eutiroideos y del 8 al 10 % en hipertiroideos (Ashworth y Hinkle, 1996; Yu *et al.*, 1998). Se ha descrito un tipo celular llamado somatolactotropo que es capaz de sintetizar y secretar tanto PRL como GH y representa un 12 % de las células (Porter *et al.*, 1990). Además de las células endocrinas, se han descrito otros dos tipos celulares en la glándula pituitaria. Al primer tipo pertenecen las células folículo estelares (F-E), que representan del 5-10 % del total de las células de la adenohipófisis y que por sus características de excitabilidad y su comunicación con las células endocrinas se han propuesto como coordinadoras de la función de la glándula (Fauquier *et al.*, 2002). Al segundo tipo pertenecen las células positivas para la proteína nestina, una proteína de filamentos intermedios asociada con células progenitoras neurales. Estas células representan un pequeño porcentaje en la glándula (0.5% en ratas jóvenes) y se encuentran distribuidas en los tres lóbulos de la pituitaria. El papel biológico de estas células positivas para nestina no se ha determinado hasta el momento (Krylyshkina *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo su función especializada, las células de la pituitaria no están distribuidas al azar. Estudios de inmunohistoquímica han mostrado patrones de distribución característicos de las células endocrinas dentro de la glándula. Los somatotropos se encuentran dispersos de manera uniforme en toda la adenohipófisis y usualmente se sitúan a lo largo de los sinusoides. Este tipo celular es escaso o ausente alrededor del lóbulo intermedio y en la porción anterior-

ventral de la glándula (Nakane, 1974). La distribución de los corticotropos es semejante a la de los somatotropos y con pocas células en el área adyacente al lóbulo intermedio y en la zona anterior-ventral de la glándula. Se ha reportado la presencia de tirotropos formando agrupamientos en la zona central de la adenohipófisis (Nakane, 1974), pero también se han reportado como dispersos de manera individual en toda la glándula sin una localización especial (Yoshimura *et al.*, 1982). Los lactotropos se presentan dispersos a través de la glándula y forman grupos pequeños de cinco a diez células (Nogami y Yoshimura, 1982); a diferencia de los somatotropos y corticotropos este tipo celular si se localiza en áreas cercanas al lóbulo intermedio. Los lactotropos tienen dos subpoblaciones espaciales y funcionales en la glándula. La subpoblación localizada hacia el exterior de la adenohipófisis responde más al TRH que a la dopamina y la subpoblación localizada hacia el centro responde más a la dopamina que al TRH (Boockfor *et al.*, 1986 y Boockfor y Frawley, 1987). Los gonadotropos se distribuyen en toda la glándula, incluyendo las zonas adyacentes al lóbulo intermedio. Estas células se concentran en el área anterior-ventral de la glándula. Estudios de inmunocitoquímica han mostrado afinidades específicas entre los diferentes tipos celulares de la glándula *in vivo*. Los somatotropos tienen unión preferencial por los corticotropos (Nakane, 1974), los gonadotropos están frecuentemente rodeados por los lactotropos (Nogami y Yoshimura, 1982). En algunas regiones los lactotropos forman grupos entre si, al igual que los tirotropos (Yashiro *et al.*, 1981). Aunque no se aprecien interacciones aparentes entre las células aisladas en la glándula, un análisis de imágenes en tres dimensiones de los somatotropos mostró que forman una red donde la mayoría se unen entre si por uniones estrechas lo que les permite una coordinación funcional (Bonfont *et al.*, 2005). Las afinidades entre los diferentes tipos celulares se mantienen en los cultivos primarios de células de la adenohipófisis (Noda *et al.*, 2003). Estas características morfológicas permiten un micro ambiente para regular la respuesta de las células en estos lugares.

Las hormonas hipotalámicas, periféricas y los factores paracrinos y autocrinos regulan la síntesis y liberación de las hormonas adenohipofisarias. Varios mecanismos moleculares determinan la cantidad de factor que actúa sobre las células blanco. Estos mecanismos implican regulación a nivel de la biosíntesis, liberación e inactivación. La regulación en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) ilustra como el sistema funciona.

La hormona liberadora de tirotropina (TRH)

En 1969, después de diez años de trabajo, dos laboratorios (encabezados por Schally y Guillemin) lograron la purificación y caracterización química del factor hipofisiotrópico, la hormona liberadora de tirotropina (TRH, pGlu-His-Pro-NH₂) (Schally *et al.*, 1969; Burgus *et al.*, 1970). Como lo indica su nombre, el TRH ha sido reconocido principalmente por su capacidad de modular la síntesis y liberación de la TSH; sin embargo, el TRH ha mostrado ser igual de potente para inducir la síntesis y liberación de la PRL. El TRH tiene la propiedad de estimular la liberación de la GH, pero solo en condiciones de algún desorden metabólico, endocrino o neuropsiquiátrico, lo que puede ser debido a un cambio en el balance de otros factores que regulan la liberación de la hormona de crecimiento (O'Leary y O'Connor, 1995). Estudios en ratones con la delección genética del gen del TRH han demostrado el papel fundamental del TRH en la regulación de la síntesis y liberación de TSH (Yamada *et al.*, 1997) ya que los ratones son hipotiroideos. En estos ratones la regulación de la síntesis y liberación de PRL solo se afecta de manera negativa durante la lactancia (Yamada *et al.*, 2006).

El TRH es sintetizado a partir de un precursor de 26 kDa (Lechan *et al.*, 1986). Durante su trayecto a través del sistema de endomembranas este precursor es secuencialmente hidrolizado por las convertasas y una carboxipeptidasa para generar Gln-His-Pro-Gly; enseguida la enzima glutaminil ciclasa convierte a la Gln en pGlu y finalmente por la acción de una monooxigenasa α -amidante de la peptidilglicina (PAM) se forma el TRH, la molécula biológicamente activa (revisado en Joseph-Bravo *et al.*, 1998). La biosíntesis del TRH es regulada por la hormona tiroidea (T₃), el producto final en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (figura 2). Los niveles del proTRH así como de su ARNm se modifican específicamente en las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), positivamente en ratas hipotiroideas y negativamente en ratas hipertiroideas (Segerson *et al.*, 1987). Este efecto es directo ya que los implantes estereotáxicos de cristales de T₃ en el NPV de ratas hipotiroideas ocasionan un decremento del ARNm y del proTRH en las neuronas parvocelulares pero no en otras regiones hipotalámicas (Dyess *et al.*, 1988). La localización por inmunohistoquímica de los subtipos funcionales de los receptores para las hormonas tiroideas (TR) TR α 1 y TR β 2 en la mayoría de las neuronas parvocelulares TRHérgicas del NPV (Lechan *et al.*, 1994) y la presencia en la región 5' del gen del TRH de dos sitios potenciales de unión a los TR (Stevenin y Lee, 1995) demuestra la acción directa de las hormonas tiroideas para regular de manera específica la biosíntesis del TRH en las neuronas

que residen dentro del área tirotrópica del hipotálamo. Además de regular la biosíntesis del pro-TRH en el núcleo paraventricular, las hormonas tiroideas también regulan el procesamiento del precursor del TRH (Perello *et al.*, 2006) y la liberación del péptido (Bruhn *et al.*, 1991). El resultado final es que la cantidad de TRH liberada al sistema porta se mantiene a niveles relativamente constantes por este circuito de retroalimentación negativa (figura 2).

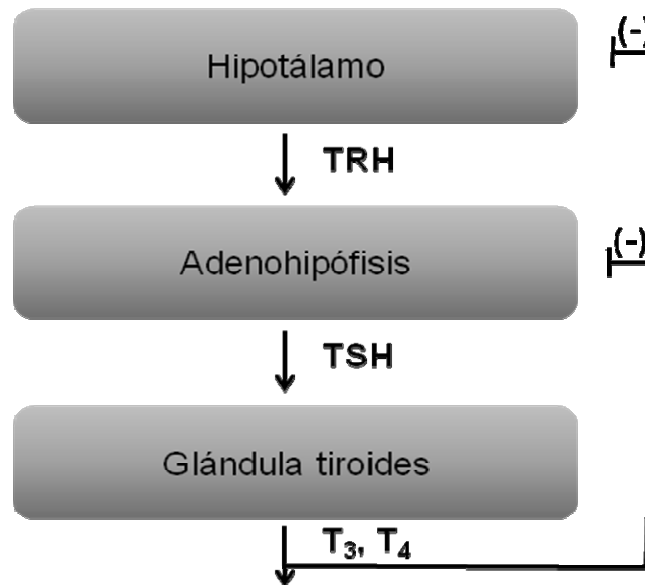


Figura 2. Circuito de retroalimentación negativa en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El hipotálamo secreta a la hormona liberadora de tirotrópica (TRH) que estimula la secreción hipofisiaria de tirotrópica (TSH), la cual estimula la secreción de tiroxina (T_4) y triiodotironina (T_3) en la glándula tiroides. La secreción de TRH y TSH se regula principalmente por un sistema de retroalimentación negativo por T_3 .

Receptores para el TRH

En la adenohipófisis de rata el ARNm del receptor para el TRH (TRHR1) se ha detectado en el 62 % de los somatotropos y en el 30 % de los lactotropos (Konaka *et al.*, 1997). En cultivos primarios de la adenohipófisis de rata, por inmunocitoquímica y con un análogo fluorescente del TRH [$\text{Rod}^3\text{-Me-His}$ TRH], el TRHR1 se detecta exclusivamente en los lactotropos y en los tirotropos y no en los somatotropos, lo que sugiere que el ARNm del TRHR1, en los somatotropos no produce una proteína activa, lo que concuerda con la falta de respuesta de estas células al TRH en condiciones normales (Yu *et al.*, 1998).

Dada la complejidad de la adenohipófisis y a su heterogeneidad de grupos celulares, las líneas celulares tumorales homogéneas, tales como las células TtT (provenientes de tumores

tirotrópicos) y las células GH₃ (provenientes de tumores lactosomatotrópicos), son de gran importancia como modelos *in vitro* para estudiar los mecanismos moleculares de acción del TRH; las células GH₃ son un modelo de lactotropos utilizado en muchos de los estudios sobre la biología del TRHR1 (Gershengorn y Osman, 1996). El TRH ejerce su efecto al unirse a su receptor, un miembro de la familia de los receptores con siete dominios transmembranales que se acopla a las proteínas G α q y G α 11, proteínas que acoplan al receptor con la vía de los fosfoinosítidos (Aragay *et al.*, 1992) (figura 3). La activación del TRHR1 estimula una respuesta bifásica en la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i); la respuesta se caracteriza por un incremento transitorio de la [Ca²⁺]_i, seguida de un incremento menor pero sostenido que depende del influjo de Ca²⁺ extracelular vía los canales dependientes de voltaje tipo L, canales activados por la proteína cinasa C (PKC) (Gollasch *et al.*, 1993 y Ashworth y Hinkle, 1996). El primer aumento en la [Ca²⁺]_i se debe a la movilización del Ca²⁺ del retículo endoplásmico vía la unión del segundo mensajero IP₃ a su receptor; este primer aumento en la [Ca²⁺]_i ocasiona una primera fase de liberación de PRL mientras que el segundo incremento en la [Ca²⁺]_i provoca una segunda fase de liberación de PRL. Los estudios llevados a cabo en las células TtT y tirotropos han mostrado que el TRH también estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol (4-5) bisfosfato con el consecuente incremento en la [Ca²⁺]_i y la liberación de la TSH (Ashworth y Hinkle, 1996; Brenner-Gati y Gershengorn, 1986) (figura 3).

Uno de los mecanismos propuestos para disminuir la respuesta a un estímulo hormonal constante es la desensibilización del receptor. Los mecanismos más importantes de desensibilización involucran efectos sobre el receptor mismo como la modificación covalente y la disminución del número de receptores en la membrana plasmática. Estos dos tipos de desensibilización se pueden diferenciar ya que la modificación covalente ocurre rápidamente (de segundos a minutos) mientras que la disminución del número de receptores es lenta y requiere de varias horas (Gershengorn y Osman, 1996). Se ha mostrado que el TRHR1 es desensibilizado en minutos por el TRH en células GH₃, evento que involucra la fosforilación del receptor por la cinasa 2 de receptores acoplados a proteínas G (G protein-coupled receptor kinase 2; Jones *et al.*, 2007). El TRH también desensibiliza al inducir una disminución en el número de los TRHR1 en la membrana plasmática; este fenómeno se explica de dos maneras: i) por internalización del complejo ligando-receptor; en este sentido Ashworth *et al.*, (1995) mostraron que en las células GH₃ el complejo TRH/TRHR1 se internaliza y recicla en vesículas cubiertas de clatrina y 20 minutos después de retirar el TRH del medio el TRHR1

regresa a la superficie de las células; ii) por la modulación de la tasa de síntesis del TRHR1; en las células GH₃, vía la activación de la PKC, el TRH ocasiona una disminución en los niveles del ARNm del TRHR1 (Fujimoto *et al.*, 1991). La expresión del TRHR1 se regula también por una variedad de hormonas tales como las tiroideas y los estrógenos, en donde las hormonas tiroideas disminuyen la densidad del TRHR1 *in vivo* y en células de la pituitaria en cultivo como consecuencia de la caída en los niveles de su ARNm (Schomburg y Bauer, 1995). Los estrógenos regulan positivamente los niveles del TRHR1 al inducir un incremento en los niveles del ARNm del TRHR1 *in vitro* e *in vivo* (Schomburg y Bauer, 1997). Así, estas hormonas no solo afectan la síntesis y secreción de las hormonas de la pituitaria sino también influyen la sensibilidad de las células de la adenohipófisis al neuropéptido hipotalámico TRH. En 1998 se identificó en la rata un segundo subtipo del receptor para el TRH llamado TRHR2 (Cao *et al.*, 1998, Itadani *et al.*, 1998), que después se identificó en el ratón (Harder *et al.*, 2001a) y en el pez *Catostomus commersoni* (Harder *et al.*, 2001b). El TRHR2 no se expresa en los humanos (Sun *et al.*, 2003). El alineamiento a nivel de aminoácidos revela un 50% de identidad entre los dos subtipos de receptor. Experimentos de "Northern blot" e hibridación *in situ* han mostrado que el TRHR1 se expresa abundantemente en la pituitaria anterior y en las regiones neuroendocrinas del cerebro, mientras que el TRHR2 no se expresa en estas regiones lo que sugiere que en la comunicación neuroendocrina el TRHR1 juega un papel principal. Ambos receptores presentan igual afinidad por el TRH (13 nM para el TRHR1 y 9 nM para el TRHR2) o sus análogos y aunque ambos receptores son estimulados por el TRH el TRHR2 tiene una mayor actividad basal de señalización y es internalizado más rápidamente que el TRHR1 (O'Dowd *et al.*, 2000). Estas diferencias en la señalización e internalización son probablemente relevantes en los distintos sitios en donde los dos subtipos del receptor llevan a cabo su función. Además de los mecanismos de desensibilización del receptor para disminuir los estímulos hormonales se ha sugerido la existencia de un mecanismo de inactivación del TRH que funciona como un elemento que regula la actividad de la hormona en su sitio blanco. La evidencia sugiere que la inactivación del TRH es por degradación enzimática. Este mecanismo aseguraría que los niveles extracelulares del TRH disminuyan para que las células blanco puedan recibir un nuevo estímulo.

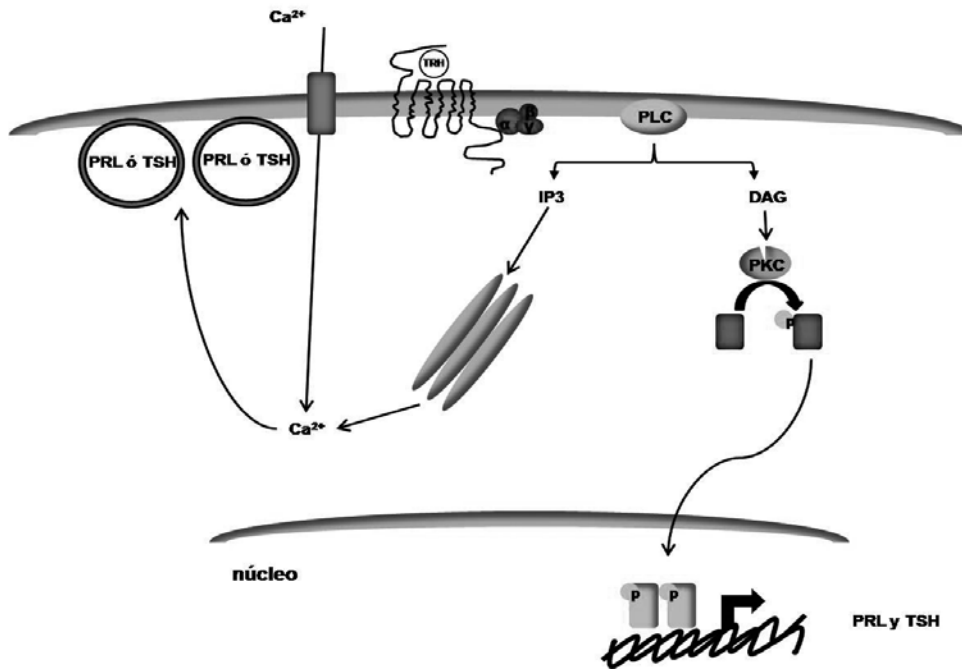


Figura 3. Vía de señalización activada por el TRH para regular la síntesis y secreción de prolactina y TSH. En respuesta al TRH su receptor se acopla a las proteínas G y activa la vía de los fosfoinosítidos. La activación de la fosfolipasa C hidroliza al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato para formar diacilglicerol (DAG) y D-mio-inositol-1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico en donde estimula la liberación de Ca^{2+} . El DAG se une y activa a la proteína cinasa C (PKC) que desencadena una cascada de señalización que regula la expresión de los genes de la prolactina y TSH. La PKC también activa canales de calcio tipo L que permiten la entrada de Ca^{2+} extracelular. El aumento en la concentración del Ca^{2+} intracelular dispara la liberación de las hormonas almacenadas en vesículas.

Degradación del TRH

Si bien el TRH es resistente a la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina, la papaína o la termolisina se ha mostrado que esta molécula es degradada *in vitro*, en fracciones solubles de cerebro (Browne y O'Cuinn, 1983) y de adenohipófisis (Bauer y Kleinkauf, 1980) por dos peptidasas clave, una piroglutamato peptidasa (PP) que libera el pGlu y una prolil endopeptidasa (PEP) que deamida al TRH para generar TRH ácido.

Una enzima con actividad de piroglutamato peptidasa se purificó parcialmente a partir de la fracción soluble de distintos tejidos de mamífero, incluyendo el cerebro de bovino, el de rata, el de ratón y el de cuyo, la adenohipófisis de bovino y de rata, el hígado de rata, la corteza

cerebral humana y el riñón humano (Walter, 1976). Esta enzima, llamada PPI, es típicamente una enzima monomérica que exhibe su máxima actividad y estabilidad en un ambiente altamente reducido y es inhibida por reactivos bloqueadores del sulfhidrilo (N-etilmaleimida, p-cloromercuribenzoato, 2-iodoacetamida). La PPI hidroliza un amplio espectro de sustratos con un residuo pGlu en el extremo amino terminal. Estos sustratos incluyen al TRH, al GnRH, a la neurotensina, a la bombesina, al neuropéptido anorexigénico y a otros sustratos sintéticos como el pGlu-7-amino-4metil-cumarina (pGlu-MCA), el pGlu-p-nitroanalido (pGlu-pNA), el pGlu-βnaftilamina (pGlu-βNA), el pGlu-Ala y el pGlu-Val (Cummins y O'Connor, 1998).

La prolil endopeptidasa (PEP) es una enzima predominantemente citosólica que tiene una masa molecular de aproximadamente 70 kDa. La PEP hidroliza a un amplio espectro de sustratos por el carboxilo terminal de la prolina (a excepción del enlace Pro-Pro). Sus sustratos incluyen a muchos neuropéptidos importantes tales como: angiotensina I y II, bradikinina, sustancia P, neurotensina, vasopresina, oxitocina, GnRH y TRH (Walter, 1976). En base a su amplio espectro de sustrato y a su distribución ubicua es probable que estas enzimas jueguen un papel en el catabolismo intracelular de péptidos, por ejemplo, en la reincorporación a las rutas biosintéticas, más que funcionar como elementos reguladores específicos de la actividad del TRH.

Los estudios de degradación del TRH permitieron detectar una actividad de piroglutamato peptidasa en la fracción de membranas, en diferentes tejidos de mamífero, que posteriormente se clasificó como piroglutamil peptidasa II o PPII.

La inactivación del TRH por la piroglutamil peptidasa II (PPII)

Los estudios bioquímicos sobre la degradación del TRH han sugerido que la enzima llamada piroglutamil peptidasa II (PPII) es la responsable de su inactivación extracelular. Las evidencias son: 1) la actividad de la PPII está enriquecida en el SNC donde su distribución no es homogénea (O'Connor y O'Cuinn 1985; Wilk y Wilk, 1989, Bauer, 1994, Kelly *et al.*, 2000); 2) tiene una especificidad restringida hacia el TRH (O'Connor y O'Cuinn 1985; Wilk y Wilk, 1989 y Bauer, 1994, Kelly *et al.*, 2000); 3) es una enzima de membrana con su sitio activo orientado hacia el espacio extracelular (Charli *et al.*, 1988; Bauer *et al.*, 1990); 4) si se inhibe su actividad, la cantidad de TRH recuperado en el medio extracelular de rebanadas de tejido cerebral se incrementa (Charli *et al.*, 1989).

La secuencia de la PPII de rata deducida a partir del ADNc predice una proteína de 1025 aminoácidos (1024 en humano) con un peso molecular calculado de 117 302 Da. El análisis de

la secuencia proteica predice un dominio N-terminal intracelular con un sitio potencial de fosforilación por la PKC, un dominio transmembranal seguido de un gran dominio extracelular (ectoenzima) con la secuencia consenso característica de las Zn^{++} metalopeptidasas. Los análisis de "Northern blot" muestran que la pituitaria y el cerebro de rata contienen varios transcritos de la PPII que van de 6 a 9.5 kb (Schauder *et al.*, 1994). Uno de estos transcritos resulta de un splicing alternativo y codifica para una forma trunca de la PPII (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005). Aunque esta forma corta carece de actividad enzimática su heterodimerización con la forma silvestre resulta en un efecto dominante negativo por lo que se ha propuesto como un mecanismo para regular la actividad de la PPII (Chavez-Gutiérrez *et al.*, 2005).

La actividad de la PPII se inhibe de manera competitiva por péptidos que contienen pGlu en su amino terminal tales como el GnRH, la neurotensina, la luliberina, la eleudoisina, el péptido anorexogénico; sin embargo, la hidrólisis es específica para péptidos cuya estructura general es pGlu-X-Y en donde X es un residuo no cargado y Y es Pro, Ala, Trp, Pro-Gly, Pro-NH₂ (TRH), Pro-β-naftilalamina o Pro-7-amino-4-metil coumarina (O'Connor y O'Cuinn 1985, Wilk y Wilk, 1989, Bauer, 1994, Kelly *et al.*, 2000). Esta especificidad de la PPII hacia el TRH contrasta con otras ectopeptidasas que no tienen un sustrato específico y que degradan una amplia variedad de péptidos (ver abajo). Por ejemplo, la PPII presenta un 30% de identidad con otras dos ectopeptidasas de la subfamilia M1 de las metalopeptidasas, las aminopeptidasas A y N (Schauder *et al.*, 1994). Las aminopeptidasas A (APA) y N (APN) hidrolizan preferentemente los enlaces peptídicos N-terminales en péptidos cuyo aminoácido N-terminal es ácido o neutro respectivamente. A pesar de este porcentaje limitado de similitud global, la similitud es mucho mayor en el dominio catalítico, por lo que la diferencia de especificidad se debe a cambios puntuales en el sitio activo. Se han identificado tres residuos (serina 269, glutámico 408 y lisina 463) en el sitio activo de la PPII que están implicados en su especificidad (Chavez-Gutiérrez *et al.*, 2006) hacia el TRH. La mutación en la serina 269 (S269E) es suficiente para transformar a la PPII en una aminopeptidasa (Chavez-Gutiérrez *et al.*, 2006).

Debido a que hasta la fecha no se cuenta con anticuerpos específicos anti-PPII útiles en inmunohistoquímica, la localización y distribución de la enzima se ha realizado midiendo su actividad enzimática (Friedman y Wilk 1986, Vargas *et al.*, 1987 y 1992), por técnicas de hibridación *in situ* (Heuer *et al.*, 1998), de hibridación tipo "Northern blot" (Schauder *et al.*, 1994) y de hibridación con protección a ribonucleasas (Lin y Wilk 1996). La actividad de la

PPII esta enriquecida en el sistema nervioso central donde su distribución no es homogénea. Los sitios de mayor actividad son el bulbo olfatorio, el hipocampo, el núcleo acumbens, la corteza cerebral y el hipotálamo. Fuera del sistema nervioso central se detecta una baja actividad en la adenohipófisis y trazas de actividad se detectan en el pulmón, en el bazo, en el corazón, en el músculo esquelético y en el riñón mientras que en el hígado, el timo y el páncreas no se detecta actividad (Friedman y Wilk 1986; Vargas *et al.*, 1987 y 1992). En general el ARNm de la PPII se distribuye en los sitios en donde se detecta la actividad enzimática (Schauder *et al.*, 1994; Lin y Wilk 1996 y Heuer *et al.*, 1998).

En comparación a los niveles encontrados en varias regiones del cerebro, la PPII en la pituitaria anterior presenta bajos niveles de actividad así como niveles bajos de su ARNm. Sin embargo, varias evidencias sugieren que la PPII es un elemento de control que influencia la extensión y duración de las actividades endocrinas del TRH en la pituitaria, para regular la secreción de hormonas. 1) En un gradiente de densidad, la actividad de la PPII correlaciona con la presencia de las células lactotrópicas pero no con los otros grupos celulares, lo que sugiere que la PPII se encuentra en uno de los blancos del TRH (Bauer *et al.*, 1990). 2) La actividad y el nivel del ARNm de la PPII en la adenohipófisis, pero no en el cerebro, son controlados por hormonas tiroideas (Bauer, 1987; Ponce *et al.*, 1988), y estrógenos (Bauer, 1988). 3) En cultivos primarios de células de la adenohipófisis y en células GH₃ la actividad y el nivel del ARNm de la PPII se regulan, a tiempos largos (horas), por el TRH y otros factores que controlan la síntesis y liberación de la PRL (Vargas *et al.*, 1994 y 1998; Lin y Wilk, 1998). 4) El TRH, en combinación con la depleción de la dopamina, activa en poco tiempo (15 minutos) a la PPII lo que sugiere que la actividad de la enzima puede ser rápidamente ajustada para eliminar el exceso de TRH (Bourdais *et al.*, 1999).

A finales de la década de los 70's se logró la purificación (parcial), a partir del suero de porcino y de rata, de una enzima que hidroliza el enlace pGlu-His del TRH. Esta enzima no se inhibe por reactivos bloqueadores del sulfhidrilo pero si por agentes quelantes de metales. Estudios llevados a cabo para determinar su especificidad mostraron que esta enzima es altamente específica hacia el TRH y péptidos semejantes al TRH (por eso fue llamada tiroliberinasa) (Bauer y Nowak, 1979). La tiroliberinasa es una isoforma soluble de la PPII que se origina en el hígado (Schmitmeir *et al.*, 2002). La alta especificidad de sustrato sugiere que esta enzima regula los niveles del TRH durante su transporte por el sistema portal en camino hacia la pituitaria para modular los niveles disponibles para las células blanco. La PPII se expresa también en los tanicitos de la eminencia media, en donde se regula positivamente

por hormonas tiroideas (Sánchez *et al.*, 2008). Esta localización sugiere un punto adicional de control para modular la cantidad de TRH liberado por las neuronas hipotálamicas (Sánchez *et al.*, 2008).

En conclusión, la regulación hormonal específica de la PPII en la adenohipófisis apoya la hipótesis de que esta enzima funciona como un elemento importante de control. Además, debido a que la regulación del TRHR1 por las mismas hormonas es inversa, se sugiere que ambos elementos cooperan para modular la sensibilidad de las células blanco del TRH a fin de controlar la secreción de las hormonas de la adenohipófisis. Los elementos que se han descrito y que participan en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis se resumen en la figura 4.

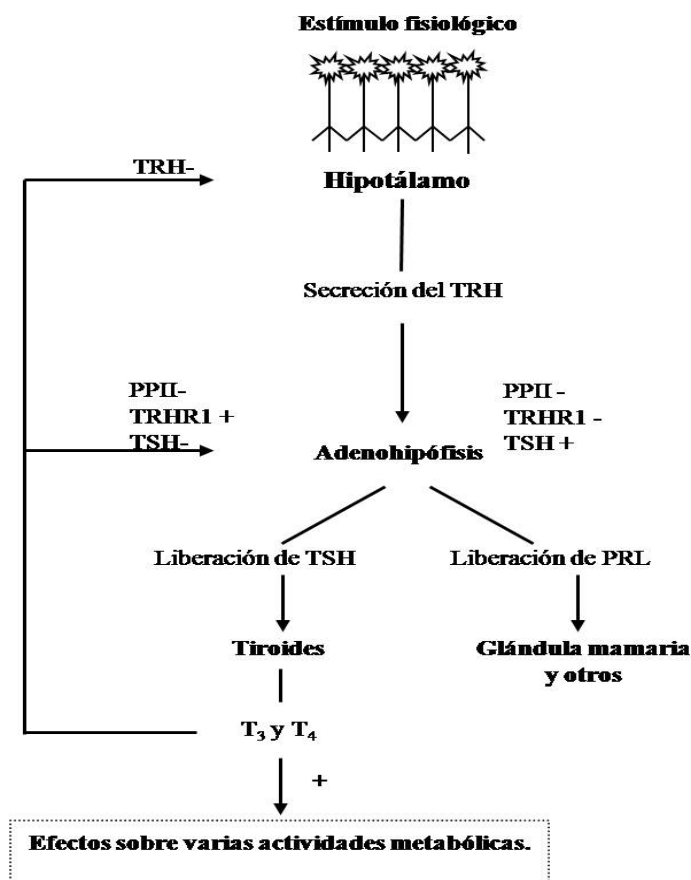


Figura 4. El TRH y el eje hipotálamo-hipófisis. El TRH es liberado de la eminencia media en respuesta a un estímulo fisiológico. La hormona es conducida vía el sistema portahipofisiario a la adenohipófisis en donde es reconocida por su receptor (TRHR1) en los tirotrópos donde modula la síntesis y liberación de TSH y en los lactotrópos donde induce la síntesis y secreción de prolactina. Los símbolos +/- indican si existe una influencia positiva o negativa del TRH y hormonas tiroideas sobre la síntesis de TRH, PPII, TRHR1 y TSH.

Otras ectopeptidasas involucradas en la regulación de la comunicación peptidérgica

Se han detectado una gran variedad de péptidos (neurotensina, sustancia P, bradikinina, angiotensina, encefalinas, endorfinas, etc.) que desempeñan una función relevante en la fisiología de los seres vivos. Como ya se describió para el TRH, su hidrólisis ocurre principalmente por la acción de ectopeptidasas. Cabe destacar que la hidrólisis de los péptidos activos permite terminar con la señal peptidérgica o bien generar una actividad biológica nueva. Las peptidasas mejor estudiadas son: la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la neprililina (NEP) y la aminopeptidasa N (APN). En contraste con la PPII, estas ectopeptidasas no tienen un sustrato biológico único y son capaces de hidrolizar varios péptidos endógenos (O'Cuinn *et al.*, 1995). Sin embargo, su función *in vivo* está determinada por varios factores, entre los que destaca la localización celular de la enzima en la cercanía de los receptores para los péptidos involucrados en una respuesta biológica particular (Csuhai *et al.*, 1995). Identificar la función biológica de las ectopeptidasas en los diferentes tejidos ha sido posible ya que se dispone de inhibidores específicos para cada una de ellas. La ACE se inhibe por el captopril, el lisinopril y el enalaprilat; la NEP por el fosforamidon y el tiorfan y la APN por la amastatina y la actinonina. El uso de estos inhibidores selectivos ha permitido monitorear los niveles extracelulares de los péptidos y de esta manera obtener información sobre la existencia y las características de la ectopeptidasa involucrada en el metabolismo del péptido. El papel de las ectopeptidasas también se asegura porque al inhibirse su actividad los efectos biológicos del péptido se potencian (Csuhai *et al.*, 1995).

La enzima convertidora de angiotensina (ACE; E.C. 3.4.15.1) es una dipeptidil carboxipeptidasa con una función fundamental en el control del sistema renina-angiotensina: genera al péptido vasoconstrictor angiotensina II (ang II) a partir de un precursor inactivo, la angiotensina I (ang I), e inactiva al péptido vasodilatador bradikinina (Wolf, 2008). La ang II induce vasoconstricción, liberación de aldosterona y otras acciones fisiológicas que en conjunto incrementan la presión sanguínea (Wolf, 2008). La ACE puede hidrolizar también, a la neurotensina, a la sustancia P y a las encefalinas (Csuhai *et al.*, 1995). La secuencia deducida a partir del ADNc de la ACE muestra que esta molécula es un polipéptido con dos dominios homólogos extracelulares, cada uno con un sitio catalítico independiente (Wei *et al.*, 1991). La ACE se ancla a la membrana celular por una secuencia hidrofóbica localizada hacia el carboxilo terminal. Los dos sitios catalíticos hidrolizan con igual eficiencia a la ang I pero varían en algunos parámetros bioquímicos tales como su capacidad para hidrolizar péptidos diferentes a la ang I (Jaspard *et al.*, 1993); por ejemplo, el sitio catalítico carboxilo terminal

requiere una mayor concentración de iones cloro para hidrolizar eficientemente a sustratos como el hipuril-histidil-leucina (HHL) e hipuril-glicil-glicina (HGG). Además, los péptidos GnRH y el péptido inhibidor de las células madre hematopoyéticas (hematopoetic stem cell inhibiting peptide, N-acetil-seril-aspartil-lisil-prolina, AcSDKP) se hidrolizan más eficientemente por el sitio activo amino terminal que por el sitio catalítico carboxilo terminal (Rieger *et al.*, 1993). El significado fisiológico de la presencia de dos sitios catalíticos en la ACE no se conoce hasta ahora.

La mayor parte de la actividad enzimática del ACE se asocia a los tejidos como el endotelio vascular y el epitelio tubular proximal del riñón, el intestino, las neuronas y la adenohipófisis. La ACE también se detecta en una forma soluble en el plasma que resulta de la hidrólisis enzimática de la forma asociada a la célula (Beldent *et al.*, 1993). El testículo expresa una isoforma de la ACE que contiene únicamente el dominio catalítico carboxilo terminal. Estudios llevados a cabo en ratones con la delección génica del gen de la ACE (ACE.1) han mostrado que la enzima juega un papel importante en el control de la presión sanguínea y en la capacidad para concentrar la orina eficientemente; además, es importante en la fertilidad (Esther *et al.*, 1996). Se ha creado una cepa de ratón (ACE.2) que no expresa la ACE del testículo y solo expresa la ACE somática en su forma soluble, ya que la enzima expresada carece del sitio de anclaje a la membrana. Aunque la enzima soluble genera ang II los animales presentan un fenotipo similar a los ratones ACE.1; es decir, tienen baja presión sanguínea, presentan un adelgazamiento en los vasos del riñón, son incapaces de concentrar orina y los machos tienen fertilidad reducida. Estos resultados sugieren que los ratones ACE.2 no generan suficiente ang II en sus sitios de acción, no obstante que en el suero de estos animales se detecta la actividad de la ACE y demuestran que la ACE somática asociada a las células y no la forma soluble es la más importante en el control de la presión sanguínea y la capacidad para concentrar la orina eficientemente (Esther *et al.*, 1997). Sin embargo, los estudios con estos ratones hacen difícil determinar si los cambios locales debidos a la ausencia de la enzima no son una consecuencia de los cambios generales ocasionados por la ausencia de la misma; por ejemplo, no se puede descartar que la baja fertilidad sea una consecuencia de los cambios en la presión sanguínea en vez de una función particular de la ACE en el testículo. Además, al suprimir por completo la expresión de la ACE no se puede obtener información sobre el papel de la enzima en el cerebro, la pituitaria etc. ni tampoco su participación en la regulación de la acción de otros péptidos, como la neurotensina, la sustancia P y a las encefalinas, que también son sus sustratos naturales. Por lo tanto, la modificación tejido

específica de una enzima es fundamental para conocer su papel en un tejido u órgano en particular. La Ang II es un potente hipertensivo por lo que los inhibidores de la ACE son utilizados como agentes antihipertensivos y como drogas terapéuticos en problemas cardíacos. La inhibición de ACE potencia el efecto relajante de la bradikinina en arterias coronarias previamente contraídas (Tom *et al.*, 2002; Dendofer *et al.*, 2001.) y permite la resensibilización de los receptores a bradikinina en células endoteliales (Marcic *et al.*, 2000; Benzing *et al.*, 1999).

La NEP (E.C. 3.4.24.11, neprilina, encefalina, endopeptidasa neutra, endopeptidasa 24,11) es una metalopeptidasa muy abundante en el riñón (4 % de la proteína total de las microvellosidades del riñón) con una especificidad semejante a la termolisina. La purificación y subsecuente clonación del ADNc de la NEP reveló que es una proteína integral de membrana de tipo II con aproximadamente 700 aminoácidos estructurados en un pequeño dominio citoplasmático, una región transmembranal hidrofóbica y un dominio extracelular que contiene el sitio activo (Devault *et al.*, 1987). El dominio extracelular presenta el motivo His-Glu-Xaa-Xaa-His de unión al zinc (metalopeptidasa de Zn^{2+}) y además contiene 10 residuos de cisteína, 4 de las cuales se localizan cerca de la región transmembranal y están involucrados en la formación de los puentes disulfuro intracadena que son importantes para mantener la estructura y actividad de la enzima (Tam *et al.*, 1985).

La NEP hidroliza una amplia variedad de oligopéptidos por su sitio amino terminal en aminoácidos hidrofóbicos. Aunque en los mamíferos la cantidad de NEP es muy alta en el riñón (4% de la proteína total) fueron los estudios del metabolismo de las encefalinas los que permitieron identificar el primer papel fisiológico para la NEP (Malfroy *et al.*, 1978). Estos estudios permitieron enfocarse en el papel de las ectopeptidasas para apagar las señales de los neuropéptidos en el cerebro (Malfroy *et al.*, 1978). Para profundizar en el estudio de la NEP se han desarrollado una gran variedad de inhibidores específicos entre los cuales los mejor estudiados son el tiorfan y el fosforamidón (Roques *et al.*, 1980, Roques y Beaumont, 1993). La NEP, en el cerebro, se localiza en las neuronas como una ectoenzima sináptica que inactiva a las encefalinas liberadas (por lo que se le ha llamado encefalinaasa). Así, la inhibición de la NEP, en el cerebro de rata y ratón, disminuye la nocicepción debido a que se mantienen altos los niveles de las encefalinas (Roques *et al.*, 1980; De la Baume *et al.*, 1983). Sin embargo, también se ha mostrado que la NEP del cerebro puede degradar al péptido neurotóxico β -amiloide, por lo que su inhibición ocasiona una mayor acumulación del péptido y puede ser un factor de riesgo para la enfermedad de Alzheimer (Iwata *et al.*, 2000). En la pituitaria la NEP

se localiza solo en los gonadotropos (Barnes y Kenny 1988) y su inhibición, en cultivos primarios, potencia la liberación de ACTH estimulada por CRH (Ritchie *et al.*, 2003). La NEP es también importante fuera del sistema nervioso central; por ejemplo, para terminar la acción de los péptidos natriuréticos y vasodilatadores como el péptido natriurético atrial (PNA). La NEP se localiza también en la superficie de los neutrófilos y en las células del pulmón, en donde limita la inflamación neurogénica iniciada por una variedad de estímulos que incluyen a las tachikininas liberadas por las terminales nerviosas periféricas en las vías aéreas superiores (Shipp *et al.*, 1991). Estudios llevados a cabo en diferentes tipos de cáncer (pulmón, próstata) han mostrado una baja expresión de la NEP lo que ha sugerido que la enzima juega un papel importante en apagar señales mitogénicas activadas por péptidos semejantes a la bombesina o endotelinas (Shipp *et al.*, 1991; Papandreou *et al.*, 1991). Así, parece que un desbalance en la expresión de la NEP y por lo tanto en los niveles de los sustratos peptídicos, desencadena estados patológicos. Estudios realizados en ratones con la delección genética del gen de la NEP han mostrado un incremento en la letalidad por choque séptico inducido por endotoxinas (Lu *et al.*, 1995) y una inflamación no controlada del colon (Sturiale *et al.*, 1999).

La APN/CD13 (E.C. 3.4.11.2; alanina aminopeptidasa, aminopeptidasa microsomal, aminopeptidasa M, amino oligopeptidasa, GP 150), originalmente identificada como un marcador de células mieloides (Look *et al.*, 1989), es una metalopeptidasa de tipo II con un dominio amino terminal intracelular, un dominio transmembranal único y un dominio extracelular que contiene el sitio activo (Hooper, 1994). Esta enzima se localiza en la membrana plasmática como un homodimero de 160 kDa unido de manera no covalente. La secuencia del ADNc revela la presencia de la secuencia de aminoácidos His-Glu-Xaa-Xaa-His característica de las metalopeptidasas de Zn^{2+} (Hooper, 1994). Estudios de mutagénesis dirigida han mostrado que las cisteínas extracelulares de la molécula permiten una correcta conformación de su estructura y por lo tanto son necesarias para su actividad enzimática y correcta localización en la superficie extracelular (Firla *et al.*, 2002).

La APN/CD13 cataliza preferencialmente la liberación de aminoácidos neutros (con excepción de la prolina) de los oligopéptidos no substituidos en su amino terminal. Dentro de los sustratos biológicamente activos de la APN/CD13 se encuentran los neuropéptidos (met y leu encefalinas, neurokinina A, met-lys-bradikinina y endorfinas como la esfinorfina), péptidos vasoactivos (kalidina, somatostatina y angiotensinas) y péptidos quimioatrayentes (proteína quimioatrayente de monocitos/MCP-1 y la N-formil metionina leucina fenilalanina/fMLP) (Bauvois y Dauzone 2006). Además de su actividad catalítica la

APN/CD13 funciona como un receptor para los coronavirus (Delmas *et al.*, 1992). En los humanos el coronavirus 229E utiliza a la APN/CD13 para entrar a las células alveolares y establecer una infección en el tracto respiratorio superior (Yeager *et al.*, 1992). La APN/CD13 es una enzima ubicua y su actividad se detecta en órganos como el riñón, el cerebro, la adenohipófisis, el hígado, los vasos sanguíneos, y los nódulos linfáticos. A nivel celular se detecta en la membrana plasmática de endotelios, epitelios, fibroblastos y leucocitos. Esta enzima es multifuncional y se ha relacionado con la regulación de diferentes procesos fisiológicos tales como: la angiogenesis del endotelio vascular, la regulación de la presión sanguínea, el ajuste (“trimming”) de los antígenos y el procesamiento para la presentación de antígenos. Identificar la función biológica de la APN/CD13 ha sido posible gracias a que se cuenta con diferentes estrategias experimentales que incluyen el uso de inhibidores específicos (amastatina y la actinonina), los ARN de interferencia y ratones con la delección del gen de la enzima. Así, cuando la expresión de la enzima se bloquea *in vitro* con un ARNi se inhibe la formación del tubo capilar de células endoteliales umbilicales (Fukasawa *et al.*, 2006). La enzima también está involucrada en regulación de la presión sanguínea en el sistema renina angiotensina en el cerebro causando hipertensión al metabolizar la angiotensina II a angiotensina III. Al igual que la NEP, su inhibición ocasiona en ratas una mayor latencia en pruebas de dolor (De la Baume, *et al.*, 1983). En la adenohipófisis su inhibición con bestatina potencia la liberación de ACTH en respuesta al CRH. Estudios con una línea de ratón deficiente del gen de la APN/CD13 han mostrado, en un modelo de neovascularización de la retina, que el ratón deficiente tiene una disminución en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Rangel *et al.*, 2007). Así aunque la APN no es esencial para el desarrollo embrionario y fetal incluyendo la formación de vasos sanguíneos (vasculogenesis), esta enzima es crítica para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogenesis) en procesos patológicos.

Estos ejemplos muestran que la mayoría de las ectopeptidasas no tienen un sustrato biológico único y son capaces de hidrolizar varios péptidos endógenos. Por lo tanto, su función *in vivo* está determinada por factores tales como: su localización celular y tisular, su cercanía con el receptor específico para un péptido determinado, si su expresión es constitutiva o susceptible a regulación etc., por lo que identificar la función biológica en los tejidos en donde se expresan no es tarea fácil. Además, es claro que el eliminar por completo a la enzima hace difícil determinar si el fenotipo observado para una respuesta fisiológica en particular se debe a los cambios locales en el metabolismo del péptido involucrado o a una consecuencia de la

eliminación de la enzima en todo el organismo. Por lo tanto, para determinar el papel de una ectoenzima en un tejido es necesario aplicar estrategias para suprimir a la enzima de manera tejido específico y así observar el fenotipo asociado.

JUSTIFICACION

Los péptidos regulan muchos procesos importantes en la fisiología de los seres vivos. La actividad de los mensajeros péptidicos se regula a nivel de su biosíntesis, su liberación y por su inactivación enzimática. En el eje hipotálamo-adenohipófisis se ha caracterizado en detalle la acción de péptidos que se liberan en la eminencia media por neuronas hipotalámicas (TRH, GnRH, ACTH, somatostatina, etc.) y que alcanzan a la adenohipófisis a través del sistema portal. En esta glándula los efectos de los péptidos hipotalámicos se han estudiado a detalle a nivel de: sus receptores específicos, las vías de señalización involucradas, los eventos de regulación de la acción de los péptidos a nivel de receptor (desensibilización, internalización) y las respuestas celulares (síntesis y liberación de hormonas). Sin embargo, la participación de las ectopeptidasas para modular la acción de los péptidos ha sido más difícil de estudiar ya que la inactivación puede ocurrir en varios compartimientos: en el espacio extracelular entre las terminales nerviosas y los vasos portales, dentro de los vasos portales y en la adenohipófisis. Para determinar si uno u otro de los compartimientos tiene un mayor impacto en el control de la acción de los péptidos es necesario el empleo de estrategias que supriman de manera tejido-específica a la peptidasa de estudio. Para el caso de la PPII, la información generada hasta el momento sugiere que la PPII actúa como un elemento para controlar los niveles extracelulares del TRH y modular la secreción de hormonas en la pituitaria anterior. Sin embargo, el impacto de la PPII para regular la respuesta fisiológica del TRH sobre la adenohipófisis no se ha estudiado a detalle ya que: a) se carece de información precisa sobre su localización a nivel celular, un problema complejo en la glándula debido a su citoarquitectura en el que las células no se distribuyen uniformemente y presentan asociaciones específicas entre los distintos tipos celulares; y b) por la ausencia de estrategias para inhibir su expresión de manera eficiente y específica. Actualmente se han sintetizado algunos inhibidores de la PPII (Kelly *et al.*, 2000, 2005) o han sido purificados de invertebrados marinos (Pascual *et al.*, 2004); estos inhibidores se están evaluando *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, al inicio de este proyecto el único inhibidor disponible para la PPII no podía ser usado en un modelo fisiológico *in vivo* ya que su Ki para

la PPII es de 8 μM (Charli *et al.*, 1989). Como alternativa utilizamos oligonucleótidos antisentido, una estrategia confiable para la supresión específica de genes. Esta estrategia tiene la ventaja de ser fácilmente optimizada para su uso *in vitro*. Para entender el papel específico de la PPII en la pituitaria anterior desarrollamos un estudio *in vitro* ya que por el momento no podemos manipular específicamente la enzima en la glándula sin afectar la PPII en la eminencia media o la tiro liberina presente en los vasos sanguíneos del sistema portalhipofisiario *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la piroglutamil peptidasa II en los efectos del tripéptido TRH en la adenohipófisis de la rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la localización celular del ARNm de la PPII en las células de la adenohipófisis en cultivo
- Diseñar oligonucleótidos antisentido (ASO) específicos para suprimir la expresión de la PPII
- Optimizar una estrategia para inhibir de manera eficiente y específica la expresión de la PPII.
- Determinar las consecuencias de modificar los niveles de la PPII en la adenohipófisis *in vitro* sobre las respuestas celulares al TRH.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

a) Expresión del ARNm de la PPII en las células de la adenohipófisis. Ya que hasta la fecha no se cuenta con anticuerpos específicos anti-PPII para realizar estudios de inmunocitoquímica (ICQ), se localizó su ARNm por hibridación *in situ* (HIS). La localización del ARNm de la PPII se estableció en cultivos primarios de células de la adenohipófisis,

porque: i) en experimentos preliminares no se logró detectar el ARNm de la enzima en cortes histológicos de la adenohipófisis; ii) El fenotipo de las células de la adenohipófisis de adulto se mantienen en cultivos primarios y iii) se facilita la detección de las células que expresan niveles bajos de un ARNm.

b) Porcentaje de lactotropos, somatotropos y tirotropos en las células de la adenohipófisis. Con experimentos de ICQ para detectar la expresión de PRL, GH y la subunidad β de la TSH se estableció el porcentaje de los lactotropos, somatotropos y tirotropos respectivamente en las células de la adenohipófisis en cultivo.

c) Porcentaje de lactotropos somatotropos y tirotropos que expresan el ARNm de la PPII. El porcentaje de lactotropos que expresan el ARNm de la PPII se determinó por dos estrategias: i) con experimentos de HIS radioactiva combinada con ICQ para PRL; ó ii) con experimentos de HIS fluorescente combinada con ICQ para PRL. El porcentaje de los tirotropos que expresan el ARNm de la PPII se definió con experimentos de HIS combinada con ICQ para la subunidad β de la TSH. El porcentaje de los somatotropos que expresan el ARNm de la PPII se determinó con experimentos de HIS combinada con ICQ para GH.

d) Diseño de los oligonucleótidos (ODN) antisentido. Se diseñaron en base a un modelo teórico que predice sitios potencialmente accesibles en la estructura secundaria del ARNm de la PPII. Se utilizaron ODN con una modificación fosforotiato ya que son estables en el medio intra e extracelular y su carga neta negativa permite la degradación del ARN blanco por la ARNasa H. Se diseñaron 8 ODN dirigidos contra distintas regiones a lo largo del ARNm de la PPII y como controles negativos se utilizaron 3 ODN revueltos (scrambled) que no hibridan con el ARNm de la PPII. Todos los ODN se obtuvieron por síntesis química.

e) Supresión de la expresión de la PPII. Para optimizar la supresión del ARNm de la PPII en cultivos de adenohipófisis se procedió a encontrar el medio de transfección adecuado para los ODN. Se evaluó a la Cellfectina, el transfectam, el fugene6 y a la polietilemina. Para realizar el monitoreo de la transfección se empleó un ODN marcado con fluoresceína. Una vez seleccionado el transfectante se procedió evaluar a los 8 ODN diseñados para suprimir la expresión de la PPII. Los cambios en los niveles del ARNm se evaluaron por RT-PCR semicuantitativa y Northern blot. Los cambios a nivel de proteína se evaluaron con un ensayo

enzimático para determinar la actividad de la PPII. La especificidad de los ODNs se determinó al evaluar los cambios en los niveles del ARNm de las aminopeptidasas A y N.

f) Papel de la PPII en la comunicación mediada por el TRH en la adenohipófisis. Una vez seleccionado el ODN más efectivo para suprimir la expresión de la PPII se procedió a evaluar el efecto del TRH en células a las que se les suprimió la expresión de la PPII. La valoración se realizó analizando las funciones bien conocidas de las células responsivas al TRH: la síntesis y liberación de PRL y TSH. Los niveles del ARNm de la PPII, PRL, TSH, TRHR-1 APA, APN, PRL y TSH se midieron por RT-PCR, los niveles de la PRL y TSH se determinaron por radioinmunoensayo.

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se emplearon ratas hembras Wistar de 80 a 100 días de edad mantenidas en condiciones controladas de luz (luz de 7 a 19 horas) y alimentadas *ad libitum*. Los animales se sacrificaron por decapitación, las glándulas pituitarias utilizadas para HIS se extrajeron y congelaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron a -70 °C hasta que se realizaron los cortes de 12 µm en un criostato. Las adenohipófisis utilizadas para realizar los cultivos primarios se extrajeron y procesaron inmediatamente (ver abajo).

Tratamiento del material y del agua

Todo el material de vidrio que se empleó para la técnica de HIS e ICQ se horneó a 180°C durante 12 horas. El resto del material que se requirió para estas técnicas se autoclaveó a 120 libras de presión durante 30 minutos.

Toda el agua utilizada en los cultivos celulares y en las técnicas de HIS e ICQ fue grado miliQ-UF (Millipore, con una resistividad de 18 mohm) y se colectó directamente en frascos horneados y posteriormente se autoclaveó a 120 libras de presión durante 30 minutos.

Cultivos celulares

Las células de la adenohipófisis se cultivaron de acuerdo al método descrito por Vargas *et al.*, (1994). De manera breve, se extrajeron 15 glándulas pituitarias, a las que se les separó la

neurohipófisis, y se colocaron en DMEM (Invitrogen corporation) que contenía 0.3 % de albúmina de suero bovino (DMEM-BSA). Las adenohipófisis se cortaron en fragmentos, se lavaron en DMEM-BSA e incubaron durante 18 minutos a 37 °C en 3 ml de DMEM-BSA que contenía 5 mg/ml de tripsina (Sigma-Aldrich). Enseguida se agregaron 4.5 ml de DMEM-BSA que contenía 12 µg de DNAsa (Sigma-Aldrich) y se incubaron por 2 minutos a 37 °C. Una vez que el tejido sedimentó el sobrenadante se descartó y las adenohipófisis se incubaron por 5 minutos a 37 °C en 2 ml de DMEM-BSA que contenía 1.5 mg de inhibidor de tripsina (Sigma-Aldrich). Después el tejido se incubó por 8 minutos a 37 °C en medio libre de calcio y magnesio DMEM con EDTA 2 mM y luego durante 15 minutos con DMEM con EDTA 1 mM. Luego de estos tratamientos las células de la adenohipófisis se dispersaron mecánicamente en DMEM, suplementado con glucosa, glutamina, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomocina, fungizona y 10% de suero fetal bovino (DMEM-S). Para los estudios de HIS e ICQ, se sembraron 5×10^5 células viables en pozos de cultivo de 21 x 20 milímetros (Nalge Nunc, Lab-Tek) tratados con poli-L-lisina; para los estudios con los ODN, sembramos 1.1×10^6 células viables en los pozos de cultivo de 16 milímetros de diámetro (Corning). Para los estudios de HIS e ICQ, el DMEM-S se suplementó con hormona tiroidea $T_3 10^{-8}$ M y el medio se cambió cada 48 horas; las células se analizaron a las 120 horas. Para los estudios con los ODN, el DMEM-S se suplementó con 10^{-8} a 10^{-9} M de T_3 al utilizar 4 protocolos de régimen de tratamiento con la hormona. Estos protocolos se evaluaron para encontrar la condición óptima de supresión de la expresión de la PPII (los detalles se describen en el artículo 1). El protocolo llamado D se empleó en los experimentos para conocer el papel de la PPII en la comunicación mediada por el TRH (ver abajo).

Las células de glioma de rata C6 se mantuvieron en DMEM suplementado con 19 mM de glucosa, 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomocina, fungizona y 10 % de SFB. 24 horas antes de transfectar los ODN, se sembraron 10^5 células en los pozos de cultivo de 16 mm con 1 mL DMEM-S suplementado con $T_3 10^{-9}$ M. Antes de que terminara el tiempo de 24 horas con T_3 las células se transfectaron con los ODN (ver abajo). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con 95 % de O_2 y el 5 % de CO_2 .

Inmunocitoquímica para la PRL, TSH y GH

Las células de la adenohipófisis (1.2×10^5 células/cm²) cultivadas sobre placas de cultivo de 21 x 20 mm (Lab-Tek, Nalge Nunc) se fijaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4 % en PBS, pH 7.2. Después de dos lavados con PBS las células se

permeabilizaron durante 3 minutos con una solución de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.3 % en PBS, pH 7.2. Para evitar el pegado inespecífico del anticuerpo las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (Roche) al 1 %, Triton X-100 al 0.01 % en PBS. Las células se incubaron por 12 horas a 4 °C con el anticuerpo de conejo anti-rPRL (NIDDK-AFP425_10_91), 1/6000 en solución de bloqueo o con el anticuerpo de conejo anti-r β TSH (NIDDK-AFP-1274789) 1/1000 en solución de bloqueo o con el anticuerpo de cuyo anti-rGH diluido 1:1000 (los anticuerpos fueron proporcionados por A. F. Parlow y el Programa Nacional de Hormonas de la Pituitaria, NIDDK, de los E.U.A.). Después de 3 lavados con PBS las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG de conejo (Vector laboratories), 1/200 en solución de bloqueo o con el anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG de cuyo (1/1000 Vector Laboratories). Las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron 60 minutos a temperatura ambiente con el complejo ABC (avidin biotin complex-ABC elite kit, Vector Laboratories). Después de 3 lavados con PBS la señal se reveló con una mezcla de 3,3'tetracloruro de diaminobenzidina al 0.05 % y H₂O₂ al 0.003 % en PBS. Las células se lavaron en PBS, se deshidrataron en una serie ascendente de etanol, se contratiñieron con Nissl (NaOH al 0.036 M, ácido acético al 0.2 M y thionin al 0.25 %), y se montaron. Las células procesadas para HIS radiactiva o fluorescente no se contratiñieron ni montaron y después de revelar a la peroxidasa las células se deshidrataron para iniciar con la HIS como se describe más adelante. Como control negativo se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

Las células positivas se contaron bajo el microscopio (axioscope Zeiss) a una amplificación de 100X.

Marcado de la sonda de ARNc para la hibridación *in situ*

Las sondas de ARNc de la PPII se obtuvieron por transcripción *in vitro* a partir del plásmido pSPT19-PPII que tiene clonado entre los promotores T7 y SP6 un fragmento de ADN de 644 pares de bases que incluye los nucleótidos 129 al 773 del ADNc de la PPII. Para obtener el ARNc antisentido de la PPII, el plásmido se linearizó con la enzima de restricción EcoRI (Roche), lo que permitió transcribir con la T7 ARN polimerasa; para obtener el ARNc sentido el plasmado se linearizó con la enzima de restricción HindIII para transcribir con la SP6 ARN polimerasa.

La reacción de transcripción *in vitro* para generar las sondas de ARNc sentido y antisentido marcadas con el nucleótido α -UTP ^{35}S (actividad específica 1250 Ci/mmol, DuPont) se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo de microcentrífuga libre de ARNasa se colocaron 125 μCi del nucleótido radiactivo, 1 μl del amortiguador para transcripción *in vitro* (Roche), 1.5 μl de una mezcla de los nucleótidos ATP, CTP, GTP (final 1.5 mM cada uno), 1 μg del plásmido linearizado y desnaturalizado por 5 minutos a 65 °C, la cantidad de UTP frío para completar 120 pmoles de UTP final, 1 μl de DTT 100 mM disuelto en agua, 0.5 μl de inhibidor de ARNasa (40 U/ μl , Roche) y agua para completar a 10 μl . Después de añadir 1 μl de la ARN polimerasa (T7 o SP6) la mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C, añadiendo al final nuevamente 1 μl de la ARN polimerasa e incubando otra hora a 37 °C. El plásmido linearizado se degradó con la adición de 1 μl de ADNasa (10 U/ μl , Roche) por 45 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo al agregar 36.5 μl de una mezcla de acetato de sodio 0.6 M, EDTA 10 mM y SDS al 0.1 %. Se tomó 1 μl de la mezcla de reacción para determinar la eficiencia de incorporación. Las enzimas utilizadas en la reacción se eliminaron por extracción con fenol:cloroformo (en relación 1:1, 2 veces) y luego con cloroformo:alcohol isoamílico (en relación 24:1, 1 vez) centrifugando a 7000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. La fracción acuosa se precipitó con acetato de sodio 0.3 M, pH 4 y tres volúmenes de etanol absoluto por 1 hora a -70 °C. La mezcla se centrifugó a 16000 rpm durante 30 minutos a 4 °C; el sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 25 μl de agua. El tamaño y la integridad de las sondas se determinó al realizar una electroforesis por 40 minutos a 350 volts en un gel de poliacrilamida al 8 % que contenía 8 M de urea en una solución amortiguadora de TBE (Tris 4.5 M, ácido bórico 0.44 M, EDTA 0.8 M, pH 8). Al final de la electroforesis, los geles con los transcritos radiactivos se expusieron por 12 horas a una película autoradiográfica (T Mat G/RA, Kodak). Las películas autoradiográficas se revelaron con un revelador GBX (Kodak), se enjuagaron en agua por un minuto y se fijaron en fijador GBX (Kodak) por 5 minutos; finalmente las películas se enjuagaron con agua y se secaron a temperatura ambiente. La actividad específica de la sonda se determinó a partir de las cpm totales emitidas por la solución final de los ARNc divididas entre los μg totales de ARN sintetizados. La cantidad de ARNc sintetizado se calculó al asumir que 1 μg de ARN corresponde a 757.5 pmol de nucleótidos. La actividad específica de las sondas de [^{35}S]-ARNc fue de aproximadamente 1.5×10^9 cpm/ μg .

La reacción para generar las sondas de ARNc sentido y antisentido marcadas con el nucleótido α -UTP-digoxigenina se llevó a cabo básicamente como la de las sondas radiactivas con algunas modificaciones. En un tubo se colocó 1 μ g del plásmido linearizado y desnaturalizado por 5 minutos a 65 °C, 2 μ l del amortiguador de transcripción (Roche), 3 μ l de una mezcla con los nucleótidos ATP, CTP, GTP (final 1.5 mM cada uno), 2 μ l de α -UTP-digoxigenina 10 mM (final 1 mM), 4 μ l de UTP frío 1 mM (final de 0.2 mM), 1 μ l de DTT 100 mM disuelto en agua, 0.5 μ l de inhibidor de RNAsa (40 U/ μ l, Roche) y agua para completar a 20 μ l. Después de añadir 1.5 μ l de la ARN polimerasa (T7 o SP6) la reacción se incubó 1 hora a 37 °C, añadiendo al final 1 μ l de la enzima e incubando otra hora a 37 °C. El plásmido linearizado se degradó con la adición de 1 μ l de ADNsa (10 U/ μ l, Roche), 45 minutos a 37 °C. La reacción se paró al agregar 76.5 μ l de una mezcla de acetato de sodio 0.3 M pH 4 y 15.4 mM de DTT. Los transcritos se precipitaron al agregar tres volúmenes de etanol absoluto e incubar durante 1 hora a -70 °C. La mezcla se centrifugó a 16000 rpm durante 30 minutos a 4 °C; el sobrenadante se descartó y el precipitado se disolvió en 50 μ l de agua. El tamaño y la integridad de la sonda se determinaron al realizar una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6 % en una solución amortiguadora de TBE. Los transcritos se electrotransfirieron 45 minutos a 45 mA a una membrana de nylon Nitran⁺ (Schleicher&Schuell) activada con metanol por un minuto. La membrana se bloqueó en una solución de bloqueo (Roche) al 5 % en PBS. Los ARNs se detectaron al incubar las membranas con un anticuerpo antidigoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina (Roche). La señal para la enzima se reveló con los reactivos NBT (1 mg/ml, Roche) y X-fosfato (0.5 mg/ml, Roche) en amortiguador de Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 0.05 M, pH 9.6, durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Fijación de las células y de los tejidos e hibridación *in situ* con ARNc

Los cortes histológicos de pituitaria de rata y las células de la adenohipófisis en cultivo se fijaron a temperatura ambiente durante 15 minutos en paraformaldehído al 4 % en PBS. Para eliminar el fijador, los tejidos y células se lavaron dos veces durante 10 minutos en PBS, se acetilaron por 10 minutos en una solución de SSC 4X (una solución 1X de SSC es: NaCl 0.3 M y 30 mM de citrato de sodio dihidratado, pH 7) con anhídrido acético al 0.25 % y trietanolamina 0.1 M, pH 8, lavados 1 vez por dos minutos con SSC 2X, deshidratados dos

minutos con etanol al 75 %, al 80 %, al 95 % y al 100 %, deslipidados por 5 minutos con cloroformo absoluto y finalmente rehidratados por 2 minutos con etanol al 95 % y al 100 %.

Los cortes y células se hibridaron durante 12 horas a 52 °C en una cámara húmeda, con 40 µl de solución de hibridación que contenía: SSC 2X, formamida desionizada al 50 %, Denhart's 1X, sulfato de dextrán al 10 %, 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por 15 minutos a 65 °C, 100 µg/µl de ARNt, DTT 10 mM y de 0.1×10^6 a 1.0×10^6 cpm del ARNc (previamente desnaturalizado por 15 minutos a 65 °C) marcado con ^{35}S o de 3 µl del ARN marcado con digoxigenina (100 ng). Al final de la hibridación, el Parafilm se quitó en una solución de SSC 1X y el exceso de la solución de hibridación se lavó cuatro veces por cinco minutos a temperatura ambiente con SSC 2X; enseguida se dio un tratamiento por 30 minutos con ARNasa (30 µg/ml) en SSC 2X que contenía 1 mM de EDTA, pH 8; los lavados continuaron con SSC 2X a temperatura ambiente dos veces por 5 minutos, con SSC 1X seguido de SSC 0.5X y 0.1X, 1 vez cada uno por 10 minutos a temperatura ambiente; se continuó con un lavado a 60 °C por 30 minutos con SSC 0.1X y finalmente un lavado a temperatura ambiente por 5 minutos con SSC 0.1X. Los cortes histológicos y las células marcadas radioactivamente se deshidrataron con etanol y se expusieron a la emulsión fotográfica (Amersham) por 60 días a 4 °C. La señal se reveló por 3 minutos a 15°C en revelador D19 (Kodak) y después de enjuagar por 1 minuto con agua a 15 °C la señal se fijó por 3 minutos a 15 °C con un fijador GBX (Kodak). Finalmente los tejidos y células se tiñeron con la tinción de Nissl.

Los cortes y células marcados con digoxigenina se trataron para revelar la señal por inmunofluorescencia. Después de 1 lavado con PBS las células se permeabilizaron durante 3 minutos con una solución de Triton X-100 al 0.3 % en PBS. Enseguida se incubaron 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (Roche) al 0.1 %, Triton X-100 al 0.01 % en PBS. Las células se incubaron por 12 horas a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de ratón antidigoxigenina (Roche) en una dilución 1/100 en solución de bloqueo. Después de los lavados con PBS la señal se reveló por inmunofluorescencia al utilizar el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado al fluoroforo ALEXA 594 (Molecular Probes) por 2 horas a 4 °C en la solución de bloqueo. Al final las células se montaron con una solución de PBS con glicerol en relación 1:1.

Hibridación *in situ* con ARNc combinada con inmunocitoquímica

Después de realizar la ICQ para la PRL, TSH o GH como se describió arriba se procedió a realizar HIS para la PPII revelando la señal por inmunofluorescencia y por radioactividad. Durante el procedimiento de la ICQ se tuvo precaución para evitar la contaminación con ARNsas.

Conteo de células

Las imágenes de microscopia de luz se observaron con el objetivo de 40X de un microscopio Axioscop (Carl Zeiss). Las células se contaron en las imágenes capturadas por una cámara CCD (Sony) con la ayuda del software Marcator (Explora nova, v.1.88a). Las señales de fluorescencia se contaron en un microscopio de epifluorescencia Axioscop (Carl Zeiss) utilizando el filtro de rodamina (540 nm de emisión y 625 nm excitación). Las fotografías de fluorescencia se tomaron con una cámara (MC80; Carl Zeiss) utilizando el objetivo de 100X.

Transfección de los ODN-AS y tratamiento con el TRH

Para los estudios del papel de la PPII en la comunicación mediada por el TRH en las células de la adenohipófisis en cultivo seguimos el protocolo D, descrito en detalle en el artículo 1, ya que fue el protocolo que aseguró la mejor eficiencia para suprimir la expresión de la PPII. De los 8 ODN-ASO diseñados se utilizó el ODN-ASO llamado PPII-ASO2 y como control negativo se empleó un el respectivo ODN revuelto (PPII-SCO2) que es un ODN con la misma proporción de bases que el PPII-ASO2 pero que no hibrida con el ARNm de la PPII. Los ODN se utilizaron a una concentración de 1 μ M (modificado como fosforotioato; Epoch Biosciences) y se mezclaron con 6 μ L de FuGENE6 (Roche) diluido en 500 μ L DMEM (más suplementos excepto el SFB y los antibióticos). La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 24 h en cultivo, las células se lavaron dos veces con DMEM y se les agregó la mezcla de transfección. Después de un periodo de 4 horas (tiempo de la transfección), se añadió a las células, sin retirar el medio de transfección, 500 μ L de DMEM-S fresco (con 20 % de SFB, 2X de penicilina y 2 X de estreptomicina y fungizona). Los controles de la transfección recibieron FuGENE6 sin el ODN. Para el análisis por RT-PCR, 24 y 48 h (24 y 36 h en las células C6) después del final de la transfección, las células se lavaron dos veces con PBS y se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento para extraer el ARN total. Los tratamientos con TRH (0.1 a 10 nM) comenzaron 48 h después del final del

transfección. A los tiempos indicados, el medio de cultivo se retiró para medir TSH y PRL por radioinmunoensayo (RIA).

Detección de las hormonas por RIA

Los medios de cultivo fueron analizados por RIA para determinar la concentración de TSH y de PRL liberada al medio de cultivo. En los RIA se utilizaron los reactivos proporcionados por A. F. Parlow y el Programa Nacional de Hormonas de la Pituitaria (NIDDK, de los E.U.A.). El RIA del TRH se realizó según lo descrito en (Joseph-Bravo *et al.*, 1979).

RT-PCR semi-cuantitativa

El ARN total de las células de la adenohipófisis en cultivo se aisló de acuerdo al método del tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo descrito por Chomczynski y Sacchi (1987). El ARNm (1 μg) se retrotranscribió con un iniciador de oligodeoxitimidina (100 pmol) y la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase; Invitrogen). La mezcla de reacción (6 μl) se sometió a la PCR para amplificar los ADNc de la PPII, la G₃PDH, la APA, la APN, la TSH, la PRL y el TRHR1.

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Eppendorf mastercycler). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2 %, y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Los productos del PCR se cuantificaron por densitometría en un analizador Flour S multiImager (Bio Rad). La cantidad de cada producto de PCR se normalizó con la de G₃PDH en cada muestra. La secuencia de cada primer utilizado y las condiciones para los PCR se describen a detalle en la sección de materiales y métodos de los artículos 1 y 2.

Análisis estadístico.

Cada experimento se realizó en duplicados o triplicados y se repitió al menos 2 veces por grupo experimental. Para los experimentos con los ODN antisentido el valor de la media del control sin transfectar o el control transfectado con el SCO se consideró el 100%. Para los experimentos de ICQ e HIS el total de células contadas de la pituitaria se consideró el 100%. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM). La significancia estadística se evaluó con una prueba t de student; las diferencias se consideraron significativas con una $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Localización del ARNm de la PPII en cultivos primarios de adenohipófisis de rata.

Los análisis de HIS mostraron que sólo una pequeña población (5.2 al 6 %) de las células de la pituitaria expresan el ARNm de la PPII (tabla 1 y figura 1 del artículo 2). Al realizar los experimentos combinados de HIS con ICQ encontramos que el 66 % de las células que expresaron el ARNm de la PPII fueron lactotropos mientras el 34 % fueron somatotropos pero ninguno fue tirotrópo (tabla 1 y figura 2 del artículo 2). Aunque tratamos de corroborar nuestros resultados con la situación en la glándula *in vivo*, ésto no fue posible ya que no pudimos optimizar el procedimiento de HIS en cortes histológicos de glándula pituitaria. Estos resultados sugieren que el ARNm de la PPII no se expresa en la mayoría de las células que responden al TRH.

Diseño de los oligodeoxinucleótidos antisentido

Los oligodeoxinucleótidos (ODN) antisentido han sido utilizados para inhibir la expresión de una variedad de genes. Sin embargo, no existe una guía universal para identificar las regiones accesibles en un ARN que pudieran ser los blancos potenciales. Se ha reportado el uso de procedimientos experimentales para identificar regiones accesibles. Estos incluyen el uso de librerías de ODN inmovilizadas sobre soportes sólidos e hibridados con el ARN blanco marcado radiactivamente (Milner *et al.*, 1997) y el uso de librerías de oligonucleótidos para medir la susceptibilidad del híbrido ARN-ODN a la ARNasa H (Ho *et al.*, 1996 y 1998). Al utilizar estos procedimientos se han diseñado ODN que son capaces de suprimir la expresión de genes eficazmente. Adicionalmente se ha descrito el empleo de un procedimiento teórico que sugiere sitios potencialmente accesibles. Estos sitios son predichos a partir de la estructura secundaria del ARN, la cual es determinada en base a parámetros energéticos (Patzel *et al.*, 1999). Este procedimiento ha mostrado hasta un 50 % de efectividad, es decir que del total de ODN seleccionados la mitad inhiben la expresión del gen en estudio. Por esta razón utilizamos el programa de computo mfold (version 2.3, www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi) que en base a un algoritmo que utiliza los valores de energía libre del plegamiento de moléculas de ARN, predice las estructuras secundarias potenciales. Utilizando este programa se sometieron al análisis una serie de secuencias (ventanas) del ARNm de la PPII (figura 5 y figura 1a en el artículo 1). Se

eligieron ventanas de 1400 nucleótidos (nt) las cuales se fueron recorriendo a lo largo del ARNm en pasos de 250 nt hasta completar todo el ARNm de la PPII (6000 nt). De las 5 estructuras secundarias potencialmente favorables, predichas para cada ventana, tomamos el valor de s-s (single-strand, hebra sencilla), que indica la probabilidad de que una base no se encuentre apareada en una estructura determinada; es decir, si el valor de s-s para el nucleótido 920 es igual a 5 quiere decir que en las 5 estructuras potencialmente favorables el nucleótido 920 esta desapareado. Al alinear a las diferentes ventanas y obtener los promedios de sus valores de s-s pudimos generar una grafica en la que se identificaron los sitios en el ARNm de la PPII en los que los nucleótidos se encuentran formando estructuras tipo asa (figura 6). Si estas estructuras locales fueron de tamaño igual o mayor a 10 nucleótidos se seleccionaron para dirigir contra ellas a los ODN antisentido (ASO). Los ASO se dirigieron hacia el inicio 5' del asa. Con esta estrategia diseñamos 8 ASO, dirigidos contra diferentes regiones a lo largo del ARNm de la PPII, incluido uno que se dirigió contra el sitio de inicio de la traducción. Para asegurar la especificidad de los efectos diseñamos 3 ODN revueltos (scrambled) PPII-SCO1, PPII-SCO2 y PPII-SCO3; estos ODNs presentan la misma composición de bases que los PPII-ASO1, PPII-ASO2, y PPII-ASO3 pero que no tienen un blanco en el ARN de la PPII o secuencias relevantes para nuestro estudio. Las secuencias de los ODN utilizados en este estudio se reportan en la tabla 1 del artículo 1.

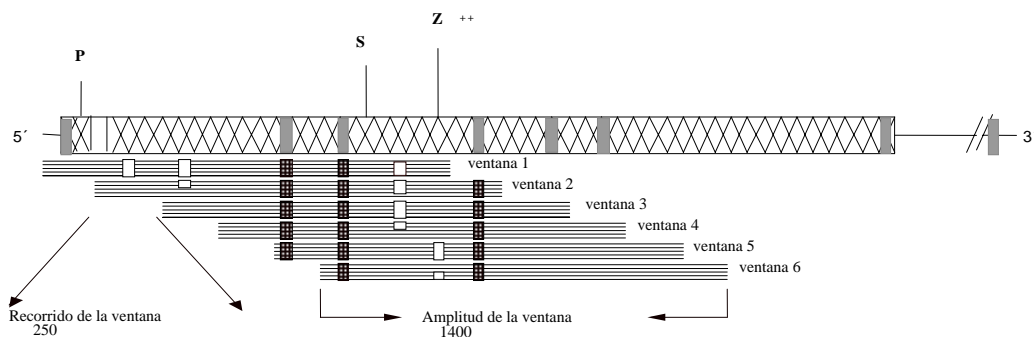


Figura 5. Esquema que representa como se seleccionaron los sitios potenciales en el ARNm de la PPII para dirigir a los ODN antisentido (cajas grises). Los sitios locales fueron seleccionados si los elementos estructurales favorables (cajas punteadas) se conservaron en las 5 estructuras favorables determinadas para cada ventana y entre todas las ventanas que se fueron moviendo a lo largo del ARNm de la PPII. Las estructuras locales no conservadas en todas las ventanas (cajas blancas) no se seleccionaron.

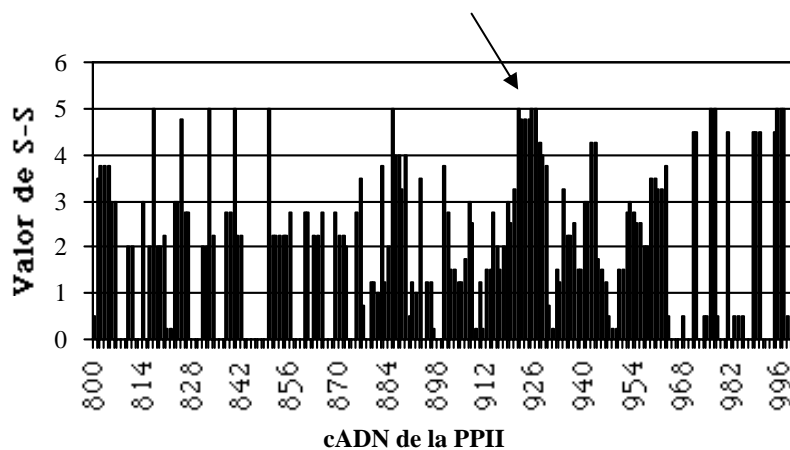


Figura 6. Grafica de un fragmento del cADN de la PPII (nucleótidos 800-1000) generada a partir de los promedios de los valores de s-s para cada nucleótido en todas las ventanas analizadas. Con la flecha se indica una zona en la que los nucleótidos 920-930 se encuentran formando una estructura local que se conserva.

Selección del transfectante óptimo en cultivos primarios de la adenohipófisis de rata

Una vez diseñados los ASO se procedió a encontrar un transfectante para introducir los diferentes ASO y SCO en las células de la adenohipófisis en cultivo. Para nuestros experimentos de optimización de la transfección utilizamos al PPII-ASO1 (20mero) marcado con fluoresceína en el extremo 5' en cultivos de adenohipófisis tratados por 5 días con T_3 (10^{-8} M) (protocolo A; ver figura 1b en el artículo 1). La marca fluorescente nos permitió monitorear el porcentaje de células transfectadas en un microscopio de fluorescencia y la sobrevivencia se evaluó al contar las células que excluyen el azul de tripano. Como transfectantes evaluamos tres preparaciones de lípidos catiónicos, Cellfectina (Gibco), Transfectam (promega) y FuGENE6 (Roche), así como un polímero catiónico, la Polietilenimina (PEI) (Fluka). La eficiencia de transfección para el PPII-ASO1 ($1 \mu\text{M}$) se evaluó a diferentes concentraciones del transfectante en medio libre de suero y siguiendo las instrucciones de los fabricantes. De los cuatro transfectantes evaluados el mejor resultado se obtuvo con el FuGENE6 ya que a una concentración de $2 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ de ODN se transfectaron 62 % de las células y murieron el 11 %. Si bien el PEI no afectó la sobrevivencia celular, con dosis de hasta $5 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ de ODN, su eficiencia de transfección fue la más baja con solo 15 % de las células transfectadas. De manera adicional, evaluamos si el tratamiento con el FuGENE6-

ODN pudiera tener a largo plazo un efecto tóxico. Las células se incubaron con el complejo FuGENE6-PPII-ASO1-FITC durante: 0 (termino de la transfección), 24 y 48 horas (después de la transfección). Al terminar el periodo de 4 horas de transfección las células no se lavaron (excepto para el tiempo 0) y el medio de transfección se suplemento con suero fetal bovino (concentración final 10 %) y antibióticos. A los tiempos indicados las células se tripsinizaron y contaron con la cámara de Neubauer en un microscopio de fluorescencia. Los resultados indicaron que no existe un efecto tóxico severo a largo plazo ya que el porcentaje de muerte a las 24 y 48 horas fue similar al porcentaje de muerte al tiempo 0, que fue del 16 %. De manera adicional, el porcentaje de células transfectadas, que fue de alrededor del 60 % se mantuvo constante durante las 48 horas, lo que nos indicó que el ODN no es degradado o expulsado de las células durante este lapso de tiempo. Estos resultados nos permitieron seleccionar al FuGENE6 para transfectar los diferentes ASO y SCO en las células de la adenohipófisis en cultivo.

Efecto del régimen de tratamiento con la T₃ sobre la efectividad de los ASO

La actividad de la PPII es apenas detectable en ausencia de T₃ en cultivos primarios de células de la adenohipófisis. En estos cultivos la T₃ (10⁻⁸ M) induce la actividad enzimática de la PPII (Vargas *et al.*, 2000 y Bauer *et al.*, 1990), inducción que correlaciona con un incremento en los niveles del ARNm de la PPII (figura 1c del artículo 1). Con este protocolo (llamado protocolo A), los estudios preliminares mostraron efectos ligeros de los PPII-ASO1 y PPII-ASO2 sobre los niveles del ARNm de la PPII. El efecto de los ASO pudiera ser ligero porque se estaría tratando de suprimir a la PPII a la vez que se estimula su expresión. Por esta razón se decidió modificar el protocolo del tratamiento; los protocolos alternativos se describen en la figura 1b del artículo 1. Las variantes fueron: a) disminuir la dosis de T₃ a la concentración fisiológica (10⁻⁹ M) y disminuir el tiempo de inducción a 72 horas (protocolo B); b) mantener el cultivo por 24 horas sin hormona y después de la transfección restituir la T₃ (10⁻⁹ M) y mantenerla por 24 horas hasta el análisis (protocolo C); y dar un estímulo con T₃ (10⁻⁹ M) por 24 horas y retirarla al momento de la transfección (protocolo D). Con el protocolo C se obtuvieron resultados similares a los del protocolo A, por lo que los esfuerzos se concentraron en los protocolos B y D.

Utilizando los protocolos B y D se evaluó la capacidad de los 8 PPII-ASO diseñados para suprimir la expresión de la PPII. Con el protocolo B, se encontró que comparado al control sin ODN (mock), los PPII-ASO 1, 2, 3, disminuyeron significativamente los niveles del ARNm

de la PPII de una manera dependiente del tiempo, ya que el efecto fue mayor a las 48 horas que a las 24 (figura 5 del artículo 1). El resto de los PPII-ASO tuvieron efectos ligeros, y dependientes del tiempo, sobre los niveles del ARNm de la PPII (figura 5 del artículo 1). La especificidad de la secuencia se evaluó al medir los niveles del ARNm de la aminopeptidasa A (APA). Los efectos de los ASO que tuvieron efecto contra la PPII fueron específicos del ARN blanco ya que los niveles del ARNm de la APA no se redujeron significativamente (figura 5 del artículo 1).

Con el protocolo D (figura 3 del artículo 1) se encontró también que el efecto sobre los niveles del ARNm de la PPII fueron dependientes del tiempo pero el efecto de los ASO fue más potente que con los protocolos A, B o C. Los PPII-ASO 1, 2 y 3 inhibieron los niveles del ARNm de la PPII en un 42, 37 y 43 % a las 24 horas y hasta en un 65, 59 y 60 % a las 48 h respectivamente (figura 3 del artículo 1). El resto de los PPII-ASO tuvieron efectos de diferente magnitud, entre aproximadamente un 30% a las 24 horas y 40% a las 48 horas (figura 3 del artículo 1). Al igual que con el protocolo B los efectos de los ASO que tuvieron efecto contra la PPII fueron específicos del ARN blanco ya que los niveles del ARNm de la APA no se redujeron significativamente (figura 3 del artículo 1).

Los PPII-ASO1, 2 y 3 fueron efectivos para suprimir la expresión del ARNm de la PPII; para determinar que el efecto fuera específico de la secuencia se analizó el impacto de los PPII-SCO1, 2 y 3. Los PPII-SCO 2 y 3 no tuvieron un efecto significativo sobre los niveles del ARNm de la PPII ni de la APA (figura 3 del artículo 1). En contraste el PPII-SCO1 tuvo un efecto sobre los niveles del ARNm de la PPII por lo que el PPII-ASO1 fue descartado para otros estudios. Estos resultados sugerían que el potente efecto de los PPII-ASO2 y 3 es específico de la secuencia y del ARN blanco. Una comparación directa del efecto de varias dosis del PPII-ASO2 y del PPII-SCO2 en los protocolos B y D confirmó la efectividad del PPII-ASO2 para suprimir la expresión del ARNm de la PPII pero no de la APA (figura 2 del artículo 1).

Los cambios ocasionados por el PPII-ASO 2 sobre el ARNm de la PPII se reflejaron a nivel de la proteína, ya que la actividad específica de la PPII se redujo más eficientemente en las células transfectadas con el PPII-ASO2 en el protocolo D que con el protocolo B (figura 4 del artículo 1).

Las diferencias en la potencia los PPII-ASO en el protocolo D con respecto al protocolo B no se debieron a efectos en la eficiencia de transfección ya que esta fue similar entre los protocolos B ($70\% \pm 2\%$, n=4) y D ($68\% \pm 5\%$, n=4). Tampoco se debieron a cambios en la

tasa de incorporación de los PPII-ASO ya que la tasa de incorporación de un ^{32}P -ASO fue similar entre los protocolos (27 vs 28 fmol/min por 10^6 células para los protocolos B y D respectivamente). Y tampoco se debió a un cambio en la distribución de los ODN ya que un análisis de microscopia confocal mostró un patrón similar de distribución intracelular del PPII-ASO 1-FITC entre los protocolos B y D (figura 7). El ODN se localizo mayoritariamente en el núcleo de las células con poca señal distribuida de manera puntual en el citoplasma (figura 7).

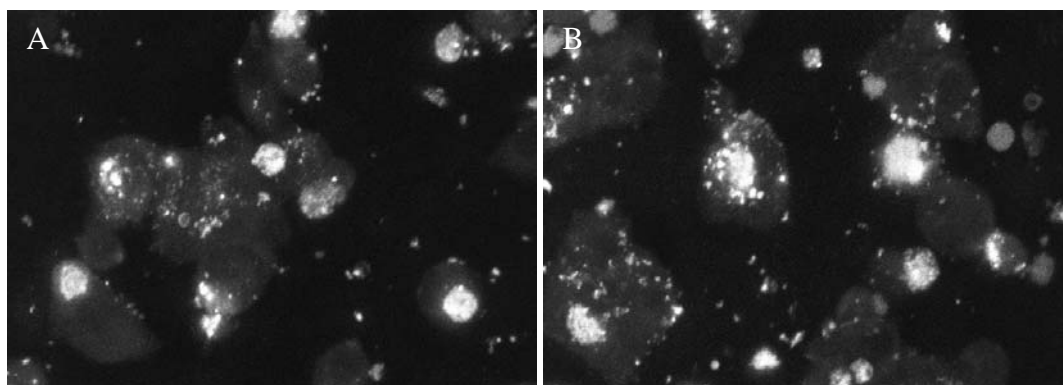


Figura 7. Localización intracelular del PPII-ASO1-FITC transfectado a las células de la pituitaria con el protocolo B (A) o el protocolo D (B). 12 horas después de la transfección las células se fijaron por 20 minutos en paraformaldehído al 4% y sacarosa al 4% en PBS. Después de dos lavados con PBS las células se montaron con PBS y glicerol en relación 1:1 y se observaron en el microscopio confocal.

Al medir los niveles del ARNm de la PPII en los protocolos B y D se encontró que existe una correlación negativa entre los niveles del ARNm y la efectividad de los PPII-ASO, es decir a mayores niveles del ARNm menor actividad del ASO y viceversa. Esta observación contrasta con la realizada por Grifman y Soreq (1997), quienes encontraron que en la línea celular PC12 la efectividad de los ASO es mayor cuando se induce la expresión del ARN blanco. Sin embargo, Miraglia *et al.*, (2000) han demostrado que la potencia de los ASO no depende de los niveles del ARNm blanco. Para tratar de entender esta discrepancia evaluamos el impacto de los protocolos B y D sobre la inhibición de la expresión del ARNm del TRHR1 un ARNm que, a diferencia de la PPII, es regulado negativamente por la T_3 (Schomburg y Bauer, 1995). La efectividad del TRHR1-ASO (Aguilar-Valles, 2000) se evaluó en ambos protocolos a las 12 horas postransfección (la PPII se evaluó a las 24 y 48 horas postransfección). Esto fue debido a que el efecto del TRHR1-ASO es máximo a las 12 horas y su efecto se pierde completamente a las 24 horas. Comparado al control de la transfección (mock) en el protocolo B el ASO-TRHR1 no tuvo efecto sobre los niveles del ARNm del TRHR1 y si un efecto ligero

pero significativo sobre los niveles del ARNm del TRHR1 en el protocolo D (tabla 3 del artículo 1). Los efectos fueron ARN blanco específicos ya que la transfección del TRHR1-ASO no afectó los niveles de los ARNm de la PPII, de la APA (tabla 3 del artículo 1) y de la APN (no mostrado). Los efectos fueron específicos de la secuencia ya que el TRHR1-SCO no afectó los niveles del ARNm del TRHR1. Estos datos sugieren que el impacto del protocolo sobre la efectividad de los ASO es independiente de los cambios en los niveles de los ARN blanco o cambios en la vida media de los mismos.

Para determinar si las respuestas que encontramos son específicas del tipo celular empleado, evaluamos el impacto de los protocolo B y D sobre la efectividad del PPII-ASO 2 en la línea celular C6. Aquí encontramos nuevamente que la efectividad del PPII-ASO 2 fue mejor en el protocolo D que con el protocolo B (figura 6 del artículo 1). En esta línea celular encontramos que el efecto fue específico para el ARN blanco ya que los niveles del ARNm de la aminopeptidasa N (APN) no se afectaron en este sistema (figura 8) Estos resultados sugieren que la sensibilidad a los ASO de acuerdo al protocolo empleado no es específica del tipo celular.

En conclusión, es probable que exista un mecanismo común involucrado en la acción de los ASO que sea afectado por las hormonas tiroideas.

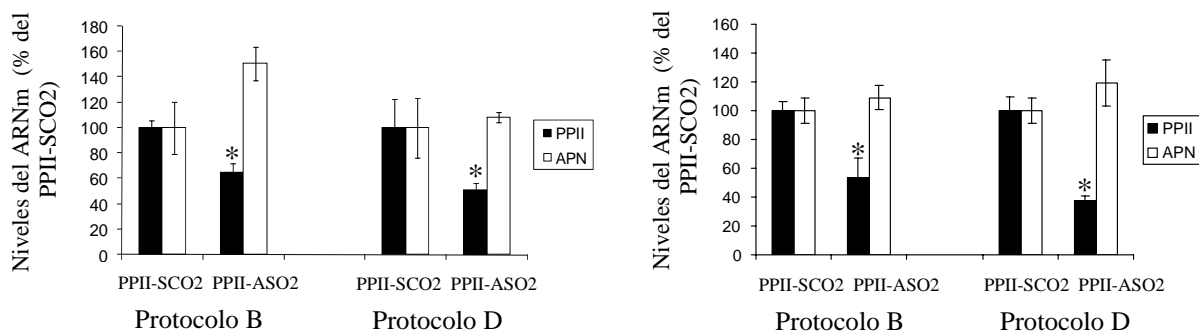


Figura 8. Efecto de los PPII-ASO 2 y PPII-SCO2 sobre los niveles de los ARNm de la PPII y la APN en células C6 transfectadas con de acuerdo al protocolo B y D. A las 24 (izquierda) y 36 h (derecha) posttransfección se cuantificaron los niveles de los ARNm para la PPII y la APN. Los datos son la media \pm ESM de los niveles del ARNm expresados como % del control PPII-SCO2. * $p \leq 0.05$, comparado al control PPII-SCO2. .

Relación regulatoria entre la PPII y la expresión de la APN en la pituitaria anterior

Con algunas excepciones los PPII-ASO no tuvieron efecto sobre la expresión de la APA, lo que sugería la especificidad por el ARN blanco. Para confirmar que el efecto del PPII-ASO2

fuera específico del ARN blanco se evaluó su acción en otro homólogo de la PPII, la APN. En este caso encontramos que el PPII-ASO 2 disminuyó los niveles del ARNm de la APN en una proporción similar a la observada para los niveles del ARNm de la PPII (figura 9). Este efecto se observó con todos los ASO efectivos para suprimir los niveles del ARNm de la PPII (no mostrado). Ya que las secuencias de los PPII-ASO no hibridan con el ARNm de la APN y dado que el PPII-ASO2 no afectó los niveles del ARNm de la APN en la línea C6 (figura 8) es probable que los niveles del ARNm de la APN cambien como consecuencia de modificar los niveles de la PPII. Las células de la adenohipófisis expresan y liberan TRH en pequeñas cantidades (Bruhn *et al.*, 1994). Una posible explicación a los resultados es que al manipular a la PPII se cambien los niveles del TRH extracelular que a su vez regulen negativamente la expresión de la APN. Para corroborar esta hipótesis, incubamos células de la adenohipófisis con TRH (10^{-8} M) por 12-48 horas. El TRH disminuyó los niveles del ARNm de la APN a las 48 horas (figura 10) pero no los de la APA (no mostrado). Por lo tanto el efecto de los PPII-ASO sobre la APN no es inespecífico y si probablemente regulatorio.

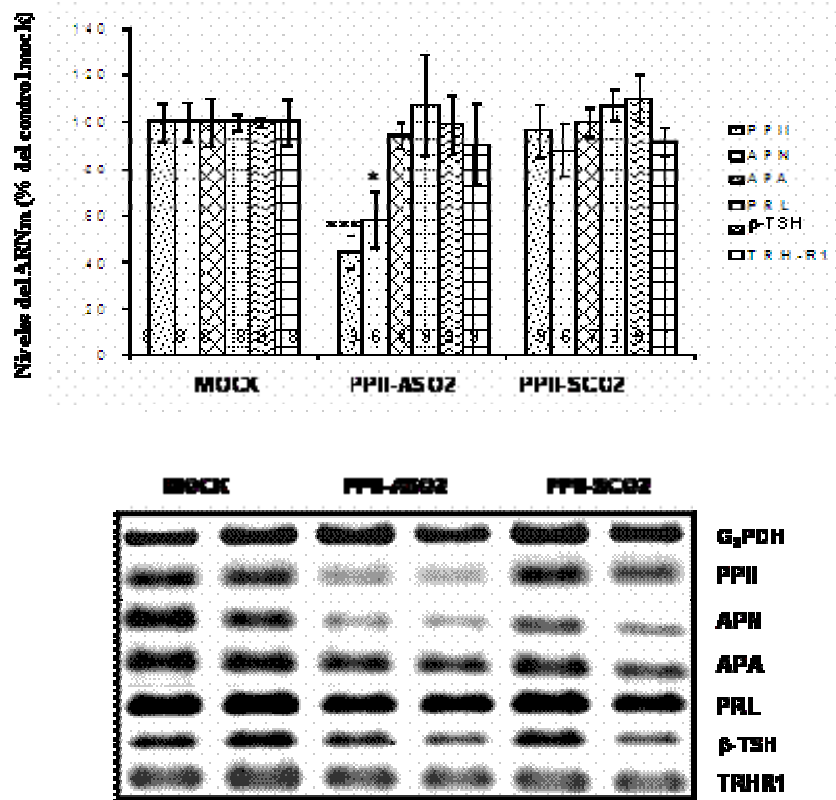


Figura 9. Efecto del PPII-ASO 2 sobre los niveles de los ARNm de la PPII, APN, APA, PRL, TSH y TRHR1 en cultivos primarios de adenohipófisis transfectadas con el protocolo D. A las 48 h postransfección se cuantificaron los niveles de los ARNm. Los datos son la media \pm ESM de los niveles del ARNm expresados como % del control sin transfectar (mock). *** $p \leq 0.0001$, * $p \leq 0.05$, comparado al control sin transfectar, el numero de determinaciones se muestra en cada una de las barras. El panel de abajo muestra la imagen de un gel representativo de los productos del RT-PCR para dos muestras independientes.

Estudios sobre la función de la PPII en las respuestas al TRH en la pituitaria anterior

Las respuestas más caracterizadas en respuesta al TRH son la síntesis y liberación de PRL y TSH por la pituitaria anterior (Carr *et al.*, 1993). Para determinar si la PPII modula las actividades endocrinas del TRH decidimos investigar si al inhibir parcialmente la actividad de la PPII con el PPII-ASO2 (utilizando el protocolo D a las 48 horas postransfección), se modifican las respuestas mencionadas arriba al neuropéptido TRH. Comparado al control de transfección y al PPII-SCO2 la supresión de la PPII con el PPII-ASO2 ocasionó una secreción aumentada de PRL en respuesta al TRH (10 nM) a 1, 3, 6 y 12 horas de tratamiento (panel superior de la figura 5 del artículo 2). Sorprendentemente, la liberación de TSH en respuesta al TRH no se afectó significativamente, a los mismos tiempos, en las células de la adenohipófisis a las que se les suprimió a la PPII con el PPII-ASO2 (panel inferior de la figura 5 del artículo 2). El efecto no se debió a cambios en la liberación basal de las hormonas por efecto de los ASO o SCO ya que con excepción de un ligero aumento a las 3 horas en la secreción de TSH, ocasionado por el PPII-SCO2 (panel inferior de la figura 4 del artículo 2), no existen diferencias significativas en la liberación basal tanto de PRL y TSH (figura 4 del artículo 2). Estudios de dosis-respuesta mostraron que a las 3 horas, comparado al control de la transfección y al PPII-SCO2 la supresión de la PPII potenció la secreción de PRL en respuesta al TRH en un 50 % para el TRH 3 nM, y 10 nM (figura 6 del artículo 2). A 1 hora, comparado al control de la transfección y al PPII-SCO2, la inhibición de la PPII potenció la liberación de PRL solo para el TRH 10 nM pero no para la concentración 3 nM (figura 11). En contraste, a bajas dosis de TRH (0.3 nM) la inhibición de la PPII no potenció la liberación de PRL en respuesta al TRH ni a 1 hora (figura 8) ni a las 3 horas (figura 6 del artículo 2). La liberación de TSH inducida por TRH no se potenció al suprimir a la PPII a ninguna concentración y tiempo evaluado (figura 7 del artículo 2).

El TRH (10 nM) no estimuló los niveles del ARNm de la PRL ni de la TSH, a 12 horas de tratamiento (no mostrado). Además, la supresión de la PPII con el PPII-ASO2 no tuvo ningún impacto en los niveles del ARNm de la TSH, PRL, TRHR1 y la APA (figura 3 del artículo 2). Para descartar que los efectos de la disminución de la expresión de PPII sobre la secreción de PRL se deban a la disminución de la expresión de APN, se estudio el efecto de un inhibidor específico de la APN (actinonina) sobre las respuestas al TRH. Un estudio preliminar mostro que la actinonina a 50 mM inhibe en un 70% la APN de membranas de cerebro pero no inhibe a la PPII ni a la APA en las mismas membranas. La tabla 3 del artículo 2 muestra que al

inhibir a la APN con la actinonina no se afecta la liberación estimulada por TRH de la PRL y TSH ni a 1 hora ni a 3 horas de tratamiento.

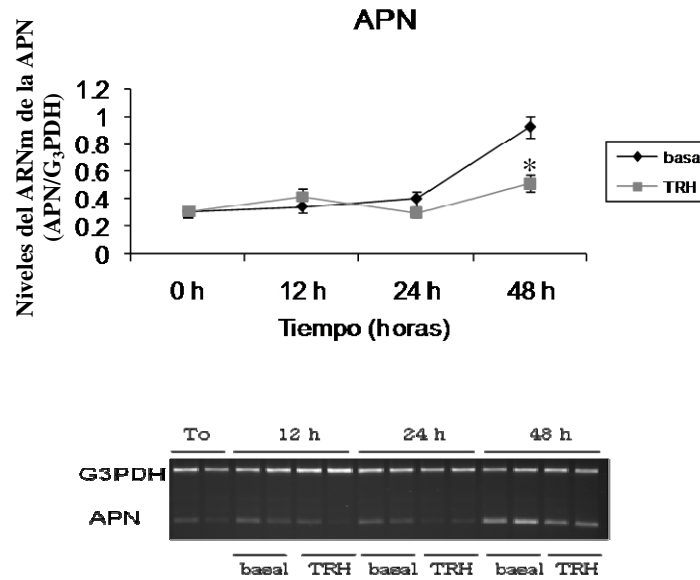


Figura 10. Efecto del TRH sobre los niveles del ARNm de APN en cultivos primarios de adenohipófisis. Las células se trataron con 10 nM de TRH por 12, 24 y 48 horas y se cuantificaron los niveles de los ARNm. Los datos son la media \pm ESM de los niveles del ARNm expresados como el cociente de la APN entre G₃PDH. * $p \leq 0.05$, comparado al basal. El panel de abajo muestra la imagen de un gel representativo de los productos del RT-PCR para dos muestras independientes.

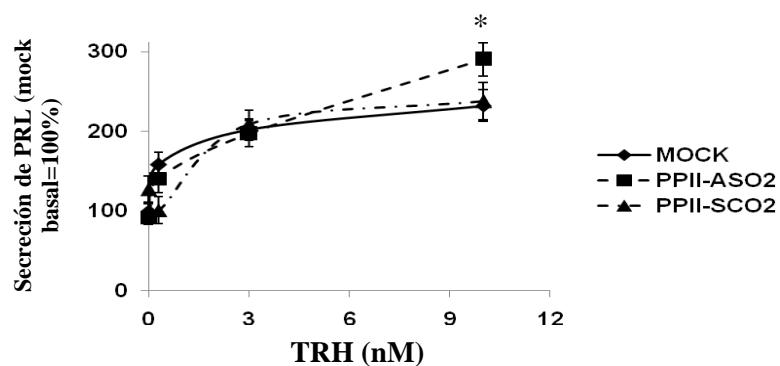


Figura 11. Liberación de PRL inducida por TRH en cultivos primarios de adenohipófisis. Las células se trataron con el PPII-ASO2 y el PPII-SCO2 y a las 48 horas postransfección se añadió el TRH (0.3, 3 y 10 nM). La PRL secretada al medio de cultivo durante 1 hora se determinó por RIA. Los datos son la media \pm ESM de la secreción de PRL inducida por el TRH en porcentaje de la liberación basal del control mock (sin transfectar). * $p \leq 0.05$, comparado al control sin transfectar, $n=6$.

DISCUSION

La glándula pituitaria es una de las glándulas endocrinas más complejas en los vertebrados ya que al integrar la información del cerebro y de los órganos periféricos mantiene la homeostasis endocrina (Dasen *et al.*, 1999). La complejidad estructural y funcional de la glándula pituitaria ha obligado a estudiar su función en líneas celulares o cultivos primarios. Aunque la biología de la comunicación TRHérgica se ha estudiado en modelos *in vivo*, ésta también se ha estudiado extensivamente en células GH₃ y cultivos primarios (Ashworth y Hinkle 1996). Debido a que las células de la pituitaria en cultivos primarios reconstruyen y mantienen la topografía y afinidades entre los diferentes grupos celulares como ocurre en la glándula *in vivo* (Noda *et al.*, 2003), estos cultivos ofrecen un excelente modelo para estudiar la respuesta endocrina al TRH.

La PPII se expresa en subpoblaciones de células de la adenohipófisis

Si las células de la adenohipófisis se separan en un gradiente, la actividad de la PPII se asocia a las poblaciones de lactotrofos pero no de somatotrofos o tirotrofos (Bauer *et al.*, 1990). Sin embargo, la separación de células en base en su tamaño y densidad y no a su contenido hormonal no define de manera precisa la localización de proteínas debido a que éstas se pueden expresar en solo subpoblaciones (y no en todas las células purificadas) o en algún contaminante minoritario que exprese en mayor proporción a la proteína de interés. La inmunocitoquímica es una técnica que permite localizar proteínas a nivel celular; sin embargo, a la fecha no se cuenta con anticuerpos anti-PPII útiles para la inmunohistoquímica, por lo que para determinar el o los tipos celulares que expresan a la PPII recurrimos al análisis de la expresión *in situ* de su ARNm. En este trabajo encontramos que en las células de la adenohipófisis en cultivo el ARNm de la PPII se expresa en pequeñas subpoblaciones de lactotrofos y somatotrofos (10 % de los lactotrofos y 6 % de los somatotrofos) pero no en los tirotrofos. La sorprendente falta de PPII en los tirotrofos no parece ser un artefacto del cultivo porque datos recientes confirman que no se puede detectar el ARNm de PPII en tirotrofos *in vivo* (Sánchez y Lechan, no publicado).

Estos resultados apoyan los obtenidos por Bauer *et al.*, (1990) quien encontró que la actividad de la PPII se asocia a los lactotrofos pero no a los tirotrofos. Sin embargo, nuestro estudio aporta datos nuevos, ya que encontramos que el ARNm de la PPII se expresa en una

subpoblación de somatotropos. Ya que la actividad de la PPII se asocia a los lactotropos suponemos que los que expresan el ARNm también tienen la actividad. Queda por determinarse si los somatotropos que expresan el ARNm de la PPII tienen actividad enzimática. Recientemente se ha demostrado la presencia, en la pituitaria, de una variante truncada de la PPII que es inactiva (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005). Ya que esta isoforma no se discrimina por la sonda de HIS, utilizada en este estudio, es posible que los somatotropos pudieran expresar a la forma trunca y no tener actividad. Así, es posible que en los somatotropos el ARNm de la PPII no se traduzca, como se ha mostrado para el ARNm del TRHR1 en este tipo celular (Konaka *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha reportado la existencia de un tipo celular que coexpresa PRL y GH, el lactosomatotrofo (Porter, *et al.*, 1990), por lo que nuestro estudio no permite descartar que hayamos detectado una subpoblación de lactosomatotropos que expresan el ARNm de la PPII. De cualquier manera, nuestros resultados muestran que la mayoría de las células responsivas al TRH no expresan a la enzima que lo inactiva. Esto es consistente con los niveles relativamente bajos de actividad y mensajero en la adenohipófisis.

Los oligonucleótidos antisentido como herramienta para suprimir la expresión de la PPII

Los péptidos transmiten su mensaje químico al unirse a receptores específicos presentes en la membrana plasmática. La actividad de los péptidos se regula al modularse sus niveles en el espacio extracelular. Este control se ha atribuido a la regulación de la biosíntesis y de la liberación y también a su inactivación por ectopeptidasas. En contraste con la PPII que tiene una especificidad restringida, cuyo único sustrato biológico conocido es el TRH (O'Connor y O'Cuinn 1985; Wilk y Wilk, 1989 y Bauer, 1994, Kelly *et al.*, 2000), otras ectopeptidasas presentan un amplio rango de sustratos biológicos (Csuhai *et al.*, 1995). Sin embargo, el uso de inhibidores específicos ha permitido determinar la participación de las ectopeptidasas en la modulación de la respuesta de diferentes tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro* (ver introducción). Actualmente se han sintetizado algunos inhibidores de la PPII (Kelly *et al.*, 2000, 2005, Scalabrino *et al.*, 2007, Matziari *et al.*, 2008) o han sido purificados de invertebrados marinos (Pascual *et al.*, 2004); estos inhibidores se están evaluando *in vivo* e *in vitro* e incluyen al TRH-fosfinico y al HcPI que se utilizaron en este trabajo (ver la tabla 2 del artículo 2). Cabe mencionar que al inicio de este proyecto el único inhibidor disponible para la PPII no podía ser usado en un modelo fisiológico ya que su K_i para la PPII es de 8 μ M (Charli

et al., 1989). Como una alternativa al uso de los inhibidores utilizamos ODN antisentido para inhibir a la expresión de la PPII. Con un procedimiento teórico derivado del descrito por Patzel *et al.*, (1999), diseñamos 8 ODN de los cuales 2 fueron capaces de suprimir la expresión de la PPII de manera eficiente y específica. La utilización de los ODN es una estrategia confiable para suprimir la expresión de genes de manera específica y tiene la ventaja de ser fácilmente optimizada para su uso *in vitro*. Durante la optimización de la estrategia para suprimir la expresión de la PPII, encontramos que la variación en el protocolo de la administración de T₃ tiene un efecto importante en la efectividad de los ODN, de tal manera que mantener a la T₃ durante y después de la transfección se reduce la eficiencia del ODN; así al comparar varios protocolos observamos que el protocolo D fue más efectivo que los protocolos A, B o C (artículo 1). La variación en la eficiencia del ASO depende de la hormona pero es independiente del ARNm blanco, de si el ARNm blanco se regula positiva o negativamente por T₃, del tipo celular, de la secuencia del ODN y de la reducción en el número de enlaces fosforotioatos. A diferencia de lo reportado por Taylor *et al.*, (2001), quienes mostraron que el 17β-estradiol incrementa los efectos de los ASO en células MCKF7-K2 por un cambio en la eficiencia de transfección, en nuestro caso los efectos no se debieron a cambios en la eficiencia de transfección ni en la tasa de captura y ni en la distribución subcelular del ODN. En las células de la adenohipófisis observamos una correlación negativa entre los niveles del ARNm de la PPII y la efectividad de los ASO; sin embargo, esta correlación no se encontró para el TRHR1, que se regula negativamente por las hormonas tiroideas (Gershengorn y Osman, 1996), ni para la PPII en las células C6 que expresan niveles más bajos del ARNm que la adenohipófisis. Por eso, la diferencia en los protocolos no se relaciona con los niveles del ARNm blanco, probablemente debido a que los ODN se encuentran en mayor exceso que el ARN blanco. Es posible que la T₃ module un mecanismo celular involucrado en la efectividad de los ODN. Los ODN con carga neta negativa como los fosforotioatos desencadenan la degradación del ARN blanco por la ARNasa H. Así, la ARNasa H puede ser el paso limitante en la actividad de los ASO y aunque a la fecha no se conoce si su expresión se regula por la T₃, existen evidencias que la ARNasa H1 se regula por el estado redox y en su forma oxidada no hidroliza a su sustrato (Lima *et al.*, 2003); en este sentido la T₃ puede incrementar los niveles oxidativos (Smith *et al.*, 2000) y así reducir la actividad de la ARNasa H. Alternativamente la hormona podría regular la localización intracelular de la ARNsas H ya que esta localización es importante para la acción de los ASO (Ten Asbroek *et al.*, 2002). En general, nuestros datos muestran que manipular la

concentración de hormonas tiroideas *in vitro* (o *in vivo*) pudiera ser una estrategia útil para optimizar la eficiencia de los efectos de ASOs.

La PPII controla los efectos del TRH en los lactotrofos de células de la pituitaria en cultivo

Para determinar si la localización particular de la PPII en la pituitaria tiene un impacto en los efectos fisiológicos del TRH utilizamos al PPII-ASO2 para inhibir la actividad de la PPII. Al suprimir la expresión de la PPII encontramos que se potenció la liberación de PRL en respuesta al TRH pero no se potenció la liberación de la TSH. El efecto solo se observó a las dosis de TRH por arriba de su KD por su receptor, a las dosis por debajo de la KD del TRH no se encontró efecto, quizá porque a las concentraciones bajas la actividad catalítica de la PPII es muy baja para tener un impacto en la concentración del TRH. El no detectar un efecto sobre la liberación de TSH puede indicar que la PPII en la pituitaria no controla la liberación de TSH en respuesta al TRH, o que las condiciones experimentales no nos permitieron observar el efecto. Estos resultados se corroboraron con el empleo de 2 inhibidores específicos de la PPII (el HcPI purificado por Pascual *et al.*, (2004) y el TRH fosfinico sintetizado por Matziari *et al.*, (2008). Con estos dos inhibidores se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con el empleo del PPII-ASO2 (ver la tabla 2 del artículo 2). Experimentos preliminares mostraron que la concentración de TRH en el volumen del medio de cultivo no se disminuye por la PPII. La incapacidad de la PPII para modular los niveles del TRH en el volumen del medio de cultivo permite suponer que la concentración del TRH en la superficie de los lactotrofos o tirotrofos no está en equilibrio con la concentración del TRH en el medio extracelular, debido a la existencia de un mecanismo que limita su difusión cerca de la superficie de estas células. Esta situación puede deberse a la existencia de afinidades entre células de la adenohipófisis del mismo fenotipo, afinidades que evitarían la agrupación de células que secretan PRL con células que secretan TSH. Así, en las agrupaciones de células que expresan a la PPII, la secreción de PRL en respuesta al TRH puede ser sensible a la modulación de la actividad de la enzima mientras que en las agrupaciones de células que no expresen a la PPII, por ejemplo agrupaciones de tirotrofos, la modulación de la actividad de la enzima no afectaría la actividad del TRH. De manera alterna, la formación de gradientes de TRH estables en la superficie de las células que expresan a la PPII pudiera modificar localmente la eficiencia del TRH, sin cambios detectables en la concentración del TRH en el medio de cultivo y sin la transmisión de los efectos a los tirotrofos vecinos. Los gradientes pudieran generarse por

interacción electroestática entre el TRH (positivo) y los fosfolípidos de la membrana. La importancia del microambiente en la función de las peptidasas se ha sugerido en otros órganos, por ejemplo en las arterias coronarias, ya que al inhibirse a la ACE se incrementan los efectos de la bradikinina, sin observarse cambios en los niveles del péptido en el volumen del medio extracelular (Tom *et al.*, 2002). Sin embargo, al inhibir a la NEP, que se expresa en el mismo tejido y también hidroliza a la bradikinina no se observa una respuesta similar a la encontrada al inhibir a la ACE. Este fenómeno se explica por la colocalización de la ACE con el receptor de bradikinina, mientras que la NEP al parecer no está en el microambiente del receptor para bradikinina.

Nuestros datos *in vitro* indican que la mayoría de las células que responden al TRH no expresan a la PPII. Además, muestran que la inhibición de la actividad de la PPII potencia la liberación de PRL pero no de tiotropina en respuesta al TRH. De manera importante, encontramos que su localización celular específica coincide con capacidades distintas para regular la secreción de PRL en respuesta al TRH, siendo la secreción de PRL la única sensible a la manipulación de la PPII.

Papel *in vivo* de la PPII

Ya que las células de la pituitaria *in vitro* reconstruyen parcialmente las afinidades topográficas entre las células secretoras de hormonas (Noda *et al.*, 2003), los resultados obtenidos en cultivos pudieran presentar lo que ocurre *in vivo*. Los estudios de inmunocitoquímica (Nakane, 1974; Nogami y Yoshimura, 1982; Yashiro *et al.*, 1981) no han mostrado una asociación entre lactotrofos y tirotrofos en la glándula *in vivo* por lo que nuestros datos sugieren que la PPII no degrada al TRH en toda la glándula si no en compartimientos específicos que contienen las células que expresan a la enzima (lactotrofos y somatotrofos) en donde modula la liberación de PRL y tal vez GH. Así, un experimento preliminar ha mostrado que la inhibición de la PPII *in vivo* con el HcPI inyectado de manera intraperitoneal ocasiona un incremento a los 20 minutos de PRL en el suero (Pascual, 2005). Sin embargo, la inhibición de la PPII *in vivo* no tiene un efecto sobre la liberación basal de TSH (Scalabrino *et al.*, 2007 y Sánchez *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren que la PPII es un elemento que controla la secreción de PRL en la glándula pituitaria, pero no la de tiotropina.

Un estudio reciente ha mostrado que la PPII se expresa en los tanicitos de la eminencia media en cercanía con las terminales de las neuronas TRHergicas (Sánchez *et al.*, 2008). Al igual que

la PPII en la pituitaria, la PPII en los tanicitos se regula por hormonas tiroideas y su inhibición incrementa la liberación de TRH y los niveles en el plasma de la TSH inducidos por estrés por frío y por TRH aplicado de manera exógena (Sánchez *et al.*, 2008). Aunque no se ha determinado el papel de la PPII de los tanicitos en la liberación de PRL, se puede suponer que la PPII en los tanicitos modula la liberación de TSH mientras que la PPII en la pituitaria modula la liberación de PRL. Queda por determinar cómo se regula la actividad de la PPII en ambos lugares para lograr que existan diferencias en la respuesta fisiológica al TRH.

Impacto de la regulación de la PPII en los efectos del TRH *in vivo*

Los eventos que regulan la actividad de PPII en pituitaria anterior dependen de señales hormonales, hipotalámicas y efectos paracrinos (Bauer 1987; Lin y Wilk 1996, Ponce *et al.*, 1988; Vargas *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 2002) que afectan de manera preferencial a los lactotrofos. Estos eventos son de intensidad y duración variable; sin embargo, nuestros resultados demuestran que aun una pequeña reducción en la actividad de la PPII es suficiente para cambiar la secreción de PRL en respuesta a TRH. La regulación específica por hormonas y factores hipotalámicos y la localización particular de la PPII en la pituitaria sugiere que la enzima es un elemento de control presente en algunos lactotrofos que determina la disponibilidad de TRH en la vecindad de algunos de los receptores para el TRH. Por ejemplo, un incremento en la degradación del TRH por la PPII en algunos lactotrofos minutos después del inicio de la onda de liberación de PRL (Bourdais *et al.*, 2000) puede contribuir a que la liberación de PRL sea transitoria durante la lactancia.

La actividad de la PPII puede determinar la intensidad y duración de la acción del TRH de una manera específica del tipo celular y de su contexto fisiológico. Así, la presencia o la ausencia de la enzima en células específicas puede modificar la respuesta de estas hacia el TRH, haciendo a las que expresen a la PPII menos sensibles a la presencia del TRH por lo que estas células pudieran tener una respuesta hormonal al TRH que sea de más corta duración. Esta hipótesis es consistente con la heterogeneidad funcional en los lactotrofos. Por ejemplo, en experimentos de centrifugación diferencial se han separado dos subpoblaciones con respuesta diferente al TRH y a la dopamina (Kazemzadeh *et al.*, 1991); también se han caracterizado dos subpoblaciones espaciales y funcionales de los lactotrofos, de tal manera que la subpoblación localizada hacia el exterior de la adenohipófisis responde más al TRH que a la dopamina y la subpoblación localizada hacia el centro responde más a la dopamina que al TRH (Boockfor *et al.*, 1986 y Boockfor y Frawley 1987). La localización particular de la PPII

en la adenohipófisis y su regulación por hormonas nos permiten postular que esta enzima constituye un elemento de control en la glándula para regular la actividad del TRH.

Importancia de la localización celular de las ectopeptidasas en la función de los péptidos

La superficie de las células juega un papel relevante en la función celular ya que participa en la comunicación inter e intracelular, la integración de los tejidos y órganos, el mantenimiento y remodelamiento de la matriz extracelular, etc. Muchos de estos procesos son regulados por ectopeptidasas que al hidrolizar a sus sustratos pueden activar, inactivar o liberar a proteínas o péptidos. Sin embargo, el estudio de las ectopeptidasas ha sido limitado debido en parte a que la mayoría son enzimas con una especificidad limitada e hidrolizan una amplia variedad de sustratos y por lo tanto no se consideraba que llevaran a cabo funciones altamente específicas (Funkhouser *et al.*, 1991). Pero, los descubrimientos sobre su localización selectiva en ciertos tipos celulares, han dado una nueva perspectiva en el estudio de su significado biológico (Kenny *et al.*, 1989). Así que, las ectopeptidasas no se pueden considerar como simples enzimas degradativas sino como parte de un complejo y dinámico sistema para regular la actividad de los péptidos al determinar la intensidad y duración de sus efectos en tipos celulares específicos. Por lo tanto, la función *in vivo* de una ectopeptidasa está determinada por factores tales como: su localización tisular y celular, su cercanía con el receptor específico para un péptido determinado, de si su expresión es constitutiva o susceptible a regulación etc. La importancia de la localización en la función de las ectopeptidasas ha quedado claramente demostrada en este trabajo ya que la expresión de la PPII en una subpoblación de lactotrofos permite un punto de control para regular la secreción de PRL en respuesta al TRH. Otro trabajo que apoya el papel de la localización celular de las ectopeptidasas es el mostrado por Tom *et al.*, (2002) quienes al inhibir a la ACE en las arterias coronarias, mostraron un incremento en la acción de la bradikinina; pero, al inhibir a la NEP, que se expresa en el mismo tejido y también hidroliza a la bradikinina no se observa una respuesta similar a la encontrada al inhibir a la ACE. Este fenómeno se explica por la colocación de la ACE con el receptor de bradikinina, mientras que la NEP al parecer no está en el microambiente del receptor para bradikinina.

CONCLUSIONES

En este trabajo se mostró que el ARNm de la PPII se expresa en subpoblaciones de lactotropos y somatotropos pero no en los tirotropos. Por lo tanto, la mayoría de las células que responden al TRH no expresan a la enzima que lo inactiva.

El modelaje de la estructura secundaria del ARNm de la PPII permitió diseñar 2 PPII-ASO eficientes y específicos para suprimir la expresión de la PPII en cultivos primarios de la adenohipófisis.

El régimen de tratamiento con la hormona tiroidea cambia la eficiencia de los ASO, independientemente de los niveles del ARNm blanco y del tipo celular.

La inhibición de la expresión de la PPII en cultivos primarios de la adenohipófisis modifica la respuesta de los lactotropos hacia el TRH. Por lo tanto, la localización particular de la PPII en los lactotropos es importante para modular la secreción de PRL.

La inhibición de la expresión de la PPII en cultivos primarios de la adenohipófisis no altera la respuesta de los tirotropos hacia el TRH; estos datos, así como los obtenidos *in vivo*, demuestran que la presencia de la PPII en los lactotropos no tiene impacto sobre la secreción de TSH.

Estos datos demuestran el papel crítico de la localización celular de las ectopeptidasas en el control de la actividad de los péptidos biológicamente activos.

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados demuestran que la PPII regula la liberación de PRL en la glándula pituitaria *in vitro*; sin embargo, para comprobarlos definitivamente *in vivo* sería provechoso generar modelos animales a los que se les suprima la expresión de la enzima de manera tejida específica. Sería útil generar ratones con la delección genética de la PPII solo en la pituitaria o bien generar un ratón que exprese a la PPII trunca en la pituitaria, ya que tiene la capacidad de

funcionar como una dominante negativa para inhibir la actividad de la PPII nativa. De manera mas amplia, generar con modelos similares animales cuya actividad de PPII sea eliminada en el hígado o en los pituicitos de la eminencia media permitiría determinar el papel de la tiro liberinasa en el sistema portal y de la PPII en la eminencia media para regular la actividad el TRH en su transito desde su sitio de liberación y transporte a la pituitaria anterior.

REFERENCIAS

Aguilar Valles, A. 2002. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Aragay, A. M., Katz, A. y Simons, M. I. 1992. The $G\alpha_q$ and $G\alpha_{11}$ proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH3 rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 267:24983-24988.

Ashworth, R., Yu, R., Nelson, E. J., Dermer, S., Gershengorn, M. C. y Hinkle, P. 1995. Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:512-516.

Ashworth, R. y Hinkle, P. 1996. Thyrotropin-releasing hormone-induced intracellular calcium responses in individual rat lactotrophs and thyrotrophs. *Endocrinology.* 137:5205-5212.

Barnes, K., y Kenny, A. J. 1988. Endopeptidase-24.11 in the adenohipofisis of the pig is localized in the gonadotropin cells. *Peptides*, 9:55-63.

Bauer, K. 1987. Adenohipofiseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature.* 330:375-377.

Bauer, K. y 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. y Kleinkauf, H. 1980. Catabolism of thyroliberin by rat adenohipofiseal tissue extract. *Eur. J. Biochem.* 106:107-117.

Bauer, K. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie.* 70:69-74.

Bauer, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M. y Deneff, C. 1990. Regulation and cellular localization of the membrane bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipofyseal cells. *Endocrinology*. 127:1224-1233.

Bauer, K. 1994. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur. J. Biochem*. 224:387-396.

Bauvois, B. y Dauzonne, D. 2006. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) Inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med. Res Revs*. 26:88-130.

Bear, M., Connors, B. y Paradiso, M. A. 1996. Neuroscience: Exploring the brain. Williams & Wilkins, U.S.A.

Beldent, V. A., Michaud, L., Wei, M. T., Chauvet, y Corvol, P. 1993. Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Localization of the cleavage site. *J. Biol. Chem*. 268:26428-26434.

Benzing, T., Fleming, I., Blaukat, A., Muller-Esterl, W., y Busse, R. 1999. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation*. 99:2034-40.

Bonnefont, X., Lacampagne, A., Sanchez-Hormigo, A., Fino, E., Creff, A., Mathieu, M. N., Smallwood, S., Carmignac, D., Fontanaud, P., Travo, P., Alonso, G., Courtois-Coutry, N., Pincus, S. M., Robinson, I. C. y Mollard, P. 2005. Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16880-16885.

Bookckfor, F. R., Hoeffler, J. P. y Frawley, L. S. 1986 Analysis by plaque assay of GH and prolactin release from individual cell in cultures of male pituitaries: evidence for functional heterogeneity within rat mammatrope and somatotrope populations. *Neuroendocrinology*. 42:64-70.

Bookckfor, F. R. y Frawley, L. S. 1987. Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions. *Endocrinology*. 120:874-879.

Bourdais, J., Romero, F., Uriostegui, B., Cisneros, M., Joseph-Bravo P. y Charli, J. L., 2000. TRH combined with dopamine withdrawal rapidly and transiently increases pyroglutamyl aminopeptidase II activity in primary cultures of adenohipofyseal cells. *Neuropeptides*.34:83-88.

Brenner-Gati, L. y Gershengorn, M. C. 1986. Effects of thyrotropin-releasing hormone on phosphoinositides and cytoplasmic free calcium in thyrotropic pituitary cells. *Endocrinology*. 118:163-169.

Browne, P. y O'Cuinn, G. 1983. An evaluation of the role of a pyroglutamate aminopeptidase, a post-proline cleaving enzyme and post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro *Eur. J. Biochem.* 137:75-87.

Bruhn, T. O., Rondeel, J. M. M., Bolduc, T. O. and Jackson, I. M. D. 1994. Thyrotropin- releasing hormone (TRH) gene expression in the anterior pituitary. I. Presence of pro-TRH messenger ribonucleic acid and pro-TRH-derived peptide in a subpopulation of somatotrophs. *Endocrinology.* 134:815-820.

Burgus, R., Dunn, T., Desidero, D., Ward, D., Vale, W. y Guillemin, R. 1970. Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH releasing factor. *Nature.* 226:321-325.

Cao, J., O'Donnell, D., Vu, H., Paysa, K., Pou, C., Godbout, C., Jakob, A., Pelletier, M., Lembo, P., Ahmad, S. y Walker, P. 1998. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 48:32281-32287.

Carr, F. E., Fisher, C. U., Fein, H. G. y Smallridge, R. C. 1993. Thyrotropin-releasing hormone stimulates *c-jun* and *c-fos* messenger ribonucleic acid levels: implications for calcium mobilization and protein kinase-C activation. *Endocrinology.* 133:1700-1707.

Charli, J. L., Mendez, M., Joseph-Bravo, P. y Wilk, S. 1987. Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do no change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides.* 9:373-378.

Charli, J. L., Cruz, C., Vargas, M. A. y Joseph-Bravo, P. 1988. The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 13:237-242.

Charli, J. L., Mendez, M., Vargas, M. A., Cisneros, M., Assai, M., Joseph-Bravo, P. y Wilk, S. 1989. Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides.* 14:191-196.

Chavez-Gutierrez, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M. A., Matta-Camacho, E., Ducancel, F., Segovia, L., Joseph-Bravo, P., y Charli, J. L. 2005. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity. *J Neurochem.* 92:807-817.

Chávez-Gutiérrez, L., Matta-Camacho, E., Osuna, J., Horjales, E., Joseph-Bravo, P., Maigret, B. y Charli J. L. 2006. Homology modelling and site directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *J Biol Chem.* 281:18581-18590.

Chomczynsky, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Csuhai, E., Little, S. S. y Hersh, L. B. 1995. Inactivation of neuropeptides. *Prog Brain Res.* 104:131-142.

Cummins, P. M. y O'Connor, B. 1998. Pyroglutamyl peptidase: an overview of three known enzymatic forms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1429:1-17.

Dasen, J. S., O'Connell, S. M., Flynn, S. E., Treier, M., Gleiberman, A. S. Szeto, D. P., Hooshmand, F., Aggarwal, A. K. y Rosenfeld, M. G. 1999. Reciprocal interactions of pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell.* 97:587-598.

de la Baume, S., Yi, C. C., Schwartz, J. C., Chaillet, P., Marcais-Collado, H. y Costentin, J. 1983. Participation of both 'enkephalinase' and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Neuroscience.* 8:143-151.

Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L. K., Sjöström, H., Norén, O. y Laude, H. 1992. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature.* 357:417-420.

Dendorfer, A., Reibetamann, S., Wolfrum, S, Raasch, W., y Dominiak, P. 2001. Potentiation of kinin analogues by ramiprilat is exclusively related to their degradation. *Hypertension.* 38:142-146.

Devault, A., Lazure, C., Nault, C., Le Moual, H., Seidah, N. G., ChreÂtien M, Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont A., Roques B. P., Crine, B., y Boileau, G. 1987. Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase-24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA. *EMBO J.* 6:1317±1322.

Dyess, E. M., Segerson, T. P., Liposits, Z., Paull, W. K., Kaplan, M. M., Wu, P., Jackson, I. M. D. y Lechan, R. M. 1988. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 123:2991-2997.

Esther, C. R. Jr., Howard, T. E., Marino, E. M., Goddard, J. M., Capecchi, M. R., y Bernstein, K. E. 1996. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology and reduced male fertility. *Lab. Invest.* 74:953-965.

Esther C. R. Jr., Marino, E. M., Howard, T. E., Machaud, A., Corvol, P., Capecchi, M. R. y Bernstein, K. E. 1997. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest.* 15: 2375-2385.

Fauquier, T., Lacampagne, A., Travo, P., Bauer, K. y Mollard, P. 2002. Hidden face of the anterior pituitary. *Trends Endocrinol Metab.* 13:304-309.

Firla, B., Arndt, M., Frank, K., Thiel, U., Ansorge, S., Tager, M., y Lendeckel, U. 2002. Extracellular cysteines define ectopeptidase (APN, CD13) expression and function. *Free Radic Biol Med.* 32:584–595.

Friedman, T. C. y Wilk, S. 1986. Delineation of a particulate thyrotropin-releasing-hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* 46:1231-1239.

Fujimoto, J., Straub, R. E. y Gershengorn, M. C. 1991. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and phorbol myristate acetate decrease TRH receptor mRNA in rat pituitary GH3 cells. Evidence that protein kinase C mediate the TRH effect. *Mol. Endocrinol.* 5:1527-1532.

Fukasawa, K., Fujii, H., Saitoh, Y., Koizumi, K., Aozuka, Y., Sekine, K., Yamada, M., Saiki, I. Y Nishikawa, K. 2006. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. *Cancer Lett.* 243:135-143.

Funkhouser, J. D., Tangada, S. D.y Peterson, R. D. 1991. Ectopeptidases of alveolar epithelium: candidates for roles in alveolar regulatory mechanisms. *Am J Physiol.* 260:L381-385.

Gershengorn, M. C. y Osman, R. 1996. Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol. Rev.* 76:175-190.

Gollasch, M., Kleuss, Ch., Hescheler, J., Wittig, B. y Schultz, G. 1993. Gi2 and protein kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca⁺⁺ channels in rat pituitary GH3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6265-6269.

Grifman, M. y Soreq, H. 1997. Differentiation intensifies the susceptibility of pheochromocytoma cells to antisense oligodeoxynucleotide-dependent suppression of acetylcholinesterase activity. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7:351-359.

Harder, S., Lu, X., Wang, W., Buck, F., Gershengorn, M. C. y Bruhn, T. O. 2001. Regulator of G protein signaling 4 suppresses basal and thyrotropin releasing-hormone (TRH)-stimulated signaling by two mouse TRH receptors, TRH-R(1) and TRH-R(2). *Endocrinology.*;142:1188-1194.

Harder, S., Dammann, O., Buck, F., Zwiers, H., Lederis, K., Richter, D. y Bruhn, T. O. 2001. Cloning of two thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): functional expression, gene structure, and evolution. *Gen Comp Endocrinol.* 124:236-245.

- Heuer, H., Ehrchen, J., Bauer, K., y Schäfer, M. K. 1998. Region-specific expression of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur. J. Neurosci.* 10:1465-1478.
- Ho, S. P., Britton, D. H. O., Stone, B. A., Behrens, D. L., Leffet, L. M., Hobbs, F. W., Miller, J. A. y Trainor, G. L. 1996 Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. *Nucleic acid Res.* 24:1901-1907.
- Ho, S. P., Bao, Y., Leshner, T., Malhotra, R., Ma, M. Y., Fluharty, S. J. y Sakai, R. R. 1998. Mapping of RNA accesible sites for antisense experiments with oligonucleotide libraries. *Nature Biotechnol.* 16:59-63.
- Hooper, N. M. 1994. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.* 354:1-6.
- Itadani, H., Nakamura, T., Itoh, J., Iwaasa, H., Kanatani, A., Borkowski, J., Ihara, M. y Ohta, M. 1998. Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 250:68-71.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y. y Saido T. C. 2000. Identification of the major A beta(1-42)-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nature Med.* 6:143-150.
- Jaspard, E., Wei, L., y Alhenc-Gelas, F. 1993. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J. Biol. Chem.* 268:9496-9503.
- Jones, B. W., Song, G. J., Greuber, E. K. y Hinkle P. M. 2007. Phosphorylation of the endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor in pituitary GH3 cells and pituitary tissue revealed by phosphosite-specific antibodies. *J. Biol Chem.* 27:12893-12906.
- Joseph-Bravo, P., Loudes, C., Charli, J. L. y Kordon, C. 1979. Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res.* 166:321-329.
- Joseph-Bravo, P., Uribe, R. M., Vargas, M. A., Pérez-Martinez, L., Zoeller, T. y Charli, J. L. 1998. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell. Mol. Neurobiol.* 18:231-247.

Kazemzadeh, M., Velkeniers, B., Herregodts, P., Collumbien, R., Finné, E., Derde, M. P., Vanhaelst, L. y Hoogne-Peters, E. L. 1992. Differential dopamine-induced prolactin mRNA levels in various prolactin-secreting cell (sub)populations. *J. Endocrinol.* 132:401-409.

Kelly, J. A., Slator, G. R., Tipton, K. F., Williams, C. H. y Bauer, K. 2000. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *J. Biol. Chem.* 275:16746-16751.

Kelly, J. A., Scalabrino, G. A., Slator, G. R., Cullen, A. A., Gilmer, J. F., Lloyd, D. G., Bennett, G. W., Bauer, K., Tipton, K. F. y Williams, C. H. 2005. Structure-activity studies with high-affinity inhibitors of pyroglutamyl-peptidase II. *Biochem J.* 389:569-576.

Kenny, A. J., O'hare, M. J. y Gusterson, B. A. 1989. Cell-surface peptidases as modulators of growth and differentiation. *Lancet.* 2:785-787.

Konaka, S., Yamada, M., Satoh, T., Osawa, H., Watanabe, E., Takaka, K. y Mori, M. 1997. Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor mRNA in somatotrophs in the rat anterior pituitary. *Endocrinology.* 138:827-830.

Krylyshkina, O., Chen J., Mebis, L., Deneff, C. y Vankelecom, H. 2005. Nestin-Immunoreactive Cells in Rat Pituitary Are neither Hormonal nor Typical Folliculo-Stellate Cells. *Endocrinology.* 146: 2376–2387.

Lechan, R. M., Wu, P., Jackson, I. M. D., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G. y Goodman, R. H. 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science.* 231:159-61.

Lechan, R. M., Qu, Y., Jackson, I. M. D. y Mahdavi, V. 1994. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 134:92-100.

Lloyd, R. V. y Landefeld, T. D. 1986. Detection of prolactin messenger RNA in rat anterior pituitary by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 125:35-44.

Lima, W. F., Wu, H., Nichols, J. G., Manalili, S. M., Drader, J. J., Hofstadler, S. A. y Crooke, S.T. 2003. Human RNase H1 activity is regulated by a unique redox switch formed between adjacent cysteines. *J. Biol. Chem.* 278, 14906-14912.

Lin, J. y Wilk, S. 1996. Quantitation and regulation of pyroglutamyl peptidase II messenger RNA in rat tissues and GH3 cells. *Neuroendocrinology.* 67:197-208.

- Look, A. T., Ashmun, R. A., Shapiro, L. H. y Peiper, S. C. 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83:1299-1299.
- Lu, B., Gerard, N. P., Kolakowski, L. F. Jr., Bozza, M., Zurakowski, D., Finco, O., Carroll, M. C. y Gerard, C. 1995. Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J. Exp. Med.* 181:2271-2275.
- Malfroy, B., Swerts, J. P., Guyon, A. y Roques, B. P. 1978. High-affinity enkephalin degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature.* 276:523-526.
- Matziari, M., Bauer, K., Dive, V. y Yiotakis, A. 2008. Synthesis of the Phosphinic Analogue of Thyrotropin Releasing Hormone. *J. Org. Chem.* 73:8591-8593.
- Marcic, B., Deddish, P. A., Skidgel, R. A., Erdos, E. G., Minshall, R. D y Tan, F. 2000. Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *J Biol Chem.* 275:16110-16118.
- Milner, N., Mir, K. U. y Southern, E. 1997. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nature biotechnol.*, 15:537-541.
- Miraglia, L., Watt, A. T., Graham, M. J. y Crooke, S. T. 2000. Variations in mRNA content have no effect on the potency of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10:453-461.
- Nakane, K. P. 1974. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem.* 18:9-20.
- Noda, T., Kikuchi, M., Kaidzu, S. y Yashiro, T. 2003. Rat anterior pituitary cells in vitro can partly reconstruct in vivo topographic affinities. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272:548-555.
- Nogami, H. y Yoshimura, F. 1982, Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec.* 202:261-274.
- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. 1985. Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 150:47-52.
- O'Cuinn, G., O'Connor, B., Gilmartin, L. y Smith, M. 1995. Neuropeptide inactivation by peptidases. In: *Metabolism of brain peptides.* Edited by O'Cuinn G. CRC press, USA. Pp 99-157.
- O'Dowd, B. F., Lee, D. K., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., Wang, B., Gershengorn, M. C. y George, S. R. 2002. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRHR1. *Mol Endocrinol.* 14:183-193.

- O'Leary, R. y O'Connor, B. 1995. Thyrotropin releasing hormone. *J. Neurochem.* 65:953-963.
- Papandreou, C. N., Usmani, B. A., Geng, Y., Bogenreider, T., Freeman, R., Wilk, S., Finstad, C. L., Reuter, V. E., Powell, C. T., Scheinberg, D., Magill, C., Scher, H. I., Albino, A. P. y Nanus, D. M. 1998. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nature Med.* 4:50-57.
- Pascual, I., Gil-Parrado, S., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., Diaz, J., Possani, L. D., Charli, J. L. y Chavez, M. 2004. Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*. in vivo effects in rodent brain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:138-152.
- Pascual, I. 2005. Purificación y caracterización parcial del primer inhibidor natural de piroglutamil aminopeptidasa II (enzima que degrada al TRH), aislado del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1766 (Polychaeta). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.
- Patzel, V., Steidl, U., Kronenwett, R., Haas, R. y Sczakiel, G. 1999. A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxiribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic acid Res.* 27:4328-4344.
- Perello, M., Friedman, T., Paez-Espinosa, V., Shen, X., Stuart, R. C. Y Nillni, E. A. 2006. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology.* 147:2705-2716.
- Ponce, G., Charli, J. L., Pasten, J. A., Aceves, C. y Joseph-Bravo, P. 1988. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology.* 48:211-213.
- Porter, T. E., Hill, J. B., Wiles, C. D., y Frawley, L. S. 1990. Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactin-secreting cells? Suggestive evidence from virgin, gestating, and lactating rats. *Endocrinology.* 127:2789-2794.
- Rangel, R., Sun, Y., Guzman-Rojas, L., Ozawa, M. G., Sun, J., Giordano, R. J., Van Pelt, C. S., Tinkey, P. T., Behringer, R. R., Sidman, R. L., Arap, W., y Pasqualini, R. 2007. Impaired angiogenesis in aminopeptidase N-null mice. *PNAS.* 104:4588-4593.
- Rieger, K. J., Saez-Servent, N., Papet, M. P., Wdzieczak-Bakala, J., Morgat, J. L., Thierry, J., Voelter, W. y Lenfant M. 1993. Involvement of human plasma angiotensin I-converting enzyme in the degradation of the haemoregulatory peptide N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline. *Biochem. J.* 296:373-378.
- Ritchie, J. C., Davis, T. P. y Nemeroff, C. B. 2003. Action of three ectopeptidases on corticotropin-releasing factor: metabolism and functional aspects. *Neuropsychopharmacology.* 28:22-33.

Roques, B. P., Fournie-Zaluski, M-C., Soroca, E., Lecomte, J-M., Malfroy, B., Llorens-Cortes, C., y Schwartz, J-C. 1980. The enkephalinase inhibitor thiorphan shows anti-nociceptive activity in mice. *Nature*. 288:286-288.

Roques, B. P. y Beaumont, A. 1993. Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives. *Trends Pharmacol Sci*. 11:245-249.

Sánchez, E., Vargas, M. A., Singru, P. S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J. L. y Lechan, R. M. 2008. Contribution of tancyte pyroglutamyl peptidase II to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the hypothalamic median eminence. Sometido a *J Neurosc*.

Segerson, T. P., Kauer, J., Wolfe, H. C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I. M. D. y Lechan, R. M. 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 238:78-80.

Scalabrino, G. A., Hogan, N. O'boyle, K. M., Slator, G. R, Gregg, D. J., Fitchett, C. M., Draper, S. M., Bennett, G. W., Hinkle, P. M, Bauer, K., Williams, C. H., Tipton, K. F. y Kelly, J. A. 2007. Discovery of a dual action first-in-class peptide that mimics and enhances CNS-mediated actions of thyrotropin-releasing hormone. *Neuropharmacology*. 52:1472-1481.

Schally, A., Redding, T., Bowers, C. y Barret, J. 1969. Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem*. 244: 4077-4087.

Schauder, B., Schomburg, L., Kohrle, J. y Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A*. 91:9534-9538.

Schmid-Nielsen, K. 1986. *Animal physiology: adaptation and environment*. Cambridge University, New York.

Schmitmeier, S., Thole, H., Bader, A., y Bauer, K. 2002. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur J Biochem*. 269:1278-1286.

Schomburg, L. y Bauer, K. 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 136:3480-3485.

Schomburg, L. y Bauer, K. 1997. Regulation of the adenohypophyseal thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol. *Endocrinology* 138: 3587-3593.

Schwartz, J. 2000. Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr Rev*. 21:488-513.

Shipp, M. A., Stefano, G. B., Switzer, S. N., Griffin, S. N. y Reinherz, E. L. 1991. CD10 (CALLA)/neutral endopeptidase 24.11 modulates inflammatory peptide induced changes in neutrophil morphology, migration and adhesion proteins and is itself regulated by neutrophil activation. *Blood*. 78:1834-1841.

Shipp, M. A., Tarr, G. E., Chen, C. Y., Switzer, S. N., Hersh, L. B., Stein, H., Sunday, M. E., Reinherz, E. L. 1991. CD10/neutral endopeptidase-24.11 hydrolyzes bombesin like peptides and regulates the growth of small-cell carcinomas of the lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:10662-10666.

Smith, J., Ladi, E., Mayer-Pröschel, M. y Noble, M. 2000. Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97, 10032-10037.

Song, J., Jin, L. y Lloyd, R. V. 1989. Effects of estradiol on prolactin and growth hormone messenger RNAs in cultured normal and neoplastic (MtT/W15 and GH3) rat pituitary cells. *Cancer Res*. 49:1247-1253.

Stevenin, B. y Lee, S. L. 1995. Hormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone (TRH) gene. *The Endocrinologist*. 5:286-296.

Sturiale, S., Barbara, G., Qiu, B., Figini, M., Geppetti, P., Gerard, N., Gerard, C., Grady, E. F., Bunnett, N. W. y Collins, S. M. 1999. Neutral endopeptidase (EC3.4.24.11) terminates colitis by degrading substance P. *Proc Nat Acad Sci USA*. 96:11653-11658.

Sun, Y., Lu, X. y Gershengorn, M. C. 2003. Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences. *J Mol Endocrinol*. 30:87-97.

Tam, L. T., Engelbrecht, S., Talent, J. M., Gracy, R. W. y Erdos, E. G. 1985. The importance of disulfide bridges in human endopeptidase (enkephalinase) after proteolytic cleavage. *Biochem Biophys Res Commun*. 133:1187-1192.

Taylor, A. H., Pringle, J. H., Bell, S. C. y Al-Azzawi, F. 2001. Specific inhibition of estrogen receptor alpha function by antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*. 11:219-231.

Ten Asbroek, A. L.M. A., Van Groenigen, M., Nooij, M., y Baas, F. 2002. The involvement of human ribonucleases

H1 and H2 in the variation of response of the cells to antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur. J. Biochem*. 269, 583D592.

Tom, B., Dendorfer, A., de Vries, R., Saxena, P. R. y Jan Danser, A. H. 2002. Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol*. 137:276-284.

Treier, M. y Rosenfeld M. G. 1996. The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. *Curr. Op. Cell. Biol.* 8:833-844.

Vargas, M. A., Mendez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. 1987. Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79:311-314.

Vargas, M. A., Cisneros, M., Herrera, J., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. 1992. Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs. *Peptides.* 13:255-260.

Vargas, M. A., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. 1994. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology.* 60:323-330.

Vargas, M. A., Bourdais, J., Sanchez, S., Uriostegui, B., Moreno, E., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. 1998. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *Neuroendocrinology.* 10:199-206.

Vargas, M. A., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. 2000. Regulation of adenohypophyseal pyroglutamyl aminopeptidase II activity by thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters. *Endocrine.* 13:267-272.

Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Corvol P. y Clauser, E. 1991. The two homologous domains of the human angiotensin I converting enzyme are both catalytically active. *J. Biol. Chem.* 266:9002-9008.

Wilk, S. y Wilk, E. 1989. Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem. Int.* 15:81-89.

Wolf, G. 2008. Novel aspects of the renin-angiotensin-aldosterone-system. *Front Biosci.* 1:4993-5005

Yamada, M., Saga, Y., Shibusawa, N., Hirato, J., Murakami, M., Iwasaki, T., Hashimoto, K., Satoh, T., Wakabayashi, K., Taketo, M. M. y Mori, M. 1997 Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:10862-10867.

Yamada, M., Shibusawa, N., Ishii, S., Horiguchi, K., Umezawa, R., Hashimoto, K., Monden, T., Satoh, T., Hirato, J. y Mori, M. 2006. Prolactin Secretion in Mice with Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Deficiency. *Endocrinology.* 147:2591-2596.

Yamamoto, N., Seo, H., Susuganuma, N., Matsui, N., Nakane, T., Kuwayama, A. y Kageyama, N. 1986. Effect of estrogen on prolactin mRNA in the rat pituitary: Analysis by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Neuroendocrinology.* 42:494-497.

Yashiro, T., Nogami, H. y Yoshimura, F. 1981. Immunohistochemical study of the postnatal development of pituitary thyrotrophs in the rat, with special reference to cluster formation. *Cell Tissue Res.* 216:39-46.

Yeager, C. L., Ashmun, R. A., Williams, R. K., Cardellicchio, C. B., Shapiro, L. H., Look, A. T. y Holmes, K. V. 1992. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature.* 357:420-422.

Yoshimura, F., Nogami, H. y Yashiro T. Fine structural criteria for pituitary thyrotrophs in immature and mature rats. *Anat Rec.* 1982 204:255-263.

Yu, R., Ashworth, R. y Hinkle, P. M. 1998. Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid.* 8:887-894.

ANEXOS

Artículo 1:

Cruz, R., Chávez-Gutiérrez, L., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. L. 2004. 3,3',5',-triiodo-L-thyronine reduces efficiency of mRNA knock-down by antisense oligodeoxynucleotides: a study with pyroglutamyl aminopeptidase II in adenohypophysis. *Oligonucleotides*, 14:176-190.

Artículo 2:

Cruz, R., Vargas, M. A., Uribe, R. M., Pascual, I., Lazcano, I., Yiotakis, A., Matziari, M., Joseph-Bravo, P y Charli, J. L. 2008. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 29:1953-1964.

3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine Reduces Efficiency of mRNA Knockdown by Antisense Oligodeoxynucleotides: A Study with Pyroglutamyl Aminopeptidase II in Adenohypophysis

RAYMUNDO CRUZ, LUCIA CHÁVEZ-GUTIÉRREZ, PATRICIA JOSEPH-BRAVO,
and JEAN-LOUIS CHARLI

ABSTRACT

The impact of hormones on the efficacy of antisense oligodeoxynucleotides (ASOs) is a poorly analyzed subject. We designed, based on the identification of potentially favorable local elements of mRNA secondary structure, eight phosphorothioate ASOs to knock down the expression of an ectopeptidase, pyroglutamyl aminopeptidase II (PPII), in primary cultures of adenohypophysis. Two of the PPII ASOs were very efficient, sequence-specific, and target-specific. Because the expression of PPII is upregulated by 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (T_3), we studied the impact of varying the protocol of PPII induction on the knockdown efficacy. Hormone removal at transfection increased markedly the ability of (1) PPII ASOs to reduce PPII mRNA levels or PPII activity in adenohypophyseal cells or in C6 rat glioma cells and (2) a thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor-1 (TRH-R1) ASO to reduce TRH-R1 mRNA levels in adenohypophyseal cells. There was no effect of hormone removal on transfection efficacy and no correlation between target mRNA levels and ASO efficacy. These data demonstrated that ASO efficacy could depend on T_3 levels; this might be due to regulation of a step generally critical for ASO efficiency.

INTRODUCTION

ANTISENSE OLIGODEOXYNUCLEOTIDES (ASOs) are widely used in cell biology or physiology to understand gene product function (Wagner, 1994; Weiss et al., 1997). Several mechanisms of action can explain sequence-specific inhibition by an ASO, including translational arrest or providing a double-stranded heteroduplex substrate for RNase H, leading to degradation of target RNA (Matteucci and Wagner, 1996).

Cell cultures are generally propagated in serum-supplemented medium or in serum-free medium supplemented with hormones and growth factors to regulate the differentiated state of the cells or to induce the expression of specific gene products. Besides the negative impact of

serum on transfection efficiency with lipofectants (Lewis et al., 1996; Zelphati et al., 1998; Hemmrich et al., 2003), that of other extracellular factors on antisense efficacy in cell cultures has not been thoroughly analyzed. Grifman and Soreq (1997), have shown that differentiation of pheochromocytoma cells by nerve growth factor (NGF) enhances cell susceptibility to ASO action. Taylor et al. (2001) demonstrated that in MCF7-K2 cells, 17β -estradiol enhances ODN uptake, leading to enhancement of ASO action. In contrast, Miraglia et al. (2000) did not observe any impact of treating other cell lines with glucocorticoids or tumor necrosis factor (TNF).

In this study, we evaluated the efficacy of phosphorothioate ASOs designed by a protocol derived from the method of Patzel et al. (1999). This is a theoretical proce-

ture that combines predicted secondary structures of nucleotide segments to select those assumed to favor nucleation events in oligodeoxynucleotide (ODN)-RNA duplex formation and improves the probability of designing efficient ASOs for RNase H-mediated RNA degradation.

These ASOs were designed to knock down pyroglutamyl aminopeptidase II (PPII; E.C. 3. 4. 19. 6), an aminopeptidase of the M1 family of proteinases that hydrolyzes *in vitro* the pyroglu-his bond of pglu-his-proNH₂ (thyrotropin-releasing hormone [TRH]), a neuropeptide involved in intercellular communication in various tissues (O'Leary and O'Connor, 1995). PPII is a type II zinc metallooctopeptidase encoded by various long transcripts. Among similar peptidases is aminopeptidase A (APA), with a primary sequence identity of 32% (Schauder et al., 1994; Charli et al., 1998; Heuer et al., 1998).

In the adenohypophysis, PPII is localized on a small subset of lactotrophs (Bauer et al., 1990; Cruz et al., 2004), one of the target cells of TRH. Adenohypophyseal PPII activity is directly upregulated by 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (T₃) (Ponce et al., 1988; Bauer, 1988; Bauer et al., 1990; Vargas et al., 2000) through regulation of mRNA levels (Schomburg and Bauer, 1995). Induction of PPII is required to test the effects of ASOs, as PPII activity is barely detectable in primary cultures of adenohypophyseal cells not supplemented with T₃ (Vargas et al., 2000). The protocol of PPII induction may alter the efficacy of ASOs because thyroid hormones have a profound impact on cell physiology in virtually all mammalian tissues (Yen, 2001) and may rapidly change the activity of proteins involved in antisense effects. Therefore, the system offers an opportunity to test the impact of cell regulation by T₃ on ASO efficiency.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotide design

Eight PPII ASOs were designed following the method of Patzel et al. (1999), with minor modifications. Briefly, the computer algorithm MFOLD version 2.3 (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form1.cgi) was used to compute free-energy optimal and suboptimal secondary structures in fragments (window = 1400 nucleotides [nt]) along PPII mRNA (Schauder et al., 1994). We selected the five lowest energy secondary structures for each window and assigned a single-stranded (ss) count (0–5) for each nucleotide according to the number of times it was single-stranded in the set. The window was shifted along the target sequence (from 5' to 3') at a step width of 250 nt until the whole cDNA sequence was covered; mean ss values were calculated for each nucleotide.

ASOs were designed over nucleotide segments with a high (approximately 4.5) mean ss count on at least 10 consecutive nucleotides. The 3' nt of each ASO was directed at the first or second 5' nt in the high mean ss score region. Three scrambled PPII ODNs (SCOs) were designed as controls. ODN sequences were compared with the GeneBank database and analyzed with the Oligo v.4.s program to eliminate potential nonspecific and self-hybridizing sequences, respectively. ODNs were synthesized and HPLC purified by Epoch Bioscience (San Diego, CA). PPII ODNs were fully phosphorothioate modified. A pair of TRH receptor-1 (TRH-R1) end-capped phosphorothioate ODNs (3 phosphorothioate bonds at the 5' and 3' ends) was also used. Sequences of ODNs and targets are described in Table 1.

Cell culture and transfection

Female Wistar rats (70–100 days old, 260–300 g) kept under controlled lighting conditions (light from 7:00 to 19:00 hours) and fed *ad libitum* were killed by decapitation between 10:00 and 11:00 hours. We followed the Society for Neuroscience (U.S.A.) *Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research*. Culture of adenohypophyseal cells was performed essentially as previously described (Vargas et al., 1998). Except where indicated, 1.1×10^6 viable cells were plated in 16-mm diameter culture dishes (Corning Inc., Acton, MA) in 1 ml Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (GIBCO-BRL, Rockville, MD) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (GIBCO-BRL), vitamins (GIBCO-BRL), 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 125 ng/ml Fungizone (Squibb, Princeton, NJ), 2 mM glutamine (Sigma, St Louis, MO), and 14 mM glucose (DMEM-S). Alternative protocols for T₃ administration (Fig. 1B) were initiated at seeding.

Rat C6 glioma cells were maintained in DMEM supplemented with 19 mM glucose, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin, 125 ng/ml Fungizone, and 10% FBS. Twenty-four hours before transfection, 10^5 cells were seeded in 16-mm diameter culture dishes in 1 ml medium using protocol B or D for T₃ administration (Fig. 1B).

To identify a suitable transfectant, we used adenohypophyseal cultures maintained with T₃ (10^{-8} M) from seeding to cell collection; transfection was at 96 hours (protocol A) (Fig. 1B). To determine transfection efficiency, PPII ASO 1 labeled on the 5'-end with fluorescein isothiocyanate (1 μ M final) (Epoch Bioscience) was mixed with each transfectant according to the manufacturer's recommendations. Cells were washed twice with DMEM, and transfection mixture was added. At 4 hours, transfection mixture was removed, and 1 ml fresh DMEM-S was added. The medium was removed 12

TABLE 1. SEQUENCES OF ASOs, SCOs, AND TARGETS USED IN THIS STUDY

Name	Sequence (5' → 3') and chemistry ^a	Target sequence ^b	T _m ^c
PPII ASO 1	GCGGCGTCG TCTTCTCCCAT	73–92	65°C
PPII ASO 2	TGAAAGTGGCCTTGATAGATT	921–940	56°C
PPII ASO 3	GCGTCGGGTCTTGCATATAA	1135–1154	60°C
PPII ASO 4	AACTGAATGGCCCATAAAAT	1691–1710	54°C
PPII ASO 5	AAGTTGAAGTGCTTTGGTTT	1952–1971	54°C
PPII ASO 6	TCCTTTGTCTAAGTATGTTA	2084–2103	53°C
PPII ASO 7	CTGGAAAAGCTCATCTTGAT	3104–3123	56°C
PPII ASO 8	GTACTAATAGACCTGTTGAG	4361–4380	56°C
PPII SCO 1	GGCACCCGTCTTTGCTCGT	None	65°C
PPII SCO 2	AGTCTACGATTGAATGGTGT	None	56°C
PPII SCO 3	ATGGGTTCTACGGAGTCCTA	None	60°C
TRH-R1 ASO	GACG*G*T*T*T*C*A*A*T*T*C*T*CCAT	3305–322 ^d	52°C
TRH-R1 SCO	CATG*G*T*T*T*T*A*C*G*A*CCTC	None	52°C

^aMost 5'–3' bonds are phosphorothioate except for * bonds, which are phosphodiester.

^bnt numbering according to Schauder et al. (1994) for PPII or to Zhao et al. (1992) for TRH-R1; also see Fig. 1A for PPII ASO positions.

^cPredicted melting temperature (with Oligo v.4s).

^dSequence designed by Martínez et al. (2001).

hours after the end of transfection, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and treated with 250 μ l trypsin-EDTA (GIBCO-BRL) for 5 minutes at 37°C, and trypsin was inactivated by adding one volume DMEM-S. Cells were collected by centrifugation and re-suspended in PBS. An aliquot was diluted in trypan blue and deposited in a Neubauer cell to record with a fluorescence microscope the extent of cell survival and intracellular incorporation of the fluorescence-tagged ODN. Three cationic lipids were tested at various DNA/lipid ratios (around the value recommended by the manufacturers). With each transfectant, the best result was: 2 μ l FuGENE6 (Roche, Indianapolis, IN) per μ g ODN, 62% ($n = 2$) efficiency and 11% ($n = 2$) death; 1.7 μ g CELL-FECTIN (GIBCO-BRL) per μ g ODN, 50% \pm 4% (mean \pm SEM, $n = 4$) transfection efficiency and 21% \pm 2% ($n = 4$) death; 0.4 μ g Transfectam (Promega Corporation, Madison, WI) per μ g ODN, 44% ($n = 2$) transfection and 29% ($n = 2$) death. In cells transfected with FuGENE6, the fluorescent signal was over the nucleus and the cytoplasm (not shown), and total RNA or protein levels were similar to those measured in an untreated control (not shown).

Therefore, except where indicated, experiments were performed using 6 or 12 μ l FuGENE6 for 16-mm or 35-mm culture dishes, respectively. ASOs or SCOs were mixed with FuGENE6 previously diluted in 500 (or 1000) μ l DMEM (plus supplements except serum and antibiotics) and maintained for 30 minutes at ambient temperature. Cells were washed twice with DMEM, and

transfection mixture was added. ODN transfectant complex was maintained until the end of the experiment, as the presence of the complex did not change ASO efficiency. Therefore, at 4 hours, 500 (or 1000) μ l fresh DMEM-S (with 20% serum and 2 \times penicillin, streptomycin, and Fungizone) was added. Controls (mock) were transfected with FuGENE6 in the absence of ODN. Cells were washed with PBS 12, 24, 36, or 48 hours after the end of transfection, collected, and frozen at -80°C .

PPII ODNs were used at 1 μ M because various experiments in adenohipophyseal cells with PPII ASOs showed that 3-fold or 6-fold higher concentrations did not increase the effects on PPII mRNA levels (not shown) and that inhibition of PPII mRNA levels decreased at lower concentrations. Figure 2 shows that in protocol D, PPII ASO 2 had no effect at 0.1 μ M or less. A significant inhibition (25% or 29% compared with mock or PPII SCO 2, respectively) was detected at 0.3 μ M, and a robust inhibition (59% or 57% compared with mock or PPII SCO 2, respectively) was detected at 1 μ M. TRH-R1 ODNs were used at 2 μ M based on similar observations (data not shown).

Intracellular distribution of ODNs

Cells were transfected with PPII ASO 1 labeled on the 5'-end with fluorescein isothiocyanate, fixed with 4% paraformaldehyde/4% sucrose in PBS for 20 minutes 12 hours after the end of transfection, washed twice in PBS, and mounted with glycerol/PBS 1:1. Distribution of fluo-

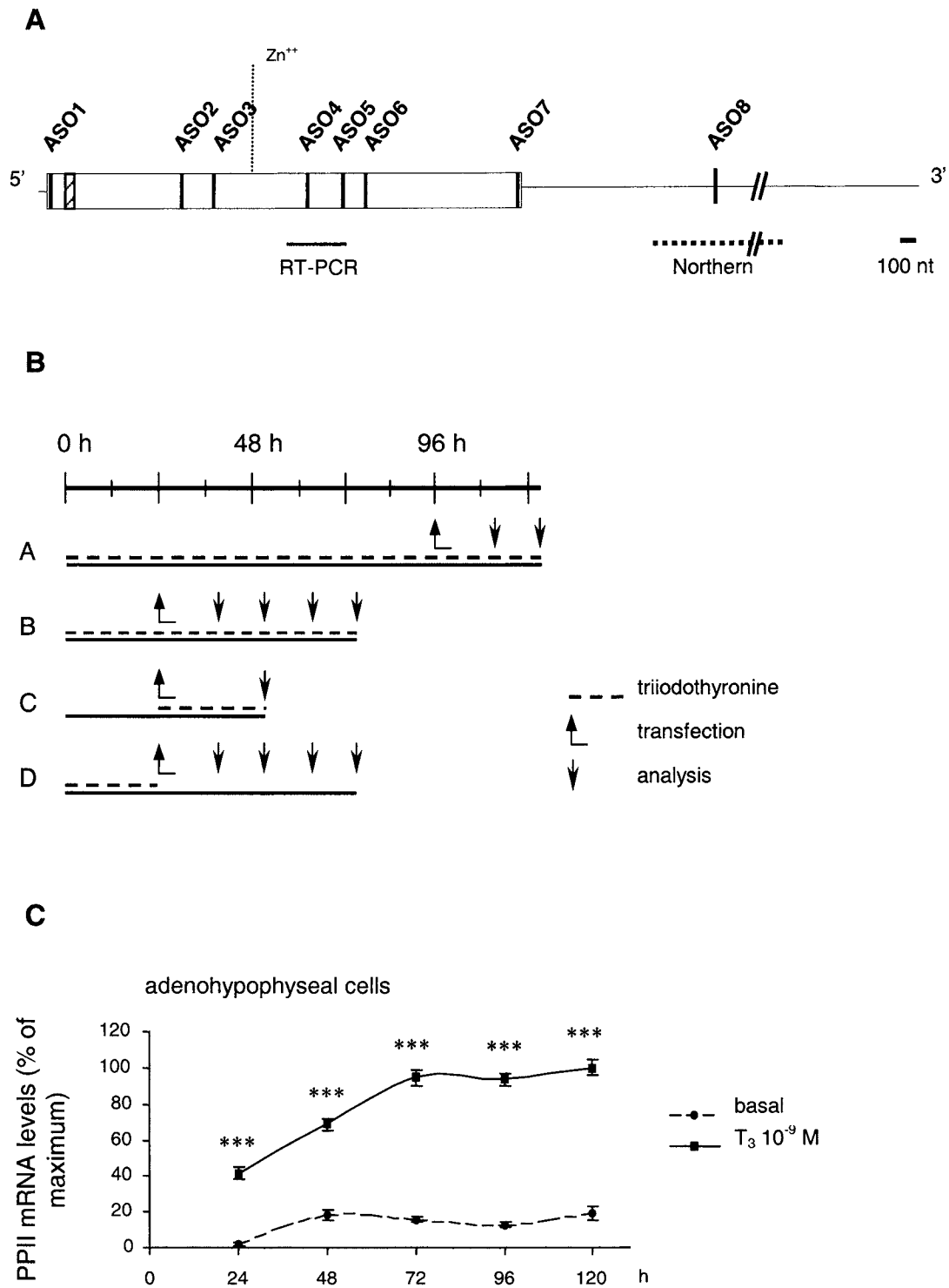


FIG. 1. (A) Schematic representation of PPII mRNA primary structure, position of target sequences in PPII mRNA, and regions used as probe. Open box, translated sequence; hatched box, transmembrane segment; vertical black bar, position of each PPII ASO; Zn⁺⁺, position of zinc ligands; horizontal black bar, segment amplified by RT-PCR; dotted line, Northern blot probe. (B) Cell culture protocols used to test the impact of T₃ addition on ASO efficacy in adenohypophysis. For protocol A, T₃ was 10⁻⁸ M; for protocols B, C, and D, T₃ was 10⁻⁹ M. (C) Time course of the effect of 10⁻⁹ M T₃ on PPII mRNA levels in primary cultures of adenohypophyseal cells. In cells treated with T₃, hormone was added at seeding and maintained until mRNA assay (protocol A). Data are mean ± SEM mRNA levels in % of maximal levels (taken as 100%) (n = 6). ***p < 0.001 compared with respective control.

adenohypophyseal cells

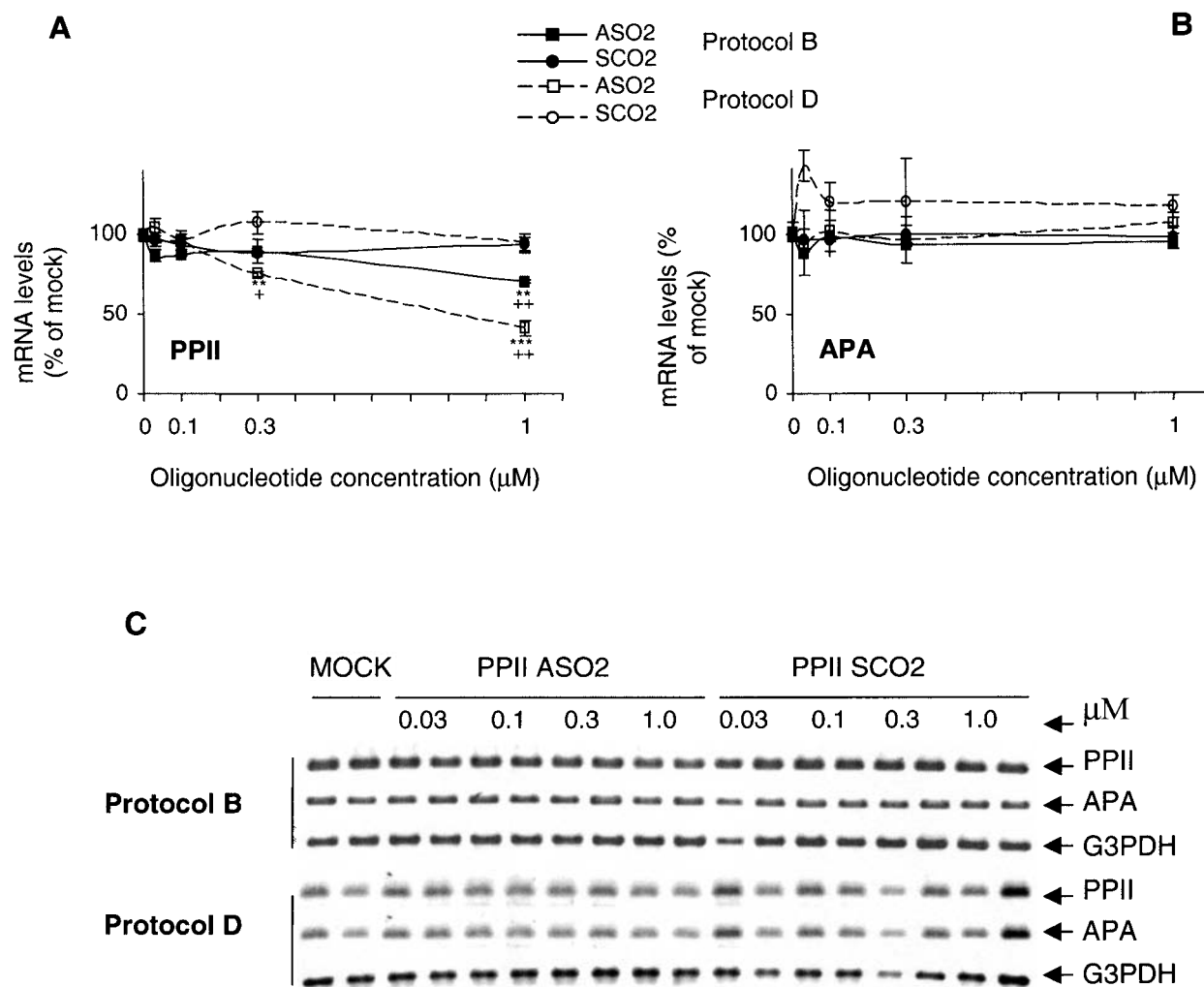


FIG. 2. Dose-dependent effects of PPII ASO 2 and PPII SCO 2 on PPII and APA mRNA levels in primary cultures of adenohypophyseal cells. Cells were either maintained with 10^{-9} M T_3 from seeding to collection (protocol B) or maintained with 10^{-9} M T_3 until transfection (protocol D). mRNA levels were measured 48 hours after the end of transfection. (A) Data are mean \pm SEM mRNA levels in % of mock-transfected cultures ($n = 4$). $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ compared with mock transfected; $+p < 0.05$; $++p < 0.01$ compared with PPII SCO 2. (B) Data are mean \pm SEM mRNA levels in % of mock-transfected cultures ($n = 4$). (C) Representative electrophoretic analysis of RT-PCR products from mock-transfected cells or cells treated with PPII ASO 2 or PPII SCO 2. For each treatment, two independent samples are shown. A similar dose-response curve was observed 24 hours after the end of transfection, except that the intensity of PPII ASO 2 effect was reduced (not shown).

rescence was determined by confocal microscopy with a Kr/Ar laser (BioRad MRC 600 microscope, Hercules, CA).

Rate of ODN uptake

PPII ASO 3 was 5'-end-labeled by incubating for 50 minutes at 37°C 10 pmol ODN and 20 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol) with 20 U T4 polynucleotide kinase (USB Corporation, Cleveland, OH) in 25 μl buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM MgCl_2 , 20 mM β -mercap-

toethanol). Labeled ODN was purified with a QIAquick kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. To determine the rate of $\gamma^{32}\text{P}$ -PPII ASO 3 uptake in adenohypophyseal cells, they were washed twice with DMEM, followed by the addition of transfection mixture containing 0.22 μCi $\gamma^{32}\text{P}$ -PPII ASO 3 (1 μM). Plates were maintained either on ice or at 37°C in a 5% CO_2 incubator. Reactions were stopped at times ranging from 10 to 40 minutes by placing cells on ice, removing the medium, and washing with ice-cold PBS and

then twice with ice-cold 0.2 M glycine, pH 4.5. Cell lysis was essentially as described (Prater and Miller, 2004). Radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Each time point value was determined in duplicate plates. Rates of uptake were calculated after subtracting values at 4°C.

Enzyme activity and mRNA levels

Membrane PPII activity was determined with a fluorogenic substrate in a coupled assay and membrane protein as described (Vargas et al., 1998). Total RNA was extracted as described previously (Chomczynsky and Sacchi, 1987) and quantified by UV photometry.

PPII, APA, and TRH-R1 mRNA levels were determined by semiquantitative RT-PCR using G3PDH as an internal control as described previously for PPII, with minor modifications. Briefly, 1 μ g RNA was incubated with 100 pmol oligo-dT₁₅ and 100 U M-MLV reverse transcriptase (RT) (GIBCO-BRL) for 2 hours at 37°C. cDNA (1/5 or 1/4) (for PPII and APA RNAs in adenohypophyseal or C6 glioma cells, respectively) or 1/10 of cDNA (for TRH-R1 and G3PDH RNAs) was submitted to PCR amplification using either 15 pmol PPII, 2.5 pmol G3PDH, 15 pmol APA primers, or 13 pmol TRH-R1 primers, and 2.5 U Taq DNA polymerase (Biotecnologías Universitarias, UNAM, DF, México). PPII primers (sense: 5'-CTGGATCGCATACAAAAG-3'; antisense, 5'-GGACACCCAAATAATTGCT-3') allowed the amplification of a 418-nt fragment corresponding to the 1644–2062 sequence of rat PPII cDNA (Schauder et al., 1994) (Fig 1A). The size of amplified fragments easily allows one to distinguish RNA amplification from DNA amplification, as the primers are localized in exons 6 and 10. APA primers (sense, 5'-GCCGATAGCAGGGGGTCATA-3'; antisense, 5'-GGTTGAACGGCTCCCTTGTG-3') led to the amplification of a 556-nt fragment corresponding to the 798–1354 sequence of rat APA cDNA (Trojanovskaya et al., 2000). TRH-R1 primers (sense, 5'-GAT CCG CCA CAG CCA GAC TCA CCA G-3'; antisense, 5'-ACC CAG AGA AGC AGG CAG CGT GAC A-3') led to the amplification of a 350-nt fragment corresponding to the 132–482 sequence of rat TRH-R1 cDNA (Zhao et al., 1992). A 983-nt fragment corresponding to nt 35–1018 of rat G3PDH cDNA (Tso et al., 1985) was amplified with sense (5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC-3') and antisense (5'-CATGTAGGCCATGAGGTC-CACCAC-3') primers as an internal standard. Samples were incubated in a thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany) for 23 (for G3PDH), 30 (for TRH-R1, PPII, and APA in adenohypophyseal cells), or 38 cycles (for PPII in C6 glioma cells) of 69 seconds at 95°C, 1 minute at 55°C, and 1 minute at 72°C with a 10-minute final extension at 72°C. One fifth of the PCR

products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel. Gels were stained with ethidium bromide, and PCR products were quantified by densitometry in a Fluor S MultiImager (BioRad Laboratories). Amplification of cDNAs was linear between 20 and 25 cycles (G3PDH), 25 and 35 cycles (PPII, TRH-R1, and APA in adenohypophyseal cells), and 30–40 cycles (PPII in C6 glioma cells). The amount of PCR products was proportional to the amount of input cDNA. PPII, TRH-R1, and APA RT-PCR products were normalized per amount of G3PDH product, as it was shown previously that G3PDH mRNA levels are unaffected by short-term treatments with thyroid hormones *in vivo* (Schomburg and Bauer, 1995). The protocol allows detection of quantitative changes in PPII mRNA levels similar to those obtained by Northern analysis (Vargas et al., 1998).

In a few experiments, a quantitative determination of PPII mRNA levels was also performed by Northern blotting essentially as described (Vargas et al., 1998) except that probe (nt 4100–5047) labeling was by random priming. In this case, RNA was extracted from cells plated in 35-mm dishes. Three major RNA bands were detected, as previously described (Schomburg and Bauer, 1995), and data from the three bands were pooled.

Data analysis

Each experiment was performed in duplicate or triplicate dishes and generally repeated at least once. In each experiment, the mean value for mock-transfected (or SCO-transfected where indicated) cells was taken as 100%. Experimental values were converted to percent of control mean. Data are presented as mean \pm SEM (n = number of independent determinations). Statistical significance was assessed using the Student's *t*-test. Differences were considered as significant at $p < 0.05$ and mentioned in the text only in this case.

RESULTS

Identification of efficient PPII ASOs

We found 35 regions with high mean ss score and 10 nt or more long over the 6000-nt length of PPII mRNA. From these, we selected 8 targets that spanned the translated region and the 3' UTR (Fig. 1A). ASOs were transfected in protocol D (10^{-9} M T₃ added at seeding but retired at transfection) (Fig. 1B) because this gave the best knockdown efficacy. Compared to mock-transfected controls, PPII ASOs had no effect on total RNA and G3PDH mRNA levels (per μ g total RNA) at each time point analyzed (data not shown). ASO effects were time dependent. PPII ASOs 1, 2, and 3 inhibited PPII mRNA levels by 42%, 37%, and 43% at 24 hours (time 0 is end of transfection) and by 65%, 59%, and 60% at 48 hours,

respectively. The other PPII ASOs were also effective, but their potency was lower: 31% and 32% reductions for PPII ASOs 4 and 5, respectively at 24 hours and 47%, 43%, 36%, 31%, 34% decreases at 48 hours for PPII ASOs 4, 5, 6, 7, and 8, respectively. APA mRNA levels were unchanged or slightly increased by PPII ASOs 2, 3, 6, 7, and 8. However, APA mRNA levels were reduced by PPII ASO 5 at 24 hours (13%) and by PPII ASOs 1, 4, and 5 at 48 hours (14%, 15%, and 32%, respectively) (Figs. 2 and 3).

PPII ASOs 1, 2, and 3 were very potent. To determine if their effect was sequence specific, we analyzed the impact of PPII SCOs 1, 2, and 3 on mRNA levels. Compared with mock-transfected controls, PPII SCOs 1, 2, and 3 had no effect on total RNA or G3PDH mRNA levels (per μg total RNA) at each time point analyzed; the same was observed when comparing PPII ASO with its respective SCO control. PPII SCOs 2 and 3 had no significant effect on PPII or APA mRNA levels at 24 or 48 hours. Furthermore, PPII mRNA levels were lower when cells were treated with PPII ASO 2 or 3 than with PPII SCO 2 or 3, and APA mRNA levels were not different between ASO and SCO treatments (at either 24 or 48 hours (Figs. 2 and 3). In contrast, PPII SCO 1 caused a profound inhibition of PPII mRNA levels ($67\% \pm 5.6\%$ at 48 hours, $n = 3$, $p < 0.01$); values were not different from those detected with PPII ASO 1. Therefore, PPII ASOs 2 and 3 have target-specific and sequence-specific effects. The nonsequence-specific effect of PPII ASO 1 may be due in part to its high GC content. Because the properties of PPII ASOs 2 and 3 were very similar, we selected arbitrarily PPII ASO 2 for further studies.

In protocol D, 24 or 48 hours after a mock transfection, PPII mRNA levels were barely detectable by Northern blot. Hence, it was not possible to confirm through a quantitative method that mRNA levels were decreased when cells were treated with PPII ASOs (data not shown). To determine if the depletion of PPII mRNA levels led to a decrease in PPII activity, cells cultured according to protocol D were treated with PPII ASO2 or SCO 2 for 24 or 48 hours before cell collection. Compared with mock-treated cells, PPII ASO 2 and SCO 2 had no effect on membrane protein levels; furthermore, levels were not statistically different between PPII ASO 2-treated and SCO 2-treated cells. Compared with mock-treated cells, PPII SCO 2 did not change PPII specific activity (data not shown). Compared with PPII SCO 2-treated cells, PPII ASO 2 decreased PPII-specific activity by 54% and 85% at 24 and 48 hours, respectively (Fig. 4). These data are consistent with the conclusion that PPII mRNA levels were reduced by PPII ASO 2.

Protocol of T_3 treatment determines PPII ASO efficacy in cultures of adenohypophyseal cells

T_3 increases PPII-specific activity, allowing its easy detection in primary cultures of adenohypophyseal cells

(Vargas et al., 2000; Bauer et al., 1990). We determined whether PPII mRNA levels are increased by T_3 in primary cultures of adenohypophyseal cells as described *in vivo* (Schomburg and Bauer, 1995). In untreated cells, PPII mRNA levels remained low up to 120 hours after seeding (Fig. 1C). The addition of T_3 at seeding induced a dose-dependent increase in PPII mRNA levels (not shown). The addition of 10^{-9} M T_3 at seeding enhanced PPII mRNA levels at each time point analyzed. Values increased until a plateau was reached at 72 hours, at which time PPII mRNA levels were increased by 500% (Fig. 1C).

Therefore, induction by T_3 is required to reproducibly detect PPII mRNA under our standard RT-PCR conditions and to determine antisense effects. Because the protocol of PPII induction may alter the efficacy of ASOs, additional protocols of T_3 administration (Fig. 1B) were selected to cover a range of PPII mRNA induction from minimal to half-maximal and to compare the efficacy of ASOs with or without T_3 present during transfection. These protocols were selected instead of choosing protocols in which the concentration of T_3 was the only variable because they permitted testing of a wider range of potential sources of variability. All PPII ASOs were tested with protocol B and some with protocols A and C.

In protocol B, ASOs were transfected at 24 hours in cultures maintained with 10^{-9} M T_3 from seeding to collection. Transfection efficiency was similar in protocols B ($70\% \pm 2\%$, $n = 4$) and D ($68\% \pm 5\%$, $n = 4$) and slightly better than in protocol A (see Materials and Methods). The rate of ODN uptake was not different in protocols B and D (27 vs. 28 fmol/min per 1.1×10^6 cells for protocols B and D, respectively). Furthermore, with fluorescence microscopy, we could not detect any difference in the subcellular distribution of the fluorescent ODN between different protocols. A confocal analysis of the intracellular distribution of a fluorescently labeled PPII ASO did not reveal any change between protocols B and D. In each case, fluorescence was intense in the nucleus and punctated in the cytoplasm (not shown). Compared with mock-transfected controls, PPII ASOs had no effect on total RNA and G3PDH mRNA levels (per μg total RNA) at each time point analyzed (data not shown). PPII ASOs 1, 2, and 3 diminished PPII mRNA levels in a time-dependent manner: 38% and 23% decreases at 24 hours (for PPII ASOs 1 and 2, respectively) and 45%, 31%, and 27% at 48 hours, respectively. PPII ASO 6 reduced (53%) PPII mRNA levels at 48 hours. Finally, PPII ASOs 4 and 7 had only a very small (9% and 5%, respectively) but significant effect at 48 hours on PPII mRNA levels. We did not detect any significant effect of PPII ASOs 5 and 8 on PPII mRNA levels. APA mRNA levels were not affected or slightly increased for most PPII ASOs (Figs. 2 and 5). Compared with mock-transfected controls, PPII SCOs 1 and 2 had no effect on total RNA or G3PDH mRNA levels (per μg total RNA) at each time point analyzed; the same was ob-

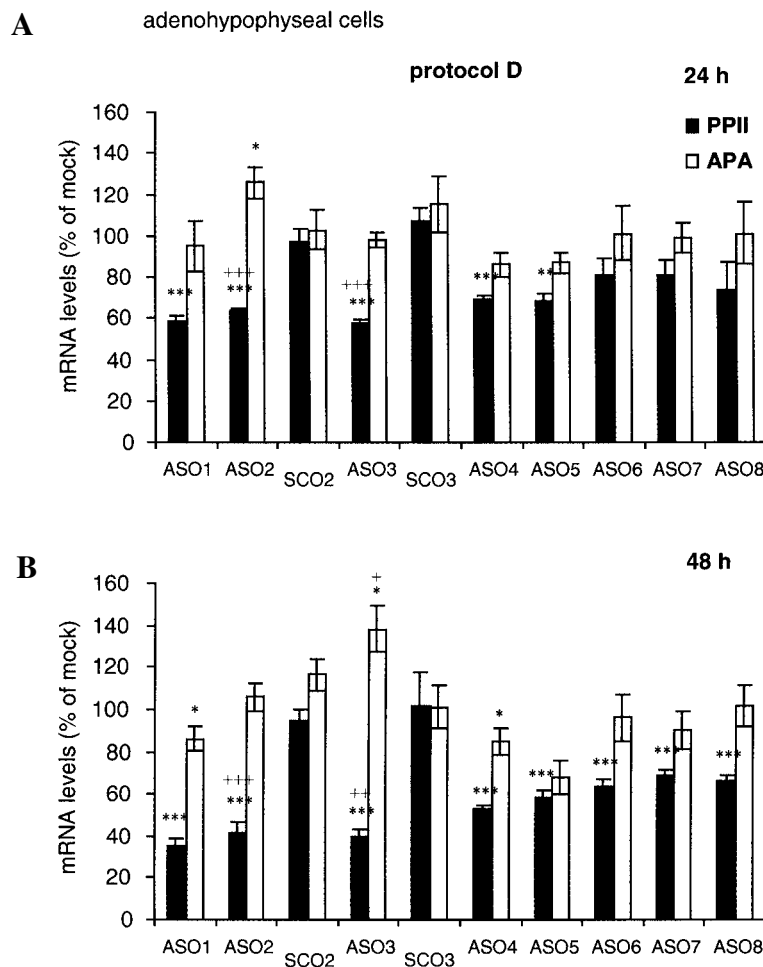


FIG. 3. Effect of PPII ASOs and SCOs on PPII and APA mRNA levels in primary cultures of adenohypophyseal cells maintained with 10^{-9} M T_3 until transfection (protocol D). At 24 hours, cells were transfected with FuGENE6 and each ODN in serum-free DMEM; 4 hours later, serum-supplemented DMEM was added. **(A)** Twenty-four hours after transfection end. **(B)** Forty-eight hours after transfection end. Data are mean \pm SEM mRNA levels in % of mock-transfected cultures ($n = 4$ except for PPII ASOs and SCOs 2 and 3; $n = 8$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with mock-transfected control. + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$ compared with PPII SCOs.

served when comparing PPII ASO with the respective SCO control. As in protocol D, we detected an inhibitory effect of PPII SCO 1 on PPII mRNA levels. PPII mRNA values were not different in PPII ASO 1-treated and SCO 1-treated cells (data not shown). In contrast, PPII SCO 2 did not change PPII mRNA levels, and we detected a significant difference between PPII ASO 2-treated and SCO 2-treated cells (Fig. 2).

These data demonstrate that, in general, PPII ASOs were less efficient in protocol B than in protocol D. These results were not due to a differential effect of protocols on the internal standard. Compared with protocol B at each time point analyzed, in protocol D total RNA was slightly increased (10%–15%) (data not shown), but we did not find any difference in G3PDH mRNA levels (per μ g total RNA). A significant difference in efficiency between protocols could be found at 48 hours for most

PPII ASOs except for PPII ASOs 5 and 6. The magnitude of difference in efficacy varied according to PPII ASO (1.4–6.2-fold); rank order of potency was partially conserved. In both protocols, PPII ASOs 2 and 3 were among the most efficient, and PPII ASOs 7 and 8 were the least efficient (Table 2). A head-to-head comparison of the effects of various doses of PPII ASO 2 on PPII mRNA levels with protocols B or D confirmed the difference in efficacy. Compared with PPII SCO 2-transfected cells, reduction of PPII mRNA levels was similar (25%–30%) using either 1 μ M PPII ASO 2 in protocol B or 0.3 μ M PPII ASO 2 in protocol D (Fig. 2). At 24 hours, differences in efficacy between protocols were detected only for PPII ASOs 3 and 4 (not shown).

To determine the relationship between ASO efficiency and target mRNA levels, a semiquantitative analysis of PPII mRNA levels in both protocols was made in control

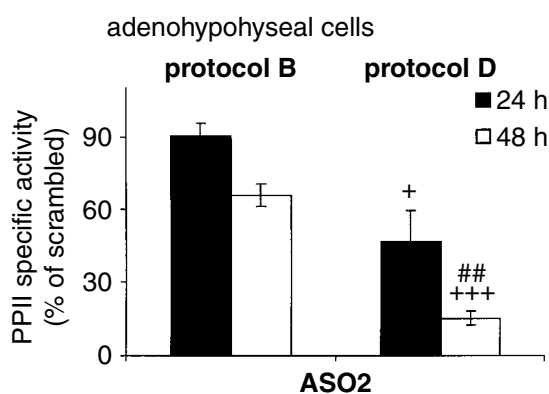


FIG. 4. Effect of PPII ASO 2 on PPII activity in primary cultures of adenohipophyseal cells (4.5×10^6 cells seeded in 35-mm dishes) and maintained with either 10^{-9} M T_3 from seeding to collection (protocol B) or 10^{-9} M T_3 until transfection (protocol D). At 24 hours, cells were transfected with FuGENE6 and each ODN in serum-free DMEM; 4 hours later, serum-supplemented DMEM was added. Data are mean \pm SEM PPII activity in % of SCO 2-transfected cultures ($n = 4$). $^+p < 0.05$; $^{+++}p < 0.001$ compared with PPII SCO 2; $^{##}p < 0.01$ compared with protocol B.

plates 24 hours after a mock transfection. PPII mRNA levels were slightly higher in protocol B (PPII/G3PDH ratio: 2 ± 0.1 , $n = 4$) than in protocol D (PPII/G3PDH ratio: 1.4 ± 0.1 , $n = 4$; $p < 0.05$). This difference was consistent with the tendency observed by Northern blotting. In this case, it was possible to confirm by Northern blotting that a reduction in PPII mRNA levels occurred in cells treated with PPII ASO 2, whereas PPII SCO 2 did not produce significant effects (data not shown).

Because of the lack of sensitivity of the Northern analysis, it was not possible to confirm with a quantitative method that reductions in PPII mRNAs were higher in protocol D than in B. Therefore, we compared the impact of both protocols on the knockdown of PPII activity. As in protocol D, comparing to mock-treated cells, PPII ASO 2 and SCO 2 had no effect on membrane protein levels in protocol B; the same occurred if ASO 2 treatment was compared with SCO 2 treatment (not shown). In protocol B, PPII specific activity was higher than in protocol D (at 24 hours posttransfection: B, 11 ± 0.6 ; D, 4.2 ± 0.7 ; at 48 hours: B, 15 ± 1 ; D, 6.3 ± 0.8 pmol β -naphthylamide/min/mg membrane protein; $n = 4$, $p < 0.001$ and $p < 0.01$ at 24 hours and 48 hours, respectively), consistent with the results obtained with PPII RNA levels. At 48 hours posttransfection, comparing with PPII SCO 2-transfected cells, we observed a more efficient downregulation of PPII specific activity by PPII ASO 2 with protocol D (85%) than with protocol B (34%) (Fig. 4). This was consistent with the effect observed at the mRNA level with semiquantitative RT-

PCR, except that the PPII ASO 2 effect was more intense at the protein level, possibly because of an additional effect on mRNA transport or translation. A small increase (10%–20%; data not shown) in membrane protein in protocol D at each time point contributed minimally to this enhancement.

A few experiments were also performed with protocol A (cultures maintained with 10^{-8} M T_3 from seeding to cell collection; transfection was at 96 hours) or C (cells were seeded without T_3 , and 10^{-9} M hormone was added at the moment of transfection and maintained until cell collection). The results obtained with these protocols were similar to those obtained with protocol B (not shown).

Protocol of T_3 treatment determines ASO efficacy for another target and in another cell type

Because a significant difference in efficiency of PPII ASOs was found generally between protocols D and B, additional experiments were performed to determine if this effect is target or cell specific.

We tested the impact of protocols B and D on TRH-R1 mRNA knockdown, a target that is negatively regulated by thyroid hormones (Gershengorn and Osman, 1996). In spite of the reported regulation, at 12 hours past a mock transfection, TRH-R1 mRNA levels were not different in protocols B and D (not shown) probably because TRH-R1 mRNA levels are less stringently regulated by T_3 than PPII mRNA levels (Schomburg and Bauer, 1995). Preliminary studies indicated that in a protocol in which cells were cultivated without T_3 , TRH-R1 ASO produced an efficient and time-dependent decrease in TRH-R1 mRNA levels, with a maximum inhibition at 12 hours and a reversal to control values at 24 hours (Aguilar Valles, 2002). Protocol impact on TRH-R1 mRNA knockdown was thus tested at 12 hours after the end of transfection. In both protocols B and D, compared with mock-transfected controls, TRH-R1 ASO and SCO had no effect on total RNA or G3PDH mRNA levels (per μ g total RNA) at each time point analyzed (not shown). TRH-R1 ASO had no significant effect on TRH-R1 mRNA levels in protocol B and a small effect in protocol D. In this protocol, TRH-R1 mRNA levels in TRH-R1 ASO-treated cells were different from those obtained from TRH-R1 SCO 1-treated cells in which the ODN had no effect; none of the TRH-R1 ODNs had an effect on APA or PPII mRNA levels (Table 3).

Next, we determined the impact of the two protocols on the efficacy of PPII ASO 2 in a cell line with lower levels of PPII mRNA. C6 glioma cells are immortalized glial cells that have been used as a model system to study astrocyte proliferation. PPII activity is undetectable in C6 glioma cells (Wilk et al., 1989). APA mRNA was undetectable, and PPII mRNA levels were apparently much

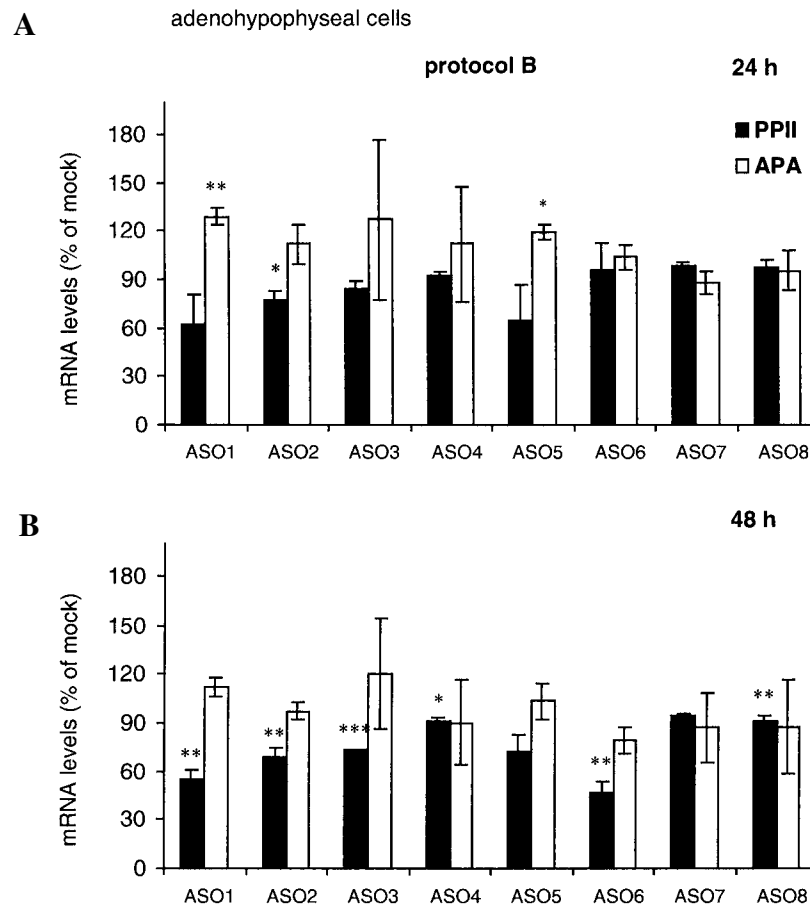


FIG. 5. Effect of PPII ASOs on PPII and APA mRNA levels in primary cultures of adenohypophyseal cells maintained with 10^{-9} M T_3 from seeding to collection (protocol B). At 24 hours, cells were transfected with FuGENE6 and each ASO in serum-free DMEM; 4 hours later, serum-supplemented DMEM was added. (A) Twenty-four hours after transfection end. (B) Forty-eight hours after transfection end. Data are mean \pm SEM mRNA levels in % of mock-transfected cultures ($n = 4$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with mock-transfected controls.

lower than in adenohypophysis, as we had to increase the number of PCR cycles to detect it (data not shown). Thyroid hormones have multiple effects in this cell type, including increased cell proliferation (Trentin et al., 2001). A previous study has shown that compared with other transfectants, transfection with FuGENE6 does not produce the highest transfection levels in C6 glioma cells (Wiesenhofer et al., 2000). However, to maintain the number of variables at a minimum, we decided to transfect these cells with FuGENE6. Total RNA levels and, contrary to what occurred in adenohypophyseal cells, PPII mRNA levels were not different between protocols B and D. The PPII ASO 2 effect was compared with that of PPII SCO 2. Total RNA and G3PDH mRNA levels were similar in cells treated with PPII ASO 2 and SCO 2 (data not shown). We found that PPII ASO 2 efficacy was again improved with protocol D. In protocol B, PPII ASO 2 decreased PPII mRNA levels by 36% at 24 hours

and by 46% at 36 hours; in protocol D, the decrease was 49% at 24 hours and 63% at 36 hours (Fig. 6).

DISCUSSION

With a procedure derived from the method of Patzel et al. (1999), we identified a pair of ASOs that knocked down efficiently and, specifically, PPII mRNA levels. This stemmed from the demonstration that PPII ASO effects were dose and time dependent and target specific and, in protocol D, sequence specific and approaching the theoretical maximum allowed by transfection efficiency.

A major inference was that variation in the protocol of T_3 administration had a substantial impact on ASO efficacy and that this effect was independent of (1) the specific target mRNA, (2) whether the target mRNA was

TABLE 2. EFFECT OF PROTOCOL ON PPII ASO IMPACT ON PPII mRNA LEVELS IN PRIMARY CULTURES OF ADENOHYPOPHYSEAL CELLS^a

PPII ASO	PPII mRNA levels (% of mock) ^b		Fold change in ASO efficacy ^c	Significance ^d
	Protocol B	Protocol D		
1	55 ± 5	35 ± 4	1.4	<i>p</i> < 0.05
2	69 ± 6	42 ± 5	1.9	<i>p</i> < 0.01
3	73 ± 1	40 ± 4	2.2	<i>p</i> < 0.01
4	91 ± 2	53 ± 2	5.2	<i>p</i> < 0.001
5	72 ± 11	58 ± 4	1.5	ns
6	47 ± 8	64 ± 3	0.7	ns
7	95 ± 1	69 ± 3	6.2	<i>p</i> < 0.01
8	91 ± 3	66 ± 3	3.7	<i>p</i> < 0.001

^aEffect of PPII ASOs on PPII mRNA levels in primary cultures of adenohipophyseal cells maintained with 10⁻⁹ M T₃ from seeding to collection (protocol B) or until transfection (protocol D). At 24 hours, 1.1 × 10⁶ cells were transfected with FuGENE6 and each ODN in serum-free DMEM; 4 hours later, serum-supplemented DMEM was added.

^bData (48 hours after transfection end) are mean ± SEM PPII RNA levels in % of mock-transfected cultures taken as 100% (*n* = 4 except for PPII ASOs 2 and 3 in protocol D: *n* = 8).

^cRatio of mean inhibitory effects on PPII RNA effects.

^dAnalysis of differences between protocols; ns, nonsignificant.

regulated positively or negatively by T₃, (3) the cell type, (4) the sequence of the ODN, and (5) a reduction in the number of phosphorothioate linkages. There was no evidence that decreasing specificity accompanied increases in efficacy, as with the best protocol (protocol D), the effects of PPII ASOs 2 and 3 were target and sequence specific. It is still possible, however, that impact of protocol is related to the presence of a few phosphorothioate linkages or to the specific delivery method used (liposomal delivery with FuGENE6).

Although conclusions were based mainly on a semi-quantitative RT-PCR analysis of mRNA levels, additional data confirmed that the variations in mRNA levels approximated real quantitative differences: (1) there was no difference in G3PDH mRNA levels between protocols or with ODN treatments, discarding the possibility that effects on the internal control contributed to the results; (2) whenever possible, we found that effects of T₃, and of PPII ASO in protocol B, were confirmed by Northern blotting, and (3) effects of PPII ASO 2 and variations in protocol on PPII mRNA levels were similar to those detected at the peptidase activity level.

A significant concern when using oligonucleotides is the possibility of nonspecific effects. Nonspecific effects may be due to antisense activity toward nontarget RNA, producing an irrelevant cleavage (Lebedeva and Stein, 2001). Our data did not allow us to exclude this, as only a few nontarget RNAs were tested. It should be noted, however, that RNA levels for APA, a structurally related peptidase, were unaffected by PPII ASOs. Various effects not related to RNA hybridization have also been at-

tributed to oligonucleotides, in particular to the phosphorothioate class, including nonspecific effects through protein binding (Lebedeva and Stein, 2001). This seems unlikely, as our data suggested that the effects were mainly due to RNA hybridization; in particular, they were sequence specific and detected at the RNA level. Another potential problem relates to the presence, in some of the oligonucleotides used of CpG dinucleotides that might activate immune system cells (Krieg, 2002). Only some of these CpG dinucleotides might correspond to CpG motifs, as many were not in a consensus context. Even multiple CpG dinucleotides or a consensus context do not necessarily lead to an immunostimulator (Wu et al., 2004).

The only study, to our knowledge, indirectly relating CpG DNA to adenohipophyseal function shows that CpG DNA injection *in vivo* does not alter serum corticosterone levels (up to 4 hours), suggesting that the function of one of the adenohipophyseal cell types (corticotropin secretion) is unaltered (Myers et al., 2001). Some immune system cells contaminated the cell culture, but they constituted a minor cell type (data not shown). Furthermore, we did not find a correlation between the presence of CpG dinucleotides and ODN efficacy; for example, PPII SCOs 2 and 3 each contained a CpG dinucleotide but, compared with the transfection control, did not show any significant effect on the parameters tested. Although PPII ASO 3 contained 2 CpG dinucleotides and PPII ASO 2 did not, both were similarly active compared with the transfection control, PPII RNA knockdown was more efficient in protocol D than in B, irrespective of the CpG

TABLE 3. EFFECT OF PROTOCOL ON TRH-R1 ODN IMPACT ON TRH-R1, PPII, AND APA mRNA LEVELS IN PRIMARY CULTURES OF ADENOHYPHYSAL CELLS^a

	mRNA levels (% of mock)					
	Protocol B			Protocol D		
	TRHR1	PPII	APA	TRHR1	PPII	APA
Mock	100 ± 5.6	100 ± 5.1	100 ± 5.1	100 ± 5.9	100 ± 0.5	100 ± 0.5
TRHR1 ASO	92 ± 4.4	107 ± 11.2	113 ± 11	75 ± 3.9* ⁺	102 ± 3.3	99 ± 3.3
TRHR1 SCO	99 ± 7.6	110 ± 5.1	108 ± 5.1	118 ± 6.8	105 ± 4.8	113 ± 4.8

^aCells were maintained with 10⁻⁹ M T₃ either from seeding to collection (protocol B) or from seeding until transfection (protocol D). At 24 hours, cells were transfected with FuGENE6 and each ODN in serum-free DMEM; 4 hours later, serum-supplemented DMEM was added. Data (12 hours after the end of transfection) are mean ± SEM mRNA levels in % of mock transfected cultures (n = 6).

*p < 0.05 compared with mock-transfected control; ⁺p < 0.05 compared with TRH-R1 SCO.

content of ASO sequences. Therefore, it is unlikely that immunostimulatory properties of the oligonucleotides used accounted for the data presented.

The only difference between the protocol that proved most effective (D) and protocol B was the absence or presence of T₃ during transfection and thereafter. In the other less effective protocols (A and C), T₃ was also present during transfection and further incubation. Therefore, maintaining physiologic concentrations of T₃ during transfection and thereafter significantly reduced efficacy.

The underlying cause for the change in efficacy is puzzling. A change in transfection efficiency is the mechanism for 17β-estradiol (10⁻⁸ M) enhancement of ASO action in MCF7-K2 cells (Taylor et al., 2001). In our study, transfection efficiency, oligonucleotide uptake rate, and subcellular distribution of a fluorescent ODN were changed minimally by variations in the protocol of T₃ administration, but we could not discard differences in effective ODN concentration at the RNA target site. For example, phosphorothioate ODNs bind tightly to cell proteins, lowering their ability to reach the mRNA targets (Brukner and Tremblay, 2000), and T₃ may regulate the expression of proteins with a high affinity for phosphorothioate ODNs. However, as the same response to protocol change was observed with an ASO (TRH-R1) in which the number of phosphorothioate bonds was strongly reduced, diminishing its binding to cellular proteins (Brukner and Tremblay, 2000), this interpretation was not likely.

A change in target cell type according to protocol does not appear probable, as PPII mRNA is expressed mainly in a small subset of lactotrophs (Cruz et al., 2004). Thyroid hormones are important for lactotroph proliferation *in vivo* (Stahl et al., 1999), but it is improbable that a change in cell proliferation had a significant impact on our data because total RNA or membrane protein levels were marginally distinct between protocols B and D.

A difference in efficacy could be found for various

PPII ASOs between protocols D and B. For PPII ASOs 2 and 3, there was a difference of 2-fold; PPII ASOs 7 and 8 had a very poor efficacy with protocol B but gave a significant antisense effect with protocol D. However, the rank order of potency was partially maintained. Thus, variation of efficacy according to protocol did not appear to be a sequence-specific phenomenon, and it was unlikely that a change in affinity between ODN and target explained the improved knockdown.

In adenohypophyseal cells, there was a negative correlation between PPII mRNA levels and PPII ASO efficacy. This negative correlation was not found for TRH-R1 mRNA knockdown, which is negatively regulated by

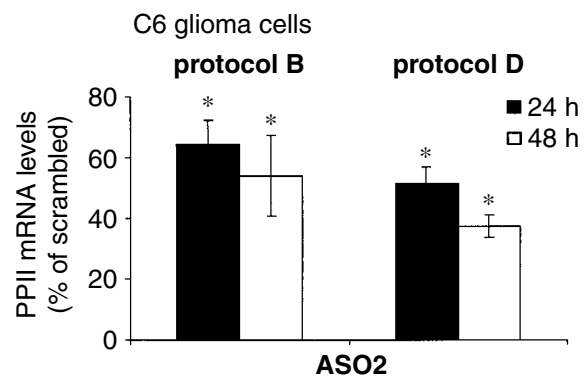


FIG. 6. Effect of PPII ASO 2 on PPII mRNA levels in rat C6 glioma cells either maintained with 10⁻⁹ M T₃ from seeding (time 0) to collection (protocol B) or maintained with 10⁻⁹ M T₃ until transfection (protocol D). At 24 hours, cells were transfected with FuGENE6 (only 4.5 μl to minimize cell loss) and PPII SCO 2 or ASO 2 in serum-free DMEM; 4 hours later, serum-supplemented DMEM was added. Data are mean ± SEM mRNA levels in % of PPII SCO 2-transfected cultures (n = 4). *p < 0.05 compared with SCO 2 transfected.

thyroid hormones (Gershengorn and Osman, 1996), or for PPII mRNA levels in C6 glioma cells. Furthermore, distinct protocols produced either small (PPII) or undetectable (TRH-R1) changes in target mRNA levels. Cells (C6 glioma) expressing much lower levels of PPII mRNA than in adenohypophysis were also susceptible to protocol impact on ASO efficacy. Therefore, the differences between protocols were not related to modifying target mRNA steady-state levels. This is consistent with data from Miraglia et al. (2000), who show no effect of changing transcription rate or mRNA levels on ASO efficacy, probably because most target RNAs have a low copy number per cell (as for PPII mRNA in adenohypophysis, which levels were low according to Northern blot results) and that, despite mRNA induction, ASOs are in large excess of target RNAs.

Because we did not detect a cell-specific, target-specific, or sequence-specific response, it was possible we uncovered a thyroid hormone specific effect involving a common mechanism in ASO action. As we used phosphorothioate ODNs and produced clear-cut effects on target mRNA levels, an RNase H-dependent mechanism was probably the major mechanism of action of the PPII ASOs. Two mammalian RNases H are cloned, RNase H1 and RNase H2, differing in their cofactor requirements (Wu et al., 1998; Cerritelli and Crouch, 1998; Frank et al., 1998). RNase H activity may be a limiting factor in ASO action. To our knowledge, there is no evidence that RNase H activity is regulated by thyroid hormones; it is, however, interesting to consider that T₃ can induce oxidative levels (Smith et al., 2000), promoting the conversion of cysteinyl residues to disulfides (Stadtman, 1990), and that the activity of human RNase H1 is regulated by a redox switch formed between adjacent cysteines, the enzyme being unable to cleave its substrate if oxidized (Lima et al., 2003). It is possible that RNase H1 has a minor role in antisense activity (Ten Asbroek et al., 2002), although there is little agreement in correlating RNase H with antisense activity (Mishra et al., 2001; Ten Asbroek et al., 2002). Alternatively, RNase H intracellular distribution may be important for ASO action (Ten Asbroek et al., 2002) and subject to regulation.

In conclusion, the selected PPII ASOs constitute important tools for studying the role of PPII in peptide information transfer. Furthermore, we demonstrated that the regimen of T₃ treatment changed the efficacy of ASO sequences independently of its impact on target mRNA steady-state levels. Manipulating thyroid hormone levels may help to improve ASO efficacy.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to F. Romero and M. Villa for technical support, to A. Linares, A. Valle, and R.

Ciria for their computational help, and to E. Mata and S. González for providing the animals used in this study. This work was supported in part by grants 31729 and 39931 from CONACYT.

REFERENCES

- AGUILAR VALLES, A. (2002). BSc. thesis, National University of México.
- BAUER, K. (1988). Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): Regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* **70**, 69–74.
- BAUER, K., CARMELIET, P., SCHULZ, M., BAES, M., and DENEFF, C. (1990). Regulation and cellular localization of the membrane bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* **127**, 1224–1233.
- BRUKNER, I., and TREMBLAY, G.A. (2000). Cellular proteins prevent antisense phosphorothioate oligonucleotide (SdT18) to target sense RNA (rA18): Development of a new *in vitro* assay. *Biochemistry* **39**, 11463–11466.
- CERRITELLI, S.M., and CROUCH, R.J. (1998). Cloning, expression and mapping of ribonucleases H of human and mouse related to bacterial RNase HI. *Genomics* **53**, 300–307.
- CHARLI, J.L., VARGAS, M.A., CISNEROS, M., DE GORTARI, P., BAEZA, M.A., JASSO, P., BOURDAIS, J., PÉREZ, P., URIBE R.M., and JOSEPH-BRAVO, P. (1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: Role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology* **6**, 45–57.
- CHOMCZYNSKY, P., and SACCHI, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159.
- CRUZ, R., JOSEPH-BRAVO, P., and CHARLI, J.L. (2004). Pyroglutamyl aminopeptidase II is expressed in a subpopulation of lactotrophs but not in thyrotrophs: Its knockdown increases TRH-induced prolactin but not thyrotropin secretion. Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, Louisiana.
- FRANK, P., BRAUNSHOFER-REITER, C., WINTERSBERGER, U., GRIMM, R., and BUSEN, W. (1998). Cloning of the cDNA encoding the large subunit of human RNase HI, a homologue of the prokaryotic RNase HII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12872–12877.
- GERSHENGORN, M.C., and OSMAN, R. (1996). Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol. Rev.* **76**, 175–191.
- GRIFMAN, M., and SOREQ, H. (1997). Differentiation intensifies the susceptibility of pheochromocytoma cells to antisense oligodeoxynucleotide-dependent suppression of acetylcholinesterase activity. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 351–359.
- HEMMRICH, K., SUSCHEK, C.V., LERZYNSKI, G., SCHNORR, O., and KOLB-BACHOFEN, V. (2003). Specific iNOS-targeted antisense knockdown in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C489–C498.

- HEUER, H., SCHÄFER, M.K., and BAUER, K. (1998). The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: The third element of the thyrotropin-releasing hormone-signaling system. *Thyroid* **8**, 915–920.
- KRIEG, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760.
- LEBEDEVA, I., and STEIN, C.A. (2001). Antisense oligonucleotides: Promise and reality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 403–419.
- LEWIS, J.G., LIN, K.-Y., KOTHAVALA, A., FLANAGAN, W.M., MATTEUCCI, M.D., DEPRINCE, R.B., MOOK, R.A., Jr., HENDREN, R.W., and WAGNER, R.W. (1996). A serum-resistant cytofectin for cellular delivery of antisense oligodeoxynucleotides and plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3176–3181.
- LIMA, W.F., WU, H., NICHOLS, J.G., MANALILI, S.M., DRADER, J.J., HOFSTADLER, S.A., and CROOKE, S.T. (2003). Human RNase H1 activity is regulated by a unique redox switch formed between adjacent cysteines. *J. Biol. Chem.* **278**, 14906–14912.
- MARTÍNEZ, V., WANG, L., and TACHÉ, Y. (2001). Central TRH receptor 1 antisense blocks cold-induced gastric emptying but not brain *c-fos* induction. *Peptides* **22**, 81–90.
- MATTEUCCI, M.D., and WAGNER, R.W. (1996). In pursuit of antisense. *Nature* **384**, 20–23.
- MIRAGLIA, L., WATT, A.T., GRAHAM, M.J., and CROOKE, S.T. (2000). Variations in mRNA content have no effect on the potency of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **10**, 453–461.
- MISHRA, M., PORTER-KELLEY, J.M., SINGH, P.K., BENNETT, J.R., and CHAUDHURI, G. (2001). Enhanced activity of antisense phosphorothioate oligos against *Leishmania* amastigotes: Augmented uptake of oligo, ribonuclease H activation, and efficient target intervention under altered growth conditions. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 569–580.
- MYERS, L.P., KRIEG, A.M., and PRUETT, S.B. (2001). Bacterial DNA does not increase serum corticosterone concentration or prevent increases induced by other stimuli. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 1605–1614.
- O'LEARY, R., and O'CONNOR, B. (1995). Thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurochem.* **65**, 953–963.
- PATZEL, V., STEIDL, U., KRONENWETT, R., HAAS, R., and SCZAKIEL, G. (1999). A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxiribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4328–4344.
- PONCE, G., CHARLI, J.L., PASTEN, J.A., ACEVES, C., and JOSEPH-BRAVO, P. (1988). Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* **48**, 211–213.
- PRATER, C.E., and MILLER, P.S. (2004). 3'-Methylphosphonate-modified oligo-2'-O-methylribonucleotides and their tat peptide conjugates: Uptake and stability in mouse fibroblasts in culture. *Bioconjugate Chem.* **15**, 498–507.
- SCHAUDER, B., SCHOMBURG, L., KOHRLE, J., and BAUER, K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9534–9538.
- SCHOMBURG, L., and BAUER, K. (1995). Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* **136**, 3480–3485.
- SMITH, J., LADI, E., MAYER-PRÖSCHEL, M., and NOBLE, M. (2000). Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10032–10037.
- STADTMAN, E.R. (1990). Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* **9**, 315–325.
- STAHL, J.H., KENDALL, S.K., BRINKMEIER, M.L., GRECO, T.L., WATKINS-CHOW, D.E., CAMPOS-BARROS, A., LLOYD, R.V., and CAMPER, S.A. (1999). Thyroid hormone is essential for pituitary somatotropes and lactotropes. *Endocrinology* **140**, 1884–1892.
- TAYLOR, A.H., PRINGLE, J.H., BELL, S.C., and AL-AZ-ZAWI, F. (2001). Specific inhibition of estrogen receptor alpha function by antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **11**, 219–231.
- TEN ASBROEK, A.L.M.A., VAN GROENIGEN, M., NOOIJ, M., and BAAS, F. (2002). The involvement of human ribonucleases H1 and H2 in the variation of response of the cells to antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur. J. Biochem.* **269**, 583–592.
- TRENTIN, A.G., ALVAREZ-SILVA, M., and MOURA NETO, V. (2001). Thyroid hormones induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **281**, E1088–E1094.
- TROYANOVSKAYA, M., JAYARAMAN, G., SONG, L., and HEALY, D.P. (2000). Aminopeptidase-A. I. CDNA cloning and expression and localization in rat tissues. *Am. J. Physiol.* **278**, R413–R424.
- TSO, J.H., SUN, X.H., KAO, T.H., REECE, K.S., and WU, R. (1985). Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: Genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* **13**, 2485–2502.
- VARGAS, M.A., BOURDAIS, J., SANCHEZ, S., URIOSTEGUI, B., MORENO, E., JOSEPH-BRAVO, P., and CHARLI, J.L. (1998). Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adeno-hypophyseal cells: Role of the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* **10**, 199–206.
- VARGAS, M.A., CISNEROS, M., JOSEPH-BRAVO, P., and CHARLI, J.L. (2000). Regulation of adeno-hypophyseal pyroglutamyl peptidase II activity by TRH and phorbol esters. Dependence on 3,3',5'-triiodothyronine and gender. *Endocrine* **13**, 267–272.
- WAGNER, R.W. (1994). Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* **372**, 333–335.
- WEISS, B., DAVIDKOVA, G., and ZHANG, S.-P. (1997). Antisense strategies in neurobiology. *Neurochem. Int.* **31**, 321–348.
- WIESENHOFER, B., WEIS, C., and HUMPEL, C. (2000). Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) is a proliferation factor for rat C6 glioma cells: Evidence from antisense experiments. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **10**, 311–321.
- WILK, S., SUEN, C.-H., and WILK, E.K. (1989). Occurrence of pyroglutamyl peptidase II, a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* **12**, 43–47.

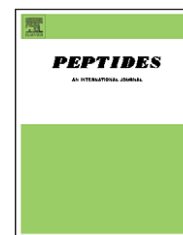
- WU, C.C.N., LEE, J., RAZ, E., CORR, M., and CARSON, D.A. (2004). Necessity of oligonucleotide aggregation for toll-like receptor 9 activation. *J. Biol. Chem.* **279**(32), 33071–33078.
- WU, H., LIMA, W.F., and CROOKE, S.T. (1998). Molecular cloning and expression of cDNA for human RNase H. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **8**, 53–61.
- YEN, P.M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* **81**, 1097–1142.
- ZELPHATI, O., UYECHI, L.S., BARRON, L.G., and SZOKA, F.C., Jr. (1998). Effect of serum components on the physicochemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1390**, 119–133.
- ZHAO, D., YANG, J., JONES, K.E., GERALD, C., SUZUKI, Y., HOGAN, P.G., CHIN, W.W., and TASHJIAN, A.H., Jr. (1992). Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. *Endocrinology* **130**, 3529–3536.

Address reprint requests to:

Dr. Jean-Louis Charli
Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma de México
A.P. 510-3
Cuernavaca, Mor. 62271
México

E-mail: charli@ibt.unam.mx

Received March 1, 2004; accepted in revised form
July 6, 2004.

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/peptides

Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release

Raymundo Cruz^a, Miguel Angel Vargas^a, Rosa Maria Uribe^a, Isel Pascual^b, Ivan Lazcano^a, Athanasios Yiotakis^c, Magdalini Matziari^c, Patricia Joseph-Bravo^a, Jean-Louis Charli^{a,*}

^aDepartamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico

^bFacultad de Biología, Universidad de la Habana, La Habana, Cuba

^cUniversity of Athens, Department of Chemistry, Laboratory of Organic Chemistry, Panepistimiopolis Zografou, Athens, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2008

Received in revised form

30 June 2008

Accepted 7 July 2008

Published on line 24 July 2008

Keywords:

Thyrotropin

Growth hormone

TRH

Anterior pituitary

Prolactin

Pyroglutamyl peptidase

ABSTRACT

Ecto-peptidases modulate the action of peptides in the extracellular space. The relationship between peptide receptor and ecto-peptidase localization, and the physiological role of peptidases is poorly understood. Current evidence suggests that pyroglutamyl peptidase II (PPII) inactivates neuronally released thyrotropin-releasing hormone (TRH). The impact of PPII localization in the anterior pituitary on the endocrine activities of TRH is unknown. We have studied whether PPII influences TRH signaling in anterior pituitary cells in primary culture. In situ hybridization (ISH) experiments showed that PPII mRNA was expressed only in 5–6% of cells. ISH for PPII mRNA combined with immunocytochemistry for prolactin, β -thyrotropin, or growth hormone, showed that 66% of PPII mRNA expressing cells are lactotrophs, 34% somatotrophs while none are thyrotrophs. PPII activity was reduced using a specific phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotide or inhibitors. Compared with mock or scrambled oligodeoxynucleotide-treated controls, knock-down of PPII expression by antisense targeting increased TRH-induced release of prolactin, but not of thyrotropin. Similar data were obtained with either a transition-state or a tight binding inhibitor. These results demonstrate that PPII expression in lactotrophs coincides with its ability to control prolactin release. It may play a specialized role in TRH signaling in the anterior pituitary. Anterior pituitary ecto-peptidases may fulfill unique functions associated with their restricted cell-specific expression.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Ecto-peptidases modify or limit the effects of peptides in the extracellular space. The physiological influence of some of these peptidases has been clearly demonstrated through the use of enzyme inhibitors or knock-out mice [41]. Peptide sensitivity to hydrolysis by an ecto-peptidase *in vitro* is not always coupled to *in vivo* susceptibility, since peptidases and their *in vitro* substrates do not co-localize consistently *in vivo*

[26]. The anterior pituitary has a complex cyto-architecture with no clear-cut anatomical boundaries between endocrine cells of distinct phenotypes. However, cells are not uniformly distributed but mixed in distributions peculiar to each cell type, with some partially segregated from each other as multiple clusters, each consisting almost exclusively of the same phenotype [27,31,34]. Information regarding the role of ecto-peptidases in anterior pituitary is very limited, or difficult to interpret, in spite of the critical role of various peptides

* Corresponding author. Tel.: +52 5556227633; fax: +52 5556227622.

E-mail address: charli@ibt.unam.mx (J.-L. Charli).

0196-9781/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.peptides.2008.07.011

[11,40]. Many ecto-peptidases are present in the gland with a limited distribution [11]. For example, within any one cluster of secretory cells in the pig anterior pituitary, only some cells are positive for neutral endopeptidase-24.11 while other clusters are wholly devoid of this enzyme [30]. The relevance of these peculiar distributions is unknown.

In mammals, thyrotropin-releasing hormone (TRH, pGlu-His-Pro-NH₂), secreted from parvocellular neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus, is transported within the hypothalamic-hypophyseal portal system and acts in the anterior pituitary through a specific receptor, TRH-R1. TRH modulates the pituitary–thyroid axis [58], regulates prolactin (PRL) release during lactation [59] and, under specific conditions, growth hormone (GH) secretion [22].

Various lines of evidence suggest that TRH is hydrolyzed *in vivo* at the pyroglutamyl-histidyl bond, by the ectoenzyme pyroglutamyl peptidase II (PPII, EC 3.4.19.6). PPII is a cell surface peptidase located on neuronal and anterior pituitary cells where it seems strategically localized to play a significant role in the extracellular inactivation of TRH [5,10]. PPII is a type II integral membrane protein containing a large extracellular region with a consensus sequence characteristic of the M1 family of gluzincins. The amino acid sequence of the rat PPII has significant homology with human aminopeptidase N (APN; EC 3.4.11.2; 34%) and mouse aminopeptidase A (APA; EC 3.4.11.7; 32%) [43]. In contrast to the majority of ecto-peptidases, PPII is a narrow specificity peptidase hydrolyzing substrates with the general structure pGlu-X-Y, X being a moderately bulky and uncharged residue and Y, either Pro, Ala, Trp, Pro-Gly, ProNH₂, Pro- β -naphthylamine, or Pro-7-amino-4-methyl coumarin [3,25,33,57]. Some structural determinants of this restricted specificity have been identified [14].

Once hypophysiotropic TRH is released, it may be hydrolyzed by PPII in the perivascular space of the median eminence, or by thyroliberinase, an isoform of PPII originating in the liver [44], in the portal vessels or by PPII in the anterior pituitary. In the anterior pituitary, the activity of PPII is lower than in the brain [53]. The separation of anterior pituitary cells by sedimentation at unit gravity shows that PPII activity is expressed in lactotrophs, and not in another cell type [5]. Anterior pituitary PPII activity is tightly regulated by estrogens and thyroid hormones [1,2,28,37], as well as by hypothalamic/paracrine factors [50,52,54]. It might control TRH-stimulated hormone release [12]. However, this hypothesis has not been tested experimentally.

To understand the specific role of PPII in the anterior pituitary, we performed an *in vitro* study as we cannot yet manipulate specifically anterior pituitary PPII without affecting median eminence PPII or portal vessel thyroliberinase *in vivo*. We used primary cultures of dispersed anterior pituitary cells, instead of tissue slices or aggregate cell cultures, due to the uncertain efficiency of the knock-down technique in these settings. We analyzed the cellular distribution of PPII mRNA and used PPII antisense oligodeoxynucleotides (ASO), or PPII inhibitors, to study the effect of selective reduction of the expression or activity of the enzyme on thyrotropin (TSH) or PRL release in response to TRH. We demonstrate that PPII mRNA is not expressed in most of anterior pituitary TRH target cells and that PPII controls TRH-induced PRL release.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Random cycle female Wistar rats weighing 250–300 g were housed on a 12 h light–12 h dark schedule with free access to food and water. Rats were killed by decapitation between 10:00 and 11:00 A.M. The guidelines for the use of animals in neuroscience research of the Society for Neuroscience (USA) were followed. Procedures were approved by the Bioethics Committee of our Institute.

2.2. Cell culture

Cultures of anterior pituitary cells were performed as previously described [50], with minor modifications. For *in situ* hybridization (ISH) and immunocytochemistry (ICC), we plated 5×10^5 viable cells in 21 mm \times 20 mm poly-L-lysine treated slides (Lab-Tek; Nalgen Nunc International, Rochester, NY, USA); for PPII knock-down or PPII inhibition, we plated 1.1×10^6 viable cells in 16-mm diameter culture dishes (Corning Inc., Corning, NY, USA). Cells were cultivated in 1 mL Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen Corp.), vitamins, antibiotics and an antimycotic (50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 125 ng/mL fungizone), 2 mM glutamine, and 14 mM glucose (DMEM-S). For ISH, ICC, and treatments with PPII inhibitors, DMEM-S was supplemented with 10 nM 3,3',5',-triiodo-L-thyronine (T₃) and medium changed every 48 h; cells were analyzed at DIV 5, a time point at which near maximal PPII activity and RNA levels are detected [17,51]. For PPII knock-down, DMEM-S was supplemented with 1 nM T₃ during the initial 24 h; T₃ was then removed and cells were treated with oligodeoxynucleotides (ODN) (see below), since optimum knock-down was obtained in these conditions [17]. Culture was maintained at 37 °C in a water-saturated atmosphere of 95% O₂ and 5% of CO₂.

2.3. PPII knock-down

PPII was knocked-down as previously described [17]. Briefly, after 24 h in culture, cells were washed twice with DMEM, and 500 μ L of the transfection mixture was added. The transfection mixture contained 1 μ M (a dose giving the maximal effect [17]) phosphorothioate modified PPII-antisense oligodeoxynucleotide 2 (PPII-ASO2) or PPII-scrambled oligodeoxynucleotide 2 (PPII-SCO2) (Epoch Biosciences, San Diego, CA, USA) mixed with 6 μ L FuGENE6 (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA) in DMEM (plus supplements except serum and antibiotics). Four hours later, 500 μ L of fresh DMEM-S (with 20% FBS and 2 \times penicillin, streptomycin, and fungizone) were added. Efficiency of transfection was 62% [17]. Mock controls were treated with FuGENE6. For RT-PCR analysis, cells were washed twice with PBS, collected 24 and 48 h after the end of transfection, and frozen at –80 °C. TRH treatment (0.3–10 nM) began 48 h after end of transfection. Culture medium was collected to measure TSH and PRL release by radioimmunoassay (RIA).

2.4. Purification of *Hermodice carunculata* peptidase inhibitor (HcPI)

HcPI was purified to homogeneity by high performance liquid chromatography as previously described [35]. The structure of HcPI is still unknown.

2.5. Synthesis of phosphinic-TRH

The detailed experimental procedure for the synthesis of the phosphinic inhibitor of PPII [3-(2-carbamoyl-pyrrolidin-1-yl)-2-(1*H*-imidazol-4-ylmethyl)-3-oxo-propyl]-(5-oxo-pyrrolidin-2-yl)-phosphinic acid (phosphinic-TRH) will be published elsewhere.

2.6. Treatment of cell cultures with PPII inhibitors

After 120 h in culture, cells were washed twice with DMEM, and 500 μ L of fresh DMEM containing either the inhibitor, TRH, or both substances were added. Culture medium was collected to measure TSH and PRL release by RIA.

2.7. PPII, APN and APA activity assays

PPII, APN and APA activities were determined essentially as described [19,51,55]. PPII activity was determined with 400 μ M TRH- β NA as substrate, in a coupled assay with an excess of dipeptidyl aminopeptidase IV (EC 3.4.14.5); assay buffer (50 mM NaPO₄ pH 7.5) included inhibitors of soluble enzymes able to degrade TRH *in vitro*: 0.2 mM *N*-ethyl maleimide, for pyroglutamyl peptidase I (PPI, EC 3.4.19.3) and 0.2 mM bacitracin, for prolyl endopeptidase (EC 3.4.21.26). APN and APA activities were assayed with 400 μ M Ala- β NA or 400 μ M Glu- β NA in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, respectively. All enzymatic assays were performed under initial velocity conditions, in duplicate or triplicate, and carried out at 37 °C. Released β NA was determined in a fluorometer (excitation 335 nm; emission 410 nm). Activities were normalized by total protein.

2.8. TSH and PRL RIA

Aliquots of cell culture medium were analyzed in duplicate by RIA using reagents provided by A.F. Parlow and the National Hormone and Pituitary Program (NIDDK, USA). Rat PRL (AFP-10505B) and rat TSH (AFP-11542B) were used for iodination, rabbit anti-rat PRL (AFP-131581570) and rabbit anti-rat TSH (AFP-329691R) as primary antisera and rat PRL (AFP-4459B) and rat TSH (AFP-5512B) as reference preparations.

2.9. Quantification of mRNAs by semi-quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted as described previously [16] and quantified by UV photometry. Specific mRNA levels were determined by semi-quantitative RT-PCR using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*G₃PDH*) as an internal control. One microgram RNA was incubated with 100 pmol oligo-dT 15 and 100 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen Corp.) for 2 h at 37 °C.

PPII, APA, and TRH-R1 mRNA levels were determined as described previously [17]. PRL and β -TSH mRNA levels were evaluated as follows. Briefly, 1/10 of the cDNA was amplified by PCR using either 2.5 pmol *G₃PDH* or 15 pmol PRL and β -TSH primers, and 2.5 U Taq DNA polymerase (Biogenica, DF, Mexico). PRL primers (sense, 5'-TCTGTTCTGGTGGCGACTGC-3'; antisense, 5'-CAGGGATGGGAGTTGTGACC-3') led to the amplification of a 455-nt fragment corresponding to the 278–732 sequence of rat PRL cDNA [45]. β -TSH primers (sense, 5'-TTCCGTGCTTTTCGCTCTTG-3'; antisense, 5'-TTGGTTTTGACAGCCTCGTG-3') led to the amplification of a 348-nt fragment corresponding to the 48–395 sequence of rat β -TSH cDNA [15]. A 983-nt fragment corresponding to nt 35–1018 of rat *G₃PDH* cDNA [49] was amplified with sense (5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTGGC-3') and antisense (5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3') primers as an internal standard. Samples were incubated in a thermocycler (Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) for 23 (*G₃PDH*), 30 (TRH-R1, PPII, and APA), 25 (β -TSH) and 13 (PRL) cycles of 69 s at 95 °C, 1 min at 55 °C, and 1 min at 72 °C with a 10-min final extension at 72 °C. PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel. Gels were stained with ethidium bromide, and PCR products were quantified by densitometry with a Fluor S MultiImager (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Amplification of cDNAs was linear between 20 and 25 cycles (*G₃PDH*), 25 and 35 cycles (PPII, APA and TRH-R1), 10 and 16 cycles (PRL), 20 and 30 cycles (β -TSH). RT-PCR products were normalized per amount of *G₃PDH* product. We have previously shown that in the conditions used for PPII amplification, RT-PCR data gave results consistent with Northern blot analysis [50].

2.10. ICC for PRL, β -TSH and GH

Pituitary cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. After washing, cells were permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 3 min. Non-specific protein binding was blocked by incubating cells 1 h at room temperature with 1% blocking reagent (Roche Diagnostics Corp.) containing 0.01% Triton X-100 in PBS. Cells were incubated for 12 h at 4 °C with the primary antibodies diluted in blocking solution (rabbit anti-rat-PRL [AFP-425_10_91] diluted 1:6000, rabbit anti-rat- β -TSH [AFP-1274789] and guinea pig anti-rat-GH diluted 1:1000; antibodies were provided by A. F. Parlow and the NIDDK). After washing with PBS, cells were incubated for 2 h with the appropriate biotinylated secondary antibodies (goat anti-rabbit IgG for PRL and β -TSH [Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA] and goat anti-guinea pig IgG for GH [Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA]) diluted 1:200 in blocking solution. Cells were then washed with PBS, incubated at room temperature for 1 h with an avidin–biotin–peroxidase complex (Vectastain ABC elite kit; Vector Laboratories), washed with PBS, and incubated in 0.05% 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride and 0.003% hydrogen peroxide in PBS. Cells were then rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, counterstained with Nissl stain, and mounted. Cells processed for ISH were not counterstained but treated for ISH as described below.

Positive PRL or GH staining was easily observed as a strong brown precipitate visible throughout the pituitary cell cytoplasm. Two populations of cells positive for β -TSH were detected; one with a strong brown precipitate throughout the

cytoplasm (not shown), corresponded to a small percentage of β -TSH positive cells; another one with a weak brown precipitate throughout the cytoplasm only visible with a color CCD camera (DXC-390P; Sony Corp., Tokyo, Japan) which accounted for the majority of β -TSH positive cells. If the primary antibodies were replaced with blocking solution, staining was abolished.

2.11. PPII ISH

The antisense and sense probes were synthesized from a 644-bp rat PPII cDNA [43] insert (bases 129–773) cloned into the pSPT19 vector [39]. *In vitro* transcription was performed with SP6 RNA polymerase (Roche Diagnostics Corp.) or with T7 RNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), using either [³⁵S]-UTP (1250 Ci/mmol; PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc., Waltham, MA, USA) or digoxigenin-labeled UTP (Roche Diagnostics). Specific activity of [³⁵S]-cRNA probes was approximately 1.5×10^9 cpm/ μ g.

ISH for PPII mRNA was done as described [18]. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min. After washing with PBS, cells were acetylated with acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine, rinsed with PBS, dehydrated with ethanol, and air dried. [³⁵S]-labeled RNA or digoxigenin-labeled probes were diluted in hybridization buffer. Hybridization was performed overnight in a humid chamber at 52 °C. The probe concentration was 1×10^6 cpm/slide (radioactive labeling) or 100 ng/slide (digoxigenin labeling). The slides for radioactive ISH were dehydrated in ethanol, air dried and coated with NTB emulsion (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). The slides were exposed for 2 months in a tightly sealed dark box at 4 °C, developed (D-19; Eastman Kodak Company), fixed (GBX; Eastman Kodak Company), stained with Nissl and cover-slipped. Slides for fluorescent ISH (digoxigenin-labeled) were incubated with PBS, blocked by incubating cells 1 h at room temperature with 1% blocking reagent (Roche Diagnostics Corp.) containing 0.01% Triton X-100 in PBS. Afterwards, cells were incubated for 12 h at 4 °C with a monoclonal anti-digoxigenin antibody (Roche Diagnostics Corp.) diluted 1:100 in blocking solution, washed with PBS, and incubated 2 h with the Alexa-594 conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen Corp.) at 5 μ g/mL in blocking solution. Finally, cells were rinsed in PBS and mounted.

For radioactive ISH, cells were considered PPII mRNA positive when 9 or more silver grains were clustered over the pituitary cell. For fluorescent ISH, cells were considered PPII mRNA positive when fluorescent signal was either around or over nuclei. In fluorescent ISH we did not find PPII mRNA signal throughout the cytoplasm. Negative ISH controls were sense strand probes of the same size and specific activity ([³⁵S]-labeled) or concentration (digoxigenin-labeled) as the antisense probes. Only a few silver grains scattered homogeneously over the slide were found with the radioactive sense control. No fluorescent signal was found in cells probed with the digoxigenin labeled sense probe.

2.12. ICC combined with ISH

The ISH procedure for PPII mRNA was initiated after ICC for PRL, β -TSH or GH. After visualization of the ICC by diaminobenzidine as described above, cells were post-fixed,

Table 1 – Percentage of cells that expressed PPII mRNA and hormones in primary cultures of anterior pituitary cells

Procedure	Percentage
ISH	
PPII mRNA	5.5 \pm 0.16
Combined ISH/ICC	
PPII mRNA/PRL	3.8 \pm 0.4
PPII mRNA/ β -TSH	0.0
PPII mRNA/GH	1.9 \pm 0.2

At 5 DIV, 5×10^5 cells were fixed and processed for radioactive ISH (PPII mRNA) combined with ICC for PRL, β -TSH or GH. PPII mRNA was detected with a cRNA probe labeled with ³⁵S-UTP, and hormones by the ABC method. In each experiment we counted the number of cells (3600 ± 450 cells per dish, taken as 100%), of PPII mRNA positive cells, and of hormone positive cells expressing PPII mRNA. Data are the mean \pm S.E.M. (three independent cultures; three dishes per culture).

dehydrated, and treated for radioactive or fluorescent ISH as described above.

2.13. Cell counting

For light microscopy, cells were viewed and counted with a color CCD camera mounted onto the 40 \times objective of a microscope (Axioscop, Carl Zeiss; Jena, Germany). Cells were counted and photographs taken with the software Marcator (Explora nova, v.1.88a). For fluorescence microscopy, a Zeiss Axioscop microscope was used with a rhodamine filter (540 nm emission and 625 nm excitation). Cells were counted and photographs taken with a camera (MC80; Carl Zeiss) mounted onto a 100 \times objective. The number of cells analyzed in each experiment is indicated in the legend of Table 1.

2.14. TRH radioimmunoassay

TRH RIA was performed as described using a specific antibody (R2) [24].

2.15. Statistical analyses

Except where indicated, each experiment was performed at least twice, with 2–4 dishes per experimental group. For ICC and ISH, total count of pituitary cells was taken as 100%. For antisense experiments, the mean value for mock-transfected or PPII-SCO2 cells was taken as 100%. Data are presented as mean \pm S.E.M. Statistical significance was assessed using the Student's *t*-test; differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. PPII mRNA is expressed in a small proportion of anterior pituitary cells in culture

PPII activity and mRNA levels are relatively low in anterior pituitaries of adult rats [21,23,28,53] but are markedly up

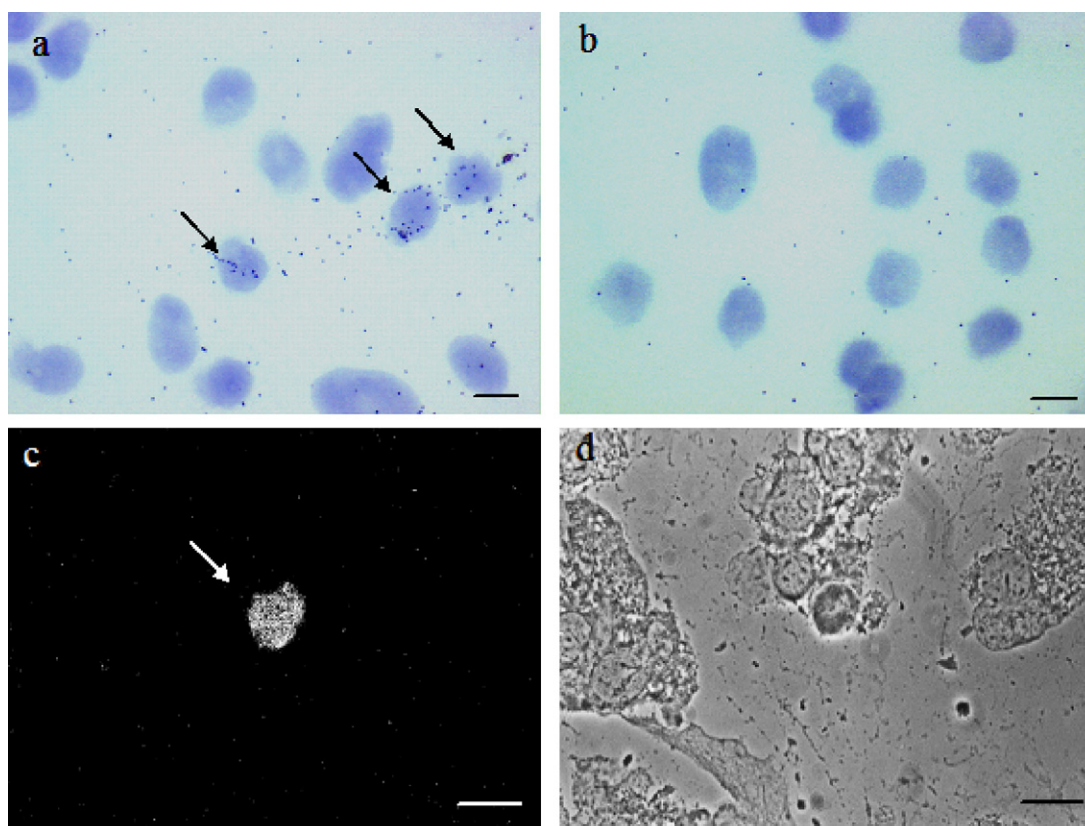


Fig. 1 – PII mRNA was detected in a small percentage of cells in primary cultures of anterior pituitary. PII mRNA was detected by ISH with an antisense cRNA probe labeled with ^{35}S -UTP (a) or UTP-digoxigenin followed by immunofluorescence (c). Negative controls for ISH were carried out with a sense cRNA labeled with ^{35}S -UTP (b). Panel (d) is the phase contrast image of (c). Cells in (a) and (b) were counterstained with Nissl. Photographs (a) and (b) were obtained with a 40 \times objective and a CCD camera and processed with the Marcator software; photographs (c) and (d) were taken with a 100 \times objective and a Carl Zeiss camera. The black arrows in (a) and the white arrow in (c) show PII mRNA positive cells. Scale bar: 10 μm .

regulated by T_3 [1,2,28,37]. If T_3 is not added, PII activity and mRNA levels are barely detectable in primary cultures [5,51], probably because thyroid hormone levels are very low in the culture medium. To identify the cells expressing PII mRNA, we carried out radioactive ISH studies on pituitary cells pre-treated for 120 h with 10 nM T_3 . This dose of T_3 increases by several fold PII activity [51] and mRNA levels [17]. [^{35}S]-ISH analysis revealed that only $5.2 \pm 0.27\%$ (three independent cultures) of the pituitary cells were PII mRNA-positive. We detected only a few silver grains in positive cells, in spite of the T_3 stimulus (Fig. 1a). Preliminary studies showed that enhancing probe concentration, or exposure time, intensified background but did not increase PII mRNA specific signal, or the number of PII mRNA positive cells (not shown). Despite its low intensity, the signal was specific since no signal was ever encountered with the sense riboprobe control (Fig. 1b). Similar results were obtained with a fluorescent ISH procedure, with $6 \pm 0.7\%$ (three independent cultures) of the anterior pituitary cells expressing PII mRNA (Fig. 1c and d). These data are consistent with the low levels of PII mRNA detected either *in vivo* or *in vitro*. In concordance with these results and the relatively low levels of activity expressed on the cell surface [52], we also observed that in cultures treated

with 10 nM T_3 , TRH (10 nM) was degraded very slowly (less than 10% at 12 h).

3.2. PII mRNA is expressed in sub-populations of lactotrophs and somatotrophs but not in thyrotrophs

An ICC analysis showed that $36 \pm 3\%$, $13.7 \pm 0.6\%$ and $34 \pm 1\%$ (three independent cultures) of the anterior pituitary cells were immunopositive for PRL, β -TSH and GH, respectively. To determine the type(s) of cells that expressed PII mRNA, we combined the [^{35}S]-ISH for PII mRNA with an ICC for either PRL, β -TSH, or GH. ICC did not interfere with PII mRNA detection by ISH since the percentage of PII mRNA positive cells was the same whether cells were counted on sections from ISH alone (see above) or from ISH combined with ICC: $5.7 \pm 0.42\%$, $5.2 \pm 0.20\%$ and $5.6 \pm 1.0\%$ for PII mRNA-PRL, PII mRNA- β -TSH and PII mRNA-GH, respectively (three independent cultures). Sixty-six percent of PII mRNA expressing cells were lactotrophs, 34% somatotrophs but none were thyrotrophs (Table 1 and Fig. 2a–c). These results were confirmed by ICC combined with fluorescent ISH: 65% (three independent cultures) of PII mRNA expressing cells were lactotrophs (Fig. 2d and e),

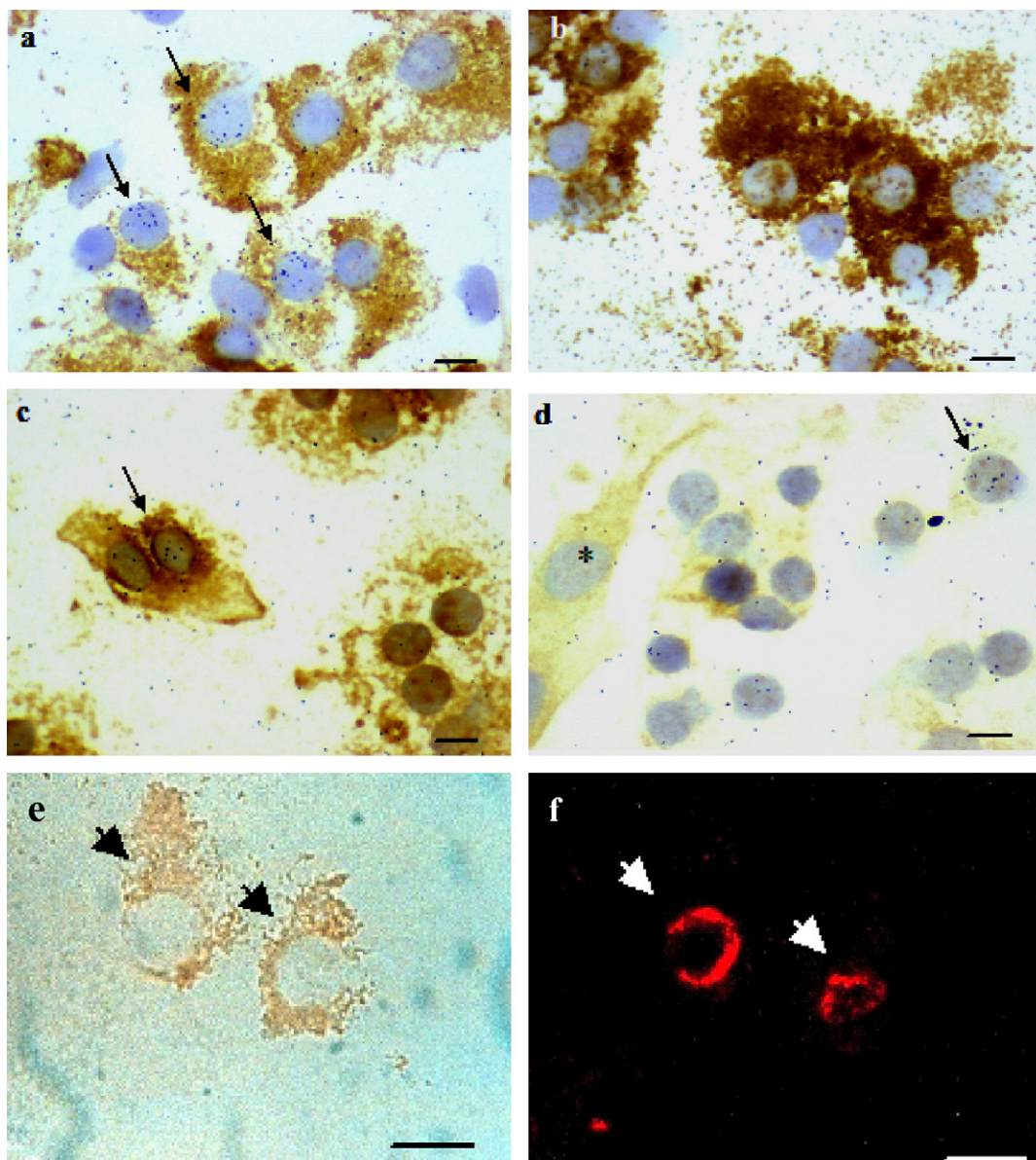


Fig. 2 – PPII mRNA was observed in lactotrophs and somatotrophs in primary cultures of anterior pituitary. Radioactive ISH (PPII mRNA) combined with ICC for PRL (a), GH (c) and β -TSH (d). PPII mRNA was detected with an antisense cRNA probe labeled with ^{35}S -UTP. Hormones were detected by the ABC method. Negative controls for ISH were carried out with a sense cRNA labeled with ^{35}S -UTP (b). Cells in (a–d) were counterstained with Nissl. Photographs were obtained with a CCD camera and the Marcator software under a $40\times$ objective. (e and f) Fluorescent ISH for PPII mRNA combined with ICC for PRL. PPII mRNA was detected with an antisense cRNA probe labeled with UTP-digoxigenin followed by immunofluorescence; (e) phase contrast image; (f) fluorescent image. Photographs were taken with a Carl Zeiss camera with a $100\times$ objective. Black arrows in (a) and (c) show PPII mRNA positive cells. The black arrow in (d) shows a PPII mRNA positive cell that is not a thyrotroph; an asterisk shows a thyrotroph in (d). Black arrowheads in (e) show lactotrophs that express PPII mRNA (white arrowheads in f). Scale bar: $10\ \mu\text{m}$.

while none were thyrotrophs (one culture; not shown); somatotrophs were not tested.

3.3. PPII knock-down with PPII-ASO2 enhances TRH-induced PRL but not TRH-induced TSH release

We recently designed, and tested in primary cultures of anterior pituitary cells, PPII antisense oligodeoxynucleotides;

PPII-ASO2 is efficient and specific for PPII mRNA since it does not change the mRNA levels of APA (one of the closest homologues of PPII) and, a scrambled sequence (PPII-SCO-2) has no significant effect on PPII mRNA levels or PPII activity; the decrease in PPII mRNA levels is accompanied by a similar decrease of PPII activity [17]. The specificity of PPII-ASO2 was further tested. As previously shown [17], PPII-ASO2 reduced PPII mRNA levels by 55% 48 h post-transfection (Fig. 3). ODN

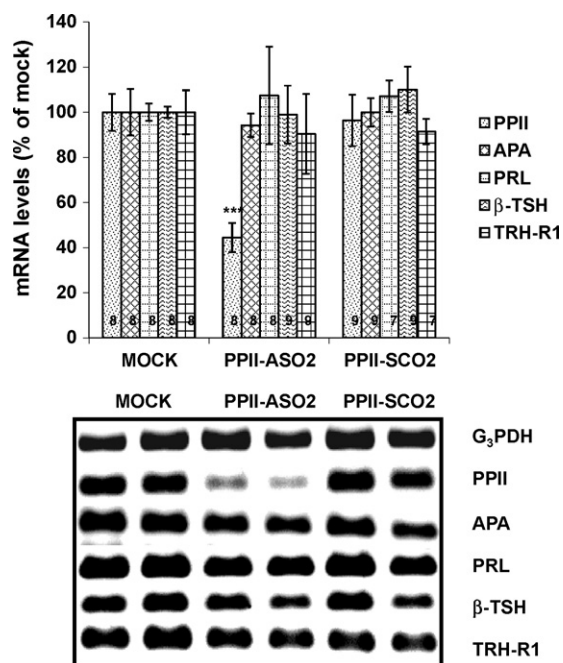


Fig. 3 – Effects of PPII-ASO2 and PPII-SCO2 on mRNA levels in primary cultures of anterior pituitary cells. mRNA levels were measured 48 h after end of transfection. Upper panel: data are mean \pm S.E.M. mRNA levels in % of data for mock-transfected cells. Lower panel: representative electrophoresis of RT-PCR products from mock-transfected cells or cells treated with PPII-ASO2 or PPII-SCO2. For each treatment, two independent samples are shown. *** $p \leq 0.0001$ compared to mock-treated cells. The number of independent determinations is shown inside each bar.

effects were sequence-specific since, compared to mock-transfected controls, PPII-SCO2 had no effect on PPII mRNA levels. ODN effects were target-specific as PPII-ASO2 or PPII-SCO2 did not change APA, TRH-R1, PRL and β -TSH mRNA levels at 24 h (not shown) or 48 h (Fig. 3). Compared to PPII-SCO2 treated cells, PPII-ASO2 decreased PPII specific activity by 54% and 85% at 24 and 48 h, respectively [17]. The following experiments were performed on cells treated 48 h after end of transfection.

The effect of PPII knock-down on the endocrine activities of TRH at anterior pituitary target sites was tested on PRL and TSH release. TRH can also increase GH release [22] but we did not analyze it because we do not know whether PPII activity is detected in somatotrophs (see Section 4.1). Compared to mock-transfected controls, PPII-ASO2 or PPII-SCO2 had no significant effect on PRL and TSH basal release at 1, 3, 6 or 12 h post-PPII knock-down, except for a stimulatory effect of PPII-SCO2 on TSH release at 3 h (Fig. 4). Compared with mock or PPII-SCO2 controls, down regulation of PPII expression by antisense targeting with PPII-ASO2 did not change TRH (10 nM)-induced PRL release at 30 min (not shown) but increased it by 68% at 1 h, 35% at 6 h and 58% at 12 h (Fig. 5 upper panel). TRH-induced TSH release was not modified by antisense treatment at any time point (Fig. 5 lower panel).

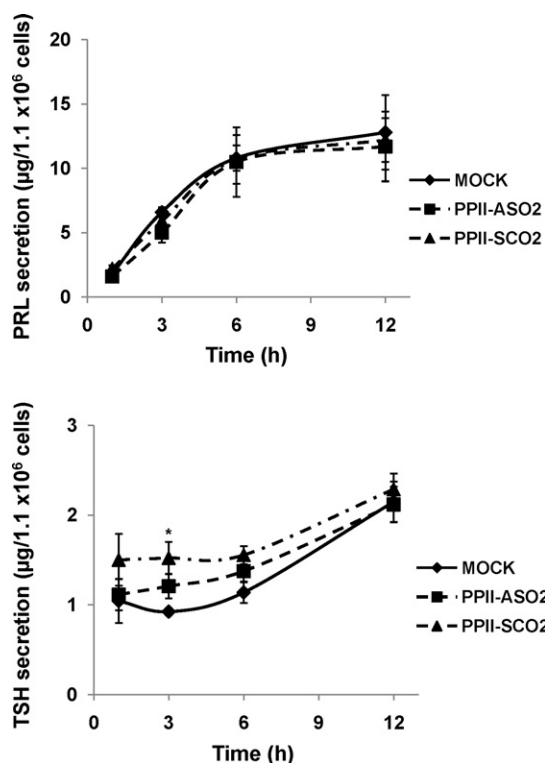


Fig. 4 – Effects of PPII-ASO2 and PPII-SCO2 on PRL and TSH basal release in primary cultures of anterior pituitary cells. At 1 DIV cells were treated with an ODN; at 48 h post-transfection cells were washed and medium changed. PRL (upper panel) and TSH (lower panel) release was quantified by RIA. Data are mean \pm S.E.M., $n = 9$. * $p \leq 0.05$ with respect to mock-treated cells.

To analyze more extensively the effect of ODN on TRH-induced hormone release, we carried out experiments at various doses of TRH. Somatotrophs or gonadotrophs, can synthesize and release TRH in primary cultures of anterior pituitary cells [8,9,36]. In our conditions, we detected low levels of TRH in the incubation medium (<0.1 nM), likely to have a very small effect on TRH receptors. Compared to mock or PPII-SCO2 treatments, PPII knock-down did not increase TRH-induced PRL release at a low dose (0.3 nM) of TRH, neither at 1 h (not shown) nor at 3 h (Fig. 6 upper panel). At 3 nM TRH, compared to mock and PPII-SCO2 treatments, PPII knock-down did not change TRH-induced PRL release at the 1 h time point (not shown) but increased it by 51% at 3 h (Fig. 6 upper panel). At 10 nM TRH, PRL release was increased by 52% at 1 h ($p \leq 0.05$, $n = 6$; not shown) or by 50% at 3 h (Fig. 6 upper panel). TRH-induced TSH release was not affected by PPII knock-down at any concentration of TRH at either 1 h (not shown) or 3 h (Fig. 6 lower panel).

3.4. Inhibition of PPII activity enhances TRH-induced PRL but not TRH-induced TSH release

We repeated experiments with PPII inhibitors to discard an artifact of the antisense technique. HcPI is a very specific inhibitor of rat brain membrane-bound PPII, with a relatively

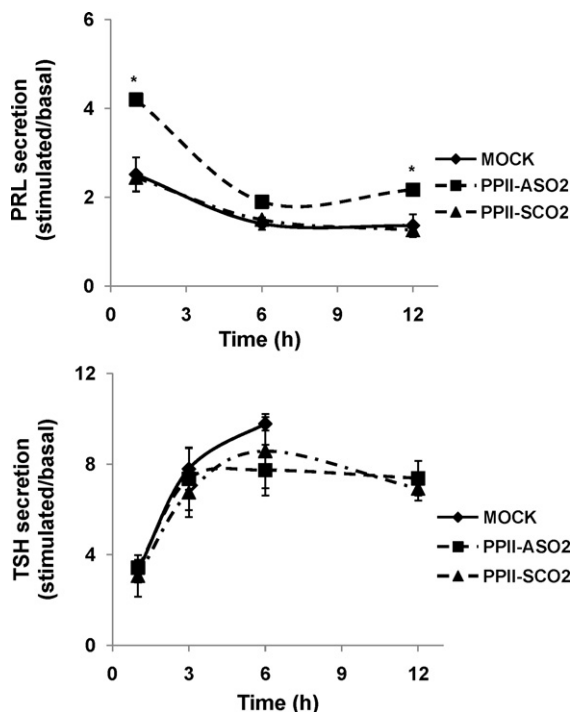


Fig. 5 – PPII knock-down by antisense targeting selectively enhanced TRH-induced PRL release in primary cultures of anterior pituitary cells. Cells were treated with oligonucleotides at 1 DIV; at 48 h post-transfection TRH (10 nM) was added. PRL (upper panel) and TSH (lower panel) release were detected by RIA. Data are mean ratio of TRH-induced PRL or TSH release over basal release \pm S.E.M., $n = 9$. * $p \leq 0.05$ with respect to mock-treated cells.

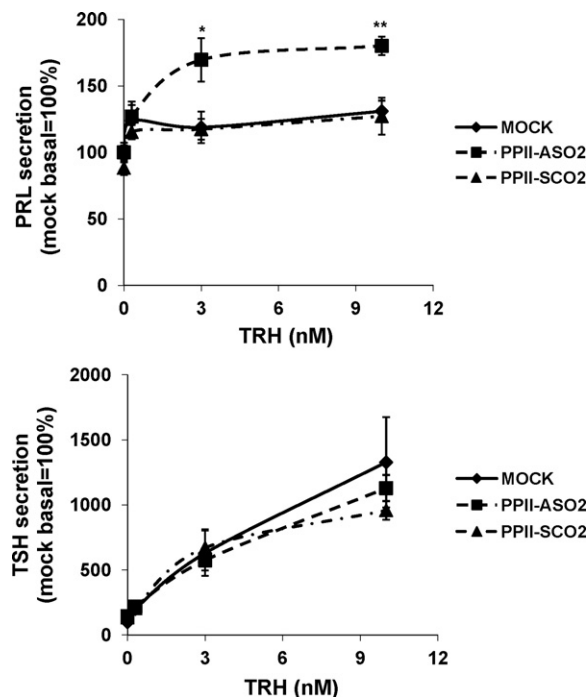


Fig. 6 – Concentration-dependent changes in TRH-induced PRL and TSH release in primary cultures of anterior pituitary cells; effect of PPII knock-down by antisense targeting. Cells were treated with oligonucleotides at 1 DIV; at 48 h post-transfection TRH was added. PRL (upper panel) and TSH (lower panel) release were detected by RIA. Data are mean \pm S.E.M. of TRH-induced hormone release at 3 h in % of data for basal release of mock-transfected cells, $n = 9$ for PRL and 6 for TSH; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$ with respect to mock-treated cells.

Table 2 – Inhibition of PPII activity with PPII inhibitors enhanced TRH-induced PRL release in primary cultures of anterior pituitary cells

Treatment	PRL	TSH
Control	100 \pm 7 (10)	100 \pm 3 (8)
TRH	388 \pm 92 (10) ^{a,**}	352 \pm 104 (7) ^{a,*}
HcPI	108 \pm 22 (10)	140 \pm 23 (7)
TRH + HcPI	851 \pm 136 (10) ^{b,**}	502 \pm 95 (8)
Control	100 \pm 5 (12)	100 \pm 9.7 (4)
TRH	153 \pm 18 (12) ^{a,**}	485 \pm 204 (6)
Phosphinic-TRH	100 \pm 10 (12)	192 \pm 48 (3)
TRH + phosphinic-TRH	217 \pm 22 (12) ^{b,*}	673 \pm 185 (6)

At 5 DIV, 1.1×10^6 pituitary cells were treated with phosphinic-TRH (10 μ M) or HcPI (50 μ g/mL) and TRH (10 nM) for 30 min. PRL and TSH release was determined by RIA. Results from 2 to 4 independent experiments, each in duplicate or triplicate, were calculated in percentage of control values taken as 100% and pooled. Data are mean \pm S.E.M.; number of independent determinations in parenthesis.

^a Compared to control.

^b Compared to TRH group.

* $p \leq 0.05$.

** $p \leq 0.01$.

low K_i (51 nM). Doses which strongly inhibit rat brain membrane-bound PPII activity have no effect on the activity of many classes of enzymes; in particular, on the activity of *Manduca sexta* APN activity, a M1 family member [35]. Further studies confirmed its specificity against mammalian (porcine kidney cortex) M1 family members: at 2 mg/mL, a concentration 300-fold higher than the concentration which inhibits rat brain membrane-bound PPII activity by 50%, it did not change APA or aminopeptidase B activities and inhibited APN activity by 20% (not shown). The effect of 45 min incubation of HcPI on PPII activity in primary cultures of anterior pituitary was dose dependent with an ED 50 of 8.3 μ g/mL. Incubation of 8 μ g/mL HcPI with primary cultures of anterior pituitary rapidly decreased PPII activity: a 42% drop was observed at 5 min of incubation; the activity remained similarly inhibited at 15, 30 or 60 min (not shown). Addition of 50 μ g/mL HcPI did not change basal release of TSH or PRL, or TRH (10 nM)-induced TSH release. In contrast, it increased TRH-induced PRL release at 30 min (Table 2).

Phosphinic-TRH inhibited rat brain membrane-bound PPII activity with an ED 50 value of 500 nM. Up to 10 μ M (a dose which inhibited rat brain membrane-bound PPII activity by 80%), it had no effect on rat brain APN, prolyl endopeptidase, pyroglutamyl peptidase I or dipeptidyl aminopeptidase IV

Table 3 – Actinonin did not change TRH-induced PRL or TSH release in primary cultures of anterior pituitary cells

Treatment	1 h		3 h	
	PRL ($\mu\text{g}/1.1 \times 10^6$ cells)	TSH ($\text{ng}/1.1 \times 10^6$ cells)	PRL ($\mu\text{g}/1.1 \times 10^6$ cells)	TSH ($\text{ng}/1.1 \times 10^6$ cells)
Control	1.59 \pm 0.038	0.68 \pm 0.15	6.48 \pm 0.045	1.11 \pm 0.12
TRH	2.97 \pm 0.047*	4.02 \pm 0.43**	8.72 \pm 0.052*	8.26 \pm 1.28**
TRH + actinonin	2.35 \pm 0.038*	3.27 \pm 0.38**	9.06 \pm 0.091*	9.15 \pm 0.85**

At 3 DIV, 1.1×10^6 pituitary cells were treated with actinonin (50 μM) and TRH (10 nM). PRL and TSH release was determined by RIA. Data are mean \pm S.E.M., $n = 6$.

* $p \leq 0.05$.

** $p \leq 0.001$ with respect to control group.

activities (not shown). Inhibition of PPII activity in anterior pituitary cultures with 10 μM phosphinic-TRH did not change basal TSH or PRL release, or TSH release in response to 10 nM TRH, but, as with HcPI, enhanced TRH-induced release of PRL at 30 min (Table 2).

To confirm the specificity of the results, we tested the effect of actinonin, an APN inhibitor [47], on TSH and PRL release. A preliminary study showed that 50 μM actinonin inhibited rat brain membrane-bound APN activity by 70% but did not modify rat brain membrane-bound APA or PPII activities (not shown). APN inhibition with 50 μM actinonin did not affect TRH-induced PRL and TSH release at 1 and 3 h (Table 3).

4. Discussion

The anterior pituitary gland is one of the most anatomically complex endocrine glands in vertebrates and serves critical homeostatic functions by regulating key organs in response to signals from brain and periphery. Some of these signals are peptides, and the role of ecto-peptidases in this organ is poorly understood. In the present study, we show that in cultured anterior pituitary cells, PPII mRNA is expressed in small subpopulations of lactotrophs and somatotrophs but not in thyrotrophs. The localization of PPII correlates with its ability to regulate PRL release in response to TRH.

4.1. PPII mRNA is expressed in a few lactotrophs and somatotrophs

In many cell types of the anterior pituitary TRH increases $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [56], but the presence of the TRH receptor has been unequivocally demonstrated only in lactotrophs, thyrotrophs and somatotrophs [39,60]. TRH-R1 levels are high in this tissue in contrast with the low activity of PPII in the anterior pituitary (compared to that in brain [53]). If anterior pituitary cells are separated by sedimentation at unit gravity, PPII activity is localized in lactotrophs but not in thyrotrophs or somatotrophs [5]. Since antibodies against PPII, useful for ICC, are not yet available, we analyzed PPII mRNA expression in anterior pituitary cells by ISH. Our data are consistent with the previous study but uncover additional information, i.e. most of the anterior pituitary cells expressing PPII mRNA are lactotrophs, some somatotrophs, but none thyrotrophs. Taking into account the previous data, we conclude that those lactotrophs that express PPII mRNA have PPII activity;

however, it remains to be determined whether the somatotrophs that express PPII mRNA have PPII activity. We have recently demonstrated that a splicing variant of PPII mRNA encodes a putative truncated PPII, which is inactive; this splicing variant is detectable in primary cultures of anterior pituitary [13]. Since the probe used for ISH does not discriminates the isoforms, some of the cells expressing PPII mRNA, including somatotrophs, may lack PPII activity. Furthermore, a dual cell population expressing both PRL and GH markers (mammo-somatotrophs) exists in the anterior pituitary of virgin female rats [38] and may constitute a significant proportion in our experimental conditions. Therefore, either monohormonal mammotrophs and somatotrophs express PPII mRNA, or some of the cells which express PPII mRNA are mammo-somatotrophs, in which case it is possible that an additional cell type expresses PPII mRNA. Our data demonstrate an ample mismatch between PPII mRNA expression and TRH responding cells, as no thyrotrophs and only few lactotrophs (10% of lactotrophs) and somatotrophs (6% of somatotrophs) express PPII mRNA. Hence, most TRH responsive cells do not express PPII mRNA, and most likely have no PPII activity. Previous studies have demonstrated phenotypic and functional variations in lactotroph and somatotroph properties [6,8,29,46,56]. This study extends the variation to the uneven expression of PPII mRNA.

4.2. PPII controls TRH effect on lactotrophs in anterior pituitary cells in culture

To monitor whether the particular localization of PPII in anterior pituitary cells has an impact on the physiological effects of TRH, we knocked-down PPII expression by treating cells with an antisense oligodeoxynucleotide or reduced PPII activity with inhibitors. The specificity of the knock-down was previously demonstrated [17] and confirmed in this new study. Inhibition of PPII activity, as a consequence of knocking-down its mRNA with PPII-ASO2, increased TRH-induced PRL but not TSH release. Knocking-down PPII mRNA expression had an effect only with the higher doses of TRH, i.e. at or just above the K_D of TRH for its receptors. At low doses of TRH, the catalytic activity of PPII is probably too low to have any impact on TRH concentration. Studies with two specific PPII inhibitors were consistent with the data obtained with the antisense oligodeoxynucleotide; however, the effects on TRH-induced PRL release were seen at earlier incubation times with the inhibitors than with the ASO. This is likely due to the fact that

antisense oligodeoxynucleotides and inhibitors were applied in distinct cell culture conditions (T_3 concentrations and initiation of treatments) leading to distinct basal PPII activity and TRH-R1 levels at the time of TRH addition. Nevertheless, since various independent strategies generated similar data, we conclude that PPII activity controls TRH effect on lactotrophs in anterior pituitary cells in culture. Our failure to detect an effect on TSH release may indicate that in cell cultures of anterior pituitary PPII does not control TSH release in response to TRH, or alternatively that the experimental conditions did not allow us to observe this effect. For example, we observed a small tendency towards an increased release of TSH in response to TRH if PPII activity was reduced by 60–80% with PPII inhibitors; a stronger inhibition of PPII activity may have produced a significant result. Alternatively, a different milieu may change the data, since many anterior pituitary responses depend on it [36]; however, it is unlikely that T_3 concentrations are critical since we observed similar data with cells briefly treated with a low dose of T_3 (experiments with ODNs) or constantly with a higher dose (experiments with inhibitors).

The increase in TRH-induced PRL release was small, independently of the agent utilized to decrease PPII activity, in agreement with the low activity of PPII in the pituitary cells in culture. Because TRH concentration in the large volume of the culture medium cannot be lowered significantly by PPII activity during the time span of the studies (less than 10% degradation of TRH in 12 h, unpublished), we hypothesize that TRH-R1 responds to a ligand that is not in equilibrium with its concentration in the bulk phase, i.e. that on the cell surface TRH is in a compartment separated from the bulk phase by a diffusion barrier. This situation may be ascribed to the existence of specific topographic affinities, which cluster pituitary cell types in non-random ways in primary culture, reducing the probability of having TSH and PRL cells organized together [32]. Thus, only inside the clusters expressing PPII activity would TRH-induced release be sensitive to modulation of peptidase activity. Alternatively, local gradients of TRH on the surface of cells that express PPII activity may be sufficiently stable to regulate TRH effects, in spite of undetectable changes in its concentration in the bulk phase. These gradients may be generated by the electrostatic interaction of positively charged TRH with membrane phospholipids. This second interpretation would probably require that PPII is close to TRH-R1.

The importance of the peptidase microenvironment has been previously suggested in other organs. For example, in coronary arteries, specific inhibitors of angiotensin converting enzyme increase bradykinin effects without changes in the levels of peptide in the bulk phase [48]. However, specific inhibitors of neutral endopeptidase, an enzyme present in the same tissue and able to hydrolyze bradykinin, have no effects. This phenomenon was explained on the basis of the colocalization of angiotensin converting enzyme and bradykinin receptor 2, with neutral endopeptidase appearing not to be present in the microenvironment of bradykinin receptor 2.

4.3. Role of anterior pituitary PPII *in vivo*

The small proportion of cells expressing PPII mRNA is consistent with *in vivo* data that show that PPII mRNA is

expressed in a few cells dispersed within the anterior pituitary (unpublished) and that PPII activity is low in this tissue [17]. Furthermore, since pituitary cells *in vitro* can partially reconstruct the *in vivo* topographic affinities among hormone-secreting cells [32], the results herein obtained may reflect the *in vivo* situation. There is no evidence for a preferential association of thyrotrophs with lactotrophs *in vivo*. Our data thus suggest that anterior pituitary PPII does not degrade TRH in the whole gland but in specific compartments that contain cells expressing PPII activity (i.e. some lactotrophs and maybe somatotrophs) where it influences TRH-induced release of PRL and maybe, GH. It was initially proposed, based on the stimulatory effects of thyroid hormones on anterior pituitary PPII activity [1,37], that anterior pituitary PPII activity controls TSH release. We cannot confirm this claim and it should be noted that the intraperitoneal injection of an inhibitor of PPII activity has no effect on serum TSH levels [42]; therefore, whether anterior pituitary PPII controls TSH secretion is still an open question.

4.4. Impact of regulation of anterior pituitary PPII activity on TRH effects *in vivo*

An additional conclusion is that the many events of regulation of anterior pituitary PPII activity due to hormonal, hypothalamic, or paracrine influences [1,28,37,50,52,54] must occur preferentially in lactotrophs and impact the capacity of TRH to regulate PRL release. These regulatory events have a variable intensity and direction; however, our data demonstrate that even a small reduction of anterior pituitary PPII activity, similar to some of the natural variations of PPII activity, is sufficient to change the release rate of PRL in response to TRH. The specific regulation by hormones and hypothalamic factors and the particular localization of pituitary PPII suggest the enzyme is a control element in some lactotrophs, determining the availability of TRH in the vicinity of TRH-R1; for example, an increase of TRH degradation by PPII in some lactotrophs, a few minutes after the initiation of the PRL burst [7], may contribute to make PRL release transient during suckling.

Since hormones that regulate PRL synthesis and release (T_3 , estrogen and glucocorticoids) are not produced by PRL-responsive organs, PRL synthesis and release is not regulated via a classical feedback loop comparable to the feedback system that regulate TSH synthesis and release [20]. The regulated activity of PPII may be part of a mechanism balancing PRL release at the anterior pituitary gland level [4]. The activity of the enzyme should determine the intensity and duration of peptide action in a manner specific to cell type and physiological context. This additional step of control may be necessary in view of the dynamic requirements of the hypothalamic-anterior pituitary complex to maintain homeostasis.

5. Conclusions

Anterior pituitary PPII activity controls TRH signaling in a sub-population of lactotrophs since PPII activity is markedly regulated by various of the effectors that regulate PRL release, it is localized on some lactotrophs and the reduction of its

activity enhances TRH-induced PRL release. As we could not observe a similar situation for TSH release, we suggest that the anterior pituitary role of PPII is cell-type specific. We propose that the specific localization and level of expression of peptidases in the anterior pituitary critically control peptide actions in this gland.

Acknowledgments

The authors thank the technical help of M. Cisneros, as well as the animal care by S. Gonzalez. This work was supported by grants 39931 from CONACYT to J.L.C., 24975 from CONACYT to M.A.V., IN226406-3 from DGAPA-UNAM to J.L.C., 3276/2 from International Foundation for Sciences and the Wood Wheland Program (IUBMB) to I.P.

REFERENCES

- [1] Bauer K. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 1987;330:375-7.
- [2] Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 1988;70:69-74.
- [3] Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem* 1994;224:387-96.
- [4] Bauer K. Inactivation of thyrotropin-releasing hormone by the hormonally regulated TRH-degrading ectoenzyme. *TEM* 1995;6:101-5.
- [5] Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Deneff C. Regulation and cellular localization of the membrane bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 1990;127:1224-33.
- [6] Bookfor FR, Hoeffler JP, Frawley LS. Analysis by plaque assay of GH and prolactin release from individual cells in culture of male pituitaries: evidence for functional heterogeneity within rat mammothrope and somatotrope. *Neuroendocrinology* 1986;42:64-70.
- [7] Bourdais J, Romero F, Uriostegui B, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL. Me-TRH combined with dopamine withdrawal rapidly and transiently increases pyroglutamyl aminopeptidase II activity in primary cultures of adenohypophyseal cells. *Neuropeptides* 2000;34:83-8.
- [8] Bruhn TO, Rondeel JM, Bolduc TG, Jackson IM. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene expression in the anterior pituitary. I. Presence of pro-TRH messenger ribonucleic acid and pro-TRH-derived peptide in a subpopulation of somatotrophs. *Endocrinology* 1994;134:815-20.
- [9] Bruhn TO, Bolduc TG, Rondeel JM, Jackson IM. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. II. Stimulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 1994;134:821-5.
- [10] Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P. The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 1988;13: 237-42.
- [11] Charli JL, Pascual I, Cruz R, Vargas MA. Post-secretory inactivation of peptides in the hypothalamic-adenohypophyseal axis: focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin releasing hormone inactivating ectoenzyme. In: Joseph-Bravo P, editor. *Molecular Endocrinology*. Kerala: Research Signpost, Transworld Research Network; 2006. p. 39-64.
- [12] Charli JL, Vargas MA, Cisneros M, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P, et al. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology* 1998;6:45-57.
- [13] Chavez-Gutiérrez L, Bourdais J, Aranda G, Vargas MA, Matta-Camacho E, Ducancel F, et al. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant negative activity. *J Neurochem* 2005;92:807-17.
- [14] Chávez-Gutiérrez L, Matta-Camacho E, Osuna J, Horjales E, Joseph-Bravo P, Maigret B, et al. Homology modelling and site directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *J Biol Chem* 2006;281:18581-90.
- [15] Chin WW, Muccini Jr JA, Shin L. Evidence for a single rat thyrotropin-beta-subunit gene: thyroidectomy increases its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;16:1152-8.
- [16] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
- [17] Cruz R, Chavez-Gutierrez L, Joseph-Bravo P, Charli JL. 3,3',5'-Triiodo-L-thyronine reduces efficiency of mRNA knockdown by antisense oligodeoxynucleotides: a study with pyroglutamyl aminopeptidase II in adenohypophysis. *Oligonucleotides* 2004;14:176-90.
- [18] De Gortari P, Uribe RM, García-Vázquez A, Aguilar-Valles A, Martínez A, Valdés A, et al. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem Int* 2006;48: 31-42.
- [19] De Gortari P, Vargas MA, Martinez A, García-Vázquez AI, Uribe RM, Chávez-Gutiérrez L, et al. Stage-specific modulation of neprilysin and aminopeptidase N in the limbic system during kindling progression. *J Mol Neurosci* 2007;33:252-61.
- [20] Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80:1523-631.
- [21] Friedman TC, Wilk S. Delineation of a particulate thyrotropin-releasing-hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J Neurochem* 1986;46:1231-9.
- [22] Harvey S. Thyrotrophin-releasing hormone: a growth hormone-releasing factor. *J Endocrinol* 1990;125: 345-58.
- [23] Heuer H, Ehrchen J, Bauer K, Schäfer MKH. Region-specific expression of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur J Neurosci* 1998;10:1465-78.
- [24] Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, Kordon C. Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1979;104:801-6.
- [25] Kelly JA, Slator GR, Tipton KF, Williams CH, Bauer K. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *J Biol Chem* 2000;275:16746-51.
- [26] Konkoy CS, Davis TP. Regional metabolism of Met-enkephalin and cholecystokinin in intact rat brain slices: characterization of specific peptidases. *J Neurochem* 1995;65:2773-82.
- [27] Kum S, Eren U, Sandikci M, Musal B. A histochemical investigation of different distribution of TSH cells in

- adenohypophysis of female and male rats. *Anat Histol Embryol* 2006;35:408-11.
- [28] Lin J, Wilk S. Quantitation and regulation of pyroglutamyl peptidase II messenger RNA in rat tissues and GH3 cells. *Neuroendocrinology* 1996;67:197-208.
- [29] Lledo PM, Guerineau N, Mollard P, Vincent JD, Israel JM. Physiological characterization of two functional states in subpopulations of prolactin cells from lactating rats. *J Physiol* 1991;437:477-94.
- [30] Matsas R, Kenny AJ, Turner AJ. An immunohistochemical study of endopeptidase-24.11 ("enkephalinase") in the pig nervous system. *Neuroscience* 1986;18:991-1012.
- [31] Nakane PK. Classifications of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J Histochem Cytochem* 1970;18:9-20.
- [32] Noda T, Kikuchi M, Kaidzu S, Yashiro T. Rat anterior pituitary cells in vitro can partly reconstruct in vivo topographic affinities. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;272:548-55.
- [33] O'Connor B, O'Cuinn G. Purification of and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from Guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 1985;150:47-52.
- [34] Pals K, Vankelecom H, Denef C. Triiodothyronine expands the lactotroph and maintains the lactosomatotroph population, whereas thyrotrophin-releasing hormone augments thyrotroph abundance in aggregate cell cultures of postnatal rat pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 2006;18:203-16.
- [35] Pascual I, Gil-Parrado S, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Diaz J, Possani LD, et al. Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*. In vivo effects in rodent brain. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:138-52.
- [36] Peters A, Heuer H, Schomburg L, De Greef WJ, Visser TJ, Bauer K. Thyrotropin-releasing hormone gene expression by anterior pituitary cells in long-term cultures is influenced by the culture conditions and cell-to-cell interactions. *Endocrinology* 1997;138:2807-12.
- [37] Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988;48:211-3.
- [38] Porter TE, Hill JB, Wiles CD, Frawley LS. Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactin-secreting cells? Suggestive evidence from virgin, gestating, and lactating rats. *Endocrinology* 1990;127:2789-94.
- [39] Radian S, Coculescu M, Morris JF. Somatotroph to thyrotroph cell transdifferentiation during experimental hypothyroidism—a light and electron-microscopy study. *J Cell Mol Med* 2003;7:297-306.
- [40] Ritchie JC, Davis TP, Nemeroff CB. Action of three ectopeptidases on corticotropin-releasing factor: metabolism and functional aspects. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:22-33.
- [41] Roques BP. Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *TPS* 2000;21:475-83.
- [42] Scalabrino GA, Hogan N, O'boyle KM, Slator GR, Gregg DJ, Fitchett CM, et al. Discovery of a dual action first-in-class peptide that mimics and enhances CNS-mediated actions of thyrotropin-releasing hormone. *Neuropharmacology* 2007;52:1472-81.
- [43] Schauder B, Schomburg L, Kohrle J, Bauer K. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:9534-8.
- [44] Schmitmeier S, Thole H, Bader A, Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur J Biochem* 2002;269:1278-86.
- [45] Shaw-Bruha CM, Pennington KL, Shull JD. Identification in the rat prolactin gene of sequences homologous to the distal promoter of the human prolactin gene. *Biochim Biophys Acta* 1998;1442:304-13.
- [46] Snyder G, Hymer WC, Snyder J. Functional heterogeneity in somatotrophs isolated from the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 1977;101:788-99.
- [47] Tieku S, Hooper NM. Inhibition of aminopeptidases N, A and W. A re-evaluation of the actions of bestatin and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Biochem Pharmacol* 1992;44:1725-30.
- [48] Tom B, Dendorfer A, de Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH. Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br J Pharmacol* 2002;137:276-84.
- [49] Tso JH, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 1985;13:2485-502.
- [50] Vargas MA, Bourdais J, Sanchez S, Uriostegui B, Moreno E, Joseph-Bravo P, et al. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *J Neuroendocrinol* 1998;10:199-206.
- [51] Vargas MA, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL. Regulation of adenohypophyseal pyroglutamyl aminopeptidase II activity by thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters. *Endocrine* 2000;13:267-72.
- [52] Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology* 1994;60:323-30.
- [53] Vargas MA, Mendez M, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL. Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neurosci Lett* 1987;79:311-4.
- [54] Vargas MA, Uribe RM, Cisneros M, Romero F, González S, Joseph-Bravo P, et al. TRH regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in male rat adenohypophysis. *Eur J Endocrinol* 2002;147:363-9.
- [55] Vazeux G, Wilk S, Wilk E, Corvol P, Llorens-Cortès C. Production and properties of a recombinant soluble form of aminopeptidase A. *Eur J Biochem* 1998;254:671-8.
- [56] Villalobos C, Nunez L, Frawley LS, Garcia-Sancho J, Sanchez A. Multi-responsiveness of single anterior pituitary cells to hypothalamic-releasing hormones: a cellular basis for paradoxical secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14132-7.
- [57] Wilk S, Wilk E. Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem Int* 1989;15:81-9.
- [58] Yamada M, Satoh T, Mori M. Mice lacking the thyrotropin-releasing hormone gene: what do they tell us? *Thyroid* 2003;3:1111-21.
- [59] Yamada M, Shibusawa N, Ishii S, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, et al. Prolactin secretion in mice with thyrotropin-releasing hormone deficiency. *Endocrinology* 2006;147:2591-6.
- [60] Yu R, Ashworth R, Hinkle PM. Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotrophs and thyrotrophs. *Thyroid* 1998;8:887-94.