

~~03061~~  
03062  
20/19.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA

RELEVANCIA FISIOLOGICA DE UNA PGA MEMBRANAL QUE DEGRADA  
AL TRH EN EL SNC DE LA RATA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
PRESENTA EL BIOLOGO

MIGUEL ANGEL VARGAS SUAREZ

1988-

UACP y P del CCH, UNAM.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO**

**PRESIDENTE:** Dr. Jean-Louis Charli Casalonga.

**VOCAL:** Dr. Lourival Possani Postay.

**SECRETARIO:** Dr. Alfonso González Noriega.

**SUPLENTE:** Dr. George Dreyfus.

**SUPLENTE:** Dr. Paul Lizardi López.

# INDICE.

	Página.
Introducción .....	1
Características del TRH .....	7
Antecedentes .....	15
Objetivos .....	23
Materiales y Métodos .....	24
Resultados .....	29
Discusión y Conclusión .....	53
Bibliografía .....	64

## INTRODUCCION

Un organismo superior posee sistemas para coordinar entre sí la actividad celular de las diferentes partes de su cuerpo, y comunicarse con el medio ambiente que lo rodea. Estos sistemas modifican su actividad en respuesta a cambios internos o externos.

El sistema inmune posee dos mecanismos para responder a infecciones: la inmunidad humoral es debida a la secreción de anticuerpos por los linfocitos B circulantes en el sistema circulatorio mientras la inmunidad celular es mediada por los linfocitos T.

En el sistema endócrino, las células glandulares elaboran mensajeros químicos, llamados hormonas, que liberan a la sangre donde son transportados hasta sus órganos blanco.

En el sistema nervioso, las neuronas liberan sustancias llamadas neurotransmisores. El mensaje químico debe atravesar el espacio sináptico entre la neurona que lo lleva, neurona presináptica, y la célula blanco.

En los dos últimos casos, cambios en las propiedades de la membrana plasmática de la célula nerviosa o endócrina provocan la liberación del mensajero; a continuación alcanza la célula blanco donde actúa sobre sus receptores específicos, localizados sobre la membrana plasmática o adentro de la célula, alterando la actividad celular.

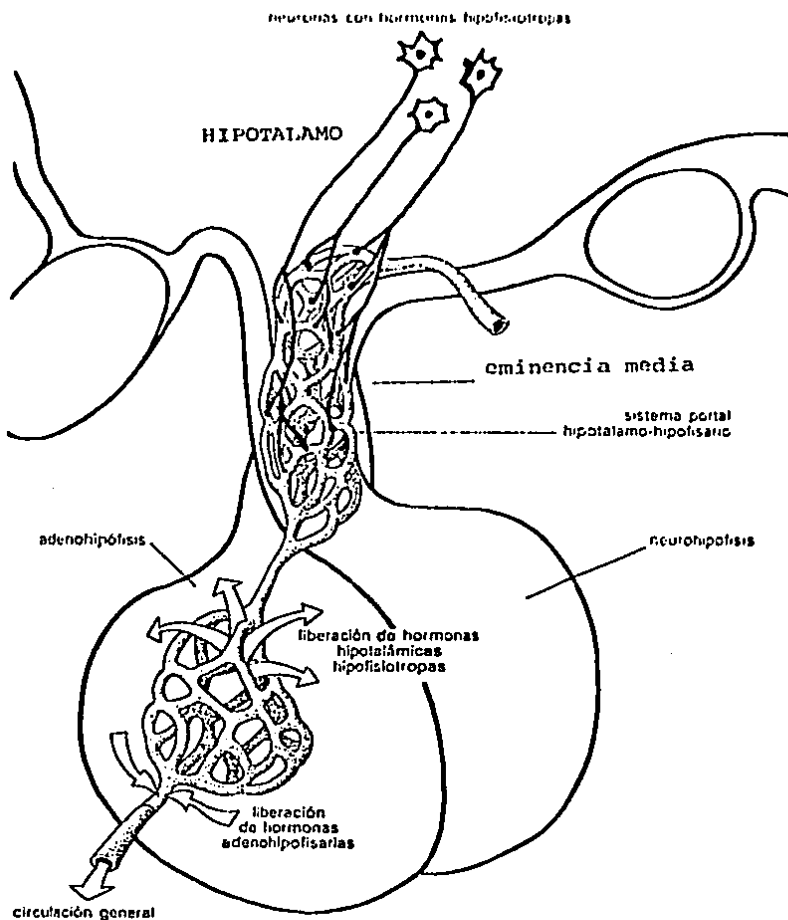
A pesar de que estos dos sistemas no solo se comunican a través de mensajeros químicos (puede haber comunicación por contacto celular o por unión comunicante "gap Junction"), la comunicación química es la

más estudiada porque es empleada por el organismo en numerosos contextos.

Cabe también señalar que las diferencias mencionadas entre el sistema endócrino y el nervioso no son tan evidentes; se sabe actualmente que ciertas neuronas pueden también comunicarse con diferentes órganos por medio de hormonas llamadas neurohormonas. Estas neuronas están, por ejemplo, reunidas en la base del cerebro de mamíferos en una región llamada hipotálamo que esta unida a la glándula endócrina adenohipófisis. Neuronas del hipotálamo mandan proyecciones hasta la eminencia media donde liberan un factor humoral al sistema portal hipotalámico-hipofisiario, por donde es transportado hasta la adenohipófisis, controlando de esta manera la liberación de hormonas adenohipofisiarias (figura 1) (1). A este nivel las relaciones anatómico-funcionales entre los dos sistemas han inducido a reagruparlos conceptualmente en uno solo: el sistema neuroendócrino.

Durante los años sesentas se postuló que tan solo ocho moléculas eran más que suficientes para realizar toda la transmisión química de la información en el sistema nervioso central. Se trataban de pequeñas moléculas como aminoácidos (ácido glutámico, ácido aspártico, glicina), derivados de aminoácidos (ácido gama aminobutírico: GABA) y aminas (acetilcolina, noradrenalina, dopamina, serotonina).

En base al conocimiento acumulado sobre los neurotransmisores, en especial estudios hechos sobre la acetilcolina, se definió una serie de criterios para la identificación y caracterización de moléculas neurotransmisoras (tabla 1) (2). Sin embargo, ya que no todas las moléculas con acción en el sistema nervioso cumplían dichos requisitos,



**FIGURA 1. EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISIARIO.**

Las neuronas que secretan hormonas hipofisiotropas envían sus prolongaciones hasta la eminencia media, donde vierten sus productos de secreción al sistema portal hipotalámico-hipofisiario, productos que son transportados hasta la adenohipófisis. Las hormonas estimulan o inhiben según el caso, la secreción de hormonas adenohipofisarias, las cuales alcanzan la circulación general, siendo transportadas hasta su órgano blanco.

**CRITERIOS PRESINAPTICOS.**

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

**CRITERIOS POSTSINAPTICOS.**

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

**TABLA 1. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE NEUROTRANSHISORES (VERMAN, 1966).**



éstos fueron tomados como una base pero no como criterio único para definirlos como tales.

Al determinar la estructura química de sustancias biológicamente activas presentes en el sistema nervioso y en particular las sustancias hipotalámicas hipofisiotrópicas, se descubrió que existe una clase importante de mensajeros químicos de estructura peptídica: los neuropéptidos.

Varias de las neurohormonas hipofisiotrópicas de naturaleza peptídica ya han sido aisladas y caracterizadas:

Hormona liberadora de tirotrópina: TRH (3).

Hormona liberadora de la hormona luteinizante y folículo estimulante: LHRH (4).

Hormona liberadora de corticotropina: CRF (5).

Hormona liberadora de la hormona de crecimiento: GRF (6).

Hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento: SRIF (7).

Debido a la localización de estos neuropéptidos en áreas extrahipotalámicas en cerebro, por su enriquecimiento a nivel de terminales nerviosas, por la presencia de receptores, por ser liberados en sistemas in vitro de una manera dependiente de calcio y por sus múltiples efectos en el sistema nervioso, se les ha propuesto como posibles transmisores, además de ser neurohormonas. La gama de neurotransmisores peptidérgicos potenciales, se ha incrementado con el descubrimiento de que hormonas peptídicas inicialmente descubiertas fuera del cerebro también se encuentren en este órgano.

Comprender el significado fisiológico de estos neuropéptidos, no solo enriquecería nuestro conocimiento acerca del funcionamiento del sistema nervioso central (SNC), pero pudiera también ayudar al tratamiento de enfermedades neurológicas y mentales.

El trabajo presentado a continuación se relaciona a las propiedades de uno de estos neuropéptidos: el TRH.

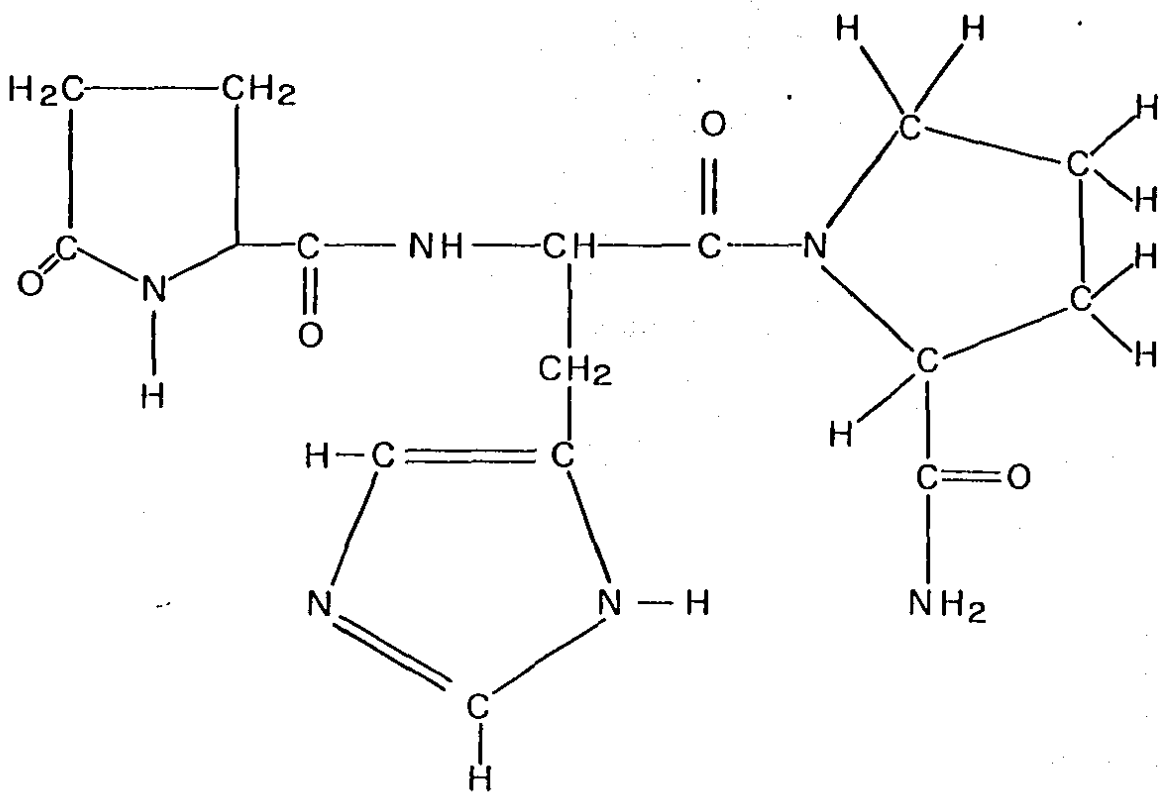
## CARACTERISTICAS DEL TRH

### -Descubrimiento y estructura.

En 1947 Harris propuso al hipotálamo como el responsable de la regulación de las secreciones adenohipofisarias a través de liberar factores en el sistema portal hipotalámico-hipofisario (8). En 1955 los estudios de Schally (9) por un lado, y los de Guillemin (10) por otro, demostraron que en cultivo in vitro de hipófisis, esta glándula no liberaba la mayor parte de sus hormonas si no estaba en presencia de fragmentos hipotalámicos, postulando así la existencia de mediadores químicos entre el hipotálamo y la adenohipófisis. Sin embargo, fue hasta 1969 cuando a partir de homogenados de hipotálamo porcino (11) y bovino (12) se purificó el primer mediador, el responsable de estimular la secreción de tiotropina; a esta hormona hipotalámica se le denominó hormona liberadora de tiotropina (TRH). La estructura del TRH fue determinada por Schally (13), y confirmada por Guillemin (14); es un tripéptido con ambas terminaciones bloqueadas de estructura L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida: pGlu-His-ProNH<sub>2</sub> (figura 2).

### -Biosíntesis del TRH

El TRH al igual que los demás neuropéptidos, es sintetizado por vía ribosomal (15,16) en forma de un precursor de alto peso molecular (17). Por medio de técnicas de ingeniería genética, se ha obtenido la secuencia del precursor para TRH de hipotálamo de rata; en éste, la secuencia se encuentra repetida cinco veces, y cada secuencia del péptido está entre pares de aminoácidos básicos (lisina y arginina) que



(piro) glutamil - histidil - prolinamida

FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL TRH.

son los posibles sitios de ruptura para originar TRH (18). Se piensa que como en el caso de otros precursores de neuropéptidos, el precursor del TRH es empaquetado en gránulos de secreción que viajan hasta las terminales nerviosas por el sistema de transporte axonal rápido. Durante este recorrido los enlaces dibásicos son hidrolizados generandose el péptido gln-his-pro-gly. Se piensa que en los gránulos este péptido es modificado por la acción de dos enzimas: una que transforma la gln en pglu (19) y otra que reconociendo la glicina, amida la prolina con liberación de ácido glioxílico (20).

#### -Localización regional y subcelular del TRH.

Conocida la estructura del tripéptido, se han podido obtener anticuerpos específicos contra éste, y por las técnicas de inmunohistoquímica y radioinmunoensayo se ha podido definir la localización y concentración de TRH en diversas regiones del cerebro así como en otros órganos. La concentración más elevada de TRH se localiza en el hipotálamo en terminales de la eminencia media (21); algunas otras áreas hipotalámicas conteniendo TRH en terminales nerviosas son: núcleo dorsomediano, núcleo paraventricular, núcleo ventromedial y núcleo periventricular (22). El TRH está también presente en cuerpos celulares de núcleos hipotalámicos: porción parvocelular del núcleo paraventricular (23) donde estan localizados los cuerpos celulares de las neuronas TRHérgicas que inervan la eminencia media; en somas de los núcleos preóptico, supraquiasmático, dorsomedial y perifórnico, en el hipotálamo lateral y la región premamilar (24). Con anticuerpo contra el TRH y su precursor se ha detectado inmunoreactividad en cuerpos celulares en regiones

extrahipotalámicas: en particular en lóbulo olfatorio, en los núcleos reticulares del tálamo, núcleos del raphe de la médula oblongada, amígdala e hipocampo (25). Terminales nerviosas conteniendo TRH se encuentran en núcleo accumbens, amígdala, núcleos del tallo cerebral y cordón espinal (26). En la médula espinal existe una vía TRHérgica que proviene del n. raphe al asta ventral, vía en la que el TRH coexiste con la substancia P y serotonina (27). En neurohipófisis también se encuentran altas concentraciones de TRH (28) y en menores concentraciones en adenohipófisis (29).

En terminales nerviosas del SNC donde existe TRH, éste se encuentra en gránulos de secreción resistentes a condiciones hipoosmóticas (30).

El TRH también se encuentra distribuido fuera del SNC: tracto gastrointestinal, tracto reproductor, placenta, islotes de Langerhans del páncreas y en piel de anfibios (31).

#### -Liberación.

Las técnicas de fraccionamiento subcelular e inmunohistoquímica a nivel de microscopía electrónica, han demostrado que más del 50% del TRH está localizado en gránulos de secreción (32). Por lo tanto se piensa que como para otros mensajes peptídicos, su liberación a la llegada de un potencial de acción se hace por exocitosis. De acuerdo con esto, la liberación de TRH se puede inducir por despolarización de una manera dependiente de calcio en sistemas *in vitro* (33,34), al igual que por neurotransmisores (35,36). Aunque existe una gran controversia acerca de los efectos producidos por diversos neurotransmisores en la

liberación de TRH, en general se ha propuesto que a nivel del hipotálamo medio basal la liberación del péptido es inhibida por dopamina (36) y somatostatina (37,38); mientras que la noradrenalina (37) y la histamina (34,36,39) la estimulan.

#### -Receptores a TRH.

En adenohipófisis existen receptores de membrana plasmática específicos y de alta afinidad para TRH (40,41). En el SNC se ha demostrado la presencia de receptores de alta afinidad ( $K_d$  50 nM) para TRH semejantes a los adenohipofisiarios (42); estos receptores se encuentran concentrados a nivel subcelular en membranas plasmáticas, y a nivel regional tienen una amplia distribución (43).

#### -Función hormonal.

El TRH es liberado del hipotálamo a través de la eminencia media al sistema portal hipotalámico-hipofisiario, de donde es transportado hasta la adenohipófisis para interactuar con sus receptores estimulando así la liberación de tirotropina (hormona estimulante de la tiroides: TSH) por los tirotropos (44), y de prolactina por los lactotropos (45). El TRH también es capaz de aumentar la biosíntesis del ARN mensajero para prolactina y tirotropina (46). La TSH es secretada a la circulación general y transportada hasta su órgano blanco, tiroides, para inducir la liberación de triiodotironina (T3) y de tiroxina (T4) (47) hormonas que a su vez afectan diversos procesos metabólicos.

La T3 y T4 regulan la secreción de las hormonas que las controlan,

a través de un mecanismo de retroalimentación. El sitio de regulación de las hormonas tiroideas sobre la secreción de TSH, por un lado, es a nivel de la adenohipófisis (48,49) a través de un mecanismo de retroalimentación negativa: la T3 y la T4 disminuyen el número de receptores de TRH en los tirotropos (50,51), decrecentando de esta forma la secreción de TSH a la circulación en respuesta a TRH. Las hormonas tiroideas también inhiben la liberación basal (52) y la síntesis de TSH (53,54). Otros dos factores hipotalámicos que controlan las secreciones de TSH y prolactina son: la dopamina, que tiene un efecto inhibitorio sobre la liberación de TSH (55) y prolactina (56); y la somatostatina que inhibe la liberación de TSH (57) provocada por TRH en adenohipófisis.

Por otro lado, T3 y T4 son capaces de penetrar al sistema nervioso central (58); manipulaciones endócrinas como la tiroidectomía producen un aumento de la tirosina hidroxilasa del hipotálamo (59), y por lo tanto de catecolaminas, lo cual sugiere que las hormonas tiroideas pudieran también controlar el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides a nivel hipotalámico, ya que se ha demostrado que las catecolaminas juegan un papel en la liberación de TRH. De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha demostrado que la biosíntesis de TRH en el núcleo paraventricular está bajo control de las hormonas tiroideas, aumentando su actividad en respuesta a una disminución de los niveles de T3 o T4 (60).

Incrementos en la actividad del eje TRH-TSH ocurren por ejemplo en animales sometidos a estrés con frío. En éstos se ha detectado un incremento tanto en los niveles de TRH en sangre periférica como de TSH en la circulación (61); el tratamiento con anticuerpo contra TRH inhibe



la liberación de TSH por estrés con frío (62), por lo cual se sugiere que el TRH controle la secreción de TSH en este fenómeno.

También a TRH se le ha propuesto como un modulador del ciclo circadiano de la secreción de TSH, debido a que TSH en sangre (63) y TRH hipotalámico presentan oscilaciones durante el día, exhibiendo el hipotálamo la concentración más alta de TRH al medio día (64).

Finalmente la secreción de prolactina en la rata lactante consta de dos fases; en la primera llamada depleción-transformación, la prolactina sufre cambios estructurales (65), esta fase es inhibida por dopamina (66). La segunda fase es la liberación de la prolactina transformada a la circulación, fase que se sugiere esté controlada por TRH, ya que éste estimula la liberación de prolactina hipofisaria de rata lactante tanto in vivo (56) como in vitro (67).

#### -Efectos del TRH en el SNC.

El TRH tiene una diversidad de efectos en el sistema nervioso central, a nivel neuroquímico, electrofisiológico y de comportamiento.

El TRH estimula el recambio de catecolaminas (68), estimula la síntesis y liberación de dopamina en hipotálamo y n. accumbens (69,70), y la liberación de noradrenalina de hipotálamo (69).

Potencia la acción excitatoria de acetilcolina en ciertas neuronas corticales de cerebro (71), excita motoneuronas espinales del asta ventral de la médula espinal (72,73). En cultivo de neuronas espinales del asta ventral aumenta la síntesis de colin acetil transferasa y creatina cinasa (74).

A nivel del núcleo accumbens, es capaz de estimular la locomoción a través de la puesta en marcha del sistema dopaminérgico (75). También antagoniza la narcosis inducida por pentobarbital (75), reduce la hipotermia inducida por pentobarbital (76); aumenta la tasa respiratoria (76) y tiene efectos termorreguladores (77).

-TRH como neurotransmisor.

Todo este conjunto de datos sugieren que el TRH pudiera actuar como un neurotransmisor en el SNC. Si tal es el caso deberían existir mecanismos rápidos de inactivación una vez que el TRH es liberado a la sinápsis y ha interactuado con su receptor específico postsináptico.

De acuerdo con los mecanismos conocidos para otros neurotransmisores, se han propuesto dos mecanismos principales de inactivación: uno de ellos es la captura del péptido, sin embargo, estudios hechos en rebanadas de cerebelo (78) y de hipotálamo (79), indican que para TRH este proceso ocurre con una  $V_{max}$  muy baja, y su importancia fisiológica no ha sido confirmada.

El otro mecanismo es la inactivación enzimática del péptido.

## ANTECEDENTES ESPECIFICOS DEL TRABAJO: LA DEGRADACION DEL TRH

Desde hace mucho tiempo se sabe que el TRH es rápidamente degradado cuando se incuba con suero (80), homogenados o fracciones subcelulares de cerebro o de otros tejidos (81). Las actividades enzimáticas responsables de tal degradación han sido parcialmente caracterizadas.

-Enzimas solubles de tejidos.

--Piroglutamato aminopeptidasa I (PGA I).

Esta enzima ha sido purificada de la fracción soluble de homogenados de tejidos: hipotálamo (82), cerebro (83), hígado (84). La PGA I (E.C. 3.4.19.13) hidroliza al TRH hasta pGlu + His-ProNH<sub>2</sub>; tiene un peso molecular de 28,000 (85); pH óptimo neutro, con una Km de 45 uM para TRH (86); es una tiol proteasa ya que es inhibida por agentes bloqueadores de los grupos tiol y necesita de ditioneitol (DTT) para expresar su actividad (87). La PGA I utiliza como sustratos tanto péptidos naturales: LHRH, gastrina y neurotensina; como péptidos sintéticos: pGlu-Ala, pGlu-His, pGlu-B-naftilamida que presenten ácido piroglutámico en el amino terminal (87). Su distribución regional en cerebro es homogénea (88), mientras que a nivel subcelular está enriquecida en la fracción citosólica y no en el sinaptoplasma (89,90). Esta enzima está ampliamente distribuida en otros órganos (91).

--Prolil endopeptidasa (PE).

En fracciones solubles de hipotálamo se detectó la presencia de una enzima capaz de degradar al TRH para formar TRH ácido (pGlu-His-Pro) (82); la enzima aislada (92) fue identificada como serin proteasa (93). La purificación y propiedades de esta enzima demostraron que se trata de una prolil endopeptidasa (E.C. 3.4.21.26), o sea una enzima que hidroliza péptidos en la unión peptidilprolil-péptido y peptidil prolil-aminoácido, excepto la unión prolil-prolina (94). Tiene un peso molecular de 66,000; pH óptimo entre 7-8 (87) y tiene una Km de 2400 uM para el TRH (86).

La distribución regional de la PE es homogénea en cerebro de rata (94); se encuentra en la fracción soluble de homogenados (92,95) y a nivel subcelular está enriquecida en el citosol y no en el sinaptoplasma (90).

Existen evidencias de que la PE se encuentra concentrada en células neuronales más que gliales (96,97). Esta enzima está presente en diversos tejidos (98).

-Papel fisiológico de la PGA I y PE.

A pesar de que la PGA I y la PE degradan al TRH in vitro, no existen evidencias para asignarles un papel fisiológico en inactivar al TRH in vivo, ya que no están concentradas a nivel de las terminaciones nerviosas y que tratamientos in vivo e in vitro con inhibidores de estas enzimas han producido resultados contradictorios: en el laboratorio hemos observado que inhibidores específicos de estas

enzimas (99,100) no afectan el contenido ni la liberación de TRH en distintas regiones del cerebro de roedores (101); mientras que otros autores utilizando inhibidores inespecíficos observaron que la inhibición de las enzimas solubles PGA I y PE aumenta los niveles de TRH intracelular, así como los de su liberación basal y estimulada con potasio (102). Además no existen evidencias de que estas enzimas sean liberadas al espacio extracelular.

-Enzima membranal: piroglutamato aminopeptidasa II (PGA II).

El 90% de la actividad degradativa de TRH en cerebro es soluble, sin embargo en membranas sinaptosomales se detectó una actividad enzimática capaz de degradar al TRH (103). Trabajando con membranas totales de cerebro o sinaptosomas se demostró la existencia de una PGA distinta de la PGA I, que no necesita DTT para su expresión, pero es inhibida por DTT y ácido etilen diamino tetra acético (EDTA) (104,105). Esta PGA II (E.C. 3.4.19.\_) se encuentra enriquecida en membranas sinaptosomales (90,106) más específicamente sobre la membrana plasmática de los sinaptosomas; estudios hechos sobre la enzima purificada (107) demuestran que es una metaloproteasa (106), con un PM de 230,000 (106), y un pH óptimo de 7.4 (107). La PGA II muestra una alta especificidad para TRH (105), ya que solo degrada tri péptidos muy semejantes a TRH como pGlu-His-Trp, pGlu-His-Pro y pGlu-His-Gly; péptidos naturales pGlu-X no son degradados por la PGA II (107). La Km de la enzima es de 40 uM para el TRH (107). Estudios del sitio activo de la enzima demuestran que los residuos tirosina, arginina e histidina son necesarios para la expresión de la enzima, y posiblemente estén localizados en el sitio activo de ésta (108). La PGA II purificada de

cerebro de conejo muestra las mismas características que la PGA II de cerebro de rata y cuyo (109). La PGA II se encuentra esencialmente en cerebro (99). La especificidad y la localización de la PGA II sugieren que la enzima pudiera tener un papel fisiológico relevante en la inactivación del TRH. Estos hechos son la base de los objetivos del presente trabajo (ver adelante).

-Enzima de suero (tiroliberinasa).

En suero, Bauer (110) ha descrito una actividad enzimática que degrada al TRH; se trata de una actividad de piroglutamato amino peptidasa (PGA) específica para el TRH (110); de 260000 daltons de peso molecular; pH óptimo entre 6.5-8, con una Km de 50 uM para TRH. Esta enzima es inhibida por DTT y EDTA sin ser afectada por benzamidina; sugiriendo que la PGA de suero (tiroliberinasa, E.C. 3.4.11.8) no posee características ni de serin proteasa ni tiol proteasa, necesitando de un metal para su expresión (111). La tiroliberinasa degrada al TRH en pGlu + His-ProNH<sub>2</sub>. Friedman y Wilk (112) han demostrado que esta enzima es la responsable de la degradación de TRH en suero.

Se ha sugerido que la PGA de suero posee un papel fisiológico importante, ya que en la sangre portal coexiste con el TRH; la actividad de PGA se incrementa con inyecciones de triiodotironina (113,114), y porque la degradación de TRH en suero exhibe cambios cinéticos durante el desarrollo ontogenético (108,109); es decir, que mientras el TRH es rápidamente degradado por suero de rata adulta, es muy estable en suero de ratas recién nacidas. La degradación enzimática

de TRH en suero, pudiera contribuir al balance de la secreción de TSH, determinando el número de moléculas de TRH disponibles para los tirotropos.

La PGA II y la tiroliberinasa tienen una gran similitud en sus características fisicoquímicas, por lo que se ha sugerido que ambas pudieran provenir de un mismo gen.

#### -Degradación de los metabolitos de TRH.

Una vez que el TRH ha sido hidrolizado por acción de las enzimas ya mencionadas, los metabolitos generados por éstas pueden ser degradados por diferentes enzimas.

El His-ProNH<sub>2</sub> generado por la acción de la PGA I y/o PGA II puede ciclizarse de manera no enzimática a histidil-prolil-dicetopiperazina (DKP), o bien ser degradado hasta His-Pro por una postprolil dipeptidil aminopeptidasa (PPDA) también llamada dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV; E.C. 3.4.14.5) (105), que en el cerebro se encuentra enriquecida en membranas sinaptosomales (90,117). Esta enzima es una serin proteasa, con un pH óptimo entre 7.8-8.7 (118); la DAP IV presenta actividad de exopeptidasa con especificidad para péptidos de estructura A-Pro(Ala)-X donde A= aminoácido, X= aminoácido, péptido, amida o éster (119). La enzima es inhibida por el antibiótico bacitracina (117). Recientemente se ha reportado la presencia de una DAP IV en la fracción soluble de cerebro que difiere de la membranal por su sensibilidad a inhibidores (120).

Se puede generar ProNH<sub>2</sub> a partir de His-ProNH<sub>2</sub> por acción de una

histidil prolinamida imidopeptidasa (121). Esta enzima esta unida a membranas de cerebro (81,90,95), pero a nivel subcelular no está enriquecida en alguna fracción en particular (90).

La iminopeptidasa puede originar prolina de la ProNH<sub>2</sub> (85).

El TRH ácido puede ser degradado a his-pro por la PGA I, este metabolito puede dar origen a His + Pro, por acción de la imidodi-peptidasa (85).

Las enzimas que originan prolina estan distribuidas en todas las fracciones solubles (95), sin un enriquecimiento en particular.

-Papel de los metabolitos de TRH.

El proceso de degradación del TRH no solo termina la actividad biológica de éste, sino también pudiera generar nuevas actividades biológicas.

La his-pro-dicetopiperacina (DKP) ha mostrado tener efectos similares o contrarios a los provocados por el TRH. Por ejemplo en el eje endócrino, se observó que dosis fisiológicas de DKP inhiben la secreción de prolactina en mono rhesus (122). También se ha demostrado un efecto inhibitorio de la DKP sobre la secreción de prolactina tanto en células GH3 en cultivo (123) como de hipófisis extraídas de ratas lactantes (124).



- Regulación de la degradación.

Los mecanismos que regulan los niveles de TRH in vivo, pueden darse a distintos niveles: síntesis, liberación o degradación. A nivel de degradación, se ha propuesto que ésta puede ser un mecanismo regulador de los niveles de TRH activo, ya que se ha encontrado cambios en la actividad específica de la enzima tiro liberinasa, según el estado tiroideo del animal: en animales hipertiroideos se incrementa la actividad específica, mientras que en animales hipotiroideos disminuye (113); estos datos ya han sido confirmados (125). Recientemente se ha reportado el mismo efecto del estado tiroideo sobre la PGA II adenohipofisaria (126,127).

La regulación de las hormonas tiroideas sobre la degradación de TRH en suero y por membranas de adenohipófisis, así como la presencia de las enzimas específicas tiro liberinasa y PGA II apoyan la propuesta de que la degradación enzimática de TRH pudiera tener un papel regulatorio en sus niveles, por lo menos a nivel sangre portal-adenohipófisis.

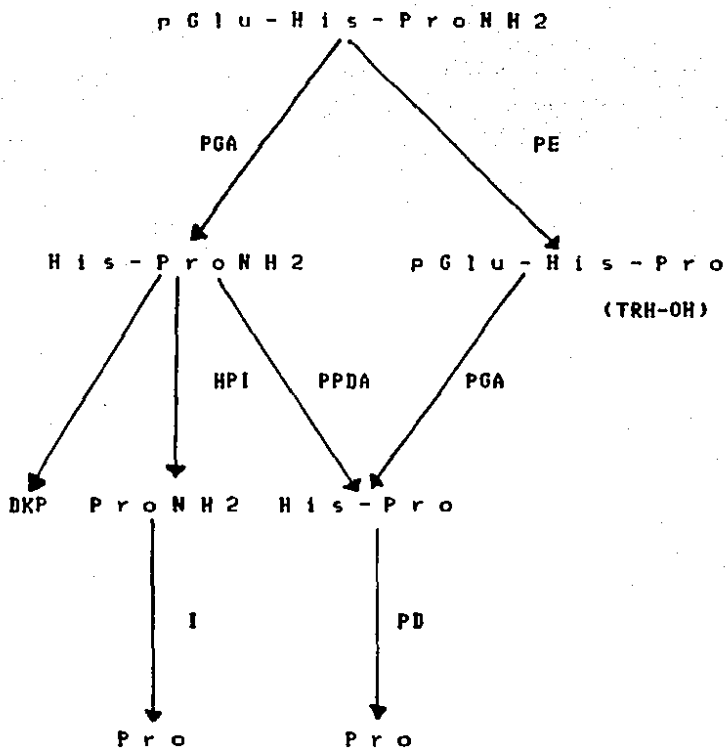


FIGURA 3. VIA CATABOLICA DEL TRH POR ENZIMAS DE CEREBRO (BAUER, 1981).

PGA: Piroglutamat amino peptidasa.

PE: Prolil endopeptidasa.

PPDA (DAP IV): Postprolil diamino peptidasa.

HPI: Histidil prolil imidopeptidasa.

I: Imino peptidasa.

PD: Prolil dipeptidasa.

## -OBJETIVOS.

Se ha propuesto que las enzimas degradativas de neuropéptidos participan de una manera importante en la regulación fisiológica de la actividad de los neuropéptidos una vez que son liberados a la sinapsis, como en el caso de las metaloproteasas membranales que degradan las encefalinas (128).

Sin embargo la concentración extracelular del péptido disponible para su receptor, puede solo ser afectada por enzimas membranales o solubles extracelulares. La PGA I y la PE quedarían sin intervenir en la inactivación del TRH una vez que este fuera liberado al espacio extracelular y haya interactuado con su receptor específico, porque su distribución y los efectos de inhibidores sugieren que no entran en contacto con el TRH; de aquí la importancia de una enzima membranal para inactivar al TRH en sinapsis.

Para desarrollar un mejor entendimiento del papel que juega la PGA II en la degradación del TRH, es necesario saber si existe una correlación entre la distribución del TRH, sus receptores y la enzima; así como determinar si su topología en la membrana es la adecuada para degradar al TRH extracelular. Los objetivos del trabajo fueron:

1. Estandarizar un método específico para determinar la actividad enzimática de la PGA II en cerebro.
2. Determinar la distribución regional de la PGA II en el cerebro de rata, para saber si existe correlación entre la enzima, TRH y sus receptores.
3. Determinar si el sitio activo de la enzima está localizado adecuadamente para degradar al TRH liberado, o sea si está localizada en la cara externa de la membrana plasmática.

## MATERIALES Y METODOS.

Ya que la mayor parte de los métodos y resultados fueron publicados (ver artículos anexados al final del presente trabajo), solo describiré aquellos que no están incluidos en dichos artículos.

### -Animales.

Se usaron ratas machos Wistar de 200-300 gramos de peso corporal, mantenidas en condiciones controladas de luz (12 horas al día), con alimento y agua ad libitum.

### -Purificación del (<sup>3</sup>H-Pro)-TRH.

En todos los experimentos realizados se trabajó con TRH radioactivo previamente purificado, con el fin de evitar encubrir los metabolitos ya existentes en el reactivo, con los producidos en los ensayos de degradación.

Para esto, el TRH radioactivo se aplicó sobre una placa fina de alta resolución (Whatman HPKF), la cual se corrió en el sistema cromatográfico cloroformo:metanol:hidróxido de amonio 5:3:1 v/v/v (solvente I). En otro carril se aplicó TRH frío como estándar, y se reveló con el reactivo de Pauli; la zona que comigró con el estándar fue recortada y extraída con un ml de metanol al 90%.

La pureza del TRH radioactivo se verificó por cromatografía en placas de sílica gel G 60 (Merck 5724) con el solvente I. La

radioactividad fue extraída con 1 ml de metanol al 90% y determinada por conteo de centelleo líquido con solución de Bray (129). La pureza obtenida fue entre 94-98%.

-Fraccionamiento celular.

--Método I.

Los animales fueron sacrificados por decapitación y los cerebros disecados se homogenizaron al 10% p/v en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con un homogenizador Potter Elvehjem.

El homogenado fue centrifugado a 1000 g durante 15 minutos, el sobrenadante se mantuvo a 4 °C, mientras la pastilla fue lavada. Los dos sobrenadantes (fracción soluble celular, organelos y membranas) se juntaron para ser centrifugados a 100000 g durante 60 minutos. El sobrenadante constituye la fracción soluble (S II). La pastilla fue rehomogenizada y centrifugada una vez más para obtener la fracción membranal, que fue resuspendida en buffer Tris. Todo el fraccionamiento se realizó a 4 °C.

--Método II.

Se indica en el artículo número uno anexado al final del trabajo.

--Preparación de sinaptosomas.

Se indica en el artículo número 2.

-Efecto del lavado de membranas con NaCl.

Cerebros homogenizados al 10% p/v con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 fueron centrifugados a 1000 g durante 15 minutos. La pastilla fue lavada y los sobrenadantes mezclados se dividieron en dos partes iguales; después de centrifugarlos a 100000 g durante 60 minutos a 4°C, las pastillas fueron resuspendidas en buffer Tris en presencia o ausencia de NaCl 1 M y recentrifugadas. Ambas pastillas se resuspendieron en buffer Tris sin NaCl.

-Actividad de PGA II en mezcla de membranas de lóbulo olfatorio y médula espinal.

Las fracciones membranales de lóbulo olfatorio y médula espinal fueron obtenidas por el método II; se resuspendieron en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y se determinó la actividad en ambas regiones y mezclas de l. olfatorio: m. espinal 1:1, 1:3, 1:10 y 1:20 respectivamente, en base a su contenido protéico.

-Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de PGA II de l. olfatorio y m. espinal.

Las membranas de los tejidos fueron obtenidas con el método II, e incubadas con Tritón X-100 al 1% concentración final durante 10 minutos a 37 °C. Las membranas fueron recuperadas por centrifugación y la actividad de PGA II determinada en el sobrenadante y membranas.

-Determinación de proteínas.

Se tomó una alícuota tanto de la fracción S II como de la fracción membranal, para hidrolizarlas con NaOH 1N y determinar la concentración de proteínas por el método de Lowry (130), usando albúmina bovina como estándar.

-Degradación del TRH

1. Condiciones experimentales iniciales utilizadas para el desarrollo del método de medición de la PGA II.

100 ul de S II (0.1-0.3 mg de proteína) o membranas (0.2-0.6 mg de proteína) fueron preincubadas por duplicado en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 a 37 °C durante 5 minutos; al tiempo 0, 10 ul de TRH radioactivo (100000 cpm) fueron añadidos. La reacción fue terminada a los 60 minutos con 110 ul de ácido acético al 40%.

A otras alícuotas de las fracciones se les agregó un volumen igual de buffer con los agentes a utilizar y a la concentración final deseada. Dos diluciones más de la fuente enzimática fueron hechas para estar dentro de las condiciones de linealidad y acercarse a la velocidad inicial.

A las muestras de reacción acidificadas se les agregó una mezcla de TRH y sus metabolitos como acarreadores, se centrifugaron a 12000 g durante 30 minutos para sedimentar proteínas. Los sobrenadantes fueron deslipidizados con éter saturado en ácido acético al 20%, y se llevaron al 90% v/v con metanol (en esta suspensión el TRH y sus

metabolitos son solubles, pero precipitan aun macromoléculas). Los sobrenadantes separados por centrifugación a 12500 g, se evaporaron a sequedad en un evaporador rotatorio de marca Savant SVC-200 y fueron resuspendidos en 20 ul de metanol al 90%. Con este método de análisis se da tiempo a que el His-ProNH<sub>2</sub> se ciclice a DKP.

Las muestras se aplicaron sobre placas cromatográficas de sílica gel G 60, junto con estándares de TRH y sus metabolitos. La cromatografía se desarrolló con el solvente ya mencionado. Los estándares fueron revelados con el reactivo de Pauli, excepto prolina y prolinamida que lo fueron con isatina. Los R<sub>f</sub> fueron los siguientes: TRH-OH 0.31, His-Pro 0.34, TRH 0.54, ProNH<sub>2</sub> 0.77 y DKP 0.85. Los carriles de las muestras se recortaron de cm en cm (2 cm de ancho por 1 cm de largo), cada rectángulo fue puesto en un vial para centelleo líquido, los péptidos eluidos con 1 ml de metanol al 90% y finalmente se agregó solución de Bray para determinar la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

En este sistema cromatográfico His-Pro y TRH-OH por un lado, y DKP y prolinamida por otro, migran muy juntos. Los picos de radioactividad correspondientes a estos metabolitos fueron recromatografiados en un segundo sistema cromatográfico: isopropanol-agua-hidróxido de amonio 80:29:1 v/v/v, sistema que separa His-Pro de TRH-OH y DKP de prolinamida. Los R<sub>f</sub> en este sistema son: TRH-OH 0.47, His-Pro 0.6, DKP 0.62 y ProNH<sub>2</sub> 0.28.

2. Ensayo específico de la PGA II. Se indica en el artículo número 1.
3. Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de t de student.



**RESULTADOS.****1) DESARROLLO DEL ENSAYO ESPECIFICO DE LA PGA II.**

Para poder determinar específicamente la actividad de la PGA II, fue necesario estandarizar un método en el cual no se expresaran otras actividades enzimáticas capaces de degradar al TRH o a sus metabolitos una vez que la PGA II hubiera actuado. Así aseguramos que solo estamos midiendo la actividad de la PGA II y no la suma de diferentes actividades. Este método se estandarizó para medir la actividad de PGA II por aparición del producto His-ProNH<sub>2</sub>-DKP, a partir de TRH como sustrato.

Se analizó el patrón de degradación de H-TRH tanto en fracción soluble como membranal de cerebro en distintas condiciones, para conocer cuales son las actividades solubles que pudieran contaminar la fracción membranal y cuales pudieran ser membranales e interferir con la medición de la PGA II, ya que pudieran competir por el TRH o degradar el His-ProNH<sub>2</sub> con el resultado que la cuantificación de la PGA II quedaría mal estimada.

En la figura 1 se muestra una relación lineal proteína-actividad de la fracción S II incubada con buffer Tris-DTT (2 mM)-EDTA (1mM), y de la fracción membranal incubada con buffer Tris. Estos datos demuestran que con el rango de concentración de proteínas utilizado estamos estimando la velocidad inicial de la reacción.

-Patrón de degradación del TRH por S II.

En la figura número 2 se muestran los resultados del análisis de degradación de  $^3\text{H}$ -TRH por SII en buffer Tris-DTT-EDTA, determinados por cromatografía en capa fina, los metabolitos producidos son: DKP, TRH-OH y ProNH<sub>2</sub>. En estas condiciones en las cuales la fracción S II es incubada en presencia de agentes que protegen a la PGA I, como DTT y EDTA, hay formación de DKP. En su ausencia la formación de DKP disminuye. Además cuando pGluBnaftilamida (un inhibidor competitivo para la PGA I pero no para la PGA II (tabla 1)) es utilizada aun en presencia de DTT-EDTA no hay formación de DKP. Estos datos confirman reportes previos donde demostraron que la PGA I es la responsable de la producción de DKP por S II.

En las condiciones en las cuales la fracción S II es incubada con buffer Tris-Bacitracina (un inhibidor de la PE) (2.5 mM) no hay formación de TRH-OH. Estos resultados son congruentes con reportes anteriores indicando que el TRH puede ser degradado por actividad de protil endopeptidasa presente en S II (tabla 1).

La ProNH<sub>2</sub> sigue el patrón de aparición de DKP, sugiriendo que este metabolito es derivado del His-ProNH<sub>2</sub> por acción de una histidil protil imidopeptidasa soluble antes de ciclizarse a DKP, y no de la degradación directa del TRH (tabla 1).

En ninguna de las condiciones de incubación de la fracción S II hubo formación de prolina.

-Patrón de degradación en membranas.

Membranas incubadas solo con buffer, producen DKP, ProNH<sub>2</sub> e His-Pro; la no aparición de TRH-OH sugiere que éstas están limpias de contaminación por PE y otras enzimas solubles. La formación de His-Pro es inhibida por bacitracina, mientras que la de DKP es incrementada. Estos datos indican que existe una competición entre la ciclización de His-ProNH<sub>2</sub> y su degradación a His-Pro por la DAP IV, enzima cuyo componente membranal es sensible a bacitracina (tabla 1).

DTT-EDTA inhiben la formación de DKP; esto es consistente con el hecho de que las membranas están limpias de contaminación por PGA I, y que DTT y EDTA inhiben la PGA II. Al igual que en la fracción soluble la producción de ProNH<sub>2</sub> sigue el patrón de aparición de DKP sugiriendo que su formación es debida a un corte secundario del TRH, a partir de His-ProNH<sub>2</sub> (tabla 1).

Los resultados obtenidos demostraban entonces que la incubación de las membranas en buffer Tris-Bacitracina es óptima para la actividad de la PGA II, ya que se encontraban inhibidas PE y PGA I (que pudieran competir con la PGA II para degradar TRH), así como DAP IV membranal (cuya actividad disminuiría el valor de His-ProNH<sub>2</sub> detectado). Sin embargo, las condiciones no eran todavía óptimas porque existía la posibilidad que parte del His-ProNH<sub>2</sub> producido se fuera degradando a ProNH<sub>2</sub>. Para resolver este problema se realizaron los siguientes experimentos.

**-Efecto de NaCl sobre membranas.**

Ya que en la fracción soluble como membranal hay producción de prolinamida, se determinó si la enzima responsable para su producción en membranas era un contaminante soluble.

Las fracciones membranales incubadas en presencia de bacitracina y lavadas o no con NaCl 1M, generan cantidades similares de DKP y ProNH<sub>2</sub> indicando que la aparición de prolinamida es intrínseca a la membrana (tabla 2).

**-Inhibición de la producción de ProNH<sub>2</sub>.**

Una vez demostrado que la producción de ProNH<sub>2</sub> es intrínseca de las membranas y para no subestimar la actividad de la PGA II, era importante inhibir esta última. De acuerdo a Matsui, la imidopeptidasa (IP) es inhibida por N-ethylmaleimida (NEM).

Utilizando diferentes concentraciones de NEM, se mostró que la producción de ProNH<sub>2</sub> es inhibida entre concentraciones de 1-2.5 mM de NEM, sin ser afectada la PGA II (tabla 3), confirmando que la producción de ProNH<sub>2</sub> es por acción de la IP.

Entonces, utilizando buffer con bacitracina y NEM que inhiben a la DAP IV e IP respectivamente, así como PE y PGA I, se puede cuantificar solo la actividad de PGA II.

-PGA II en membranas obtenidas por diferentes métodos.

El método de la obtención de las membranas que se utilizó en los experimentos anteriores toma tiempo (3-4 horas). Para obtener de una manera más rápida la fracción membranal, sin perder actividad de PGA II, se comparó la actividad de la enzima en membranas obtenidas por este método con la obtenida por un método más rápido (método II). La actividad total de la enzima, determinada como producción de DKP, es la misma en ambos métodos, por lo cual se optó seguir trabajando con el método II (tabla 4).

-Determinación de la actividad de la PGA II utilizando papel de intercambio iónico.

También se optó por determinar de manera más rápida la actividad de PGA midiendo el His-ProNH<sub>2</sub> por cromatografía en papel de intercambio iónico. Una alícuota de la mezcla de incubación (membranas + TRH) puede ser puesta directamente sobre el papel, parando de esta forma la reacción, sin necesidad de hacer extracciones como en el caso del análisis de degradación en capa fina. Una vez corrida la cromatografía, se corta el primer cm (His-ProNH<sub>2</sub> queda en el origen, mientras que TRH migra), se pone en un vial para centelleo líquido, es extraído con un ml de NH<sub>4</sub>OH 1M y se agrega solución de Bray para determinar la radioactividad en un contador de centelleo líquido. En estas condiciones His-ProNH<sub>2</sub> no se cicliza. Determinando la actividad con este método se obtienen valores semejantes a los observados con el método de capa fina para medir DKP.

## II) DISTRIBUCION REGIONAL DE LA PGA II EN CEREBRO.

Con el método ya estandarizado para obtener membranas y medir la PGA II, se prosiguió a determinar su distribución en regiones cerebrales, trabajando con regiones ricas en TRH (n. accumbens-septum lateral, hipotálamo, l. olfatorio), moderadas (mesencefalo, puente, region cervical de m. espinal, m. oblongada) y bajas (adenohipófisis, corteza cerebelar, hipocampo).

Las regiones presentando alta actividad de PGAI son l. olfatorio, hipocampo, n. accumbens, corteza posterior cerebral e hipotálamo; seguidas de corteza cerebelar, neurohipófisis y mesencefalo que presentan de dos a cinco veces menor actividad que las anteriores; con una actividad de hasta 10 veces menor a las primeras son: m. oblongada, adenohipófisis, puente y medula espinal (artículo I).

La distribución de la enzima se determinó con una concentración final de sustrato de 50 nM; ya que la Km de la enzima es mucho mayor (45 uM), entonces en nuestras condiciones experimentales, sustratos endógenos de la PGA II pudieran estar compitiendo con el TRH; además un error en la cantidad de cpm de TRH añadido en el ensayo pudiera inducir a estimar inadecuadamente la actividad de PGA II. Por lo tanto se decidió comparar los resultados obtenidos con resultados de experimentos trabajando con concentraciones más altas de sustrato. Para determinar la concentración ideal de sustrato (o sea una concentración alta pero no tan alta que se diluye demasiado el  $^3\text{H-TRH}$ ) se añadió TRH frío al  $^3\text{H-TRH}$  para generar varias concentraciones finales ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-8}$  M). A la concentración de  $10^{-5}$  M ya no es posible observar la presencia del metabolito radioactivo por efecto de

dilución; a  $10^{-6}$  M la señal se amplifica 10 veces (figura 3); esta concentración de de sustrato fue utilizada para ensayos de la enzima en algunas regiones, y en los experimentos subsecuentes. Aprovechando esta serie de diluciones se determinó la Km aparente de la enzima que fue de 4 uM (figura 4).

En las regiones donde se determinó la actividad de esta enzima a  $10^{-6}$  M de TRH el orden de las regiones no varía (tabla 5) por lo que se confirma la distribución estimada a  $5 \times 10^{-8}$  M.

Con el fin de conocer si la distribución heterogénea de la PGA II en cerebro se debiera por un lado a la presencia de una inhibidor intrínseco de la enzima en aquellas regiones donde la actividad es baja, o por otro lado, al enmascaramiento de la enzima por interacciones con lípidos de membrana de estas regiones, se realizaron los siguientes experimentos.

La actividad de la PGA II fue determinada en membranas de l. olfatorio, m. espinal y mezclas de éstas 1:1, 1:3, 1:10 y 1:20 en base al contenido protéico. Los resultados son muy similares a lo esperado, suponiendo que no existe tal inhibidor (tabla 6).

Por otro lado, las membranas de ambas regiones fueron tratadas con Triton X-100 a una concentración final de 1% y recuperadas por centrifugación. La actividad se midió en sobrenadante y en membranas; en ambas regiones la actividad específica de la enzima aumenta en membranas tratadas con el detergente respecto al control, esto es debido a que se solubilizan preferencialmente otras proteínas membranales, pero la suma de las actividades de la fracción soluble y membranal es igual a la actividad de membranas controles. Estos

resultados indican que no hay un enmascaramiento de la enzima (tabla 7).

Finalmente no se encontró correlación entre la distribución de la PGA II y algunos parámetros del TRH: sus niveles endógenos, liberación in vitro basal o estimulada, o receptores (artículo 1).

### III) TOPOLOGIA DE LA PGA II EN MEMBRANA.

La distribución regional heterogénea de la PGA II sugiere que esta enzima tiene un papel específico, y pudiera estar involucrada en la inactivación del TRH sin embargo la PGA II debiera estar localizada estratégicamente en las membranas para inactivar al TRH en el espacio extracelular. El siguiente punto fue determinar si el sitio activo de la enzima está orientado hacia la cara externa de membranas sinaptosomales.

- Efecto del choque osmótico y tratamiento con detergentes sobre la PGA II sinaptosomal.

La lisis por choque osmótico de sinaptosomas intactos no incrementó la actividad de PGA II de manera significativa (artículo 2); la falta de un aumento en la actividad de sinaptosomas lisados no se debió a la pérdida de proteína membranal o a la inactivación de la enzima durante la recuperación de membranas después del choque osmótico (artículo 2). El tratamiento de sinaptosomas con Triton X-100 o saponina incrementó la actividad 12 y 42% respectivamente (artículo 2). Solo el último efecto fue significativo. La saponina redujo un 10% la

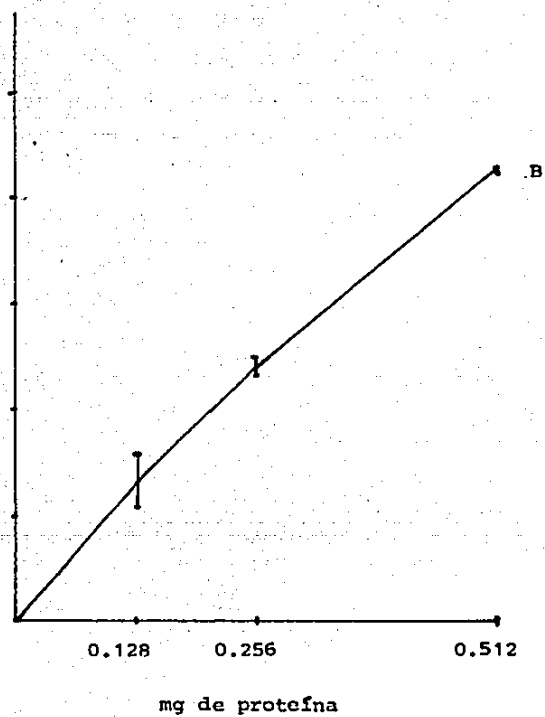
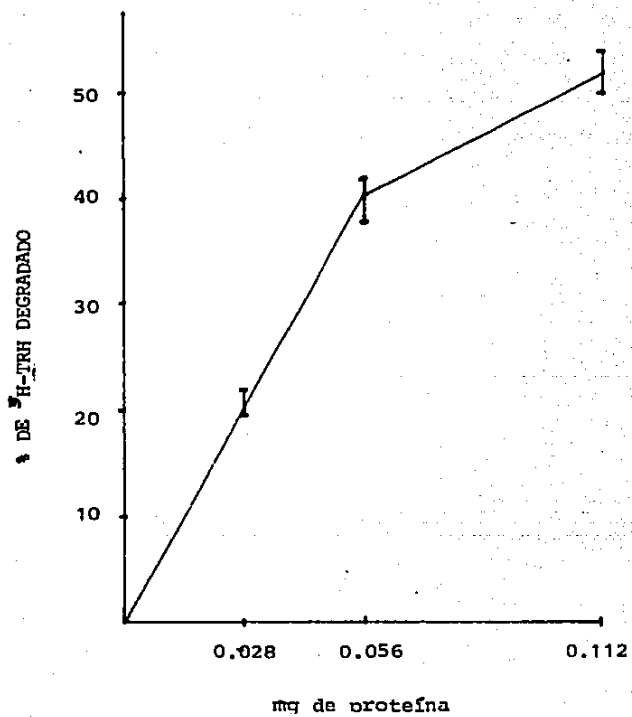


actividad de PGA II purificada, lo cual indica que la falta de un incremento mayor de la actividad de la enzima, no se debió a la inactivación por saponina. Estos datos sugieren que más del 50% del sitio activo de la enzima está orientado hacia el lado externo de las membranas.

- Efecto de la tripsina sobre la PGA II sinaptosomal

Para obtener mayor evidencia que la PGA II o gran parte de ella es ectoenzima, sinaptosomas intactos fueron sometidos a tratamiento con tripsina el cual redujo la actividad de PGA II entre 70-80% sin afectar la actividad de LDH, sugiriendo que la inactivación se debe a una proteólisis de ectoproteínas y no a una proteólisis general de proteínas sinaptosomales. Esta disminución de actividad no se debió a una inactivación de la PGA II por sí sola, ya que fue muy estable hasta los 20 minutos de incubación (artículo 2). Estos resultados apoyan la hipótesis de que gran parte de la PGA II es una ectoenzima.

**FIGURA 1.** La actividad degradativa de TRH fue determinada tanto en la fracción soluble como en la membranal, a partir de 3 concentraciones de enzima. A: fracción SII en presencia de buffer Tris-DTT-EDTA. B: fracción membranal en presencia de buffer Tris. Determinación de dos experimentos.

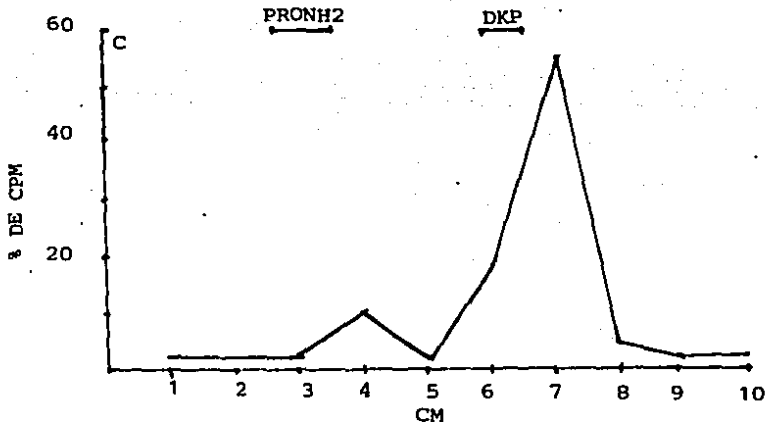
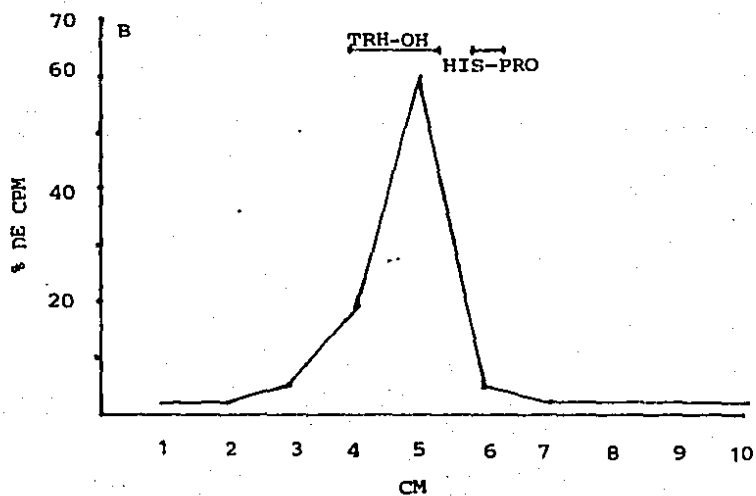
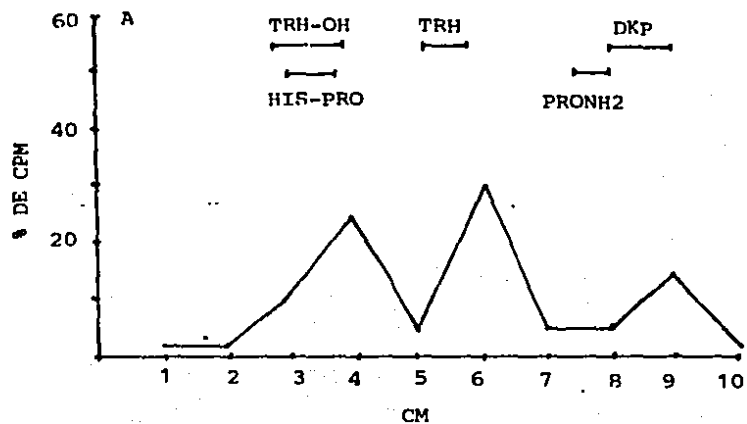


## FIGURA 2

- A) Patrón de degradación de  $^3\text{H}$ -TRH por SII en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5-DTT(2 mM)-EDTA(1 mM). Análisis cromatográfico en capa fina con el solvente cloroformo:metanol:hidróxido (5:3:1 v/v/v).

Los picos correspondientes a (TRH-OH)-(His-Pro) y (ProNH<sub>2</sub>)-(DKP) fueron recortados, eluidos y recromatografiados en un segundo sistema: isopropanol:agua:hidróxido de amonio (70:29:1 v/v/v); representados en las gráficas B y C.

- B) Recromatografía del pico (TRH-OH)-(His-Pro) del primer sistema; muestra solo la presencia de TRH ácido.
- C) Recromatografía del pico (ProNH<sub>2</sub>)-(DKP) del primer sistema; se detecta la presencia de ambos metabolitos.



## S II

	DKP	ProNH2	TRH-OH
Tris-DTT-EDTA	100 $\pm$ 1(6)	100 $\pm$ 6(6)	100 5(4)
Tris-BAC	14 $\pm$ 7(6)*	13 $\pm$ 9(6)*	0 (6)
Tris-BAC-DTT-EDTA	107 (2)	137 (2)	0 (2)
Tris-BAC-pGluBNAF	0 (2)	0 (2)	0 (2)
Tris-pGluBNAF-DTT	0 (2)	0 (2)	109 (2)
Tris-pGluBNAF-DTT-EDTA	0 (2)	0 (2)	90 (2)

## MEMBRANAS

	DKP	ProNH2	His-Pro
Tris	100 $\pm$ 5(9)	100 $\pm$ 4(4)	100 4(4)
Tris-BAC	150 $\pm$ 9(6)**	111 $\pm$ 6(6)	0 (6)
Tris-BAC-DTT-EDTA	23 (2)	3 (2)	0 (2)

Tabla 1. Actividad de las enzimas que degradan al H-TRH en las fracciones solubles y membranales de cerebro.

100  $\mu$ l por duplicado de fracción soluble (0.1-0.3 mg de proteína) y membranal (0.2-0.6 mg de proteína) obtenidos por el método I fueron preincubados en presencia de los agentes durante 5 minutos a 37°C; dos diluciones más de las fracciones fueron analizadas. La reacción fue iniciada al agregar 10  $\mu$ l de  $^3$ H-TRH (100000 cpm), y terminada al agregar 110  $\mu$ l de ácido acético al 40% después de una hora de incubación. Las concentraciones finales de los agentes en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4, fueron: DTT 2 mM, EDTA 1 mM, bacitracina (Bac) 2.5 mM, pirogluBnaftilamida (pGluBNAf) 2.5 mM. Los productos de degradación se analizaron por cromatografía en capa fina. Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media de las actividades normalizadas al control. Las actividades específicas promedio fueron: en Tris-DTT-EDTA para SII: 37 fmolas de DKP/min/mg prot, 3 fmolas de proNH2/min/mg prot, 80 fmolas de TRH-OH/min/mg prot., y en Tris-HCl 50 mM pH 7.5 para la fracción membranal: 8 fmolas de DKP/min/mg prot, 6 fmolas de ProNH2/min/mg prot, 15 fmolas his-pro/min/mg prot. \* p 0.0005 comparando al grupo Tris DTT-EDTA y \*\* p 0.025 comparando al grupo Tris.

	DKP	ProNH <sub>2</sub>
<b>CONDICION</b>		
CONTROL	18 $\pm$ 2(3)	9 $\pm$ 1(4)
TRATADO	16 $\pm$ 1(5)	10 $\pm$ 2(6)

Tabla 2. Efecto del lavado con NaCl 1 M sobre la formación de DKP y Pro NH<sub>2</sub> en membranas.

El homogenado de cerebro se dividió en dos partes iguales, el fraccionamiento de uno de ellos fue tratado con NaCl 1 M. La actividad fue determinada en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4-bacitracina 2.5 mM; El análisis de degradación fue hecho como se menciona en la tabla 1. Los resultados están expresados como fmolas/min/mg prot.  $\pm$  el error estándar de la media.

CONDICION	DKP	ProNH <sub>2</sub>
Tris-BAC	11	3
Tris-BAC-NEM 0.2 mM	8	3
Tris-BAC-NEM 1.0 mM	13	0.2
Tris-BAC-NEM 2.5 mM	13	0.3

Tabla 3. Efecto de la N-ethylmaleimida (NEM) sobre la producción de ProNH<sub>2</sub> y DKP en membranas.

La fracción membranal de cerebro obtenida por el método I fue preincubada en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 con los agentes a ensayar durante 5 minutos a 37°C y la actividad enzimática determinada como se indica en métodos. Los resultados, promedio de dos experimentos, están expresados en fmolas/min/mg prot. El % de variación de los duplicados es del 10%. El análisis de degradación fue hecho como se menciona en la tabla 1.



---

	PGA II
Método I	90 $\pm$ 12(6)
Método II	97 $\pm$ 6(6)

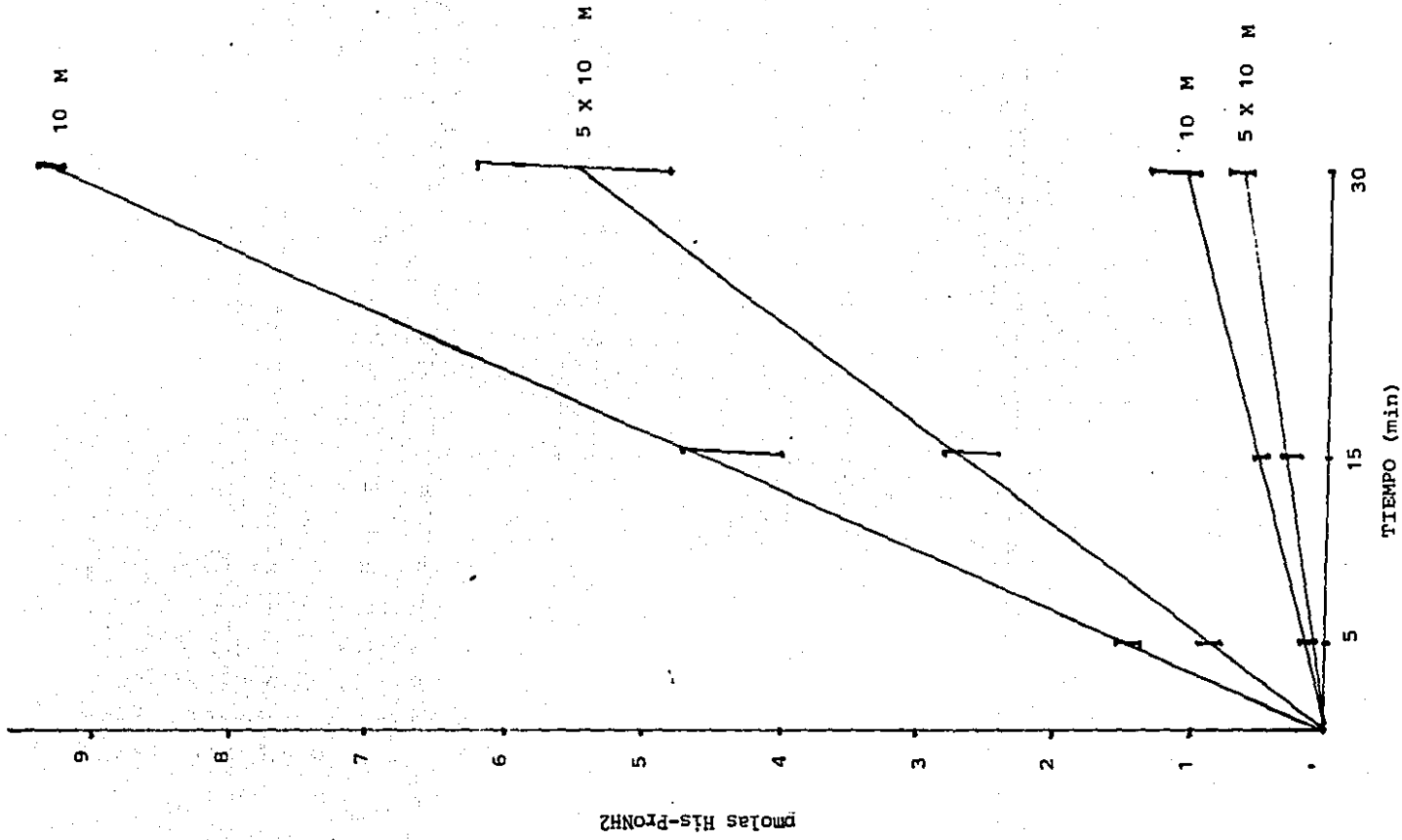
---

Tabla 4. Actividad de la PGAI en membranas de cerebro preparadas por dos métodos de fraccionamiento.

Membranas totales de cerebro fueron obtenidas por el método I y II; la actividad fue determinada en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 en presencia de bacitracina y N-ethylmaleimida 2.5 mM c/u, como se indica en la tabla 1. Tres concentraciones de enzima fueron utilizadas para la determinación. Los resultados están expresados en fmolas de DKP/min/ml.  $\pm$  el error estándar de la media.

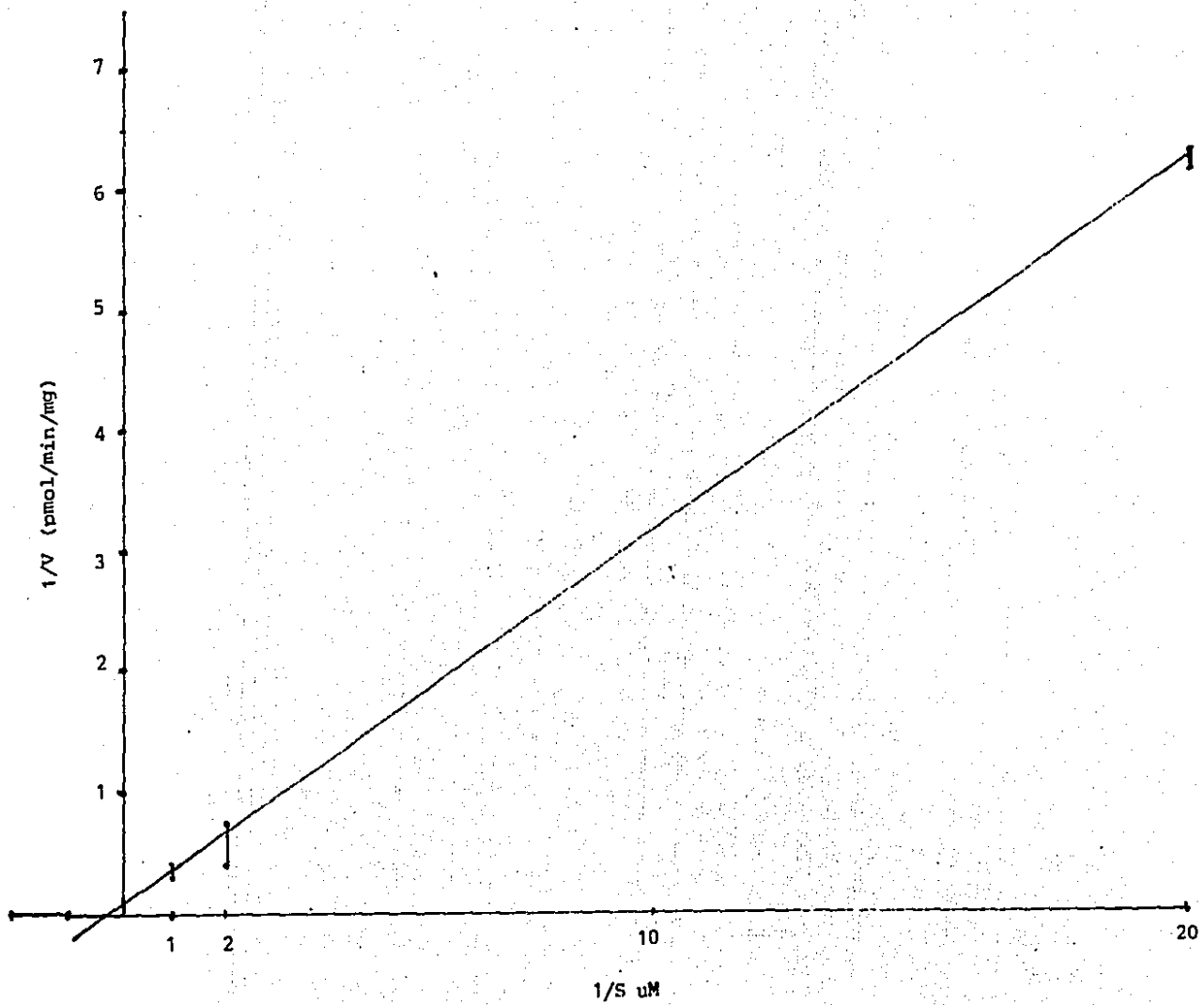
**FIGURA 3. Actividad de la PGA II de membranas totales de cerebro, a diferentes concentraciones de sustrato.**

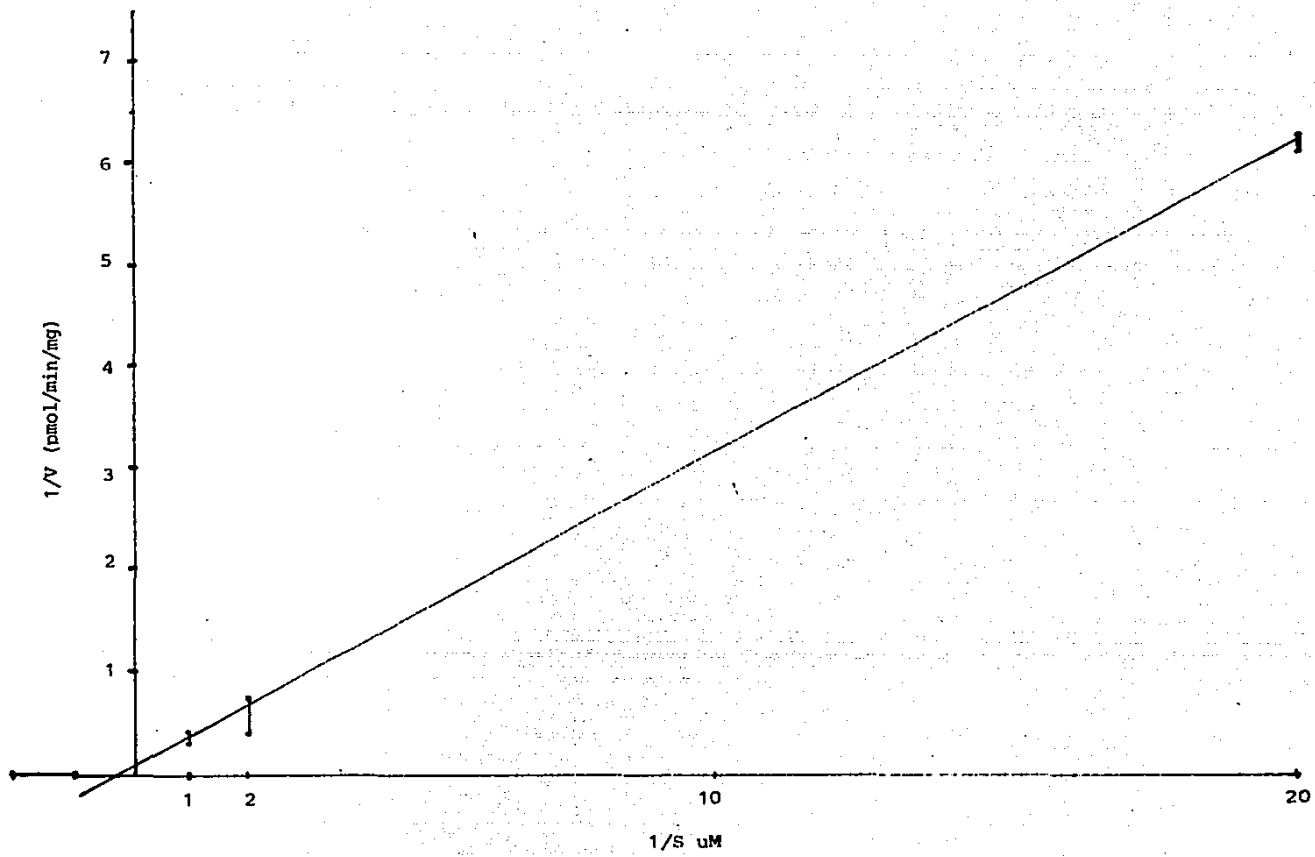
**Membranas de cerebro fueron obtenidas por el método II; la actividad de PGA II y el análisis de degradación se indica en el artículo 1, excepto para la concentración final de TRH. La actividad determinada por triplicado se indica en pmolas de His-ProNH<sub>2</sub>.**



**FIGURA 4.** Gráfica de Lineweaver-Burke de la actividad de PGA II a diferentes concentraciones de TRH.

Membranas totales de cerebro fueron incubadas con buffer Tris HCl 50 mM pH 7.4, por triplicado en presencia de bacitracina y N-ethylmaleimida 2.5 mM, a diferentes concentraciones de TRH ( $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M) El análisis de degradación se hizo como se indica en el artículo 1.





## PGA II

REGION	$10^{-6}$ M	$5 \times 10^{-8}$ M
L. olfatorio.	$6.8 \pm 0.75$ (8)	$261 \pm 55$ (5)
Hipocampo.	$5.4 \pm 1.6$ (6)	$223 \pm 18$ (3)
N. accumbens-septum lateral.	$2.8 \pm 0.6$ (4)	$178 \pm 23$ (3)
Corteza cerebral posterior.	$2.9 \pm 0.6$ (4)	$142 \pm 12$ (4)
Hipotálamo.	$1.7 \pm 0.4$ (4)	$135 \pm 22$ (4)
M. oblongada.	$1.2 \pm 0.2$ (4)	$36 \pm 10$ (4)
Adenohipófisis.	$0.17 \pm 0.07$ (4)	$31 \pm 6$ (4)

Tabla 5. Distribución regional de la PGA II en cerebro de rata a dos concentraciones de sustrato.

La actividad de la PGA II se determinó como se indica en el artículo 1, a excepción de la concentración final de TRH. Los resultados expresados como pmolas (para  $10^{-6}$  M de TRH) o fmolas (para  $5 \times 10^{-8}$  M de TRH) His- $\text{PronH}_2$ /min/mg de prot. muestran la media + la desviación estándar de la media. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

PGA II		
REGIONES	VALOR OBSERVADO	VALOR ESPERADO
Lóbulo Olfatorio.	100 ± 9 (4)	
Médula Espinal.	17 ± 3 (4)	
1 : 1	59 ± 1 (4)	59
1 : 3	42 ± 1 (4)	38
1 : 10	25 (2)	24
1 : 20	19 (2)	21

Tabla 6. Actividad específica de la PGA II en Lóbulo olfatorio, Médula espinal y mezcla de estas dos regiones.

La actividad específica de PGA II fue determinada en membranas de l. olfatorio, m. espinal, mezclas de éstas 1:1, 1:3, 1:10 y 1:20 respectivamente en relación a su contenido de proteínas. Los resultados están expresados como la media + el error estándar de las actividades específicas normalizadas al valor en el l. olfatorio. Las actividades específicas promedio para l. olfatorio fue de 13 pmolas de His-ProNH<sub>2</sub>/min/mg prot. y para m. espinal de 1.8 pmolas de His-ProNH<sub>2</sub>/min/mg prot. El valor esperado significa la actividad específica esperada en las mezclas de ambas regiones, en caso de que no exista algún inhibidor intrínseco de la PGA II en m. espinal.



## REGIONES

## PGA II

## I. olfatorio.

No tratado.	100 $\pm$ 9 (4)
Sobrenadante.	30 $\pm$ 7 (4)
Membranas.	75 $\pm$ 6 (4)
Sob. + Mem.	106 $\pm$ 6 (4)

## M. espinal

No tratado.	100 $\pm$ 9 (4)
Sobrenadante.	36 $\pm$ 9 (4)
Membranas.	80 $\pm$ 4 (4)
Sob. + Mem.	116 $\pm$ 12 (4)

Tabla 7. Efecto del Tritón X-100 sobre la actividad de PGA II.

Membranas de l. olfatorio y m. espinal obtenidas por el método II fueron incubadas con Tritón X-100 1% concentración final, durante 30 minutos a 4°C. Las membranas fueron recuperadas por centrifugación y la actividad de PGA II determinada en el sobrenadante y membranas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media, de las actividades totales normalizadas al control tomado como 100%. El número de determinaciones se indica entre paréntesis.

## DISCUSION

La importancia de un mecanismo rápido de inactivación para los neuropéptidos una vez liberados al espacio sináptico, se basa por un lado, en la disponibilidad de los receptores para poder registrar la llegada de un nuevo mensaje; y por otro lado, en la eliminación de los péptidos remanentes en el espacio extracelular. Conocer el mecanismo fisiológico que regula los niveles extracelulares de estos péptidos, nos permitirá comprender más sobre el funcionamiento de las neuronas peptidérgicas, así como aplicar estos conocimientos al tratamiento de enfermedades mentales.

Se ha descrito la existencia de diversos mecanismos de inactivación para neurotransmisores clásicos, los cuales pudieran funcionar para los neuropéptidos tales como: a) captura del neurotransmisor luego de liberado, por la célula presináptica, postsináptica o célula glial vecina; b) modificación covalente del transmisor liberado; c) hidrólisis enzimática de los transmisores. Por otro lado, para hormonas polipeptídicas se ha descrito la internalización del complejo receptor-transmisor por endocitosis mediada por receptores.

Se ha reportado la existencia de un mecanismo de acumulación para TRH en rebanadas de cerebelo (78) y de hipotálamo (79), fenómeno que ocurre con una  $V_{max}$  muy baja; sin embargo, en sinaptosomas no se ha demostrado la presencia de dicho fenómeno (131, Torres et al no publicado). Además experimentos hechos con sinaptosomas y células gliales muestran que no existe un sistema activo de captura de

Sustancia P (132). El conjunto de estos resultados y otros sugiere que la captura no es un mecanismo de inactivación importante para los neuropéptidos.

Existen algunas evidencias apoyando la hipótesis de que exista internalización de los neuropéptidos, al menos en el eje hipotalámico-adenohipofisario, ya que se ha demostrado que TRH administrado exógenamente es internalizado por los tirotrópos y lactotópos, distribuyéndose en diversos compartimentos subcelulares (133). Por otro lado, se ha reportado que un agonista de LHRH es internalizado en gonadotópos (134) y que al igual que TRH se distribuye subcelularmente en diferentes compartimentos. Sin embargo, queda por definir cual es la vía metabólica de estos péptidos luego de ser internalizados, ya que no se sabe si son degradados por vía lisosomal o por enzimas solubles o no son degradados; así como determinar si este fenómeno es general para estos y otros neuropéptidos en las diversas regiones donde actúan como neurotransmisores.

En cuanto a la modificación covalente, se ha reportado que la forma acetilada de la alfa MSH es la que se libera de la pars intermedia de hipófisis de anfibios (135), no se sabe si esta modificación ocurre justo antes o durante la liberación de la alfa MSH. Se ha demostrado que la forma acetilada de este péptido es más potente que la forma desacetilada; por otro lado, la acetilación de la B-endorfina cancela su actividad biológica (136,137), lo cual sugiere que las modificaciones covalentes, pudieran regular la actividad biológica de los neuropéptidos. Al igual que para el mecanismo de internalización queda por definir si este mecanismo puede generalizarse para otros neuropéptidos y si ocurre en otras regiones del cerebro.

El último mecanismo, la degradación enzimática, es el fenómeno que tiene un gran número de evidencias, apoyandolo como el responsable de la inactivación de los neuropéptidos. Si bien, un neuropéptido puede ser degradado por diversas enzimas, lo importante es determinar cual de ellas juega un papel fisiológico en la inactivación, y si la degradación puede actuar como un elemento regulador de la función del neuropéptido.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las distribuciones regional y subcelular de la PGA II son las adecuadas para apoyar la hipótesis de que la enzima pudiera degradar al TRH in vivo en la sinapsis. Debido a que un neuropéptido puede sufrir diferentes cortes primarios por diversas enzimas, el TRH ofrece una gran ventaja como modelo para el estudio de la degradación enzimática, debido a su pequeño tamaño y a que solo puede sufrir tres cortes primarios.

Existen enzimas capaces de degradar al TRH en suero (tiroliberinasa), en fracción soluble (PGA I y PE) y fracción membranar (PGA II) de cerebro.

La PGA I y la PE están concentradas en la fracción soluble citosólica (89,90); por lo tanto para que éstas tengan un papel en la inactivación del TRH liberado a la sinapsis, debe existir un mecanismo de liberación de las enzimas del cual no existen evidencias (102, Vargas et al no publicado), o bien, actuar luego de un proceso de captura para TRH, fenómeno que ocurre con una  $V_{max}$  muy baja, y cuya relevancia fisiológica no ha sido determinada.

Por otro lado, al inyectar in vivo inhibidores específicos (99,100) para la PGA I y la PE, o incubar tejido nervioso in vitro con ellos, hemos observado que no alteran los niveles endógenos de TRH (101) ni afectan su liberación in vitro (101). Cabe también señalar que PGA I y PE no son tejido específico (91,98), ni son específicas para un neuropéptido (87,94). En base a todas estas características, es poco probable que PGA I y PE sean las responsables de inactivar in vivo al TRH liberado a la sinapsis.

El caso de las enzimas solubles que degradan neuropéptidos parece ser general. Por ejemplo, existen enzimas solubles: aminopeptidasas (138) y dipeptidilaminopeptidasas (139) que degradan encefalinas. Si bien se ha reportado que una de estas aminopeptidasas se libera in vivo en respuesta a estimulación (140), no se ha demostrado su papel fisiológico en la inactivación de las encefalinas. Las enzimas solubles también tienen una variedad de sustratos (141,142), están concentradas en el citosol y no en el sinaptoplasma (138,143), su distribución regional en cerebro es homogénea (118,144) y están presentes en diversos órganos (118,145).

Por lo tanto, la presencia de una enzima membranal en la sinapsis TRHérgica, resulta de suma importancia, como en el caso de diversas peptidasas membranales con posible función fisiológica en inactivar otros neuropéptidos como encefalinas (128), Sustancia P (146) y Neurotensina (147).

Los resultados obtenidos en la estandarización del método para determinar la actividad de PGA II, muestran que las características de las actividades enzimáticas solubles y membranales, determinadas en

nuestras condiciones experimentales, son similares a lo reportado anteriormente. La PGA I es la responsable de la producción de DKP en la fracción soluble, mientras que la aparición de TRH-OH se debe a la PE. Recientemente se ha reportado la presencia de una PPDA soluble (120) sensible a puromicina, que produce His-Pro a partir de His-ProNH<sub>2</sub>. En ninguna de nuestras condiciones fuimos capaces de detectar His-Pro o prolina en la fracción soluble, debido tal vez a una pobre recuperación de las actividades responsables de producir este metabolito. En la fracción membranal la aparición de DKP e His-Pro se debió a la acción de PGA II y PPDA respectivamente.

Tanto en la fracción soluble como membranal se detecta ProNH<sub>2</sub>; Kreider et al (95) sugirió que este metabolito proviene de la degradación directa del TRH. Sin embargo, Matsui et al (121) ha reportado que existe una imidopeptidasa capaz de degradar His-ProNH<sub>2</sub> a ProNH<sub>2</sub> y que es sensible a N-ethylmaleimida. Nosotros demostramos que en ambas fracciones la aparición de ProNH<sub>2</sub> sigue el patrón de producción de DKP, y que su formación es inhibida por N-ethylmaleimida en la fracción membranal, lo cual sugiere que la producción de ProNH<sub>2</sub> se debe a la acción de la imidopeptidasa reportada por Matsui et al (121), es decir a un corte secundario del TRH, antes de que His-ProNH<sub>2</sub> se ciclice a DKP. Por otro lado, la aparición de ProNH<sub>2</sub> en membranas es intrínseca, sin embargo se ha reportado que la imidopeptidasa no se encuentra enriquecida en alguna fracción en particular (90).

La PGA II produce His-ProNH<sub>2</sub>, metabolito que es inactivo, pero una vez ciclizado a DKP puede ser activo en el SNC y adenohipófisis. Sin embargo no se ha demostrado la existencia de receptores para DKP, así como tampoco se encuentra concentrada en terminales nerviosas (148),

por lo que no se sabe todavía que tanto la formación de DKP pueda tomarse como un mecanismo de biotransformación.

A diferencia de la distribución regional homogénea de la PGA I en cerebro (88), la distribución regional de la PGA II es heterogénea, con una diferencia de 10 veces entre la región de mayor actividad (lóbulo olfatorio) y la región con menor actividad (parte cervical del cordón espinal). Este hecho no se debe a la existencia de un inhibidor intrínseco de la PGA II cuya distribución no estuviera homogénea, ya que la actividad en una mezcla de membranas de lóbulo olfatorio y cordón espinal es igual al promedio de las actividades en cada región. Tampoco se debe a un enmascaramiento diferencial de la enzima por componentes membranales, ya que el tratamiento con Tritón X-100 no revela más actividad de PGA II en las dos regiones. Estos resultados concuerdan y amplían lo reportado recientemente por Friedman et al (149), quien demostró que la distribución de la PGA II en cerebro no es homogénea. La distribución heterogénea de la enzima lleva a proponer que la PGA II posee un papel específico; sin embargo, su distribución no concuerda con algunos parámetros de TRH, como su localización, liberación basal o estimulada, o sus receptores. Esta falta de correlación puede deberse a que el sitio de liberación de TRH y sus receptores están lejanos, o bien, que la PGA II puede tener otros sustratos endógenos aun no determinados.

Hemos demostrado que la PGA II o al menos gran parte de ella (70-80%) es una ectoenzima, es decir, que su sitio activo se localiza en la cara externa de membranas plasmáticas sinaptosomales. Esta conclusión se debe a las siguientes observaciones que demuestran que la PGA II cumple con la mayoría de los criterios sugeridos para clasificar una

enzima como ectoenzima (150). Utilizando como modelo sinaptosomas intactos, o bien células intactas fetales corticales en cultivo, se puede detectar la actividad de PGA II con un sustrato que no entra en ellos (131, Torres et al, no publicado). La disminución de la actividad de PGA II por el tratamiento con tripsina se debe a una hidrólisis de ectoproteínas y no a una proteólisis en general; como tampoco se debe a una inactivación de la PGA II por si sola. Por otro lado, la ruptura de los sinaptosomas o células por choque osmótico o tratamientos con detergentes no aumenta generalmente la actividad de la enzima. El aumento de actividad de PGA II por la permeabilización de sinaptosomas con saponina probablemente se debe a un desenmascaramiento de una parte de la actividad membranal más que a una actividad intracelular, como se ha reportado para otras enzimas (151). Finalmente, la PGA II no es liberada de las células en cultivo.

De manera congruente con la conclusión de que la PGA II es ectoenzima, hemos determinado que en rebanadas de hipotálamo la PGA II es la principal enzima degradando TRH. Por otro lado, hemos observado que el uso de inhibidores específicos de la PGA II (99,100), así como LHRH un competidor para la PGA II (105), aumentan los niveles de recuperación del TRH liberado en rebanadas de hipotálamo inducida por despolarización.

Esta topología de la PGA II y los efectos de los inhibidores apoyan la hipótesis de que pudiera inactivar al TRH en sinapsis y que por lo tanto pudiera ser clasificada como una neuropeptidasa, según la clasificación de Schwartz (152). En la tabla 8 se muestran los criterios propuestos para definir a una enzima como neuropeptidasa.



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

TABLA 8. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACION DE NEUROPEPTIDASA (SCHWARTZ, 1981).

Los dos primeros criterios son cumplidos por la PGA II. Para los puntos 3 y 4, existe resultados preliminares donde se ha demostrado que el uso de inhibidores y competidores de la PGA II, protegen al TRH liberado extracelularmente. Por otro lado, se ha demostrado que el estado tiroideo modifica la actividad de la PGA II, al menos a nivel adenohipofisario (126,127). Finalmente los criterios 5 y 6 no han sido explorados.

Las características mencionadas anteriormente para la PGA II, son semejantes en parte a las propiedades a las enzimas membranales que degradan encefalinas (el modelo de inactivación de neuropéptidos más estudiado). En membranas plasmáticas de sinaptosomas existen tres enzimas: dos aminopeptidasas, M y M II (153) y una endopeptidasa 24.11 (encefalinas) (154) capaces de hidrolizar encefalinas. Estas enzimas no son específicas para las encefalinas (155,156), sin embargo, existe aunque no estrictamente, una correlación entre la distribución de estas enzimas, las encefalinas y receptores para las encefalinas (155,157). La aminopeptidasa M II y la endopeptidasa 24.11 tienen una distribución regional heterogénea similar en cerebro; ambas se encuentran enriquecidas en células neuronales (158,159), mostrando que son ectoenzimas (159,160). Existen evidencias de que la endopeptidasa 24.11 esta en vecindad con los receptores opiáceos (161), así como su patrón ontogenético es paralelo al de las encefalinas y receptores opioides (162). El uso combinado de inhibidores de estas enzimas lleva a la recuperación total de las encefalinas liberadas al medio in vitro (163), así como a reproducir la acción biológica de las encefalinas al inyectarlas in vivo (164).

Evidencias semejantes (pero menos extensivas) han sido reportadas para otros neuropéptidos, en donde si bien, las enzimas involucradas no son específicas para un neuropéptido, si presentan una diversidad de propiedades compatibles con la posibilidad de ser verdaderas neuropeptidasas, por lo que la degradación enzimática pudiera ser un mecanismo general de inactivación para los neuropéptidos. Sin embargo, cabe señalar que existe una propiedad que diferencia a la PGA II de todas estas enzimas: su estricta especificidad. Actualmente no se puede definir si la PGA II es un caso particular, o si realmente se le puede considerar como un elemento de otra clase de neuropeptidasa: las "neuropeptidasas específicas".

Hace falta un estudio más detallado acerca de las propiedades de la PGA II para poder determinar su relevancia fisiológica en degradar al TRH en sinapsis. Esto se debe lograr al analizar extensivamente el efecto de inhibidores específicos sobre los efectos fisiológicos del TRH. También será importante producir anticuerpos para la PGA II purificada o utilizar inhibidores específicos radioactivos para determinar con precisión la distribución regional y subcelular de la enzima por autorradiografía o inmunohistoquímica. También podrían ayudarnos a definir la localización celular de la enzima y saber si coexiste en la misma neurona que TRH. Por otro lado, es importante conocer si el patrón ontogenético de la enzima sigue el patrón de aparición de TRH y receptores a TRH, para determinar si la enzima controla los niveles de TRH a lo largo del desarrollo del SNC.

Recientemente se ha reportado (165) que el TRH tiene efectos benéficos cuando se aplica a pacientes con esclerosis amiotrófica lateral (enfermedad en la que ocurre una degeneración de fibras motoras); por lo que el diseño de análogos de TRH más potentes que éste y resistente a la degradación pudiera tener aplicaciones clínicas.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Green J.D. and Harris G.W. (1949) Observation of the Hypophysiportal Vessels of the Living Rat. *J. Physiol.* 108, 359-361.
2. Werman R. (1966) Criteria for the Identification of General Nervous System Transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* 18, 745-766.
3. Scally A.V., Bowers C.Y., Redding T.W. and Barrett J.F. (1966) Isolation of Thyrotropin Releasing Factor (TRH) from Porcine Hypothalamus. *Endocrinology* 78, 726-732.
4. Matsuo H., Baba Y., Nair R.M.G., Arimura A. and Schally A.V. (1971) Structure of Porcine LH and FSH Releasing Hormone I. The Proposed Aminoacid Sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1324-1339.
5. Vale W., Spiess J., Rivier C. and Rivier J. (1981) Characterization of a 41 Residue Ovine Hypotalamic Peptide that Stimulates Secretions of Corticotropin and B-Endorphin. *Science* 213, 1394-1397
6. Bolten P., Esch F., Brazeau P., Ling N. and Guillemin R. (1983) Isolation and Characterization of the Porcine Hypothalamic Growth Hormone Releasing Factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 726-734.
7. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher, M., Rivier J. and Guillemin R. (1973) Hypothalamic Peptides that Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science* 179, 77-78.
8. Green J.D. and Harris G.W. (1947) *J. Endocrinol.* 5, 136-
9. Schally A.V. (1978) Aspects of Hypotalamic Regulation of the Pituitary Gland. *Science* 202, 18-28.
10. Guillemin R. (1978) Peptides in the Brain: The New Endocrinology of the Neuron. *Science* 202, 390-402.
11. Schally A.V., Redding T.W., Bowers C.Y. and Barret J.F. (1969) Isolation and Properties of TRH. *J. Biol. Chem.* 244, 4077-
12. Burgus R., Dunn T.F., Desiderio D., Ward D.N., Vale W. and Gullemin R. (1970) Characterization of Ovine Hypothalamic Hypophysiotropic TSH Releasing Factor. *Nature* 226, 321-325.
13. Folkers K., Euzmann F., Boler J., Bowers C.Y. and Schally A.V. (1969) Discovery of Modification of the Synthetic Tripeptide Sequence of the Thyrotropin Releasing Hormone Having Activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 123-126.

14. Burgus R., Dunn T.F., Desiderio D., Ward D.N., Vale W. and Gullemin R. (1970) Characterization of Ovine Hypothalamic Hypophysiotropic TSH-Releasing Factor. *Nature* 226, 321-325.
15. McKelvy J.F. (1977) Biosynthesis of Hypothalamic Peptides. In: *Hypothalamic Peptide Hormones and Pituitary Regulation*. (Ed. J.D. Porter.), pp. 77-88. Plenum Press, New York.
16. McKelvy J.F., Lin C.J., Chan L., Joshep-Bravo P., Charli J.L., Pacheco M., Paulo M., Neale J. and Barker J. (1979) Biosynthesis of Brain Peptides. In: *Brain Peptides The New Endocrinology*. (A.M. Gotto, Jr. E.J. Peck, Jr. and A.E. Boyd III. Eds.). Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp 183-186.
17. Rupnow J.H., Hinkle P.M. and Dixon J.E. (1979) A Macromolecule Which Gives Rise To Thyrotropin Releasing Hormone. *Biochem. Biophys. Res. Res. Commun.* 89, 721-728.
18. Lechan R.M., Wu P., Jackson I.M.D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G. and Goodman R.H. (1986) Thyrotropin Releasing Hormone Precursors: Characterization in Rat Brain. *Science* 231, 159-161.
19. Busby W.H.Jr., Quackenbush G.E., Humm J., Youngblood W.W. and Kizer J.S. (1987) An Enzyme(s) that Converts Glutaminyll Peptides into Pyroglutamyl Peptides. *J. Biol. Chem.* 262, 8532-8535.
20. Mains R.E., Myers A.C. and Eipper D.A. (1985) Hormonal, Drug and Dietary Factors Affecting Peptidyl Glycine alfa Amidating Monooxygenase Activity in Various Tissues of the Adult Male Rat. *Endocrinology* 116, 2505-
21. Brownstein M.J., Palkovitz M., Saavedra J.M., Bassiri R.M. and Utiger R.D. (1974) Thyrotropin Releasing Hormone in Specific Nuclei of Rat Brain. *Science* 185, 267-269.
22. Elde R. and Hokfelt T. (1979) Localization of Hypophysiotropic Peptides and Other Biologically Active Peptides Within the Brain. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 587-602.
23. Brownstein M.J., Eskay R.L. and Palkovitz M. (1982) Thyrotropin Releasing in the Median Eminence Is in Processes of Paraventricular Nucleus Neurons. *Neuropeptides* 2, 197-201.
24. Palkovitz M. (1984) Topography of Chemically Identified Neurons in the Central Nervous System: Progress in 1981-1983. In: *Neuroendocrine Perspectives* (Eds. E.E. Miller and R.M. Leod.), Vol. 3, 1-69. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
25. Lechan R.M., Wu P. and Jackson I.M.D. (1986) Immunolocalization of the Thyrotropin Relasing Hormone Prohormone in the Rat Central Nervous System. *Endocrinology* 119, 1210-1216..
26. Lechan R.M., Molitch N.E. and Jackson I.M.D. (1983) Distribution of Immunoreactive Human Growth Hormone Like Material and Thyrotropin Releasing Hormone in the Rat Central Nervous System:

Evidence for their Coexistence in the Same Neurons. *Endocrinology* 112: 877-884.

27. Johansson O., Hockfelt T., Pernow B., Jeffcoate S.L., Whitw N., Steinbusem H., Verhofstad A.A.J., Emson, P.C. and Spindel. (1981) *Neuroscience* 6: 1257-1281.

28. Hockfelt T., Fluxe L., Johansson O., Jeffcoate S. and White N. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) Containing Nerve Terminals in Certain Brain Stem Nuclei and in the Spinal Cord. *Neurosci. Lett.* 1: 133-139.

29. Oliver C., Eskay R.L., Ben-Jonathan N. and Porter J.C. (1974) Distribution and Concentration of TRH in the Rat Brain. *Endocrinology* 95: 540-546.

30. Barnea A., Neaves W.B., Cho G. and Porter J.C. (1978) A Subcellular Pool of Hypo-osmotically Resistant Particles Containing Thyrotropin Releasing Hormone, -Melanocyte Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Releasing Hormone in the Rat Hypothalamus. *J. Neurochem.* 30: 937-943.

31. Jackson I.M.D. and Reichlin S. (1974) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH): Distribution in Hypothalamic and Extrahypothalamic Brain Tissues of Mammalian and Submammalian Chordates. *Endocrinology* 95: 854-862.

32. Winokur A., Davis R. and Utiger R.D. (1977) Subcellular Distribution of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) in Rat Brain and Hypothalamus. *Brain Res.* 120: 423-424.

33. Mendez M., Joseph-Bravo P., Cisneros M., Vargas M.A. and Charli J.L. (1987) Regional Distribution of In Vitro Release of Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain. *Peptides* 8: 291-298.

34. Charli J.L., Joseph-Bravo P., Palacios J.M. and Kordon C. (1978) Histamine Induced Release of Thyrotropin Releasing Hormone from Hypothalamic Slices. *Eur. J. Pharmacol.* 52: 401-403.

35. Warberg J., Eskay R.L., Barnea A., Reynolds R.C. and Porter J.C. (1977) Release of Luteinizing Hormone Releasing Hormone and Thyrotropin Releasing Hormone from a Synaptosome Enriched Fraction of Hypothalamic Homogenates. *Endocrinology* 100: 814-825.

36. Joseph-Bravo P., Charli J.L., Palacios J.M. and Kordon C. (1979) Effect of Neurotransmitters on the In Vitro Release of Immunoreactive Thyrotropin Releasing Hormone from Rat Mediobasal Hypothalamus. *Endocrinology* 104: 801-806.

37. Hirooka Y., Hollander C.S., Suzuki S., Ferdinand P. and Juan S.I. (1978) Somatostatin Inhibits Release of Thyrotropin Releasing Factor from Organ Cultures of Rat Hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4509-4514.

38. Tapia-Arancibia L., Arancibia S. and Astier H. (1984) k -Induced

Thyrotropin Releasing Hormone Release from Superfused Mediobasal Hypothalamus in Rats. Inhibition By Somatostatin. *Neuroscience Letters* 45, 47-52.

39. Annunziato L., Di Renzo G., Lombardi G., Scopacasa F., Schettini G., Preciosi P. and Scapagnini U. (1977) The Role of Central Noradrenergic Neurons in the Control of Thyrotropin Secretion in the Rat. *Endocrinology* 100, 738-744.
40. Labrie R., Barden N., Portier G. and De Lean A. (1972) Binding of Thyrotropin Releasing Hormone to Plasma Membranes of Bovine Anterior Pituitary Gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 283-287.
41. Tan K.N. and Tashjian A.M. Jr. (1981) Receptor Mediated Release of Plasma Membrane Associated Calcium and Stimulation of Calcium Uptake by Thyrotropin Releasing Hormone in Pituitary Cells In Culture. *J. Biol. Chem.* 256, 8994-9002.
42. Burt D.R. and Snyder S.N. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone (TRH): Apparent Receptor Binding in Rat Brain Membranes. *Brain Res.* 93, 309-329.
43. Burt D.R. and Taylor R.L. (1980) Binding Sites for Thyrotropin Releasing Hormone in Sheep Nucleus Accumbens Resemble Pituitary Receptors. *Endocrinology* 106, 1416-1423.
44. Fink G., Koch Y. and Ben Aroya N. (1983) TRH in Hypophysial Portal Blood: Characteristics of Release and Relationship to Thyrotropin and Prolactin Secretion. In: *Thyrotropin Releasing Hormone* (Eds. E.C. Griffiths and G.W. Bennett.), pp. 127-143. Raven Press, New York.
45. Tashjian A.H. Jr. Barousky N.J. and Jensen D.K. (1971) Thyrotropin Releasing Hormone: Direct Evidence for Stimulation of Prolactin Production by Pituitary Cells In Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 516-523.
46. Potter E., Nicolaisen A.K., Ong E.S., Evans R.M. and Rosenfeld M.G. (1981) Thyrotropin Releasing Hormone Exerts Rapid Nuclear Effects to Increase Production of the Primary Prolactin mRNA Transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 6662-6666.
47. Dumont J.E. and Lamv F. (1980) The Regulation of Thyroid Cell Metabolism, Function, Growth and Differentiation. In: *The Thyroid Gland.* (Ed. M. De Visscher.), pp. 153-167. Raven Press, New York.
48. Blackwell R.E. and Guillemin R. (1973) Hypothalamic Control of Adenohypophyseal Secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 35, 357-390.
49. Guillemin R., Yamazaki E., Gard A., Jutisz M. and Sakiz E. (1963) In Vitro Secretion of Thyrotropin (TSH): Stimulation by a Hypothalamic Peptide (TRF). *Endocrinology* 73, 564-572.
50. Hinkle F.M., Ferrone N.H. and Schonbrunn A. (1981) Mechanism of Thyroid Hormone Inhibition of Thyrotropin Releasing Hormone Action



Endocrinology 108: 199-205.

51. Martin J.B., Boshans R. and Reichlin S. (1970) Feedback Regulation of TSH Secretions in Rats With Hypothalamic Lesions. *Endocrinology* 87: 1032-1037.
52. Padmanabhan V., Kesner J.S. and Convey E.M. (1981) Effects of Triiodothyronine and Thyroxine on Thyrotropin and Prolactin Secretion from Bovine Pituitary Cells In Vitro. *Endocrinology* 108: 226-231.
53. Shueni M.A., Chin W.W., Habener J.F. and Ridgway E.C. (1985) Transcriptional Regulation of the Thyrotropin Subunit Genes by Thyroid Hormone. *J. Biol. Chem.* 260: 2900-2903.
54. Croyle M.L. and Maurer R.A. (1984) Thyroid Hormone Decreases Thyrotropin Subunit mRNA Levels in Rat Anterior Pituitary. *DNA* 3: 231-235.
55. Scanlon M.F. (1979) *Clin. Endocrinol.* 10: 7-
56. Grosvenor C.E. and Mena F. (1980) Evidence that Thyrotropin Releasing Hormone and Hypothalamic Prolactin Releasing Factor May Function in the Release of Prolactin in the Lactating Rat. *Endocrinology* 107: 263-269.
57. Ridgway E.C., Klubansky A., Martorana M.A., Milbury P., Kieffer J.D. and Chin W.W. (1983) The Effect of Somatostatin on the Release of Thyrotropin and its Subunits from Bovine Anterior Pituitary Cells In Vitro. *Endocrinology* 112: 1937-1942.
58. Taurog A., Harris G.W., Tong W. and Chaidoff I.L. (1956) *Endocrinology* 59: 34-
59. Kizer J.S., Palkovitz M., Tappaz M., Kehabian J. and Brownstein N.J. (1976) Distribution of Releasing Factors, Biogenics Amines and Related Enzymes in the Bovine Median Eminence. *Endocrinology* 98: 685-695.
60. Segerson T.P., Kauer J., Wolfe H.C., Moltaker H., Wu P., Jackson I.M.D. and Lechan R.M. (1987) Thyroid Hormone Regulates TRH Biosynthesis in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus *Science* 238: 78-80.
61. Montoya E., Seibel M.J. and Wilber J.F. (1975) Thyrotropin Releasing Hormone Secretory Physiology: Studies by Radioimmunoassay and Affinity Chromatography. *Endocrinology* 96: 1413-1418.
62. Mueller G.P., Franco F.S., Reichlin S. and Jackson I.M.D. (1977) *Clin. Res.* 25: 298 A.
63. Jordan D., Perrin F. and Mornex R. (1983) Circannual Variations of TSH Circadian Rhythm Parameters in the Rat. *Neuroendocrinol.* 36: 17-20.

64. Collu R., Du Ruisseau P., Taché Y. and Ducham J.P. (1977) *Endocrinol.* 101, 1391-
65. Grosvenor C.E., Mena F. and Whitworth N.S. (1979) The Secretion Rate of Prolactin in the Rat During Suckling and its Metabolic Clearance Rate After Increasing Intervals of Nonsuckling. *Endocrinol.* 104, 372-376.
66. De Greef W.J. and Viseer T.J. (1981) Evidence for the Involvement of Hypothalamic Dopamine and Thyrotropin Releasing Hormone in Suckling Induced Release of Prolactin. *J. Endocrinol.* 91, 213-223.
67. Grosvenor C.E. and Mena F. (1981) *J. Anim. Sci.* 52, suppl. 1, 115-136.
68. Sharp T., Bennett G.W. and Marsden C.A. (1982) Thyrotropin Releasing Hormone Analogues Increase Dopamine Release from Slices of Rat Brain. *J. Neurochem.* 39, 1763-1766.
69. Bennett G.W., Sharp T., Brazell M. and Marsden C.A. (1983) TRH and Catecholamine Neurotransmitter Release in the Central Nervous System. In: *Thyrotropin Releasing Hormone* (Eds. E.C. Griffiths and G.W. Bennett.), pp. 253-269. Raven Press, New York.
70. Miyamoto M., Narumi S., Nagai Y., Shina T. and Nagawa Y. (1979) Thyrotropin Releasing Hormone: Hyperactivity and Mesolimbic Dopamine System in Rats. *Jap. J. Pharmacol.* 29, 335-
71. Yarbrough G.G. (1976) TRH Potentiates Excitatory Actions of Acetylcholine on Cerebral Cortical Neurones. *Nature* 263, 523-524.
72. Yarbrough G.G. (1982) Thyrotropin Releasing Hormone and DSN Cholinergic Neurons. *Life Science* 33, 11-118.
73. Ono H. and Fukuda H. (1982) Ventral Root Depolarization and Spinal Reflex Augmentation by a TRH Analog in Rat Spinal Cord. *Neuropharmacology* 21, 739-744.
74. Schmidt-Achert K.M., Askansas V. and Engel W.K. (1984) Thyrotropin Releasing Hormone Enhances Choline Acetyltransferase and Creatine Kinase in Cultured Spinal Ventral Horn Neurons. *J. Neurochem.* 43, 586-589.
75. Rastogi R.B. Thyrotropin Releasing Hormone Influences on Behaviour: Possible involvement of Brain Monoaminergic System. In: *Central Nervous System of Hypothalamus Hormones and Other Peptides.* (Eds. R. Collu, J.R. Ducharme, A. Barbeau and J.R. Rochefort.), pp. 123-149. Raven Press. New York.
76. Sharp T., Tulloch I.F., Bennett G.W., Marsden C.A., Metcalf G. and Dettmar P.W. (1984) Anxiolytic Effects of Central Injected TRH and Analogues of TRH in the Pentobarbitone Anaesthetized Rat. *Neuropharmacol.* 23, 339-349.
77. Yehuda S. and Kastin A.J. (1980) Peptides and Thermoregulation.

- Neurosci. Biobehav. Rev. 4, 459-471.
78. Pacheco M.F., Woudward D.J., McKelvy J.F. and Griffin W.A. (1981) TRH in the RAT Cerebellum II. Uptake by Cerebellar Slices. Peptides 2, 253.
  79. Charli J.L., Fong G., McKelvy J.F. and Joseph-Bravo P. (1984) Accumulation of Thyrotropin Releasing Hormone by Rat Hypothalamic Slices. J. Neurochem. 42, 981-986.
  80. Bassiri R.M. and Utiger R.D. (1972) Serum Inactivation of the Immunological and Biological Activity of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH). Endocrinology 91, 657-664.
  81. Bauer K. And Lipman F. (1976) Attempts Toward the Biosynthesis of the Thyrotropin Releasing Hormone and Studies on its Breakdown in Hypothalamic Tissue Preparations. Endocrinology 99, 230-245.
  82. Prasad C. and Peterkofsky A. (1976) Demonstration of Pyrroglutamylopeptidase and Amidase Activities Toward Thyrotropin Releasing Hormone in Hamster Hypothalamus Extracts. J. Biol. Chem. 251, 3229-3234.
  83. Bauer K., Graf K.J., Faivre-Bauman A., Beier S., Tixier-Vidal A. and Kleinkauf H. (1978) Inhibition of Prolactin Secretion by Histidyl Proline Diketopiperazine. Nature 274, 174-175.
  84. Armentrout R.W. (1969) Rat Liver Pyrrolidonyl Peptidase. Biochim. Biophys. Acta 191, 756-759.
  85. Bauer K., Kleinkauf H. and Flohe L. (1981) Degradation of TRF and TRF Analogues by Brain and Serum Enzyme. In: Structure and Activity of Natural Peptides. (Eds. W. Volter and G. Weitzel.), pp. 437-477. Walter de Gruyter, Berlin.
  86. Busby W.H.Jr., Youngblood W.W. and Kizer J.S. (1982) Studies of Substrate Requirements, Kinetic Properties and Competitive Inhibitors of the Enzymes Catabolizing TRH in Rat Brain. Brain Res. 242, 267-270.
  87. Bauer K. (1983) Biochemical Properties of TRH Inactivating Enzymes. In: Thyrotropin Releasing Hormone (E.C. Griffiths and G.W. Bennett, Eds.), Raven Pres. New York, pp 103-107.
  88. Prasad C., Mori M., Wilber J.F., Pierson W., Pegues J. and Jayarama A. (1982) Distribution and Metabolism of Cyclo (His-Pro): A New Member of the Neuropeptide Family. Peptides 3, 591-598.
  89. Brown P. and O Quinn G. (1983) An Evaluation of the Role of a Pyrroglutamyl Peptidase, a Post Proline Cleaving Enzyme and a 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.
  90. Torres H., Charli J.L., Gonzalez-Noriega A., Vargas M.A. and

- Joseph-Bravo P. (1986) Subcellular Distribution of the Enzymes Degrading Thyrotropin Releasing Hormone and Metabolites in Rat Brain. *Neurochem. Int.* 9, 103-110.
91. Szeuzuk A. and Kwiatowska J. (1970) Pyrrolidonyl Peptidase in Animal, Plants and Human Tissues. *Eur. J. Biochem.* 15, 92-96.
  92. Rupnow J.H., Taylor W.L. and Dixon J.E. (1979) Purification and Characterization of a Thyrotropin Releasing Hormone Deamidase from Rat Brain. *Biochem.* 18, 1206-1211.
  93. Yoshimoto T., Orlowsky R.C. and Walter R. (1977) Postproline Cleaving Enzyme: Identification as Serin Protease Using Active Site Specific Inhibitors. *Biochem.* 16, 2942-2948.
  94. Orlowsky M., Wilk E., Pearce S. and Wilk S. (1979) Purification and Properties of a Prolyl Endopeptidase from Rabbit Brain. *J. Neurochem.* 33, 461-469.
  95. Braider N.S., Minokur A. and Krieger N.R. (1981) Pathways of TRH Degradation in Rat Brain. *Neuropeptides* 1, 455-463.
  96. Koshiya K., Kato T., Tanaka R. and Kato T. (1984) Brain Peptidases Their Possible Neural and Glial Localization. *Brain Res.* 324, 261-270.
  97. Koshiya K., Okada M., Imai K., Kato T., Tanaka R., Hatanaka H. and Kato T. (1985) Localization of Angiotensin Converting Enzyme, Prolyl Endopeptidase and other Peptidases In Cultured Neuronal or Glial Cells. *Neurochem. Int.* 7, 125-130.
  98. Hersh L.B. and McKelvy J.F. (1979) Enzymes involved in the Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) and Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) in Bovine Brain. *Brain Res.* 168, 553-564.
  99. Wilk S., Friedman T.C. and Kline T.B. (1985) Pyroglutamyl Diazomethyl Ketone: Potent Inhibitor of Mammalian Pyroglutamyl Peptide Hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 662-668.
  100. Friedman T.C., Orlowsky M. and Wilk S. (1984) Prolyl Endopeptidase: Inhibition in vivo by N-Benzylloxycarbonyl-prolyl-prolinal. *J. Neurochem.* 42, 237-241.
  101. Charli J.L., Mendez M., Joseph-Bravo P. and Wilk S. (1987) Specific Inhibitors of Pyroglutamyl Peptidase I and Prolyl Endopeptidase do not Change the In Vitro Release of TRH or its Content in Rodent Brain. *Neuropeptides* 9, 373-378.
  102. Faivre-Bauman K., Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A. and Bauer K. (1986) Possible Role of Neuropeptide Degrading Enzymes on Thyrliberin Secretion in Fetal Hypothalamic Cultures Grown in Serum Free Medium. *Neuropeptides* 7, 125-137.
  103. Joseph-Bravo P., Loudes C., Charli J.L. and Kordon C. (1979)

- Subcellular Distribution of Brain Peptidases Degrading Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) and Thyrotropin Releasing Hormone (TRH). *Brain. Res.* 166, 321-329.
104. Greaney A., Phelan J. and O'Cuinn G. (1980) Localization of Thyroliberin Pyroglutamyl Peptidase on Synaptosomal Membrane Preparations of Guinea Pig Brain Tissue. *Biochem. Soc. Trans.* 8, 423.
  105. Garat B., Miranda J., Charli J.L. and Joseph-Bravo F. (1985) Presence of a Membrane Bound Pyroglutamyl Amino Peptidase Degrading Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain. *Neuropeptides* 6, 27-40.
  106. O'Connor B. and O'Cuinn G. (1984) Localization of a Narrow Specificity Thyroliberin Hydrolyzing Pyroglutamate Aminopeptidase in Synaptosomal Membranes of Guinea Pig Brain. *Eur. J. Biochem.* 144, 271-278.
  107. O'Connor B. and 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.
  108. O'Connor B. and O'Cuinn G. (1987) Active Site Studies on a Narrow Specificity Thyroliberin Hydrolyzing Pyroglutamate Aminopeptidase Purified from Synaptosomal Membrane of Guinea Pig Brain. *J. Neurochem.* 49: 676-680.
  109. Will S., Friedman T.C. and Milk E.K. (1986) Purification and Properties of Rabbit Brain Thyroliberinase, a Membrane Bound Thyrotropin Releasing Hormone Degrading Enzyme. *FASEB Abstract Form* (April 1986).
  110. Bauer K., Nowak P. and Kleinkauf H. (1981) Specificity of a Serum Peptidase Hydrolyzing Thyroliberin at the Pyroglutamyl Histidine Bond. *Eur. J. Biochem.* 118, 173-176.
  111. Bauer K. and Nowak P. (1979) Characterization of a Thyroliberin Degrading Serum Enzyme Catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the Pyroglutamyl Histidine Bond. *Eur. J. Biochem.* 99, 239-246.
  112. Friedman T.C. and Will S. (1985) The Effect of Inhibitors of Prolyl Endopeptidase and Pyroglutamyl Peptide Hydrolase on TRH Degradation in Rat Serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132, 787-793.
  113. Bauer K. (1976) Regulation of Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone By Thyroid Hormones. *Nature* 259, 591-593.
  114. White N., Jeffcoate S.L., Griffiths E.C. and Hopper K.C. (1976) Effect of Thyroid Status on the Thyrotropin Releasing Hormone Degrading Activity of Rat Serum. *J. Endocrinol.* 71, 13-19.
  115. Neary J.T., Kieffer J.D., Federico P., Mover H., Maloof F. and

- Soodal, N. (1976) Thyrotropin Releasing Hormone: Development of Inactivation System During Maturation of the Rat. *Science* 193, 402-405.
116. Oliver, C., Parker, C.R. and Porter, J.C. (1977) Developmental Changes in the Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone by the Serum and Brain Tissues of the Male Rat. *J. Endocrinol.* 74, 339-340.
117. O'Connor, E. and O'Cuinn, G. (1986)  $\alpha$ -Post Proline Dipeptidyl Aminopeptidase from Synaptosomal Membranes of Guinea Pig Brain. *Eur. J. Biochem.* 154, 329-335.
118. Lee, C., and Snyder, S.H. (1982) Dipeptidyl Aminopeptidase III of Rat Brain. *J. Biol. Chem.* 257, 12043-12050.
119. Yoshimoto, T. and Walter, R. (1977) Postproline Dipeptidyl Aminopeptidase (Dipeptidyl Aminopeptidase IV) from Lamb Kidney. *Biochem. Biophys. Acta.* : 391-401.
120. Browne, F. and O'Cuinn, G. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 6147-6154.
121. Matsui, T., Prasad, C. and Peterkofsky, A. (1979) Metabolism of Thyrotropin Releasing Hormone in Brain Extracts. *J. Biol. Chem.* 254, 2439-2445.
122. Brabant, G., Wickings, E.J. and Nieschlag, E. (1981) The TRH Metabolite Histidyl-Proline-Diketopiperazine (DKP) Inhibits Prolactin Secretion in Male Rhesus Monkeys. *Acta Endocrinol.* 98, 189-194.
123. Bauer, K., Graf, K.J., Faivre-Bauman, A., Beier, S., Tixier-Vidal, A. and Kleinkauf, H. (1978) Inhibition of Prolactin Secretion by Histidyl-Proline-Diketopiperazine. *Nature* 274, 174-175.
124. Charli, J.L., Garat, B., Martinez-Escalera, G., Ponce, G., Miranda, J. and Joseph-Bravo, P. (1984) In *Frontiers in Prolactin Secretion: A Multidisciplinary Approach* (Eds. F. Mena, and C. Valverde.), pp. 239-248. Academic Press, New York.
125. Jackson, I.M.D., Papapetrou, P.D. and Reichlin, S. Metabolic Clearance of Thyrotropin Releasing Hormone in the Rat in Hypothyroid and Hyperthyroid States: Comparison with Serum Degradation in Vitro. *Endocrinology* (1979) 104, 1292-1298.
126. Bauer, K. (1987) Adenohypophyseal Degradation of Thyrotropin Releasing Hormone Regulated by Thyroid Hormones. *Nature* 330: 375-377.
127. 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* (en prensa).
128. Schwartz, J.C. (1983) Metabolism of Enkephalins and the Inactivating Neuropeptidase Concept. *Trens. Neurosci.* 6, 45-48.

129. Bray G.A. (1970) In: The Current State of Liquid Scintillation Counting. (Ed. E.D. Bennett.). pp. 170. Grune and Stratton, New York.
130. Lowry O.H. and Rosenbrough N.J. (1951) Protein Measurement With Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
131. Parker C.R., Neaves W.B., Barnea A. and Porter J.C. (1977) Studies on the Uptake of H-Thyrotropin Releasing Hormone and its Metabolites by Sinaptosome Preparations of the Rat Brain. *Endocrinology* 101, 66-75.
132. Segawa T., Nakata Y., Yajima H. and Kitagawa K. (1978) Further Observation on the Lack of Active Uptake System for Substance P in the Central Nervous System. *J. Pharmacol.* 27, 573-580.
133. Morel G., Gourdjil D., Grousselle D., Brunet N., Tixier-Vidal A. and Duhols P.M. (1985) Immunocytochemical Evidence for in vivo Internalization of Thyroliberin into Rat Pituitary Target Cells. *Neuroendocrinology* 41, 312-320.
134. Duello T.H., Nett T.H. and Farquhar M.G. (1983) Fate of a Gonadotropin Releasing Hormone Agonist Internalized by Rat Pituitary Gonadotrophs. *Endocrinology* 112, 1-10.
135. Martens G.J.M., Jenks B.G. and Van Overbeeke A.P. (1981) N-acetylation is Linked to -MSH Release from Pars Intermedia of the Amphibian Pituitary Gland. *Nature* 294, 558-560.
136. Akil H., Young E., Watson S.J. and Goy D.H. (1981) Opiate Binding Properties of Naturally Occurring N and C Terminus Modified Beta-Endorphins. *Peptides* 2, 289-292.
137. Smyth D.G., Massoy D.E. and Zakarian S. (1979) Endorphins Are Stored in Biologically Active and Inactive forms. Isolation of alpha-N-acetyl Peptides. *Nature* 279, 252-254.
138. Harsh L.B. (1982) Degradation of Enkephalins. The Search for an Enkephalinase. *Molecular and Cellular Biochemistry* 47, 35-43.
139. Van Amsterdam J.G.C., Van Buuren K.J.H. and Soudijn W. (1983) Purification and Characterization of Enkephalin degrading Enzymes from Calf Brain Striatum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 632-641.
140. Neuroscience 1985.
141. Hayahhi, M. (1978) *J. Biochem.* 81: 1363-1372.
142. Van Buuren K.J.H., Van Amsterdam J.G.C., Mulder J.R.A. and Soudijn W. (1985) Isolation and Characterization of an Enkephalin Dipeptidyl Aminopeptidase from Calf Brain Striatum. *Neuropeptides* 6, 381-389.

143. Horsthemke B., Hampröcht B. and Bauer K. (1983) Heterogenous Distribution of Enkephalin degrading Peptidases Between Neuronal and Glial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 423-429.

144. Hui K., Wang Y., Wong K., Tsai H. and Lajtha A. (1981) Regional and Subcellular Distribution of Met and Leu Enkephalin Degrading Activity in Rat Brain. *Neuropeptides* 1, 167-173.

145. Palmieri F.E., Petrelli J.J. and Ward P.E. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 2309-2317.

146. Lee C., Sandburg R.E.B., Hanley M.R. and Iversen L.L. (1981) Purification and Characterization of a Membrane Bound Substance P Degrading Enzyme from Human Brain. *Eur. J. Biochem.* 114, 315-327.

147. Chesler F., Vincent P. and Kitabgi P. (1986) Purification and Characterization of a Novel Neurotensin Degrading Peptidase from Rat Brain Synaptic Membrane. *J. Biol. Chem.* 261, 11274-11281.

148. Yanagisawa T., Prasad C. and Perterkofsky A. (1980) The Subcellular and Organ Distribution and Natural form of Histidyl-Proline-Diketopiperazine in Rat Brain Determined by a Specific Radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 255, 1290-

149. Friedman T.C. and 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.

150. Karnovsky N.L. (1986) Ectoenzymes. Their Modulation and Similarity. In *Cellular Biology of Ectoenzymes*. (Eds. Kreutzberg G.W. et al.). pp. 3-13. Springer-Verlag Berlin.

151. De Pierre J.W. and Karnovsky M.L. (1974) Ectoenzymes of the Guinea-Pig Polymorphonuclear Leucocyte II. Properties and Suitability as Markers for the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* 249, 7121-7129.

152. Schwartz J.C., Malfroy B. and De la Baume S. (1981) Biological Inactivation of Enkephalins and the Role of Enkephalin dipeptidyl Carboxypeptidase (Enkephalinase) as Neuropeptidase. *Life Sciences* 29, 1715-1740.

153. Giros B., Gros C., Solhonne B. and Schwartz J.C. (1986) Characterization of Aminopeptidases Responsible for Inactivating Endogenous (Met) Enkephalin in Brain Slices Using Peptidase Inhibitors and Anti-Aminopeptidase M Antibodies. *Mol. Pharmacol.* 29, 281-287.

154. Malfroy B., Swertz J.P., Guyon A., Roques B.P. and Schwartz J.C. (1978) High Affinity Enkephalin Degrading Peptidase in Brain is Increased After Morphine. *Nature* 276, 523-526.

155. Hersh L.B. (1985) Characterization of Membrane Bound Aminopeptidases from Rat Brain. Identification of the Enkephalin



Degrading Aminopeptidase. *J. Neurochem.* 44, 1427-1435.

156. Turner A.J., Matsas R. and Kenny A.J. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 1347-1356.
157. Waksman G., Hamel E., Fournie-Zaluski M. and Roques B.P. (1986) Autoradiography Comparison of the Distribution of the Neutral Endopeptidase Enkephalinase and of m and d opioid Receptor in Rat Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1523-1527.
158. Waksman G., Hamel E., Delay-Goyet E. and Roques B.P. (1986) Neuronal Localization of the Neutral Endopeptidase "Enkephalinase" in Rat Brain Revealed by Lesions and Autoradiography. *Embo. J.* 5, 3163-3166.
159. Hazum E., Chang K. and Cuatrecasas P. (1979) Rapid Degradation of (<sup>3</sup>H)-Leucine-Enkephalin by Intact Neuroblastoma Cells. *Life Sciences* 24, 137-144.
160. Kenny A.A., Fulcher I.S., Mc Gill K.A. and Kershaw D. (1983) Proteins of the Kidney Microvillar Membrane. Reconstitution of Endopeptidase in Liposomes Shows That it is a Short-Stalked Protein. *Biochem. J.* 211, 755-762.
161. Malfroy B., Swertz J.P., Llorens C. and Schwartz J. (1979) Regional Distribution of a High-Affinity Enkephalin Degrading Peptidase ("Enkephalinase") and Effects of Lesions Suggest Localization in the vicinity of Opiate Receptors in Brain. *Neuroscience Letters* 11, 329-334.
162. De la Baume S., Patey G., Gros C. and Schwartz J.C. (1980) Ontogenesis of Systems Enkephalinergic. In *Endogenous Opiate Agonists and Antagonists* (Ed. E.L. Way.). pp. 179-182. Pergamon Press. Oxford.
163. De la Baume S., Gros C., Yi C., Chaillet P., Marciais-Collado H., Constantin I. and Schwatz J.C. (1982) Selective Participation of Both "Enkephalinase" and Aminopeptidase Activities in the Metabolism of Endogenous Enkephalins. *Life Sci.* 31, 1735-1756.
164. Constantin I., Vlaculescu A., Chaillet P., Natan L., Aveaux D. and Schwartz J.C. (1986) Dissociated Effects of Inhibitors of Enkephalin-Metabolising Peptidases or Naxalone on Various Nociceptive Responses. *Eur. J. Pharmacol* 123, 37-44.
165. Munsat T.L., Taft J. and Kasdon D. (1987) Intrathecal Thyrotropin Releasing Hormone in Emiotrophic Lateral Sclerosis. *Neurological Clinics* 5, 159-170.

NSL 04753

## Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain

Miguel Vargas, Milagros Mendez, Miguel Cisneros, Patricia Joseph-Bravo and Jean Louis Charli

*Departamento de Bioquímica de Proteínas, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca (México)*

(Received 3 January 1987; Revised version received and accepted 15 April 1987)

**Key words:** Thyrotropin-releasing hormone; Peptidase; Membrane; Pyroglutamate amino peptidase; Brain regional distribution

The brain regional distribution of membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat was studied using a specific radiometric assay. The distribution was not homogeneous: a 10-fold difference was observed between regions. The highest activity was detected in olfactory bulb while the lowest was in the cervical part of spinal cord. There was no correlation with the regional distribution of enzyme activity vs TRH levels, previously reported TRH receptors or *in vitro* TRH release. The differential distribution of this enzyme is consistent with the hypothesis that it is responsible for extracellular degradation of neuroactive peptides.

Thyrotropin releasing hormone [pyro-Glu-His-ProNH<sub>2</sub>; TRH] is probably involved in information transfer in the central nervous system [12]. If so, its extracellular levels should be controlled by rapid inactivation processes. Although we have previously shown that rat hypothalamic slices can accumulate [<sup>3</sup>H-Pro]TRH by a process similar to the uptake of neurotransmitters [3], the tissue to medium ratio and  $V_{max}$  were low so that its relevance in inactivating extracellular TRH is not yet demonstrated. On the other hand, TRH can be degraded by various brain peptidases *in vitro*. Two of these, pyroglutamate aminopeptidase (PGAs) (EC 3.4.11.8) and prolyl endopeptidase (PE) (EC 3.4.21.26) are soluble [1] while another is a membrane-bound pyroglutamate amino peptidase (PGAm) of narrow specificity [5, 11]. This enzyme is localized on synaptosomal membranes [11, 14] and may be responsible for extracellular inactivation of TRH. In the present investigation, we have studied the regional distribution of the PGAm in brain and compared it with the regional distribution of TRH like-immunoreactivity (TRH-LI), TRH receptors or TRH release.

*Correspondence:* J.L. Charli, CEINGEBI/UNAM, Apartado Postal 70479, Mexico D.F., 04510, Mexico.

Animals used were male adult Wistar rats given a standard diet (Purina chow) and tap water ad libitum. Brain regions were rapidly dissected, weighed and processed either for radioimmunoassay (RIA) or enzymatic assay. For RIA, tissues were sonicated in 20% acetic acid, centrifuged at 12,100 g for 10 min at 4°C and the supernatant evaporated. The residue was extracted with 1 ml 90% methanol, centrifuged, the supernatant dried and an aliquot of the residue subjected to RIA as previously described [7, 10].

For quantification of the PGAm activity, the tissue was homogenized with a Potter-Elvehjem homogenizer in 10% (w/v) Tris-HCl, 0.05 M, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 1000 g for 15 min the pellet homogenized with the buffer and centrifuged again. The two supernatants were pooled and centrifuged at 12,000 g for 15 min. The 12,000-g pellet was washed and homogenized in Tris buffer. All these steps were performed at 4°C. An aliquot was taken for digestion with NaOH and protein determination [8]. The rest was diluted 1:1 with buffer containing bacitracin and *N*-ethylmaleimide (final concentration: 2.5 mM). This buffer allows the specific determination of the PGAm activity [14] by inhibiting the activities of PGAs, PE [16] as well as of postproline dipeptidyl aminopeptidase [5] and histidylprolineamide imidopeptidase [9] which could degrade His-ProNH<sub>2</sub>. Two further enzyme dilutions were used to ensure linearity and the best approximation to initial velocity. Before enzyme assay, the membranes (25 µl) were preincubated for 5 min at 37°C. Incubation was for 5 min at 37°C in the presence of 100,000 cpm [<sup>3</sup>H-Pro]TRH (New England Nuclear, 100 Ci/mmol) (added in 5 µl). At time 0 and 5 min, 5-µl aliquots were taken and spotted directly on cellulose phosphate paper (Whatman P81). The ascending chromatography was developed in 1 M acetic acid [2]. In this system His-ProNH<sub>2</sub> does not migrate while TRH, His-Pro diketopiperazine, pyroGlu-His-Pro, Pro and ProNH<sub>2</sub> do. After drying the paper, the first cm was cut, His-ProNH<sub>2</sub> eluted with 1 ml 2 N NH<sub>4</sub>OH and mixed with 10 ml Bray's mixture and counted in a liquid scintillation counter. Zero time values were subtracted from the 5-min values and each determination performed in duplicate.

TRH-LI levels in brain varied widely from 197 pg/mg wet wt. in hypothalamus to 2.6 in the posterior part of the cerebral cortex (Table I). These values corresponded closely to those reported by other authors [6]. The PGAm was also unevenly distributed with a 10-fold difference between the region with the highest activity (olfactory bulb) and region with the lowest activity (cervical part of the spinal cord) (Table I). Regional variation was not due to the presence of an inhibitor in some of the regions. Activity detected in a mixture of membranes from olfactory bulb and cervical part of spinal cord (3 times more proteins from the second region) was equal to the sum of the activities in each region.

These data extend recent results from Friedman and Wilk [4] who showed in a limited study that the regional distribution of PGAm is not homogeneous. They are at variance with the regional distribution of PE and PGAs in brain. There is only a 2-3 fold difference between regions of highest and lowest PE activity [15]. The ratio of the lowest activity of PGAs over the highest activity in brain is only 0.72 [12]. The subcellular distribution of the PGAm is also very different from that of PGAs and

TABLE I

## RAT BRAIN REGIONAL DISTRIBUTION OF THE MEMBRANE-BOUND PYROGLUTAMATE AMINOPEPTIDASE-DEGRADING TRH

Brain regions were dissected, weighed and either processed for RIA of PGAm assay. For RIA, tissues were sonicated in acetic acid, centrifuged and the supernatant dried, extracted with methanol and subjected to RIA [7]. For enzyme assay, the 12,000-g pellet was resuspended in 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 containing 2.5 mM bacitracin and 2.5 mM *N*-ethylmaleimide. After 5 min preincubation at 37°C 100,000 cpm [<sup>3</sup>H]-Pro[TRH] were added and incubation continued for 5 min. His-[<sup>3</sup>H]ProNH<sub>2</sub> produced was determined by ion exchange paper chromatography [2]. Data are mean ± S.E.M. Number of determinations are in parentheses. n.d., not determined.

Region	PGAm (fmol His-ProNH <sub>2</sub> /min/mg prot.)	TRH (pg/mg wet wt.)
Olfactory bulb	261 ± 55 (5)	32 ± 4 (12)
Hippocampus	223 ± 45 (3)	5.0 ± 0.6 (12)
Nucleus accumbens-lateral septum	178 ± 28 (3)	143 ± 29 (12)
Posterior part of cerebral cortex	142 ± 12 (4)	2.6 ± 0.7 (6)
Hypothalamus	135 ± 22 (4)	197 ± 21 (12)
Cerebellar cortex	67 ± 7 (4)	n.d.
Neurohypophysis	54 ± 5 (4)	118 ± 18 (15)
Mesencephalon	47 ± 6 (3)	16 ± 3 (4)
Medulla oblongata	36 ± 10 (4)	14 ± 3 (7)
Adenohypophysis	31 ± 6 (4)	4.3 ± 0.8 (17)
Pons	28 ± 4 (3)	10 ± 1 (8)
Cervical part of spinal cord	24 ± 1 (3)	20 ± 3 (8)

PE. While more than 50% of PGAm sediments with synaptosomes, less than 10% of PE and PGAs do so [14]. Moreover PGAm is probably localized on the external face of the synaptic plasma membrane (Charli et al., in preparation). The present data are consistent with the hypothesis that PGAm is involved in TRH extracellular catabolism at the synapses. If this is the case, there may be a correlation between the distribution of the enzyme and some TRH parameters. There was no correlation of the PGAm distribution with TRH-LI levels (Table I) or TRH receptors (data from ref. 13). We have demonstrated that *in vitro* TRH release is highly variable from region to region in brain [10]. There was no correlation with *in vitro* TRH basal release vs PGAm distribution: i.e., cervical part of spinal cord and olfactory bulb, regions with the highest basal release (60–130 pg TRH released in 10 min/mg protein (data from ref. 10)) had either low or high PGAm activity, respectively. This occurred also with *in vitro* K<sup>+</sup>-stimulated TRH release; i.e., olfactory bulb or nucleus accumbens-lateral septum, regions with the highest PGAm activity, released either low or high amounts of TRH (7 or 62 pg TRH released during 56 mM K<sup>+</sup> stimulation over basal release per mg protein respectively (data from ref. 10)). This lack of correlation may indicate PGAm is involved in the catabolism of other neuropeptides.

The authors wish to thank Dr. E. Mata and Dr. L. Cintra for providing the ani-

mals, and V. Aldama for typing the manuscript. This study was supported in part by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (ICCBXNA-021044) and Fondo de Estudios e Investigaciones Ricardo J. Zevada.

- 1 Bauer, K., Biochemical properties of TRH-inactivating enzymes. In E.C. Griffiths and G.W. Bennett (Eds.), *Thyrotropin releasing hormone*, Raven, New York, 1983, pp. 103-107.
- 2 Bauer, K. and Kleinkauf, H., Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract, *Eur. J. Biochem.*, 106 (1980) 107-117.
- 3 Charli, J.L., Ponce, G., McKelvy, J.F. and Joseph-Bravo, P., Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices, *J. Neurochem.*, 42 (1984) 981-986.
- 4 Friedman, T.C. and 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.*, 46 (1986) 1231-1238.
- 5 Garat, B., Miranda, J., Charli, J.L. and Joseph-Bravo, P., Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino peptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain, *Neuropeptides*, 6 (1985) 27-40.
- 6 Jackson, J.M.D. and Reichlin, S., Distribution and biosynthesis of TRH in the nervous system. In R. Collu, A. Barbeau, J.R. Ducharme and J.G. Rochefort (Eds.), *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides*, Raven, New York, 1979, pp. 3-54.
- 7 Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Palacios, J.M. and Kordon, C., Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus, *Endocrinology*, 104 (1979) 801-806.
- 8 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- 9 Matsui, T., Prasad, C. and Peterkofsky, A., Metabolism of thyrotropin releasing hormone in brain extracts. Isolation and characterization of an imidopeptidase for histidylprolineamide, *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 2439-2445.
- 10 Méndez, M., Joseph-Bravo, P., Cisneros, M., Vargas, M.A. and Charli, J.L., Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain, *Peptides*, in press.
- 11 O'Connor, B. and O'Cuinn, G., Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain, *Eur. J. Biochem.*, 144 (1984) 271-278.
- 12 Prasad, C., Thyrotropin releasing hormone. In A. Lajtha (Ed.), *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 8, Plenum, New York, 1985, pp. 176-199.
- 13 Taylor, R.L. and Burt, D.R., Species differences in the brain regional distribution of receptor binding for thyrotropin releasing hormone, *J. Neurochem.*, 38 (1982) 1649-1656.
- 14 Torres, H., Charli, J.L., González-Noriega, A., Vargas, M.A. and Joseph-Bravo, P., Subcellular distribution of the enzyme degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain, *Neurochem., Int.*, 9 (1986) 103-110.
- 15 Wilk, S., Prolyl endopeptidase, *Life Sci.*, 33 (1983) 2149-2157.
- 16 Yoshimoto, T., Nishimura, T., Kita, T. and Tsuru, D., Post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase) from bovine brain, *J. Biochem.*, 94 (1983) 1179-1190.

THE NARROW SPECIFICITY PYROGLUTAMATE AMINO PEPTIDASE DEGRADING TRH IN RAT BRAIN IS AN ECTOENZYME.

JEAN-LOUIS CHARLI, CARLOS CRUZ, MIGUEL-ANGEL VARGAS and PATRICIA JOSEPH-BRAVO.

Departamento de Bioquímica, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62270, México.

Address proofs and correspondence to: Dr. J.L. Charli, Centro de Investigaciones sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62270, México.

Abstract-In order to determine the pathway of extracellular metabolism of thyrotropin releasing hormone (pyroglutamisproNH<sub>2</sub>) in brain, the topographical organization of pyroglutamate aminopeptidase II on the plasma membrane was investigated. Its activity was only slightly increased when intact brain synaptosomes were lysed by osmotic shock or detergent treatment. Trypsin treatment of intact synaptosomes destroyed 70 to 80 % of enzyme activity without affecting lactate dehydrogenase. Pyroglutamate aminopeptidase II activity was present in primary cultures of foetal mice cortical cells. It was detected in intact cells, was not released by the cells and its activity was not increased by saponin pretreatment. Trypsin treatment of the cells reduced pyroglutamate aminopeptidase II by 70% while not pyroglutamate aminopeptidase I and lactate dehydrogenase.

These data support brain pyroglutamate aminopeptidase II as an ectoenzyme. They suggest that this enzyme could be responsible for thyrotropin releasing hormone extracellular catabolism in brain.

47

Thyrotropin releasing hormone (TRH; pyroglutisprNH<sub>2</sub>) has been suggested as a participant of information transfer in the central nervous system. The existence of such a role should be accompanied by mechanisms of TRH removal from active sites. Neuropeptides are easily degraded by peptidases. Two soluble enzymes present in brain are able to degrade TRH in vitro: prolylendopeptidase (PE; EC 3.4.21.26) and pyroglutamate aminopeptidase (PGA 1; EC 3.4.11.8) (Bauer, 1983). Current evidence suggests they might not participate in extracellular catabolism of TRH (Charli et al, 1987) and their involvement in intracellular degradation remains controversial (Faivre-Bauman et al, 1986; Charli et al, 1987; Torres et al, 1986). On the other hand, on brain membranes exists a pyroglutamate aminopeptidase (PGAlI) distinct from the widely distributed PGAl. PGAlI is a metalloenzyme of narrow specificity (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Garat et al, 1985; Friedman and Wilk, 1986; O'Connor and O'Cuinn, 1987); only small peptides whose structure is pglutisX are cleaved (O'Connor and O'Cuinn, 1985a; Wilk, 1986). The papain solubilized form of the enzyme has a molecular weight of 230,000 daltons (O'Connor and O'Cuinn, 1985a). These properties are similar to those of serum thyroliberinase (Bauer, 1983). PGAlI is mainly localized on synaptosomal membranes (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Torres et al, 1986), at the plasma membrane level (O'Connor and O'Cuinn, 1984). Highest activity is found in brain (Friedman and Wilk, 1986), where regional distribution is not homogeneous (Friedman and Wilk, 1986; Vargas et al, 1987). PGAlI properties are indicative of a true neuropeptide specific peptidase (Wilk, 1986). However, before such a hypothesis can be confirmed, further properties of the enzyme have to be studied. In this communication we have investigated if its



orientation on brain plasma membranes is suited for inactivating an extracellularly localized peptide.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

Male Wistar rats (200-300 g) kept under controlled lighting conditions (lights on at 7 AM and off at 7 PM) and fed ad libitum were used in most experiments. 14 days CDI foetal mice were used for the primary cultures. [L- 2,3,4,5-<sup>3</sup>H ] proline-TRH ( [ <sup>3</sup>H-pro ]-TRH) (107 Ci/mole) was purchased from New England Nuclear Co. TRH was obtained from Peninsula Laboratories. Media, sera, glutamine, the antibiotic-antimycotic mixture and the vitamin mix were from Gibco laboratories; plasticware for cell culture, from Costar and glucose for cell culture, from Difco laboratories. All other chemicals were reagent grade from Sigma Chemical Co. or J.T. Baker. Ion exchange paper chromatography was performed on Whatman cellulose phosphate P81 sheets. N-benzyloxycarbonyl prolyl prolinol (ZPP) and pyroglutamyl diazomethylketone (PDMK) were generous gifts from Dr. S. Wilk.

### Purification of [ <sup>3</sup>H-pro ]-TRH

When necessary, [ <sup>3</sup>H-pro ]-TRH was repurified to 95% radiochemical purity by high performance thin layer chromatography (Charli et al, 1984).

### Degradation of TRH by rat brain synaplosomes

Synaplosomes were prepared according to Bradford (1972) and Joseph-Bravo et al (1979). The 0.8-1.2 M interphase of sucrose gradient was diluted to 0.45 M sucrose with water and centrifuged at

35,000 g for 30 min. The pellet was either gently resuspended in 0.32 M sucrose 10 mM tris-HCl pH 7.4 (intact synaptosomes) or sonicated in 10mM tris-HCl pH 7.4. After sonication, synaptosomal membranes were recovered by centrifugation at 75 000 g for 30 min. All steps were performed at 4°C.

TRH degradation by PGII was measured using a specific assay essentially as described (Vargas et al, 1987) except for TRH concentration. Briefly, after 5 min preincubation of the membranes (60ug protein) or synaptosomes (75ug protein) in 0.05M sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 2.5 mM bacitracin (BAC) and 2.5 mM N-ethylmaleimide (NEM) (final concentrations), 100 000 cpm [<sup>3</sup>Hpro]-TRH (10<sup>-6</sup> M) were added and incubation carried out at 37°C (final vol 31 ul). Incubation medium of synaptosomes contained also 0.25M sucrose. Sucrose increased membrane PGII activity; data were corrected accordingly. At time 0 and subsequent times, 5ul aliquots were immediately spotted on cellulose phosphate paper. Chromatography was developed with 1 M acetic acid; his [<sup>3</sup>H]pronH2 produced was eluted from the first cm (Bauer and Kleinkauf, 1980) and counted by liquid scintillation. Zero time values were subtracted from other time values and each determination performed in duplicate. Initial velocities were determined from the linear part of the time-course curve (up to 15 min for intact synaptosomes).

Degradation of TRH by primary cultures of foetal cortical cells.

Cortical tissue was obtained from 14 day mice foetuses. Initiation of cultures was essentially that described by Faivre-Bauman et al, 1980, with some modifications. Briefly, mothers were killed by cervical dislocation, embryos removed, placed in cold sterile phosphate

buffered saline (PBS), frontal cortex dissected under a stereoscopic microscope and placed in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum (FBS). Pooled fragments from a whole litter were mechanically dissociated in DMEM-FBS by passage through 2 hypodermic needles of decreasing diameter. After dissociation, the cellular suspension was centrifuged 10 min at 450 g, and the cells were resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS, 0.25% glucose, 1 mM glutamine, 8 u/100 ml insulin, 1% vitamin mix and antibiotic-antimycotic solution (100 u/100 ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin and 0.25 ug/ml fungizone) (final concentrations). Viable cells, determined by trypan blue exclusion, were plated in poly D-lysine-coated 35 or 16 mm wells at  $10^5$  cells/cm<sup>2</sup> in a total volume of 4 or 1 ml respectively. Cultures were maintained at 37 °C in an atmosphere of 8% CO<sub>2</sub>, 92% air and 95% relative humidity for up to 14 days. Medium was changed every three days, replacing half volume by fresh medium everytime. Cytosine-arabinofuranoside (10 uM) was included at fifth day for inhibiting proliferating non-neuronal cells. Morphology of cells was similar to previous reports (Dichter, 1978). An extended report on the properties of these cells will be published elsewhere (C. Guerra, J.L. Redondo, C. Cruz, J.L. Charli and P. Joseph-Bravo, in preparation).

To study TRH degradation by intact cells, cultures (10 days in vitro) were washed twice with PBS and preincubated in DMEM containing glucose (0.25%), glutamine (1 mM), ZPP ( $10^{-5}$  M) and PDHK ( $10^{-5}$  M) (final concentrations; medium A) with or without saponin for 3 min at 37 °C. ZPP and PDHK are potent specific inhibitors of PE and PGAI respectively (Friedman et al, 1984; Ulk et al, 1985). After discarding the medium, cells were rinsed with PBS, preincubated for 5

min in medium A before adding [<sup>3</sup>H-Pro]-TRH (10<sup>-6</sup> M final concentration); degradation was linear with time up to one hour. 10 ul aliquots per duplicate of the medium were spotted on P-81 chromatography paper and his [<sup>3</sup>H] pro NH<sub>2</sub> produced determined as described .

To study TRH degradation by PGAI or PGAI1 from broken cells, cultures were washed 3 times with PBS, scrapped and homogenized in 300 ul 0.05 M Tris-HCl pH 7.5 per plate; membranes and soluble fractions prepared as described (Vargas et al, 1987). Briefly, the 1000 g supernatant was centrifuged at 12 000 g for 15 min at 4°C. Supernatant was used to measure PGAI essentially as reported (Bauer and Kleinkauf, 1980) except that substrate and inhibitors concentrations were: 10<sup>-6</sup> M TRH, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 2.5 mM BAC. Pellet was used to determine PGAI1 as described for synaptosomes. PGAI or PGAI1 independent values reported are mean of 2 determinations taken from the linear part of the time-course curve: up to 15 min for PGAI and 60 min for PGAI1. Mean protein concentration used in the assays were 638 ug/ml (membranes) and 749 ug/ml (soluble fraction).

Lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined (Johnson and Whittaker, 1963) after 15 min preincubation of the samples with 0.1% (final) Triton X 100 at 37°C. Protein was quantified following Lowry et al, 1951. Statistical analyses were performed using Student's t test.

## RESULTS

To determine the transmembrane topology of PGAI1 on brain membranes, we isolated synaptosomes and measured PGAI1 activity from intact or broken preparations with a specific assay for PGAI1 (Torres

9

et al, 1986; Vargas et al, 1987). Synaptosomes' lysis by osmotic shock did not cause a significant increase in activity (Table 1). No loss of membrane proteins or PGAlI activity was observed during centrifugation steps subsequent to lysis. Triton X 100 or saponin treatment of synaptosomes increased PGAlI activity by 12 or 41% respectively (Table 1). This suggested that a considerable part of the enzyme activity has its active site facing the extracellular space. In agreement with this hypothesis, 70 to 80% of the activity could be abolished by trypsin treatment of intact synaptosomes (Table 2); while being stable at least for 20 min when incubation was performed in control conditions (table 2). Digestion of ectoproteins only and not of whole synaptosomal proteins is inferred by the lack of modification of LDH activity associated with the synaptosomes (Table 2).

101

Foetal cortical cells were used to confirm the orientation of PGAlI in intact cells. These cultures were composed of a mixture of viable neuronal and non neuronal like cells (viability verified in control plates by complete trypan blue exclusion). PGAl activity was much higher than PGAlI (Table 4); however, neither a 5 min preincubation at 37°C with 0.25 mM 2-iodoacetamide, which inhibits PGAl (Bauer, 1983), nor a 1 M NaCl wash of the membranes, changed the specific activity of PGAl supporting the specificity of the assay used for PGAlI determination (data not shown). Moreover, TRH was degraded linearly with time by intact cells to hispr<sup>1</sup>NH<sub>2</sub> due to PGAlI activity since PGAl was completely<sup>0</sup> inhibited by PDHK (preincubation of hypothalamic slices with 10<sup>-5</sup>M ZPP and PDHK completely inhibits PE and PGAl activities (Charli et al, 1987)). Serum thyroliberinase activity was very low in the serum supplemented medium (2.0 ± 0.5 fmoles hispro

NH<sub>2</sub> produced per min per ml, mean SEM, n=3) as well as in culture medium that had been in contact with the cells for three days. Total PGII activity observed with intact cells was similar to that observed in a membrane preparation from equivalent. These results suggested that PGII activity is expressed by intact cells and not by thyrolyberinase or a released enzyme.

Saponin, at reported concentrations (Czajkowski and Farb, 1986), induced swelling of cells and decrease of neurites network, mainly on neuron-like cells, as well as loss of membrane proteins (Table 3, experiment # 1) and DNA (not shown). Total PGII activity was significantly reduced; but not activity per mg membrane proteins (Table 3, experiment # 1) or activity per ug DNA (not shown). This suggested loss of cellular material and PGII during the rinse following saponin treatment. At much lower concentrations, cells were still permeabilized (as evidenced by staining with trypan blue) but maintained their appearance and organization and there was no loss of membrane protein (Table 3, experiments # 2 and # 3). In this case, we could not detect PGII in the first rinse coming from saponin treated cells; activity per well and specific activity were only slightly decreased by the treatment (table 3).

Finally, treatment of cells with trypsin prior to their homogenization decreased PGII activity by 70% without decreasing substantially LDH or PGAI activities or inducing cells rupture (Table 4).

## DISCUSSION

We have studied PGAll activity in synaptosomes and brain cells in culture in an effort to determine the localization of its active site on brain plasma membranes.

The data presented, consistent in 2 experimental models, demonstrate that most of PGAll is an ectoenzyme (i.e. an intrinsic plasma membrane enzyme with an extracellularly localized active site) in brain. This conclusion is supported by the following observations:

- 1) The enzyme activity is detected in intact cells with a non penetrating substrate. Although accumulation of TRH has been reported in hypothalamic slices (Charli et al 1984), no uptake has been observed in nerve ending preparations (Parker et al, 1977; H. Torres, J.L.Charli and P. Joseph-Bravo, unpublished observations). Further evidence that activity observed was not due to TRH uptake by cells or synaptosomes or through their rupture during incubation came from the linear characteristics of the time-course curves before a plateau was reached.
- 2) PGAll is not released from the cells.
- 3) Serum thyroliberinase contaminating the cells is not accounting for this activity since it was very low in the serum supplemented medium (even if PGAll assay of cells was performed without rinsing, only 0.5% of intact cell activity at most could be attributed to thyroliberinase).
- 4) PGAll activity is not increased by homogenization, solubilization or permeabilization of cells or synaptosomes except when synaptosomes were treated with saponin. This slight increase with saponin is more likely due to unmasking part of ectoenzyme activity and not to revealing intracellular activity, as suggested for

5 nucleotidase from guinea pig granulocytes (Dr Pierre and Karnovsky, 1974). This effect may not have been seen on cells because low concentrations were used in experiments # 2 and # 3 and higher concentrations used in experiment # 1 induced loss of cell membrane (decrease of material was not detected in the synaptosomes experiments since the assay was performed without separating synaptosomes from medium).

5) PGAll activity is strongly decreased by trypsin treatment of cells or synaptosomes. This is not due to rupture of cells or synaptosomes, or degradation of intracellular proteins.

These evidence fulfill most of the criteria mentioned by Karnovsky (1966) to qualify an enzyme as an ectoenzyme. From our data we can estimate that at least 70% of the enzyme is an ectoenzyme.

Further data that support the concept of PGAll being an ectoenzyme come from the observations that PGAll is the main enzyme degrading TRH added in the extracellular space of hypothalamic slices (J.L. Charli, A. Baez and P. Joseph-Bravo, unpublished observations) and inhibition of PGAll increases TRH recovery from hypothalamic slices (Charli et al, 1986). Together with previous studies (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Torres et al, 1986), this suggests that the majority of the enzyme active site is localized on the external face of a synaptosomal plasma membrane. The data from these studies as well as the heterogeneous distribution of PGAll in brain (Friedman and Wilk, 1986; Vargas et al, 1987) and its narrow specificity (O'Connor and O'Cuinn, 1984; Wilk, 1986) make it a prime candidate for inactivating TRH or related peptides present in the brain extracellular fluid. This reaction could be responsible for his proNH<sub>2</sub> production in brain extracellular space so that part of histidyl prolyl diketopiperazine present in brain in a



non-synaptosomal compartment (Tanigisawa et al, 1980), may be in the extracellular fluid. Critical experiments showing that endogenous TRH is released in the vicinity of the enzyme and degraded by it are needed to demonstrate PGAlI involvement in controlling TRH levels at the synaptic cleft.

On the other hand, there is no evidence that PE and PGAl are able to degrade TRH present in the extracellular space: specific inhibitors of these enzymes do not modify in vitro TRH release from hypothalamic slices (Charli et al, 1987); exogenous TRH added to hypothalamic slices is not degraded substantially by these enzymes (J.L. Charli, A. Baez and P. Joseph-Bravo, unpublished observations) and finally they are not released by KCl stimulation of primary cultures of hypothalamic cells (Faivre-Bauman et al, 1986) or hypothalamic slices (M.A. Vargas, M. Mendez, J.L. Charli and P. Joseph-Bravo, unpublished observations).

Finally, although TRH can be accumulated by hypothalamic slices (Charli et al, 1984),  $V_{max}$  of the phenomenon was low and there is no evidence that it plays a significant role in TRH inactivation.

In conclusion this study demonstrates that PGAlI is an ectoenzyme in brain and supports the hypothesis that the main pathway of extracellular inactivation of TRH is through action of PGAlI.

10

Acknowledgments—The authors wish to thank the generous gifts of ZPP and PDNH from Dr. S. Wilk and the skilful technical assistances of Dr. E. Mata and M. Cisneros. The excellent typing of the manuscript by V. Aldama is acknowledged. We also thank Dr. S. Wilk and Dr. G. O'Quinn for providing data and manuscript before their publication. This work was supported in part by grants from CONACyT (IIBXNA-021044), "Fondo de Estudios e Investigaciones K.J. Zevada" and "Fundacion Miguel Aleman A.C.".

## REFERENCES

Bauer E. (1983) Biochemical properties of TRH-inactivating enzymes. In: Thyrotropin Releasing Hormone (Griffiths E.C. and Bennett G.W., eds), pp. 103-107. Raven Press, New York.

Bauer E. and Kleinkauf H. (1980) Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. Eur. J. Biochem. 106, 107-117.

Bauer E. and Nowak P. (1979) Characterization of a thyroliberin degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin on the pyroglutamyl-histidine bond. Eur. J. Biochem. 99, 239-246.

Bradford H.F. (1972) Cerebral cortex slices and synaptosomes. In vitro approaches to brain metabolism. In: Methods of Neurochemistry, Vol. 3 (Fried K.L., ed), pp. 155-202, Marcel Dekker, New York.

Charli J.L., Cruz C., Ponce G., Vargas M.A., Mendez M., Cisneros M., Pasten J. and Joseph-Bravo P. (1988) Physiological relevance of pyroglutamate aminopeptidase II. In: Recent advances in the biomedical significance of Thyrotropin Releasing Hormone (Metcalf G. and Jackson I.H.D., eds), The New York Academy of Sciences, New York, in press.

Charli J.L., Mendez M., Joseph-Bravo P. and Wilk S. (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl aminopeptidase I and prolylendopeptidase do not change TRH in vitro release or content in rodent brain. Neuropeptides 9, 373-378.

Charli J.L., Ponce G., McKelvy J.F. and Joseph-Bravo P. (1984) Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. J. Neurochem. 42, 981-986.

Czajkowski C. and Farb D.H. (1986) Transmembrane topology and subcellular distribution of the benzodiazepine receptor. *J. Neurosci.* 6, 2857-2863.

De Fierre J.U. and Karnovsky M.L. (1974) Ectoenzymes of the guinea-pig polymorphonuclear leukocyte II. Properties and suitability as markers for the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 249, 7121-7129.

Dichter M.A. (1978) Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* 149, 279-293.

Faivre-Bauman A., Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A. and Bauer K. (1986) Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in foetal hypothalamic cultures grown in serum free medium. *Neuropeptides* 7, 125-136.

Faivre-Bauman A., Nemeskeri A., Tougard C. and Tixier-Vidal A. (1980) Immunological evidence for thyroliberin (TRH) neurons in primary cultures of foetal mouse brain cells. Ontogenic aspects. *Brain Res.* 185, 289-304.

Friedman T.C., Orłowski M. and Wilk S. (1984) Prolylendopeptidase: inhibition in vivo by N-benzyloxycarbonyl-prolylprolinol. *J. Neurochem.* 42, 237-241.

Friedman T.C. and Wilk S. (1986) Delineation of a particulate thyrotropin releasing hormone degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* 46, 1231-1238.

Garal B., Miranda J., Charli J.L. and Joseph-Bravo P. (1985) Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6, 27-40.

Johnson N.K. and Whittaker J.P. (1963) Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain. *Biochem. J.* 88, 404-409.

Joseph-Bravo P., Loudes C., Charli J.L. and Kordon C. (1979) Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Research* 166, 321-329.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Karnovsky H.L. (1986) Ectoenzymes: their modulation and similarity. In: *Cellular Biology of Ectoenzymes* (Kreutzberg et al, eds), pp. 3-13, Springer-Verlag, Berlin.

O'Connor B. and O'Cuinn G. (1984) Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144, 271-278.

O'Connor B. and O'Cuinn G. (1985a) Purification and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 150, 47-52.

O'Connor B. and O'Cuinn G. (1985b) Some properties of a synaptosomal membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *Biochem. Soc. Trans.* 13, 485-486.

18

O'Connor, B. and O'Cuinn G. (1987) Active site studies on a narrow specificity thyroliberin-hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase purified from synaptosomal membranes of guinea pig brain. *J. Neurochem.* 48, 676-680.

Parker C.F., Neaves W.B., Barnea A. and Porter J.C. (1977) Studies on the uptake of  $^3\text{H}$ -Thyrotropin Releasing Hormone and its metabolites by synaptosome preparations of the rat brain. *Endocrinology* 101, 66-75.

Torres H., Charli J.L., Gonzalez-Noriega A., Vargas M.A. and Joseph-Bravo P. (1986) Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 9, 103-110.

Vargas M.A., Mendez M., Cisneros M., Joseph-Bravo P. and Charli J.L. (1987) Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79, 311-314.

Wilk S. (1986) Neuropeptide specific peptidases: does brain contains a specific TRH degrading enzyme? *Life Sci.* 39, 1487-1492.

Wilk S., Friedman T.C. and Kline T.B. (1985) Pyroglutamyl diazomethylketone: potent inhibitor of mammalian pyroglutamyl peptide hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 130, 662-668.

Yanagisawa T., Prasad C. and Peterkofsky A. (1980) The subcellular and organ distribution and natural form of histidyl proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 255, 10290-10298.

Table 1. Effects of osmotic shock, Triton X100 and saponin treatments on synaptosomal PGII and LDH activities.

Preparation	PGII <sup>a</sup>	LDH <sup>a</sup>
Osmotic shock		
Intact synaptosomes	100 ± 5(5)	100 ± 5(6)
Synaptosomal membranes <sup>b</sup>	110 ± 24(5)	49 ± 8(4)*
Detergent treatment of synaptosomes <sup>c</sup>		
Intact	100 ± 8(6)	nd
Triton X100	112 ± 13(6)	nd
Saponin	141 ± 14(6)**	nd

Brain synaptosomes were prepared and PGII and LDH activities evaluated as indicated in Experimental Procedures. Activities are not expressed on a per mg basis but referred to the same amount of starting material. a: Data indicate the mean ± SEM of the activities normalized to control (intact synaptosomes). The number of independent determinations is within parenthesis. For intact synaptosomes, mean PGII specific activity was 4.5 pmoles hisproNH<sub>2</sub>/min/mg protein and mean LDH specific activity was 2.2 umoles NADH<sub>2</sub>/min/mg protein. b: Synaptosomal membranes were prepared by resuspension and sonication of the synaptosomal pellet in 10mM Tris-HCl pH 7.4. The membranes were separated from synaptoplasm by centrifugation at 75,000 g. c: Intact synaptosomes were pretreated in 0.25 M sucrose with or without 0.1% Triton X 100 or 0.5% saponin (final concentrations) for 30 min at 37° C before preincubation and incubation with TRH. Synaptosomes were not separated from pretreatment medium before PGII assay. Saponin reduced purified PGII activity by 10%. nd: not determined. \*: p < 0.0005; \*\*: p < 0.01 compared to control.

Table 2. Effect of trypsin treatment on synaptosomal PGAlI and LDH activities.

	Control	PGAlI	Trypsin treated	LDH Trypsin treated
0 min	100 (2)		100 ± 4(3)	100 ± 8(4)
10 min	122 (2)		46 ± 6(3)*	100 ± 16(4)
20 min	92 (2)		26 ± 4(4)*	99 ± 7(4)
30 min	nd		17 ± (2)	78 (2)

Brain synaptosomes were prepared and PGAlI and LDH activities measured as described in Experimental Procedures. For trypsin treatment of the synaptosomes, these were resuspended in 95 ul of 50mM tris-HCl pH 7.4 containing 2mM CaCl and 0.25M sucrose (3.3 mg proteins/ml). Digestion with 0.06% trypsin at 37°C was stopped by addition of 0.23 mg/ml trypsin inhibitor and transfer of synaptosomes at 4°C for 10 min. Data (mean ± SEM; number of independent determinations within parenthesis) are not expressed on a per mg basis since trypsinization causes a loss in general cell membrane protein as well as a loss of PGAlI. Thus expressing the data on a per milligram basis would not reflect the absolute sensitivity of the PGAlI to trypsin. They are expressed in percentage of value at time 0. nd: not determined. \*: p < 0.0005 compared to time 0.



Table 3. PGII activity in primary cultures of cortical cells; effect of saponin treatment

	PGII <sup>a</sup> (activity per well)	PGII <sup>b</sup> (specific activity)	membrane <sup>c</sup> protein (per well)
Experiment # 1			
Control	131 ± 23(4)	2.0 ± 0.5(4)	65 ± 5(6)
Saponin 0.125%	71 ± 5(4)**	2.1 ± 0.1(4)	35 ± 2(6)***
0.50%	72 (2)	2.1 ± 0.1(4)	33 ± 1(6)***
Experiment # 2			
Control	67 ± 9(8)	2.0 ± 0.1(8)	34 ± 6(4)
Saponin 0.002%	49 ± 9(8)	1.4 ± 0.2(8)**	40 ± 6(4)
Experiment # 3			
Control	189 ± 8(6)	4.1 ± 0.2(6)	46 (2)
Saponin 0.002%	161 ± 20(6)*	3.4 ± 0.4(6)*	48 (2)

Experiments # 1 and # 2 were performed in 16 mm wells; experiment # 3 in 35 mm wells. Cultured cortical cells (10 days in vitro (DIV)) were rinsed twice with PBS and pre-incubated in medium A (DMEM, 0.25% glucose, 1 mM glutamine,  $10^{-5}$  M ZPP and  $10^{-5}$  M PDMK) with or without saponin (3 min, 37°C). The medium was discarded, cells were rinsed with PBS, preincubated for 5 min in medium A and incubated at 37°C in 150 or 300 ul medium A containing 200,000 or 300,000 cpm [ $^3$ H-pro]-TRH (final concentration  $10^{-6}$  M) for experiments # 1 and # 2 or # 3 respectively. 10 ul aliquots per duplicate of the medium were drawn and spotted on P-81 Whatman paper at time 0, 30 and 60 min to measure

PGaII activity. Values are mean  $\pm$  SEM of the number of independent determinations indicated in parenthesis. The highest saponin concentrations used inhibited partially purified PGaII activity 20% at most. a: fmoles his pro NH<sub>2</sub> per min per well. b: pmoles his pro NH<sub>2</sub> per min per mg membrane proteins. c: ug membrane proteins per well. nd: not determined. \*: p < 0.05; \*\*: p < 0.01; \*\*\*: p < 0.0005 compared to control.

Table 4. Effect of trypsin on PGAI, PGAll and LDH activities in cortical cells in culture.

	PGAI	PGAll	LDH
Control	100 ± 3(4)	100 ± 3(4)	100 ± 6(4)
Trypsin	86 ± 8(4)	26 ± 3(5) <sup>a</sup>	122 ± 18(6)

Cortical cell cultures (propagated in 16 mm wells) were washed with PBS, incubated with or without 0.125% trypsin for 10 min at 37 °C, transferred at 4 °C and maintained for 10 min in the presence of 190 ug bovine pancreas trypsin inhibitor. After trypsin treatment, most cells remained intact while other lost intercellular contacts and became globular. No debris appeared suggesting there was no rupture of cells. Unbound cells were recovered by centrifugation; attached cells were rinsed, recovered in 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 and pooled with cells recovered by centrifugation. Enzymatic analyses were performed as described. Data are expressed in percentage of control value. They correspond to 2 independent experiments made from cultures maintained for 6 or 14 days in vitro. For control, mean activities were: PGAI: 7.8 (6 DIV) or 16.9 (14 DIV) pmoles his pro NH<sub>2</sub> produced per min per well; PGAll: 21 (6 DIV) or 81 (14 DIV) fmoles his pro NH<sub>2</sub> produced per min per well; LDH: 1.9 umoles NADH<sub>2</sub> per min per well. a: values are mean ± SEM of the number of independent determinations between parentheses. <sup>a</sup>: p < 0.0005 compared to control.