

18
2ej.

03081

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE LA PIROGLUTAMIL
PEPTIDASA II EN ADENOHIPOFISIS: PAPEL DE LA TRH**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

PRESENTA

EL M. EN IBB. MIGUEL ANGEL VARGAS SUAREZ

CUERNAVACA, MORELOS

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

257619



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA MOLECULAR DEL DEPERTAMENTO DE FISIOLOGIA Y GENETICA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNAM, BAJO LA ASESORIA DEL DR. JEAN-LOUIS CHARLI CASALONGA. EL TRABAJO FUE FINANCIADO PARCIALMENTE POR EL CONACYT, LA DGAPA-UNAM Y LA COMUNIDAD ECONOMICA EUROPEA.

COMITE TUTORIAL:

DR. JEAN-LOUIS CHARLI CASALONGA

DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL

DR. MIGUEL LARA FLORES

JURADO DE EXAMEN:

PRESIDENTE: DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL

VOCAL: DRA. CLAUDIA GONZALEZ ESPINOZA

VOCAL: DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA

VOCAL: DR. GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA

SECRETARIO: DR. JEAN-LOUIS CHARLI CASALONGA

SUPLENTE: DRA. HILDA MARIA LOMELI BUYOLI

SUPLENTE: DR. GUSTAVO PEDRAZA ALVA

A Blanca, Natali Michelle y Miguel Ernesto.
Por compartir su vida conmigo.

A la Dra. Patricia Joseph-Bravo y al Dr. Jean-Louis Charli, a quienes quiero agradecer profundamente su apoyo, tiempo y paciencia que han dedicado a mi formación académica.

Agradezco:

A mis compañeros del Instituto el apoyo que me brindaron y su participación en la realización de este trabajo: Arturo Baeza, Julie Bourdais, Graciela Cabeza, Miguel Cisneros, Paul Gaytán, Sergio González, Eugenio López, Elena Martell, Elizabeth Mata, Eloy Moreno, Leonor Pérez, Sonia Sánchez, Rosa María Uribe, Bernardo Uriostegui, Manuel Villa.

Especialmente al Dr. Gonzálo Martínez de la Escalera su valiosa aportación de ideas en el desarrollo experimental de la tesis.

Sinceramente al Dr. Alberto Darszon su interés y preocupación que mostró por mi formación durante mis estudios de doctorado, así como en la realización de la tesis.

A mis padres, hermanos y amigos todos los momentos compartidos.

INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCION	9
1. EL SISTEMA NEUROENDOCRINO.....	9
2. LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH).....	16
3. EL EJE HIPOTALAMICO ADENOHIPOFISIARIO Y LA TRH.....	19
4. EL RECEPTOR DE LA TRH (R-TRH).....	21
5. PROTEINAS G HETEROTRIMERICAS.....	26
6. MECANISMOS DE TRANSDUCCION PARA LA TRH.....	31
6.1 ACTIVACION DE LA FOSFOLIPASA C β -1.....	31
6.2 ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA.....	33
6.3 OTRAS VIAS DE TRANSDUCCION.....	36
6.3.1 Acoplamiento del R-TRH con una proteína $G\alpha_i$	36
6.3.2 Vía de la cinasa de proteínas activada por mitógenos (MAPK).....	36
6.3.3 Vía del ácido araquidónico.....	38
7. REGULACION DE LA TRH EN EL EJE NEUROENDOCRINO.....	40
8. REGULACION DEL RECEPTOR DE LA TRH.....	40
9. CONTROL DE LA SECRECION DE PROLACTINA (PRL).....	42
9.1 PAPEL DE LA DOPAMINA EN LA SECRECION DE PRL.....	42
9.2 INTERACCION DE LA DOPAMINA Y DE LA TRH EN LA REGULACION DE LA LIBERACION DE PRL.....	43
9.3 VIAS DE TRANSDUCCION IMPLICADAS EN LA LIBERACION DE PRL....	43
ANTECEDENTES	44
10. MECANISMOS DE INACTIVACION DE LA TRH.....	44
11. LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II (PPII).....	44
11.1 CARACTERISTICAS DE LA PPII.....	44
11.2 PPII EN EL CEREBRO.....	47

11.3 RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA PPII EN EL CEREBRO.....47

11.4 PPII EN LA ADENOHIPOFISIS.....48

OBJETIVO.....50

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....51

METODOLOGIA.....51

RESULTADOS.....52

12. ESTANDARIZACIÓN DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA PPII.....52

 12.1 EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ES ESPECÍFICO PARA LA PPII.....52

 12.2 EFECTO DE LA T₃ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII.....53

 12.3 LOS EFECTOS DE LA TRH Y DEL TPA SOBRE LA PPII SON INDEPENDIENTES DE LOS NIVELES DE T₃ Y DEL SEXO.....53

13. LA ACTIVACIÓN DEL R-TRH INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA PPII DE MANERA ESPECÍFICA.....59

14. LA ACTIVACIÓN DEL R-TRH POR TIEMPO LIMITADO ES SUFICIENTE PARA DESENCADENAR LOS EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII.....61

15. LA VÍA DE LA PLC ESTA IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA PPII POR LA TRH.....63

 15.1 LA INHIBICIÓN DE LA PLC BLOQUEA EL EFECTO DE LA TRH SOBRE LA PPII.....63

 15.2 PAPEL DE LA PKC EN LA REGULACIÓN DE LA PPII.....66

 15.3 PAPEL DEL CALCIO EN LA REGULACIÓN DE LA PPII.....67

16. EFECTOS DE LA PTX Y LA CTX SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII BASAL Y REGULADA POR LA TRH.....76

17. PAPEL DEL AMP_c EN LA REGULACIÓN DE LA PPII.....76

18. INTERACCIÓN DE LA VÍA DEL AMP_c CON LA TRH Y CON LA PKC EN LA REGULACIÓN DE LA PPII.....77

19. EFECTOS DE DIVERSOS FACTORES HIPOTALÁMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII.....78

20. NIVEL DE REGULACIÓN DE LA PPII.....79

DISCUSIÓN.....80

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....93

REFERENCIAS.....94
PUBLICACIONES (anexos 1 y 2).....119

ABREVIATURAS

AA	Acido araquidónico
AC	Adenilato ciclasa
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
All	Angiotensina II
[Ca ⁺⁺] _i	Concentración intracelular de calcio
CTX	Toxina del cólera
DA	Dopamina
DG	Diacilglicerol
EM	Eminencia media
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
MAPK	Cinasa de proteínas activada por mitógenos
MeTRH	Metil-histidil-TRH
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PPII	Piroglutamil peptidasa II
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria
PKA	Cinasa de proteínas dependiente de AMPc
PKC	Cinasa C de proteínas
PLC	Fosfolipasa C
PRL	Prolactina
PTX	Toxina pertussis
SRIF	Somatostatina
R-TRH	Receptor de la TRH
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TRH-OH	TRH-ácida (pglu-his-proOH)
TSH	Tirotrópina (hormona estimulante de la tiroides)
TPA	12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

RESUMEN

En la adenohipófisis, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es inactivada por la piroglutamil peptidasa II (PPII: EC 3.4.19. 6), una zinc-ectopeptidasa localizada en lactótropos. En estas células, la actividad de la PPII está positiva y negativamente regulada por las hormonas tiroideas y el 17β -estradiol respectivamente. En esta tesis, hemos estudiado los efectos de la TRH sobre la actividad de la PPII y las vías de transducción implicadas; así como el papel de otros factores hipotalámicos que también regulan la secreción de la prolactina. Células dispersas de adenohipófisis de rata se incubaron durante 5 días en medio suplementado antes de determinar la actividad de la PPII.

La TRH (10^{-6} M) disminuyó la actividad de la PPII con una inhibición máxima a 16 h y una ED_{50} de 10^{-9} M. La [3Me-His²] TRH, un potente agonista del receptor de la TRH (R-TRH) fue efectiva a concentraciones menores, mientras que la TRH-OH, un metabolito de la TRH con una afinidad baja para el R-TRH, fue mucho menos efectiva. Estos datos sugieren que la TRH regula la actividad de la PPII a través de la activación de su receptor. El U-73122, un inhibidor de procesos dependientes de fosfolipasa C (PLC), bloqueó el efecto de la TRH. El TPA, un activador de la cinasa C de proteínas (PKC) y el Bay K 8644, un agonista de canales de Ca^{++} dependientes de voltage disminuyeron la actividad de la PPII de una manera dependiente de la dosis. Los efectos de las dosis máximas del TPA o del Bay K más la TRH no fueron aditivos. Inhibidores de cinasas de proteínas no revirtieron los efectos de la TRH o del TPA. La regulación de la PPII inducida por la TRH no se modificó por el pretratamiento con el TPA por 24 h. Los efectos de la TRH o del Bay K se bloquearon con nifedipina o verapamil, antagonistas de canales de Ca^{++} tipo L. Estos resultados sugieren que el R-TRH está acoplado a la PLC para regular la actividad de la PPII, y que la entrada de Ca^{++} a través de los canales tipo L es necesaria para regular a la PPII. Una nueva isoenzima de PKC podría estar implicada en la acción de la TRH.

La toxina pertussis (PTX) no modificó la actividad de la PPII basal o regulada

por la TRH. La toxina del cólera (CTX), la forskolina (activador de la adenilato ciclasa [AC]), el dibutilil AMPc o el IBMX (inhibidor de fosfodiesterasas) disminuyeron la actividad de la PPII con una eficacia similar. Sus efectos máximos fueron aditivos con los de la TRH. El efecto de la TRH no se bloqueó con la 2',3'-dideoxiadenosina (inhibidor de la AC) o el H89 (inhibidor de la cinasa A de proteínas). Por lo tanto, el R-TRH no está acoplado a proteínas G sensibles a la PTX o a la CTX y no moviliza AMPc para regular a la PPII. El polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria disminuyó la actividad de la PPII y su efecto fue aditivo con el de la TRH y bloqueado por el H89. La bromocriptina o la somatostatina, agonistas acoplados negativamente a la AC, estimularon la actividad de la PPII y bloquearon el efecto inhibitor de la TRH. La preincubación con la PTX revirtió estos efectos.

Ya que varios de los tratamientos regularon la concentración del ARNm de la PPII de manera similar a su actividad, un mecanismo de control de la actividad de la PPII por las hormonas puede ser a nivel del ARNm.

En conclusión, la actividad de la PPII está sujeta a regulación homóloga y heteróloga por elementos del sistema multifactorial que coordinadamente controlan la secreción de la prolactina, a través de múltiples mensajeros intracelulares.

ABSTRACT

In the adenohypophysis, thyrotropin releasing hormone (TRH) is inactivated by pyroglutamyl peptidase II (PPII: EC 3.4.19.6), a zinc-ectopeptidase localized in lactotropes. In these cells, PPII activity is positively and negatively regulated by thyroid hormones and 17β -estradiol respectively. In this thesis we have studied the effects of TRH on PPII activity, the transduction pathways involved, as well as the role of other hypothalamic factors that regulate prolactin secretion. Dispersed cells from rat adenohypophysis were cultured for 5 days in supplemented medium; surface PPII activity was determined.

TRH (10^{-6} M) decreased PPII activity with maximal inhibition at 16 h and an ED_{50} of 10^{-9} M. [3Me-His²]TRH, a potent agonist of the TRH receptor (TRH-R) was effective at lower concentrations, while TRH-OH, a TRH metabolite with a low affinity for TRH-R, was much less effective. These data suggest that TRH down regulates PPII activity through TRH-R activation. U-73122, an inhibitor of phospholipase C (PLC) dependent processes, blocked TRH effect. TPA, a protein kinase C (PKC) activator or Bay K 8644, an agonist of voltage-dependent Ca^{++} channels, diminished PPII activity in a dose-dependent manner. The effects of maximal doses of TPA or Bay K plus TRH were not additive. Neither TPA nor TRH effects were reversed by inhibitors of protein kinases. TRH-induced downregulation of PPII was not modified by TPA pretreatment for 24 h. TRH or Bay K effects were blocked by nifedipine or verapamil, antagonists of L-type Ca^{++} channels. These results suggest that TRH-R is coupled to PLC to regulate PPII activity, and that Ca^{++} entry through L-type channels is necessary for PPII down regulation. A new PKC isoenzyme may be involved in TRH action.

Pertussis toxin (PTX) neither modified basal PPII activity nor TRH-induced PPII-downregulation. Cholera toxin (CTX), forskolin (an adenylate cyclase [AC] activator), dibutyryl cAMP or IBMX (a phosphodiesterases inhibitor) decreased PPII activity with similar efficacy. Their maximal effects were additive with that of TRH. TRH effect was not blocked by 2',3'-dideoxyadenosine (an inhibitor of AC) or with H89 (a protein kinase A inhibitor). TRH-R is therefore not coupled to PTX- or CTX-sensitive G proteins

and does not mobilize cAMP to regulate PPII. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide diminished enzyme activity; its effect was additive with that of TRH and blocked with H89. Bromocriptine or somatostatin, two agonists coupled negatively to AC, stimulated PPII activity and blocked the inhibitory effect of TRH. Their effects were reversed by preincubation with PTX.

Since various of these treatments similarly regulated PPII mRNA and its activity, a mechanism of control of PPII activity by these hormones may be at the mRNA level.

In conclusion, PPII activity is subject to homologous and heterologous regulations by elements of the multifactorial system which coordinately controls PRL secretion, through multiple intracellular messengers.

INTRODUCCION

1. EL SISTEMA NEUROENDOCRINO

En organismos multicelulares la comunicación entre las células es vital para coordinar la actividad de sus órganos, regulando así su diferenciación, desarrollo, crecimiento, organización y adaptación al medio ambiente. En mamíferos esta comunicación se realiza a través de múltiples sistemas de comunicación intercelular que incluyen al sistema neuroendócrino, el cual al decodificar señales internas y externas modifica la actividad de numerosas células, contribuyendo así al proceso homeostático del organismo.

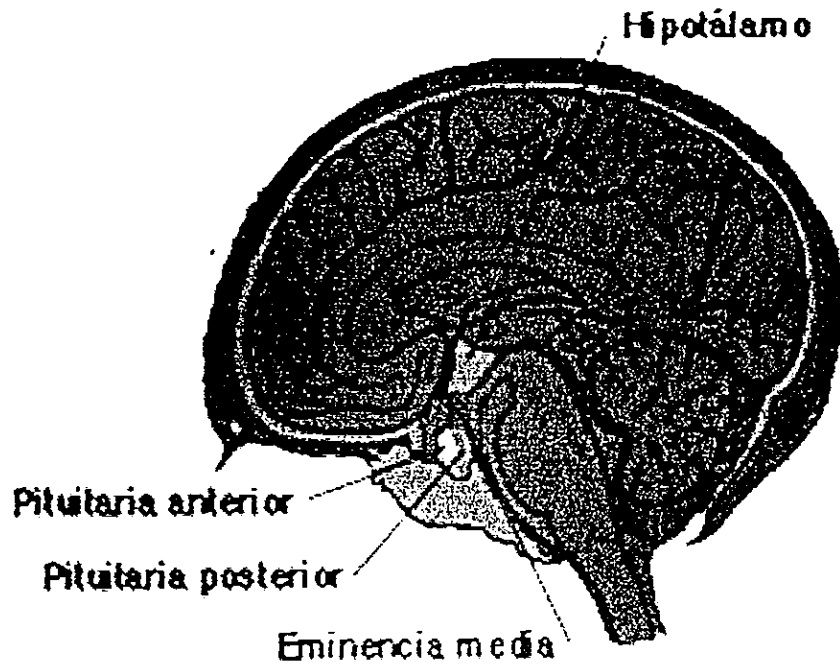
El sistema neuroendócrino incluye un grupo de células neurosecretoras localizadas en la base del cerebro, en una región llamada hipotálamo (figura 1). Estas neuronas, al igual que cualquier otra, son capaces de recibir y conducir impulsos nerviosos, pero no liberan sus moléculas mensajeras a una sinapsis clásica, sino en un plexo capilar localizado en la eminencia media (parte basal del hipotálamo) [figura 2]. Otro de los componentes de este sistema es la glándula pituitaria (también llamada hipófisis), un pequeño apéndice situado en la base del hipotálamo. En el humano, la hipófisis consta de dos lóbulos cada uno con diferentes funciones. El lóbulo posterior (neurohipófisis) es una extensión del hipotálamo, unido a éste por el tallo hipofisial; contiene axones y terminales nerviosas de células neurosecretoras originadas en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Por el contrario, el lóbulo anterior (adenohipófisis) no presenta conexión nerviosa alguna con el hipotálamo, pero está irrigado por un sistema portal que fluye de la eminencia media hacia la adenohipófisis (figuras 1 y 2).

El hipotálamo presenta “dos tipos” de neuronas neurosecretoras: uno produce las hormonas de la neurohipófisis y el otro produce y libera factores humorales que regulan la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisarias. En el primer caso, las células neurosecretoras del hipotálamo sintetizan oxitocina o vasopresina, hormonas que se transportan hasta las terminales nerviosas en la neurohipófisis, en

donde se almacenan. La neurohipófisis libera estas hormonas en los capilares de la circulación general, por donde circulan hasta encontrar a su órgano blanco (figura 2a y tabla I). En el segundo caso, las neuronas proyectan sus terminales a la eminencia media donde liberan factores hipofisiotróficos al sistema portal hipotalámico-adenohipofisiario. Los factores hipofisiotróficos se transportan en el sistema portal hasta sus células blanco en la adenohipófisis, para regular la síntesis y liberación de otras hormonas. La adenohipófisis produce diferentes hormonas, cada una sintetizada por un tipo de célula en particular. Algunas de las hormonas adenohipofisiarias son hormonas tróficas que actúan sobre otras células glandulares (figura 2b y tabla I); a este "subsistema" se le denomina eje hipotalámico-adenohipofisiario.

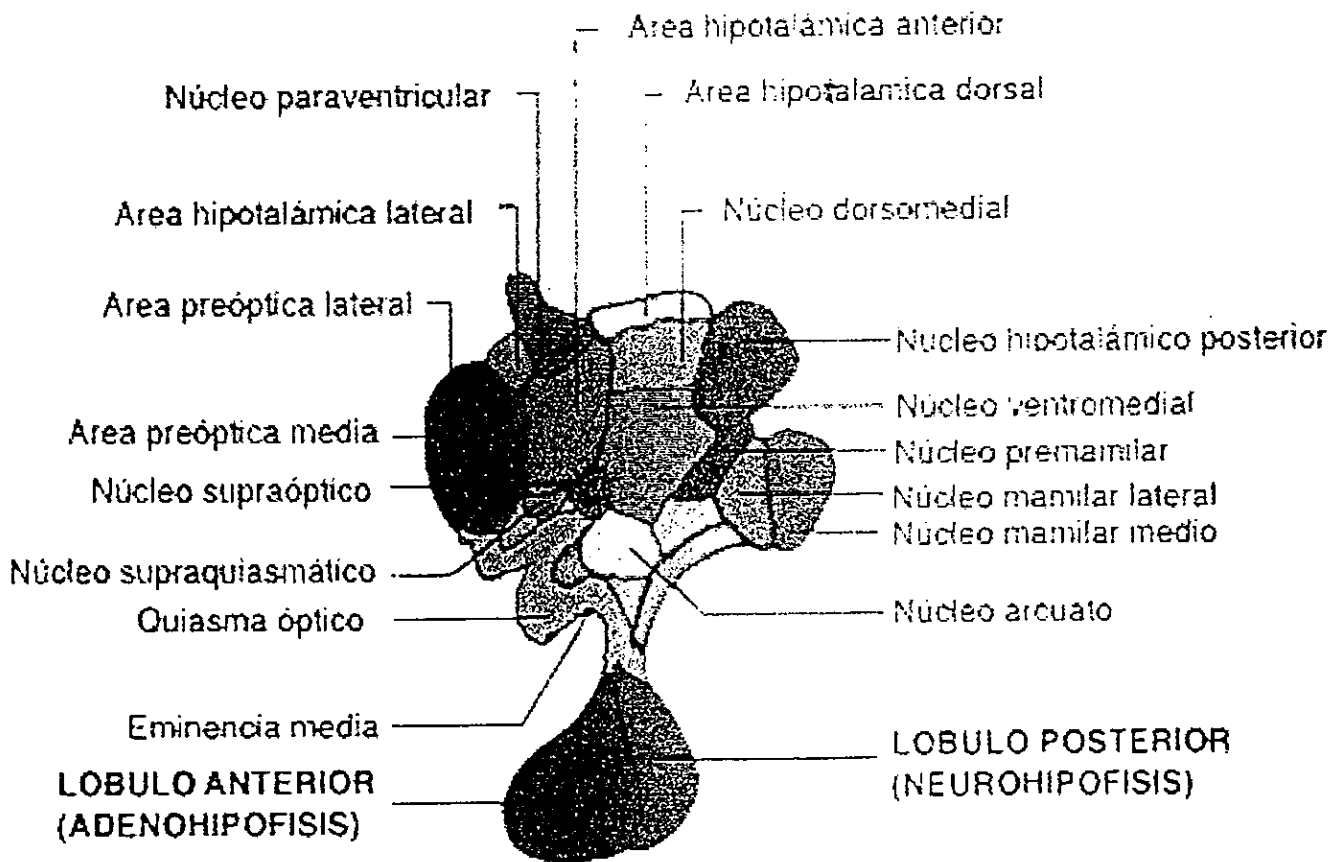
Figura 1. EL HIPOTALAMO HUMANO. Esta región del sistema nervioso central que se localiza en la base del cerebro **(A)** y que consta de varias agrupaciones de cuerpos celulares llamadas núcleos **(B)**, juega un papel importante en la integración del sistema endócrino y nervioso. El hipotálamo recibe e integra información de nervios periféricos y de otras regiones del cerebro para coordinar diferentes procesos fisiológicos, a través de varios tipos de neuronas, incluyendo neuronas secretoras. Las neuronas secretoras sintetizan y liberan mensajeros químicos a la sangre (figura 2).

A)



B)

HIPOTALAMO



GLANDULA PITUITARIA (HIPOFISIS)

Figura 2. EL EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISIARIO. A) Las hormonas oxitocina y vasopresina, sintetizadas por células neurosecretoras de los núcleos supraóptico y paraventricular, se transportan axonalmente hasta las terminales nerviosas en la neurohipófisis, donde se almacenan y, en respuesta a un estímulo específico se liberan a la sangre, por donde se desplazan hasta alcanzar a su órgano blanco. **B)** El hipotálamo presenta otro juego de células neurosecretoras, que liberan sus neurohormonas al sistema portal que fluye de la eminencia media a la adenohipófisis. Estas neurohormonas inhiben o estimulan la liberación de las hormonas adenohipofisiarias a la sangre periférica.

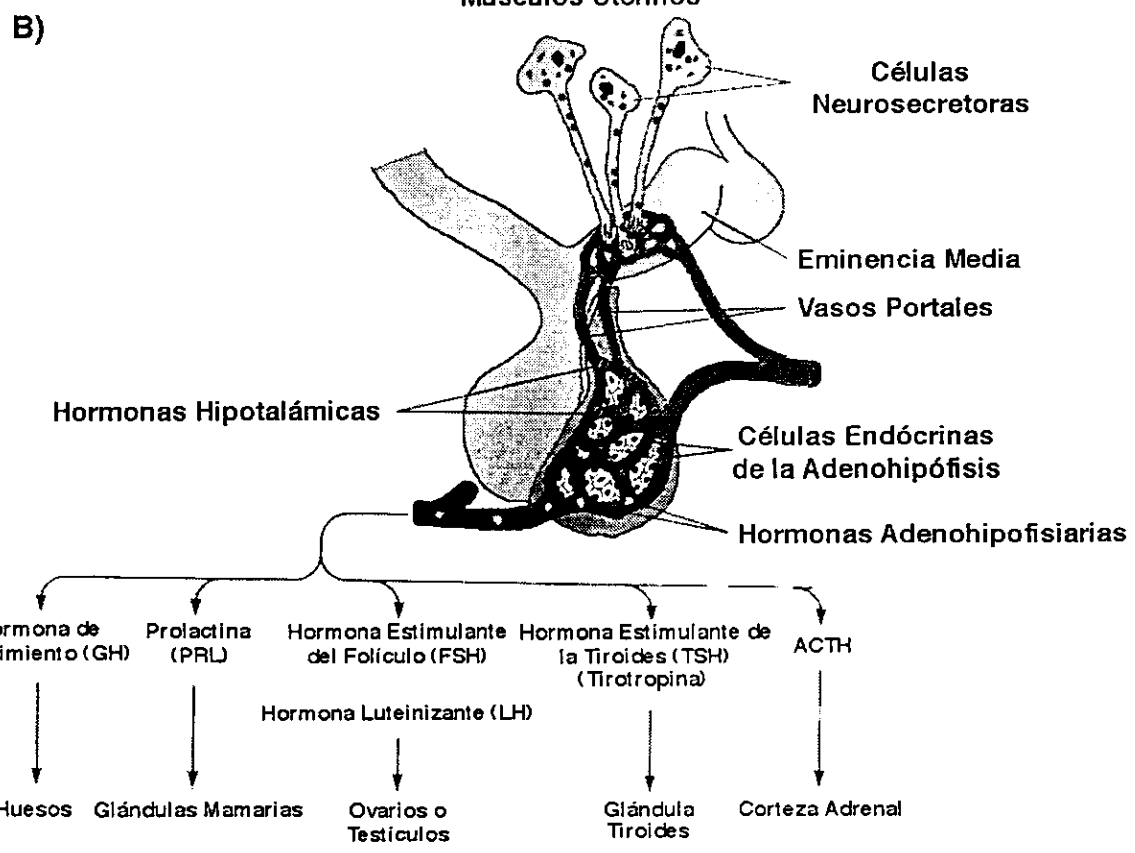
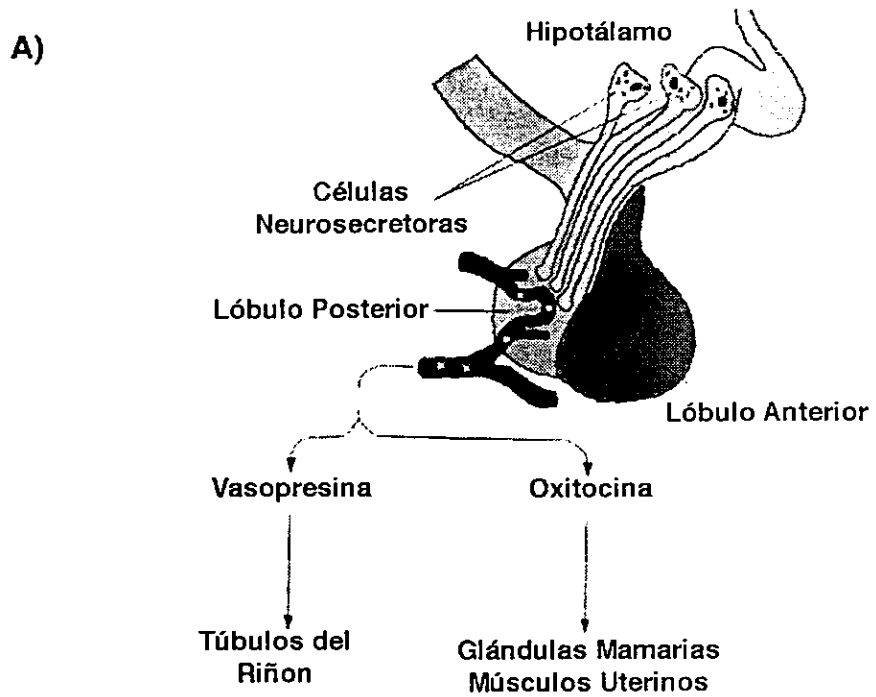


Tabla I. PRINCIPALES HORMONAS DE LA HIPOFISIS. Las hormonas vasopresina y oxitocina se sintetizan en el hipotálamo y se transportan axonalmente hasta la neurohipófisis, en donde se almacenan y liberan a la sangre. En general, las hormonas adenohipofisarias se sintetizan y liberan por un tipo celular en particular. Entre paréntesis se indican las siglas con las que se les identifica universalmente.

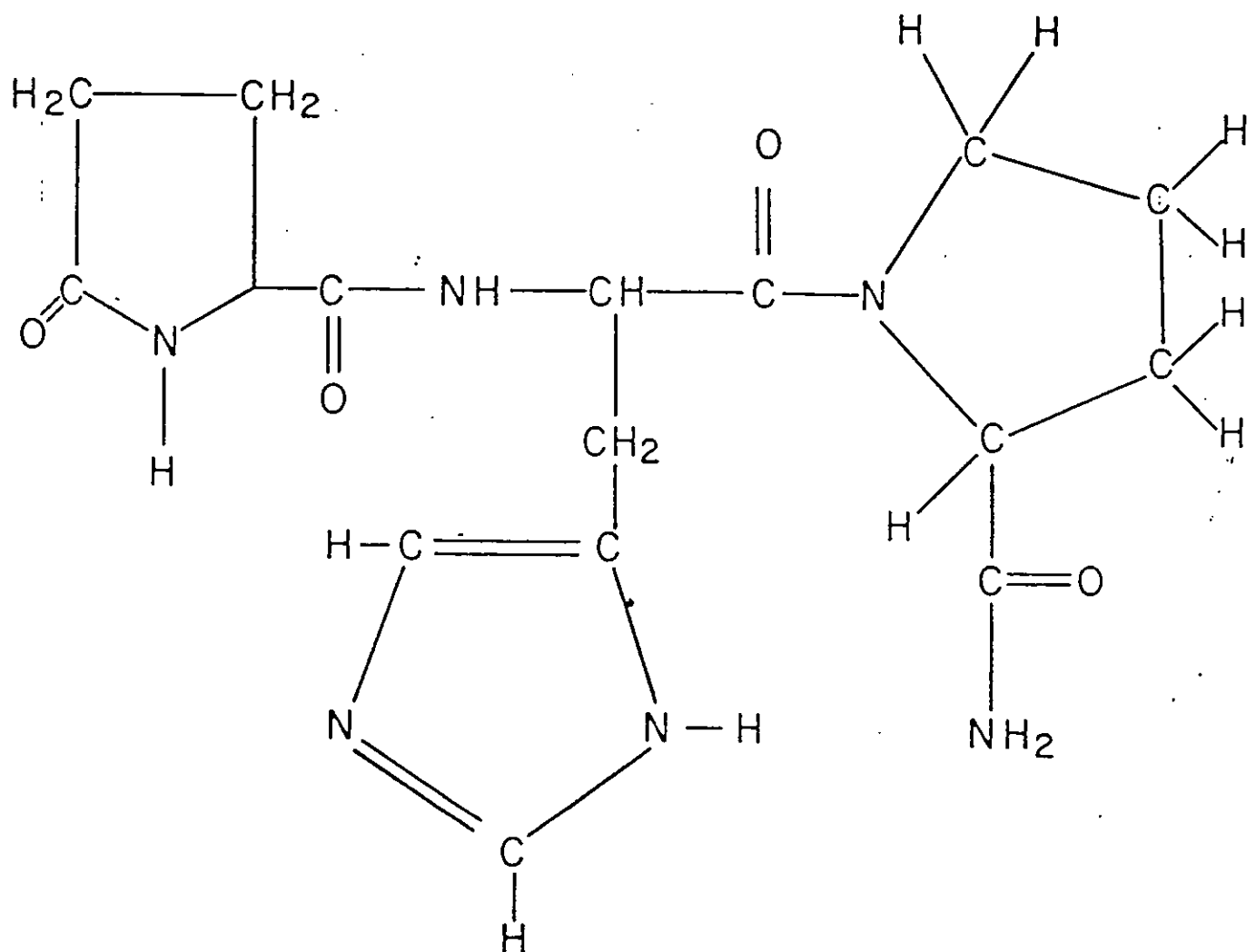
LOBULO	HORMONA	FUNCION REPRESENTATIVA
Posterior	Vasopresina	Induce la reabsorción de agua de los ductos del riñon.
	Oxitocina	Estimula la contracción de los músculos uterinos y de la glándula mamaria.
Anterior	Prolactina (PRL)	Estimula la producción y secreción de leche.
	Hormona estimulante de la tiroides (TSH) [también llamada tirotropina]	Estimula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas
	Hormona de crecimiento (GH) [también llamada somatotropina]	Estimula el crecimiento en general.
	Hormona estimulante del folículo (FSH)	Induce el desarrollo del folículo en los ovarios y la secreción de estrógenos; estimula la espermatogénesis.
	Hormona luteinizante (LH)	Estimula el desarrollo del cuerpo lúteo y la producción de progesterona en hembras, y la síntesis de testosterona en el macho.
	Adrenocorticotropina (ACTH)	Estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal.

2. LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)

El primer factor hipofisiotrófico que se purificó y secuenció fue un tripéptido con el N-terminal ciclizado y el C-terminal amidado: pglu-his-proNH₂ [figura 3] (Boler *et al.*, 1969; Burgus *et al.*, 1969). A esta molécula se le denominó hormona liberadora de tirotropina (“thyrotropin-releasing hormone”: TRH), porque induce la liberación de la hormona adenohipofisiaria tirotropina (“thyroid-stimulating hormone”: TSH), tanto *in vivo* como *in vitro*, en todas las especies de mamíferos estudiadas, incluyendo al humano (Guillemin, 1978; Schally, 1978). Posteriormente, se aislaron y caracterizaron diferentes factores hipotalámicos, la mayoría de ellos de naturaleza peptídica, algunos de los cuales inhiben o activan la síntesis y liberación de las hormonas adenohipofisiarias (tabla II).

La TRH se sintetiza a partir de un precursor de alto peso molecular (pro-TRH). La secuencia de aminoácidos del precursor deducida del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de hipotálamo de rata contiene la secuencia progenitora de la TRH, gln-his-pro-gly, repetida cinco veces, cada una de ellas flanqueada por pares de aminoácidos básicos y separadas por diferentes péptidos conectores (Lechan *et al.*, 1986).

El gene que codifica para la pro-TRH contiene tres exones interrumpidos por dos intrones (Lee *et al.*, 1988). El exón 1 codifica para la región 5' no traducida del ácido ribonucleico mensajero (ARNm), el exón 2 codifica para la secuencia señal y la mayor parte del amino terminal del precursor, y el exón 3 codifica para el resto del amino terminal, las cinco copias de la TRH, los péptidos conectores, el carboxilo terminal y la region 3' no traducida del ARNm. En la región 5' reguladora del gene se encuentran las secuencias nucleotídicas reconocidas por los receptores a glucocorticoides y a hormonas tiroideas, así como las secuencias nucleotídicas consenso TRE y CRE, reconocidas en genes que son regulados por ésteres de forbol y por el monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) respectivamente.



piroglutamil-histidil-prolinamida

Figura 3. ESTRUCTURA DE LA TRH. Durante el procesamiento de la pro-TRH la glutamina N-terminal es ciclizada a ácido piroglutámico por la enzima piroglutaminil ciclasa y la glicina C-terminal es utilizada por la enzima peptidil glicina α -amidante monooxigenasa ("peptidyl glycine α -amidating monooxygenase") para amidar a la prolina.

Tabla II. HORMONAS HIPOFISIOTROFICAS. Entre paréntesis se indican las siglas con las que se les identifica universalmente y el número de aminoácidos (aas) de las hormonas peptídicas.

HORMONAS HIPOFISIOTROFICAS	ESTRUCTURA QUIMICA	EFECTO EN ADENOHIPOFISIS
Hormona liberadora de tirotropina (TRH).	Péptido (3 aas)	Estimula la síntesis y liberación de TSH y PRL.
Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (también llamada hormona liberadora de LH [LHRH]).	Péptido (10 aas)	Estimula la liberación de LH y FSH.
Somatostatina (también llamada factor inhibidor de la liberación de somatotropina [SRIF]).	Péptido (14 aas)	Inhibe la liberación de GH, PRL y TSH.
Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	Péptido (41 aas)	Estimula la secreción de ACTH.
Hormona liberadora de GH (GHRH).	Péptido (44 aas)	Estimula la secreción de GH.
Péptido intestinal vasoactivo (VIP).	Péptido (28 aas)	Estimula la secreción de PRL.
Dopamina (DA).	Catecolamina	Inhibe la secreción de PRL.

Durante su síntesis en el núcleo paraventricular del hipotálamo, el precursor de la TRH se empaqueta en gránulos de neurosecreción, que se transportan hasta la terminal nerviosa. Los enlaces dibásicos pueden ser cortados por enzimas de procesamiento (PC), aparentemente por la PC1 y/o la PC2, que rompen el enlace peptídico en el lado carboxilo del segundo aminoácido básico (Friedman *et al.*, 1995; Nillni *et al.*, 1993; Nillni *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 1997; Schaner *et al.*, 1997). Los aminoácidos básicos remanentes, se retiran gracias a la acción de la carboxipeptidasa E, generándose entonces el péptido gln-his-pro-gly. Posteriormente, la glutamina N-terminal se cicliza por la enzima glutaminil ciclasa (Fisher *et al.*, 1987), mientras que la enzima peptidil glicina α -amidante monooxigenasa ("peptidyl glycine α -amidating monooxygenase") utiliza a la glicina C-terminal para dejar a la prolina amidada (Eipper *et al.*, 1985).

La TRH se almacena en gránulos de neurosecreción a nivel de las terminales nerviosas, y se libera por exocitosis, tal como ocurre para los neurotransmisores. Estudios *in vitro* han demostrado que la TRH se libera del hipotálamo por despolarización de una manera dependiente de Ca^{++} , así como por neurotransmisores. Por ejemplo, la liberación de la TRH en el hipotálamo medio basal se estimula por histamina pero se inhibe por dopamina (Joseph-Bravo *et al.*, 1979).

3. EL EJE HIPOTALAMICO-ADENOHIPOFISIARIO Y LA TRH

En respuesta a la TRH, los tirótopos secretan TSH a la circulación general. Al alcanzar a su órgano blanco, la glándula tiroidea, la TSH regula la liberación de las hormonas tiroideas triiodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), hormonas que controlan diversos procesos metabólicos (Dumont *et al.*, 1980).

Las técnicas de radioinmunoensayo, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*, han permitido determinar la localización del "área tirotrófica", región hipotalámica involucrada en el control de la secreción de la TSH de la adenohipófisis. La concentración más alta de TRH se localiza en las terminales nerviosas de la eminencia media [EM] (Brownstein *et al.*, 1974). Lesiones electrolíticas del núcleo

paraventricular (NPV) o cortes del hipotálamo a nivel del hipotálamo medio basal han mostrado que los cuerpos celulares de las neuronas TRHérgicas del NPV proyectan sus axones a la EM (Brownstein *et al.*, 1982; Martin y Reichlin, 1972; Palkovits *et al.*, 1982). El tratamiento de ratas con peroxidasa de rábano (marcador del transporte retrógrado) y colchicina (inhibidor del transporte axonal) en la EM, reveló por inmunocitoquímica, doble marcaje positivo a la peroxidasa de rábano y a la TRH en los cuerpos celulares de la región parvocelular del NPV (Ishikawa *et al.*, 1988). La presencia de la prohormona y del ARNm de la TRH se ha detectado en estas mismas neuronas (Jackson *et al.*, 1985; Segerson *et al.*, 1987a).

Por otro lado, lesiones del NPV (Aizawa y Greer., 1981; Martin *et al.*, 1970), cortes de las vías aferentes del hipotálamo medio basal (Halász *et al.*, 1967) o la inmunización pasiva con anticuerpos anti-TRH (Koch *et al.*, 1977) disminuyen la concentración basal de la TSH en plasma, así como en respuesta al frío (Hefco *et al.*, 1975b; Ishikawa *et al.*, 1984; Mueller *et al.*, 1977), condición que induce la liberación de la TRH de la EM a la sangre portal, y como consecuencia, la liberación de la TSH del tirótopo a la circulación general (Arancibia *et al.*, 1983; Hefco *et al.*, 1975a; Jobin *et al.*, 1975). La TRH también regula la síntesis y glucosilación de las subunidades α y β de la TSH (Weintraub *et al.*, 1989).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la TRH también induce la síntesis y liberación de prolactina (PRL) de la adenohipófisis, hormona que entre muchas otras funciones, estimula la producción de leche en la glándula mamaria (Leong *et al.*, 1983). Diversas evidencias experimentales apoyan el papel de la TRH como un regulador fisiológico de la liberación de PRL. Lesiones del NPV previenen el incremento de PRL en suero en respuesta a la succión (Kiss *et al.*, 1986). Durante la lactancia, en respuesta al estímulo de la succión, un aumento en los niveles del ARNm de la TRH en el NPV, y un incremento en la concentración de la TRH en sangre portal se correlacionan con una alta liberación de PRL (de Greef *et al.*, 1981; Fink *et al.*, 1982; Uribe *et al.*, 1993). También en el ciclo estral (ciclo ovulatorio) de la rata, específicamente durante la tarde del proestro, la liberación de PRL aumenta cuando se incrementa la concentración de la TRH en sangre portal (Fink *et al.*, 1982).

Además, la inmunización pasiva con anticuerpos anti-TRH inhibe la liberación de PRL que ocurre durante la tarde del proestro (Horn *et al.*, 1985; Koch *et al.*, 1977) o en respuesta al estímulo de la succión (de Greef *et al.*, 1987).

Por otro lado, cabe señalar brevemente que la TRH está ampliamente distribuída en el sistema nervioso central, en donde al activar a su receptor, desencadena una diversidad de respuestas celulares, razón por la cual se le ha propuesto como un neurotransmisor (Metcalf y Jackson, 1989).

4. EL RECEPTOR DE LA TRH (R-TRH)

La transducción del mensaje que llevan las hormonas de naturaleza hidrofílica, se inicia cuando éstas interactúan con sus receptores localizados sobre la membrana plasmática de la célula blanco. Poco tiempo después de haber sido identificada la TRH, estudios de unión de la [³H]-TRH a membranas celulares, demostraron la existencia de sitios de unión de alta afinidad para el tripéptido en homogenados de adenohipófisis y en líneas celulares tumorales derivadas de este tejido (Gourdji *et al.*, 1973; Hinkle y Tashjian 1973; Labrie *et al.*, 1972; Wilber y Siebel 1973). Esta unión se lleva a cabo a nivel de la membrana plasmática (Vandlen *et al.*, 1981). Así, la unión de la TRH a sus receptores en los tirótopos y en los lactótopos induce la síntesis y liberación de la TSH y PRL respectivamente.

A los receptores membranales, con base en su estructura y su función se les ha clasificado en familias, entre las cuales se encuentra la familia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (Dohlman *et al.*, 1987). Estos receptores responden a una variedad de mensajeros químicos entre ellos, aminas biogénicas, péptidos, hormonas glucoproteícas, etc. Los receptores acoplados a proteínas G son el componente celular inicial de una compleja cascada de señales intracelulares por la cual un ligando extracelular inicia una respuesta celular.

La comparación de la estructura primaria deducida del ADNc de diferentes miembros de esta familia, reveló que tienen una alta similitud con respecto tanto a su secuencia de aminoácidos como a nivel de su organización topográfica (Dohlman *et*

al., 1987). Los receptores acoplados a proteínas G son glucoproteínas integrales de membrana. En general presentan siete α -hélices transmembranales, formadas cada una por 20-28 aminoácidos hidrofóbicos, unidas alternativamente por tres asas extracelulares y tres citoplásmicas, con las regiones N-terminal y C-terminal orientadas hacia el exterior y el interior de la célula respectivamente (figura 4).

Las secuencias de aminoácidos deducidas del ADNc del receptor de la TRH (R-TRH) de un tumor tirotrópico TtT de ratón (Straub *et al.* 1990), de las líneas celulares lactotrópicas de rata GH₃ (de la Peña *et al.*, 1992a) y GH₄C₁ (Zhao *et al.*, 1992), de adenohipófisis de rata (Sellar *et al.*, 1993), y de hipófisis (Duthie *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993) y cerebro (Matre *et al.*, 1993) humano, indican que el R-TRH pertenece a los receptores acoplados a proteínas G (figura 4).

El R-TRH presenta dos sitios consenso potenciales de N-glucosilación (asn-X-ser/thr), similares al de otros receptores acoplados a proteínas G, en la región N-terminal (Asn 3 y Asn 10). Actualmente no se conoce el papel funcional de estas glucosilaciones.

El R-TRH tiene dos residuos de cisteínas en la primera y segunda asa extracelular, que están altamente conservados en esta familia de receptores y que parecen jugar un papel en la estructura del receptor. Estos residuos podrían formar un puente disulfuro, ya que se ha demostrado que la unión de la TRH a membranas de tejido nervioso se reduce cuando éstas son tratadas con agentes que desestabilizan los puentes disulfuro (Sharif y Burt, 1984).

Las mayores divergencias entre los receptores acoplados a proteínas G ocurren en la tercera asa intracelular y en el C-terminal. Gracias a estudios de proteólisis, mutagénesis y con receptores quiméricos, se ha postulado que estas dos regiones son críticas para las funciones del receptor, tal como el acoplamiento con las proteínas G, selectividad para el sistema de transducción y regulación del receptor.

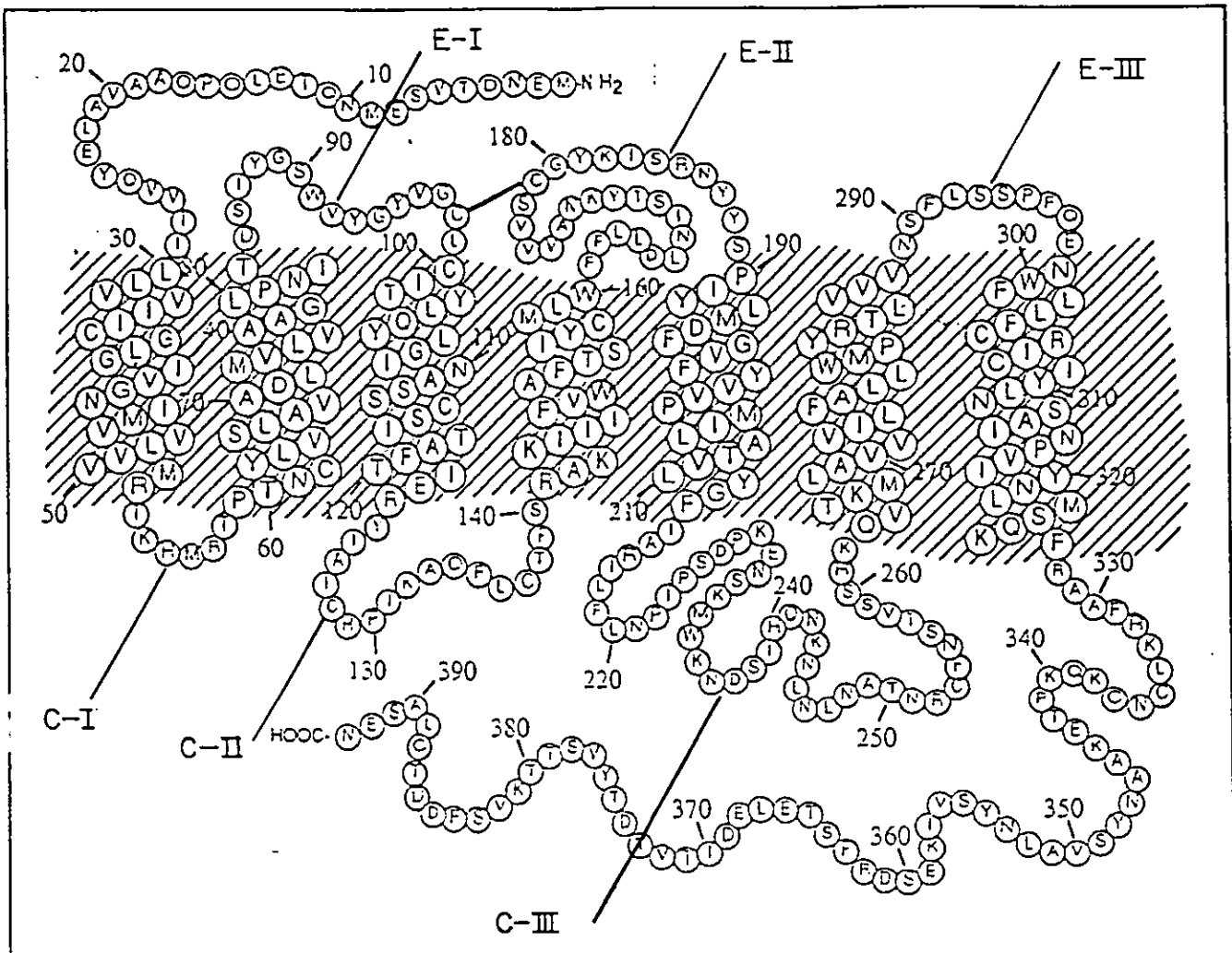


Figura 4. REPRESENTACION DEL RECEPTOR DE LA TRH. En general los receptores acoplados a proteínas G tienen la región amino-terminal y tres asas (E-I, E-II y E-III) orientadas extracelularmente, siete α -hélices transmembranales (M-I a M-VII), y la región carboxilo-terminal y tres asas (C-I, C-II y C-III) orientadas hacia el citoplasma

Por ejemplo, deleciones o substituciones de residuos tanto en la parte proximal del N-terminal como de la región C-terminal de la tercera asa intracelular del receptor adrenérgico β_2 ($A\beta_2$) de hamster, causan una disminuci3n de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) inducida por el agonista (Dixon *et al.*, 1987; Strader *et al.*, 1987). El reemplazo de la tercera asa intracelular del receptor muscarínico m_2 (el cual está acoplado negativamente a la AC) por el correspondiente al m_3 (acoplado a la fosfolipasa C [PLC]) resulta en una proteína quimérica (m_2/m_3) que estimula a la PLC (Wess *et al.*, 1989). Se ha postulado que las regiones de la tercera asa intracelular involucradas en la activaci3n de las proteínas G son hélices anfipáticas; nueve aminoácidos (227-235) de la tercera asa intracelular del R-TRH podrían formar una estructura secundaria de tal tipo. Estudios mutacionales de esta regi3n en el receptor $A\beta$ sugieren que los residuos hidrof3bicos de las hélices anfipáticas, los cuales pueden determinar la estructura secundaria, están involucrados en la capacidad del receptor para activar a la proteína G (Cheung *et al.*, 1992). Adem3s, estudios mutacionales con el receptor muscarínico m_3 , sugieren que la inserci3n o substituci3n de residuos que afectan la naturaleza anfipática de esta regi3n también afectan la capacidad del receptor para acoplarse con su proteína G (Duerson *et al.*, 1993). De hecho, parece haber motivos estructurales en estas regiones asociados con el sistema específico de segundos mensajeros. En los receptores muscarínicos m_1 , m_3 , y m_5 (los cuales están acoplados a la PLC) la porci3n amino terminal de la tercera asa intracelular está altamente conservada, pero no en los subtipos m_2 y m_4 [acoplados negativamente a la AC] (Wess *et al.*, 1989). Por otro lado, algunos receptores acoplados a la inhibici3n de la AC, como el adrenérgico α_2 , el dopaminérgico D_2 , los muscarínicos m_2 y m_3 y el serotoninérgico $5-HT_{1A}$ presentan una tercera asa intracelular larga y un C-terminal corto; por el contrario, los receptores acoplados a la PLC como los serotoninérgicos $5-HT_2$ y $5-HT_{1C}$, y el adrenérgico α_{1B} tienen la tercera asa intracelular corta pero el C-terminal largo.

Otra serie de experimentos bioquímicos y mutacionales han demostrado que la regi3n próxima a la porci3n N-terminal de la cola intracelular C-terminal de los

receptores $A\beta_2$ y de la rodopsina también está involucrada en el acoplamiento con las proteínas G (O'Dowd *et al.*, 1988; Takemoto *et al.*, 1985; Weiss *et al.*, 1994). El R-TRH presenta un residuo de cys en la parte C-terminal próxima al séptimo dominio transmembranal, residuo que es homólogo a la cys que puede ser acilada por ácido palmítico en otros receptores. La sustitución de este residuo por gly en el receptor $A\beta_2$ induce una pérdida en la capacidad del receptor para activar proteínas G, lo que sugiere que la estructura cys-palmitilada puede ser crucial para la función de algunos receptores (O'Dowd *et al.*, 1989).

Finalmente, los receptores acoplados a la AC o fosfodiesterasa del GMP cíclico, como los $A\beta_1$, $A\beta_3$ y los de la opsina, poseen un dominio C-terminal largo rico en residuos de serinas y treoninas que pueden servir como sustrato para diferentes cinasas. La tercera asa intracelular del R-TRH posee un residuo de treonina y dos de serina potencialmente fosforilables por la cinasa C de proteínas (PKC), y en el dominio C-terminal sitios potenciales de fosforilación por la cinasa A de proteínas (PKA), PKC, cinasa II de caseína o cinasas específicas de receptores acoplados a proteínas G. Estas fosforilaciones están involucradas en la regulación (desensibilización, internalización y degradación) de este tipo de receptores (Hausdorff *et al.*, 1990; Raymond *et al.*, 1990).

El R-TRH tiene una alta especificidad para la estructura completa de la TRH (Hinkle *et al.*, 1974). La sustitución del pglu N-terminal por gln no ciclizada causa una disminución de 200 veces en la afinidad de unión. La adición de un iodo a la histidina, provoca una pérdida total de unión al receptor. Lo mismo ocurre con el derivado N-1-metil-histidil-TRH, pero el N-3-metil-histidil-TRH (MeTRH) mostró 3-10 veces más afinidad para el R-TRH (Hinkle *et al.*, 1974). Esta alta afinidad se ve reflejada en un efecto sobre la secreción de PRL mayor de la MeTRH que de la TRH (Vale *et al.*, 1971). Actualmente este análogo sigue siendo utilizado para estudios del R-TRH así como en respuestas celulares y mecanismos de transducción inducidos por la TRH. La ruptura de la unión pro-amida en la TRH (pglu-his-pro-OH: TRH ácida) induce prácticamente una pérdida total de unión al receptor (Hinkle *et al.*, 1974).

5. PROTEINAS G HETEROTRIMERICAS

Las proteínas G acopladas a los receptores que presentan siete dominios transmembranales, son proteínas heterotriméricas asociadas a la membrana plasmática del lado citoplásmico, cuyas subunidades son denominadas α , β y γ (Spiegel *et al.*, 1991). La primera es la subunidad que acopla al receptor con la proteína G (Conklin y Bourne 1993). La subunidad α es única para cada proteína G y posee un sitio de unión para nucleótidos de guanina, que en estado "no activado" tiene unida una molécula de 5'-difosfato de guanosina (GDP).

Fisiológicamente el ciclo de activación-inactivación de una proteína G se inicia con la activación de un receptor por su ligando. La unión del ligando a su receptor provoca un cambio conformacional en el sitio de unión de nucleótidos de guanina de la subunidad α , catalizando entonces el intercambio de GDP por 5'-trifosfato de guanosina (GTP). La unión del GTP a la subunidad α provoca tanto la disociación de la proteína G del receptor así como del α -GTP del complejo $\beta\gamma$ (Birnbaumer, 1990). La disociación de la proteína G del receptor también reduce la afinidad del receptor por el agonista. Así activada la subunidad α , de acuerdo a su identidad, causa cambios conformacionales y alteraciones en las actividades de canales iónicos o de varias enzimas, incluyendo a la AC y a la PLC, generadoras de segundos mensajeros intracelulares (ver sección 6). La subunidad α posee una actividad intrínseca de GTPasa que hidroliza al GTP que lleva unido en GDP. El complejo α -GDP se reasocia con el complejo $\beta\gamma$ para volver a formar el heterotrímero inactivo (figura 5).

Gracias a las técnicas de biología molecular, bioquímica y electrofisiología, se ha podido clonar los ADNc de diferentes subunidades α , así como identificar sus funciones en sistemas celulares (tabla III). Por ejemplo, en todos los sistemas estudiados α_s y α_i activan e inhiben a la AC respectivamente. Además, α_s y α_i son también capaces de activar directamente canales iónicos; por ejemplo, la primera activa canales de Ca^{++} sensibles a dihidropiridinas en músculo cardiaco y esquelético, mientras que la segunda activa al canal de potasio muscarínico en células cardiacas (Yatani *et al.*, 1987; 1988a; 1988b).

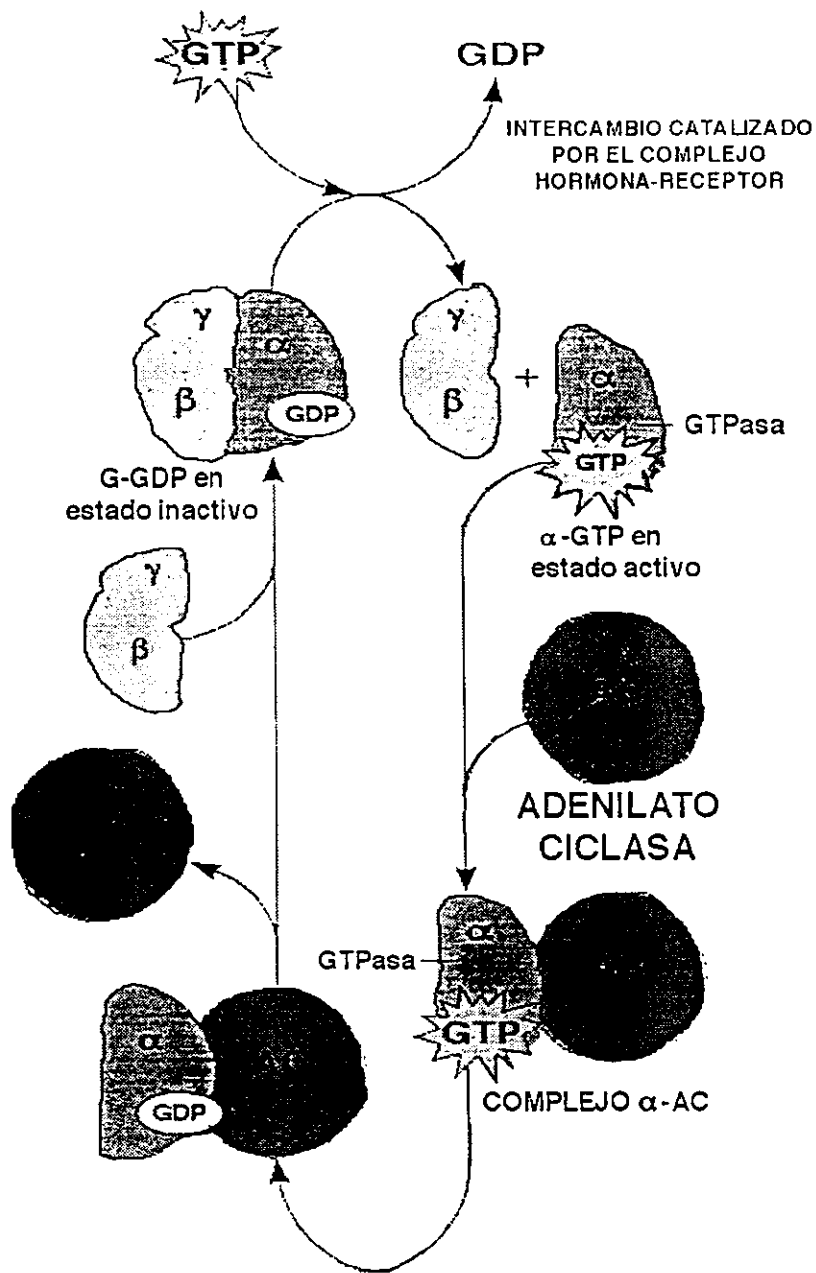


FIGURA 5. CICLO DE ACTIVACION DE UNA PROTEINA G HETEROTRIMERICA. La explicación del ciclo se detalla en el texto.

Tabla III. LA FAMILIA DE LAS SUBUNIDADES α DE PROTEINAS G TRIMERICAS. Entre paréntesis se indica la sensibilidad a las toxinas pertussis (PTX) o del cólera (CTX). GPMc: monofosfato cíclico de guanosina; PI-PLC: fosfolipasa C específica de fosfatidil inositol. Las flechas hacia arriba y hacia abajo indican activación o inhibición respectivamente.

SUBFAMILIA	G α	RECEPTOR REPRESENTATIVO	EFFECTORES
s	α_s (CTX)	β -adrenérgico	↑Adenilato ciclasa ↑Canales de Ca ⁺⁺
	α_{olf} (CTX)	Receptores del olfato	↑Adenilato ciclasa
i/o/t	$\alpha_{i1}, \alpha_{i2},$ α_{i3} (PTX)	Receptor dopaminérgico D2	↑Canales de K ⁺ ↓Canales de Ca ⁺⁺ ↓Adenilato ciclasa
	α_o (PTX)	Receptor colinérgico m2	↓Canales de Ca ⁺⁺
	α_z	Desconocido	↓Adenilato ciclasa
	α_{t1} (PTX/CTX)	Rodopsina	↑Fosfodiesterasa del GMPc
	α_{t2} (PTX/CTX)	Opsinas del color	↑Fosfodiesterasa del GMPc
	α_{gus}	Receptores del gusto	Desconocido
q	$\alpha_q, \alpha_{11},$ α_{14}, α_{15}	Receptor colinérgico m1	↑PI-PLC β
12/13	α_{12}, α_{13}	Desconocido	Desconocido

Una de las herramientas más importantes para estudiar procesos dependientes de proteínas G ha sido el uso de toxinas bacterianas con actividad de difosfato de adenosina (ADP)-ribosil transferasa (figura 6). Estas toxinas pueden usarse para interferir con los mecanismos de transducción de señales en células intactas e identificar la familia de proteína G involucrada en una respuesta en particular. Dos toxinas se han utilizado sistemáticamente. La toxina del cólera (CTX) de Vibrio cholerae, ADP-ribosila a las subunidades α_s , α_{t1} , α_{t2} y α_{olf} (preferencialmente en estado α -GTP, disociada de $\beta\gamma$) en un residuo de arginina equivalente a la posición 174 de α_{t1} . Esta modificación inhibe la actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad α manteniéndola en estado activo (Fishman, 1990). La toxina pertussis (PTX) de Bordetella pertussis, ADP-ribosila a las subunidades α_i , α_t , α_o , en un residuo de cisteína conservado en la posición 4 de la región C-terminal. Sólo la proteína G en estado trimérico es sustrato de la PTX. La ADP-ribosilación de las $G\alpha$ catalizada por la PTX, impide la interacción del receptor con la proteína G, y por lo tanto también el intercambio de GDP por GTP de la subunidad α manteniéndola en estado inactivo [α -GDP $\beta\gamma$] (Ui, 1990).

Las identidades y funciones de las proteínas G fueron definidas por las de sus subunidades α . Inicialmente sólo se identificaron dos subunidades β y una subunidad γ , por lo que se postuló que las funciones del complejo $\beta\gamma$ eran mantener en estado inactivo a las proteínas G y anclar a éstas en la membrana plasmática. Actualmente se han clonado 4 y 7 tipos de subunidades β y γ respectivamente, y existen evidencias de que el complejo $\beta\gamma$, independientemente de la subunidad α , también es capaz de regular la actividad de diferentes enzimas y al menos la del canal de potasio cardíaco, que normalmente es regulado por acetilcolina (Clapham y Neer, 1993; Neer y Clapham, 1988). También se ha postulado que el complejo $\beta\gamma$ es un factor importante en determinar la especificidad de la interacción de una proteína G con el receptor. Por ejemplo, en células GH₃, el receptor de la SRIF inhibe un canal de Ca⁺⁺ vía $\alpha_{o2}\beta_1\gamma_3$ mientras que el receptor muscarínico m₄ inhibe al mismo canal vía $\alpha_{o2}\beta_3\gamma_4$ (Clapham y Neer, 1993).

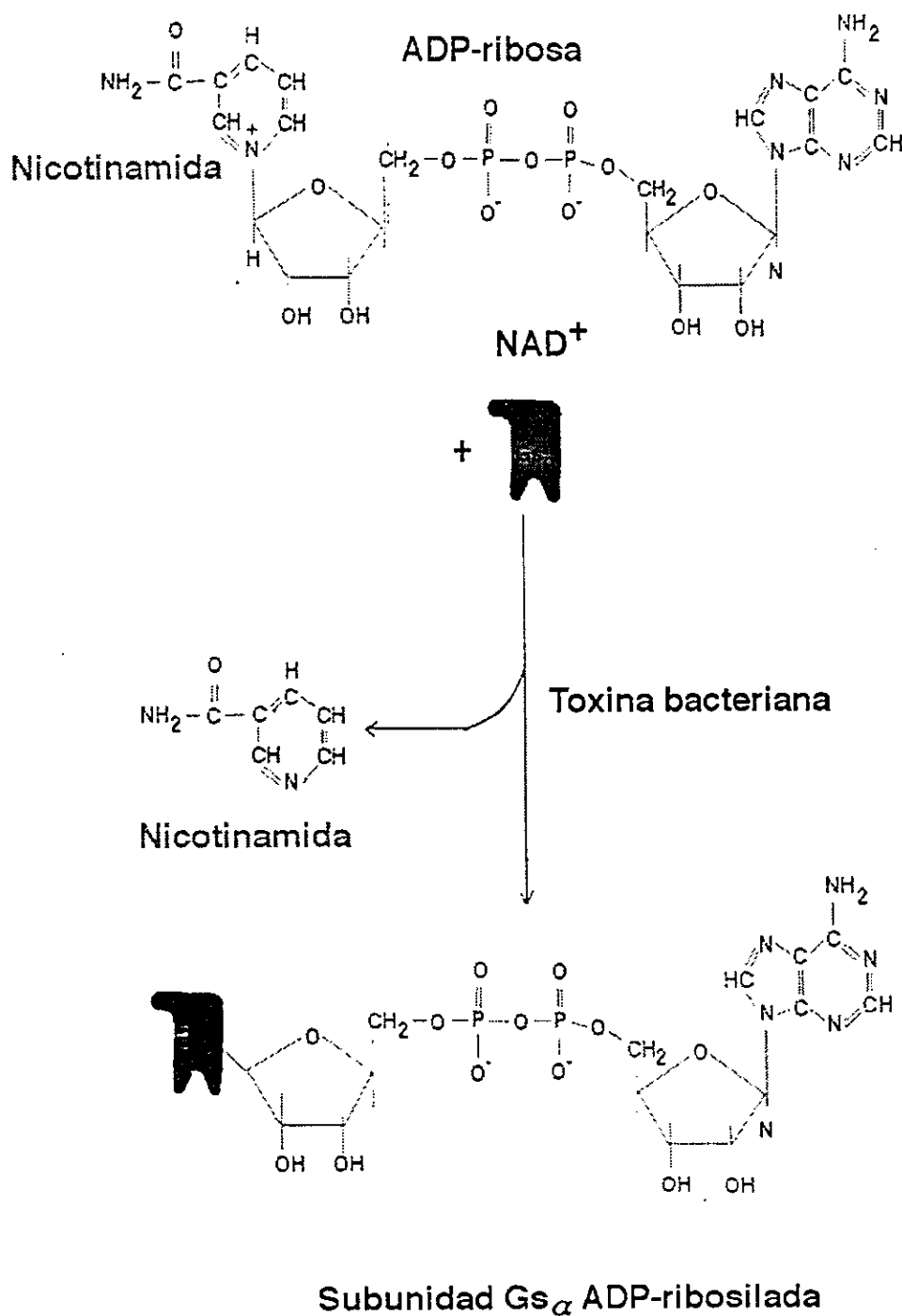


Figura 6. ADP-RIBOSILACION DE PROTEINAS G. La actividad de algunas proteínas G son modificadas por toxinas bacterianas que transfieren un grupo ADP-ribosil del NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida-adenina) a la subunidad α .

6. MECANISMOS DE TRANSDUCCION PARA LA TRH

6.1 ACTIVACION DE LA FOSFOLIPASA C β -1

La TRH estimula la secreción de PRL de una manera bifásica, con una fase "ráfaga" de secreción con hasta 10 veces de estimulación sobre la secreción basal, que dura aproximadamente 2 minutos, seguida por una fase sostenida de liberación con 5 veces de estimulación sobre la basal y con una duración de al menos 30 minutos (Kolesnick y Gershengorn, 1985).

Las líneas celulares GH (líneas celulares derivadas de tumores adenohipofisarios que sintetizan y liberan GH y PRL), se han utilizado como modelo para el estudio de la vía de transducción de la TRH en lactótrofos. En células GH₃, el R-TRH está acoplado a una proteína G de la familia G α q/G α 11 (Aragay *et al.*, 1992; Hsieh y Martin, 1992) la cual activa a la PLC- β 1 (Smrcka *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1991), que a partir del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato genera 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y diacilglicerol (DG) como segundos mensajeros [figura 7] (Gershengorn, 1986).

La unión de la TRH a su receptor causa un aumento rápido (con un pico máximo en 10 segundos) en la concentración intracelular de Ca⁺⁺ libre ([Ca⁺⁺]_i) de 3-8 veces sobre la basal, regresando a niveles basales en 1-2 minutos, seguido por un segundo aumento de 1.5-2 veces sobre la basal, sostenido por al menos 15 minutos (Albert y Tashjian, 1984; Gershengorn y Thaw, 1985). El primer aumento en la [Ca⁺⁺]_i se debe a la movilización de Ca⁺⁺ del retículo endoplásmico a través de la activación del receptor a IP₃ por su ligando; este primer aumento en la [Ca⁺⁺]_i provoca la primera fase de la liberación de PRL (Gershengorn *et al.*, 1984). El segundo incremento en la [Ca⁺⁺]_i se debe al influjo de Ca⁺⁺, a través de canales de Ca⁺⁺ dependientes de voltage tipo L, provocando la segunda fase de liberación de PRL. Existen evidencias de que la PKC translocada (del citosol a la membrana plasmática inducida por el primer aumento en la [Ca⁺⁺]_i) y activada por el DG, fosforila a los canales tipo L aumentando su probabilidad de apertura, y por lo tanto induce el segundo aumento en la [Ca⁺⁺]_i (Dufy *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1987).

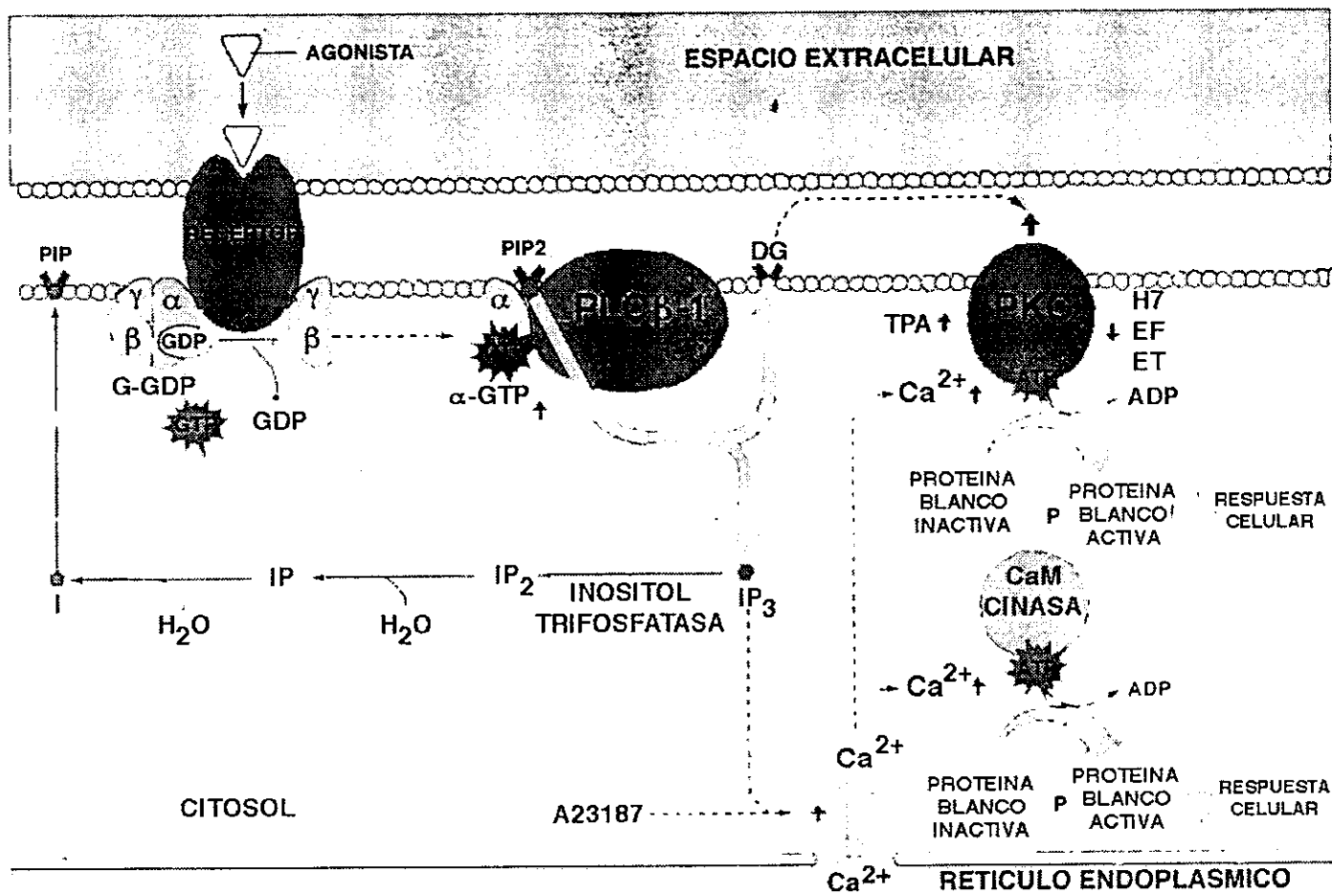


Figura 7. VIA DE TRANSDUCCION DEL RECAMBIO DE FOSFOINOSITIDOS. La activación de la fosfolipasa C β -1 (PLC β -1) induce la producción del 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) y un aumento en la [Ca²⁺]_i que se utilizan como segundos mensajeros intracelulares. La explicación de la vía se detalla en el texto. El A23187 es un ionóforo de Ca²⁺. El TPA es un activador de la PKC. El H7, la esfingosina (EF) y la estaurosporina (ET) son inhibidores de cinasas de proteínas. PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato, DG: diacilglicerol, PKC: cinasa C de proteínas, CaM Cinasa: cinasa de proteínas dependiente de Ca²⁺/calmodulina.

Se ha reportado recientemente que en células GH₃ y en células HEK 293 transfectadas con el ADNc del R-TRH, la TRH también tiene un efecto reatrolimentador negativo y rápido sobre el primer aumento del Ca⁺⁺ intracelular, induciendo un eflujo de Ca⁺⁺, posiblemente a través de activar a una bomba de Ca⁺⁺ de la membrana plasmática (Nelson y Hinkle, 1994).

La elevación de la [Ca⁺⁺]_i provocada por la TRH, puede inducir la secreción de la PRL a través de activar diversas cinasas de proteínas que fosforilan proteínas involucradas en los procesos de exocitosis. La TRH induce fosforilación de algunas proteínas nucleares y citosólicas en lactótopos y en células GH₃ vía activación de una PKC dependiente de Ca⁺⁺ (Drust y Martin, 1984; Murdoch *et al.*, 1983). En particular promueve la fosforilación de una proteína de 80K que está asociada a los microtúbulos, la cual parece ser la proteína de 80K que es sustrato endógeno de la PKC (Martínez de la Escaleta *et al.*, 1989; Martínez de la Escalera y Weiner, 1992). Las cinasas dependientes de Ca⁺⁺/calmodulina (CaM-cinasa) o de AMPc (PKA) también pudieran participar en estos eventos. La TRH induce activación de la CaM-cinasa en células GH₃ y en lactótopos (Cui *et al.*, 1994; Jefferson *et al.*, 1991); ciertas isoformas de la AC pueden ser activadas por el complejo Ca⁺⁺/calmodulina, llevando finalmente a la activación de la PKA (Cooper *et al.*, 1995). Por otro lado, la activación de la PKC y el aumento en la [Ca⁺⁺]_i, inducen un aumento en los niveles del ARNm de los proto-oncogenes *c-fos* y *jun B* [los cuales codifican para los componentes del factor de transcripción AP1, Fos y Jun, respectivamente], posiblemente para inducir la síntesis de PRL (Passegue *et al.*, 1995). El gene de la PRL presenta un sitio de unión para la familia de factores transcripcionales AP1 (Peers *et al.*, 1990). Este mecanismo de transducción utilizado por la TRH también puede estar involucrado en la regulación del R-TRH (Fujimoto *et al.*, 1991).

6.2 ACTIVACION DE LA ADENILATO CICLASA

Estudios iniciales sobre el mecanismo de transducción de la TRH mostraron que en fracciones particuladas provenientes de células GH₄C₁ y GH₃ tratadas con TRH la AC está activada (Gautvik *et al.*, 1983). Por otro lado, la incubación de células

GH₃ con CTX por 16 h disminuyó 40% la unión de la [³H]Me-TRH a su receptor (Yajima *et al.*, 1988). Estos resultados llevaron a postular que las acciones de la TRH en células lactotrópicas están mediadas por una proteína G α_s , que al activar a la AC, induce un aumento en la concentración intracelular del AMPc y la activación de la PKA (figura 8).

Actualmente, existe controversia en cuanto a los datos experimentales sobre esta vía. Audinot *et al.* (1991) mostraron que en células lactotrópicas normales la activación de la AC y la acumulación intracelular del AMPc inducidas por la TRH son mediadas por la activación de la PKC. Sin embargo, el tratamiento de células GH₃ con el ARN antisentido de la proteína G α_s , bloquea la regulación de la AC estimulada por la TRH; lo que sugiere que el R-TRH está acoplado directamente a una proteína G α_s (Paulssen *et al.*, 1992). Además, existen evidencias de que la TRH puede activar a una u otra vía de transducción (PLC o AC) en regiones específicas del cerebro (Iriuchijima y Mori, 1989). En la adenohipófisis, existen dos isoformas del R-TRH generadas por procesamiento diferencial (de la Peña *et al.*, 1992b). La primera isoforma identificada consta de 412 aminoácidos [R-TRH₄₁] (de la Peña *et al.*, 1992a). La segunda presenta en el carboxilo terminal una delección de 52 pares de bases (a partir del aminoácido 376 de la primera isoforma) que genera un receptor de 387 aminoácidos con los últimos 12 residuos diferentes respecto al R-TRH₄₁₂ (de la Peña *et al.*, 1992b). Ambas isoformas se acoplan a la vía de la PLC pero no activan a la AC cuando se expresan en células de fibroblastos Rat 1 (Lee *et al.*, 1995). Además la isoforma de 412 aminoácidos, sigue este mismo comportamiento cuando se expresa en células HEK-293 (Kim *et al.*, 1994).

Similar a la PKC, la activación de la PKA (activada directa o indirectamente por la TRH) llevaría a la fosforilación de proteínas involucradas en el proceso de liberación de la PRL (Hernández *et al.*, 1994), a la fosforilación del factor de transcripción CREB para inducir la síntesis de PRL (Ben-Jonathan *et al.*, 1996) y a la regulación del R-TRH (Fujimoto y Gershengorn, 1991).

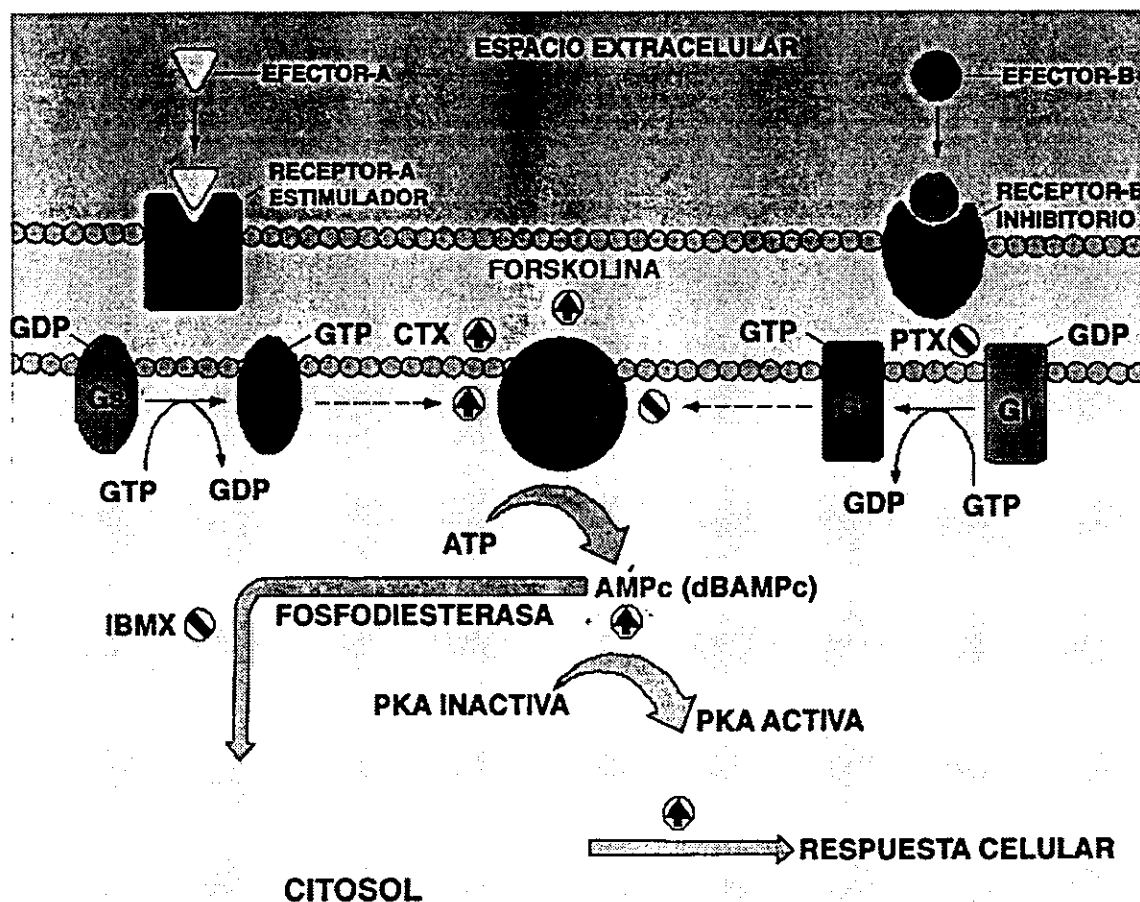


Figura 8. VIA DE TRANSDUCCION DE LA ADENILATO CICLASA. La unión de un ligando a su receptor acoplado a la proteína Gs o Gi activa o inhibe a la adenilato ciclasa (AC) respectivamente. La activación de la AC cataliza la formación del monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), el cual activa a la cinasa A de proteínas (PKA), ésta a su vez fosforila residuos específicos de serinas y treoninas en diversas proteínas para modificar su actividad. La forskolina es un activador de la AC. La toxina pertussis (PTX) y la del cólera (CTX) mantienen en estado inactivo y activo a las proteínas Gi y Gs respectivamente. El IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), un inhibidor de fosfodiesterasas y el dBAMPc (dibutiril AMPc), un análogo del AMPc son moléculas que atraviesan la membrana plasmática.

6.3 OTRAS VIAS DE TRANSDUCCION

6.3.1 Acoplamiento del R-TRH con una proteína $G\alpha_i$

El R-TRH pudiera activar a una proteína $G\alpha_i$, ya que el pretratamiento de células GH₃ con PTX inhibe 50% la actividad de GTPasa inducida por la TRH (Offermanns *et al.*, 1989). Gollasch *et al.* (1993) reportaron que la PKC y la proteína G_{i2} son necesarias para la activación del canal de Ca⁺⁺ dependiente de voltage tipo L inducida por la TRH en células GH₃, y que este mecanismo es sensible a la PTX.

6.3.2. Vía de la cinasa de proteínas activada por mitógenos (“mitogen-activated protein kinase”: MAPK)

La activación de la MAPK es otra posible vía de transducción utilizada por el R-TRH (Ohmichi *et al.*, 1994). Esta vía se describió originalmente para receptores membranales con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas, como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidermal. La unión del ligando a su receptor induce que éste se asocie en dímeros, se autofosforile y forme un complejo con las proteínas acopladoras Shc o Grb2 a través de sus dominios estructurales SH2. Este complejo se asocia a la proteína Sos (la cual induce que la proteína G monomérica Ras intercambie GDP por GTP). Ras se une y activa a Raf, una cinasa de serinas y treoninas (anteriormente denominada “MAP kinase kinase kinase”: MAPKKK); a su vez Raf fosforila a MEK, una cinasa que fosforila tirosinas, serinas y treoninas (inicialmente nombrada “MAP kinase kinase”: MAPKK). Finalmente MEK fosforila a ERK, otra cinasa de serinas y treoninas (originalmente llamada “MAP kinase”: MAPK). ERK fosforila diferentes proteínas, entre ellas factores de transcripción que regulan la expresión de genes específicos (figura 9). La PKC también induce activación de la MAPK a través de fosforilar a Ras (VanRenterghemb *et al.*, 1994) o a raf (Marquardt *et al.*, 1994). En células GH₃, la TRH induce la formación del complejo Shc-Grb2 y las activaciones de ras, Raf y ERK. Esto ocurre ya sea a través de la activación de la PKC o por un mecanismo independiente de PKC (Ohmichi *et al.*, 1994). Además, se ha reportado que el ST638, un inhibidor de cinasas de tirosinas, inhibe la fosforilación de la MAPK y la liberación de PRL estimuladas por la TRH (Kanda *et al.*, 1994).

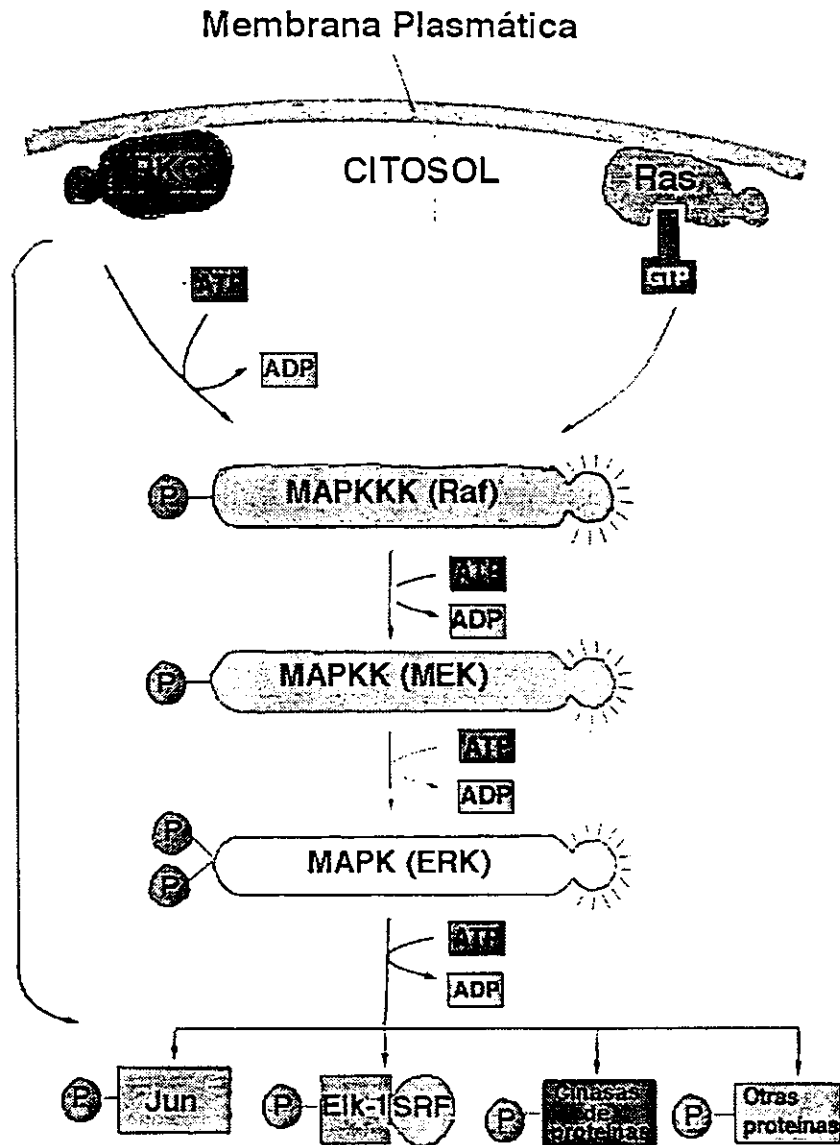


Figura 9. CASCADA DE ACTIVACION DE LA MAPK. La activación de la vía de la MAPK se puede iniciar por un mecanismo dependiente de la proteína G monomérica Ras, la cual activa a la cinasa Raf, o bien, por un mecanismo independiente de Ras, pero dependiente de PKC y Raf. MAPKKK, MAPKK y MAPK también son conocidas como Raf, MEK y ERK respectivamente. Los detalles de la vía se describen en el texto

6.3.3 Vía del ácido araquidónico

La activación del R-TRH también induce movilización de ácido araquidónico (AA) en células adenohipofisarias en cultivo (Judd *et al.*, 1986), probablemente como consecuencia de la fosforilación, translocación a la membrana plasmática y activación de la fosfolipasa A2 citosólica (PLA2c), eventos inducidos por la activación de la MAPK y el aumento en la $[Ca^{++}]_i$. Para esta vía se ha postulado que la activación de los receptores acoplados a proteínas G, induce fosforilación y activación de la MAPK de una manera dependiente de la PKC; la MAPK a su vez fosforila a la PLA2c, provocando un aumento en la afinidad de la PLA2c por el Ca^{++} , con subsecuente translocación y activación de la enzima [figura 10] (Lin *et al.*, 1993; Piomelli, 1993; Schalkwijk *et al.*, 1996). Por otro lado, existe una correlación temporal entre el aumento de la liberación de AA y de PRL inducido por la TRH (Ross *et al.*, 1988).

El AA se puede metabolizar principalmente por tres vías: lipooxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX) y epooxigenasa (EPOX) [figura 10] (Shimizu y Wolfe, 1990). Si bien existen evidencias de que el AA puede activar a ciertas subespecies de PKC dependientes o independientes de Ca^{++} (Nishizuka, 1992) y que la inhibición del catabolismo general del AA inhibe la liberación de PRL inducida por la TRH (Judd *et al.*, 1986; Junier *et al.*, 1990), se ha reportado que sólo al bloquear las vías LOX y EPOX, pero no la COX, se inhibe la liberación de PRL, lo cual sugiere que únicamente metabolitos formados por las dos primeras vías están involucrados en la liberación de la PRL (Judd *et al.*, 1988; Junier *et al.*, 1990). Además, en células normales la TRH induce la formación de los leucotrienos C_4 y B_4 y de ácidos hidroxiicosatetraenoicos (HETES), metabolitos de la vía LOX, y en células GH_3 induce específicamente la formación de los HETES 9 y 15 (Judd *et al.*, 1988; Rabier *et al.*, 1987). Sin embargo, los leucotrienos no tienen efecto sobre la liberación basal de PRL, pero aumentan la liberación estimulada por la TRH; en cambio los HETES estimulan la liberación de PRL en ambas condiciones (Judd *et al.*, 1988).

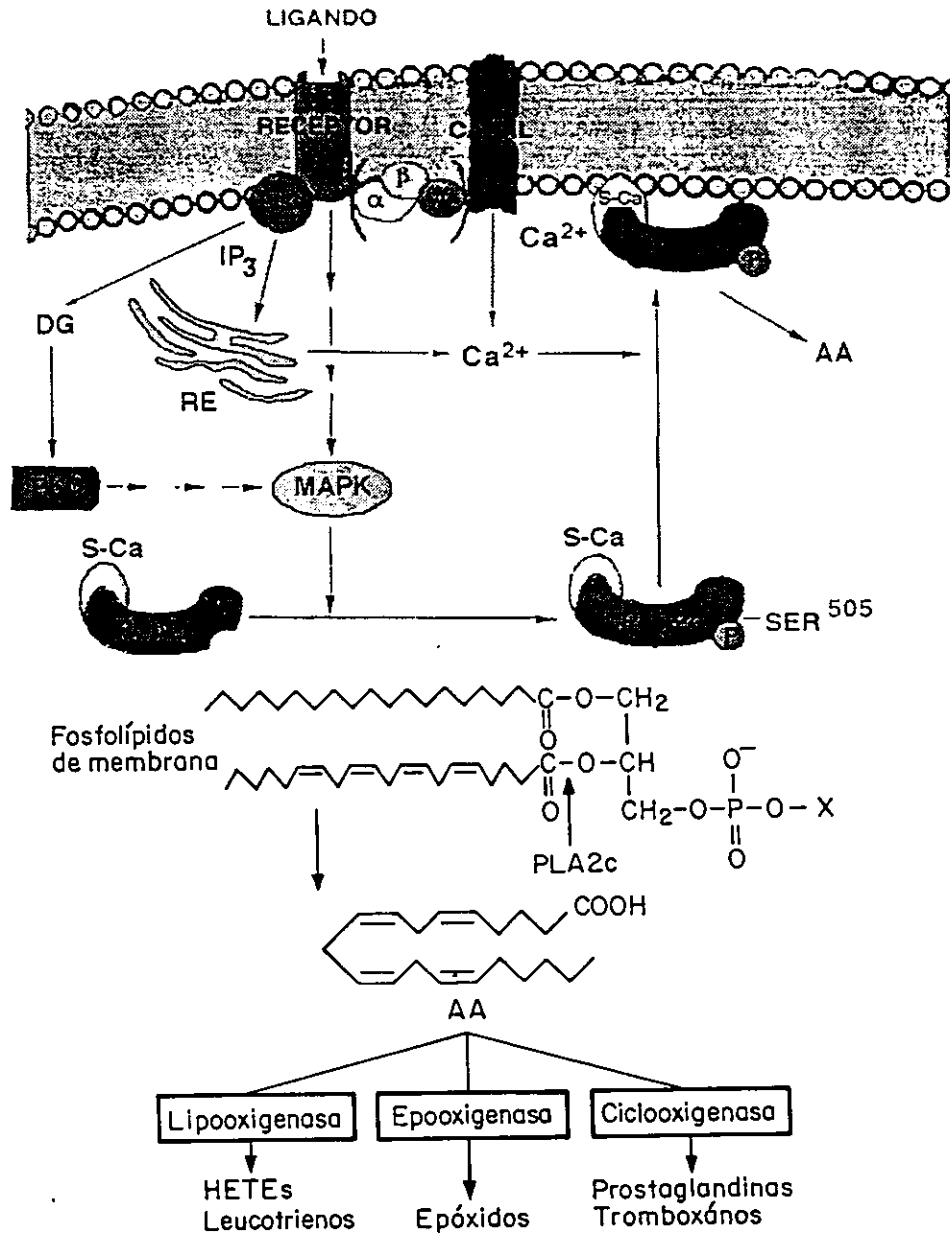


Figura 10. MECANISMO DE ACTIVACION DE LA PLA2c Y METABOLISMO DEL AA. La fosfolipasa A2 citosólica (PLA2c) se activa sinérgicamente por la MAPK y el Ca⁺⁺ (ver los detalles en el texto). DG: diacilglicerol, IP₃: 1,4,5-trifosfato de inositol, RE: retículo endoplásmico, S-Ca: sitio de unión al Ca⁺⁺. La figura de abajo representa el metabolismo del ácido araquidónico (AA). HETES: ácidos hidroxieicosatetraenoicos.

7. REGULACION DE LA TRH EN EL EJE NEUROENDOCRINO

Estudios en diferentes condiciones fisiológicas o experimentales sugieren que la concentración de la TRH a proximidad de su célula blanco está determinada por una compleja y coordinada regulación de sus tasas de síntesis, procesamiento, liberación y degradación.

Por ejemplo, las hormonas tiroideas regulan el eje hipotalámico-adenohipofisario-tiroideo a través de una retroalimentación negativa. Esta regulación se da a nivel del hipotálamo y de la adenohipófisis. En el NPV del hipotálamo las hormonas tiroideas disminuyen los niveles del ARNm de la TRH y de la pro-TRH (Dyess *et al.*, 1988; Koller *et al.*, 1987; Segerson *et al.*, 1987b), efecto que se ve reflejado al disminuir el contenido de TRH (Mori y Yamada, 1987) y su liberación de la eminencia media (Dahl *et al.*, 1994). En la adenohipófisis las hormonas inhiben la síntesis (Weintraub *et al.*, 1989) y la liberación (Padmanabhan *et al.*, 1981) de la TSH; más aún, disminuyen los niveles del R-TRH (de Lean *et al.*, 1977; Perrone y Hinkle, 1978; Yamada *et al.*, 1992) e incrementan la degradación de la TRH [ver secciones 8 y 11.4] (Bauer, 1987; Ponce *et al.*, 1988; Schomburg y Bauer, 1995).

8. REGULACION DEL RECEPTOR DE LA TRH

El R-TRH es regulado por su propio ligando (regulación homóloga). La unión de la TRH a su receptor por un lado lo activa pero por otro lado induce una rápida desensibilización de su actividad. El pretratamiento de células GH₄C₁ con la TRH desensibiliza la activación de la PLC a un estímulo posterior de TRH. Por ejemplo, después del pretratamiento con la TRH durante 10 minutos, la actividad de la PLC en respuesta a TRH (un estímulo de 5 segundos) disminuye hasta un 40% en comparación con la actividad control (Torjesen *et al.*, 1988). Los mismos resultados se obtienen cuando células GH₃ se incuban en la presencia continua de TRH (44% de desensibilización de la PLC después de 20 minutos) (Perlman y Gershengorn, 1991).

La TRH también desensibiliza al R-TRH de rata y humano, expresado en células HEK-293. En estas células la movilización de Ca^{++} intracelular en respuesta a la TRH se desensibiliza en 1 minuto, sin que exista pérdida del receptor (Anderson *et al.*, 1995). No se conoce el mecanismo de esta desensibilización pero se ha propuesto que pueden estar involucradas fosforilaciones del R-TRH (Anderson *et al.*, 1995; Falck-Pedersen *et al.*, 1994).

La TRH también induce una disminución en el número de sus receptores ("down-regulation") en la membrana plasmática de tirótrofos y lactótrofos (Gershengorn, 1978; Hinkle y Tashjian, 1975). El grupo de Torjensen (1988) mostró que el evento es bifásico; una disminución rápida de la actividad de la PLC (50%) en respuesta a la TRH se observa durante los primeros 30 minutos de preincubación con la TRH; y períodos de preincubación más largos (horas) disminuyen lentamente la respuesta a la TRH con un máximo de desensibilización del 80% en 6 h. Estos efectos se deben a la internalización e inhibición de la síntesis del R-TRH como consecuencia de una disminución en los niveles de su ARNm respectivamente (Fujimoto *et al.*, 1991; Hinkle y Kinsella, 1982; Oron *et al.*, 1987; Zhao *et al.*, 1992). En células GH₃ el complejo TRH/R-TRH es internalizado de una manera dependiente de clatrina, disociado y reciclado rápidamente a la membrana plasmática (Ashworth *et al.*, 1995; Petrou y Tashjian, 1995). Al incrementar el tiempo de internalización (con períodos prolongados de incubación con la TRH), la cantidad de receptor reciclado disminuye en proporción a la duración de la internalización, mientras que la TRH se recicla inicialmente de manera similar al receptor, pero posteriormente se recicla a una tasa constante independiente del tiempo de internalización (Petrou y Tashjian, 1995).

El número de R-TRH sobre la membrana plasmática, así como los niveles de su ARNm, también están sujetos a regulación heteróloga negativa por el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Fujimoto y Gershengorn, 1991) y las hormonas tiroideas (de Lean *et al.*, 1977; Perrone y Hinkle, 1978; Yamada *et al.*, 1992). Existe también una regulación heteróloga positiva por estrógenos (de Lean *et al.*, 1977; Gershengorn *et al.*, 1979; Kimura *et al.*, 1994) y glucocorticoides (Tashjian *et al.*, 1977; Yang y Tashjian, 1993a).

9. CONTROL DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL)

La liberación de PRL del lactótrofo está controlada por un mecanismo multifactorial. 1) Por factores hipotalámicos estimulantes (TRH, VIP, angiotensina II) o inhibidores (DA, SRIF) de la liberación de PRL. 2) Por hormonas periféricas (hormonas tiroideas y estrógenos). 3) Por regulación autócrina (PRL) y/o parácrina [VIP] (Lamberts y Macleod, 1990).

9.1 PAPEL DE LA DOPAMINA EN LA SECRECIÓN DE PRL

In vivo, la liberación de PRL está inhibida principalmente por la DA (Ben-Jonathan, 1985; Lamberts y MacLeod, 1990). El tratamiento de ratas con antagonistas dopaminérgicos, induce un incremento en la liberación de PRL (Cocchi *et al.*, 1980; Smalstig *et al.*, 1974). La concentración de DA en la sangre del tallo hipofisial es suficiente para tener un impacto fisiológico: la DA ocupa el 80% de sus receptores D₂ en lactótrofos y el nivel de inhibición es proporcional al número de receptores ocupados por la DA (Ben-Jonathan *et al.*, 1977; 1980; de Greef *et al.*, 1981; de Greef y Viser 1981; Gibbs y Neill, 1978; Martin *et al.*, 1984). El tratamiento de células adenohipofisarias en cultivo con DA induce inhibición de la liberación de PRL de una manera dependiente de la dosis (MacLeod y Lehmeyer 1974; Yeo *et al.*, 1979).

La liberación de PRL no sólo está regulada por la unión de la DA a su receptor; al parecer la disociación del complejo DA-receptor juega un papel fisiológico en la liberación de PRL. Una disminución en la concentración de DA provoca una rápida disociación de la DA de su receptor (Cronin *et al.*, 1978). Existe una correlación entre la disminución en la concentración de DA en sangre portal y un aumento en la liberación de PRL en diferentes condiciones fisiológicas: en la tarde del proestro (Ben-Jonathan *et al.*, 1977; de Greef *et al.*, 1985), al final de la preñez (Ben-Jonathan *et al.*, 1980) y en respuesta a la succión durante la lactancia (de Greef *et al.*, 1981; de Greef y Viser, 1981). Por otro lado, se ha mostrado que la liberación de PRL aumenta (3-10 veces), cuando la DA se retira del medio de incubación de lactótrofos en cultivo (Martínez de la Escalera *et al.*, 1988; Swearingen *et al.*, 1990).

9.2 INTERACCION DE LA DOPAMINA Y DE LA TRH EN LA REGULACION DE LA LIBERACION DE PRL

Existe una interacción compleja entre los diferentes factores hipotalámicos que regulan la liberación de PRL. Por ejemplo, cuando disminuye la concentración de DA en los vasos portales se manifiesta claramente el efecto estimulador de la TRH sobre la liberación de PRL (Lamberts y Macleod, 1990). Este mecanismo ocurre *in vivo* en diferentes condiciones fisiológicas y experimentales: en el ciclo estral (Haisenleder *et al.*, 1991), en respuesta a la succión durante la lactancia (de Greef y Visser, 1981; Plotsky y Neill, 1982), en la preñez (Haisenleder *et al.*, 1986a) y en ratas tratadas con estrógenos (Haisenleder *et al.*, 1986b). Estos resultados son reproducibles *in vitro*: el retiro momentáneo de la DA del medio de incubación de lactótrofos en cultivo potencia el efecto estimulador de la TRH sobre la liberación de PRL (Martínez de la Escalera *et al.*, 1988; Martínez de la Escalera y Weiner, 1990; Swearingen *et al.*, 1990). Por otro lado, Martínez de la Escalera y Weiner (1988a) han reportado que en lactótrofos cultivados en presencia de DA, el VIP también potencia el efecto de la TRH.

9.3 VIAS DE TRANSDUCCION IMPLICADAS EN LA LIBERACION DE PRL

El efecto potenciador de la remoción de DA sobre la liberación de PRL en respuesta a la TRH puede estar mediado por la PKA y la PKC. Puesto que el receptor del VIP y el dopaminérgico D2 están acoplados positiva (Gourdji *et al.*, 1979; Robberech *et al.*, 1979) y negativamente a la AC respectivamente (Enjalbert y Bockaert, 1983; Giannattasio *et al.*, 1981); se ha propuesto que los efectos potenciadores están mediados por la activación de la PKA. La DA también puede inhibir la vía Ca^{++}/PKC , ya que es capaz de inhibir la actividad de la PLC basal y estimulada por la TRH (Enjalbert *et al.*, 1986, 1990; Vallar *et al.*, 1988) y de inhibir canales de Ca^{++} sensibles a voltaje (Lledo *et al.*, 1990a). Además la remoción de la DA del medio de incubación de lactótrofos activa tanto a la PKA como a la PKC, enzimas que fosforilan canales de Ca^{++} (Hernández *et al.*, 1994; Martínez de la Escalera *et al.*, 1987; Martínez de la Escalera y Weiner 1988b).

ANTECEDENTES

10. MECANISMOS DE INACTIVACION DE LA TRH

Una vez liberada al medio extracelular, la TRH alcanza a su célula blanco e interactúa con su receptor en la membrana plasmática. Existe además un mecanismo que inactiva al péptido con el fin de limitar la intensidad y/o duración de su acción, así como para preparar a la célula blanco para responder a un nuevo pulso de TRH. Los mecanismos de inactivación de la TRH que se han estudiado son la captura y la degradación enzimática. Se ha demostrado que existe un fenómeno de acumulación de la ³H-TRH en rebanadas de hipotálamo (Charli *et al.*, 1984), que parecería deberse al fenómeno de endocitosis mediada por receptores debido a su baja velocidad máxima (descrito en la sección 8). Por lo tanto se considera que la acumulación no es responsable de la inactivación de la TRH. Por otro lado, se ha propuesto que la degradación enzimática es el mecanismo principal de la inactivación extracelular de la TRH.

11. LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II (PPII)

11.1 CARACTERISTICAS DE LA PPII

Se ha caracterizado una peptidasa de membranas sinaptosomales denominada piroglutamil peptidasa II [PPII: EC 3.4.19.6] que corta el enlace pglu-his de la TRH (Garat *et al.*, 1985; McDonald y Barret, 1986; O'Connor y O'Cuinn, 1984; 1985; Torres *et al.*, 1986). La actividad de la enzima es óptima a valores de pH entre 7.0-7.5 y es sensible a agentes quelantes de metales, pero refractaria a inhibidores específicos de serina y cisteína proteasas o a inhibidores peptídicos de aspartil proteasas (Garat *et al.*, 1985; O'Connor y O'Cuinn, 1984; Wilk y Wilk, 1989). Estudios iniciales enfocados a identificar los aminoácidos involucrados en el sitio activo de la PPII confirmaron que los residuos de serina y cisteína, además de aspartato no participan en la expresión de la actividad catalítica de la enzima, pero que la histidina, la tirosina, la arginina y el ácido glutámico son esenciales para su actividad (Czekay y

Bauer, 1993; O'Connor y O'Cuinn, 1987), tal como ocurre para otras metalopeptidasas (Bunning *et al.*, 1978; Helene *et al.*, 1991). Posteriormente, Czekay y Bauer (1993) identificaron a la PPII como una Zn²⁺-metaloproteasa.

Utilizando péptidos endógenos como sustrato, se demostró que la PPII es altamente específica para la TRH [Km= 40 µM] (O'Connor y O'Cuinn, 1984; 1985). La secuencia pglu-his es esencial para la actividad de la enzima ya que substituciones del pglu o la his en el péptido lo hacen resistente a la degradación (Elmore *et al.*, 1990; Wilk y Wilk, 1989). La enzima muestra una especificidad restringida: sólo hidroliza tripéptidos, tripéptidos amidados y tetrapéptidos sintéticos, cuya estructura general es pglu-his-X, pglu-his-X-[NH₂ o βnaftilamida], donde X= ala, pro o trp y pglu-his-pro-gly (Wilk y Wilk, 1989; Elmore *et al.*, 1990).

El análisis electroforético de la enzima purificada en condiciones desnaturalizantes reductoras reveló una sola banda de 116 kDa de peso molecular. Puesto que se estimó un peso molecular de 230 kDa por cromatografía de exclusión molecular, se ha asumido que la enzima consiste de dos subunidades idénticas. La PPII se ha identificado como una glucoproteína porque la banda de 116 kDa sufre una disminución en su peso molecular al ser tratada con glucosidasas (Bauer, 1994).

La reciente clonación del ADNc de la PPII de rata ha llevado a la identificación de una proteína de 1025 aminoácidos, con un peso molecular de 117 kDa (Schauder *et al.*, 1994). La enzima presenta una región N-terminal intracelular corta con un sitio potencial de fosforilación por la PKC, seguida por un dominio transmembranal compuesto por 22 aminoácidos hidrofóbicos y una región extracelular extensa en donde contiene un sitio potencial de sulfatación (tyr 381) y 12 de glucosilación. Esta región también presenta la secuencia consenso HEXXH (posición 441-445) seguida por un segundo residuo de ácido glutámico después de 18 aminoácidos. Esto forma el sitio activo característico de las Zn²⁺-metaloproteasas pertenecientes a la familia de las "gluzinczinas" (Hooper, 1994). De acuerdo a los estudios sobre el sitio activo, un residuo de arginina y uno de tirosina se encuentran a proximidad de la secuencia HEXXH (figura 11). La PPII mostró 30% de similitud con otras dos ectopeptidasas que pertenecen a la familia de las "gluzinczinas", las aminopeptidasas A y N.

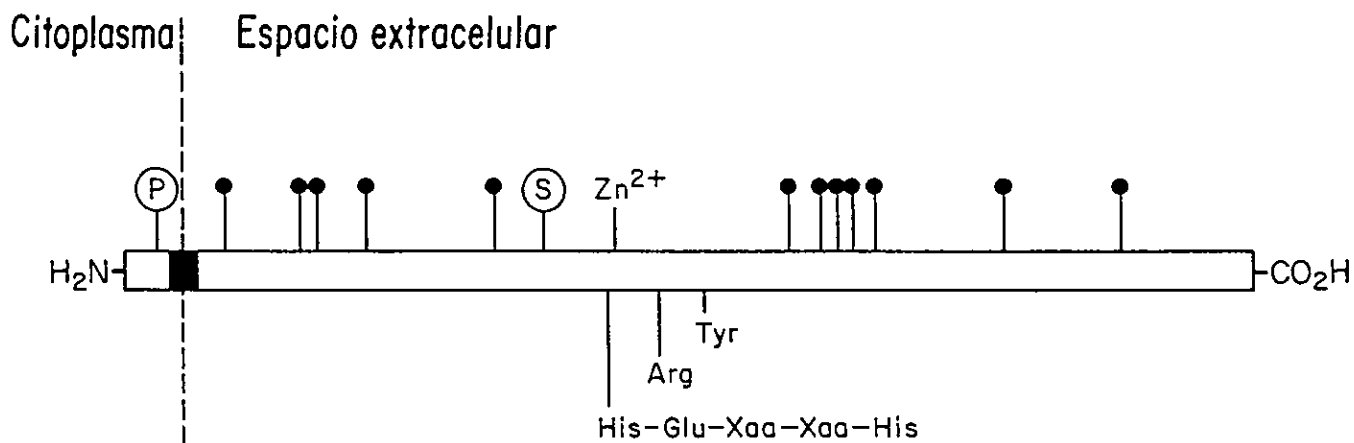


Figura 11. ESTRUCTURA ESQUEMATICA DE LA PPII. La clonación del ADNc de la PPII de rata ha llevado a la identificación de una proteína de 1025 aminoácidos, con un peso molecular de 117 kDa. La enzima presenta una región N-terminal intracelular corta (39 aminoácidos) con un sitio potencialmente fosforilable por la PKC (P), seguida por un dominio transmembranal compuesto por 22 aminoácidos hidrofóbicos y una región extracelular extensa. El dominio extracelular contiene un sitio potencial de sulfatación (S), 12 de glucosilación (☉) y la secuencia consenso HEXXH con un segundo residuo de ácido glutámico después de 18 aminoácidos presente en la familia de las metaloproteasas dependientes de zinc. De acuerdo a los estudios sobre el sitio activo de la PPII, un residuo de arginina y uno de tirosina se encuentran a proximidad de la secuencia HEXXH.

11.2 PPII EN EL CEREBRO

La PPII está enriquecida en el sistema nervioso central en donde su distribución regional es heterogénea; existe una diferencia de hasta 10 veces entre las regiones de mayor y menor actividad (Friedman y Wilk, 1986; Vargas *et al.*, 1987; 1992a). La actividad más alta se detecta en el bulbo olfatorio, el hipocampo y la corteza cerebral. Este patrón de distribución no se debió a la presencia de algún inhibidor de la enzima (Vargas *et al.*, 1987).

La PPII está concentrada a nivel de la membrana plasmática de sinaptosomas (Torres *et al.*, 1986). Utilizando cultivos primarios enriquecidos en neuronas o glia (Bauer *et al.*, 1990; Cruz *et al.*, 1991) o líneas celulares neuronales y gliales (Wilk *et al.*, 1988) se demostró que la PPII está localizada casi exclusivamente en células neuronales. La localización neuronal de la enzima es consistente con los datos mostrando que el desarrollo de la PPII in vivo está asociado al proceso de diferenciación neuronal en varias regiones del cerebro (Vargas *et al.*, 1992b). Al estudiar la topología de la PPII en membranas plasmáticas sinaptosomales y células intactas, se determinó que su sitio activo está orientado hacia el espacio extracelular, es decir que la PPII es una ectoenzima (Charli *et al.*, 1988).

11.3 RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA PPII EN EL CEREBRO

El enriquecimiento de la PPII en el cerebro, su distribución heterogénea y su localización neuronal indican que la PPII puede estar involucrada en funciones especializadas y en particular en la inactivación de la TRH debido a su especificidad. Aunque no existe una correlación estricta entre la distribución de la PPII y los niveles de la TRH o la densidad de R-TRH, regiones con alta actividad de PPII también contienen una alta densidad de R-TRH (Vargas *et al.*, 1987; Vargas *et al.*, 1992a); estos datos sugieren que la PPII pudiera participar en la coordinación de las funciones de la TRH. Ya que esta correlación ocurre en cerebros de rata y de conejo y que la actividad de la PPII es muy similar entre cerebros de varias especies de mamíferos (Vargas *et al.*, 1992a), se podría especular que la PPII juega el mismo papel en todos los mamíferos.

La topología del sitio activo de la PPII indica que la orientación de la PPII es la adecuada para poder degradar a la TRH en el espacio extracelular. Esta hipótesis es consistente con otros datos: 1) la recuperación de la TRH liberada de rebanadas de cerebro se incrementa en presencia de un inhibidor específico de la PPII, sugiriendo que la enzima está localizada cerca del sitio de liberación de la TRH (Charli et al., 1989) y 2) la PPII se encuentra probablemente en la membrana de la célula postsináptica (Joseph-Bravo *et al.*, 1994; Uribe et al., 1996). Con base en sus características, se ha propuesto que la PPII es la primera neuropeptidasa específica (Wilk, 1986).

11.4 PPII EN LA ADENOHIPOFISIS

La PPII está también presente en la adenohipófisis (Horsthemke *et al.*, 1984; Vargas *et al.*, 1987), particularmente en lactótopos (Bauer *et al.*, 1990). En este tejido su desarrollo posnatal coincide con el de diversos componentes del eje hipotalámico-adenohipofisario; por ejemplo, la neurogénesis de la EM, el desarrollo de neuronas TRHérgicas en la EM y del sistema portal (Vargas *et al.*, 1992b).

En la adenohipófisis, las hormonas tiroideas y los estrógenos regulan la actividad de la PPII de manera positiva y negativa respectivamente (Bauer, 1987; 1988; Ponce *et al.*, 1988). El tratamiento con hormonas tiroideas induce la actividad de la PPII; por el contrario, el hipotiroidismo la disminuye (Bauer, 1988; Ponce et al., 1988). El tratamiento de ratas hipotiroideas con T₃ restaura la actividad de la PPII (Ponce *et al.*, 1988) y el 17β-estradiol antagoniza el efecto estimulador de la T₃ sobre la actividad de la enzima (Bauer, 1988). Los mismos resultados se observan en cultivo de células adenohipofisarias, indicando que las hormonas actúan directamente sobre el lactótropo (Bauer *et al.*, 1990). Los efectos de las hormonas tiroideas y del 17β-estradiol pudieran ser a nivel de la síntesis de la PPII, ya que inducen un aumento y una disminución respectivamente en los niveles del ARNm de la enzima (Schomburg y Bauer, 1995; 1997).

Por otro lado, la actividad de la PPII varía durante el ciclo estral, con un pico máximo en el estro y uno mínimo en el diestro 2, opuesto con lo observado en los

niveles del ARNm de la TRH en el hipotálamo (Uribe *et al.*, 1991); sin embargo, estas fluctuaciones no están en fase con los niveles circulantes de estrógenos, probablemente reflejando respuestas a otros factores, posiblemente de origen hipotalámico.

OBJETIVO

Diferentes etapas del metabolismo de la TRH (biosíntesis, liberación e inactivación) pueden estar reguladas por uno o más efectores extracelulares. El balance de estos eventos establece los niveles del péptido activo en el medio extracelular. Si bien existen evidencias de que la degradación por ectopeptidasas es el mecanismo de inactivación extracelular de los neuropéptidos, esta es una de las etapas que ha recibido menos atención en cuanto a un posible papel regulador en la fisiología de los neuropéptidos.

Debido a que 1) la topología de la PPII es adecuada para degradar a la TRH presente en el medio extracelular, 2) su localización en lactótrofos la hace un blanco potencial de múltiples factores hipotalámicos, 3) su actividad en la adenohipófisis fluctúa durante el ciclo estral posiblemente en respuesta a factores hipotalámicos y 4) la TRH es capaz de regular a su propio receptor en la adenohipófisis, nuestro objetivo fue determinar si la TRH y otros factores hipotalámicos son capaces de regular la actividad de la PPII en la adenohipófisis y de ser así, identificar las vías de transducción involucradas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Se utilizaron cultivos primarios de células dispersas de adenohipófisis de ratas para medir de una manera directa los efectos de las hormonas sobre la actividad de la enzima, así como estudiar a nivel celular las vías de transducción.

-Sólo se clonó recientemente el ADNc de la PPII y no existen anticuerpos para la enzima; por lo tanto se estudió la regulación de la PPII determinando principalmente su actividad enzimática de superficie utilizando un método radiométrico con la ^3H -TRH como sustrato. Únicamente en la última etapa del proyecto se utilizó la clona del ADNc para determinar el nivel de su ARNm.

-Con el fin de determinar si algunos factores hipotalámicos regulan la actividad de la PPII, las células se incubaron con diferentes péptidos a concentraciones en las cuales tienen efectos biológicos (inhibiendo o activando la liberación de PRL).

-Para determinar a que proteínas G se acoplan los receptores de estos péptidos para regular a la enzima, los cultivos se trataron con la PTX o la CTX antes y durante el tratamiento con los péptidos.

-Para identificar la vía de transducción que la TRH utiliza, las células se preincubaron con agentes que modifican (activando o inhibiendo) la concentración de segundos mensajeros, antes y durante el tratamiento con la TRH.

METODOLOGIA

Los detalles metodológicos se describen en las secciones de "Materials and Methods" de los anexos 1 y 2.

RESULTADOS

Los objetivos, estrategias, resultados y discusión de las secciones 12.1, 13 y 15.2 se detallan en el anexo 1; y de las secciones 16 a 20 en el anexo 2. Aquí sólo se mencionarán brevemente los propósitos y resultados principales de cada una de estas estrategias y se mostrarán los resultados no incluidos en los anexos.

12. ESTANDARIZACION DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE LA PPII

12.1 EI ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA ES ESPECIFICO PARA LA PPII

El ensayo enzimático utilizado en la mayor parte de la tesis consistió en determinar la actividad enzimática en la superficie celular. Para esto, se incubó [³Hpro]-TRH con las células y se midió la cantidad de ³H-his-proNH₂ producido en el medio a varios intervalos de tiempo.

Con el fin de demostrar que nuestro ensayo es específico para la actividad enzimática de la PPII, las células intactas se trataron con un inhibidor reversible y específico de la PPII, el N-1-carboxi-2-fenil(Nimbencil)-histidil-β-naftilamida (CPHNA). La preincubación de las células con 10⁻⁴ M de CPHNA inhibió 60% la actividad degradativa para la TRH (tabla 1 del anexo 1). Este valor de inhibición es consistente con las propiedades del inhibidor: si bien presenta una K_i de 8 μM y una concentración de 10⁻⁴ M inhibe 100% la actividad de la enzima semipurificada, solamente inhibe 40% su actividad en homogenados de cerebro (Charli *et al.*, 1989).

Por otro lado, después de incubar a las células con ³H-TRH durante 1 h, prácticamente todo el material radioactivo se recuperó en el medio de incubación, quedando sólo trazas en las células (datos no mostrados). Este resultado indica que el sustrato no se internaliza significativamente en nuestras condiciones y que la modulación de la actividad de la PPII no se debe a la variación de acceso al sustrato.

Puesto que al determinar la actividad de la PPII en células intactas están funcionando los diversos mecanismos de transducción, los cuales pudieran estar

alterando a la PPII durante el ensayo enzimático, se usó un método alternativo en algunos experimentos: medir la actividad de la enzima en membranas, después de los tratamientos en las células intactas (ver métodos en el anexo 2). Los efectos de un mismo tratamiento sobre la actividad de la PPII fueron similares con ambos métodos.

12.2 EFECTO DE LA T₃ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII

En la adenohipófisis se expresan bajos niveles de PPII y su actividad basal está muy cercana al límite inferior de sensibilidad de nuestro método de ensayo, por lo cual, las células se incubaron con diferentes concentraciones de T₃ durante el cultivo para inducir la actividad de la PPII. En la figura 12 se muestra el efecto dosis-respuesta de la T₃ sobre la actividad de la enzima. El efecto de la T₃ no se debió a un mecanismo generalizado ya que la actividad de otra ectopeptidasa, la dipeptidil aminopeptidasa IV (DAPIV: EC 3.4.14.5), no se vio modificada (figura 12).

12.3 LOS EFECTOS DE LA TRH Y DEL TPA SOBRE LA PPII SON INDEPENDIENTES DE LOS NIVELES DE LA T₃ Y DEL SEXO

Puesto que se ha reportado que la PPII se encuentra principalmente en lactótrofos y que las hembras presentan un número mayor de este tipo celular que los machos, se decidió comparar la actividad de la PPII en cultivos de células provenientes de ratas hembra o macho. La actividad basal o inducida con T₃ 10⁻⁸ M de la PPII (0.36 ± 0.1 [n=15] y 1.93 ± 0.12 [n=24] pmolas de his-proNH₂/min/mg proteína respectivamente) en cultivos de células provenientes de ratas hembra fue 109% y 88% mayor que las actividades en cultivos de células provenientes de ratas macho respectivamente (0.17 ± 0.02 [n=7] y 0.87 ± 0.12 [n=19] pmolas de his-proNH₂/min/mg proteína respectivamente) [figura 13].

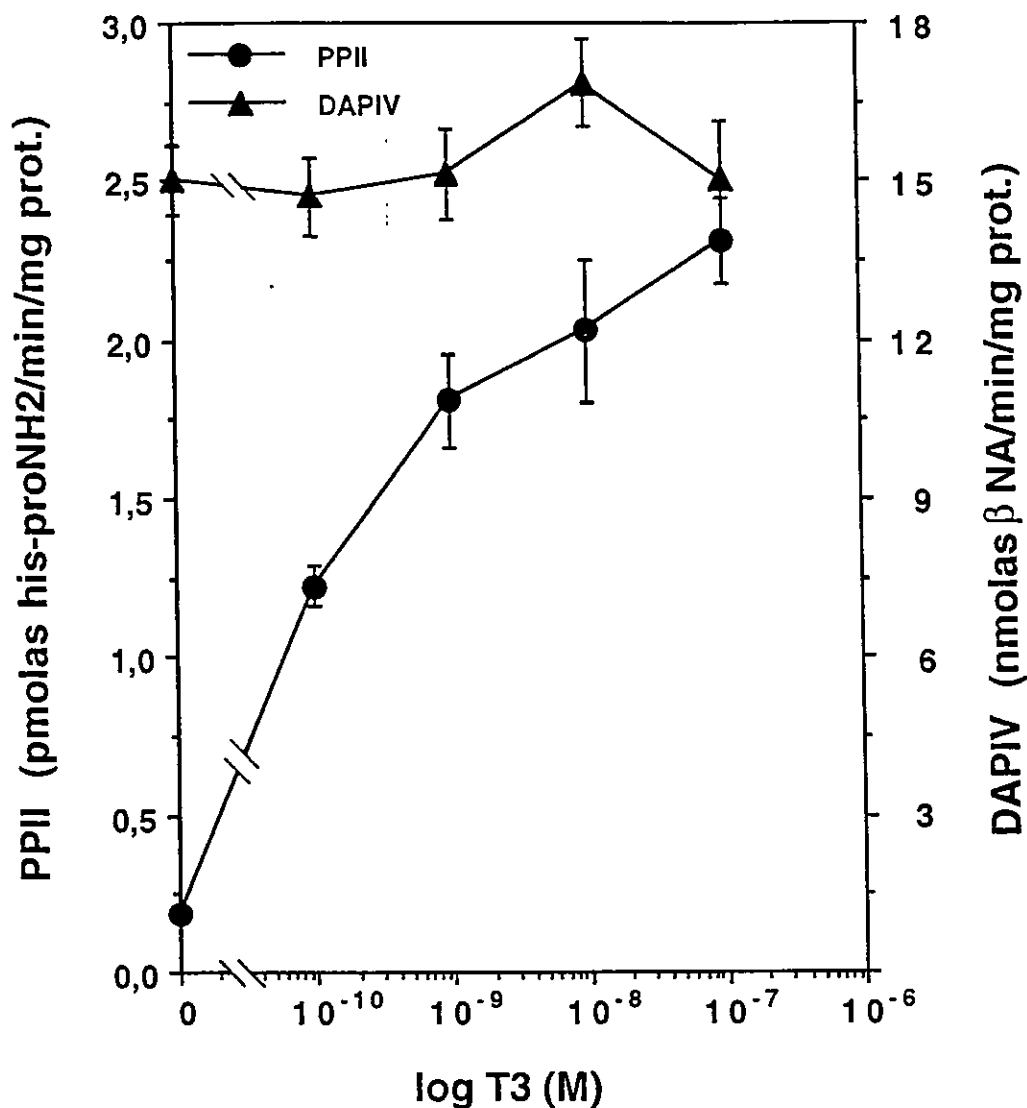


Figura 12. EFECTO DE LA T_3 SOBRE LAS ACTIVIDADES DE LA PPII Y DE LA DAPIV. Cultivos de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembra se incubaron con diferentes concentraciones de T_3 durante cinco días, previo a la determinación de las actividades de la PPII y de la DAPIV. Los datos indican el promedio de la actividad específica \pm el error estándar de la media. $n=8$ (excepto el control $n=4$) y $n=4$ para las determinaciones de la PPII y de la DAPIV respectivamente. El tratamiento con T_3 a cualquier concentración modificó la actividad de la PPII significativamente con respecto al control (grupo sin T_3), con un valor de $p < 0.001$.

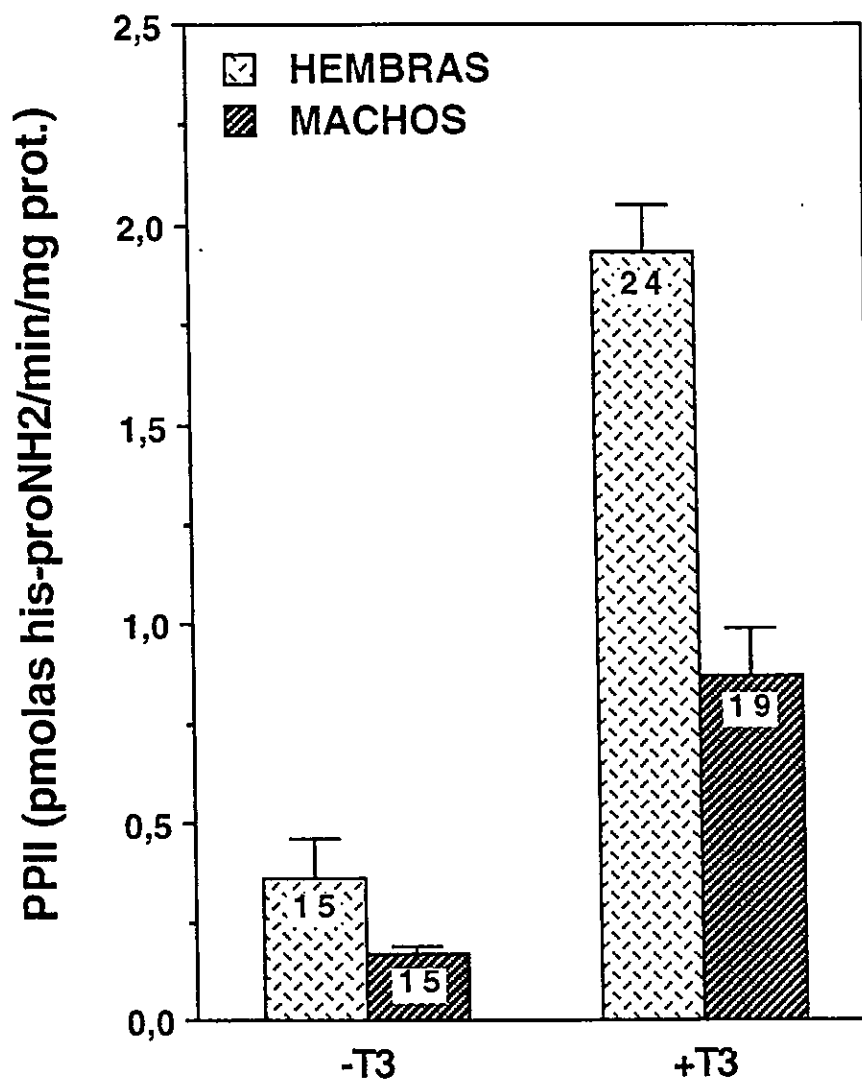
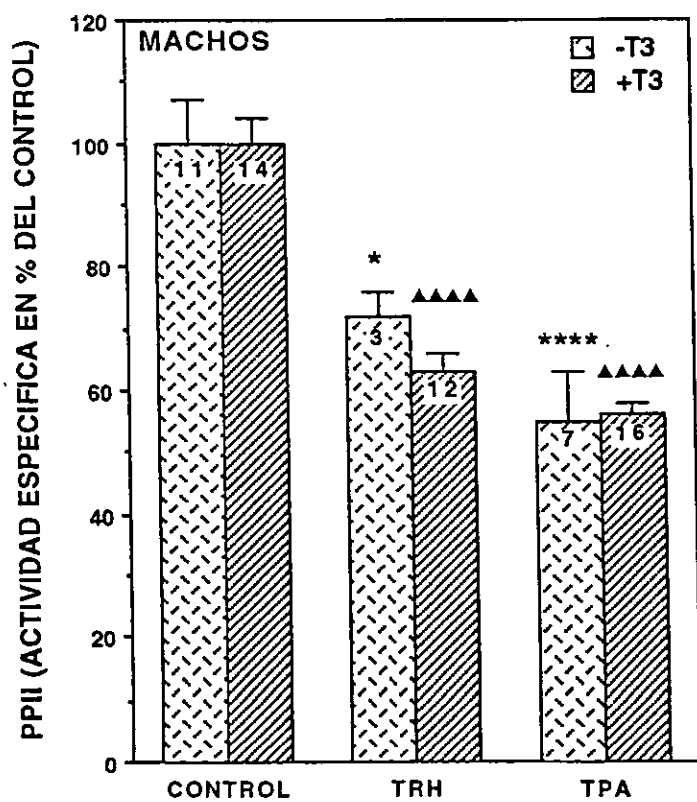
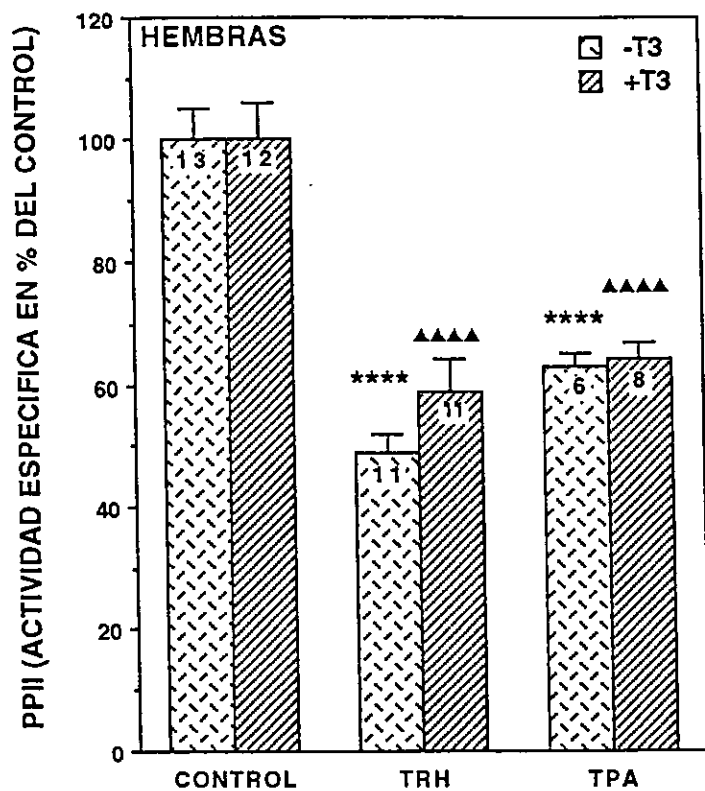


Figura 13. ACTIVIDAD BASAL Y ESTIMULADA CON T_3 DE LA PPII EN CULTIVOS DE CELULAS PROVENIENTES DE RATAS HEMBRA O MACHO. Los cultivos se mantuvieron durante cinco días en presencia o ausencia de T_3 10^{-8} M antes de determinar la actividad enzimática de la PPII. Los resultados son el promedio de la actividad específica \pm el error estándar de la media. El número de determinaciones independientes se indica dentro de las barras.

Resultados preliminares mostraron que la actividad de superficie de la PPII se puede regular negativamente por la exposición prolongada a la TRH o al TPA (ver adelante). Con el propósito de establecer las condiciones experimentales adecuadas para estudiar la regulación de la PPII, se compararon los efectos de la TRH o del TPA en presencia y ausencia de T_3 . La TRH o el TPA inhibieron con una eficiencia similar la actividad de la PPII independientemente de los niveles de T_3 y del sexo del animal (figura 14). Tampoco se modificaron los efectos al retirar la T_3 del cultivo durante las últimas 16 h de incubación (tiempo que correspondió al período de tratamiento con la TRH o el TPA; resultados no mostrados). Estos datos sugieren que los niveles de T_3 no modifican la respuesta enzimática a la TRH o al TPA. Con base en estos resultados y para facilitar el análisis de los efectos de las diferentes drogas sobre la actividad de la PPII, todos los siguientes cultivos se realizaron con células provenientes de ratas hembra e incubados en presencia de T_3 10^{-8} M.

Figura 14. LOS EFECTOS DE LA TRH Y DEL TPA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII SON INDEPENDIENTES DE LA T₃ Y DEL SEXO DEL DONADOR. Los cultivos de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembra o macho se incubaron (barras con líneas) o no (barras con puntos) con T₃ 10⁻⁸ M durante cinco días y se trataron con 1 μM de TRH o 1 μM de TPA durante 16 h antes de determinar la actividad de la PPII. Los resultados son el promedio de la actividad específica (expresada en % del control) ± el error estándar de la media. El promedio de la actividad específica basal de las células provenientes de ratas hembra y macho fue de 0.44 ± 0.13 y 0.2 ± 0.05 y la actividad inducida con T₃ de 1.73 ± 0.14 y 0.92 ± 0.17 pmolas de his-proNH₂/min/mg de proteína respectivamente. El número de determinaciones independientes se indica dentro de las barras. En ambos casos, los tratamientos fueron diferentes con respecto al control (triángulos y estrellas para grupos tratados o no con T₃ respectivamente): *p<0.05; **** y ▲▲▲▲p<0.001.



13. LA ACTIVACION DEL R-TRH INHIBE LA ACTIVIDAD DE LA PPII DE MANERA ESPECIFICA

Para determinar si la TRH regula la actividad de la PPII, las células se incubaron con TRH (10^{-6} M) por diferentes tiempos. La TRH causó una inhibición máxima a 16 h (figura 1 del anexo 1); por lo tanto en los experimentos subsecuentes las células se incubaron con las diferentes drogas durante 16 h antes de determinar la actividad de la enzima. El efecto de la TRH sobre la actividad de la PPII fue dependiente de la dosis con una ED_{50} de 10^{-9} M (figura 2 del anexo 1). La MeTRH y la TRH-OH también disminuyeron la actividad de la PPII de una manera dependiente de la dosis, con una ED_{50} de 1.6×10^{-10} M y de 8×10^{-6} M respectivamente (figuras 2 del anexo 1, y 15 en esta sección). Las ED_{50} fueron similares a las obtenidas con otros efectos biológicos de estos tres péptidos (Hinkle, 1989; Vale *et al.*, 1977). Los datos sugieren que la TRH regula a la PPII a través de la activación de su receptor.

La TRH no modificó la actividad de otras dos ectopeptidasas: la actividad basal de la endopeptidasa 24.11 (EC 3.4.24.11) fue de 1.05 ± 0.04 pmolas de [7-amido,4-metil]-cumarina (AMC)/ 10^6 células/min ($n=4$), y después del tratamiento con la TRH por 16 h de 1.02 ± 0.1 pmolas de AMC/ 10^6 células/min ($n=4$); la TRH no afectó la actividad de la DAPIV a ningún tiempo de exposición (figura 1 del anexo 1).

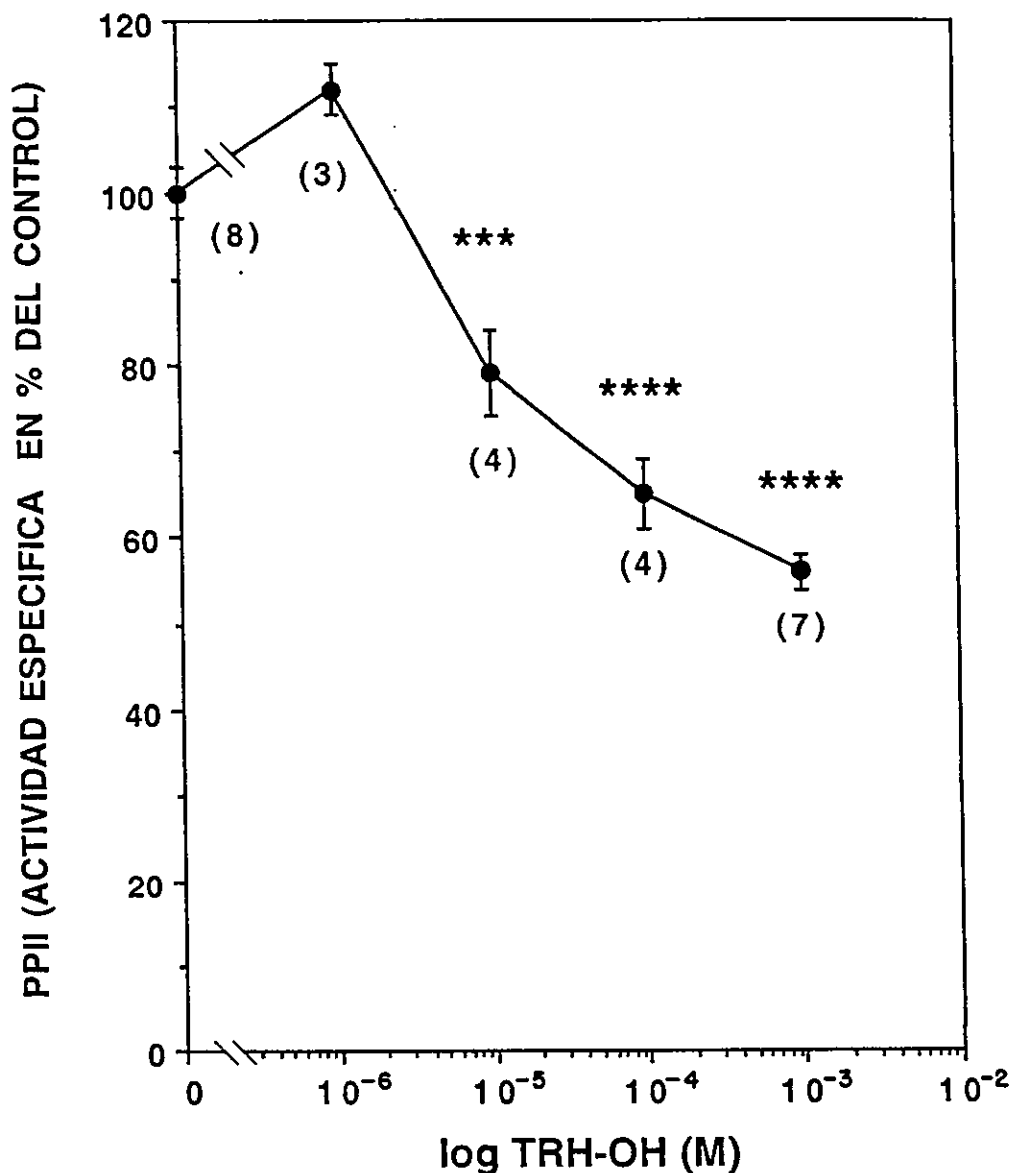


Figura 15. CURVA DOSIS-RESPUESTA DE LA ACCION DE LA TRH-OH SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII. Los cultivos se incubaron con varias concentraciones de TRH-OH durante 16 h antes de determinar la actividad de la PPII. Los resultados son el promedio de la actividad específica (expresados en % del control) \pm el error estándar de la media. La actividad específica promedio fue de 1.59 ± 0.06 pmolas de his-proNH₂/min/mg de proteína. El número de determinaciones se indica entre paréntesis. *** $p < 0.01$ y **** $p < 0.001$ comparados con el control.

14. LA ACTIVACION DEL R-TRH POR TIEMPO LIMITADO ES SUFICIENTE PARA DESENCADENAR LOS EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII

En el animal intacto, muchos mensajeros intercelulares interactúan con sus receptores durante un tiempo breve, el cual es suficiente para desencadenar una respuesta en su célula blanco. Para determinar si la activación del R-TRH por un tiempo corto es suficiente para inducir los cambios a largo plazo de la actividad de la PPII, las células se incubaron con TRH (10^{-6} M) durante diferentes tiempos, posteriormente la TRH se retiró del medio de incubación, las células se lavaron y se volvieron a incubar con medio. Después de 16 h del contacto inicial con la TRH se determinó la actividad de la PPII. El tratamiento de las células con TRH durante 15 minutos disminuyó la actividad de la PPII $26 \pm 3\%$, $n=8$ (figura16). La incubación de las células con la TRH durante 30 min o 16 h disminuyó con la misma eficiencia la actividad de la PPII ($36 \pm 5\%$ $n=6$ y $43 \pm 4\%$ $n=8$ respectivamente) [figura 16]. Esto sugiere que una interacción breve TRH/R-TRH es suficiente para desencadenar respuestas celulares a largo plazo. Puesto que estos resultados se obtuvieron al final del presente trabajo, en la mayoría de los experimentos las células se incubaron con los fármacos durante 16 h, antes de determinar la actividad de la PPII. Con esta estrategia (incubación de las células durante 1 h con los fármacos y determinación de la actividad de la PPII 15 h después) se investigó principalmente el papel del Ca^{++} en la regulación de la PPII (ver más adelante).

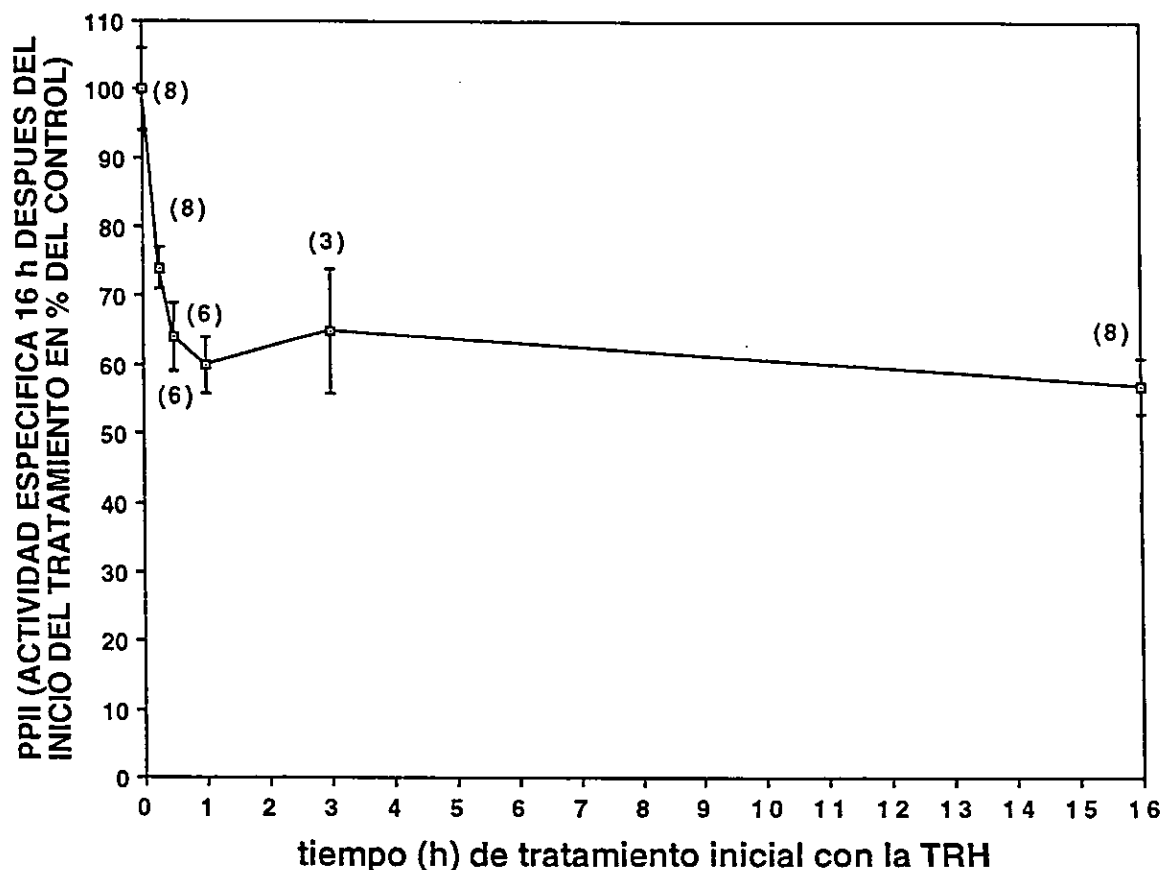


Figura 16. EL TRATAMIENTO DE CELULAS ADENOHIPOFISIARIAS CON LA TRH DURANTE TIEMPOS CORTOS REGULA LA ACTIVIDAD DE LA PPII A LARGO PLAZO. Al cuarto día de cultivo, las células se incubaron con $1 \mu\text{M}$ de MeTRH por los tiempos indicados. Células tratadas durante 0, 15, 30, 60 y 180 minutos así como células controles (no tratadas) se lavaron tres veces con medio suplementado y se incubaron con medio suplementado sin MeTRH hasta completar 16 h de incubación. Solo el grupo "16 h" se trató con MeTRH durante 16 h continuas. Los resultados son la actividad específica promedio (expresada en % de cada control) \pm el error estándar de la media. El número de determinaciones independientes se indica entre paréntesis. La actividad específica promedio del control absoluto (células no tratadas ni lavadas) fue de 1.3 ± 0.14 pmolas de his-proNH₂/min/mg proteína. Todos los tratamientos fueron diferentes (con un valor de $p < 0.001$) con respecto al control.

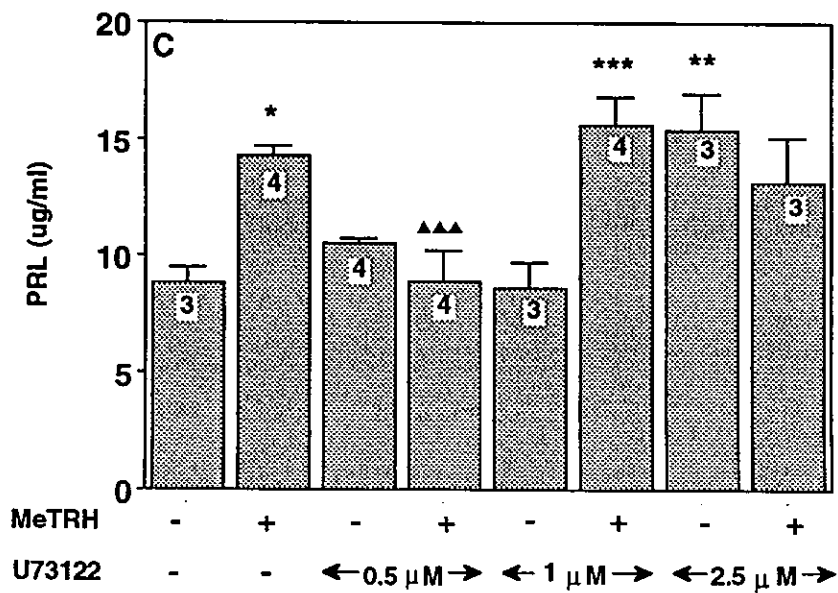
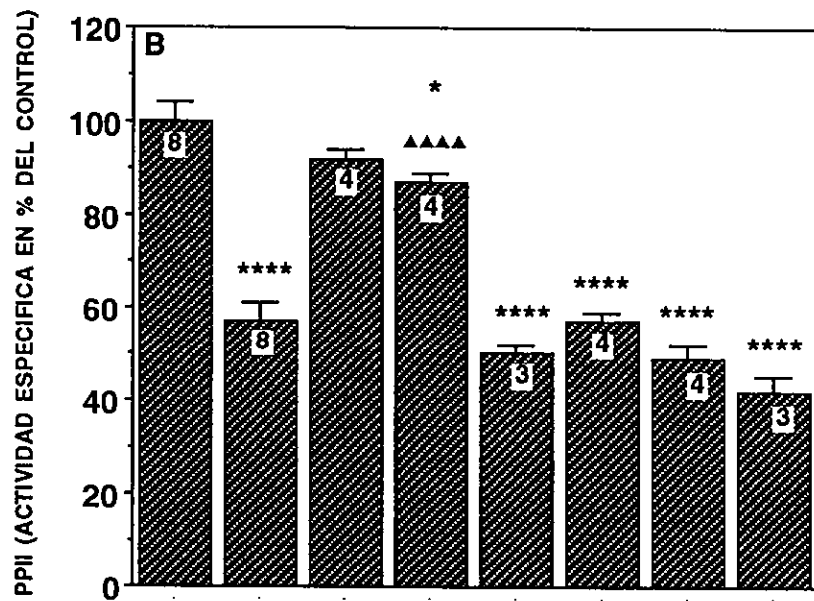
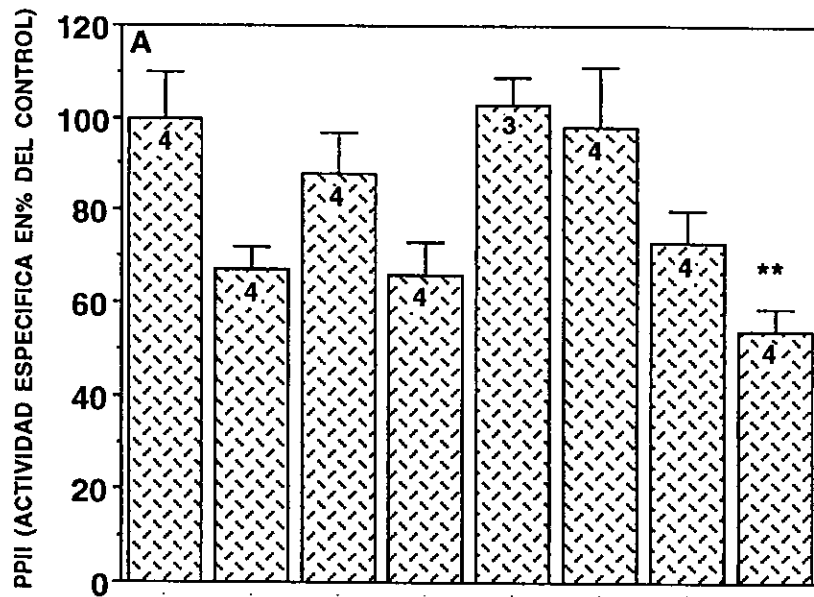
15. LA VIA DE LA PLC ESTA IMPLICADA EN LA REGULACION DE LA PPII POR LA TRH

El receptor de la TRH se acopla a una proteína Gq para activar la vía de la PLC (ver sección 6.1), en la cual la activación de la PKC y la movilización de Ca⁺⁺ intracelular median diversos efectos de la TRH, como liberación y síntesis de PRL y regulación del ARNm del R-TRH. Actualmente no existen toxinas que modifiquen a la proteína Gq; por lo tanto, hasta donde fue posible se evaluó el papel de cada uno de los componentes de esta vía subsecuentes a la activación de la Gq, en la regulación de la actividad de la PPII.

15.1 LA INHIBICION DE LA PLC BLOQUEA EL EFECTO DE LA TRH SOBRE LA PPII

El pretratamiento de las células con el aminoesteroide U-73122 (1-[6[[[(17β)-3-metoxiestral-1,3,5,(10)-trien-17-il]amino]hexil]-1H-pirrol-2,5-diona), un agente que inhibe procesos dependientes de PLC (Bleasdale *et al.*, 1990; Smallridge *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1991), revirtió el efecto de la TRH sobre la actividad de la PPII en dos cultivos independientes a una concentración de 1 y 0.5 μM respectivamente (figura 17A y B); en el segundo experimento se mostró que también inhibió la liberación de PRL inducida por la TRH (figura 17C). A dosis más altas (en cada experimento) el U-73122 no revirtió los efectos que la TRH ejerce sobre la PPII y la liberación de PRL; en cambio, por si solo tuvo un efecto negativo sobre la actividad de la PPII y positivo sobre la liberación de la PRL (figura 17). Estos efectos no fueron aditivos con el efecto de la TRH. Nuestros resultados sugieren que la regulación de la PPII por la TRH es mediada parcialmente por la activación de la PLC. Por lo tanto se analizó el papel de la PKC y del Ca⁺⁺, las dos vías de transducción movilizadas por la activación de la PLC.

Figura 17. EFECTOS DEL U-73122 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII. Células provenientes de dos cultivos independientes (**A y B-C**) se lavaron e incubaron en medio suplementado con diferentes concentraciones de U-73122; una hora después se agregó 1 μ M de TRH y se incubaron por 16 h más. Al final del tratamiento los medios del cultivo **B**) se recuperaron y guardaron a -20 °C hasta que se cuantificó la concentración de PRL por RIA (**C**). Los resultados (**A y B**) son el promedio de la actividad específica (expresados en % del control) \pm el error estándar de la media. La actividad específica promedio para los controles fue de 2.88 ± 0.3 y 2.73 ± 0.1 pmolas de his-proNH₂/min/mg de proteína, para A y B respectivamente. En **C**), los resultados expresan el promedio de la concentración de PRL \pm el error estándar de la media. El número de determinaciones se indica dentro de las barras. *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001 comparados con el control; y ▲▲▲p<0.001 comparados con el grupo MeTRH.



15.2 PAPEL DE LA PKC EN LA REGULACION DE LA PPII

El 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA, un activador de la PKC) disminuyó la actividad de la PPII de una manera dependiente del tiempo (similar a la TRH) y de la dosis, con una ED_{50} de 2.2×10^{-8} M (figura 3 del anexo 1). El forbol-12,13-dibutirato, otro activador de la PKC, también inhibió a la enzima, pero no así un análogo inactivo del TPA, el 4 α -forbol-12,13-didecanoato (tabla 2 del anexo 1). Para poder determinar si la TRH regula a la PPII a través de la activación de la PKC, los cultivos se incubaron con dosis máximas de TRH y de TPA (1 μ M c/u) durante 16 h. Este cotratamiento no tuvo efecto aditivo sobre la regulación de la PPII (tabla 3 del anexo 1). Sin embargo, la preincubación de las células con diferentes dosis de inhibidores de cinasas de proteínas que inhiben la actividad de la PKC (H7, esfingosina o estaurosporina) no previnó los efectos de la TRH o del TPA sobre la actividad de la PPII (figura 4A del anexo 1). Cabe señalar que mientras la estaurosporina bloqueó la liberación de la PRL estimulada por la TRH o el TPA, el H7 sólo bloqueó la acción de la TRH; la esfingosina no tuvo ningún efecto (resultados no mostrados). La activación constante de la PKC prolonga su asociación a la membrana plasmática e induce finalmente a su desaparición, fenómeno que se conoce como "down-regulation" o "depletion" de la PKC (Ase *et al.*, 1988). La incubación de los cultivos con TPA por 24 h no modificó los efectos inhibitorios de la TRH o del mismo TPA sobre la PPII (figura 4B del anexo 1).

Estos resultados tienen varias interpretaciones. Una de ellas es que la TRH regule a la PPII por una PKC tanto resistente a la inhibición por inhibidores de cinasas de proteínas convencionales como a la desaparición inducida por el TPA. Alternativamente, otro segundo mensajero generado por la vía de la PLC, como es el Ca^{++} , u otra vía de transducción pudiera mediar el efecto de la TRH para regular la actividad de la PPII. En este caso la no aditividad de los efectos del TPA y de la TRH se pudiera explicar por una convergencia distal de las 2 vías de transducción.

15.3 PAPEL DEL CALCIO EN LA REGULACION DE LA PPII

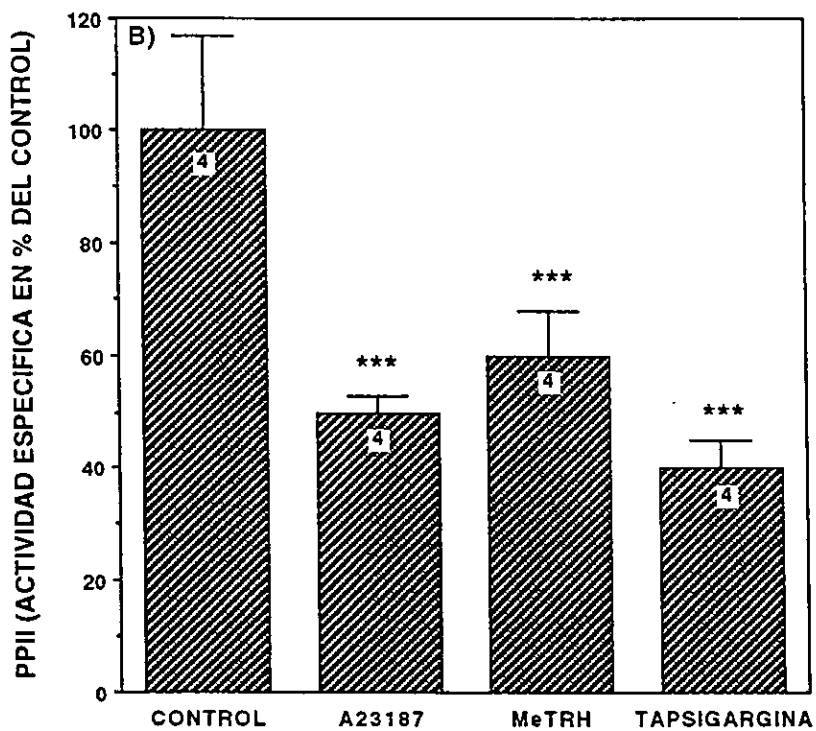
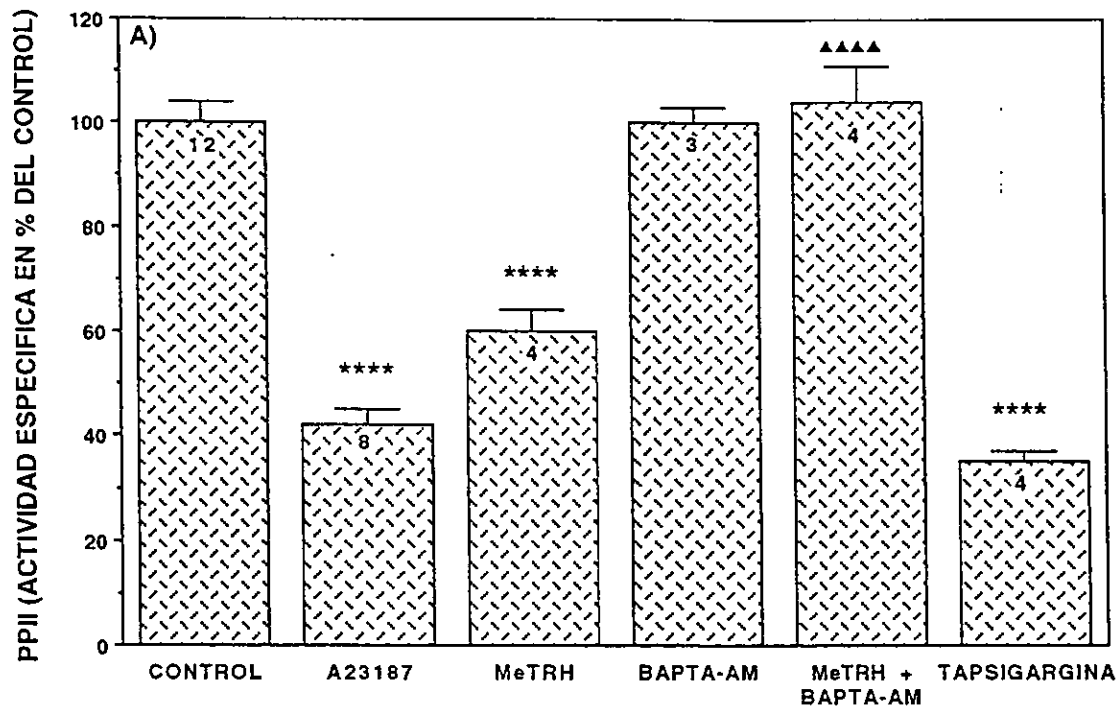
Para estudiar el papel del Ca^{++} en la regulación de la PPII, los cultivos se trataron inicialmente con diferentes drogas durante 16 h antes de medir la actividad enzimática de la PPII.

Puesto que el ionóforo de Ca^{++} A23187 (10^{-6} M) disminuyó $58 \pm 3\%$ [$n=8$] la actividad de la enzima (figura 18A), se decidió investigar si el Ca^{++} es un mediador de la respuesta TRHérgica en la regulación de la PPII. La preincubación de las células con $100 \mu\text{M}$ de BAPTA-AM, un agente quelante de Ca^{++} que atraviesa la membrana plasmática, no tuvo efecto sobre la actividad basal de la PPII, pero revirtió el efecto de la TRH sobre ésta (figura 18A). Estos resultados sugieren que un aumento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$ es capaz de regular a la PPII, y que este aumento es necesario para que se lleve a cabo el efecto de la TRH.

En células GH, la TRH causa una elevación bifásica de Ca^{++} libre intracelular. La primera se da a través de la movilización de Ca^{++} proveniente del retículo endoplasmático, y la segunda por el influjo de Ca^{++} a través de canales de Ca^{++} tipo L (ver sección 6.1). Por lo tanto, se intentó discernir si alguna de estas "vías" de control del Ca^{++} intracelular media la respuesta TRHérgica. La primera se estudió al incubar las células con tapsigargina, un agente que inhibe a la ATPasa de Ca^{++} del retículo endoplasmático, lo cual induce una pérdida de Ca^{++} del retículo (Lytton *et al.*, 1991). La tapsigargina (10^{-6} M) disminuyó la actividad de la PPII ($65 \pm 2\%$, $n=4$; figura 18A), efecto que pudiera deberse a una acumulación transitoria de Ca^{++} intracelular; por lo tanto esta estrategia no fue adecuada para determinar si el efecto que la TRH ejerce pasa por la movilización de Ca^{++} intracelular.

Para definir si el influjo de Ca^{++} a través de canales dependientes de voltaje y sensibles a dihidropiridinas regula a la PPII, las células se incubaron con diferentes concentraciones de (\pm)-Bay K 8644, un agonista de canales de Ca^{++} tipo L, durante 16 h antes de determinar la actividad de la enzima. La incubación de las células con $1 \mu\text{M}$ de Bay K tuvo un ligero efecto inhibitor ($17 \pm 3\%$ $n=16$), y se observó un efecto máximo con una concentración de $50 \mu\text{M}$ ($50 \pm 3\%$ $n=11$ de inhibición; figura 19).

Figura 18. FARMACOS QUE MODIFICAN LA CONCENTRACION INTRACELULAR DE CALCIO REGULAN LA ACTIVIDAD DE LA PPII. **A)** Los cultivos se trataron durante 16 h con A23187 (10^{-6} M), tapsigargina (10^{-6} M), BAPTA-AM (10^{-4} M) o MeTRH (10^{-6} M) antes de determinar la actividad de la PPII. En el grupo BAPTA-AM + MeTRH, el primero se añadió 1 h antes que la TRH. **B)** Las células se incubaron con A23187 o tapsigargina durante 1 h. El medio se retiró, las células se lavaron 3 veces e incubaron nuevamente en medio sin fármacos, durante 15 h antes de medir la actividad de la enzima. Los resultados son la actividad específica promedio (expresada en % de cada control) \pm el error estándar de la media. El número de determinaciones independientes se muestra dentro de las barras. La actividad específica promedio del control en A) fue de 1.63 ± 0.11 pmolas de his-proNH₂/min/mg de proteína. En B), la actividad basal determinada en membranas con el ensayo fluorogénico descrito en el anexo 2, fue de 26 ± 5 pmolas de β NA/min/mg de proteína. *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ con respecto a su control y ▲▲▲ $p < 0.001$ con respecto al grupo TRH.



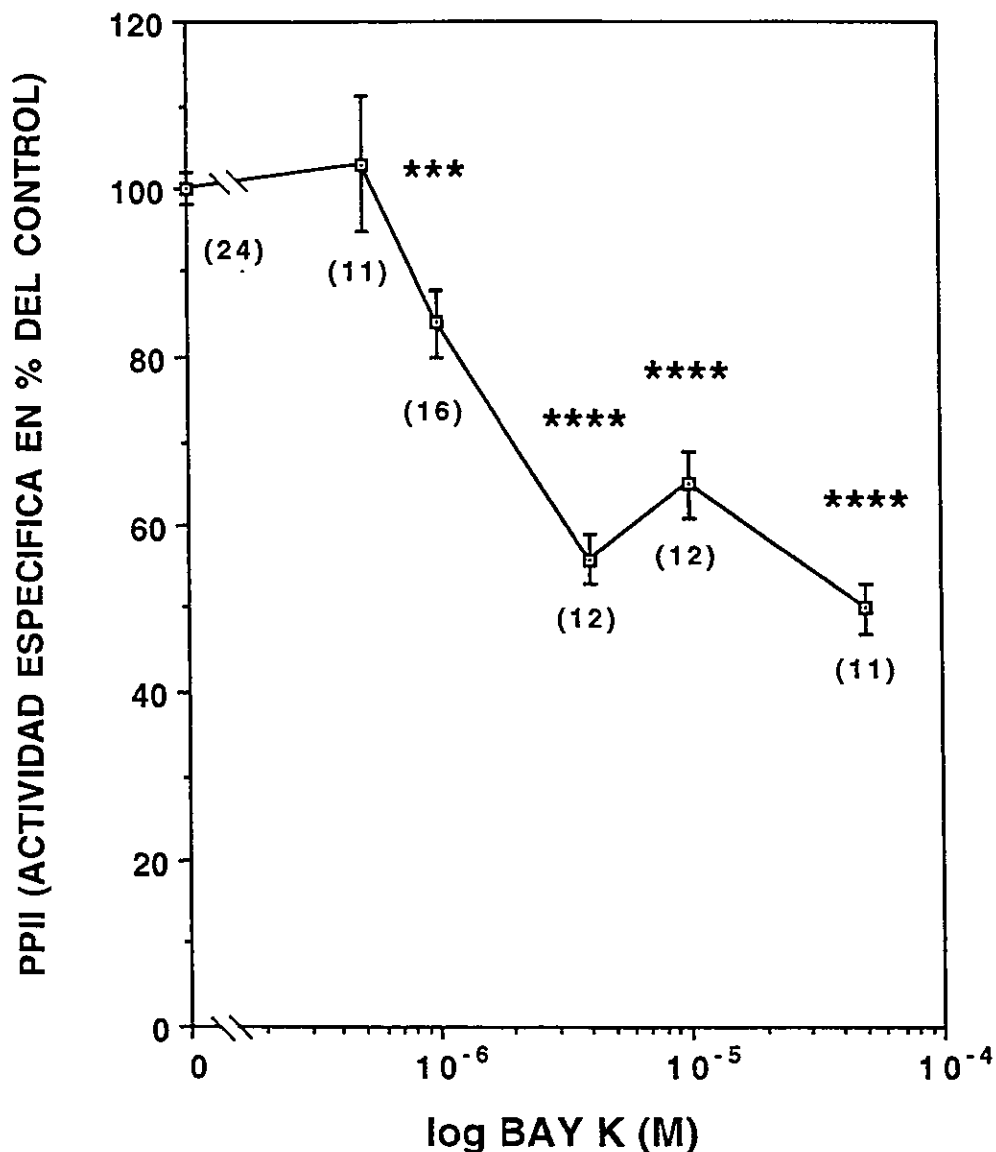


Figura 19. EFECTO DEL (\pm)BAY K 8644 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII. Las células se incubaron con diferentes concentraciones de Bay K durante 16 h antes de determinar la actividad de la PPII. Los resultados son el promedio de la actividad específica (expresados en % del control) \pm el error estándar de la media. La actividad específica promedio del control fue de 1.78 ± 0.1 pmolas de his-proNH₂/min/mg de proteína. El número de determinaciones se indica entre paréntesis. *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$ comparado al control.

La incubación prolongada con agentes que incrementan la $[Ca^{++}]_i$ puede ser tóxica para las células y/o modificar procesos de transducción o síntesis de proteínas, involucradas en la regulación de la PPII. Con base en el contenido de proteína total y a la viabilidad y la morfología celular, detectamos efectos tóxicos del Bay K a una concentración de 200 μ M. Por lo tanto, para los subsecuentes experimentos de esta sección se utilizó la estrategia mencionada en la sección 14: las células se trataron sólo durante 1 h con las drogas y 15 h después de retirarlas del medio de incubación, se determinó la actividad de la PPII.

El A23187 (10^{-6} M), la tapsigargina (10^{-6} M) o el Bay K (10 y 50 μ M) disminuyeron la actividad de la PPII ($50 \pm 5\%$ $n=8$, $62 \pm 9\%$ $n=4$, $35 \pm 6\%$ $n=3$ y $43 \pm 3\%$ $n=3$ respectivamente) de manera similar a cuando las células se trataron durante 16 h contínuas con estos agentes ($58 \pm 3\%$ $n=4$, $65 \pm 2\%$ $n=6$, $33 \pm 4\%$ $n=3$ y $48 \pm 2\%$ $n=3$ respectivamente) [figuras 18 y 20A].

Para definir si la TRH y el Bay K actúan por la misma vía, las células fueron incubadas con dosis máximas efectivas de estos agentes. El cotratamiento de las células con TRH (10^{-6} M) y Bay K (10 o 50 μ M) no produjo un efecto mayor sobre la PPII, al obtenido cuando las células fueron incubadas con uno o con otro agente (figura 20B). Estos datos sugieren que la TRH pudiera actuar a través de la misma vía que el Bay K. Con la finalidad de apoyar esta sugerencia, se estudió el efecto de drogas que bloquean canales de Ca^{++} dependientes de voltaje y sensibles a dihidropiridinas sobre la acción de la TRH. Los tratamientos de las células con verapamil (50 μ M) o nifedipina (50 nM) no modificaron la actividad basal de la PPII, pero en cambio inhibieron los efectos que la TRH (1 μ M) o el Bay K (10 μ M) ejercen sobre la PPII (figura 21). Dosis mayores de nifedipina dieron el mismo resultado (no mostrado). Entonces, es posible que el efecto de la TRH esté mediado por la activación de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje que son sensibles a las dihidropiridinas.

Figura 20. EI TRATAMIENTO DE LAS CELULAS CON BAY K DURANTE 16 O 1 h TIENE EL MISMO EFECTO SOBRE LA PPII. Las células se incubaron con MeTRH (10^{-6} M) o Bay K (10^{-6} M) durante 16 h continuas (barras con puntos) o 1 h con las drogas y 15 h más en medio sin fármacos (barras con líneas), antes de determinar la actividad de la PPII. La actividad específica membranar (determinada con el método fluorogénico descrito en el anexo 2) de los controles fue de 6 ± 0.5 , 5 ± 0.9 y 10 ± 3 pmolas de BNA/min/mg de proteína para los paneles A (grupos 16 y 1 h) y B respectivamente. El número de determinaciones independientes se muestra dentro de las barras. ▲▲▲▲, **** $p < 0.001$ comparados con su respectivo control.

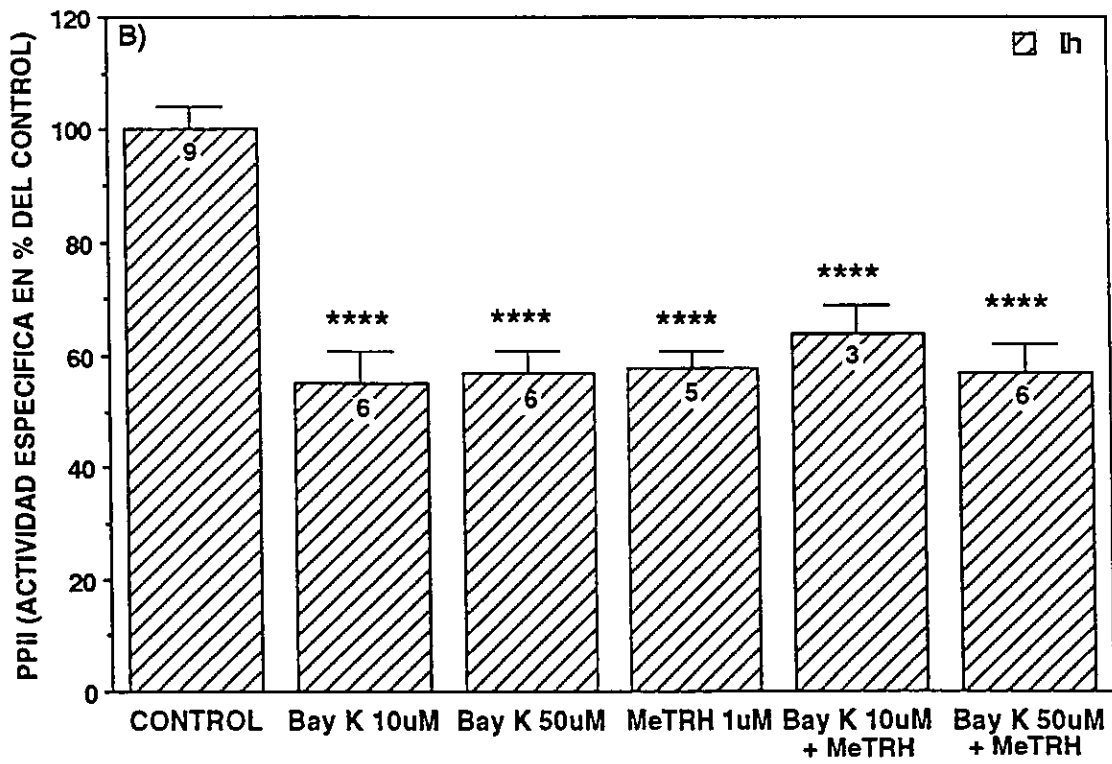
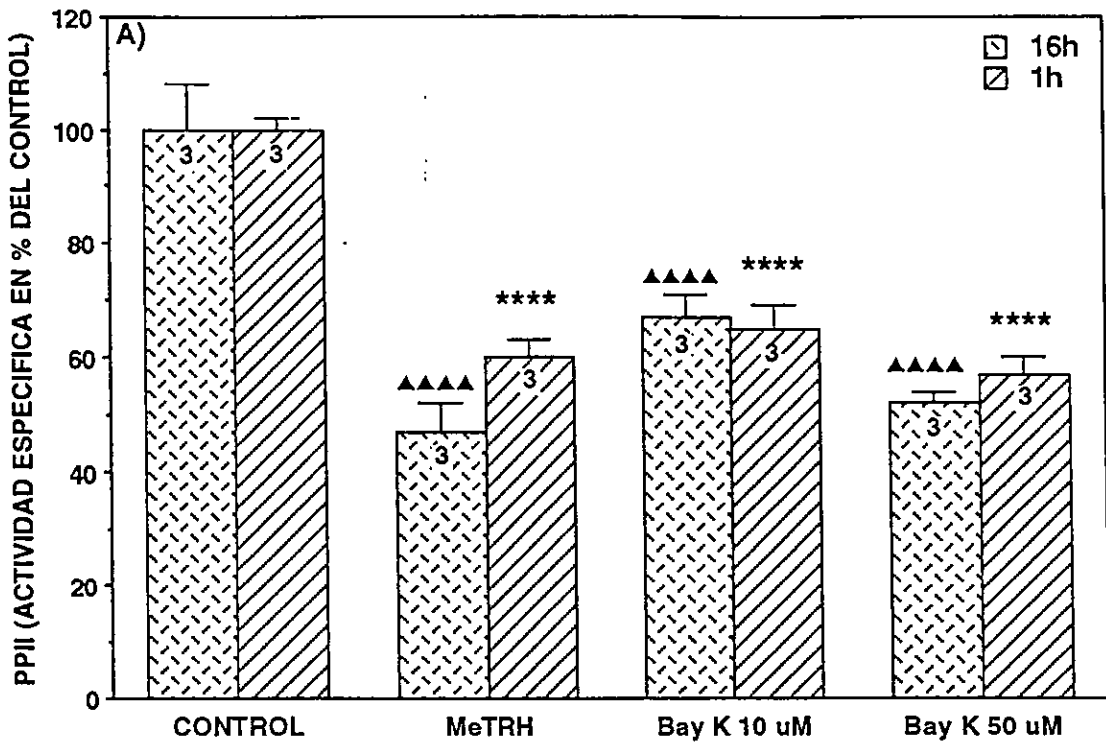
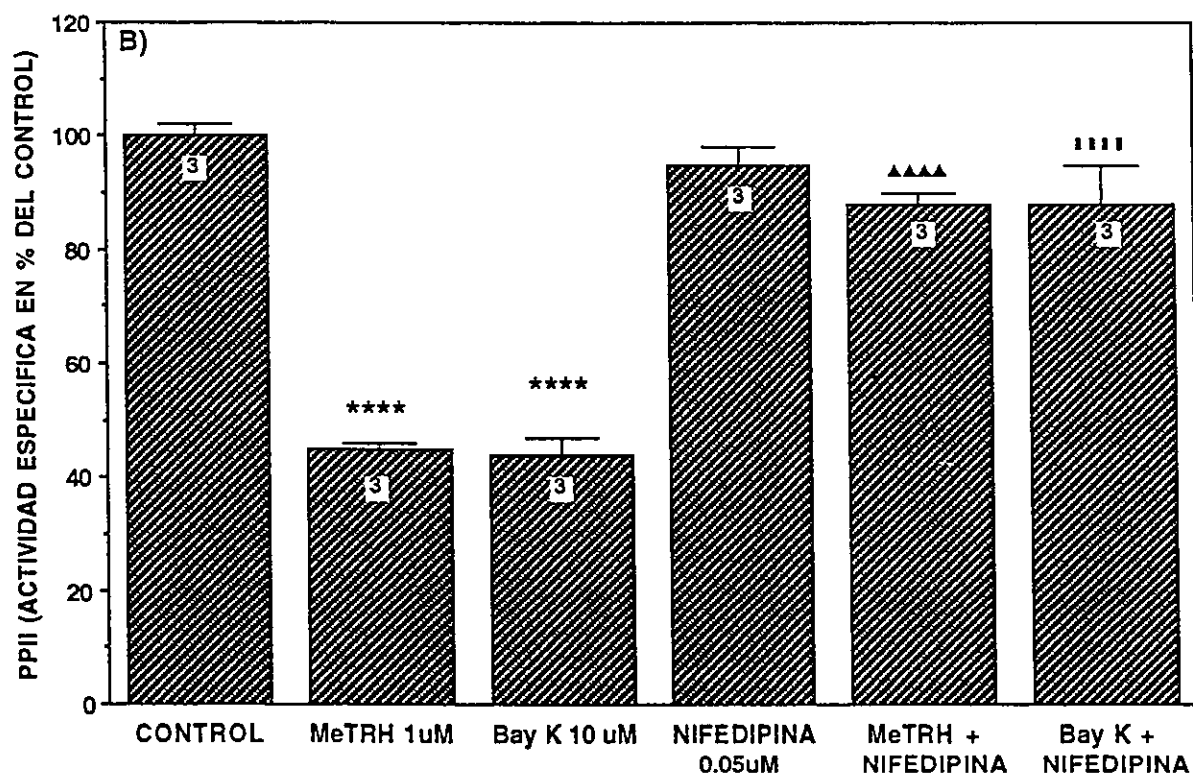
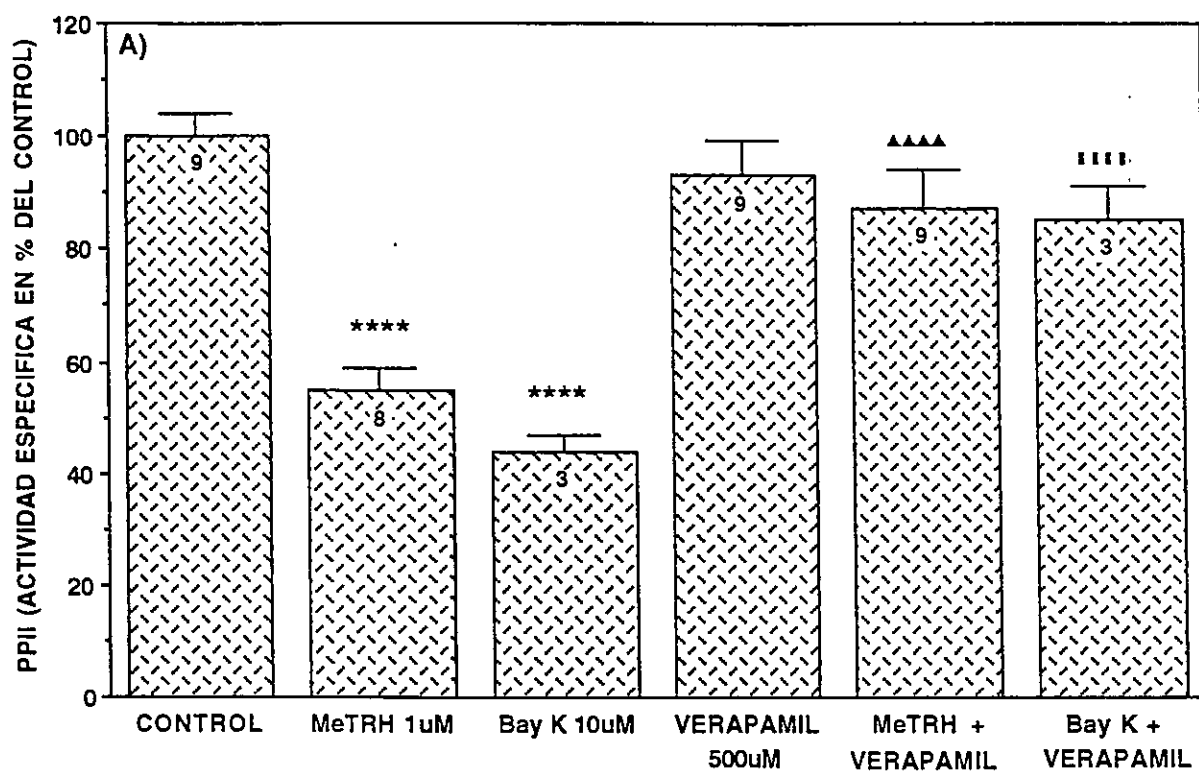


Figura 21. EL VERAPAMIL Y LA NIFEDIPINA BLOQUEAN LOS EFECTOS DE LA TRH Y DEL BAY K SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII. Las células se preincubaron durante 15 minutos con 50 μ M de verapamil **(A)** o 50 nM de nifedipina **(B)** antes de incubarlas con MeTRH (1 μ M) o Bay K (10 μ M) durante 1 h; 15 h después de retirar las drogas del medio, se determinó la actividad de la PPII membranal con el método fluorogénico descrito en el anexo 2. La actividad específica promedio para los controles A y B fue de 27 ± 3 y 36 ± 2 pmolas de β NA/min/mg de proteína respectivamente. El número de determinaciones independientes se indica dentro de las barras. ****p<0.001 con respecto al control, ▲▲▲p<0.001 con respecto al grupo MeTRH y ■■p<0.02, ■■■p<0.001 con respecto al grupo Bay K.



16. EFECTOS DE LA PTX Y LA CTX SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII BASAL Y REGULADA POR LA TRH

Nuestros datos pueden tener dos interpretaciones. El R-TRH se acopla a una proteína Gq, la cual activa a la PLC para inducir la activación de los canales de Ca⁺⁺ (discutido en la sección 6.1) y finalmente llevar a la regulación de la PPII. Alternativamente, el R-TRH pudiera activar a la PKA y ésta a su vez activar, a través de fosforilar, a la PKC y/o los canales de Ca⁺⁺.

Ya que se ha reportado que el R-TRH puede estar acoplado a otras vías de transducción a través de proteínas G de la familia G $\alpha_{i/o}$ o G α_s sensibles a la PTX o a la CTX respectivamente (ver secciones 6.2 y 6.3.1), se estudió el efecto de estas toxinas sobre la actividad de la PPII basal y regulada por la MeTRH. El pretratamiento de las células con la PTX no tuvo efecto sobre la PPII ni modificó el efecto de la MeTRH sobre la actividad de la PPII, lo cual indica que el R-TRH no está acoplado a la familia de proteínas G $\alpha_{i/o}$ para regular a la PPII, tal como ocurre para su efecto sobre la liberación de PRL (figura 1 del anexo 2). En cambio, la CTX inhibió la actividad de la enzima y el cotratamiento con la MeTRH tuvo un efecto aditivo (figura 1 del anexo 2). Estos resultados sugieren que la activación de una proteína Gs regula a la PPII pero que la TRH no utiliza a ésta para regular a la enzima.

17. PAPEL DEL AMPc EN LA REGULACION DE LA PPII

Ya que uno de los blancos de la Gs es la AC, se exploró el papel del AMPc en la regulación de la PPII incubando a las células con drogas que aumentan los niveles intracelulares del AMPc. La forskolina, un activador de la AC, causó una disminución en la actividad de la PPII de una manera dependiente del tiempo y de la dosis. El efecto máximo se observó entre las 12 y 16 h de tratamiento con inhibiciones del 42 \pm 3% y 47 \pm 3% respectivamente. El valor de la ED₅₀ fue de 10⁻⁷ M. La 1-9, dideoxiforskolina, un análogo de la forskolina que no activa a la AC, no afectó la

actividad de la PPII (figura 2 del anexo 2). El 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) un inhibidor de fosfodiesterasas (que causa acumulación intracelular del AMPc) y el dibutiril AMPc (dBAMPc), un análogo permeable del AMPc, también causaron un efecto inhibitor sobre la actividad de la PPII de una manera dependiente de la dosis a 16 h de tratamiento. Las inhibiciones máximas se observaron con 10^{-4} M de IBMX ($49 \pm 6\%$) y 10^{-3} M de dBAMPc ($46 \pm 4\%$) (figura 3 del anexo 2). Estos resultados demuestran que la vía del AMPc también regula la actividad de la PPII.

18. INTERACCION DE LA VIA DEL AMPc CON LA TRH Y CON LA PKC EN LA REGULACION DE LA PPII

Para determinar si las vías de transducción de la TRH y del AMPc actúan de manera dependiente o independiente, los cultivos se cotrataron con dosis máximas efectivas de MeTRH y forskolina o MeTRH y dBAMPc. De manera similar se exploró la posible interacción entre las vías del AMPc y la PKC, incubando a las células con TPA y forskolina.

En la figura 4 del anexo 2, se muestra que los cotratamientos con la MeTRH y la forskolina o con la MeTRH y el dBAMPc tuvieron efectos aditivos sobre la regulación de la PPII, en comparación al efecto de las drogas por separado. Por otro lado, el cotratamiento de las células con el TPA y la forskolina a dosis máximas provocó una inhibición más fuerte de la PPII ($62 \pm 2\%$) que con el TPA ($36 \pm 3\%$) o la forskolina ($38 \pm 2\%$) solos (figura 5 del anexo 2).

Estos datos muestran que las vías de transducción de la PKC y del AMPc actúan de manera independiente para regular la actividad de la PPII y que la TRH no utiliza a ésta última. Consistente con esta conclusión, la preincubación de las células con inhibidores de la AC (2',3'-dideoxiadenosina) o de la PKA (H89) no revirtió el efecto de la TRH pero el H89 si bloqueó el efecto de un péptido que activa a la AC, el PACAP [ver sección 19] (figura 6 del anexo 2).

19. EFECTOS DE DIVERSOS FACTORES HIPOTALAMICOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PPII

Nuestros resultados mostraron que la vía del AMPc regula la actividad de la PPII, independientemente de la PKC y de la vía de transducción que la TRH utiliza. Se decidió entonces evaluar el efecto de factores hipotalámicos cuyos receptores se acoplan a la vía del AMPc y que regulan la secreción de PRL. La incubación de las células con el “polipéptido activador de la adenilato ciclasa de pituitaria” (10^{-6} M) [PACAP: “pituitary adenylate cyclase activating polypeptide”], el cual induce un aumento en los niveles intracelulares del AMPc, disminuyó la actividad de la PPII, efecto que fue revertido por el pretratamiento con el H89 (10^{-6} M), un inhibidor específico de la PKA. El efecto del PACAP fue aditivo con el de la MeTRH (figura 6 del anexo 2). Sin embargo, otro péptido activador de la AC, el VIP (10^{-6} M), no modificó la actividad de la PPII (dato no mostrado). Estos resultados se deben probablemente a la activación del receptor tipo I del PACAP, el cual es más afín al PACAP que al VIP.

La DA y la SRIF, cuyos receptores están acoplados negativamente a la AC vía proteínas G sensibles a la PTX, son dos factores hipotalámicos que inhiben la liberación de PRL basal y estimulada por la TRH. Tanto la bromocriptina [agonista del receptor dopaminérgico D2] (10^{-8} M) como la SRIF (10^{-6} M) tuvieron un pequeño efecto positivo sobre la actividad de la PPII. El pretratamiento de los cultivos con estos factores bloqueó el efecto negativo de la MeTRH sobre la actividad de la PPII (figura 7A del anexo 2). Para determinar si los efectos de estos factores están mediados a través de una proteína $G_{i/o}$, los cultivos se preincubaron con PTX antes de tratarlos con la bromocriptina o la SRIF. La PTX revirtió el efecto positivo de estos factores y bloqueó su capacidad de inhibir el efecto de la MeTRH sobre la PPII (figura 7B, del anexo 2).

Ya que activadores de la PKC regulan a la PPII, se decidió investigar si la angiotensina II (AII), péptido que utiliza la vía de la PKC para inducir la liberación de PRL (Audinot *et al.*, 1991), también es capaz de regular a la enzima. El tratamiento de los cultivos con AII (10^{-6} M) durante 16 h no modificó la actividad de la PPII (no mostrado).

Nuestros datos sugieren que la actividad de la PPII puede ser regulada tanto "homóloga" como "heterológamente" por algunos de los factores hipotalámicos involucrados en controlar la secreción de PRL.

20. NIVEL DE REGULACION DE LA PPII

Los efectos descritos se observaron varias horas después del inicio de los tratamientos. Para determinar si esto se debe a una disminución en la síntesis de la PPII, se cuantificaron los niveles del ARNm de la PPII en respuesta a varios tratamientos. Los tratamientos de los cultivos con la MeTRH, el TPA o la forskolina durante 16 h disminuyeron los niveles del ARNm $49 \pm 2\%$, $42 \pm 6\%$ y $37 \pm 6\%$, respectivamente (figuras 8A y 9A del anexo 2); el cotratamiento con el TPA y la forskolina fue aditivo ($69 \pm 7\%$ vs $47 \pm 10\%$ para el TPA y $25 \pm 12\%$ para la forskolina) (figura 8B del anexo 2). Si bien la bromocriptina o la SRIF no modificaron los niveles del ARNm, si fueron capaces de revertir el efecto de la MeTRH (figura 9A, B y C). Resultados preliminares (no mostrados) indicaron que la TRH induce una disminución progresiva del ARNm detectable desde 3 h de incubación (30% de inhibición). Con base en esto, se sugiere que una disminución en el nivel del ARNm de la PPII precede a la disminución de la PPII en la membrana plasmática.

DISCUSION

En los últimos años se ha demostrado que el mecanismo comúnmente utilizado para inactivar a los neuropéptidos es la degradación enzimática por peptidasas embebidas en la membrana plasmática, con su sitio activo orientado hacia el medio extracelular. A estas enzimas se les ha denominado ectopeptidasas (Bauer *et al.*, 1995; Csuhai *et al.*, 1995; Kenny y Turner, 1987; O'Cuinn *et al.*, 1995). Las ectoenzimas hidrolizan uniones peptídicas incluídas en una secuencia consenso, y generalmente degradan diversos péptidos. La PPII es la única ectopeptidasa específica para un péptido (Wilk, 1986). Tradicionalmente se considera que la eficiencia de un sistema de comunicación intercelular depende de la cantidad de mensajero secretado y de los mecanismos de transducción de la señal. Los sistemas de inactivación en cambio se han considerado estáticos. Así se ha postulado que las ectopeptidasas son responsables de inactivar de manera constitutiva a los neuropéptidos, sin que su actividad sea regulable, y que no son un factor que module la eficiencia de la transmisión peptidérgica. Sin embargo evidencias obtenidas en este trabajo y por otros autores sugieren que la actividad de estas ectoenzimas está sujeta a regulación.

Nuestros resultados demuestran claramente que la TRH regula la actividad de la PPII a través de su interacción con el R-TRH. No existen antagonistas de alta afinidad para el R-TRH. Sin embargo, la ED_{50} del efecto de la TRH sobre la actividad de la PPII es similar a la ED_{50} ($1-2 \times 10^{-9}$ M) para inducir la liberación y síntesis de PRL de células normales y GH_3 [tabla IV] (Hinkle, 1989; Vale *et al.*, 1973). De manera similar, las ED_{50} para los efectos de la MeTRH y de la TRH-OH sobre la PPII son semejantes a su correspondiente para inducir la síntesis de PRL en células GH_3 [tabla IV] (Hinkle, 1989). La relación entre las ED_{50} de los efectos de la Me-TRH y de la TRH-OH sobre la PPII con respecto a la ED_{50} del efecto de la TRH es similar a la relación entre sus K_d para el R-TRH (tabla V).

TABLA IV. K_d DE LA TRH, LA MeTRH Y LA TRH-OH PARA LA UNIÓN AL R-TRH, Y ED_{50} PARA DIFERENTES EFECTOS BIOLÓGICOS.

EFECTOR O LIGANDO	K_d	CULTIVO DE CELULAS:	R-TRH ED_{50}	EFEECTO
TRH	40 nM	Hipofisis anterior ^{a,b}	2 nM	Liberación de TSH y PRL
	10 nM	GH ₃ ^c	2 nM	Síntesis de PRL
MeTRH	2 nM	GH ₃ ^c	250 pM	Síntesis de PRL
TRH-OH	10 μ M	GH ₃ ^c	10 μ M	Síntesis de PRL

Datos tomados de a: Labrie *et al.*, 1976. b: Vale *et al.*, 1973. c: Hinkle, 1989.

TABLA V. COCIENTES TRH/MeTRH Y TRH-OH/TRH DE SUS K_d PARA EL R-TRH Y ED_{50} PARA REGULAR LA ACTIVIDAD DE LA PPII Y LA SÍNTESIS DE PRL.

	K_d R-TRH	ED_{50} -PPII	ED_{50} -PRL
TRH/MeTRH	5	6	8
TRH-OH/TRH	1000	8000	5000

Los valores de la K_d y de la ED_{50} fueron tomados de Hinkle, 1989.

En células GH₃, la unión de la TRH a su receptor activa a la PLC-β1 a través de una proteína G de la familia α_{q/11} (ver sección 6.1). Una de las estrategias más utilizadas para estudiar procesos dependientes de proteínas G en células intactas ha sido el uso de toxinas bacterianas con actividad de ADP-ribosilación (ver sección 5). Sin embargo, no hay toxina que modifique la actividad de las α_{q/11}. El aminoesteroide U-73122 inhibe específicamente procesos dependientes de PLC: inhibe la formación del IP₃ y el incremento en la [Ca⁺⁺]_i inducidos por agonistas (incluyendo a la TRH) en plaquetas, células GH₃ y células de neuroblastoma (Bleasade *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1991; Smallridge *et al.*, 1992). Por otro lado, en células COS-1 transfectadas con el R-TRH y en células de neuroblastoma, además de inhibir la formación del IP₃ inducida por agonistas, también inhibe la endocitosis del R-TRH y del receptor muscarínico respectivamente (Nussenzveig *et al.*, 1993; Thompson *et al.*, 1991).

El efecto dual que el U-73122 presentó en nuestras condiciones experimentales no parece ser inespecífico ni aleatorio porque se mostró previamente que en células GH₃ el U-73122 a una concentración de 1 μM bloquea el efecto de la TRH sobre la movilización de Ca⁺⁺ intracelular, la producción del IP₃ y la secreción de PRL pero que a concentraciones entre 3-10 μM por sí solo induce la formación del IP₃, un aumento en la [Ca⁺⁺]_i y liberación de PRL, efectos que no son aditivos con los de la TRH (Smallridge *et al.*, 1992). Los efectos agonistas y antagonistas dependientes de la dosis se observan en varios tipos celulares (Jin *et al.*, 1994; Zheng *et al.*, 1995). Nuestros resultados son consistentes con la hipótesis de que en el lactótropo el R-TRH está acoplado a la vía de la PLC para regular la actividad de la PPII. La activación de la PLC enciende dos vías intracelulares cuyo papel se investigó de manera separada.

Los efectos de las dosis máximas de la TRH y del TPA no fueron aditivos por lo que propusimos que ambos actúan a través de la misma vía: la activación de la PKC. La desaparición de la PKC celular inducida por el tratamiento prolongado con TPA inhibe algunas respuestas lactotrópicas mediadas por esta cinasa (Audinot *et al.*, 1991; Cheng *et al.*, 1992). En nuestras condiciones, este tratamiento no revirtió los

efectos de la TRH o del TPA sobre la actividad de la PPII.

La PKC es una familia de isoenzimas que, con base en su estructura y propiedades bioquímicas, ha sido dividida en tres subfamilias: las PKC convencionales (cPKC: α , β I, β II y γ), las PKC nuevas (nPKC: δ , ϵ , η y θ) y las PKC atípicas (aPKC: ι , λ , y ζ). El Ca^{++} , el diacilglicerol y la fosfatidilserina regulan las isoformas cPKC; el diacilglicerol y la fosfatidilserina pero no el Ca^{++} regulan las isoenzimas nPKC; por último, la fosfatidilserina activa los subtipos aPKC. Los ácidos grasos insaturados como el AA, aumentan la activación de todas las isoformas cPKC y δ , ϵ y ζ (Newton, 1997; Nishizuka, 1992). En lactótrofos se ha reportado la presencia de las PKC α , β II, δ y ζ (Mau *et al.*, 1994). En estas células, el TPA sólo induce translocación a la membrana de las tres primeras isoformas (Mau *et al.*, 1994). El papel de algunas isoenzimas en la transducción de la TRH se ha estudiado en células GH_4C_1 , las cuales contienen las isoformas α , β II, δ , ϵ , η y ζ pero no contienen las isoformas β I, γ o θ (Akita *et al.*, 1994; Kiley *et al.*, 1991). En estas células, la TRH o el TPA inducen una rápida translocación de las isoformas α , β II, δ y ϵ (Akita *et al.*, 1990; Kiley *et al.*, 1991). La translocación de las tres primeras isoformas inducida por la TRH es transitoria y solo promueve la desaparición de la PKC ϵ . El TPA en cambio induce desaparición transitoria (minutos) de la PKC α , pero definitiva de las PKC β II y ϵ (Akita *et al.*, 1990; Kiley *et al.*, 1991). Múltiples PKC pueden participar en los diversos efectos desencadenados por la TRH. Por ejemplo, la liberación de PRL inducida por la TRH puede estar mediada por isoformas dependientes o independientes (específicamente la isoforma ϵ) del Ca^{++} (Akita *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990). En este contexto, la reorganización de proteínas del citoesqueleto, como la vinculina y los filamentos de actina, inducida por la TRH opera a través de cinasas pertenecientes a las subfamilias cPKC y nPKC respectivamente (Kiley *et al.*, 1992). Además se ha reportado que en lactótrofos la desaparición de la PKC inducida por el pretratamiento con el TPA inhibe la liberación de PRL estimulada por el TPA pero no por la TRH (Cheng *et al.*, 1992). Por lo tanto, es posible que una de las PKC ya mencionadas (α , δ o η) o alguna no descrita pero que no desaparezca participe en el efecto de la TRH. Recientemente se ha reportado la presencia de una nueva PKC

(independiente de Ca^{++} pero dependiente de esteres de forbol) en adenohipófisis. Aun no se ha estudiado su distribución celular (Ison *et al.*, 1995).

Otra estrategia que se utilizó para estudiar el papel de la PKC en la regulación de la PPII es preincubar a las células con inhibidores de cinasas (H7, esfingosina o estaurosporina) que actúan en diferentes sitios de la PKC (y de otras cinasas) antes del tratamiento con la TRH o el TPA. Con los inhibidores que utilizamos en esta tesis, se ha observado una inhibición del efecto del TPA o de secretagogos que actúan a través de la PKC en el lactótropo (Audinot *et al.*, 1991; Samson y Skala, 1992). La PKC consiste de una sola cadena polipeptídica que contiene una región reguladora N-terminal (con dos dominios conservados, C1 y C2) y una región catalítica C-terminal (con los dominios C3 y C4). El dominio C1 es el sitio de unión del diacilglicerol o de ésteres de forbol y de la fosfatidilserina, el dominio C2 (presente sólo en cPKC) es el sitio de unión para el Ca^{++} , en el C3 se une el ATP y en el C4 el sustrato (Newton, 1997; Nishizuka, 1992). El H7 compite por el sitio de unión al ATP (Hidaka *et al.*, 1984); la esfingosina interactúa competitivamente con la región reguladora (Hannun *et al.*, 1986), y la estaurosporina interactúa de manera competitiva y no competitiva en el sitio de unión al ATP (Huang, 1989). La incapacidad de estos inhibidores para bloquear los efectos del TPA o de la TRH no se debió a una falta de eficiencia en nuestros experimentos, puesto que algunos de ellos inhibieron la liberación de PRL inducida por la TRH y/o el TPA. Se ha reportado que ciertos efectos del TPA no son revertidos por estos inhibidores (Downey *et al.*, 1992). Gschwendt *et al.* (1989) reportaron la presencia de una nPKC resistente a un inhibidor de la familia de la estaurosporina (K252a) en bazo porcino. Los lactótrofos pudieran presentar una o varias nPKC resistentes a estos inhibidores. La nPKC de adenohipófisis, reportada por Ison *et al.* (1993a; 1995), es resistente a la inhibición por H7, pero no por estaurosporina (Ison *et al.*, 1993b; Thompson *et al.*, 1993). En conclusión, es posible que una nPKC resistente a desaparecer y a la inhibición por los fármacos usados en este estudio sea la responsable de regular la actividad de la PPII en respuesta a la TRH.

Alternativamente, la no aditividad de los efectos del TPA y de la TRH se pudiera

explicar por una convergencia distal de las vías involucradas. Por lo tanto, otra vía de señalización intracelular estaría involucrada en la regulación de la PPII por la TRH. Ya que el Ca^{++} es el otro componente en la vía de la PLC, su posible participación en la regulación de la PPII fue evaluada. Puesto que la TRH induce un aumento en la $[\text{Ca}^{++}]_i$ de manera bifásica, mediada por dos diferentes componentes (ver sección 6.1), se intentó discernir el papel de cada uno de ellos. El papel de la movilización del Ca^{++} intracelular no se pudo estudiar.

Sin embargo, se exploró la participación de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje sensibles a dihidropiridinas (Lewis *et al.*, 1988) en la regulación de la PPII. El tratamiento de las células con (\pm)-Bay K 8644 produjo un efecto inhibitorio sobre la actividad de la PPII, que fue máximo a una concentración de 10 μM . Esta dosis es similar a la reportada para inducir la síntesis (3 μM) y liberación (5-50 μM) de PRL de células GH (Enyeart y Hinkle, 1984; Enyeart *et al.*, 1987). Por otro lado, se evaluó el efecto de antagonistas de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje, el verapamil y la nifedipina, que actúan en diferentes regiones de la subunidad α_1 del canal (Spedding y Kenny, 1992). Estos fármacos inhiben preferencialmente a los canales tipo L, que son sensibles a concentraciones nanomolares de dihidropiridinas antagonistas (Bean, 1984). La nifedipina (una molécula perteneciente a la familia de las dihidropiridinas) bloqueó el efecto de la TRH a una concentración de 50 nM (dosis mínima ensayada en este estudio). Resultados preliminares (no mostrados) indicaron que los efectos a máximas dosis del Bay K y del TPA no fueron aditivos, lo cual sugiere que ambos actúan a través de una vía común para regular a la PPII. Esto es consistente con la no aditividad del efecto del TRH y TPA. Es factible por tanto que el efecto de la TRH este mediado por la activación de canales de Ca^{++} dependientes de voltaje sensibles a dihidropiridinas y probablemente éstos sean del tipo-L.

Existen evidencias de que el R-TRH puede estar acoplado a diferentes proteínas G sensibles a PTX o CTX en líneas celulares GH o en diferentes tipos celulares cuando son transfectados con el R-TRH. Nuestros datos son consistentes con que el R-TRH no está acoplado a una proteína G_i o G_s y que la vía de transducción utilizada por la TRH para regular a la PPII no involucra una alteración de

los niveles de AMPc.

En lactótrofos se ha observado que la TRH, la AII o el TPA inducen un aumento en los niveles del AMPc a través de la activación de la PKC (Audinot *et al.*, 1991; Mau *et al.*, 1997). De manera similar, la sustancia P (quien activa a la PKC) potencia la formación del AMPc inducida por el VIP o la forskolina y, de manera inversa, el VIP o la forskolina potencian el efecto de la sustancia P sobre la translocación de la PKC y la formación del IP_3 (Mau *et al.*, 1997). En nuestras condiciones, los efectos aditivos del TPA y de la forskolina o del Bay K y de la forskolina (estos últimos son resultados preliminares no mostrados) sobre la actividad de la PPII sugieren que no existe una comunicación cruzada entre las vías del AMPc y de la PLC para regular a la PPII.

La activación del R-TRH también lleva a la producción de AA intracelular (ver sección 6.3.3). Puesto que no se ha descrito que la activación del R-TRH induzca un acoplamiento directo de alguna proteína G con la PLA2, es posible que la activación de la PLA2 sea una consecuencia del aumento en la $[Ca^{++}]_i$; y/o de la activación de la MAPK (ver secciones 6.3.2 y 6.3.3). Hemos observado que la melitina (activador de la PLA2) o el AA inhiben rápidamente la actividad de la PPII, probablemente debido al metabolismo del AA por la vía LOX ya que inhibidores de la lipooxigenasa pero no de la ciclooxigenasa bloquean el efecto de la melitina o del AA. Sin embargo no sabemos si la TRH utiliza esta vía para regular la actividad de la PPII pero la movilización del AA no induce efecto a largo plazo a diferencia de lo que pasa con la TRH (Charli *et al.*, 1996). En conclusión proponemos que el R-TRH se acopla a la proteína $G\alpha_q$ para regular la actividad de la PPII en lactótrofos (células normales).

Acerca del mecanismo intracelular que la TRH desencadena al activar a la PLC para regular a la PPII, dos alternativas se pueden proponer. 1) Puesto que los efectos de las dosis máximas de la TRH y del Bay K no fueron aditivos, que los inhibidores de cinasas de proteínas y la desaparición de la PKC no revirtieron el efecto de la TRH pero que el bloqueo de los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje si lo revirtió, es posible que la entrada de Ca^{++} por canales tipo L sea un mediador. La entrada de Ca^{++} no tendría como blanco a la PKC y tampoco a la AC porque los efectos de la

TRH con cualquier activador de la vía del AMPc fueron aditivos. Un blanco potencial del Ca^{++} es la cinasa de proteínas dependiente de Ca^{++} /calmodulina. Con base en que el TPA reguló negativamente la actividad de la PPII y que su efecto no fue aditivo con el del Bay K o de la TRH, la entrada de Ca^{++} (inducida por la TRH) y la activación de una PKC (por otro mensajero extracelular) tendrían un mismo blanco distal que lleve a disminuir la actividad de la enzima. 2) La activación del R-TRH pudiera involucrar activación de una cPKC o nPKC (resistente a la inhibición y a desaparecer, discutido anteriormente), para la cual una de sus funciones sería fosforilar los canales de Ca^{++} , modificando así su permeabilidad. En este caso también un blanco potencial del incremento de Ca^{++} intracelular sería la cinasa dependiente de Ca^{++} /calmodulina. Otra posibilidad es que la PKC no tenga como blanco los canales de Ca^{++} pero más bien que la PKC sea activada por la entrada de Ca^{++} .

Al estudiar el papel de hormonas hipofisiotróficas acopladas a la vía del AMPc, observamos que el PACAP, la SRIF y la bromocriptina, pero no el VIP regulan la actividad de la PPII. Los receptores del PACAP y del VIP están acoplados a la proteína $G_{\alpha s}$ en lactótopos, pertenecen a la misma familia que se ha dividido en tres subgrupos de los cuáles el tipo I es más afín al PACAP que al VIP (Rawlings y Hezareh, 1996), por lo que es posible que este receptor esté involucrado en el efecto del PACAP sobre la PPII. Sus efectos intracelulares están probablemente mediados por la activación de la PKA ya que la inhibición de esta cinasa bloqueó el efecto del PACAP.

Las acciones de la bromocriptina pueden estar mediadas por diferentes mecanismos sensibles a PTX. En lactótopos, el receptor D2 esta acoplado a una proteína $G_{\alpha i}$ que inhibe la actividad de la AC y por ende la acumulación intracelular del AMPc (Lamberts y MacLeod, 1990). Entonces, una disminución en los niveles del AMPc pudiera ser la responsable de la regulación de la PPII. Sin embargo, la preincubación con el dBAMPc (20 μ M, datos no mostrados) no revirtió el efecto de la bromocriptina; es probable que otros mecanismos estén implicados en las acciones de la bromocriptina. La activación del receptor D2 puede también inhibir la actividad de la PKC y la movilización de Ca^{++} intracelular: inhibe directamente la actividad de la

PLC basal o estimulada por la TRH (Caccavelli *et al.*, 1992). Otro mecanismo por el cual la DA disminuye la $[Ca^{++}]_i$ incluye una inhibición de los canales de Ca^{++} tipo L (Einhorn *et al.*, 1991; Israel *et al.*, 1987; Lledo *et al.*, 1990a, 1990b). Por lo tanto la inhibición de la PKC y/o un decremento en la $[Ca^{++}]_i$ podrían mediar los efectos de la bromocriptina, lo que es consistente con el papel previamente discutido de la PKC y de los canales de Ca^{++} . Los mecanismos que la SRIF utiliza para regular a la PPII pudieran ser semejantes a los de la DA porque varias de las acciones descritas para la DA también operan para la SRIF en el lactótopo: sus receptores están acopladas negativamente a la AC y a canales de Ca^{++} y acoplados positivamente a canales de potasio, a través de proteínas G sensibles a PTX (Patel *et al.*, 1995; Reisine *et al.*, 1995).

Los efectos de la TRH o de otros factores hipotalámicos sobre la actividad de la enzima sólo son observados varias horas después del tratamiento inicial, lo que sugiere un mecanismo de regulación a nivel de la biosíntesis de la PPII. Consistente con esta hipótesis, una disminución en el nivel del ARNm de la PPII precede a aquella de la actividad de la PPII. Entonces en nuestras condiciones experimentales, se estaría afectando la V_{max} de la enzima y no su K_m .

La regulación de los receptores acoplados a proteínas G consta en general de dos fases. La primera consiste en una rápida desensibilización: la interacción hormona-receptor induce fosforilación del receptor (modificación que disminuye la afinidad del receptor por el ligando), internalización y subsecuente degradación del mismo. En esta fase inicialmente disminuye el número de receptores sobre la membrana plasmática pero en minutos cierta cantidad es reciclada a la membrana plasmática. La segunda fase consta de una inhibición de la síntesis de los receptores, que aunado a su degradación, disminuye la concentración de éstos en la superficie celular. En respuesta al TPA un mecanismo similar de regulación se ha descrito para la endopeptidasa 24.11 e inclusive para la PPII (Erdos *et al.*, 1989; Suen y Wilk, 1990; 1991; Werb y Clark, 1989). En neutrófilos, el TPA induce endocitosis de la endopeptidasa 24.11 en 5 minutos con subsecuente pérdida de su actividad, mecanismos que son mediados aparentemente por la fosforilación e inactivación

proteolítica de la enzima respectivamente (Erdos *et al.*, 1988). Además en fibroblastos y líneas celulares epiteliales, el TPA disminuye la cantidad de la peptidasa y el nivel de su ARNm (Werb y Clark, 1989). En células de retinoblastoma, el TPA regula a la PPII de una manera bifásica. Inicialmente induce una disminución en la actividad de la PPII del 90% en 15 minutos la cual regresa al 70% del control en 1 h (primera fase) para caer nuevamente, con una inhibición máxima del 85% en 7 h (segunda fase); también se ha sugerido que estos mecanismos son mediados por la fosforilación (primera fase) y la inhibición de la síntesis de la PPII [segunda fase] (Suen y Wilk, 1990; 1991). Recientemente hemos observado que la TRH, el TPA, la melitina o el AA disminuyen (20-60%, dependiendo del fármaco) la actividad de la PPII en 5-20 minutos (Charli *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, observaciones no publicadas). Es entonces factible que este mecanismo de regulación (endocitosis, degradación y disminución en el nivel del ARNm de las péptidasas) opere para diversas ectoenzimas.

Las cinéticas de regulación de la actividad y del nivel del ARNm de la PPII por la TRH son similares a las cinéticas de regulación del número de R-TRH (Hinkle y Tashjian, 1975) y del nivel de su ARNm (Fujimoto *et al.*, 1992). La TRH disminuye el número de sus receptores (70-80%) en la membrana plasmática en 10-15 minutos (Hinkle y Kinsella, 1982; Petrou y Tashjian, 1995). La disminución máxima de los ARNm (R-TRH y PPII) ocurre después de 6 h de tratamiento con la TRH y ésta precede a la disminución del número de receptores y de la actividad de la enzima (máximas inhibiciones ocurren a las 24 y 16 h respectivamente). Las vías intracelulares involucradas en regular la actividad de la PPII también son similares a las que modulan los niveles del ARNm del R-TRH. Se ha reportado que el decremento en el ARNm del R-TRH inducido por la TRH está mediado a través de la activación de la PKC y por un aumento en la $[Ca^{++}]$; (Fujimoto *et al.*, 1991; Yang y Tashjian, 1993b). Algunos compuestos que incrementan los niveles intracelulares del AMPc también disminuyen los niveles del ARNm del R-TRH y sus efectos no son aditivos con los del VIP; pero los efectos de éste son aditivos con los del TPA o la TRH (Fujimoto y Gershengorn, 1991). Esto sugiere que el R-TRH es regulado por dos vías independientes, PKC/ Ca^{++} y AMPc, pero que la TRH no activa a esta última. Ya que

existe similitud en las vías de transducción y las cinéticas para regular al R-TRH y a la PPII, es posible que ambos sean regulados a través de mecanismos semejantes (endocitosis, degradación y disminución en el nivel del ARNm), los cuales pudieran utilizar las mismas vías de transducción para su regulación.

En este trabajo hemos demostrado que diversas hormonas hipotalámicas (en adición a las hormonas tiroideas y los estrógenos) que coordinadamente controlan la secreción de PRL también regulan la actividad de la PPII a través de múltiples mensajeros intracelulares. Datos obtenidos recientemente en el laboratorio y otros reportados en la literatura sugieren que los eventos que hemos observado no son excepcionales, es decir se puede observar regulación de la actividad de varias ectopeptidasas en distintas circunstancias. La actividad de la PPII se incrementa en diferentes regiones del cerebro de rata, en la etapa II del desarrollo del "kindling" amigdaloides [un modelo experimental de epilepsia] (de Gortari *et al.*, 1995) o bien en respuesta a una sola inyección de etanol (Rodríguez *et al.*, resultados no publicados). Por otro lado, se ha observado que la administración del neuroleptico haloperidol (antagonista de receptores dopaminérgicos) puede modular las actividades de ciertas ectopeptidasas en diferentes regiones del cerebro. *In vivo* por ejemplo, el tratamiento con haloperidol disminuye la actividad de la aminopeptidasa N (EC 3.4.11.7) y de la endopeptidasa 24.11 en la corteza frontal y en el caudo-putamen mientras que la apomorfina (agonista de receptores dopaminérgicos) incrementa la actividad de estas dos peptidasas en el caudo-putamen y aumenta y disminuye la actividad de la aminopeptidasa N y de la endopeptidasa 24.11 en la corteza frontal respectivamente (Waters *et al.*, 1996).

A consecuencia de la inhibición *in vivo* de las ectopeptidasas no sólo se protege a los péptidos de la degradación. La inyección intracerebroventricular de inhibidores específicos de la endopeptidasa 24.11 es capaz de inducir efectos analgésicos semejantes a los opioides debido a la protección de las encefalinas endógenas de la degradación enzimática; la coinyección de inhibidores y de encefalinas exógenas resulta en una potenciación del efecto analgésico de las encefalinas en ratas (Fournie-Zalowski *et al.*, 1983; Roques *et al.*, 1980). De manera

similar, la administración de inhibidores de la endopeptidasa 24.15 y de la aminopeptidasa N potencia el efecto del péptido endógeno nociceptina/orfanina sobre la actividad motora (Noble y Roques, 1997). Así mismo, la inhibición específica de la endopeptidasa 24.11 modifica la respuesta peptidérgica en el sistema inmune: los inhibidores de la endopeptidasa 24.11 reducen la concentración mínima requerida de las encefalinas para activar a leucocitos polimorfonucleares humanos *in vitro* (Shipp *et al.*, 1990). La inhibición de la endopeptidasa también resulta en una diferenciación tardía de los timocitos *in vitro* y en una inhibición de la diferenciación de los linfocitos T *in vivo* (Guerin y Auberger, 1997). Se ha postulado que *in vivo*, los efectos antiinflamatorios de la interleucina 4 son mediados indirectamente; induce la expresión de la aminopeptidasa N y por lo tanto, disminuye la concentración de mediadores inflamatorios peptidérgicos (van Hal *et al.*, 1994). Por otro lado se ha reportado que en humanos, el tratamiento con inhibidores de la endopeptidasa 24.11 induce un incremento de los niveles endógenos de otro sustrato natural de esta ectopeptidasa, el péptido natriurético atrial (ANP: hormona natriurética, diurética y vasorelajante) en sangre; así como diuresis y natriuresis (Roques y Beaumont, 1990). Además este tratamiento incrementa la respuesta natriurética del ANP exógeno (Richards *et al.*, 1991). Las ectopeptidasas pudieran entonces modular la acción biológica de los péptidos en diferentes sistemas de comunicación celular: el nervioso, el inmune y el endócrino.

Los resultados presentados aquí sugieren que la eficiencia del sistema de eliminación de la TRH en la adenohipófisis puede ser regulada de una manera precisa en coordinación con otras respuestas celulares. Estas regulaciones posiblemente signifiquen que la PPII no sólo es responsable de degradar a la TRH en la proximidad de los lactótrofos sino que también contribuye a regular la liberación de la PRL al modular la eficiencia de la comunicación TRH-érgica. Tres diferentes contextos pudieran ejemplificar esto. 1) *In vivo*, la TRH es liberada del hipotálamo de una manera pulsátil, con pulsos de duración limitada. Hemos demostrado que la incubación de las células con la TRH por tiempos cortos (15-30 min) es suficiente para regular la actividad de la PPII a largo plazo y con la misma eficacia que la

obtenida cuando las células son incubadas con TRH durante 16 h, sugiriendo que basta un tiempo corto de interacción TRH/R-TRH, para que el efecto de la TRH sea transducido. Esto es compatible con que la respuesta a la TRH se desensibiliza y se pierden receptores en la superficie celular si se prolonga la incubación con la TRH. Esto podría significar que un pulso de TRH es capaz de definir la vida media de un pulso futuro de TRH a proximidad del lactótopo. Este mecanismo pudiera operar en el ciclo estral. 2) In vivo, la secreción de PRL está regulada negativamente por la DA (Lamberts y MacLeod, 1990). La PPII puede ser un elemento adicional que la DA utiliza para modular la liberación de PRL puesto que reguló positivamente la actividad de la PPII y bloqueó el efecto de la TRH sobre la PPII, con lo cual se estaría disminuyendo la eficiencia de la TRH. Por lo tanto cuando se mantiene el tono dopaminérgico un elevado nivel de PPII limitaría la eficiencia de pulsos de TRH, que pudiera contribuir a la baja secreción de PRL. 3) Las hormonas tiroideas y los estrógenos regulan negativa y positivamente el número de receptores de la TRH sobre la membrana plasmática respectivamente (de Lean *et al.*, 1977; Gershengorn *et al.*, 1979; Perrone y Hinkle, 1978). En ratas tratadas con estrógenos se ha observado que cuando disminuyen los niveles de hormonas tiroideas la liberación de la PRL inducida por la TRH aumenta, debido posiblemente a un incremento en los niveles del R-TRH. En esta misma condición la actividad de la PPII disminuye, con lo cual se estaría aumentando la eficiencia de la TRH. Sin embargo queda por probar experimentalmente la hipótesis de que la regulación de la PPII juega un papel fisiológico sobre la eficiencia de la comunicación TRHérgica.

En conclusión es posible que la modulación de la inactivación de neuropéptidos mediada por ectoenzimas represente un nivel adicional de regulación de la transmisión peptidérgica.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En conclusión, hemos mostrado que la activación del receptor de la TRH induce una disminución en la actividad de la PPII y que un tiempo breve (15 min) de interacción TRH/R-TRH es suficiente para desencadenar respuestas celulares a largo plazo. Además el R-TRH parece estar acoplado a la familia de proteínas $G\alpha_q$ y no a proteínas G sensibles a la PTX o la CTX para regular la actividad de la PPII. Los efectos de la TRH están probablemente mediados por una entrada de Ca^{++} a través de los canales tipo L posterior a la activación de la PLC. Por otro lado, observamos que un incremento en los niveles intracelulares del AMPc disminuye la actividad de la enzima, pero que la activación del R-TRH no modula esta vía y que no existe comunicación cruzada entre las vías de la PLC y del AMPc para regular a la PPII. La PPII también es regulada heterológicamente por otros factores hipotalámicos. El PACAP, posiblemente vía activación de la PKA, regula negativamente la actividad de la PPII. La bromocriptina o la SRIF inducen un incremento en la actividad de la PPII y bloquean el efecto de la TRH, a través de proteínas G sensibles a la PTX. La regulación de la PPII puede estar mediada, al menos parcialmente, a nivel del ARNm.

Si bien, el conjunto de los datos reportados en la literatura y en esta tesis apoyan la hipótesis de que la modulación (positiva o negativa) de ectopeptidasas, pudiera ser un nuevo nivel de regulación de la comunicación intercelular, queda por determinar cual es el impacto real in vivo de la regulación de la PPII sobre la vida media de la TRH a proximidad del lactótropo y sobre las respuestas celulares al péptido. Para estudiar esto proponemos que se analice la respuesta biológica de la TRH después de alterar a la PPII, ya sea inhibiendo específicamente su actividad o modificando su expresión negativa o positivamente con la transfección del ARNm antisentido o del ADNc de la PPII respectivamente. Por otro lado, debido a que la PPII es una enzima específica para la TRH, es posible contemplar en el futuro una manipulación farmacológica de la enzima, aprovechando los conocimientos sobre su regulación, con el propósito de controlar desórdenes de las secreciones adenohipofisarias debidos a alteraciones de la secreción de la TRH en sangre portal.

REFERENCIAS

Aizawa T, Greer MA 1981 Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 109:1731-1738.

Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Suzuki K 1990 Possible role of Ca²⁺-independent isozyme, nPKC ϵ , in thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: differential down-regulation of nPKC ϵ in GH₄C₁ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 172:184-189.

Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Konno Y, Saido TC, Mizuno K, Chida K, Osada S, Kuroki T, Kawashima S, Suzuki K 1994 Overproduction of a Ca²⁺-independent protein kinase C isozyme, nPKC ϵ , increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH₄C₁ cells. *J Biol Chem* 269:4653-4660.

Albert PR, Tashjian JrAH 1984 Thyrotropin-releasing hormone-induced spike and plateau in cytosolic free Ca²⁺ concentrations in pituitary cells. *J Biol Chem* 259:5827-5832.

Anderson L, Alexander CL, Faccenda E, Eidne KA 1995 Rapid desensitization of the thyrotropin-releasing hormone receptor expressed in single human embryonal kidney 293 cells. *Biochem J* 311:385-392.

Aragay AM, Katz A, Simon MI 1992 The G α_q and G α_{11} proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH₃ rat pituitary cells. *J Biol Chem* 267:24983-24988.

Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H 1983 Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 37:225-228.

Ase K, Berry M, Kikkawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y 1988 Differential down-regulation of protein kinase C subspecies in KM3 cells. *FEBS Lett* 236:396-400.

Ashworth R, Yu R, Nelson EJ, Darmer S, Gershengorn MC, Hinkle PM 1995 Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:512-516.

Audinot V, Rasolonjanahary R, Bertrand P, Priam M, Kordon C, Enjalbert A 1991 Involvement of protein kinase-C in the effect of angiotensin-II on adenosine 3',5'-monophosphate production in lactotroph cells. *Endocrinology* 129:2231-2239.

- Bauer K** 1987 Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 330:375-377.
- Bauer K** 1988 Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane bound TRH degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 70:69-74.
- Bauer K** 1994 Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem* 224:387-396.
- Bauer K** 1995 Inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH). The TRH-degrading enzyme as a regulator and/or terminator of TRH-signals? In: O'Cuinn G (ed) *Metabolism of brain peptides*. CRC Press, Boca Raton, pp 201-213.
- Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Deneef C** 1990 Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures on neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 127:1224-1233.
- Bean BP** 1984 Nitrendipine block of cardiac calcium channels: high-affinity binding to the inactivated state. *Proc Natl Acad Sci* 81:6388-6392.
- Ben-Jonathan N** 1985 Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev* 6:564-589.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW** 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639-669.
- Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL, Hoefler MT** 1980 Dopamine in hypophyseal portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* 106:690-696.
- Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC** 1977 dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 100:452-458.
- Birnbaumer L** 1990 G proteins in signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30:675-705.
- Bleasdale JE, Thakur NR, Gremban RS, Bundy GL, Fitzpatrick FA, Smith RJ, Bunting S** 1990 Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther* 255:756-768.

Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV 1969 The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun* 37:705-710.

Brownstein MJ, Eskay RL, Palkovitz M 1982 Thyrotropin-releasing hormone in the median eminence is in processes of paraventricular nucleus neurons. *Neuropeptides* 2:197-201.

Brownstein MJ, Palkovitz M, Saavedra JM, Bassiri RM, Utiger RD 1974 Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science* 185:267-269.

Bunning P, Holmquist B, Riordan JF 1978 Functional residues at the active site of angiotensin converting enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 83:1442-1449.

Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Vale W, Guillemin R 1969 Derivés polypeptidiques de synthèses doués d'activité hypophysiotropique TRF. Nouvelles observations. *C R Acad Sci (Paris)* 269:1870-1873.

Caccavelli L, Cussac D, Pellegrini I, Audinot V, Jaquet P, Enjalbert A 1992 D₂ dopaminergic receptors: normal and abnormal transduction mechanisms. *Horm Res* 38:78-83.

Casey PJ, Graziano MP, Gilman AG 1989 G protein $\beta\gamma$ subunits from bovine brain and retina: equivalent catalytic support of ADP-ribosylation of α subunit by pertussis toxin but differential interactions with G_{s α} . *Biochemistry* 28:611-616.

Charli JL, Baeza MA, Uriostegui B, Joseph-Bravo P 1996 Rapid down regulation of adenohipophyseal pyroglutamyl peptidase II activity by arachidonic acid. 10TH International Congress of Endocrinology. San Francisco, USA. June 12-15. Abstract P1-1054.

Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P 1988 The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 13:273-242.

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

Charli JL, Ponce G, McKelvy JF, Joseph-Bravo P 1984 Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J Neurochem* 42:981-986.

Cheng K, Chan WW, Arias R, Barreto JrA, Butler B 1992 PMA-sensitive protein kinase C is not necessary in TRH-stimulated prolactin release from female rat

primary pituitary cells. *Life Sci* 51:1957-1967.

Cheung AH, Huang RR, Strader CD 1992 Involvement of specific hydrophobic, but not hydrophilic, aminoacids in the third intracellular loop of the beta-adrenergic receptor in the activation of Gs. *Mol Pharmacol* 41:1061-1065.

Clapham DE, Neer EJ 1993 New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimer in transmembrane signalling. *Nature* 365:403-406.

Cocchi D, Gil-Ad I, Parenti M, Stefanini E, Locatelli V, Muller E 1980 Prolactin releasing effect of a novel anti-dopaminergic drug, domperidone, in the rat. *Neuroendocrinology* 30:65-69.

Conklin BR, Bourne HR 1993 Structural elements of $G\alpha$ subunits that interact with $G\beta\gamma$, receptors, and effectors. *Cell* 73:631-641.

Cooper DMF, Mons N, Karpen JW 1995 Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374:421-424.

Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI 1978 Dopamine and dihydroergocryptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. *Endocrinology* 103:302-309.

Cruz C, Charli JL, Vargas MA, Joseph-Bravo P 1991 Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem* 56:1594-1601.

Csuhai E, Little SS, Hersh LB 1995 Inactivation of neuropeptides. In: Nyberg F, Sharma HS, Wiesenfeld-Hallin Z (eds) *Progress in Brain Research*. Elsevier Science BV, vol 104:131-142.

Cui ZJ, Gorelick FS, Dannies PS 1994 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II activation in rat pituitary cells in the presence of thyrotropin-releasing hormone and dopamine. *Endocrinology* 134:2245-2250.

Czekay G, Bauer K 1993 Identification of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme as metallopeptidase. *Biochem J* 290:921-926.

Dahl GE, Evans NP, Thrun LA, Karsch F 1994 A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 135:2392-2397.

de Gortari P, Fernández-Guardiola A, Martínez A, Cisneros M, Joseph-Bravo P 1995 Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II,

during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res* 679:144-150.

de Greef WJ, Klootwijk, Karels B, Visser TJ 1985 Levels of dopamine and TRH in hypophyseal stalk blood during an oestrogen-stimulated surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J Endocrinol* 105:107-112.

de Greef WJ, Plotsky PM, Neill JD 1981 Dopamine levels in hypophyseal stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of stimulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 32:229-233.

de Greef WJ, Visser TJ 1981 Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocrinol* 91:213-223.

de Greef WJ, Voogt JL, Visser TJ, Lamberts SWJ, Van der Schoot P 1987 Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology* 121:316-322.

de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F 1992a Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284:891-899.

de la Peña P, Delgado LM, del Camino D, Barros F 1992b Two isoforms of the TRH receptor generated by alternative splicing have indistinguishable function properties. *J Biol Chem* 267:25703-25708.

de Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA, Labrie F 1977 Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* 100:1496-1504.

Dixon RAF, Sigal IS, Rands E, Register RB, Candelore MR, Blake AD, Strader CD 1987 Ligand binding to β -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* 326:73-77.

Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ 1987 A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26:2657-2664.

Downey GP, Chan CK, Lea P, Takai A, Grinstein S 1992 Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. *J Cell Biol* 116:695-706.

Drust DS, Martin TFJ 1984 Thyrotropin-releasing hormone rapidly activates protein phosphorylation in GH₃ pituitary cells by a lipid-linked, protein kinase C-mediated pathway. *J Biol Chem* 259:14520-14530.

Duerson K, Carroll R, Clapham D 1993 α -helical distorting substitutions disrupt coupling between m3 muscarinic receptor and G proteins. *FEBS Lett* 324:103-108.

Dufy B, Jaken S, Barker J 1987 Intracellular Ca^{2+} -dependent protein kinase C activation mimics delayed effects of thyrotropin-releasing hormone on clonal pituitary cell excitability. *Endocrinology* 121:793-802.

Dumont JE, Lamy F 1980 The regulation of thyroid cell metabolism, function growth and differentiation. In: De Visscher M (ed) *The thyroid gland*. Raven Press, New York, pp 153-167.

Duthie SM, Taylor PL, Anderson L, Cook J, Eidne KA 1993 Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor. *Mol Cell Endocrinol* 95:R11-R15.

Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paull WD, Kaplan MM, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM 1988. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 123:2291-2297.

Einhorn LC, Gregerson KA, Oxford GS 1991 D_2 dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotroph: whole-cell and single-channel recording. *J Neurosci* 11:3727-3737.

Eipper BA, Myers AC, Mains RE 1985 Peptidylglycine α -amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology* 116:2497-12305.

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G 1990 Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 15:31-36.

Enjalbert A, Bockaert J 1983 Pharmacological characterization of the D_2 dopaminergic receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol Pharmacol* 23:576-584.

Enjalbert A, Guillon G, Movillac B, Audinot V, Rasolonjanahary R, Kordon C, Bockaert J 1990 Dual mechanism of inhibition by dopamine of basal and TRH stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J Biol Chem* 265:18816-18822.

Enjalbert A, Sladeczck F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Sainz A, Jards S, Lombard C, Kordon C, Bockaert J 1986 Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions

in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion. *J Biol Chem* 261:4071-4075.

Enyeart JJ, Hinkle PM 1984 The calcium agonist Bay K 8644 stimulates secretion from a pituitary cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 122:991-996.

Enyeart JJ, Sheu SS, Hinkle PM 1987 Dihydropyridine modulators of voltage-sensitive Ca^{2+} channels specifically regulate prolactin production by GH_4C_1 pituitary tumor cells. *J Biol Chem* 262:3154-3159.

Erdos EG, Wagner B, Harbury CB, Painter RG, Skidgel RA, Fa XG 1989 Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 enkephalinase in human neutrophils. *J Biol Chem* 264:14591-14523.

Falck-Pedersen E, Heinflink M, Alvira M, Nussenzveig DR, Gershengorn 1994 Expression of thyrotropin-releasing hormone receptors by adenovirus-mediate gene transfer reveals that thyrotropin-releasing hormone desensitization is cell specific. *Mol Pharmacol* 45:684-689.

Fink G, Koch Y, Ben Aroya N 1982 Release of thyrotropin releasing hormone into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res* 243:186-189.

Fisher WH, Spiess J 1987 Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3628-3632.

Fishman PH 1990 Mechanism of action of cholera toxin. In: Moss J, Vaughan M (eds) ADP-ribosylating toxins and G proteins. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 127-140.

Fournie-Zalauksi MC, Chaillet P, Soroca-Lucas E, Marcais-Collado H, Costentin J, Roques BP 1983 New carboxyalkyl inhibitors of brain enkephalinase: synthesis, biological activity, and analgesic properties. *J Med Chem* 26:60-65.

Friedman TC, Loh YP, Cawley NX, Birch NP, Huang SS, Jackson IMD, Nilini EA 1995 Processing of prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes. *Endocrinology* 136:4462-4472.

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

Fujimoto J, Gershengorn MC 1991 Evidence for dual regulation by protein kinase A and C of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA in GH₃ cells. *Endocrinology* 129:3430-3432.

Fujimoto J, Straub RE, Gershengorn MC 1991 Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and phorbol myristate acetate decrease TRH receptor messenger RNA in rat pituitary GH₃ cells: evidence that protein kinase-C mediates the TRH effect. *Mol Endocrinol* 5:1527-1532.

Garat B, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P 1985 Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino peptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6:27-40.

Gautvik KM, Gordeladze JO, Jahnsen T, Haugh E, Hansson V, Lystad E 1983 Thyroliberin receptor binding and adenylyl cyclase activation in cultured prolactin-producing rat pituitary tumor cells (GH cells). *J Biol Chem* 258:10304-10311.

Gershengorn MC 1978 Bihormonal regulation of the thyrotropin-releasing hormone receptor in mouse pituitary thyrotropic tumor cells in culture. *J Clin Invest* 62:937-943.

Gershengorn MC 1986 Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 48:515-526.

Gershengorn MC, Geras E, Spina Purrello V, Rebecchi MJ 1984 Inositol triphosphate mediates thyrotropin-releasing hormone mobilization of nonmitochondrial calcium in rat mammatropic pituitary cells. *J Biol Chem* 259:10675-10681.

Gershengorn MC, Marcus-Samuels BE, Geras E 1979 Estrogens increase the number of thyrotropin-releasing hormone receptors on mammatropic cells in culture. *Endocrinology* 105:171-176.

Gershengorn MC, Thaw C 1985 Thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulates biphasic elevation of cytoplasmic free calcium in GH₃ cells. Further evidence that TRH mobilizes cellular and extracellular Ca²⁺. *Endocrinology* 116:591-596.

Giannattasio G, De Ferrari ME, Spada A, 1981 Dopamine-inhibited adenylate cyclase in female rat adenohypophysis. *Life Sci* 28:1609-1611.

Gibbs DM, Neill JD 1978 Dopamine levels in hypophysial stalk blood are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology* 102:1895-1900.

Gollasch M, Kleuss C, Hescheler J, Wittig B, Schultz G 1993 G_{i2} and protein

kinase C are required for thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels in rat pituitary GH_3 cells. *Proc Natl Acad Sci* 90:6265-6269.

Gourdji D, Bataille D, Vandin N, Grouselle D, Rosselin G, Tixier-Vidal A 1979 VIP stimulates PRL release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH_3/B_6). Additive effects of VIP and TRH on PRL release. *FEBS Lett* 104:165-168.

Gourdji D, Tixier-Vidal A, Morin A, Pradelles P, Morgat JL, Fromageot P, Kerdelhue B 1973 Binding of a tritiated thyrotropin-releasing factor to a prolactin secreting clonal cell line (GH_3). *Exp Cell Res* 82:39-46.

Gschwendt M, Leibersperger H, Marks F 1989 Differentiative action of K252a on protein kinase C and a calcium-unresponsive, phorbol ester/phospholipid-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 164:974-982.

Guerin S, Auberger P 1997 Regulation of thymic development by neprilysin inhibition. *Adv Exp Med Biol* 421:93-99.

Guillemin R 1978 Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Sciences* 202:390-402.

Haisenleder DJ, Gala RR, Lawson DM 1991 The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in female rats during the estrous cycle. *Life Sci* 48:1911-1916.

Haisenleder DJ, Moy JA, Gala RR, Lawson DM 1986a The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in pregnant rats. *Endocrinology* 119:1980-1988.

Haisenleder DJ, Moy JA, Gala RR, Lawson DM 1986b The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in ovariectomized rats treated with estradiol and/or progesterone. *Endocrinology* 119:1996-2003.

Halász B, Florsheim WH, Corcorran NL, Gorski RA 1967 Thyrotropic hormone secretion in rats after partial or total interruption of neuronal afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 80:1075-1082.

Hannun YA, Loomis CR, Merrill AH, Bell RM 1986 Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets. *J Biol Chem* 261:12604-12609.

- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz JF** 1990 Turning off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* 4:2881-2889.
- Hefco E, Krulich L, Illner P, Larsen PR** 1975a Effect of acute exposure to cold on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology* 97:1185-1195.
- Hefco E, Krulich L, Aschenbrenner JE** 1975b Effect of hypothalamic deafferentation on the secretion of thyrotropin during thyroid blockade and exposure to cold in the rat. *Endocrinology* 97:1234-1240.
- Helene A, Beaumont A, Roques BP** 1991 Functional residues at the active site of aminopeptidase N. *Eur J Biochem* 196:385-93.
- Hernández ME, Clapp C, Torner L, Martínez de la Escalera G** 1994 Dopamine-escape potentiation of prolactin release may involve the activation of calcium channels by protein kinase A and C. *Endocrine* 2:779-786.
- Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S, Sasaki Y** 1984 Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinases and protein kinase C. *Biochemistry* 23:5036-5041.
- Hinkle PM** 1989 Pituitary TRH receptors. *Ann NY Acad Sci* 553:176-187.
- Hinkle PM, Kinsella PA** 1982 Rapid temperature dependent transformation of the thyrotropin-releasing hormone receptor complex in rat pituitary tumor cells. *J Biol Chem* 257:5462-5470.
- Hinkle PM, Tashjian AH** 1973 Receptor for thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem* 248:6180-6186.
- Hinkle PM, Tashjian JrAH** 1975 thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH₃ strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 14:3845-3851.
- Hinkle PM, Woroch EL, Tashjian JrAH** 1974 Receptor binding affinities and biological activities of analogs of thyrotropin-releasing hormone in prolactin producing pituitary cells in culture. *J Biol Chem* 249:3085-3090.
- Hooper NM** 1994 Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* 354:1-6.
- Horn AM, Fraser HM, Fink G** 1985 Effects of antiserum to thyrotrophin-releasing hormone on the concentrations of plasma prolactin, thyrotrophin and LH in the pro-oestrous rat. *J Endocrinol* 104:205-209.

Horsthemke B, Leblanc P, Kordon C, Wattiaux-de Coninck S, Wattiaux R, Bauer K 1984 Subcellular distribution of particle-bound neutral peptidase capable of hydrolyzing gonadoliberin, thyroliberin, enkephalin and substance P. *Eur J Biochem* 139:315-320.

Hsieh KP, Martin TFJ 1992 Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins G_q and G_{11} . *Mol Endocrinol* 6:1673-1681.

Huang KP 1989 The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci Sci* 12:425-432.

Iriuchijima T, Mori M 1989 Regional dissociation of cyclic AMP and inositol phosphate formation in response to thyrotropin-releasing hormone in the rat brain. *J Neurochem* 52:1944-1946.

Ishikawa K, Kakegawa T, Suzuki M 1984 Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in the secretion of thyrotropin under adrenergic and cold-stimulated conditions in the rat. *Endocrinology* 114:352-358.

Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K, Suzuki M 1988 Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology* 47:384-388.

Ison AJ, Johnson MS, MacEwan DJ, Simpson J, Clegg RA, Connor K, Mitchell R 1993a Biochemical characterisation of an apparently novel isoform of protein kinase C in pituitary. *Biochem Soc Trans* 21:386S

Ison AJ, MacEwan DJ, Johnson MS, Clegg RA, Connor K, Mitchell R 1993b Evidence for a distinct H7-resistant form of protein kinase C in rat anterior pituitary gland. *FEBS Lett* 329:199-204.

Ison AJ, Simpson J, Lutz EM, Clegg RA, Connor K, Mitchell R 1995 A novel high molecular weight form of protein kinase C in anterior pituitary. *Biochem Soc Trans* 23:146S.

Israel JM, Kirk C, Vincent JD 1987 Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophyseal cells in lactotroph-enriched primary cultures. *J Physiol Lond* 390:1-22.

Jackson IMD, Wu P, Lechan RM 1985 Immunohistochemical localization in the rat brain of the precursor for thyrotropin-releasing hormone. *Science* 229:1097-1099.

- Jefferson AB, Travis SM, Schulman H** 1991 Activation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in GH₃ cells. *J Biol Chem* 266:1484-1490.
- Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA** 1994 U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* 642:237-243.
- Jobin M, Ferland L, Cote J, Labrie F** 1975 Effect of exposure to cold on hypothalamic TRH activity and plasma levels of TSH and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology* 18:204-212.
- Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, Kordon C** 1979 Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104:801-806.
- Joseph-Bravo P, Fresán ME, Cisneros M, Vargas MA, Charli JL** 1994 Pyroglutamyl peptidase II activity is not in the processes of bulbospinal TRHergic neurons. *Neurosci Lett* 178:243-246.
- Judd AM, Koike K, MacLeod RM** 1986 A possible role of arachidonate metabolism in the mechanism of prolactin release. *Am J Physiol* 250(Pt 1):E288-295.
- Judd AM, Spangelo BL, Ehreth JT, MacLeod RM** 1988 A possible role for lipoxygenase and epoxygenase arachidonate metabolites in prolactin release from pituitary cells. *Neuroendocrinology* 48:407-416.
- Junier MP, Israel JM, Dray F, Vincent JD** 1990 Contribution of arachidonate metabolites to basal and thyrotropin releasing-hormone-stimulated release of prolactin from purified lactotrophs in primary culture. *Life Sci* 47:1829-1836.
- Kanda Y, Koike K, Ohmichi M, Sawada T, Hirota K, Miyake A** 1994 A possible involvement of tyrosine kinase in TRH-induced prolactin secretion in GH₃ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199:1447-1452.
- Kenny AJ, Turner AJ** 1987 What are ectoenzymes? In: Kenny AJ, Turner AJ (eds) *Mammalian Ectoenzymes*. Elsevier, Amsterdam, pp 169-210.
- Kiley SC, Parker PJ, Fabbros D, Jaken S** 1991 Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH₄C₁ cells. *J Biol Chem* 266:23761-23768.
- Kiley SC, Parker PJ, Fabbro D, Jake S** 1992 Hormone- and phorbol ester-activated protein kinase C isozymes mediate a reorganization of the actin cytoskeleton associated with prolactin secretion in GH₄C₁ cells. *Mol Endocrinol* 6:120-131.

Kim G-D, Carr IC, Anderson LA, Zabavnik J, Eidne KA, Milligan G 1994 The long isoform of the rat thyrotropin-releasing hormone receptor down-regulates G_q proteins. *J Biol Chem* 269:19933-19940.

Kimura N, Arai K, Sahara Y, Suzuki H, Kimura N 1994 Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells. *Endocrinology* 134:432-440.

Kiss Jz, Kanyicska B, Nagy GY 1986 The hypothalamic paraventricular nucleus has a pivotal role in regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* 119:870-873.

Koch Y, Goldhaber G, Fireman I, Zor U, Shani J, Tal E 1977 Suppression of prolactin and thyrotropin secretion in the rat by antiserum to thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 100:1476-1478.

Kolesnick RN, Gershengorn MC 1985 Direct evidence that burst but not sustained secretion of prolactin stimulated by thyrotropin-releasing hormone is dependent on elevation of cytoplasmic calcium. *J Biol Chem* 260:5217-5220.

Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT 1987 Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7329-7333.

Labrie F, Barden N, Poirier G, De Lean A 1972 Binding of thyrotropin-releasing hormone to plasma membrane of bovine anterior pituitary gland (hormone receptor-adenylate cyclase-equilibrium constant-(³H)thyrotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 69:283-287.

Labrie F, Pelletier G, Borgeat P, Drouin J, Louise F, Belanger A 1976 Mode of action of hypothalamic regulatory hormones in the adenohypophysis. In: Martin L, Ganong WF (eds) *Frontiers in Neuroendocrinology*. New York, Raven Press, Vol. 4:63-93.

Lamberts SWJ, MacLeod RM 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70:279-318.

Lee SL, Stewart K, Goodman RH 1988 Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 262:16604-16609.

Lee TW, Anderson LA, Eidne KA, Milligan G 1995 Comparison of the signalling properties of the long and short isoforms of the rat thyrotropin-releasing-hormone receptor following expression in Rat 1 fibroblasts. *Biochem J* 310:291-298.

- Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolf H, Cooperman S, Mandel G** 1986 Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Sciences* 231:159-161.
- Leong DA, Frawley LS, Neill JD** 1983 Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annu Rev Physiol* 45:109-127.
- Lewis DL, Goodman MB, St. John PA, Barker JL** 1988 Calcium currents and fura 2 signals in fluorescence-activated cells sorted lactotrophs and somatotrophs of rat anterior pituitary. *Endocrinology* 123:611-621.
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ** 1993 cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72:269-278.
- Lledo P, Legendre P, Israel J, Vincent J** 1990a Dopamine inhibits two characterized voltage-dependent calcium currents in identified rat lactotroph cells. *Endocrinology* 127:990-1001.
- Lledo P, Legendre P, Zhang J, Israel J, Vincent J** 1990b Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotroph cells. *Neuroendocrinology* 52:545-555.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR** 1991 Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266:17067-17071.
- MacLeod RM, Lehmeyer JE** 1974 Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology* 94:1077-1085.
- Marquardt B, Frith D, Stabel S** 1994 Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene* 9:3213-3218.
- Martin JB, Boshans R, Reichlin S** 1970 Feedback regulation of TSH secretion in rats with hypothalamus lesions. *Endocrinology* 87:1032-1040.
- Martin JB, Reichlin S** 1972 Plasma thyrotropin (TSH) response to hypothalamic electrical stimulation and to injection of synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 90:1079-1085.
- Martin MC, Weiner RI, Monroe SE, Roberts JM, Licko V, Jaffe RB** 1984 Prolactin-secreting adenomas in women. VII. Dopamine regulation of prolactin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 59:485-490.

Martin TFJ, Hsieh KP, Porter BW 1990 The sustained second phase of hormone-stimulated diacylglycerol accumulation does not activate protein kinase C in GH₃ cells. *J Biol Chem* 265:7623-7631.

Martínez de la Escalera G, Guthrie J, Weiner RI 1988 Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: Stimulation via Ca²⁺/protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* 47:38-193.

Martínez de la Escalera G, Martin TFJ, Weiner RI 1987 Phosphoinositide hydrolysis in response to the withdrawal of dopamine inhibition in enriched lactotrophs in culture. *Neuroendocrinology* 46:545-548.

Martínez de la Escalera G, Porter BW, Martin TFJ, Weiner RI 1989 Dopamine withdrawal and addition of thyrotropin-releasing hormone stimulate membrane translocation of protein kinase-C and phosphorylation of an endogenous 80K substrate in enriched lactotrophs. *Endocrinology* 125:1168-1173.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI 1988a Mechanism(s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 47:186-193.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI 1988b Effect of dopamine withdrawal on activation of adenylate cyclase and phospholipase C in enriched lactotrophs. *Endocrinology* 123:1682-1687.

Martínez de la Escalera G, Weiner RI 1990 Transient dopamine withdrawal differentially potentiates thyrotropin releasing hormone-induced release of prolactin of various ages. *Neuroendocrinology* 51:694-699.

Martínez de la Escalera G, Weiner R 1992 Hypothalamic regulation of microtubule-associated protein phosphorylation in lactotrophs. *Neuroendocrinology* 55:327-335.

Matre V, Karlsen HE, Wright MS, Lundell I, Fjeldheim AK, Gabrielsen OS, Larhammar D, Gautvik KM 1993 Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 195:179-185.

Mau SE, Saermark T, Vilhardt H 1994 Translocation of protein kinase C isoenzymes in lactotroph-enriched rat anterior pituitary cell cultures: differential effects of substance P and phorbol ester. *J Mol Endocrinol* 12:293-302.

Mau SE, Saermark T, Vilhardt H 1997 Cross-talk between cellular signaling pathways activated by substance P and vasoactive intestinal peptide in rat lactotroph-enriched pituitary cell cultures. *Endocrinology* 138:1704-1711.

McDonald JK, Barrett AJ 1986 Mammalian proteases: a glossary and bibliography. In: Exopeptidases, Academic Press, New York, vol 2:305-311.

Metcalf G, Jackson IMD 1989 Thyrotropin-releasing hormone: Biomedical significance. Ann NY Acad Sci vol 553.

Mori M, Yamada M 1987 Thyroid hormones regulate the amount of thyrotrophin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. J Endocr 114:443-448.

Mueller GP, Franco FS, Reichlin S, Jackson IMD 1977 Clin. Res. 25:298A

Murdoch GM, Franco R, Evans RM, Rosenfeld MG 1983 polypeptide hormone regulation of gene expression: thyrotropin-releasing hormone rapidly stimulates both transcription of the prolactin gene and the phosphorylation of a specific nuclear protein. J Biol Chem 258:15329-15335.

Neer EJ, Clapham DE 1988 Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. Nature 333:129-134.

Nelson EJ, Hinkle PM 1994 Thyrotropin-releasing hormone activates Ca^{2+} efflux. Evidence suggesting that plasma membrane Ca^{2+} pump is an effector for a G-protein-coupled Ca^{2+} -mobilizing receptor. J Biol Chem 269:30854-30860.

Newton AC 1997 Regulation of protein kinase C. Curr Opin Cell Biol 9:161-167.

Nilini EA, Sevarino KA, Jackson IMD 1993 Processing of proTRH to its intermediate products occurs before the packing into secretory granules of transfected AtT20 cells. Endocrinology 132:1271-1277.

Nilini EA, Friedman TC, Todd-RB, Birch NP, Loh YP, Jackson IM 1995 Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. J Neurochem 65:2462-2472.

Nishizuka Y 1992 Intracellular signaling by hidrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258:607-614.

Noble F, Roques BP 1997 Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiates behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. FEBS Lett 401:227-229.

Nussenzveig DR, Heinflink M, Gershengorn MC 1993 Decreased levels of internalized thyrotropin-releasing hormone receptors after uncoupling from guanine nucleotide-binding protein and phospholipase C. Mol Endocrinol 7:1105-1111.

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

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

O'Cuinn G, O'Connor B, Gilmartin L, Smyth M 1995 Neuropeptide inactivation by peptidases. In: O'Cuinn G (ed) *Metabolism of brain peptides*. CRC Press, Boca Raton, pp 99-157.

O'Dowd BF, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ, Bouvier M 1989 Palmitoylation of the human β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 264:7564-7569.

O'Dowd BF, Hnatowich M, Regan JW, Leader WM, Caron MG, Lefkowitz RJ 1988 Site-directed mutagenesis on the cytoplasmic domains of the human beta 2-adrenergic receptor. Localization of regions involved in G protein-receptor coupling. *J Biol Chem* 263:15985-15992.

Offermanns S, Schultz G, Rosenthal W 1989 Secretion-stimulating and secretion-inhibiting hormones stimulate high-affinity pertussis-toxin-sensitive GTPases in membranes of a pituitary cell line. *Eur J Biochem* 180:283-287.

Ohmichi M, Sawada T, Kanda Y, Koike K, Hirota K, Mykake A, Saltiel AR 1994 Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. *J Biol Chem* 269:3783-3788.

Oron Y, Straub RE, Traktman P, Gershengorn MC 1987 Decreased TRH receptor mRNA activity precedes homologous downregulation: assay in oocytes. *Sciences* 238:1406-1408.

Padmanabhan V, Kesner JS, Convey EM 1981 Effects of triiodothyronine and thyroxine on thyrotropin and prolactin secretion from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 108:226-231.

Palkovitz M, Eskay RL, Brownstein MJ 1982 The course of thyrotropin-releasing hormone fibers to the median eminence in rats. *Endocrinology* 110:1526-1528.

Passegue E, Richard JL, Boulla G, Gourdj D 1995 Multiple intracellular

signallings are involved in thyrotropin-releasing hormone (TRH)-induced c-fos and jun B mRNA levels in clonal prolactin cells. *Mol Cell Endocrinol* 107:29-40.

Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srink CB 1995 The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57:1249-1265.

Paulssen RH, Paulssen EJ, Gautvik KM, Gordeladze JO 1992 The thyroliberin receptor interacts directly with a stimulatory guanine-nucleotide-binding protein in the activation of adenylyl cyclase in GH₃ rat pituitary tumor cells. *Eur J Biochem* 204:413-418.

Peers B, Voz ML, Monget P, Mathy-Hartert M, Berwaer M, Belayew A, Martial JA 1990 Regulatory elements controlling pituitary-specific expression of the human prolactin gene. *Mol Cell Biol* 10:4690-4700.

Perlman JH, Gershengorn MC 1991 Thyrotropin-releasing hormone stimulation of phosphoinositide hydrolysis desensitizes. Evidence against mediation by protein kinase C or calcium. *Endocrinology* 129:2679-2686.

Perrone MH, Hinkle PM 1978 Regulation of pituitary receptors for thyrotropin-releasing hormone by thyroid hormones. *J Biol Chem* 253:5168-5173.

Petrou CP, Tashjian JrAH 1995 Evidence that thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand are recycled dissociated from each other. *Biochem J* 306:107-113.

Piomelli D 1993 Arachidonic acid in cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5:274-280.

Plotsky PM, Neill JD 1982 Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* 111:168-173.

Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P 1988 Tissue specificity regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48:211-213.

Rabier M, Chavis C, Crastes de Paulet A, Damon M 1987 Arachidonic acid metabolism in a cloned strain of rat pituitary tumor cells: correlation between 15 hydroxyeicosatetraenoic acid release and the prolactin secretory process. *Prostaglandins Leukot Med* 27:27-42.

Raymond JR, Hnatowich M, Caron MG, Lefkowitz RJ 1990 Structure-function relationships of G-protein-coupled receptors. In: Moss J, Vaughan M (eds) ADP-ribosylating toxins and G proteins. American Society for Microbiology, Washington,

D.C. pp 163-188.

Rawlings SR, Hezareh M 1996 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endoc Rev* 17:4-29.

Reisine T, Bell GI 1995 Molecular biology of somatostatin receptor. *Endocrine Rev* 16:427-442.

Richards AM, Wittert G, Espiner EA, Yandle TG, Frampton C, Ikram H 1991 EC 24.11 inhibition in man alters clearance of atrial natriuretic peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 72:1317-1322.

Robberecht P, Deschodt-Lanckman M, Camus JC, De-Neef P, Lambert M, Christophe J 1979 VIP activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase. *FEBS Lett* 103:229-233.

Rodriguez R, Imai A, Gershengorn MC 1987 Phosphatidylinositol depletion in GH₃ rat pituitary cells inhibits sustained responses to thyrotropin-releasing hormone. Reversal with myo-inositol. *Mol Endocrinol* 1:802-807.

Roques BP, Fournié-Zaluski MC, Soroca E, Lecomte JM, Malfroy B, Llorens C, Schwartz JC 1980 The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288:286-288.

Roques BP, Beaumont A 1990 Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesic to antihypertensives? *Trends Pharmacol Sci* 11:245-249.

Ross PC, Judd AM, MacLeod RM 1988 The dynamics of arachidonate acid liberation and prolactin release: a comparison of thyrotropin-releasing hormone, angiotensin II, and neurotensin stimulation in perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 123:2445-2453.

Samson WK, Skala KD 1992 Comparison of the pituitary effects of the mammalian endothelins: vasoactive intestinal contractor (endothelin-beta, rat endothelin-2) is a potent inhibitor of prolactin secretion. *Endocrinology* 130:2964-2079.

Sánchez E, Charli JL, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P, Uribe RM 1997 Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNA in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res* 761:77-86.

Schalkwijk CG, van der Heijden MA, Bunt G, Maas R, Tertoolen LG, van Bergen en Henegouwen PM, Verkleij AJ, van den Bosch H, Boonstra J

1996 Maximal epidermal growth-factor-induced cytosolic phospholipase A2 activation in vivo requires phosphorylation followed by an increased intracellular calcium concentration. *Biochem J* 313(pt 1):91-96.

Schally AV 1978 Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Sciences* 202:18-28.

Schaner P, Todd RB, Seidah NG, Nillni EA 1997 Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J Biol Chem* 272:19958-19968.

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

Schoemaker H, Davis TP 1984 Differential in vitro metabolism of beta-endorphin in schizophrenia. *Peptides* 5:1049-1054.

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

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

Segerson TP, Hoefler H, Childers H, Wolfe HJ, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM 1987a Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 121:98-107.

Segerson TP, Kauer J, Wolfe H, Mobitker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM 1987b Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238:78-80.

Sellar RE, Taylor PL, Lamb RF, Zabavnik J, Anderson L, Eidne KA 1993 Functional expression and molecular characterization of the thyrotropin-releasing hormone receptor from the rat anterior pituitary gland. *J Mol Endocrinol* 10:199-206.

Sharif NA, Burt DR 1984 Sulfhydryl groups in receptor binding for thyrotropin-releasing hormone to rat amygdala. *J Neurochem* 42:209-214.

Shimizu T, Wolfe L 1990 Arachidonic acid cascade signal transduction. *J Neurochem* 55:1-15.

Shipp MA, Stefano GB, D'Adamio L, Switzer SN, Howard FD, Sinisterra J, Scharer B, Reinherz EL 1990 Downregulation of enkephalin-mediated inflammatory responses by CD10/neutral endopeptidase 24.11. *Nature* 347:394-396.

Smallridge RC, Kian JG, Gist ID, Fein HG, Galloway RJ 1992 U-73122, an aminosteroid phospholipase C antagonist, noncompetitively inhibits thyrotropin-releasing hormone effects in GH₃ rat pituitary cells. *Endocrinology* 131:1883-1888.

Smalstig E, Sawyer B, Clemens J 1974 Inhibition of rat prolactin release by apomorphine in vivo and in vitro. *Endocrinology* 95:123-129.

Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, Steinweis PC 1991 Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified G_q. *Science* 251:804-807.

Spedding M, Kenny B 1992 Voltage-dependent calcium channels: structures and drug-binding sites. *Biochem Soc Trans* 20:147-153.

Spiegel AM, Backlund JrPS, Butrynski JE, Jones TLZ, Simonds WF 1991 The G protein connection: molecular basis of membrane association. *Trends Biochem Sci* 16:338-341.

Strader CD, Dixon RAF, Cheung AH, Candelore MR, Blake AD, Sigal IS 1987 Mutations that uncouple the β -adrenergic receptor from G_s and increase agonist affinity. *J Biol Chem* 262:16439-16443.

Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC 1990 Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9514-9518.

Suen CS, Wilk S 1990 Rapid inactivation and phosphorylation of pyroglutamyl peptidase II in Y-79 human retinoblastoma cells after exposure to phorbol ester. *Endocrinology* 127:3038-3046.

Suen CS, Wilk S 1991 Inhibition of pyroglutamyl peptidase II synthesis by phorbol ester in the Y-79 retinoblastoma cell. *Endocrinology* 128:2169-2174.

Swearingen KC, Martínez de la Escalera G, Weiner RI 1990 Episodic prolactin release after removal of dopamine inhibition in vitro. *Biol Estud Med Biol* 38:43-48.

Takemoto DJ, Takemoto LJ, Hansen J, Morrison D 1985 Regulation of retinal transducin by C-terminal peptides of rhodopsin. *Biochem J* 232:669-672.

- Tashjian JrAH, Osborne R, Maina D, Knaian A** 1977 Hydrocortisone increases the number of receptors for thyrotropin-releasing hormone on pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 79:333-340.
- Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH** 1991 Activation of the β_1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the G_q class of G proteins. *Nature* 350:516-518.
- Thompson AK, Mostafapour SP, Denlinger LC, Bleasdale JE, Fisher SK** 1991 The aminosteroid U-73122 inhibits muscarinic receptor sequestration and phosphoinositide hydrolysis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 266:23856-23862.
- Thomson FJ, Johnson MS, Mitchell R, Wolbers WB, Ison AJ, MacEwan DJ** 1993 The differential effects of protein kinase C activators and inhibitors on rat anterior pituitary hormone release. *Mol Cell Endocrinol* 94:223-234.
- Torjesen PA, Bjoro T, Ostberg BC, Haug E** 1988 Thyrotropin-releasing hormone-stimulated inositol triphosphate formation is liable to thyrotropin-releasing hormone-induced desensitization by a calcium-dependent mechanism. *Mol Cell Endocr* 56:107-114.
- Torres H, Charli JL, González-Noriega A, Vargas MA, Joseph-Bravo P** 1986 Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem Int* 9:103-110.
- Ui M** 1990 Pertussis toxin as a valuable probe for G-protein involvement in signal transduction. In: Moss J, Vaughan M (eds) *ADP-ribosylating toxins and G proteins*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 45-77.
- Uribe RM, Jasso P, Morales C, de Gortari P, Charli JL, Joseph-Bravo P** 1996 In situ hybridization histochemical analysis of pyroglutamyl peptidase II mRNA distribution in the rat Brain. 26TH Annual Meeting Society for Neuroscience. Washington, D.C. November 16-21. Abstract 694.4.
- Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli JL** 1991 Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 54:493-498.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P** 1993 Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58:140-145.
- Vale W** 1977 Pharmacology of thyrotropin releasing factor (TRF), luteinizing hormone releasing factor (LRF), and somatostatin. *Adv Exp Med Biol* 87:123-156.

- Vale W, Grant G, Guillemin R** 1973 Chemistry of the hypothalamic releasing factors-studies on structure-function relationships. In: Ganong WF, Martini L (eds) *Frontiers in neuroendocrinology*. New York, Oxford University Press, pp 375-413.
- Vale W, Rivier J, Burgus R** 1971 Synthetic TRF (thyrotropin releasing factor) analogues. II. pGlu-N³imMeHis-Pro-NH₂: a synthetic analogue with specific activity greater than that of TRF2. *Endocrinology* 89:1485-1488.
- Vallar L, Vicentini LM, Meldolesi J** 1988 Inhibition of inositol phosphate production is a late Ca²⁺ dependent effect of D2 dopaminergic receptor activation in rat lactotroph cells. *J Biol Chem* 263:10127-10314.
- Vandlen RL, Sarcione SL, Telakowski CA** 1981 Purification and characterization of plasma membrane fractions from cultured pituitary glands. *Biochim Biophys Acta* 649:595-607.
- van Hal PT, Hopstaken-Broos JP, Prins A, Favaloro EJ, Huijbens RJ, Hilvering C, Figdor CG, Hoogsteden HC** 1994 Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *J Immunol* 153:2718-2728.
- VanRenterghem B, Browning MD, Maller JL** 1994 Regulation of mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase A and C in a cell-free system. *J Biol Chem* 269:24666-24672.
- Vargas MA, Cisneros M, Herrera J, Joseph-Bravo P, Charli JL** 1992a Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord and organs. *Peptides* 13:255-260.
- Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P** 1992b Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Dev Brain Res* 66:251-256.
- Vargas MA, Méndez M, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL** 1987 Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neurosci Lett* 79:311-314.
- Waters SM, Konkoy CS, Davis TP** 1996 Haloperidol and apomorphine differentially affect neuropeptidase activity. *J Pharmacol Exp Ther* 277:113-120.
- Weintraub BD, Gesundheit N, Taylor T, Gyves PW** 1989 Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. *Ann NY Sci* 553:205-213.

- Weiss ER, Osawa S, Shi W, Dickerson CD** 1994 Effects of carboxil-terminal truncation on the stability and G protein-coupling activity of bovine rhodopsin. *Biochemistry* 33:7587-93.
- Werb Z, Clark EJ** 1989 Phorbol diesters regulate expression on the membrane neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in rabbit synovial fibroblasts and mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 264:9111-9113.
- Wess J, Brann MR, Bonner TI** 1989 Identification of a small intracellular region of the muscarinic m₃ receptor as a determination of selective coupling to PI turnover. *FEBS Lett* 258:133-136.
- Wiegant VM, Ronken E, Kovacs G, De Wied D** 1992 Endorphins and schizophrenia. *Prog Brain Res* 93:433-453.
- Wilber JF, Siebel MJ** 1973 Thyrotropin releasing hormone interactions with an anterior pituitary membrane receptor. *Endocrinology* 92:888-893.
- Wilk S** 1986 Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzymes? *Life Sci* 39:1487-1492.
- Wilk S, Suen CS, Wilk EK** 1988 Occurrence of pyroglutamyl peptidase II, a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* 12:43-47.
- Wilk S, Wilk EK** 1989 Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem Int* 15:81-90.
- Yajima Y, Akita Y, Saito T** 1988 Effects of cholera toxin on the coupling of thyrotropin-releasing hormone to a guanine nucleotide-binding protein in cultured GH₃ cells. *Mol Pharmacol* 33:592-597.
- Yamada M, Monden T, Satoh T, Iizuka M, Murakami M, Iriuchijima T, Mori M** 1992 Differential regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA levels by thyroid hormone in vivo and in vitro (GH3 cells). *Biochem Biophys Res Commun* 184:367-372.
- Yamada M, Monden T, Satoh T, Satoh N, Murakami M, Iriuchijima T, Kakegawa T, Mori M** 1993 Pituitary adenomas of patients with acromegaly express thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA: cloning and functional expression of the human thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 195:737-745.

Yang J, Tashjian JrAH 1993a Transcriptional regulation by dexamethasone of endogenous thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary GH₄C₁ cells. *Endocrinology* 133:487-490.

Yang J, Tashjian JrAH 1993b Regulation of endogenous thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor messenger RNA by TRH in GH₄C₁ cells. *Mol Endocrinol* 7:753-758.

Yatani AJ, Cordina Y, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM 1987 A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. *Science* 238:1288-1292.

Yatani AJ, Imoto Y, Cordina Y, Hamilton SL, Brown AM, Birnbaumer L 1988a The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, G_s, directly stimulates dihydropyridine-sensitive skeletal muscle Ca²⁺ channels. Evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 263:9887-9895.

Yatani A, Mattera R, Codina J, Graf R, Okabe K, Padrell E, Iyengar R, Brown AM, Birnbaumer L 1988b The G protein-gated atrial K⁺ channel is stimulated by three distinct G α s. *Nature* 336:680-682.

Yeo T, Thorner MO, Jones A, Lowry PJ, Besser GM 1979 The effect of dopamine, bromocriptine, lergotriple and metoclopramide on prolactin release from continuously perfused columns of isolated rat pituitary cells. *Clin Endocrinol Oxf* 10:123-130.

Zhao D, Yang J, Jones KE, Gerald C, Suzuki Y, Hogan PG, Chin WW, Tashjian JrAH 1992 Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. *Endocrinology* 130:3529-3536.

Zheng L, Paik WY, Cesnjaj M, Balla T, Tomic M, Catt KJ, Stojilkovic SS 1995 Effects of the phospholipase C inhibitor, U73122, on signaling and secretion in pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 136:1079-1088.

PUBLICACIONES

ANEXO 1. Miguel Angel Vargas, Patricia Joseph-Bravo and Jean-Louis Charli 1994 THYROTROPIN-RELEASING HORMONE DOWNREGULATES PYROGLUTAMYL PEPTIDASE II ACTIVITY IN ADENOHYPHYSAL CELLS. Neuroendocrinology 60:323-330.

ANEXO 2. Miguel Angel Vargas, Julie Bourdais, Sonia Sánchez, Bernardo Uriostegui, Eloy Moreno, Patricia Joseph-Bravo and Jean-Louis Charli 1997 PYROGLUTAMYL PEPTIDASE II ACTIVITY IS REGULATED THROUGH THE cAMP PATHWAY IN CULTURES OF ADENOHYPHYSAL CELLS. Sometido para su publicación a la revista Endocrinology.

Miguel Angel Vargas
Patricia Joseph-Bravo
Jean-Louis Charli

Instituto de Biotecnología, Universidad
Nacional Autónoma de México,
Cuernavaca, México

Thyrotropin-Releasing Hormone Downregulates Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Adenohypophyseal Cells

Key Words

Thyrotropin-releasing hormone
Thyrotropin-releasing hormone
receptor
Pyroglutamyl peptidase
Protein kinase
Phorbol ester
Lactotropes

Abstract

Pyroglutamyl peptidase II (PPII) is a thyrotropin-releasing hormone (TRH) hydrolyzing ectoenzyme with a narrow specificity. In the adenohypophysis, it is present on lactotropes. This study was undertaken in order to determine whether TRH itself regulates PPII activity in the adenohypophysis. After 5 days in culture, dispersed cells from female pituitaries expressed detectable levels of PPII activity when 10^{-8} M 3,3',5'-triiodo-L-thyronine was present throughout the culture. 10^{-6} M TRH decreased PPII activity with a maximal effect (down to 46% of initial values) at 16 h and an ED_{50} of 10^{-9} M. [3Me-His²]TRH, a potent agonist of the TRH receptor was effective at lower concentrations (ED_{50} : 1.6×10^{-10} M). Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 10^{-6} M), a protein kinase C (PKC) activator, diminished PPII activity to 61% of initial values with an ED_{50} of 2.2×10^{-8} M. Maximal effects of PMA and TRH were not additive. Neither PMA nor TRH effects were reversed by inhibitors of protein kinases (1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine or sphingosine or staurosporine); TRH-induced downregulation of the enzyme was not modified by PMA pretreatment. TRH had no effect on two other ectopeptidases, endopeptidase 24.11 and dipeptidyl aminopeptidase IV. These data demonstrate that TRH specifically downregulates PPII activity in adenohypophyseal cells through TRH receptor activation and suggest that the activation of a presumably calcium-independent PKC mimics the TRH effect. TRH regulation of PPII activity may contribute to adjust lactotrope responsiveness to TRH.

Introduction

Pyroglutamyl peptidase II (PPII; EC 3.4.19.6), an ectoenzyme [1] present in neuronal [2] and adenohypophyseal cells [3, 4], specifically degrades thyrotropin-releasing hormone (pGlu-His-ProNH₂; TRH) in vitro [5, 6].

Adenohypophyseal PPII appears after TRH hypophyseotropic neurons terminal differentiation, concomitant with lactotropes [7] where it is localized in adult rats [4]. Its activity is subject to positive regulation by thyroid hormones [8, 9] acting directly on the adenohypophysis [4] and to negative regulation by 17 β -estradiol [9]. PPII

Received:
October 15, 1993
Accepted after revision
February 20, 1994

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

© 1994 S. Karger AG, Basel
0028-3835/94 0603-0323
\$5.00/0

activity fluctuates during the estrous cycle, with minimal activity during diestrus 2 and maximal at estrous [10]. Serum 17 β -estradiol fluctuations during this period seem insufficient to explain this pattern of activity. TRH is known to increase the synthesis and release of thyrotropin and prolactin (PRL), but also to downregulate its own receptors [11]. Hypothalamic factors may contribute to regulate PPII activity since it can be regulated by phorbol esters in Y-79 human retinoblastoma cells [12, 13]. The changes in PPII activity detected during the estrous cycle could reflect responses to TRH secretion since hypothalamic TRH mRNA levels (an index of peptide neurons activity) fluctuate during the estrous cycle in an opposite manner to adenohipophyseal PPII activity [10]. We have studied the effect of TRH on PPII activity, as well as the transduction mechanism involved in adenohipophyseal cell culture. Our data demonstrate that TRH downregulates PPII activity through activation of its own receptors and suggest that protein kinase C (PKC) activation mimics this effect.

Materials and Methods

Reagents

Peptides were purchased from Peninsula Laboratories (Belmont, Calif., USA); HPLC or TLC analyses of peptides revealed a single peak with expected retention time or Rf. [L-2,3,4,5-³H-Pro]-TRH (³H]-TRH; 83 Ci/mmol) was from New England Nuclear Co. (Boston, Mass., USA); Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum, vitamins and antibiotics were obtained from Gibco BRL (Grand Island, N.Y., USA); 4-well multidishes, from Nunc (Roskilde, Denmark); aminopeptidase M from Pierce Chemical Co (Rockford, Ill., USA). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, Mo., USA) or J.T. Baker (D.F., México). N-benzoyloxycarbonyl prolyl proline (ZPP), pyroglutamyl diazomethyl ketone (PDMK) and N-1-carboxy-2-phenylethyl(N^{im}benzyl)-histidyl- β -naphthylamide (CPHNA), specific inhibitors of prolyl endopeptidase (PE), pyroglutamyl peptidase I (PPI) and PPII, respectively, were a gift from Dr. S. Wilk, Mount Sinai School of Medicine, New York, N.Y., USA.

Animals

Female Wistar rats (80–100 days old, 260–300 g) kept under controlled lighting conditions (light from 07.00 to 19.00 h) and fed ad libitum were used in all experiments. Animals were killed by decapitation.

Cell Culture

Adenohipophyseal cells were cultured as described [14]. Briefly, the adenohipophysis was separated from the neurointermediate lobe, dissociated with trypsin and DNase followed by mechanical dispersion. 10⁶ viable cells, determined by trypan blue exclusion, were plated in 16-mm wells with 1 ml DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, vitamins, antibiotics (50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin), 125 ng/ml fungizone, 2 mM glutamine,

14 mM glucose, 10⁻⁸ M 3,3',5'-triiodo-L-thyronine (T₃) and 0.7 mM insulin. If T₃ was not added, PPII was generally undetectable. The medium was changed after 3 days of incubation at 37 °C in a water-saturated atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂.

Treatments

Stock solutions of drugs were diluted with culture medium, to desired concentration, just before use and 10 μ l added to the dishes at indicated times before enzymatic determinations.

Enzymatic Assays

Enzymatic determinations were performed at the 5th culture day on intact cells. After drug treatment, the cells were washed twice with Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) and incubated in KRB containing the drug under study (or vehicle) and the substrate. Aliquots of medium were taken at time 0 and subsequent times to ensure measurement of initial velocity. Vehicles did not affect enzyme activities.

For PPII assay, 10⁻⁶ M [³H]-TRH (200,000 cpm) in 250 μ l was used as substrate. [³H]-His-ProNH₂ produced was detected after separation from [³H]-TRH by ion-exchange paper chromatography on Whatman cellulose phosphate P81 sheets [3]. PPII activity was stable during 1 h incubation and linear with time (1 h) and cell density input. Cells incubated with 10⁻⁶ M [³H]-TRH (400,000 cpm) for 1 h did not internalize a significant amount of radioactivity.

Dipeptidyl aminopeptidase IV (DAPIV) was assayed according to Yoshimoto and Walter [15] using 0.4 mM glycyl-prolyl- β -naphthylamide (Gly-Pro- β NA) as substrate. DAPIV activity was linear during 30 min incubation.

Endopeptidase 24.11 was assayed using succinyl-alanyl-alanyl-phenylalanyl-(7-amido,4-methyl)-coumarin (suc-Ala-Ala-Phe-AMC) as substrate, in a coupled assay with aminopeptidase M, according to Giros et al. [16].

Proteins

After enzymatic assays, cells were washed with KRB, digested with 1 N NaOH at room temperature for 24 h and proteins determined according to Lowry et al. [17].

Phase-Contrast Microscopy

Cells were observed under a Zeiss inverted light microscope on the day of plating, and before and after treatment. Adenohipophyseal cell cultures were maintained healthy in our conditions for up to at least 5 days and there was no morphologic change with any of the drugs tested.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using Student's t test. p values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

PPII Assay Specificity

TRH was exclusively degraded by the ectoenzyme PPII and not by soluble enzymes leaking from the cells since: (a) addition of PE and PPI specific inhibitors (ZPP and PDMK, respectively) in the incubation medium had no effect on the amount of [³H]-His-ProNH₂ produced

(table 1); (b) CPHNA, a PPII specific inhibitor, decreased adenohypophyseal cell activity (table 1) as previously shown for brain membranes incubated in conditions developed to specifically detect PPII [18], and (c) no enzyme activity was detected in KRB that was incubated with cells for 1 h (not shown).

Effects of TRH and [3-Me-His²]TRH on Ectoenzyme Activities

A time-dependent inhibition of PPII activity was observed when cells were incubated with TRH (10^{-6} M) (fig. 1). Maximum inhibition ($54 \pm 6\%$, $n = 6$) was observed after 16 h (fig. 1); with further TRH exposure PPII activity returned towards control values ($28 \pm 7\%$ inhibition, $n = 4$, at 24 h) (not shown). PPII activity was not detected in media from cells incubated for 16 h with or without TRH (not shown). TRH inhibitory effect was dose-dependent with an ED_{50} of 10^{-9} M (fig. 2A). 10^{-6} M TRH had no effect on two other ectopeptidases: endopeptidase 24.11 activity was 1.05 ± 0.04 pmol AMC/10⁶ cells/min ($n = 4$) after 16 h incubation with TRH (controls: 1.02 ± 0.1 , $n = 4$); DAPIV was unaltered after different exposure times (fig. 1). 16 h incubation with the TRH analog [3Me-His²]TRH inhibited PPII activity with an ED_{50} of 1.6×10^{-10} M (fig. 2B).

To verify that TRH was regulating membrane-bound PPII, activity was also measured on membranes obtained [3] from cells incubated with or without 10^{-6} M TRH for 16 h. An inhibitory effect (45%) similar to that obtained with intact cells was observed (not shown).

Involvement of PKC

TRH receptor activation induces PKC activity in GH cells [19], an activity responsible for various TRH effects, including TRH receptor mRNA downregulation [20]. The role of PKC was therefore evaluated. 10^{-6} M PMA inhibited PPII; the maximum effect was observed between 8 and 16 h ($39 \pm 6\%$ inhibition at 16 h) (fig. 3A), with lesser inhibition at 24 h ($22 \pm 9\%$) (not shown). Enzyme activity was not detected in media from cells incubated 16 h with 10^{-6} M PMA (not shown). All further experiments were performed at 16 h. A dose-dependent response was observed (fig. 3B) with an ED_{50} of 2.2×10^{-8} M. Another PKC activator, phorbol-12,13-dibutyrate (PDBu) [21] caused a similar PPII inhibition while the inactive analogue 4 α -phorbol-12, 13-didecanoate (4 α -PDDe) [21] had no effect (table 2). TRH and PMA (both at 10^{-6} M) added together inhibited PPII to the same extent as TRH alone (table 3). These data were consistent with the hypothesis that TRH decreases PPII activity

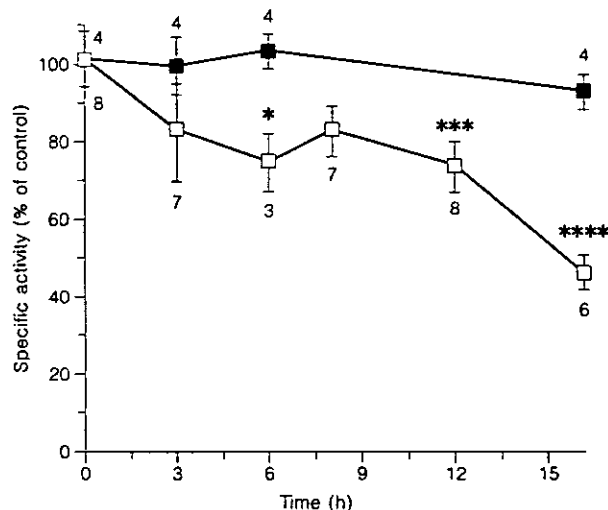


Fig. 1. Time-dependent effects of TRH on PPII and DAPIV specific activities in adenohypophyseal cell culture. Cells were treated with 10^{-6} M TRH for various times. Data are mean specific activity (in % of time 0) \pm SEM. Indicated in the figure are the numbers of independent determinations shown above (DAPIV, black boxes) or below (PPII, white boxes, from two experiments). Mean PPII specific activity (time 0) was 1.77 pmol His-ProNH₂/min/mg protein; mean DAPIV specific activity (time 0) was 11 nmol β NA/min/mg protein. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$ compared to time 0.

Table 1. Effects of specific inhibitors of TRH degrading enzymes on TRH degradation in adenohypophyseal cell cultures

Inhibitor	His-ProNH ₂
Control	100 \pm 3 (12)
ZPP + PDMK	98 \pm 11 (8)
CPHNA	39 \pm 4 (4)***

Cells were preincubated with 10^{-5} M ZPP + PDMK or 10^{-4} M CPHNA for 15 min; inhibitors were maintained during enzymatic assay. Data are mean pmol His-ProNH₂/min/mg protein (in % of control) \pm SEM. Number of independent determinations indicated in parentheses. Mean control specific activity was: 1.52 pmol His-ProNH₂/min/mg protein. *** $p < 0.01$ compared to control.

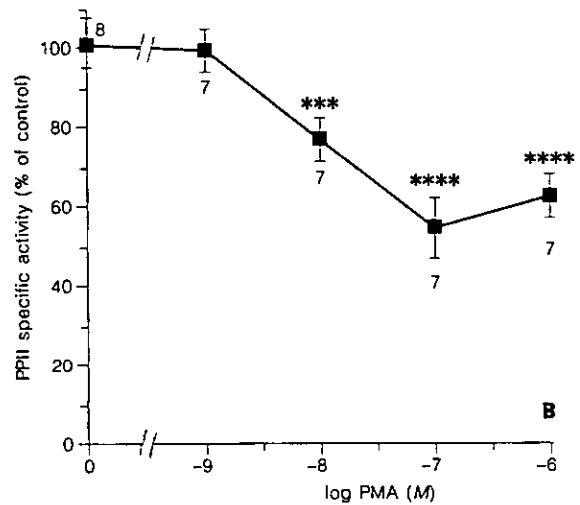
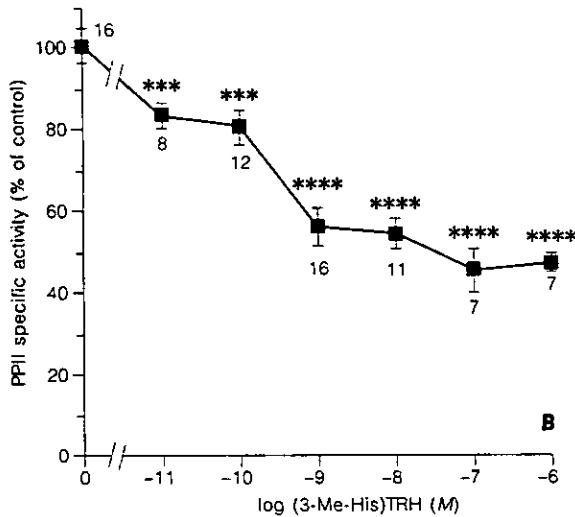
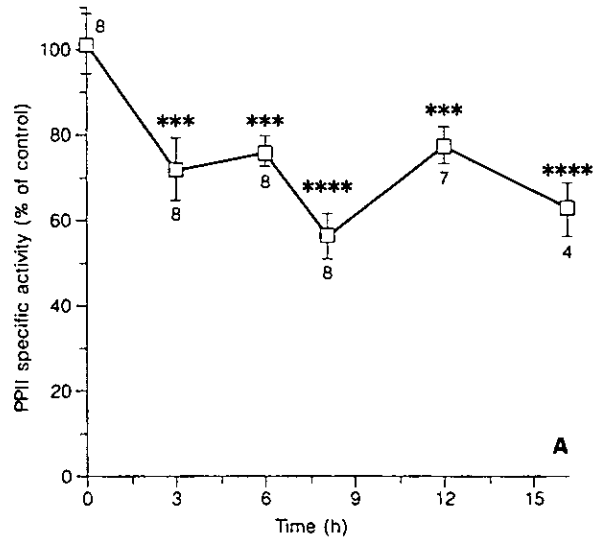
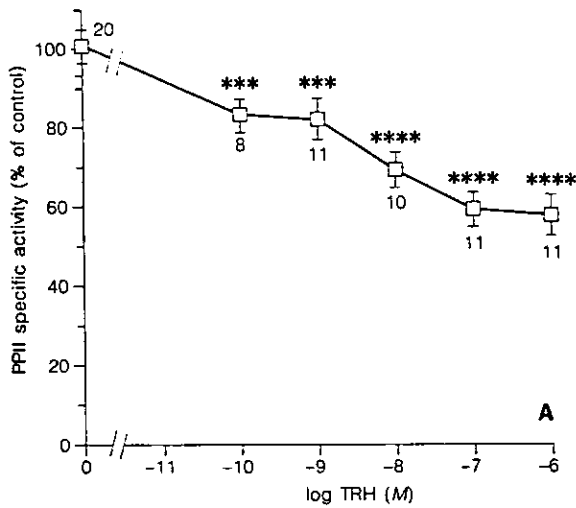


Fig. 2. Dose-response curves of TRH and [3-Me-His²]TRH on PPII activity in adenohipophyseal cell cultures. Cells were incubated with 10^{-10} – 10^{-6} M TRH (**A**) or 10^{-11} – 10^{-6} M [3-Me-His²]TRH (**B**) for 16 h before PPII assay. Data are mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Indicated in the figure are the numbers of independent determinations (from 3 or 4 experiments). Mean control PPII specific activities were 1.57 and 1.82 pmol His-ProNH₂/min/mg protein for **A** and **B**, respectively. *** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$ compared to control.

Fig. 3. Time-dependent and dose-response effects of PMA on PPII specific activity in adenohipophyseal cell cultures. Cells were incubated with 10^{-6} M PMA for various times (**A**) or exposed to 10^{-9} – 10^{-6} M PMA for 16 h (**B**) before PPII activity determination. Data are mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Indicated in the figure are the numbers of independent determinations (from 2 experiments). Mean control PPII specific activities were 1.78 and 1.49 pmol His-ProNH₂/min/mg protein for **A** and **B**, respectively. *** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$ compared to control.

through PKC activation. To test this, cells were pretreated with kinase inhibitors before PMA or TRH addition. Neither 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methyl-piperazine (H7) (tested from 10^{-6} to 2×10^{-4} M) nor staurosporine (10^{-7} – 10^{-6} M) nor sphingosine alone (10^{-6} – 10^{-5} M) modified PPII activity (not shown). H7 (2×10^{-4} M) or

10^{-7} M staurosporine did not reverse PPII inhibition caused by 10^{-7} M TRH or PMA (fig. 4A). Further experiments with various doses of H7, sphingosine or staurosporine gave the same results (not shown).

It has been shown that 20 h exposure to 10^{-6} M PMA virtually inhibits most of PMA-induced PRL release in

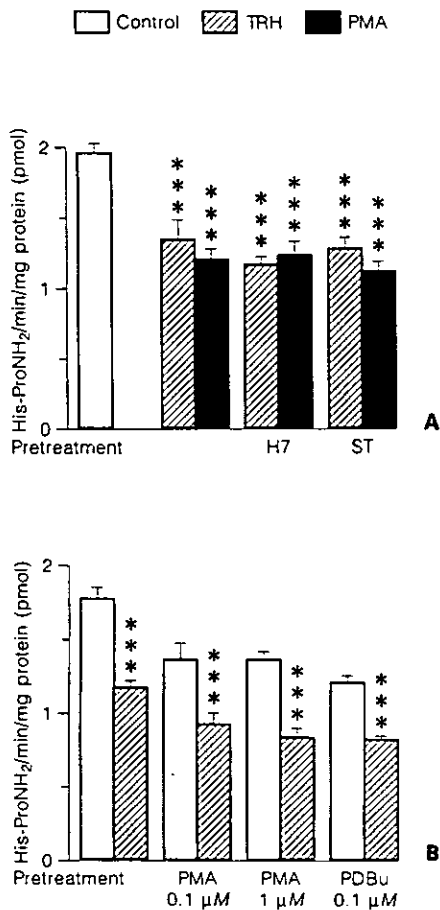


Fig. 4. Effects of kinase inhibitors or phorbol esters pretreatment on TRH or PMA effect. Cells were treated with 2.2×10^{-4} M H7 or 10^{-7} M staurosporine (ST) for 1 h before addition of 10^{-7} M TRH or 10^{-7} M PMA (A) or with PMA or PDBu for 24 h before 10^{-7} M TRH addition (B). Pretreatment drugs were maintained during TRH or PMA treatment and PPII determination. Data are mean specific activity \pm SEM ($n = 4$). *** $p < 0.01$ and **** $p < 0.001$ compared to control.

adenohypophyseal cells cultivated under very similar conditions [22]. A 24-hour pretreatment with 10^{-6} or 10^{-7} M PMA or 10^{-7} M PDBu did not change the inhibitory effect caused by 10^{-7} M TRH on PPII activity (fig. 4B). Similar results were obtained in an independent experiment (not shown).

Table 2. Effects of phorbol esters on the specific activity of PPII in adenohypophyseal cultures

Treatment	PPII
0.001% DMSO	100 \pm 12 (4)
10^{-8} M PMA	66 \pm 3 (4)***
10^{-8} M PDBu	75 \pm 2 (4)**
10^{-6} M 4 α -PDDe	93 \pm 4 (4)
0.01% DMSO	100 \pm 5 (4)
10^{-7} M PMA	64 \pm 8 (8) ^b ***
10^{-7} M PDBu	67 \pm 13 (4) ^b *
10^{-7} M 4 α -PDDe	105 \pm 17 (4)

Cells were treated with phorbol esters for 16 h. Data are mean specific activity (in % of control with vehicle) \pm SEM. Numbers in parentheses represent number of independent determinations. 0.001 and 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO) final concentrations in culture medium were used as the vehicles for 10^{-8} and 10^{-7} M phorbol esters, respectively. Mean specific activities were 1.49 and 1.32 pmol His-ProNH₂/min/mg protein for 0.001 and 0.01% DMSO controls, respectively.

^a Compared to 0.001% DMSO; ^b compared to 0.01% DMSO.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$, *** $p < 0.01$.

Table 3. TRH and PMA effects on PPII specific activity are not additive

Treatment	PPII
Control	1.64 \pm 0.22
TRH	0.80 \pm 0.08****
PMA	0.74 \pm 0.09****
TRH + PMA	0.79 \pm 0.10****

Cells were treated with TRH (10^{-6} M) and/or PMA (10^{-6} M) for 16 h before PPII assay. Data are mean pmol His-ProNH₂/min/mg protein \pm SEM ($n = 4$).

**** $p < 0.001$ compared to control.

Discussion

The primary conclusion of this study is that adenohipophyseal PPII, a target of feedback effects of thyroid hormones [4, 8, 9] and 17 β -estradiol [4, 9], is also regulated by TRH. The ED₅₀ of the effect is lower than the K_d of TRH for its receptors in pituitary (4×10^{-8} M) [23] but similar to the ED₅₀ values for TRH biological responses such as stimulation of prolactin secretion (2×10^{-9} M) [23]. The 6-fold lower ED₅₀ observed with [3-Me-His²]TRH is similar to K_d ratios for TRH receptors [23]. These data suggest that TRH down regulates PPII activity through TRH receptor activation.

Understanding the biochemical consequences of TRH binding to its receptor has largely relied on the use of clonal strains of rat pituitary cells. TRH promotes inositol 1,4,5-triphosphate and 1,2-diacylglycerol formation in GH cells with subsequent increases in intracellular calcium and PKC activity [19]. These events contribute to PRL release [24, 25] and synthesis [26, 27] and TRH receptor mRNA downregulation [20].

The very low levels of PPII in GH₃ cells [28] have precluded the use of this cell line for the study of the mechanisms involved in PPII regulation. TRH inhibition of adenohipophyseal PPII was replicated by phorbol esters. PMA ED₅₀ was similar to that reported for PMA effect on the second phase of PMA-induced PRL release from GH₄C₁ cells [29]. PMA effect was reproduced by active but not by inactive phorbol esters. Therefore, PMA and PDBu effects were probably due to PKC activation.

Two strategies have frequently been used to establish PKC role in cell physiology. One is to pretreat cells with PKC inhibitors before addition of agonists. We have used 3 inhibitors that impede lactotrope or corticotrope (in primary cell culture) response to phorbol esters or agonists which act through PKC activation [22, 30, 31]. Failure to block PMA effect with H7 or sphingosine or staurosporine is probably not due to a lack of efficacy of these treatments. Various reports revealed that some PMA effects are not counteracted by calcium-dependent PKC (cPKC) inhibitor treatment [32, 33]. PKC is a family of enzymes with different properties [34], some of which (α , β II, δ , ϵ and ζ) have been identified in GH₄C₁ cells [35, 36]. Cells can contain a novel PKC (nPKC) two orders of magnitude less sensitive than cPKC to an inhibitor of the staurosporine family (K252a) [37]. It is therefore possible that an nPKC isoenzyme downregulates PPII activity in response to phorbol esters.

The lack of additive effect of maximal doses of TRH and PMA is consistent with a common mechanism of

action: TRH may inhibit PPII activity through activation of a PKC. To test this hypothesis, we used the strategy mentioned above, i.e. pretreatment with PKC inhibitors, and PMA-induced PKC depletion. This second strategy has been exploited successfully to suppress some primary lactotrope responses mediated by PKC [22, 38]. Our inability to overcome TRH-induced down-regulation of PPII activity by pretreatments aimed at inhibiting or depleting PKC may then be explained by the involvement of an nPKC. Studies by Strulovici et al. [39] and Grief et al. [40] have shown that long-term treatment of cells by PMA does not deplete all forms of PKC, i.e. PKC-L and PKC- ϵ , respectively, in certain cell types. In GH₄C₁ cells, PMA depletes all PKCs studied including PKC- ϵ [35]. However, extrapolating the results in GH cells to primary cultures of adenohipophyseal cells should be made with extreme caution. In particular, it has been recently shown that, in contrast to what occurs for GH₃ cells, PMA-induced downregulation of PKC does not block TRH-induced PRL release by adenohipophyseal cells [38].

Alternatively, TRH-induced PPII downregulation could be the result of the activity of other second messengers and/or protein kinases. Prolonged enhancement of intracellular Ca²⁺ levels or protein kinase A stimulation also downregulates PPII activity [Vargas et al: unpubl. observations].

The mechanism by which PMA or TRH downregulates PPII is not known but is not due to PPII release in extracellular medium. The inhibition observed may be due to a decrease in synthesis, as suggested for the long-term PMA effect on retinoblastoma PPII [13], or to internalization followed by degradation as occurs for the neutrophil endopeptidase 24.11 response to short-term application of PMA [41].

Regulation of the number of cell surface receptors is a common mechanism for modulation of cell responses to hydrophilic first messengers. TRH downregulates TRH receptor number in GH₃ cells [11] with similar kinetic to PPII downregulation. Because of the time course of TRH, the concentration near the lactotropes could be influenced by PPII activity, 'homologous' modulation of ectopeptidase activity may be an additional mechanism that regulates cellular responsiveness to peptides.

In conclusion, we have shown that adenohipophyseal PPII activity is down-regulated by TRH. PPII downregulation may be induced by activation of a calcium-independent PKC. This implies that PPII is another target in the regulation of lactotrope function.

Acknowledgments

The authors thank Drs. G. Ponce, G. Martínez de la Escalera and J.L. Redondo for their contributions, M. Cisneros, E. Mata and S. González for technical and M. Sifuentes for secretarial assistance.

The generous gift of peptidase inhibitors by Dr. S. Wilk is acknowledged. This work was supported in part by grants IN204791 from DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México, D111-903547 and 0776-N9110 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and C11356F from the European Economic Community.

References

- 1 Charli J-L, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P: The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 1988;13:237-242.
- 2 Cruz C, Charli J-L, Vargas MA, Joseph-Bravo P: Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem* 1991;56:1594-1601.
- 3 Vargas M, Méndez M, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli J-L: Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neurosci Lett* 1987;79:1476-1492.
- 4 Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Denef C: Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophysial cells. *Endocrinology* 1990;127:1224-1233.
- 5 O'Connor B, O'Cuinn G: Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 1984;144:271-278.
- 6 Wilk S: Neuropeptide-specific peptidases: Does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci* 1986;39:1487-1492.
- 7 Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli J-L, Joseph-Bravo P: Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Dev Brain Res* 1992;66:251-256.
- 8 Ponce G, Charli J-L, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P: Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988;48:211-213.
- 9 Bauer K: Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 1988;70:69-74.
- 10 Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli J-L: Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 1991;54:493-498.
- 11 Hinkie PM, Tashjian AH Jr: Thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH₃ strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 1975;14:3845-3851.
- 12 Suen C-S, Wilk S: Rapid inactivation and phosphorylation of pyroglutamyl peptidase II in Y-79 human retinoblastoma cells after exposure to phorbol ester. *Endocrinology* 1990;127:3038-3046.
- 13 Suen C-S, Wilk S: Inhibition of pyroglutamyl peptidase II synthesis by phorbol ester in the Y-79 retinoblastoma cell. *Endocrinology* 1991;128:2169-2174.
- 14 Enjalbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Sainz A, Jard S, Lombard C, Kordon C, Bockaert J: Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion. *J Biol Chem* 1986;261:4071-4075.
- 15 Yoshimoto T, Walter R: Post-proline dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase IV) from lamb kidney. *Biochim Biophys Acta* 1977;485:391-394.
- 16 Giros B, Gros C, Schwartz J-C, Danvy D, Plaquevent J-C, Duhamel L, Duhamel P, Vlaiculescu A, Costentin J, Lecomte J-M: Enantiomers of thiorphan and acetorphan: correlation between enkephalinase inhibition, protection of endogenous enkephalins and behavioral effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1987;243:666-673.
- 17 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 18 Charli J-L, Méndez M, Vargas MA, Cisneros M, Assai M, Joseph-Bravo P, Wilk S: Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 1989;14:191-196.
- 19 Gershengorn MC: Mechanism of thyrotropin-releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 1986;48:515-526.
- 20 Fujimoto J, Straub RE, Gershengorn MC: Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and phorbol myristate acetate decrease TRH receptor mRNA in rat pituitary GH₃ cells. Evidence that protein kinase C mediates the TRH effect. *Mol Endocrinol* 1991;5:1527-1532.
- 21 Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982;257:7847-7851.
- 22 Audinot V, Rasolonjanahary R, Bertrand P, Priam M, Kordon C, Enjalbert A: Involvement of protein kinase-C in the effect of angiotensin II on adenosine 3',5'-monophosphate production in lactotroph cells. *Endocrinology* 1991;129:2231-2239.
- 23 Vale W, Grant G, Guillemin R: Chemistry of the hypothalamic releasing factors-studies on structure-function relationships; in Ganong WF, Martini L (eds): *Frontiers in Neuroendocrinology*. New York, Oxford University Press, 1973, pp 375-413.
- 24 Martin TFJ, Kowalchuk JA: Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: Involvement of diacylglycerol. *Endocrinology* 1984;115:1517-1526.
- 25 Martin TFJ, Kowalchuk JA: Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: involvement of Ca²⁺. *Endocrinology* 1984;115:1527-1536.
- 26 Murdoch GH, Waterman M, Evans RM, Rosenfeld MG: Molecular mechanisms of phorbol ester, thyrotropin-releasing hormone, and growth factor stimulation of prolactin gene transcription. *J Biol Chem* 1985;260:11852-11858.
- 27 Ramsdell JS, Tashjian AH Jr: Thyrotropin-releasing hormone and epidermal growth factor stimulate prolactin synthesis by a pathway(s) that differs from that used by phorbol esters: Dissociation of actions by calcium dependency and additivity. *Endocrinology* 1985;117:2050-2060.
- 28 Wilk S, Suen C-S, Wilk EK: Occurrence of pyroglutamyl peptidase II, a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* 1988;12:43-47.
- 29 Aizawa T, Hinkle PM: Differential effects of thyrotropin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, phorbol ester, and depolarization in GH₄C₁ rat pituitary cells. *Endocrinology* 1985;116:909-919.
- 30 Samson WK, Skala KD: Comparison of the pituitary effects of the mammalian endothelins: vasoactive intestinal contractor (endothelin-beta, rat endothelin-2) is a potent inhibitor of prolactin secretion. *Endocrinology* 1992;130:2964-2079.

- 31 Liu JP, Engler D, Funder JW, Robinson PJ: Evidence that the stimulation by arginine vasopressin of the release of adrenocorticotropin from the ovine anterior pituitary involves the activation of protein kinase C. *Mol Cell Endocrinol* 1992;87:35-47.
- 32 Sako T, Tauber AI, Jeng AY, Yuspa SH, Blumberg PM: Contrasting actions of staurosporine, a protein kinase C inhibitor, on human neutrophils and primary mouse epidermal cells. *Cancer Res* 1988;48:4646-4650.
- 33 Downey GP, Chan CK, Lea P, Takai A, Grinstein S: Phorbol ester-induced actin assembly in neutrophils: role of protein kinase C. *J Cell Biol* 1992;116:695-706.
- 34 Nishizuka Y: Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992;258:607-614.
- 35 Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Suzuki K: Possible role of Ca^{2+} independent protein kinase C isoenzyme, nPKC ϵ , in thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: Differential down-regulation of nPKC ϵ in GH $_4$ C $_1$ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172:184-189.
- 36 Kiley SC, Parker PJ, Fabbros D, Jaken S: Differential regulation of protein kinase C isoenzyme by thyrotropin-releasing hormone in GH $_4$ C $_1$ cells. *J Biol Chem* 1991;266:23761-23768.
- 37 Gschwendt M, Leibersperger H, Marks F: Differentiative action of K252a on protein kinase C and a calcium-unresponsive, phorbol ester/phospholipid-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;164:974-982.
- 38 Cheng K, Chan WW, Arias R, Barreto A Jr, Butler B: PMA-sensitive protein kinase C is not necessary in TRH-stimulated prolactin release from female rat primary pituitary cells. *Life Sci* 1992;51:1957-1967.
- 39 Strulovici B, Daniel-Issakani S, Baxter G, Knopf J, Sultzman L, Cherwinski H, Nestor JJ, Webb DR, Ransom J: Distinct mechanisms of regulation of protein kinase C ϵ by hormones and phorbol diesters. *J Biol Chem* 1991;266:168-173.
- 40 Greif H, Ben-Chaim J, Shimon T, Bechor E, Eldar H, Livneh E: The protein kinase C-related PKC-L(η) gene product is localized in the cell nucleus. *Mol Cell Biol* 1992;12:1303-1311.
- 41 Erdos EG, Wagner B, Harbury CB, Painter RG, Skidgel RA, Fa XG: Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 enkephalinase in human neutrophils. *J Biol Chem* 1989;264:14519-14523.

PYROGLUTAMYL PEPTIDASE II ACTIVITY IS REGULATED THROUGH THE
cAMP PATHWAY IN CULTURES OF ADENOHYPOPHYSEAL CELLS*

MIGUEL ANGEL VARGAS, JULIE BOURDAIS, SONIA SANCHEZ, BERNARDO
URIOSTEGUI, ELOY MORENO#, PATRICIA JOSEPH-BRAVO AND JEAN-LOUIS
CHARLI

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-
3, Cuernavaca, Mor., 62271, México. # present address: Facultad de Ciencias
Químicas, Universidad de Colima, Col., México.

Abbreviated title: Regulation of TRH degradation in adenohipophysis.

KEY WORDS: TRH, pyroglutamyl peptidase II, peptidase, adenohipophysis,
cyclic AMP, protein kinase C, protein kinase A, lactotroph, cholera toxin, pertussis
toxin, dopamine, somatostatin, PACAP.

Address all correspondence and reprints requests to: Jean-Louis Charli, Instituto
de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3,
Cuernavaca, Mor. 62271, México.

Telephone and fax number: (52)73170805; e-mail address: charli@ibt.unam.mx

* This work was supported by grants IN206494 from DGAPA-Universidad
Nacional Autónoma de México and 3299P-N9607 from CONACYT.

ABSTRACT

In adenohipophysial, TRH is inactivated by pyroglutamyl peptidase II (PPII), a TRH specific ectoenzyme localized on lactotrophs. TRH slowly downregulates surface PPII activity in adenohipophysial cell cultures. Although protein kinase C (PKC) activation mimicks this effect, there is no conclusive evidence that TRH action is through this pathway. Since the TRH receptor (TRH-R) can couple to G_i/G_o or G_s proteins, we determined whether these G proteins are involved in PPII activity regulation in adenohipophysial cells. Pertussis toxin, neither modified basal PPII activity nor the inhibitory (37 %) effect of 3-Me-His-TRH (MeTRH), a high affinity TRH-R agonist. Cholera toxin inhibited PPII activity by 35 %. Forskolin (10^{-6} M) caused a time-dependent decrease in PPII activity, with maximal inhibition at 12-16 h treatment (42-47 %); ED_{50} was 10^{-7} M. 3-isobutyl-1-methylxanthine, or dibutyl cAMP (dBcAMP), caused dose dependent inhibition of PPII activity. The inhibitory effect of maximally effective doses of CTX, forskolin or dBcAMP were additive with MeTRH; effects of forskolin and 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate, a PKC activator, were also additive. MeTRH action was not blocked by preincubation with an adenylate cyclase inhibitor or with H89, a protein kinase A inhibitor. PPII activity is therefore independently regulated by the PKC and cAMP pathways; TRH action does not involve cAMP. The effect of other hypophysiotropic factors which may use the cAMP pathway was analysed: pituitary adenylate cyclase activator peptide 38 (PACAP; 10^{-5} M) decreased PPII activity (32 %) and its effect was additive with that of MeTRH and blocked by preincubation with H89; bromocryptine (10^{-8} M) or somatostatin (10^{-6} M) stimulated enzyme activity (22 and 25% respectively) and blocked the inhibitory effect of MeTRH. Since various treatments inhibited PPII mRNA levels similarly to PPII

activity, an important level of control of PPII activity by these factors may be at the mRNA level. We suggest that PPII is subject to homologous and heterologous regulations by elements of the multifactorial system which controls prolactin secretion.

INTRODUCTION

Regulation of PRL secretion at the level of the lactotroph involves pleiotropic signals. Interactions between inhibitory (dopamine (DA), somatostatin (SRIF),...) and stimulatory (TRH, vasoactive intestinal peptide (VIP),) hypothalamic as well as paracrine and autocrine factors modulate intracellular signalling pathways tuning PRL secretion. These intracellular signals feedback on the activity of the transduction mechanisms (1, 2).

Lactotroph or GH cell lines responsiveness to TRH at the TRH receptor (TRH-R) level is regulated either by a rapid homologous desensitization without receptor loss or by modulation of the amount of TRH-R molecules present on plasma membrane; i.e. TRH-R number decreases after its activation by TRH due to internalization and to inhibition of TRH-R synthesis (3). TRH-R is also up- or down-regulated by the action of other hormones (3, 4, 5).

Pyroglutamyl peptidase II (PPII: EC 3.4.19.6), a highly specific TRH-degrading ectoenzyme (6, 7, 8, 9), may modulate TRH turnover in the vicinity of lactotrophs and therefore participate in regulating its response: PPII is present on the plasma membrane of lactotrophs (10), its development in adenohypophysis is concomitant with that of the neuroendocrine TRHergic system (11) and its *in vivo* activity fluctuates during the estrous cycle (12) or thyroid status variations (13, 14).

TRH, through TRH-R activation, down regulates PPII activity in adenohypophyseal cells (15). TRH transduction pathway has been studied primarily in GH cell lines; evidence was provided that TRH-R is coupled to phospholipase C

(PLC) β -1 via a $G_{\alpha q}/G_{\alpha 11}$ protein. TRH induces phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by PLC, activating protein kinase C (PKC) isozymes and an initial increase of free calcium ion ($[Ca^{++}]_i$) mobilized from intracellular stores. A second phase of $[Ca^{++}]_i$ increase is mediated by voltage-dependent L-type Ca^{++} channels (3). These events contribute to PRL release (16, 17) and synthesis (18, 19) and to TRH-R mRNA downregulation (3).

A PKC activator, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) decreases PPII activity as does TRH. When applied together their effect is not additive, although PKC inhibition or depletion does not revert TRH effect. This led us to propose that TRH-induced downregulation of PPII activity is mediated via a non conventional PKC or alternatively, other second messengers (15).

TRH-R may also be coupled to pertussis toxin (PTX)- and cholera toxin (CTX)-sensitive G proteins in GH3 cells (3). The initial aim of this work was to determine whether PPII regulation by TRH in primary cultures of adenohypophyseal cells is coupled to G_i/G_o or G_s -like proteins. Our data show no involvement of these G proteins. However, we demonstrate that the cAMP pathway is involved in PPII activity regulation.

MATERIALS AND METHODS

Reagents: TRH, [3-Me-His²]-TRH (MeTRH), pituitary adenylate cyclase activator peptide 38 (PACAP), VIP and SRIF were purchased from Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA); high performance liquid chromatographic analyses revealed a single peak with expected retention time. [L-2,3,4,5-³H-Pro]-TRH (³H]-TRH; 83 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear Co. (Boston, MA, USA); Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetal bovine serum, vitamins, antibiotics-antimycotic,

M-MLV reverse transcriptase from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA); 4 well multidishes from Nunc (Roskilde, Denmark); 35 mm Petri dishes from COSTAR (Cambridge, MA, USA); Cholera and pertussis toxins, from Research Biochemicals International (Natick, MA, USA); Taq DNA polymerase and oligo-dT₁₅ from Boehringer Mannheim; agarose from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA); nitrocellulose from Schleicher and Schuell (Dassel, Germany); TRI-X pan film from KODAK; N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride (H89) from Biomol Research Laboratories, Inc (Plymouth Meeting, PA, USA); TRH β NA (TRH β naphtylamide) from Bachem Bioscience Inc (King of Prussia, PA, USA); guanidium isothiocyanate and solvents were from J.T. Baker (D.F., México). All other reagents (including deoxynucleotides, forskolin, 1-9 dideoxyforskolin, N⁶,2'-O-dibutiryladenosine 3':5'-cyclic monophosphate [dBcAMP], 3-isobutyl-1-methylxanthine [IBMX], 2',3'-dideoxyadenosine, TPA and 2-bromo- α -ergocryptine [bromocryptine]) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Dipeptidyl aminopeptidase IV (DAPIV) was purified from goat cortical kidney according to Yoshimoto and Walter (20).

Animals: Female Wistar rats (80-100 days old, 260-300 g) were used in all experiments. Animals kept under controlled lighting conditions (light from 7:00-19:00 h) and fed ad libitum were killed by decapitation between 10:00 and 11:00 h. The Society for Neuroscience (USA) "Guidelines for the use of animals in neuroscience research" were followed.

Cell Culture: Adenohypophyseal cells were cultured as described (15). Briefly, 15 adenohypophysis separated from the neurointermediate lobe were placed in DMEM

containing bovine serum albumin (0.3 %) (DMEM-BSA), minced, washed and incubated in 3 ml DMEM-BSA containing trypsin (5 mg/ml) for 18 min at 37 °C; 4.5 ml DNase (12 ug) was then added to the medium for 2 min. Tissue was allowed to settle, supernatant discarded and adenohypophysis incubated for 5 min in 2 ml DMEM-BSA containing trypsin inhibitor (1.5 mg) followed by incubation in Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free medium with EDTA (2 mM) for 8 min, with EDTA (1 mM) for 15 min and mechanically dispersed. Except when mentioned, 10⁵ viable cells, determined by trypan blue exclusion, were plated on 16 mm diameter culture dishes with 1 ml DMEM supplemented with fetal bovine serum (10%), vitamins, penicillin (50 units/ml), streptomycin (50 ug/ml), fungizone (125 ng/ml), glutamine (2 mM), glucose (14 mM) and 3,3',5',-triiodo-L-thyronine (10⁻⁸ M). After 3 days of incubation at 37 °C in a water-saturated atmosphere of 95 % O₂ and 5 % CO₂, the medium was changed.

Forskolin (10⁻² M), 1-9 dideoxyforskolin (10⁻³ M), IBMX (5 X 10⁻¹ M), TPA (2 X 10⁻³ M), H89 (10⁻² M) and bromocryptine (2 X 10⁻³ M) were dissolved in DMSO; TRH (10⁻³ M), PACAP (10⁻⁴ M), and SRIF (10⁻³ M) in acetic acid (0.001 %); dBcAMP (10⁻¹ M), VIP (5 X 10⁻⁵ M), 2',3'-dideoxyadenosine (10⁻² M), CTX and PTX in water. Stock solution of drugs were diluted with culture medium to appropriate concentration just before addition to cultures. Vehicles had no effect on PPII activity.

Cells were observed under a Zeiss inverted light microscope the day of plating, and before and after treatments. Adenohypophyseal cell cultures were maintained healthy in our conditions at least up to 5 days and there was no morphologic change with any of the drugs tested.

Prolactin release and radioimmunoassay (RIA): Aliquots of medium were recovered one

h after addition of drugs. PRL was assayed by RIA with NIH reagents (intraassay variation coefficient, 5%) according to previously published protocols (21). Secretory responses to the drugs used in this study were similar to those reported elsewhere (not shown).

Enzymatic assays: Enzymatic determinations were performed at 5th culture day on intact cells as previously described (15), except where indicated. Briefly, after drug treatment, cells were washed twice with Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) and incubated in KRB containing treatment drug and substrate. Aliquots of medium were taken at time 0 and subsequent times to ensure measurement of initial velocity. For PPII assay, [^3H]-TRH (10^{-6} M, 200,000 cpm) in 250 μl was used as substrate. [^3H]-His-ProNH $_2$ produced was detected after separation from [^3H]-TRH by ion exchange paper chromatography on Whatman cellulose phosphate P81 sheets. Surface DAPIV was assayed using glycyl-prolyl- β -naphthylamide (0.4 mM) as substrate, according to Yoshimoto and Walter (20).

In some experiments, PPII activity was measured in membranes obtained from 35 mm Petri dishes containing 4.5×10^6 cells. Cells were ruptured by freezing and thawing on ice (3x) in 2 ml NaPO $_4$ (10 mM) buffer pH 7.5 containing phenylmethylsulfonyl fluoride (0.5 mM), iodoacetamide (5 mM) and pepstatin A (1 μM) (buffer A). After centrifugation for 15 min at 14 000 g, pellet was washed once with buffer A-1M NaCl and once with buffer A. Pellet was resuspended finally in NaPO $_4$ buffer (0.05 M) pH 7.5 (buffer B). Membrane PPII activity was determined with the substrate pGlu-His-Pro- β NA in a coupled assay in the presence of excess DAPIV according to Friedman and Wilk (22) except for a few modifications. The incubation mixture contained 100-200

ug membrane protein, DAPIV (4 nmoles Gly-Pro- β NA hydrolysed per min), bacitracin and N-ethylmaleimide (200 μ M each) and pGlu-His-Pro- β NA (400 μ M) in buffer B. Incubations were for 0-120 min. Reactions were stopped by addition of one vol. of methanol. Liberated β NA was detected fluorometrically. Results obtained with this assay were similar to those obtained with the surface activity assay (compare effect of MeTRH in Figures 1 or 4 and 6).

Protein quantification: After enzymatic assays, cells were washed with KRB, digested with NaOH (1N) at room temperature for 24 h and proteins determined according to Lowry et al. (23). Membranes were treated in the same way.

RNA quantification: Cells were washed with PBS and scrapped in 200 μ l lysis buffer (solution D) per 10^6 cells; total RNA was purified according to Chomczynski and Sacchi (24).

Northern analyses: Analyses were performed as described (25). Membranes were hybridized with 32 P nick-translated rat PPII cDNA (nucleotides 1-2683 of rat cDNA) kindly donated by K. Bauer. Various PPII mRNA bands were detected with MW similar to those reported (26). PPII mRNAs were quantified by laser densitometry (Biomed Instruments, Fullerton, CA) of the autoradiographic signals and adjusted for ribosomal RNA amount present before transfer.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR): 1 μ g RNA was incubated with oligo-dT₁₅ (100 pmoles) and M-MLV reverse transcriptase (200 U) during 1 h at 37 °C. 1/5 of cDNA was submitted to PCR amplification using PPII primers (15 pmoles), glyceraldehyde- β phosphate dehydrogenase (G₃PDH) primers (2.5 pmoles) and Taq

DNA polymerase (2.5 U). PPII primers [CTGGATCGCATACAAAAAG (sense); GGACACCCAAATAATTGCT (antisense)] amplified a 418 bp fragment corresponding to 1644-2061 sequence of rat PPII cDNA. A 983 bp fragment corresponding to nucleotides 35-1017 of rat G₃PDH cDNA (27) was coamplified with sense [TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC] and antisense CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC] primers as an internal standard. Samples were incubated in a robocycler gradient 40 system (STRATAGENE) at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles with a profile of 95 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 1 min except for the last cycle which was raised to 10 min. 1/10 of the PCR products were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel. Gel was stained with ethidium bromide and photographed with a TRI-X pan film (exposure 2 min). PPII and G₃PDH bands were quantified by laser densitometry.

Statistical analyses: Data generally represent the mean \pm SEM values of at least two independent cultures (each performed in tri- or quadri-plicate). One-way ANOVA followed by Duncan multiple range test was used to determine statistical significance between individual means. Differences were considered as significant at $p < 0.05$ or less.

RESULTS

Role of G proteins in MeTRH-induced downregulation of PPII activity.

PPII regulation by TRH-R coupling to G proteins of the G_i/G_o or G_s families was

investigated with pertussis (PTX) or cholera (CTX) toxins. In agreement with previously published data, MeTRH (10^{-6} M), a high affinity agonist for TRH receptor, decreased PPII activity by 37 ± 2 % 16 hr after treatment initiation (fig.1); since this was the maximal effect of TRH (15), experiments were generally performed at this time point. Basal and MeTRH down regulated PPII activity were not modified by PTX (400 ng/ml) added prior to agonist treatment (fig. 1). In contrast, incubation with CTX (400 ng/ml) diminished PPII activity by 35 ± 2 % (fig. 1), probably a maximum effect since CTX (200 ng/ml) induced a maximal increase of PRL secretion (not shown). MeTRH (added 2 h after CTX), caused a greater inhibition of PPII activity (60 ± 1 %) than that caused by CTX (35 ± 2 %) or MeTRH (37 ± 2 %) alone (fig. 1). Similar results were obtained if CTX was added 4 h before MeTRH (data not shown). These data suggested that G proteins of the G_i/G_o or G_s families do not transduce TRH effects on PPII activity and that down stream elements activated by G_s -like proteins may regulate PPII activity.

Regulation of PPII activity by the cAMP pathway

Since CTX activates G_s -like proteins, some of which are positive regulators of adenylate cyclase (AC), we analyzed whether treatments that increase cAMP levels down regulate PPII activity. Forskolin (10^{-6} M), an AC activator, caused a time-dependent inhibition of PPII activity. A significant inhibition (22 ± 3 %) was observed after 8 h; maximal decrease occurred between 12 h (42 ± 3 %) and 16 h (47 ± 3 %) (fig. 2A). The effect of forskolin was dose-dependent with an ED_{50} of 10^{-7} M (fig. 2B). Incubation for 16 h with an analog of forskolin inactive on AC, 1-9 dideoxyforskolin (10^{-6} M), had not effect on PPII (not shown). A phosphodiesterase inhibitor (IBMX) and dBcAMP, a permeable cAMP analog, caused dose dependent inhibition on PPII

activity. Maximum effects were obtained at 10^{-4} M IBMX (49 ± 6 %) and 10^{-3} M dBcAMP (46 ± 4 %) (fig. 3). Therefore enhancement of cAMP levels can down regulate PPII activity. However adenylyate cyclase inhibition with 2',3'-dideoxyadenosine (10^{-4} M) or PKA inhibition with H89 (10^{-6} M), a specific PKA inhibitor (28) had no effect on basal PPII activity (fig. 6 and various independent experiments [not shown]) suggesting that basal activity is not determined by steady state cAMP intracellular levels. Forskolin (10^{-6} M) caused no change on surface DAPIV activity after 16 h treatment (10.4 ± 1.8 nmol β NA/min/mg protein, n=8 vs control activity: 10.6 ± 1.7 nmol β NA/min/mg protein, n=8); this demonstrate that the effects on PPII do not reflect a general modification of the expression of membrane proteins.

Role of the cAMP pathway in MeTRH-induced downregulation of PPII activity.

To determine whether TRH action on PPII activity involves the cAMP pathway, cells were treated with the maximally effective doses of MeTRH (10^{-6} M) (15) and forskolin (10^{-6} M). MeTRH in association with forskolin inhibited PPII activity (56 ± 2 %) more than any of these drugs alone (MeTRH: 34 ± 3 %; forskolin: 32 ± 2 %) (Fig. 4A). An additive effect was also observed when cells were incubated with dBcAMP (10^{-3} M) and MeTRH (10^{-6} M) (62 ± 3 % vs 34 ± 3 % [dBcAMP] and 38 ± 3 % [MeTRH]) (fig.4B). We conclude that TRH action on PPII activity is independent of the cAMP pathway. In agreement with these data, MeTRH action was not decreased by preincubation with 2',3'-dideoxyadenosine (10^{-4} M) (2 independent experiments, not shown) or H89 (10^{-6} M) (2 independent experiments; not shown).

Relationship between the cAMP and PKC pathways in the control of PPII activity.

Since signalling pathways can crosstalk at many levels, we determined whether interactions between the PKC and cAMP pathways could contribute to control PPII activity. This was studied by cotreatment with maximally effective doses of TPA (10^{-6} M) (15) and forskolin; in this case a stronger down regulation of PPII activity (62 ± 2 %) was induced than with TPA (36 ± 3 %) or forskolin (38 ± 2 %) alone (fig. 5). This suggests that regulation of PPII activity by PKC and cAMP involves independent pathways.

Effects of PACAP, VIP, bromocryptine and SRIF on PPII activity and their interaction with MeTRH.

Because our results implied regulation of PPII activity through the cAMP pathway, extracellular effectors whose receptors couple to this second messenger were analysed. PACAP (10^{-6} M), a potent stimulator of AC in adenohypophysis (29), decreased PPII activity by 32 ± 4 %; this effect was additive with that of TRH (57 ± 6 % versus 36 ± 7 % inhibition for MeTRH alone) and reversed by preincubation with 10^{-6} M H89 (Fig 6). VIP (10^{-6} M) was ineffective (3 independent experiments with 2 different lots of peptide; not shown). Somatostatin (SRIF) and dopamine D_2 receptors are negatively coupled to AC via PTX-sensitive G proteins (2, 30, 31, 32) and inhibit the release of prolactin induced by TRH (2, 30). Bromocryptine (10^{-8} M) or SRIF (10^{-6} M) had small but significant stimulatory effects on PPII activity (22 ± 5 % or 25 ± 7 % respectively) and strongly reduced the inhibitory effect of MeTRH treatment (fig. 7). To determine whether bromocryptine and SRIF effects were mediated by G_i/G_o proteins, we incubated the cells with PTX (400 ng/ml) 2 h before bromocryptine or SRIF treatments. PTX reverted the effects of bromocryptine or SRIF on basal as well as on

MeTRH inhibited PPII activity (fig. 7).

Effects on PPII mRNA.

The effects previously described appear after several hours, possibly as a consequence of regulation of PPII biosynthesis. Therefore, PPII mRNA was quantified in response to MeTRH and other treatments. Preliminary experiments using Northern blots and RT-PCR suggested MeTRH down regulates PPII mRNAs with a lag of a few hrs. 40-50 % inhibition was observed at 16 h (not shown). Similar results with both techniques support that the RT-PCR protocol allowed a semiquantitative estimation of PPII mRNA levels. Since MeTRH effects were higher at 16 h, subsequent experiments with RT-PCR were performed at this time point. Addition of TPA or forskolin led to 42 ± 6 % or 37 ± 6 % down regulation of PPII mRNA respectively (Fig 8A). Their action was additive since addition of the 2 drugs caused a higher inhibition than any one alone (69 ± 7 % versus 47 ± 10 % for TPA and 25 ± 12 % for forskolin; Fig 8B). MeTRH decreased PPII mRNA by 49 ± 2 %. Although bromocryptine and SRIF caused no significant changes, they did reverse TRH induced PPII mRNA down regulation (Fig 9 A, B and C). Except for treatments with BrC or SRIF alone, the pattern of regulation of PPII mRNA levels was very similar to that of the activity.

DISCUSSION

The initial goal of the present study was to further analyse the way by which TRH regulates PPII activity in adenohipophyseal cells since we had not previously obtained conclusive evidence for PKC involvement (15). Various types of G proteins may

transduce TRH effects in lactotrophs or GH cell lines. TRH-induced PLC activation was reported as a PTX-insensitive mechanism (33) but recent data indicate coupling of TRH-R to a PTX-sensitive G protein in GH₃ membranes (3). Moreover, PKC and G₁₂ protein are necessary for TRH-induced voltage-dependent L-type Ca²⁺ channels activation in GH₃ cells, a process sensitive to PTX (3). Our results suggest that G_i/G_o are not involved in basal or TRH-regulated PPII activity in normal adenohypophyseal cells.

TRH-R cDNA cloning allowed the identification of two TRH-R isoforms generated by alternative splicing (3); both coupled to PLC by a PTX-insensitive mechanism, but incapable of AC activation when expressed in Rat 1 fibroblasts (34). However, other evidences suggest that TRH-R activates AC via a CTX-sensitive G_s protein in GH₃ cells (3). This led us to explore the involvement of TRH-R coupling to G_s protein in PPII activity regulation. We demonstrate that increases in the level of intracellular cAMP downregulate PPII activity: enzymatic activity was inhibited by CTX or forskolin or enhancement of intracellular levels of cyclic nucleotides or addition of dBcAMP. Although forskolin is able to induce cellular responses independent of AC activation, 1,9-dideoxyforskolin, an analog unable to activate adenylyl cyclase but which reproduces AC-independent forskolin effects (35, 36), had no effect on PPII activity. Consistent with our interpretation, maximum effects of these drugs were very similar.

The additivity of maximally effective doses of MeTRH with treatments enhancing cAMP levels suggests that TRH regulation of PPII activity is not due to TRH-R coupling to a G_s protein or a downstream element of the cAMP pathway; accordingly, adenylyl cyclase or PKA inhibitions did not modify the effect of MeTRH. PPII down regulation can thus occur independently either by TRH or by the cAMP pathway. Despite that

TRH-induced AC activation and cAMP accumulation can be mediated by PKC activation (37), our data showing additivity of PKC and AC actions suggest that a crosstalk between the PKC and cAMP pathways does not operate in PPII activity modulation.

The data led us to demonstrate that PACAP, as well as dopamine and SRIF, neurohormones modulating AC activity regulate PPII activity (2, 29, 31, 32). PACAP binding sites are present on most lactotrophs (29). Since VIP was not able to modulate PPII activity, it is probable that the type I PACAP receptor, which prefers PACAP over VIP, was involved in PACAP action. The various cloned subtypes of receptors positively couple to AC (29). Therefore PACAP may directly enhance AC activity in lactotrophs. Since a PKA inhibitor reverted its effect, activation of PKA and therefore presumably of AC could contribute to the down regulation of PPII activity. However other PACAP transduction pathways (inositol 3-phosphate turnover) or a paracrine action (29) may also contribute to PPII regulation.

While bromocryptine (10^{-8} M) induced only a small but significant increase of basal PPII activity, a stronger effect was observed at 10^{-7} M (not shown). Even at the lower dose, preincubation with bromocryptine reversed MeTRH induced down regulation of PPII activity. Bromocryptine actions can be mediated by different mechanisms including PTX sensible effects. D2 dopamine receptors in lactotroph cells are negatively coupled to AC via a PTX-sensitive G protein, inhibiting basal AC activity and cAMP accumulation (1). Bromocryptine-induced decrease of intracellular cAMP levels may therefore account for the upregulation of PPII activity. However, bromocryptine action on basal or MeTRH regulated PPII activity was not prevented by preincubation of cells with a small dose of dBcAMP (20 μ M; 2 independent

experiments; not shown) and inhibition of adenylyl cyclase (or PKA) did not modify basal PPII activity. These data suggest that inhibition of intracellular cAMP levels alone is insufficient for explaining the effect of bromocryptine. Other PTX sensitive mechanisms may relate to our data. D2 receptor activation may also inhibit PKC activity and mobilization of intracellular Ca^{2+} by a direct effect on PLC (38). Other mechanisms by which DA lowers $[Ca^{2+}]_i$ include either direct inhibition of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels (39) or indirect inhibition of these channels after voltage-gated K^+ channels activation (40, 41) and subsequent hyperpolarization of plasma membrane (42). Inhibition of PKC activity and/or decreased $[Ca^{2+}]_i$ could mediate bromocryptine action. Thus, PPII activity downregulation can occur due to PKC activation (15) or to treatment with Bay K 8644, an agonist of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels (Vargas et al., unpubl. observations).

The five subtypes of the SRIF receptor (SSTR) including two isoforms for SSTR2 are present in adenohypophysis. Some of the mechanisms mentioned for bromocryptine may mediate SRIF action on PPII because its receptors are also coupled negatively to AC and Ca^{2+} channels and positively to K^+ channels, through PTX-sensitive G proteins (31, 32).

The delayed response of surface PPII activity to TRH or pathways involving PKC or AC activation suggests an effect on PPII biosynthesis. Consistent with this hypothesis, the pattern of PPII activity in response to various effectors was similar to that of PPII mRNA levels. Modulation of PPII mRNA by hormones (43) and hypothalamic factors (this study) probably underlies an important regulatory event of adenohypophyseal PPII. However, additional mechanisms of control may exist.

Positive regulation of surface PPII activity by DA and SRIF, hypothalamic

hormones that inhibit basal and TRH induced PRL secretion (1), points for a physiological role of this enzyme in the control of PRL secretion. Since short term (15-30 min) exposure to TRH is sufficient to induce the long term effect on PPII activity (Vargas et al, unpublished), the mechanisms here unraveled might contribute to set the future in vivo sensitivity of lactotrophs to TRH based on the actual secretion of neurohormones controlling PRL secretion.

In conclusion, regarding the mode of adenohipophyseal PPII regulation, our data demonstrate: a) TRH-R is not coupled to PTX- or CTX-sensitive G proteins, b) increased intracellular cAMP levels downregulate the enzyme activity, but the response to TRH-R activation is independent of this pathway, c) PACAP probably enhances cAMP to down regulate PPII activity, d) through PTX-sensitive G proteins, bromocryptine or SRIF upregulate PPII activity and block the effect of TRH, as occurs for prolactin release, e) control at the mRNA level may contribute to some of these effects. PPII can thus be regulated through homologous and heterologous elements of the multifactorial system which coordinately controls PRL secretion.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. L. Pérez-Martínez, R. M. Uribe and G. Martínez de la Escalera for technical advices and stimulating discussions; MVZ E. Mata, G. Cabeza and S. González for animal care; P Gaytan and E Bustos for oligonucleotide synthesis and M. Cisneros and M. Villa for technical assistance. We acknowledge the gifts of prolactin and prolactin antibodies by the National Hormone and Pituitary Program supported by the NIDDK (USA) and of PPII cDNA by Dr. Karl Bauer.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effects of PTX, CTX and MeTRH on PPII activity. Adenohypophyseal cells were preincubated for 2 h with PTX (400 ng/ml) or CTX (400 ng/ml) before addition of 10^{-6} M MeTRH or vehicle, followed by 16 h incubation. Surface PPII activity was determined. Data are the mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activity was 1.5 pmol His-ProNH₂/min/mg protein. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ****p<0.001 with respect to control, ****p<0.001 compared to CTX.

Fig. 2. Time course and concentration dependence of forskolin effects on PPII activity. Adenohypophyseal cells were incubated with either 10^{-6} M forskolin for the time indicated (A) or various concentrations of forskolin for 16 h (B) before surface PPII activity determination. Data are the mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activities were 1.6 and 1.5 pmol His-ProNH₂/min/mg protein for A and B, respectively. The numbers of independent determinations are indicated below or above curves. *p<0.05, **p<0.02, ***p<0.01, ****p<0.001 compared to zero time or control.

Fig. 3. Regulation of PPII activity by dBcAMP and IBMX. Adenohypophyseal cells were treated with various concentrations of dBcAMP or IBMX for 16 h before surface PPII activity determination. Data are the mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activity was 1.2 pmol His-ProNH₂/min/mg protein. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ****p<0.001 compared to control.

Fig. 4. MeTRH and forskolin or dBcAMP effects additively regulate PPII activity. Adenohypophyseal cell cultures were incubated for 16 h with 10^{-6} M MeTRH alone or in combination with 10^{-6} M forskolin (A) or 10^{-6} M dBcAMP (B), before surface PPII activity determination. Data are the mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activities were 1.0 pmol His-ProNH₂/min/mg protein. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ****p<0.001 with respect to control, ▲▲▲p<0.001 with respect to MeTRH or forskolin, ■■■p<0.001 with respect to MeTRH or dBcAMP.

Fig. 5. Effects of forskolin and TPA on PPII activity are additive. Adenohypophyseal cells were incubated with 10^{-6} M forskolin or with 10^{-6} M TPA alone or in combination during 16 h. Data are the mean specific surface PPII activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activity was 1.1 pmol His-ProNH₂/min/mg protein. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ****p<0.001 with respect to control, ▲▲▲p<0.001 with respect to forskolin or TPA .

Fig. 6. PACAP down regulates PPII activity through the PKA pathway. Adenohypophyseal cells were incubated with 10^{-8} M PACAP or with 10^{-6} M MeTRH or with 10^{-6} M H89 alone or in combination during 16 h. Data are the mean specific membrane PPII activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activity was 19 pmol β NA/min/mg protein. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ***p<0.01 with respect to control, ▲▲p<0.01 with respect to PACAP, ▲▲p<0.02 with respect to PACAP, ■■■p<0.01 with respect to MeTRH.

Fig. 7. Bromocriptine and SRIF regulate PPII activity through PTX sensitive proteins. A: adenohipophyseal cells were preincubated for 1 h with 10^{-8} M bromocriptine (BrC) or 10^{-6} M SRIF before addition of 10^{-6} M MeTRH or vehicle. B: adenohipophyseal cells were treated with PTX (400 ng/ml) for 2 h before addition of 10^{-6} M BrC or 10^{-6} M SRIF. One h later 10^{-6} M MeTRH or vehicle was added. After addition of MeTRH or vehicle, cultures were incubated for 16 h, and surface PPII activity determined. Data are the mean specific activity (in % of control) \pm SEM. Mean control PPII specific activities were 1.0 and 1.2 pmol His-ProNH₂/min/mg protein for A and B panels, respectively. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ***p<0.01 and ****p<0.001 compared to control.

Fig. 8. Regulation of PPII mRNA levels by TPA and forskolin. Adenohipophyseal cells were incubated with the indicated treatments as described in figure 5. Total RNA was purified and PPII and G₃PDH mRNAs amplified by RTPCR. PCR products were separated by electrophoresis; gel was stained and photographed. PPII and G₃PDH bands were quantified by laser densitometry. Data in panels A and B are the mean ratio of PPII over G₃PDH mRNA levels (in % of control) \pm SEM. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. **p<0.02 compared to control.

Fig. 9. Regulation of PPII mRNA levels by MeTRH, BrC and SRIF. Adenohipophyseal cells were incubated with the indicated treatments as described in figure 7. Total RNA was purified and PPII and G₃PDH mRNAs amplified by RTPCR. PCR products were separated by electrophoresis; gel was stained and photographed. PPII and G₃PDH bands were quantified by laser densitometry. Data in panels A and B are the mean ratio

of PPII over G₃PDH mRNA levels (in % of control) ± SEM. The numbers of independent determinations are indicated inside bars. ***p<0.01 and ****p<0.001 compared to control; ^p<0.05 and ■■■p<0.01 with respect to MeTRH. Panel C shows the result of a representative RT-PCR amplification in various experimental conditions.

REFERENCES

1. Lamberts SWJ, MacLeod RM 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70: 279-318
2. Martinez de la Escalera G, Weiner RI 1992 Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endoc Rev* 13: 241-255
3. Gershengorn MC, Osman R 1996 Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev* 76:175-191
4. De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA, Labrie F 1977 Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* 100:1496-1504
5. Tashjian Jr AH, Osborne R, Maina D, Knaian A 1977 Hydrocortisone increases the number of receptors for thyrotropin-releasing hormone on pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 79:333-340
6. Garat B, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P 1985 Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6:27-40
7. O'Connor B, O'Cuinn G 1984 Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 144:271-278
8. Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P 1988 The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 13:237-242

9. Wilk S 1986 Neuropeptide-specific peptidases: does brain contain a specific TRH-degrading enzyme? *Life Sci* 39:1487-1492.
10. Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Denef C 1990 Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipophyseal cells. *Endocrinology* 127:1224-1233
11. Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P 1992 Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohipophysis and pancreas. *Dev Brain Res* 66:251-256
12. Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli JL 1991 Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 54:493-498
13. Bauer K 1988 Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 70:69-74
14. Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P 1988 Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48:211-213
15. Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL 1994 Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology* 60:323-330
16. Martin TFJ, Kowalchuk JA 1984 Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: involvement of diacylglycerol. *Endocrinology* 115:1517-1526

17. Martin TFJ, Kowalchuk JA 1984 Evidence for the role of calcium and diacylglycerol as dual second messengers in thyrotropin-releasing hormone action: involvement of Ca^{2+} . *Endocrinology* 115:1527-1536
18. Murdoch GH, Waterman M, Evans RM, Rosenfeld MG 1985 Molecular mechanisms of phorbol ester, thyrotropin-releasing hormone, and growth factor stimulation of prolactin gene transcription. *J Biol Chem* 260:11852-11858
19. Ramsdell JS, Tashjian AH Jr 1985 Thyrotropin-releasing hormone and epidermal growth factor stimulate prolactin synthesis by a pathway(s) that differs from that used by phorbol esters: dissociation of actions by calcium dependency and additivity. *Endocrinology* 117:2050-2060
20. Yoshimoto T, Walter R 1977 Post-proline dipeptidyl aminopeptidase (dipeptidyl aminopeptidase IV) from lamb kidney. *Biochim Biophys Acta* 485:391-394
21. Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztein WH, Kordon C 1980 Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 31: 200-204
22. Friedman TC, 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
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275
24. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
25. Uribe RM, Pérez-Martínez L, Covarrubias ML, Gómez OB, Covarrubias L, Charli JL, Joseph-Bravo P 1995 Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin releasing

- hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neurosc Let* 201: 41-44 26.
26. Schauder B, Schomburg L, Köhrle J, Bauer K. 1994 Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9334-9538
27. Tso JH, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R 1985 Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13: 2485-2502
28. Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H 1990 Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 265: 5267-5272
29. Rawlings SR, Hezareh M 1996 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and PACAP/vasoactive intestinal polypeptide receptors: actions on the anterior pituitary gland. *Endoc Rev* 17: 4-29
30. Yajima Y, Akita Y, Saito T 1986 Pertussis toxin blocks the inhibitory effects of somatostatin on cAMP-dependent vasoactive intestinal peptide and cAMP-independent thyrotropin releasing hormone-stimulated prolactin secretion of GH₃ cells. *J Biol Chem* 261:2684-2689
31. Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB 1995 The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57:1249-1265
32. Reisine T, Bell GI 1995 Molecular Biology of somatostatin receptor. *Endocrine Rev* 16:427-442
33. Martin TF, Bajjalieh SM, Lucas DO, Kowalchuk JA 1986 Thyrotropin-releasing

- hormone stimulation of polyphosphoinositide hydrolysis in GH₃ cell membranes is GTP dependent but insensitive to cholera or pertussis toxin. *J Biol Chem* 261:10141-10149
34. Lee TW, Anderson LA, Eidne KA, Milligan G 1995 Comparison of the signalling properties of the long and short isoforms of the rat thyrotropin-releasing-hormone receptor following expression in Rat 1 fibroblasts. *Biochem J* 310:291-298
35. Hoshi T, Garber SS, Aldrich RW 1988 Effect of forskolin on voltage-gated K⁺ channels is independent of adenylate cyclase activation. *Science* 240:1652-1655
36. Park TJ, Jim KT 1996 Cyclic AMP-independent inhibition of voltage-sensitive calcium channels by forskolin in PC12 cells. *J Neurochem* 66:83-88
37. Audinot V, Rasolonjanahary R, Bertrand P, Priam M, Kordon C, Enjalbert A 1991 Involvement of protein kinase-C in the effect of angiotensin-II on adenosine 3',5'-monophosphate production in lactotroph cells. *Endocrinology* 129:2231-2239
38. Caccavelli L, Cussac D, Pellegrini I, Audinot V, Jaquet P, Enjalbert A. 1992 D₂ dopaminergic receptors: normal and abnormal transduction mechanisms. *Hormone Res* 38:78-83
39. Lledo P, Legendre P, Israel J, Vincent J 1990 Dopamine inhibits two characterized voltage-dependent calcium currents in identified rat lactotroph cells. *Endocrinology* 127:990-1001
40. Lledo P, Legendre P, Zhang J, Israel J, Vincent J 1990 Effects of dopamine on voltage-dependent potassium currents in identified rat lactotroph cells. *Neuroendocrinology* 52:545-555
41. Einhorn LC, Gregerson KA, Oxford GS 1991 D₂ dopamine receptor activation of potassium channels in identified rat lactotrophs: whole-cell and single-channel recording. *J Neurosci* 11:3727-3737

42. Israel JM, Kirk C, Vincent JD 1987 Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophyseal cells in lactotroph-enriched primary cultures. *J Physiol Lond* 390:1-22
43. Schomburg L, Bauer K 1995 Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136: 3480-3485

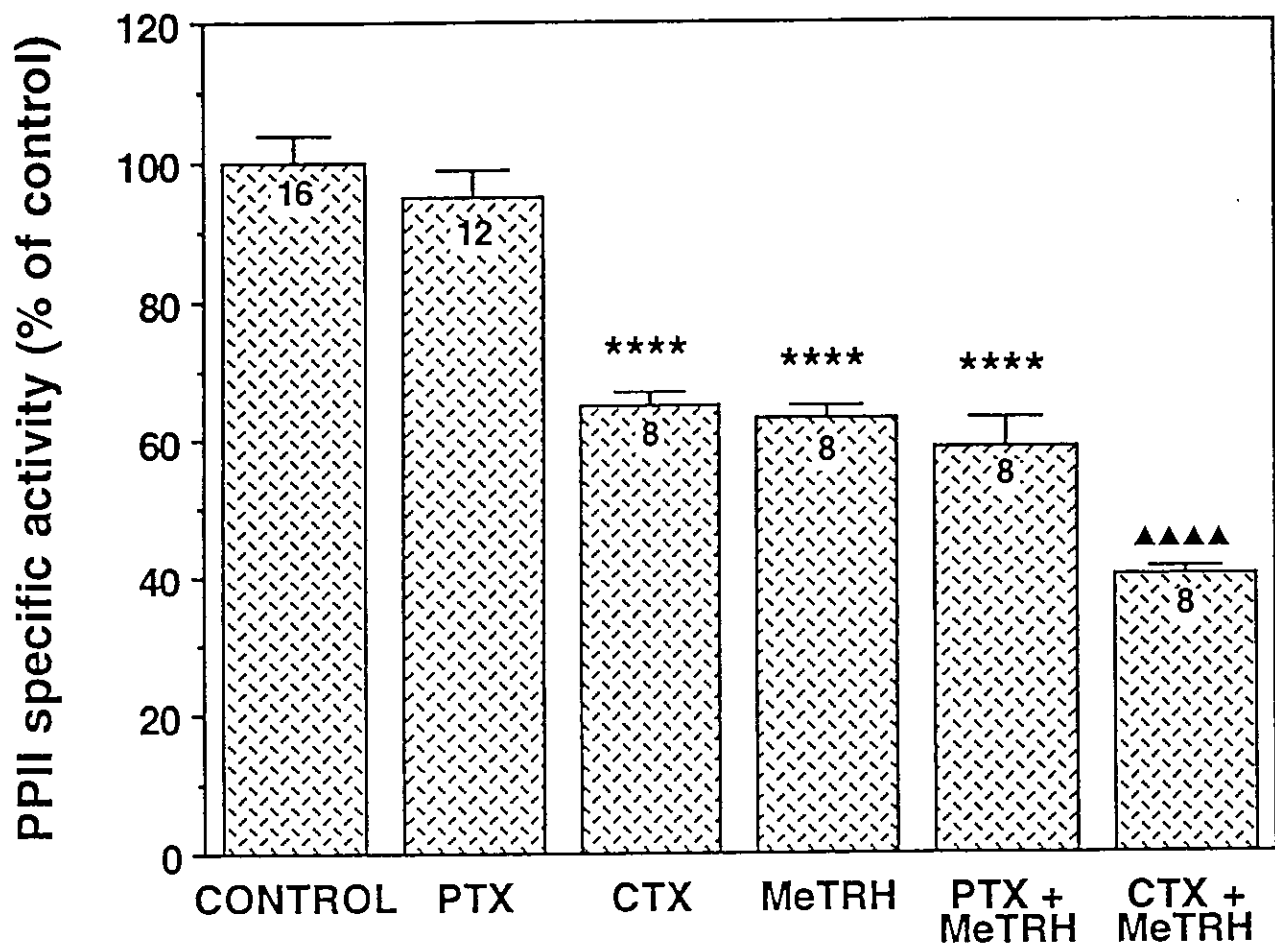


Fig 1

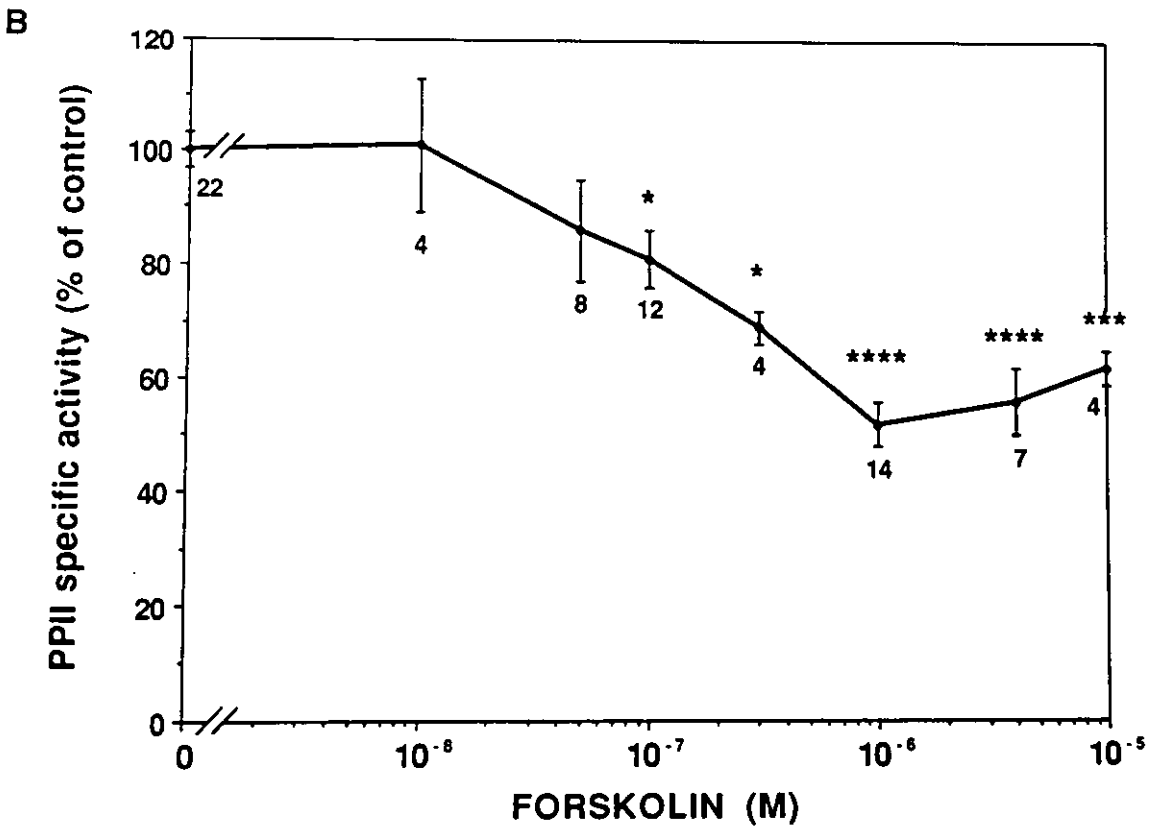
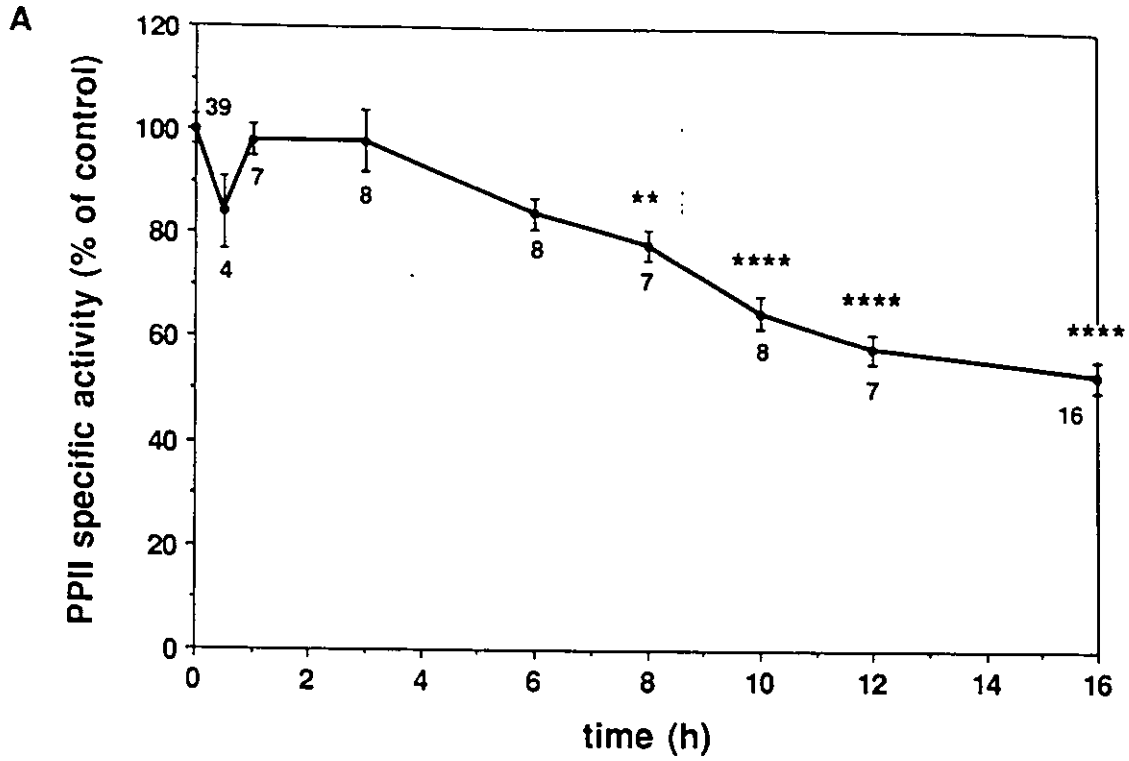


Fig. 2

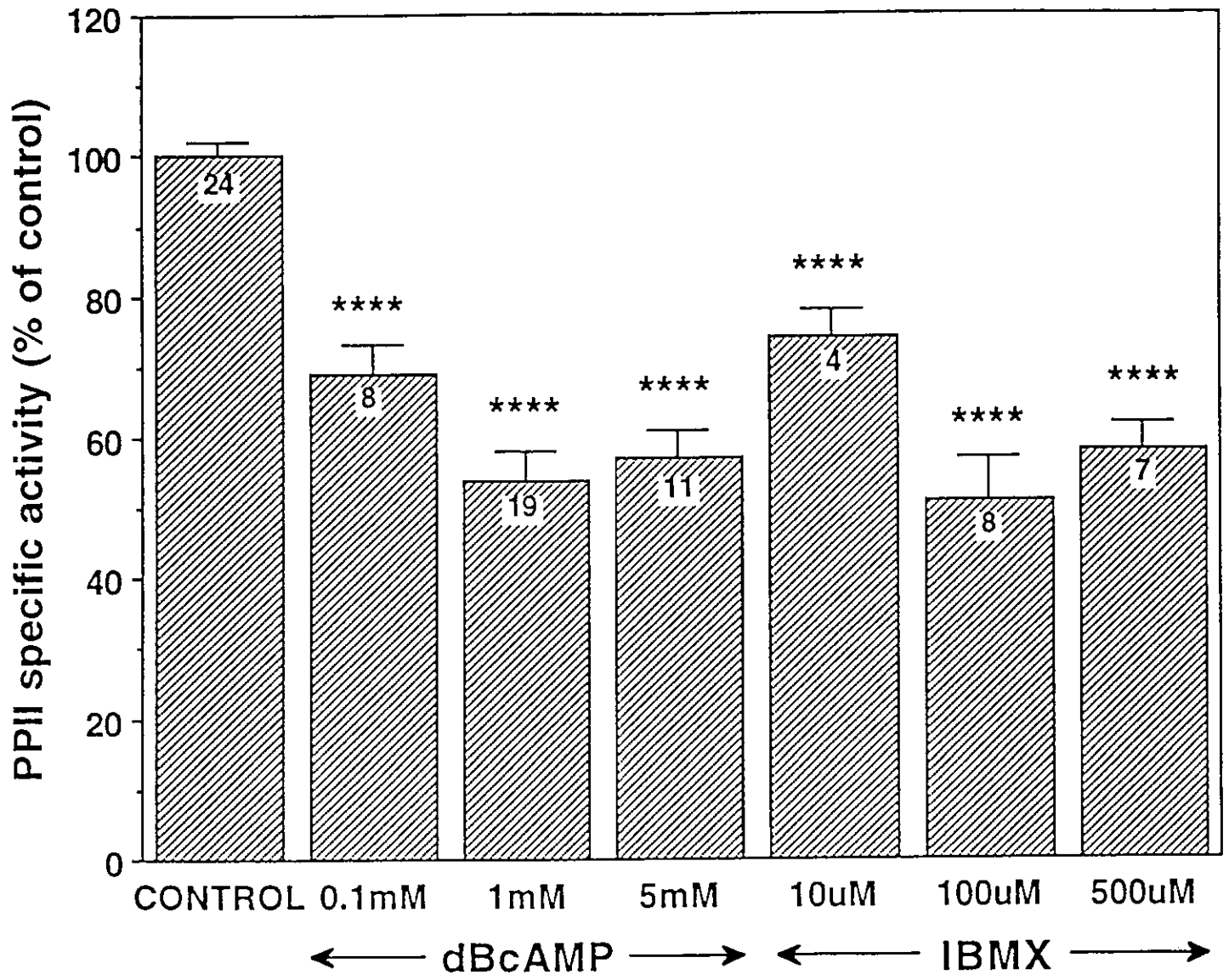


Fig 3

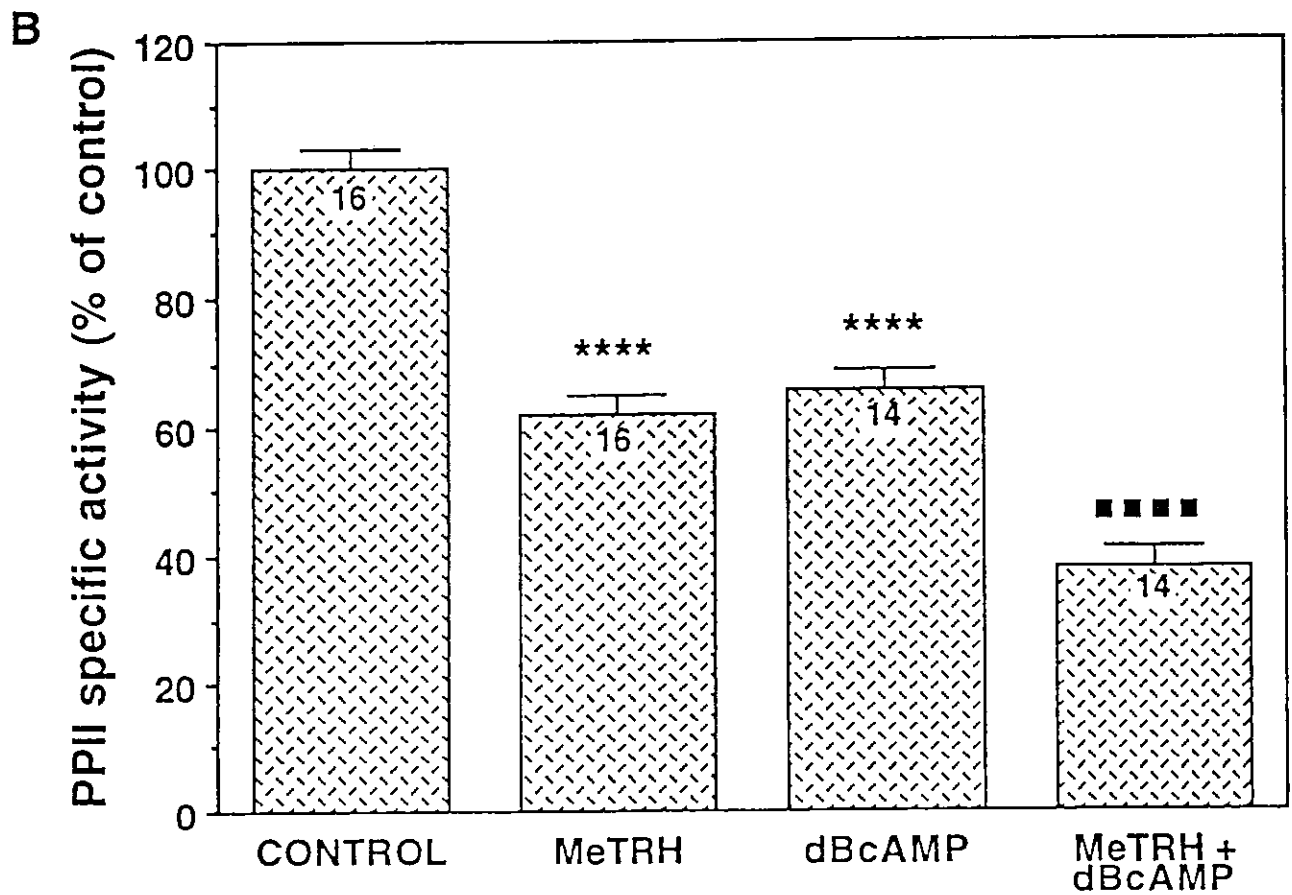
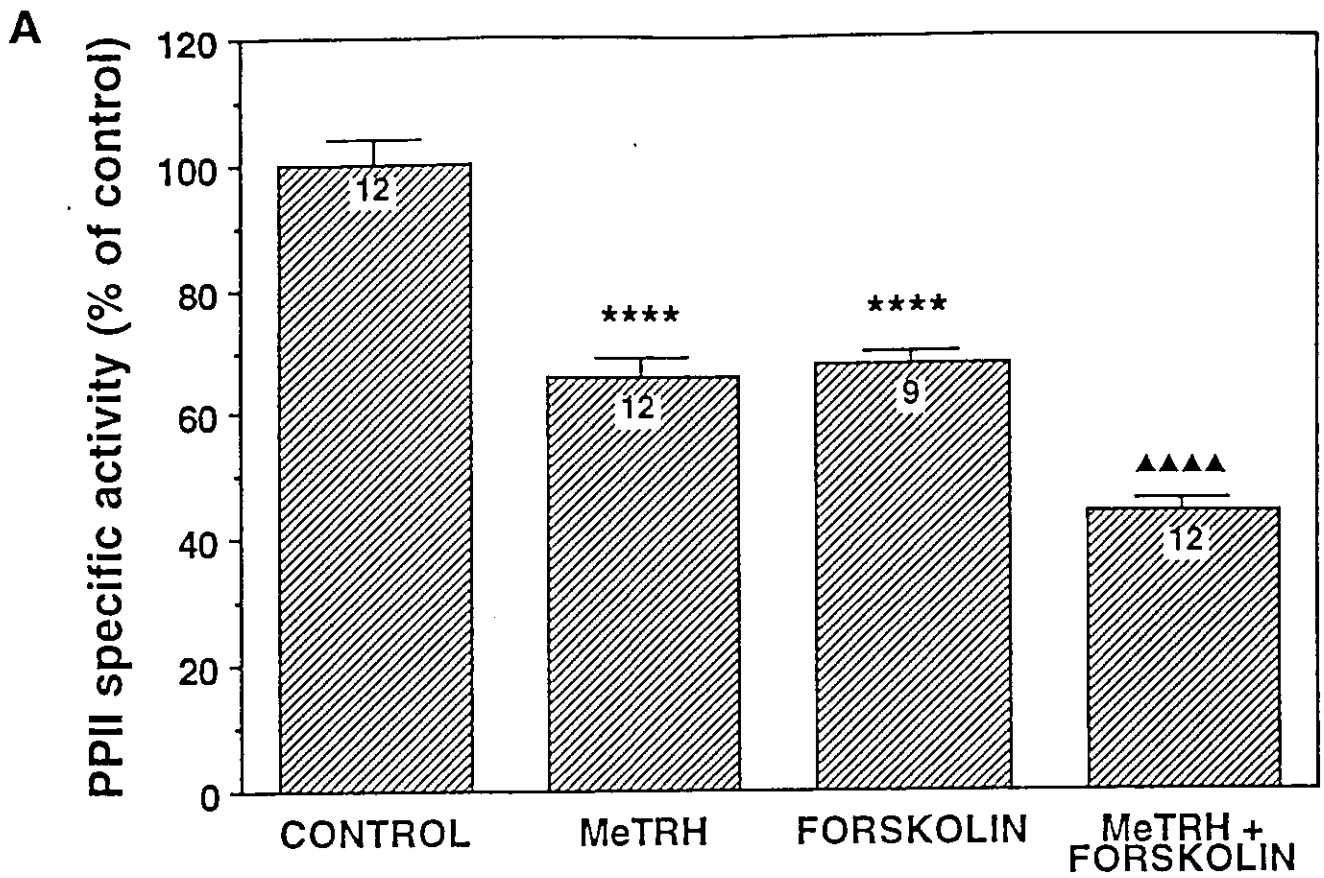


Fig 4

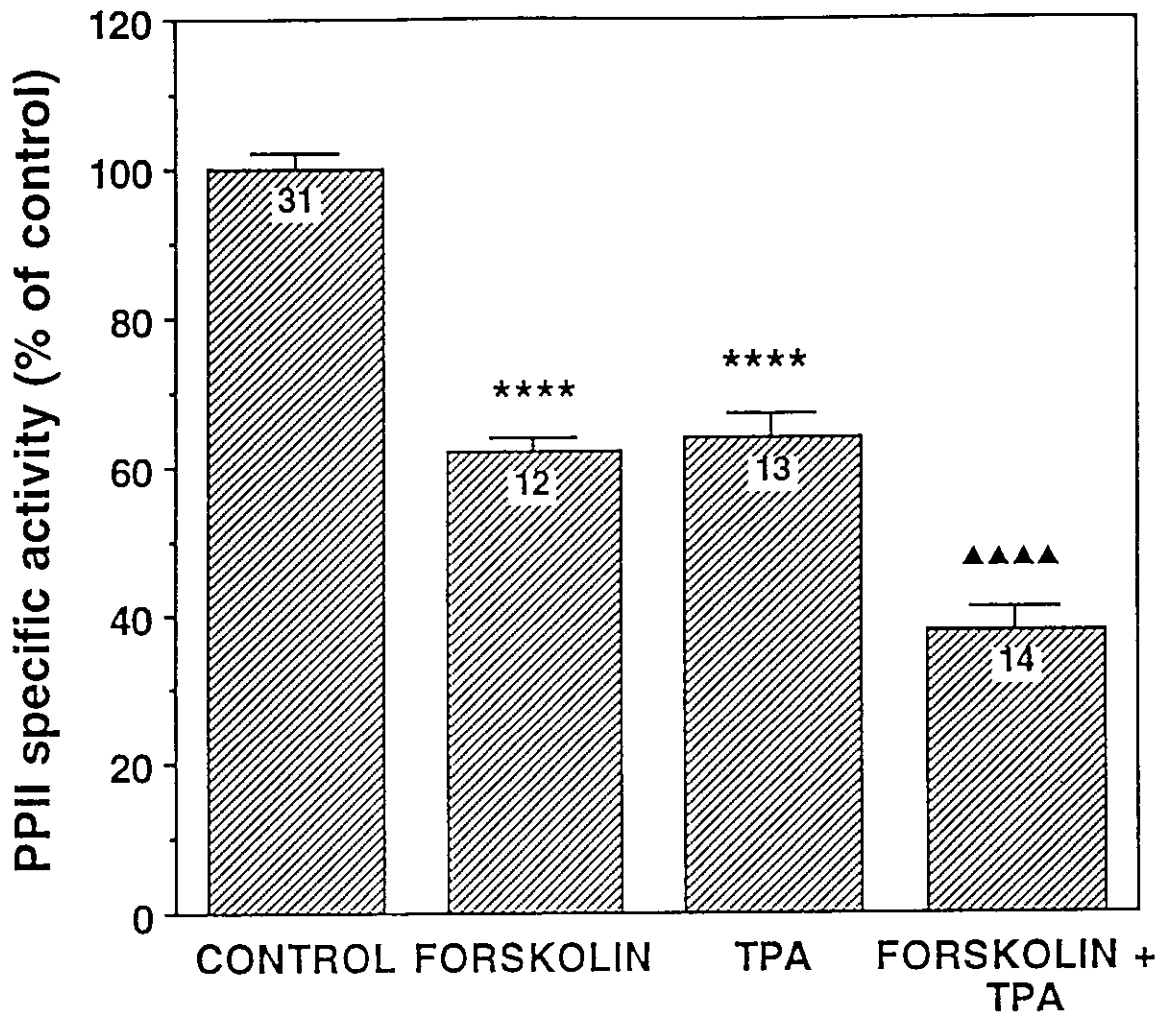


Fig 5

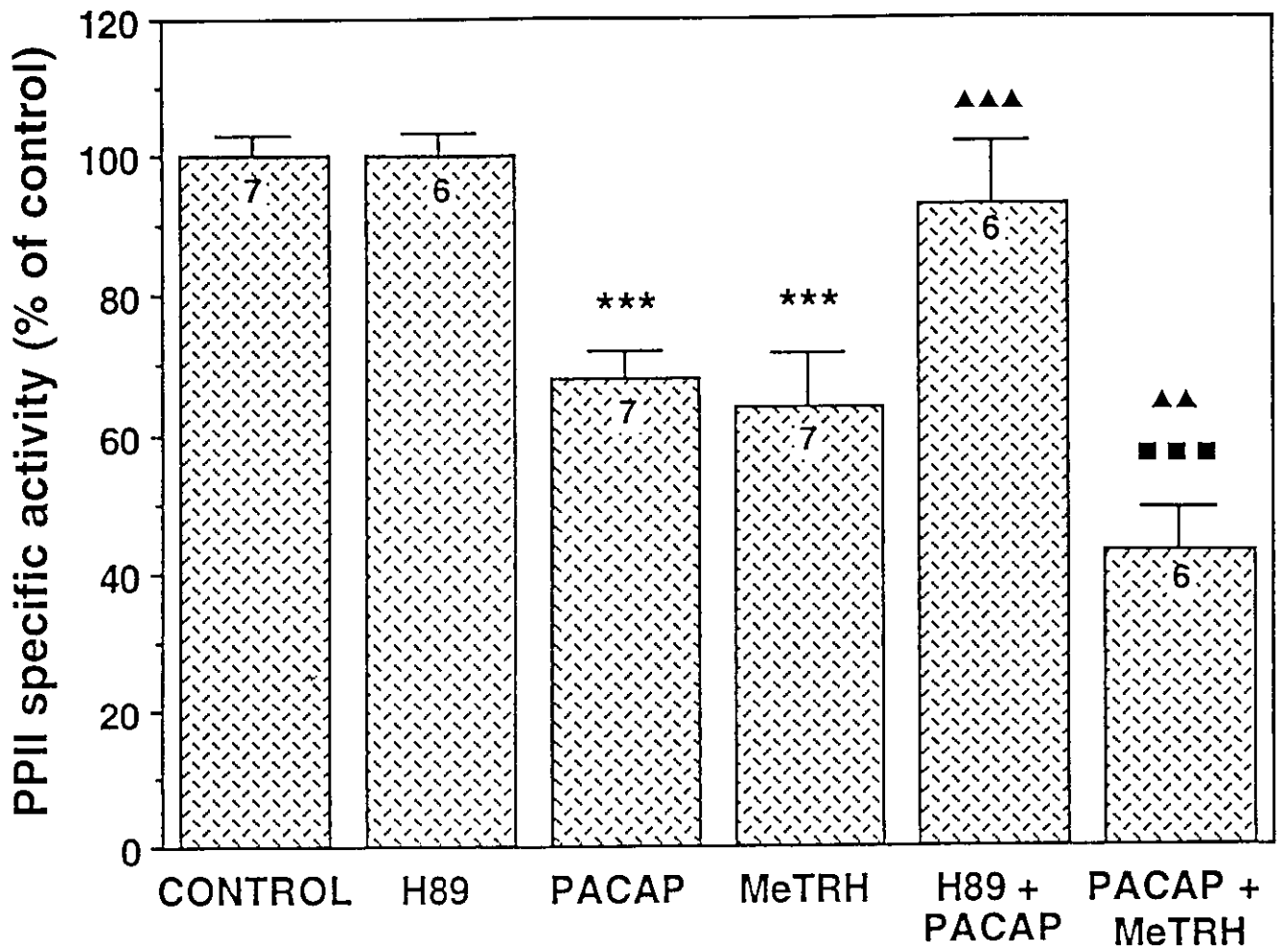


Fig 6

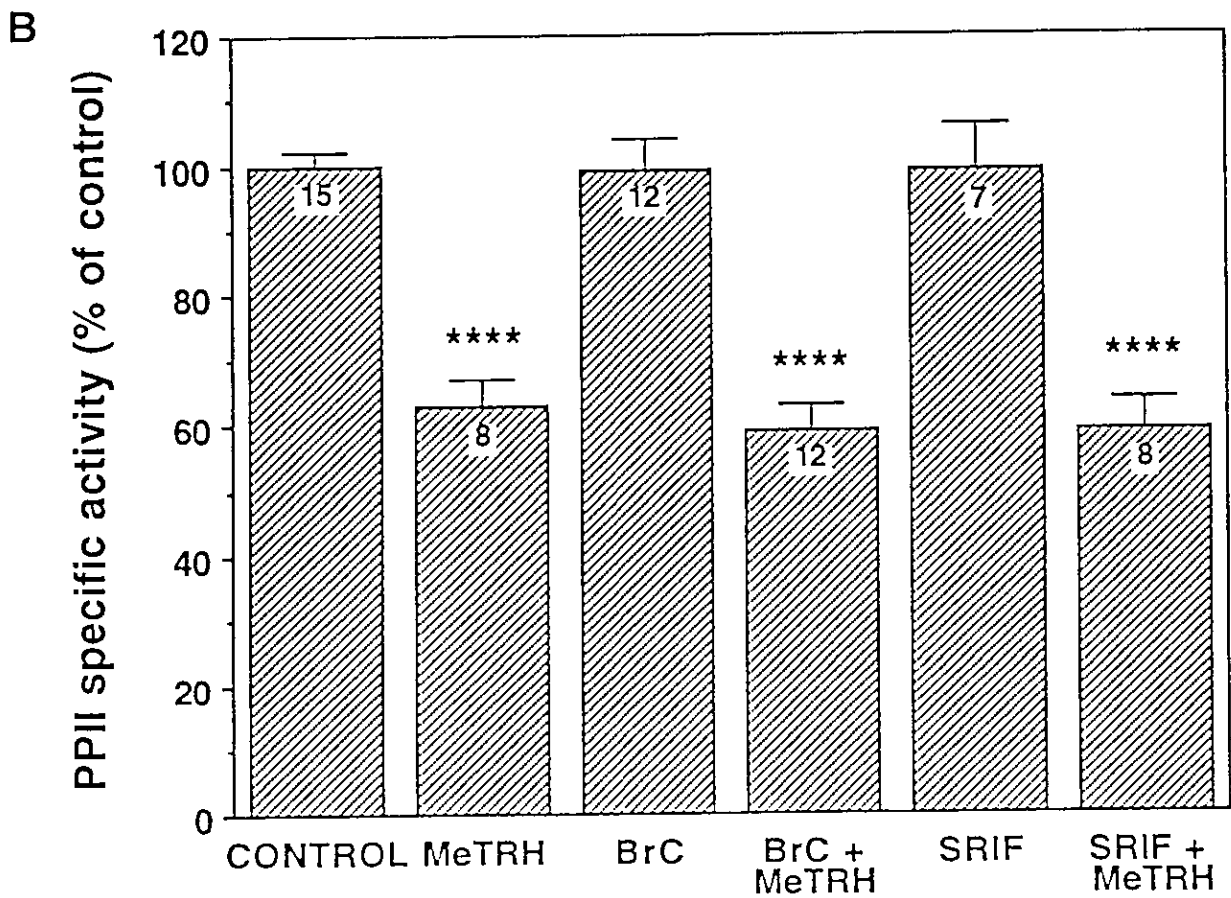
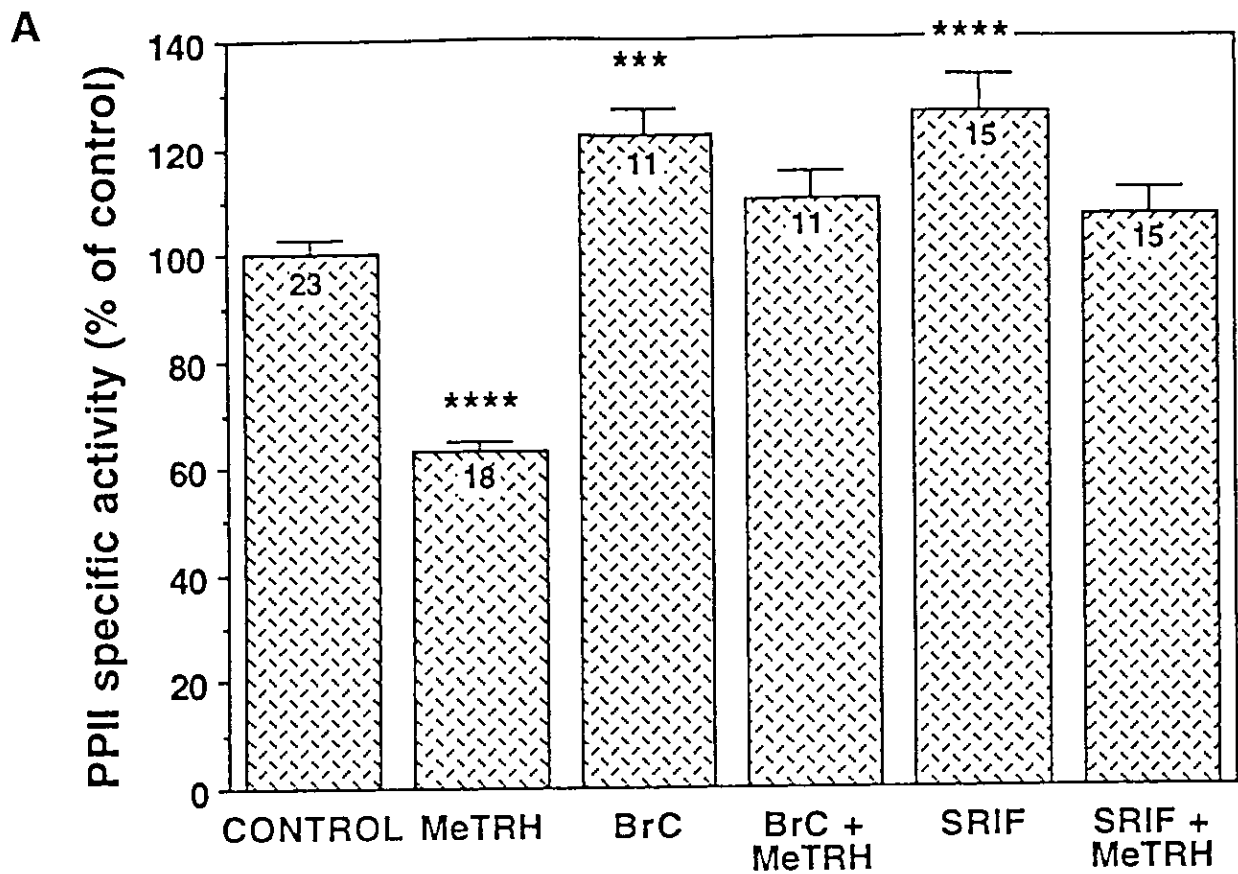
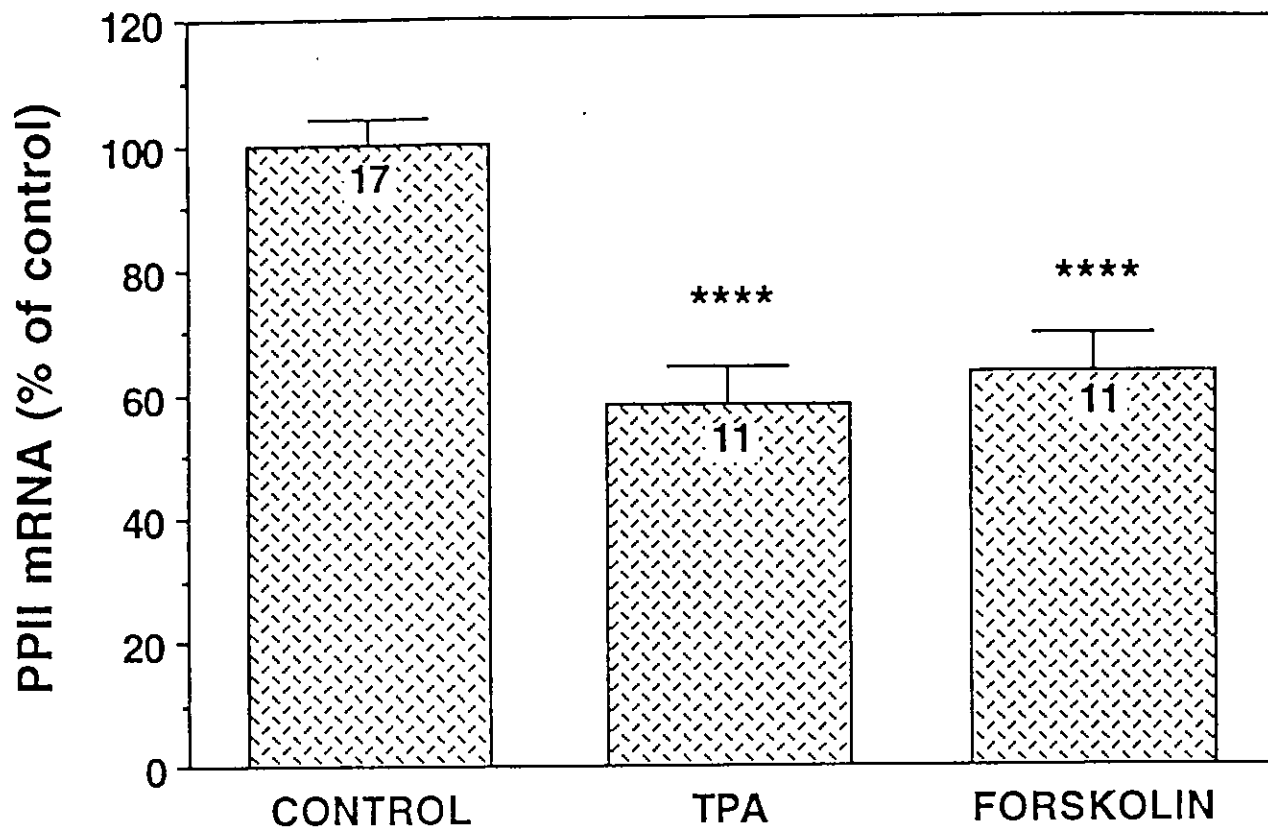


Fig 7

A



B

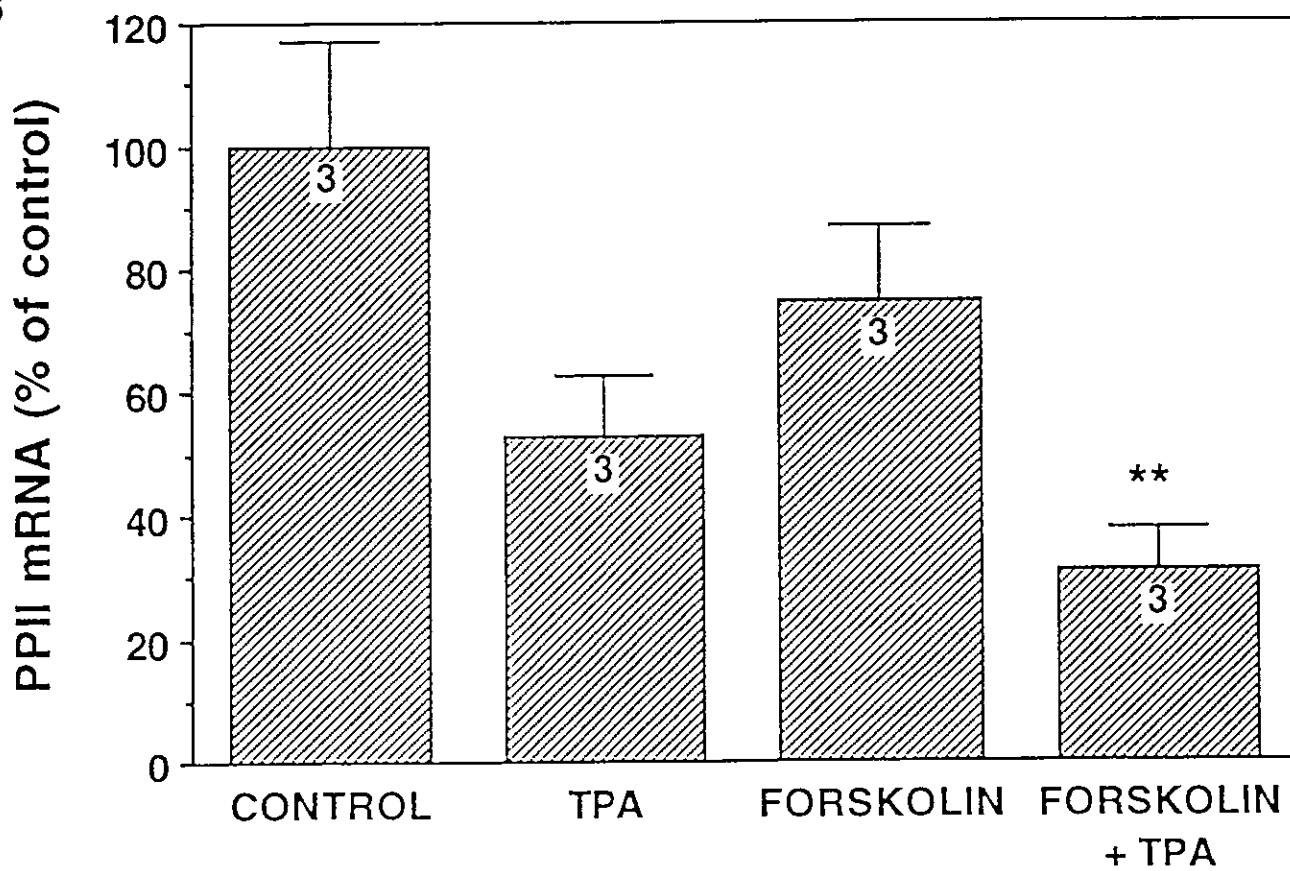


Fig 8

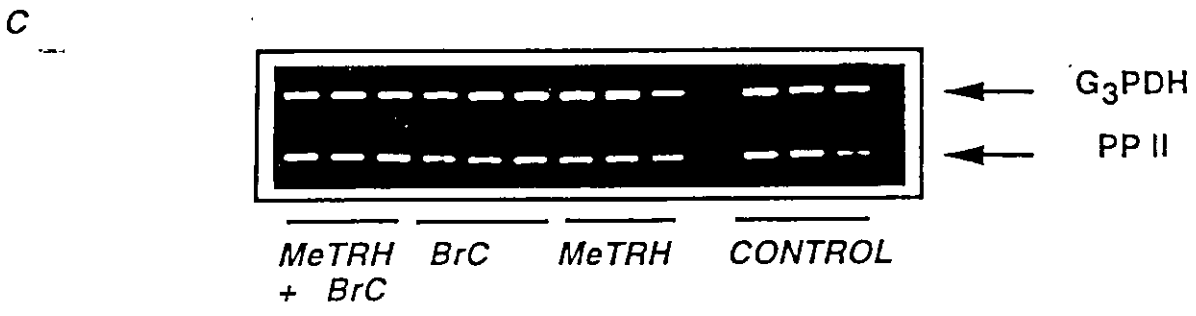
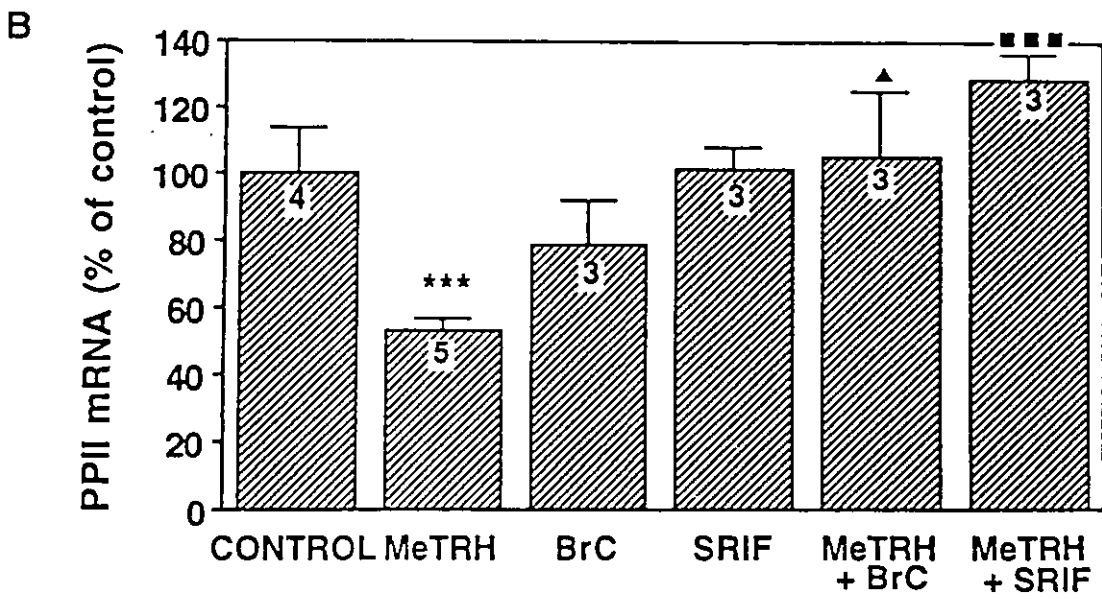
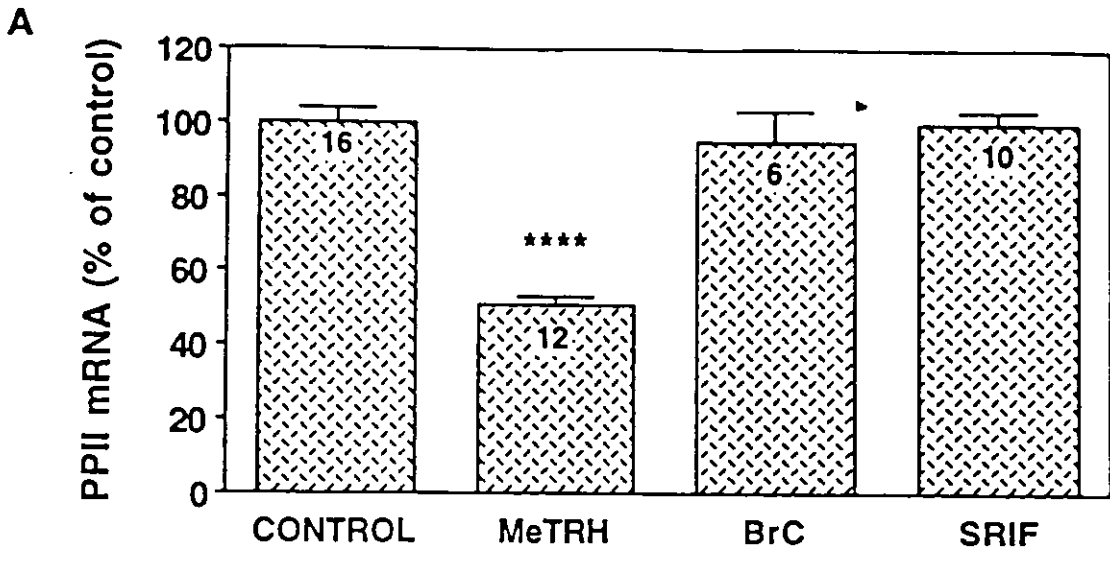


Fig 9