

Melatonina i jej receptory^{*)}

INGA KOWALEWSKA, MAREK KMIEĆ, HANNA KULIG

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt AR,
ul. Doktora Judyma 6, 71-460 Szczecin

Kowalewska I., Kmiec M., Kulig H.

Melatonin and melatonin receptors

Summary

The pineal hormone melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an important regulator of seasonal reproduction and circadian rhythms. Melatonin is synthesized from serotonin, primarily in the pineal gland. The circadian production of melatonin from the mammalian pineal gland is endogenously controlled by the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus, the site of the mammalian circadian pacemaker, and is synchronized by environmental light. In all vertebrates, melatonin is secreted from the pineal gland during the hours of darkness and acts as a hormonal message of the photoperiod. Its effect is mediated via high-affinity melatonin receptors. Two subtypes of mammalian melatonin receptors have been cloned and characterized: the MT1 (Mel1a) and the MT2 (Mel1b) melatonin receptor subtypes. Both subtypes are members of the G protein-coupled receptor family. A third subtype of the high-affinity melatonin receptor was cloned from a chicken brain and termed the Mel1c. Mammalian MT1 is expressed in the hypophyseal pars tuberalis and hypothalamic suprachiasmatic nuclei, the regions of the brain that have been implicated as being important for reproduction and circadian rhythms. MT2 is found in the retina.

Keywords: melatonin, melatonin receptors, pineal gland

Melatonina (N-acetylo-5-metoksytryptamina) jest biologicznie aktywną pochodną aminokwasu – tryptofanu. Związek ten występuje zarówno w świecie zwierzęcym, zachowując swoje podstawowe działanie chronobiologiczne, jak i w świecie roślinnym, gdzie jest obecny prawdopodobnie po to, by chronić rośliny przed złymi warunkami środowiska, takimi jak: skrajne ciepło lub zimno, promieniowanie UV (27). U ssaków głównym organem wydzielania melatoniny jest szyszynka. Sekrecja melatoniny jest rytmiczna, z maksimum wydzielania w godzinach nocnych u wszystkich badanych zwierząt, niezależnie czy zwierzę jest aktywne w dzień, czy w nocy (15). Rola szyszynki zmieniała się w czasie ewolucji kręgowców z fotosensorycznego organu u niższych kręgowców do fotoendokrynologicznego organu u ssaków. Ptasia szyszynka wydaje się środkowym punktem na drodze ewolucji szyszynki (13).

Melatonina jest syntetyzowana z serotoniny (10), na dwustopniowym szlaku zawierającym N-acetylację i O-metylację (16). U ssaków melatonina metabolizowana jest przez hydroksylację w wątrobie, a następnie jest wydalana w formie skoniugowanej z siarczanem. Czas półtrwania melatoniny w osoczu krwi wynosi 10 min., a później następuje szereg hydroksylacji (25). Poza szyszynką, melatonina jest syntetyzowana w wie-

lu różnych organach, takich jak: siatkówka, soczewka, komórki szpiku kostnego, jelito, skóra (24).

U wszystkich gatunków zwierząt poziom melatoniny wzrasta podczas godzin nocnych, bez różnicy czy są one aktywne w dzień, czy w nocy. To czyni melatoninę endokrynnym markerem nocy. Wzrost poziomu melatoniny jest kontrolowany przez długość dnia świetlnego. Długi dzień świetlny, np. w okresie letnim, powoduje, że okres syntezy i wydzielania melatoniny jest niewielki, natomiast krótki dzień świetlny powoduje, że okres syntetyzowania i wydzielania melatoniny jest dłuższy. Jednakże przywrócenie sekrecji melatoniny po zmianie długości dnia świetlnego z długiego na krótki jest stopniowe i może trwać kilka dni lub tygodni, aż zostanie osiągnięty nowy stały stan (25). Regulacja okresu wydzielania melatoniny przez długość dnia świetlnego sprawia, że stężenie tego hormonu jest endokrynnym kalendarzem. Celem działania melatoniny są narządy i informowanie ich o porze roku przez zmianę okresu wydzielania melatoniny.

U ssaków ważną rolę melatoniny jest pośrednia regulacja rytmu sezonowego przez długość dnia świetlnego. Adaptacja do sezonowych zmian, jakie następują w ciągu roku, powoduje, że zwierzęta też żyją w rytmie sezonowym. Sezonowa adaptacja do zmian środowiskowych powoduje zmiany w cyklu reprodukcyjnym, żywieniu, kolorze i jakości futra oraz w przygotowaniu do hibernacji (25). U wszystkich badanych

^{*)} Praca finansowana przez AR w Szczecinie, temat BW/DB/04/2001.

gatunków ssaków adaptacja do sezonowych zmian otaczającego środowiska zależy od obecności szyszynki. U zwierząt pozbawionych szyszynki sezonowe zmiany nie odnoszą się do wszystkiego lub tracą synchronizację z cyklem geofizycznym (25). Sezonowość reprodukcji jest fizjologiczną adaptacją zwierząt dzikich do życia w warunkach sezonowych zmian temperatury i dostępności żywności. Udomowienie doprowadziło do całkowitej utraty adaptacji do zmian sezonowych u bydła i świń, lecz zachowała się ona u wielu eurytermicznych ras owiec, kóz i koni (19).

Melatonina, działająca przez receptory, jest zaangażowana w liczne fizjologiczne procesy składające się na homeostazę okołodobową (12, 17, 27) oraz w regulację ciśnienia krwi (7), onkogenezę (4), fizjologię siatkówki (11), sezonową reprodukcję (2) i fizjologię jajników (5). Należy zwrócić uwagę, że wpływ melatoniny na sezonowość reprodukcji jest wysoko specyficzny gatunkowo (24). Melatonina jest również przeciwutleniaczem, który neutralizuje aktywne formy tlenu oraz reguluje aktywność licznych enzymów odpowiedzialnych za usuwanie aktywnych form tlenu (10).

W 1917 r. C. P. McCord i F. P. Allen wykazali po raz pierwszy biologiczne działanie melatoniny. Uczni ci zaobserwowali, że skóra kijanek żaby *Rana pipens* jaśnieje pod wpływem ekstraktu z szyszynki wołowych (10). Natomiast Lerner i wsp. w 1958 r. po raz pierwszy wyizolowali i zidentyfikowali strukturę związku powodującego agregację melaniny w melanoforach skóry płazów. Związek ten nazwano melatoniną – od nazwy barwnika i komórek wrażliwych na jego działanie (24).

Zdolność melatoniny do agregacji melanosomów w skórze płazów w postaci melanoforów została wykorzystana do sugerowania istnienia receptorów melatoniny, ustalenia struktury aktywności powiązań melatoniny i jej analogów (10) i przedstawienia z wykorzystaniem hodowli tkankowych melanoforów żaby należącej do rodziny żab szponiastych, zwanej płataną (*Xenopus laevis*), działania receptorów melatoniny w hamowaniu cAMP przez połączenie z białkiem G wrażliwym na toksynę krztuśca (26).

Melatonina działa za pośrednictwem specyficznych receptorów o wysokim powinowactwie do melatoniny. Receptory te zostały wykryte i scharakteryzowane w licznych tkankach dzięki autoradiografii *in vitro* i konwencjonalnemu łączeniu z ligandem-[¹²⁵I]-jodomelatoniną (22).

Sklonowanie mRNA z melanoforów płataniny pozwoliło na pierwszą izolację cDNA kodującego receptor melatoniny. To cDNA koduje białko wiążące, które charakteryzuje się wysokim powinowactwem do 2-[¹²⁵I]-jodomelatoniny. Białko to, liczące 420 aminokwasów, ma strukturę helikalną i zawiera 7 obszarów hydrofobowych (9). Receptory te należą do podrodziny receptorów sprzężonych z białkami G, które wykazują niewielką homologię z innymi receptorami (23). Region kodujący receptor melatoniny u ludzi i u owiec

wykazuje 60% homologii z takim regionem u płataniny (17). Największa różnica została stwierdzona w N- i C-końcu klonu ssaków; ten ostatni był krótszy o 65 aminokwasów. Receptory melatoniny u płataniny i ssaków zawierają miejsca N-glikozylacji (reszty asparaginy) w obrębie N-końca białka receptorowego. Natomiast C-koniec posiada kilka potencjalnych miejsc fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową C, która może w ten sposób uczestniczyć w regulacji funkcjonowania receptorów (9).

Rozmieszczenie receptorów melatoniny w centralnym układzie nerwowym różnych gatunków jest badane intensywnie od kilku lat. Specyficzne miejsca wiązania wykryto w części guzowatej przysadki mózgowej i jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza oraz w innych częściach mózgu (jądro przykomorowe wzgórza, kora mózgowa, hipokamp) (3). Receptory melatoniny w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza są zaangażowane w regulację rytmu dobowego przez melatoninę, natomiast receptory zlokalizowane w jądrze przykomorowym podwzgórza pełnią prawdopodobnie funkcję regulacyjną na poziomie limbicznym. Receptory melatoniny zlokalizowane w części guzowatej przysadki mózgowej są prawdopodobnie odpowiedzialne za regulację funkcji sezonowych u gatunków hodowlanych. Natomiast zlokalizowane w tętnicy mózgu i tętnicy krzyżowej pośredkowej mogą być odpowiedzialne za regulację funkcji sercowo-naczyniowych i temperatury, a receptory melatoniny w siatkówce i wzgórku górnym blaszki czworaczej prawdopodobnie regulują funkcje wzrokowe (9).

U ssaków zidentyfikowano tylko receptory Mel_{1a} i Mel_{1b}. Różnica między receptorem Mel_{1a} i Mel_{1b} ssaków dotyczy ich molekularnej struktury (60% homologii aminokwasów), chromosomowej lokalizacji genów, różnicy w farmakologicznej charakterystyce i w ścieżce przekazywania sygnału (20). Trzeci podtyp receptora został sklonowany z kurzego mózgu i nazwany Mel_{1c} (15). Ostatnio Międzynarodowy Związek Farmakologii zmienił nazwę i klasyfikację receptorów Mel_{1a} i Mel_{1b} ssaków na MT1 i MT2. Nomenklatura ta nie zawiera nazewnictwa dla innych gatunków niż ssaki (14). Receptory MT1 i MT2 należą do podrodziny receptorów sprzężonych z białkami G, podczas gdy receptor Mel_{1c} należy do rodziny reduktaz chinonowych (25).

Różnorodność odpowiedzi melatoniny w organizmie może być powodowana faktem istnienia różnych receptorów w różnych tkankach. Stwierdzono obecność receptora melatoniny MT1 w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza i naczyniach serca, gdzie jest on zaangażowany w regulację rytmu dobowego i kurczenie naczyń serca (25). Oprócz wyżej wymienionych regionów, receptor MT1 występuje w innych częściach mózgu i obwodowych tkankach (6). Wyjaśnienie fizjologicznej roli receptorów MT1 w tak wielu tkankach jest wciąż badane.

Oprócz lokalizacji w tak wielu tkankach, fakt, że receptory MT1 mogą być połączone z różnymi typami białek G: $G_{\alpha 2}$, $G_{\alpha 3}$ i $G_{\alpha 9}$ (23), $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha z}$ i $G_{\alpha 16}$ (1) może wyjaśniać różnorodność reakcji w organizmie. Nawet na poziomie komórkowym, melatonina działając przez receptory MT1, może dawać wieloraką odpowiedź. Ponieważ receptory zlokalizowane są w błonie komórkowej, melatonina reguluje funkcjonowanie komórek przez międzykomórkowe wtórne przekaźniki. Na przykład w wielu tkankach melatoninę wykryto podczas wzrostu zewnątrzkomórkowego stężenia cAMP. Melatonina działa też przez inne wtórne przekaźniki, takie jak: $[Ca^{2+}]_i$, cGMP, diacyloglicerol, kinazę białkową C lub kwas arachidonowy, który został opisany w komórkach przysadki i jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza noworodków szczurów, lecz rzadko występuje w innych tkankach (25).

Pierwszy czynnościowy receptor MT1 w tkance ssaków wykryto w siatkówce królika (9). Receptor MT1 charakteryzuje się dużą zdolnością do łączenia się z grupą 5-metoksylogową w pozycji C-5 indolu i N-acetylogową grupą w tej samej pozycji w melatoninie (12). Melatonina i 6-chloromelatonina są nieznacznie mniej skuteczne niż 2-jodomelatonina w hamowaniu uwalniania dopaminy. Metabolit melatoniny 6-hydroksymelatonina i jej prekursor N-acetylo-5-hydroksytryptamina są 100 i 1000 razy (odpowiednio) mniej skuteczne w aktywowaniu receptora melatoniny w siatkówce królika. Podobna relacja struktury i działania melatoniny oraz jej analogów została opisana w melanoforach płazów (9).

U szczurów, w tętnicy krzyżowej pośrodkowej, melatonina odpowiada za zdolność obkurczania naczyń w odpowiedzi na egzogenną noradrenalinę i nerwową stymulację przez aktywację receptora MT1. Inne czynnościowe odpowiedzi melatoniny za pośrednictwem receptora zawierają: przesunięcie w dobowym rytmie wydzielania przez aktywność w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza szczurów oraz inhibicję hormonu uwalnającego gonadotropinę, który indukuje uwalnianie hormonu luteinizującego z przysadki noworodków szczurów (21).

Rola receptora MT2 w fizjologii ssaków, jak również właściwości sygnalizacyjne, stają się jasne wraz z odkryciem selektywnych ligandów dla tego receptora (10). Jak dotąd wiadomo, że receptory MT2 zaangażowane są w fizjologię siatkówki (11), modulowanie rytmu dobowego, rozszerzanie naczyń serca (27). W odróżnieniu od receptorów MT1, receptory te są bardziej ograniczone w swojej lokalizacji, na którą składają się: mózdzek, jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza, siatkówka, nerki, jajniki, naczynia sercowe i różne linie komórek nowotworowych (11). Być może, niewielkie różnice w farmakologicznych i sygnalizacyjnych właściwościach między receptorem MT_1 a receptorem MT_2 mogą być uznane za właściwe wskazówki do zrozumienia działania melatoniny w specyficznych procesach fizjologicznych.

Piśmiennictwo

1. Badura L. L., Goldman B. D.: Central sites mediating reproductive response to melatonin juvenile male Siberian hamsters. *Brain Res.* 1992, 598, 98-106.
2. Barrett P., Conway S., Jockers R., Strosberg A. D., Guardiola-Lemaitre B., Delagrèze P., Morgan P. J.: Cloning and functional analysis of a polymorphic variant of the ovine Mel1a melatonin receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1356, 299-307.
3. Blumenau C., Berger E., Fauteck J. D., Madeja M., Wittkowski W., Speckmann E. J., Mufshoff U.: Expression and functional characterization of the MT1 melatonin receptor from rat brain in *Xenopus* oocytes: evidence for coupling to the phosphoinositol pathway. *J. Pineal Res.* 2001, 30, 139-146.
4. Boidt S. L., McKeon R. M., Li P. K., Witt-Enderby P. A., Melan M. A.: N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1499, 257-264.
5. Clemens J. W., Jarzynka M. J., Witt-Enderby P. A.: Down-regulation of MT1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sci.* 2001, 69, 27-35.
6. Deacon S., Arendt J.: Melatonin-induced temperature suppression and its acute phase-shifting effects correlate in a dose-dependent manner in humans. *Brain Res.* 1995, 688, 77-85.
7. Doolen S., Krause D. N., Dubocovich M. L., Duckles S. P.: Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 1998, 345, 67-69.
8. Dubocovich M. L.: Characterization of a retinal melatonin receptor. *Pharmacol. Exp. Ther.* 1985, 234, 395-401.
9. Dubocovich M. L.: Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol. Sci.* 1995, 16, 50-56.
10. Dubocovich M. L., Benloucif S., Masana M. I.: Melatonin receptors in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *Behav. Brain Res.* 1996, 73, 141-147.
11. Dubocovich M. L., Masana M. I., Jacob S., Sauri D. M.: Melatonin receptor antagonists that differentiate between the human Mel1a and Mel1b recombinant subtypes are used to assess the pharmacological profile of rabbit retina ML1 presynaptic heteroreceptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1997, 355, 365-375.
12. Dubocovich M. L., Yun K., Al-Ghoul W. M., Benloucif S., Masana M. I.: Selective MT2 melatonin receptors antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J.* 1998, 355, 365-375.
13. Fukada Y., Okano T.: Circadian clock system in the pineal gland. *Mol. Neurobiol.* 2002, 25, 19-30.
14. Gaildrat P., Becq F., Falcón J.: First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one? *J. Pineal Res.* 2002, 32, 74-84.
15. Gall Ch. von, Stehle J. H., Weaver D. R.: Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.* 2002, 309, 151-162.
16. Klein D. C., Weller J. L.: Indole metabolism: neural regulation of pineal serotonin:acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1971, 68, 3107-3110.
17. Lai F. P. L., Mody S. M., Young L. Y., Kam J. Y. M., Pang C. S., Pang S. F., Wong Y. H.: Molecular determinants for the differential coupling of $G_{\alpha s}$ to the melatonin MT1, MT2 and *Xenopus* Mel1c receptors. *J. Neurochem.* 2002, 80, 736-745.
18. Liu C., Weaver D. R., Jin X., Shearman L. P., Pieschl R. L., Gribkoff V. K., Reppert S. M.: Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 1997, 19, 91-102.
19. Malapaux B., Vigié C., Skinner D. C., Thiéry J. C., Pelletier J., Chemineau P.: Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 1996, 42, 109-117.
20. Masana M. I., Witt-Enderby P. A., Dubocovich M. L.: Melatonin differentially modulates the expression and function of the hMT₁ and hMT₂ melatonin receptors upon prolonged withdrawal. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 731-739.
21. McArthur A. J., Gillette M., Prosser R. A.: Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res.* 1991, 565, 158-161.
22. Morgan P. J., Barrett P., Howell H. E., Helliwel R.: Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem. Int.* 1994, 24, 101-146.
23. Reppert S. M., Weaver D. R., Godson C.: Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.* 1996, 17, 100-102.
24. Stefulj J., Hortner M., Ghosh M.: Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.* 2001, 30, 243-247.
25. Vanecek J.: Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 1998, 78, 687-721.
26. White B. H., Sekura R. D., Rollag M. D.: Pertussis toxin blocks melatonin induced pigment aggregation in *Xenopus* dermal melanophores. *J. Comp. Physiol.* 1987, 157, 153-159.
27. Witt-Enderby P. A., Bennett J., Jarzynka M. J., Firestine S., Melan M. A.: Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanism. *Life Sci.* 2003, 72, 2183-2198.