

Efecto de la melatonina sobre la unión del [³H]-dibutirato de forbol a la proteína cinasa C

Gloria Benítez-King*
Gerardo Ramírez Rodríguez*
Isabel Martínez Mateos*
María Eugenia Hernández Gutiérrez**
Fernando Antón-Tay*

Summary

Melatonin is a highly lipophilic compound that acts mainly on the Central Nervous System (CNS). Evidence suggesting that the hormone may be involved in psychiatric diseases is growing. However, the precise role of melatonin as well as its usefulness in CNS diseases remain to be elucidated. Currently it is known that melatonin acts as a free radical scavenger and through binding to membranous receptors, calmodulin and nuclear proteins. Melatonin binds to calmodulin and acts as a potent calmodulin antagonist both *in vitro* and *in vivo*. Moreover, recently we described that melatonin activates protein kinase C, a family of eleven isoenzymes that play a key role in cellular physiology. The enzyme has a hydrophobic binding site where activators (diacylglycerol and phorbol esters) bind. In addition, the group A of protein kinase C isoenzymes are activated in the presence of Ca²⁺. In this work we explored the effects of melatonin on phorbol ester ³H-Phorbol, 12,13 dibutirato binding. The results showed that melatonin increased the ³H-PDBu binding to the enzyme by 50 % in the presence of calcium. All indoles tested were ineffective at 1 nM. The results show that besides melatonin binding to calmodulin, the hormone also interacts with protein kinase C and those mechanisms can modify cellular physiology through protein phosphorylation. The results also suggest that intracellular actions of MEL may involve interactions with another hydrophobic and calcium dependent proteins.

Key words: Melatonin, protein kinase C, phorbol esters, calcium.

Resumen

La melatonina es una hormona lipofílica que actúa como un neuromodulador en el sistema nervioso central. Existen evidencias que sugieren que esta hormona podría participar en la patofisiología de algunas enfermedades psiquiátricas. Sin embargo, no se conoce con precisión cómo participa en la etiología de estas enfermedades. De ahí que el estudio de su mecanismo de acción, así como de las respuestas celulares que

causa, sea una estrategia clave para poder entender el papel que tiene en la psiquiatría, y su posible utilidad terapéutica.

En los últimos años, se ha descrito que la señal de melatonina es decodificada por sus células blanco mediante varios mecanismos: por la unión a receptores membranales específicos a proteínas intracelulares y a proteínas nucleares. Una de las proteínas que decodifica la señal de la melatonina, es la calmodulina. La melatonina se une a la calmodulina con alta afinidad y antagoniza su actividad, modulando así, la señal del Ca²⁺. Recientemente se ha descrito que la melatonina activa a la proteína cinasa C, tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta enzima se activa por el diacilglicerol y los ésteres del forbol en presencia de la fosfatidilserina. Una vez activa, la enzima fosforila una gran variedad de sustratos claves para la fisiología celular. Además de activar a la proteína cinasa C, la melatonina sinergiza la activación y la autofosforilación de la enzima causada por el miristato de forbol. Estos resultados, han sugerido que la hormona podría unirse a la proteína cinasa C, y así modular la respuesta de la enzima a los ésteres del forbol. En este trabajo se estudió el efecto de la melatonina sobre la unión del [³H]-dibutirato 12,13 de forbol a la proteína cinasa C y se determinó, si el efecto es dependiente de Ca²⁺. Los ensayos de unión se realizaron con el método de ultrafiltración rápida. Como fuente de proteína cinasa C, se utilizó una fracción cruda de cerebro de rata, obtenida a 100 000 × g de células MDCK. Los resultados obtenidos señalaron que la melatonina (10⁻⁸ M) aumentó en un 50 % la unión del [³H]-dibutirato 12,13 de forbol a la proteína cinasa C, solamente en presencia de Ca²⁺. Con concentraciones mayores (10⁻⁷-10⁻⁵ M) la hormona aumentó la unión del éster del forbol hasta en un 75 %. El efecto de la melatonina sobre la unión del [³H]-dibutirato 12,13 de forbol en la enzima fue específico, ya que el catabolito de la hormona, la 6-hidroxi-melatonina y sus precursores, la N-acetilserotonina y la serotonina no incrementaron significativamente la unión del éster del forbol a la proteína cinasa C en un margen de concentraciones de 10⁻¹¹ a 10⁻⁵ M. El incremento en la unión del [³H]-dibutirato 12,13 de forbol a la proteína cinasa C causado por la melatonina, se observó también en presencia de la fosfatidilserina y con la enzima obtenida de las células epiteliales MDCK. Los resultados apoyan la hipótesis de que la melatonina se une a la proteína cinasa C. Además sugieren, que la hormona podría amplificar la respuesta de los receptores acoplados a la vía del fosfatidilinositol, aumentando así la unión de los activadores de la proteína cinasa C a las isoformas de la enzima, que son dependientes de Ca²⁺.

Palabras clave: Melatonina, proteínas cinasa C, ésteres del forbol, calcio.

* Instituto Mexicano de Psiquiatría, Departamento de Neurofarmacología, D.C. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F.

** Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción, CBS. México, D.F.

Introducción

La melatonina (MEL) es una hormona lipofílica que actúa como un neuromodulador en el sistema nervioso central (6). Su función principal es la de sincronizar la actividad celular con el ciclo luz-oscuridad (18). Existen evidencias que sugieren que esta hormona podría participar en la patofisiología de algunas enfermedades psiquiátricas, tales como los trastornos afectivos, algunos trastornos del sueño, y la esquizofrenia (16). Esta evidencia se basa fundamentalmente en dos tipos de observaciones: primero, que los trastornos afectivos se presentan con alteraciones en algunos ritmos biológicos como son: el ciclo sueño-vigilia, el ritmo de secreción del cortisol, la temperatura corporal, y las variaciones circadianas en el estado de ánimo (20). Segundo, que los niveles circulantes de la MEL se encuentran disminuidos en pacientes con depresión mayor (13), con esquizofrenia (9) y con trastorno obsesivo-compulsivo (16) y aumentados en los pacientes con trastorno de pánico (15), o durante los episodios de manía en pacientes con trastorno bipolar (13). A pesar de esta información, no se conoce con precisión cómo participa la MEL en la etiología de estas enfermedades, ni si puede tener utilidad terapéutica. De ahí, que el estudio del mecanismo de acción de la hormona y de las respuestas celulares que causa, sea una estrategia clave para poder entender el papel que tiene en la patofisiología de las enfermedades psiquiátricas y su posible utilidad terapéutica.

En la actualidad, se considera que la MEL actúa a través de varios mecanismos. La hormona puede actuar como captador de radicales libres (19); por unión a receptores membranales específicos (8,21); a proteínas intracelulares como la calmodulina (2,3); y a proteínas nucleares (7). Estos mecanismos no son excluyentes uno del otro y las respuestas biológicas a la hormona pueden ser mediadas por un mecanismo o por la combinación de varios. Recientemente, se ha descrito que la MEL activa a la proteína cinasa C (PKC) tanto *in vivo* como *in vitro* en presencia de Ca^{++} , con una EC_{50} de 1 nM (4). La PKC es una enzima que fosforila una gran variedad de sustratos claves para la fisiología celular (10). La enzima es activada por el diacilglicerol en respuesta a la estimulación de receptores membranales acoplados a la vía del fosfatidilinositol (10,11). También lo hace por compuestos lipofílicos que cruzan la membrana plasmática y alcanzan el espacio intracelular, tales como los ésteres del forbol (17). Además de activar a la PKC, la MEL sinergiza la activación y la autofosforilación de la enzima causada por el miristato, acetato 12,13 de forbol (PMA) (4). Estos resultados han sugerido que la MEL podría producir respuestas celulares específicas al unirse a la PKC y modular la respuesta de la enzima al diacilglicerol.

En este trabajo se estudió el efecto de la MEL sobre la unión de un análogo del PMA, el [^3H]-dibutirato (12,13) de forbol ([^3H]-PDBu) a la PKC. Los resultados indican que concentraciones fisiológicas de la MEL incrementan la unión del éster del forbol a la PKC en un 50 % en presencia de Ca^{++} . También sugieren que la hormona puede actuar modulando la respuesta de la PKC a segundos mensajeros tales como el Ca^{++} y el diacilglicerol.

Material y métodos

Obtención de una fracción cruda de proteína cinasa C

La fracción cruda de la proteína cinasa C se obtuvo del cerebro de ratas Wistar macho (200 a 220 g) con el método descrito (23). Los animales se sacrificaron por decapitación y se removieron los cerebros. Estos se lavaron dos veces con solución salina a 4 °C, y se homogeneizaron en una solución que contenía 20 mM tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 25 µg/ml aprotinina, 25 µg/ml leupeptina, 0.5 % tritón X-100 y 10 mM de 2-mercaptoetanol (2 ml/cerebro). Los homogenizados se obtuvieron sonicando los cerebros con un ultrasonificador de Cole Palmer a 40 HZ, durante 1 min, a 4 °C. Los homogeneizados se mantuvieron en un baño de hielo durante 30 min, y posteriormente se centrifugaron por 30 min a 100 000 × g. Se determinó la concentración de proteína en el sobrenadante con el método de Lowry (14). En algunos experimentos se preparó la fracción cruda de la PKC a partir de homogeneizados de células MDCK, que se cultivaron de acuerdo al método descrito (1).

Preparación de la melatonina e indoles

Para los ensayos de la unión de [^3H]-PDBu en la fracción cruda de PKC, se preparó una solución de MEL concentrada (10^{-3} M). La hormona se disolvió en 50 µl de etanol y se aforó al volumen deseado con la solución del vehículo (50 mM tris pH 7.6, 20 % glicerol). A partir de la solución concentrada de MEL (10^{-3} M) se hicieron diluciones 1:10 con el vehículo diluido 1:10. La concentración final de etanol en los ensayos fue del 0.01 %. Los análogos de MEL, N-acetilserotonina, 6OH-melatonina y serotonina se disolvieron con el mismo procedimiento descrito para la MEL.

Ensayo de unión del [^3H]-dibutirato- 12,13 de forbol a la proteína cinasa C

El ensayo de unión del [^3H]-PDBu a la fracción cruda de PKC se realizó con modificaciones al método de Tanaka y col (22). Brevemente, alícuotas de la fracción cruda de PKC (3mg/ml) se incubaron a 30 °C, durante 60 min, con 20 nM de [^3H]-PDBu (20 Ci/mmol), 1.4 mM de CaCl_2 o 5 mM de EGTA, 10 mM de acetato de Mg^{2+} , 25 mM tris pH 7.5 en presencia del vehículo, o diferentes concentraciones de MEL (10^{-11} - 10^{-5} M), en un volumen final de 100 µl. La unión inespecífica de [^3H]-PDBu a PKC se determinó en presencia de 3 µM del PDBu frío. La unión se estudió en algunos experimentos, en presencia de 0.1 mg/ml de fosfatidilserina. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de la solución TMC (25 mM tris pH 7.5, acetato de Mg^{2+} , 1.4 mM de CaCl_2) a 4 °C. El [^3H]-PDBu libre se separó del unido mediante el método de ultrafiltración rápida en un cosechador de células de Brandel. Se utilizaron filtros de fibra de vidrio previamente bloqueados con polietilenimina al 0.3 % toda la noche. Los filtros se lavaron 5 veces con 2 ml de solución TMC. Posteriormente se secaron y se contaron en un contador de centelleo líquido de Beckman.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con la prueba t de Student.

Materiales

El [^3H]-dibutirato 12,13 de forbol se obtuvo de NEN-DUPONT, el dibutirato 12,13 de forbol no radioactivo, fue de GIBCO, BRL. La melatonina y el resto de los reactivos se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. Los filtros de fibra de vidrio fueron de Whatmann Co. Las células MDCK se obtuvieron de la American Type Culture Collection.

Resultados

Como se muestra en la figura 1, la MEL a una concentración de 10^{-9} M aumentó la unión del [^3H]-PDBu a la PKC en un 50 %. Con concentraciones mayores (10^{-7} - 10^{-5} M), la MEL aumentó la unión del [^3H]-PDBu hasta en un 75 %. Este efecto se observó solamente en presencia de Ca^{++} , ya que en presencia de un agente quelante del Ca^{++} , el EGTA, no se observó el aumento en la unión del [^3H]-PDBu a la PKC (fig. 1).

La dependencia del Ca^{++} , del incremento en la unión del [^3H]-PDBu a la PKC causado por la MEL, se confirmó cuantificando la cantidad de [^3H]-PDBu unido a la PKC en presencia de diferentes concentraciones del

Ca^{++} . En la figura 2 se muestra que con concentraciones de Ca^{++} superiores a 10^{-7} M se observa el aumento en la unión del [^3H]-PDBu a la PKC en presencia de 10^{-9} M de MEL.

La especificidad de los efectos de la MEL sobre la unión del [^3H]-PDBu a la PKC se probó en presencia de diferentes concentraciones del catabolito de la MEL, la 6-hidroximelatonina, o de sus precursores, serotonina y N-acetilserotonina. Como se observa en la fig. 3, ninguno de estos compuestos probados en el margen de concentraciones de 10^{-11} a 10^{-5} M modificaron la unión del [^3H]-PDBu a la PKC.

Finalmente, en la figura 4, se muestra que la MEL a concentraciones superiores a 10^{-9} M, aumentó en un 50 % la unión del [^3H]-PDBu a la PKC cuando la enzima se estimuló con la fosfatidilserina. En este experimento la PKC se obtuvo de una fracción cruda de las células MDCK. Como control, se desplazó el [^3H]-PDBu con el forbol no radioactivo. En la figura 4 se muestra que el PDBu no radiactivo desplazó la unión del forbol radioactivo con una IC_{50} de 50 nM.

Discusión

Los resultados descritos señalan que la MEL causa un incremento en la unión del [^3H]-PDBu a la PKC; que el aumento en la unión es dependiente de Ca^{++} e independiente de que la enzima provenga del cerebro de la rata o de las células epiteliales MDCK. La PKC es

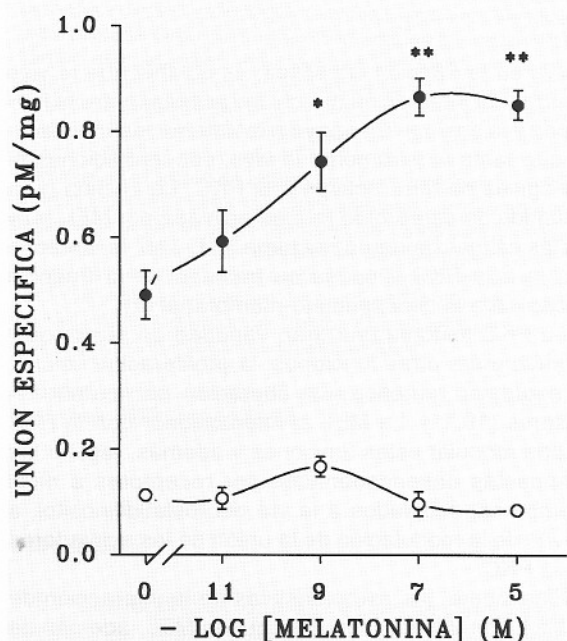


Figura 1. Curva dosis-respuesta del efecto de la melatonina sobre la unión del [^3H]-forbol-12-13 dibutirato a la proteína cinasa C. La fracción cruda de PKC obtenida del cerebro de la rata se incubó con el [^3H]-PDBu, el vehículo o varias concentraciones de MEL. Los ensayos se realizaron en presencia de 1.4 mM de CaCl_2 (●), o 5 mM de EGTA (○). La unión inespecífica se determinó en presencia de 3 μM del PDBu no radioactivo. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de dos experimentos realizados por cuadruplicado * $p < 0.04$, ** $p < 0.01$.

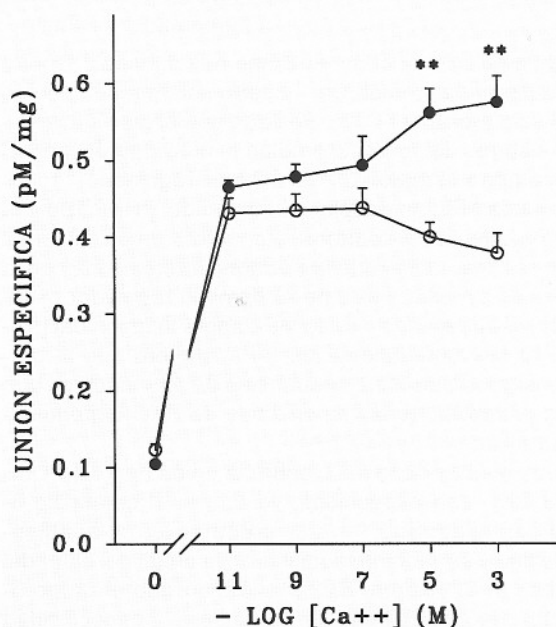


Figura 2. Curva dosis-respuesta del efecto del calcio sobre la unión del [^3H]-forbol-12-13 dibutirato a la proteína cinasa C en presencia de melatonina. La fracción cruda de PKC obtenida del cerebro de la rata se incubó con el [^3H]-PDBu, el vehículo (○) o 1 nM de MEL (●), y varias concentraciones de Ca^{++} . La unión inespecífica se determinó en presencia de 3 μM del PDBu no radioactivo. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de dos experimentos realizados por cuadruplicado ** $p < 0.005$.

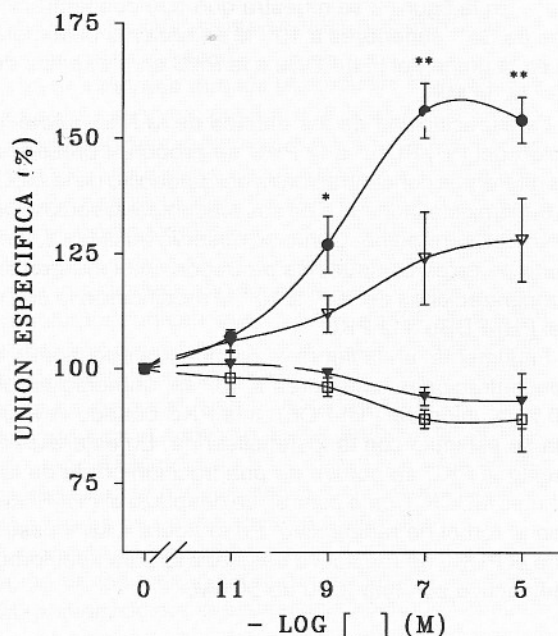


Figura 3. Curva dosis-respuesta del efecto de algunos análogos de la melatonina sobre la unión del $[^3\text{H}]$ -forbol-12-13 dibutirato a la proteína cinasa C. La fracción cruda de PKC obtenida del cerebro de la rata se incubó con el $[^3\text{H}]$ -PDBu, 1.4 mM de CaCl_2 , el vehículo, varias concentraciones de MEL (●), o los análogos de MEL, 6OH-MEL (▼), N-acetilserotonina (□) y serotonina (▽). La unión específica en presencia del vehículo fue de 0.51 ± 0.016 pm/mg de proteína y representa el 100 % de unión a la PKC. La unión inespecífica se determinó en presencia de 3 μM del PDBu no radioactivo. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de dos experimentos realizados por cuadruplicado * $p < 0.04$, ** $p < 0.01$.

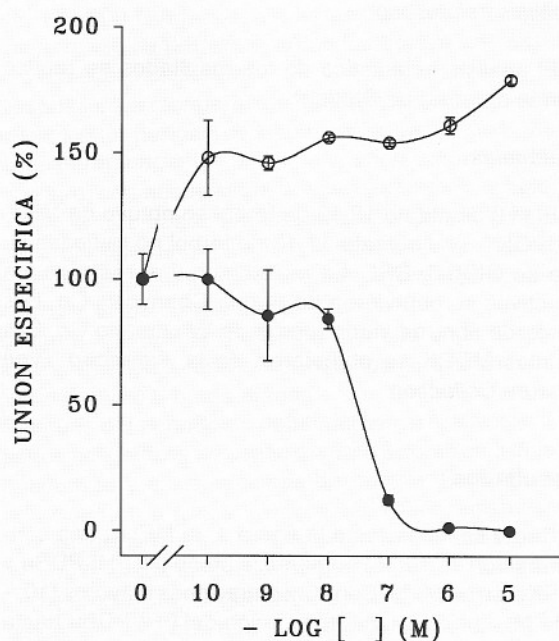


Figura 4. Curva dosis-respuesta del efecto de la melatonina sobre la unión del $[^3\text{H}]$ -forbol-12-13 dibutirato a la proteína cinasa C en presencia de fosfatidilserina. La fracción cruda de PKC obtenida de cultivos de células MDCK se incubó en presencia de 1.4 mM de Ca^{++} , con el $[^3\text{H}]$ -PDBu, el vehículo, varias concentraciones de MEL (○), o PDBu no radioactivo (●). La unión específica en presencia del vehículo fue de 0.13 ± 0.0041 pm/mg de proteína y representan el 100 % de unión a la PKC. La unión inespecífica se determinó en presencia de 3 μM del PDBu no radioactivo. Los datos representan la media $\pm$ S.E.M. de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

una familia de once isoenzimas relacionadas. Cuatro son dependientes de Ca^{++} , cuatro son independientes y 3 son atípicas (11,12). Se sabe que el diacilglicerol y los ésteres del forbol estimulan la actividad de la PKC por unión a la región C1 del dominio regulador (11,12). El que la MEL no desplace la unión del $[^3\text{H}]$ -PDBu a la PKC y que, por el contrario, aumente la unión del forbol a la enzima, indica que la hormona interacciona con la PKC en un sitio diferente al dominio regulador. Además, el que el efecto de la MEL sobre la unión del $[^3\text{H}]$ -PDBu sea dependiente de Ca^{++} , sugiere que la hormona podría unirse a secuencias de aminoácidos que son privativas de las isoenzimas de PKC dependientes de Ca^{++} .

Los efectos de la MEL sobre la unión del $[^3\text{H}]$ -PDBu a la PKC son específicos, ya que ni el catabolito 6-hidroximelatonina, ni sus precursores N-acetilserotonina y serotonina modificaron la unión del éster del forbol en la enzima. Se ha sugerido que el grupo 5-metoxi de la MEL es quien le confiere la especificidad estructural a la hormona (2,5,8). Los datos reportados aquí, apoyan que este grupo es el que confiere la especificidad de la interacción de la MEL con la PKC, ya que la hidroxilación en la posición seis del anillo indólico, o los análogos carentes del grupo metoxi, no interaccionan con la PKC. Además, dado que la MEL es una hormona lipofílica que cruza la membrana plasmática (3), y que su interacción con la PKC se ob-

serva en la fracción citosólica, es posible que *in vivo* ocurra una interacción directa intracelular entre la hormona y la enzima. En apoyo a lo anterior, se ha descrito que tanto *in vitro* como *in vivo*, concentraciones fisiológicas de MEL activan a la PKC. La enzima pura obtenida de cerebro de rata es activada por MEL (4) y en las células de neuroblastoma N1E-115, la hormona activa a la PKC y causa su traslado de la fracción citosólica a la citoesqueleto-membranal (4).

La PKC fosforila una gran variedad de sustratos y modula entre otras funciones, la proliferación celular, la expresión genética y la liberación de neurotransmisores (10,11). La MEL al interaccionar con la PKC podría modular estas funciones y además, regular las respuestas desencadenadas por receptores a nivel membranal acoplados a la vía del fosfatidilinositol, a través de la modulación de la unión de los activadores de la PKC.

Finalmente, las características de la interacción de la MEL con la PKC, sugieren que la MEL, además de unirse a la calmodulina (2), actúa en el espacio intracelular sobre otras proteínas hidrofóbicas dependientes de Ca^{++} .

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, donativo No. 1781-N9210.

REFERENCIAS

1. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin effects on cytoskeletal organization of MDCK and N1E-115 cells. *J Pineal Res*, 9:209-220, 1990.
2. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Binding of 3Hmelatonin to calmodulin. *Life Sci*, 53:201-207, 1993.
3. BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49:635-641, 1993.
4. BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F: Role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmodulin and protein kinase C. *Front Horm Res*, (en prensa).
5. BENITEZ-KING G, RIOS A, MARTINEZ A, ANTON-TAY F: In vitro inhibition of Ca^{++} calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1290:191-196, 1996.
6. CARDINALI DP: Melatonin a mammalian pineal hormone. *Endocr Rev*, 2:327-354, 1981.
7. CARLBERG C, WIESSENBERG I: The orphan receptor family RZB/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J Pineal Res*, 18:171-178, 1995.
8. DUBOCOVICH ML: Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Tips*, 16:50-56, 1995.
9. FANGET F, CLAUSTRAT B, DALERY J, BRUN J, TERRA JL, MARIE-CARDINE M, GUYOTAT J: Nocturnal plasma melatonin levels in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*, 25:499-501, 1989.
10. HUANG KP, FREESIA LH: How is protein kinase C activated in CNS. *Neurochem Int*, 22:417-433, 1993.
11. HUANG KP: The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci*, 12:425-432.
12. KAIBUCHI K, FUKUMOTO T, OKU N, TAKAI Y, ARAI K, MUROMATSU M: Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J Biol Chem*, 264:13489-13496, 1989.
13. LAM RW, BERKOWITZ AL, BERGA SL, CLARK CM, KRIPKE DF, GILLIN JC: Melatonin suppression in bipolar and unipolar mood disorders. *Psychiatry Research*, 33:129-134, 1990.
14. LOWRY OH, ROSENBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
15. MCINTYRE IM, JUDD FK, BURROWS GD, ARMSTRONG SM, NORMAN TR: Plasma concentrations of melatonin in panic disorder. *Am J Psychiatry*, 147:462-464, 1990.
16. MILES A, PHILBRICK DRS: Melatonin and psychiatry. *Biol Psychiatry*, 23:405-425, 1988.
17. NISHIZUKA Y: Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB Journal*, 9:484-496, 1995.
18. REITER RJ: Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, 12:151-180, 1991.
19. REITER RJ, POEGGELER B, TAN DX, CHEN LD, MANCHESTER LC, GUERRERO JM: Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Letts*, 15:103-116, 1993.
20. SIDNEY H, KENNEDY MB, SPENCER TMD, GAIL M, GREGORY MB: Melatonin and cortisol "switches" during mania, depression, and euthymia in a drug-free bipolar patient. *The Journal of nervous and Mental Disease*, 177:300-303, 1989.
21. STANKOV B, FRASCHINI F, REITER RJ: Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Rev*, 16:245-256, 1991.
22. TANAKA Y, MIYAKE R, KIKKAWA U, NISHIZUKA Y: Rapid assay of binding of tumor-promoting phorbol esters to protein kinase C. *J Biochem*, 99:257-261, 1986.
23. VERNET O, ROSTWOROWSKI K, SHERWIN AL: Protein kinase C activity and subcellular distribution in rat brain following repeated electroconvulsive seizures. *Exp Neurol*, 115:297-301, 1992.