

## Efecto de la melatonina sobre la actividad de la proteína cinasa C y la multiproteína cinasa II dependiente de calmodulina

Gloria Benítez-King,\* Lourdes Huerto-Delgadillo,\* Aída Martínez Hernández,\* Fernando Antón-Tay\*\*

### Summary

Melatonin, a phylogenetic highly conserved molecule, has been demonstrated to be a synchronizing signal in vertebrates, invertebrates and even in unicellular organisms. The hormone has a chronobiotic role in mediating clock and calendar information related to the light-dark cycle. Also, it has been suggested that it plays an important role in mental disorder physiopathology. Actually, the knowledge about the biological function and physiological significance of melatonin is still substantially expanding. However, its mechanisms of action remain unclear. We demonstrated recently, that melatonin acts intracellularly by calmodulin modulation. Calmodulin has been shown to be a multifunctional protein modulator.  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin complex acts directly by interacting with key target enzymes (adenylate cyclase, phosphodiesterase, etc) and structural proteins (i.e. Microtubule binding proteins [MAPs], and tubulin), and indirectly, via specific protein kinases. Among these, multiprotein kinase II has a broad substrate specificity and, through phosphorylation, modulates lipid and carbohydrate metabolism, neurotransmitter synthesis and release, cytoskeletal structure, calcium homeostasis, and gene expression. In this work we studied melatonin effects on the calmodulin dependent multiprotein kinase II activity. Since other calmodulin antagonists have shown to inhibit protein kinase C activity, we also tested melatonin effects on this enzyme activity.

Our results point out that at physiological concentration ( $10^{-9}$ ) melatonin inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin dependent multiprotein kinase II activity by 40 % ( $p < 0.01$ ). In addition, the hormone was able to directly activate protein kinase C, differently to the well known calmodulin antagonists trifluoperazine and W-7 which already have been described to have an inhibitory effect. These data support the previously described melatonin calmodulin antagonist effect, and suggest that melatonin could also binds to another intracellular functional proteins, modulating their activity. The results also suggest that melatonin could synchronize cell activity with the dark-light cycle by regulating protein phosphorylation, and act as a crosstalk signal regulator between two transduction pathways.

### Resumen

La melatonina actúa como un regulador cronobiológico en los vertebrados, invertebrados y en el ser humano, sincronizando la actividad biológica del organismo con el ciclo luz-oscuridad. De ahí que se ha sugerido que la hormona tiene un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas que se presentan con alteraciones de los ritmos circadianos. En la actualidad, el conocimiento acerca del efecto modulador de la melatonina sobre la fisiología celular se encuentra en expansión, aun cuando la información sobre su mecanismo de acción es escasa. Hay evidencia que indica que la melatonina actúa a nivel celular por medio de varios mecanismos. Uno de ellos, propuesto por nuestro grupo, involucra la modulación intracelular de la actividad de la calmodulina por la melatonina. La calmodulina modula directa o indirectamente un amplio espectro de funcio-

\* Departamento de Neurofarmacología. División de Investigaciones Clínicas, Instituto Mexicano de Psiquiatría Calz. México-Xochimilco No. 101, San Lorenzo Huipulco, 14370 México.

\*\* Departamento de Biología de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Av. Michoacán y Purísima S/N Col. Vicentina Iztapalapa, 09340 México D.F.

nes celulares. En forma directa, activando enzimas tales como la fosfodiesterasa, la adenilato ciclasa, etc. e indirectamente, modulando la fosforilación de sustratos específicos al activar a la multiproteína cinasa II. Esta enzima fosforila una gran variedad de sustratos regulando funciones tales como el metabolismo de lípidos y carbohidratos, la síntesis y liberación de neurotransmisores, la funcionalidad del citoesqueleto, la homeostasis del calcio, y la expresión genética. En este trabajo se estudió el efecto de la melatonina sobre la actividad de la multiproteína cinasa II  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina dependiente. Además, como se ha descrito que otros antagonistas de calmodulina (trifluoperazina y compuesto W-7) inhiben a la proteína cinasa C, se estudiaron los efectos de la hormona sobre la actividad de esta enzima. Los resultados obtenidos señalaron que las concentraciones fisiológicas de la melatonina inhiben la actividad de la multiproteína cinasa II en un 40% ( $p < 0.01$ ) y activan directamente a la proteína cinasa C ( $p < 0.007$ ), en contraste con los antagonistas de la calmodulina (trifluoperazina y W-7), que inhiben la actividad de ambas enzimas. Estos datos confirman que la melatonina actúa como un antagonista de la calmodulina al inhibir la actividad de la multiproteína cinasa II y sugieren que la hormona es también capaz de unirse intracelularmente a otras proteínas funcionales, modulando su actividad. La melatonina podría sincronizar la actividad celular con el fotoperíodo por medio de una modulación selectiva de la fosforilación de proteínas y probablemente modula las respuestas desencadenadas por segundos mensajeros al actuar como un enlace de información cruzada entre dos caminos de traducción de señales, el del calcio y el del fosfatidil inositol.

## Introducción

La melatonina (MEL), es la hormona secretada por la glándula pineal más estudiada. Es una molécula lipofílica, filogenéticamente conservada,<sup>6,24</sup> y por sus características fisicoquímicas cruza las barreras biológicas y es capaz de penetrar en todos los compartimentos celulares.<sup>23,32</sup> La MEL es secretada durante la noche y constituye la señal que informa al organismo de la duración del periodo de oscuridad, sincronizando su actividad biológica con el fotoperíodo.<sup>15</sup> El papel de la MEL como regulador cronobiológico se ha demostrado en vertebrados, invertebrados y organismos unicelulares.<sup>14</sup> También se ha sugerido que desempeña un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas que se presentan con alteraciones en varios ritmos circadianos.<sup>28</sup> En la actualidad, el conocimiento acerca de la función moduladora de la MEL sobre la fisiología celular se encuentra en expansión. Sin embargo la información existente sobre su mecanismo de acción es escasa. La evidencia acumulada hasta ahora, sugiere tres mecanismos de acción de MEL a nivel celular. El primero de ellos propone que la señal de MEL es percibida por un receptor a nivel membranar. Aun cuando se han descrito sitios de alta afinidad en el sistema nervioso central (SNC) y en tejidos periféricos,<sup>14,24,29</sup> no se ha logrado aislar y purificar el receptor y tampoco se han podido establecer las vías de traducción de esta señal al medio intracelular. El segundo mecanismo propone que la MEL actúa como un captador de radicales libres.<sup>32</sup> La hormona, al donar electrones, repara las biomoléculas dañadas, por lo que se ha sugerido que este mecanismo previene el desarrollo tumoral y el proceso de envejecimiento. El tercer mecanismo propuesto por nuestro grupo, indica que la MEL actúa intracelularmente modulando la actividad de la calmodulina (CaM).<sup>12</sup> La hormona actúa como antagonista de la CaM, inhibiendo su actividad por

unión directa. La unión MEL-CaM es de alta afinidad y depende de la presencia de calcio.<sup>11</sup> Esta unión inactiva el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, produciendo una inhibición de la actividad dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM de la fosfodiesterasa de AMPc y de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>4,8</sup> Por el efecto antagónico de la MEL sobre la CaM también se previene el efecto inhibitorio del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM sobre la polimerización de tubulina *in vitro*, produciendo un alargamiento de los microtúbulos.<sup>4</sup>

En las células en cultivo se ha demostrado que la MEL incrementa los niveles totales de CaM y los concentra en compartimentos celulares específicos.<sup>8,9</sup> En las células MDCK, la hormona modifica la distribución subcelular de la CaM y la traslada del compartimento citosólico al membranar.<sup>9</sup> Este efecto es reversible y se establece después de 6 horas de incubación con la hormona. Durante la fase de crecimiento logarítmico, en las células MDCK y N1E-115, expuestas por periodos largos (días) al estímulo de la melatonina, se incrementan los niveles totales de CaM.<sup>8</sup> Este incremento está relacionado con un aumento en la proliferación celular que se sabe es un proceso que depende de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM. Recientemente demostramos que la síntesis de CaM en la fase de crecimiento logarítmico aumenta en las células MDCK incubadas con MEL.<sup>10</sup> Esto se debe a un incremento en los niveles de RNAm, específicos de CaM, sugiriendo que la MEL también actúa a nivel nuclear modulando la expresión genética.<sup>27</sup>

Dado que la CaM es una proteína ubicua<sup>30</sup> que modula un amplio espectro de funciones celulares, el mecanismo de acción de MEL, por medio de la modulación de CaM, constituye un modelo plausible que puede explicar los efectos pleiotrópicos que la hormona produce en diferentes tipos celulares.<sup>14</sup> Entre las enzimas que son activadas por la CaM se encuentra la multiproteína cinasa II (MPKII).<sup>17</sup> Esta enzima fosforila una gran variedad de sustratos, regulando funciones tales como el metabo-

lismo de lípidos y carbohidratos, la síntesis y liberación de neurotransmisores, la funcionalidad del citoesqueleto, la homeostasis del calcio, y la expresión genética.<sup>22</sup> En este trabajo se estudió el efecto de la MEL sobre la actividad de la MPKII  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM dependiente. Además como se ha descrito que otros antagonistas de CaM (trifluoperazina y compuesto W-7) inhiben a la proteína cinasa C (PKC),<sup>18</sup> se estudiaron los efectos de la hormona sobre la actividad de esta enzima.

## Material y métodos

Obtención de la multiproteína cinasa II. La MPKII se obtuvo del cerebro de la rata, con modificaciones en el método descrito.<sup>34</sup> Diez ratas wistar macho fueron decapitadas y se les disecó el cerebro. Los cerebros se lavaron con PBS (0.128 M NaCl, .010 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.004 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dos veces y se homogeneizaron en 50 mM tris, 10 mM EGTA, 10 mM EDTA, 2 mM mercaptoetanol, 0.5% de tritón X-100 y 0.32mM de PMSF pH 7.2 en un ultrasonicador Cole-Palmer (set 40/30 sec) a razón de 2 ml/cerebro. El homogenado se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm a 4°C, y el sobrenadante se centrifugó a 100 000 x g durante 30 min. El sobrenadante de 100 000 x g se separó en una columna (1.5 cm x 10 cm) de sepharosa S de intercambio catiónico y flujo rápido (farmacia), previamente equilibrada con 50 mM tris, 2mM de mercaptoetanol pH 7.2 a un flujo de 40 ml/h. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un gradiente discontinuo de 150 y 350 mM de NaCl. Se determinó la concentración de proteínas en cada fracción con el método de Lowry.<sup>26</sup> Las fracciones eluidas con 150 mM de NaCl tuvieron la mayor actividad de MPKII y se guardaron en alícuotas con 10% de glicerol y 2 mM de  $\text{CaCl}_2$  a -70 °C.

Determinación de la actividad de la multiproteína MPKII dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina. La actividad de la MPKII dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se determinó con modificaciones en el método descrito.<sup>34</sup> La reacción se llevó a cabo en 20 mM tris pH 7.2, 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10 mM acetato de  $\text{Mg}^{2+}$ , 20 uM del inhibidor de PKC (péptido 19-36), 1 uM de CaM, 20 uM de ATP y 25 uCi/ml de  $\text{ATP}^{32}$  (3000 Ci/mMola), en un volumen final de 25 ul. Como sustrato se utilizó el syntide 2, y como fuente de enzima se utilizó 1 ug de proteína eluida de la columna de sepharosa S, con 150 mM de NaCl. La actividad independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM se determinó en presencia de 5 mM de EGTA o en ausencia de CaM. La mezcla de reacción se incubó en presencia de varias concentraciones de MEL ( $10^{-5}$  a  $10^{-11}$  M) o el vehículo (20 mM tris pH 7.2, 2% glicerol) durante 5 min a 30°C. La reacción se detuvo colocando las muestras (5 ul) sobre papel de

fosfoceulosa.<sup>35</sup> Las muestras se secaron y los papeles se lavaron tres veces con ácido fosfórico 75 mM. La radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de centelleo líquido Beckman.

Obtención de la proteína cinasa C. La PKC se obtuvo de células MDCK cultivadas como se describió anteriormente.<sup>7</sup>  $5 \times 10^6$  células cultivadas en 2 cajas de 75  $\text{cm}^2$  se lavaron dos veces con PBS y se homogeneizaron en 0.5 ml de 20 mM tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 25 ug/ml de leupeptina, 25 ug/ml de aprotinina, 0.5 % de tritón X-100 y 10 mM de mercaptoetanol en un ultrasonicador de Cole-Palmer. El homogenado se incubó 30 min en un baño de hielo y posteriormente se centrifugó durante 2 min a 10 000 rpm en una microfuga de Beckman. El sobrenadante se separó en una columna de DEAE celulosa previamente equilibrada con 20 mM de tris pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 10 mM mercaptoetanol. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con la solución de equilibrio y NaCl 0.2 M. En esta fracción se obtuvo la actividad de la PKC.

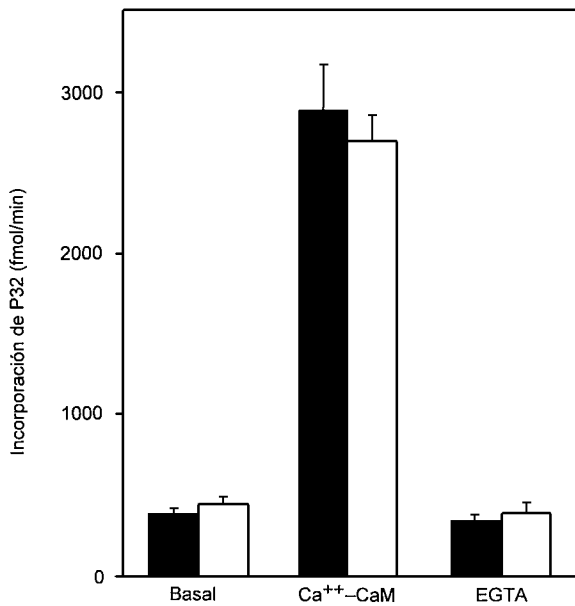
Determinación de la actividad de la proteína cinasa C. La actividad de la PKC se determinó con un estuche comercial (GIBCO BRL) midiendo la incorporación de fosfato radioactivo a un sustrato específico de PKC. La reacción se llevó a cabo en presencia de MEL, trifluoperazina (TFP), W7, estaurosporina o vehículo. Como sustrato se utilizó el péptido sintético de la proteína básica de mielina Ac-MBP<sup>4,14</sup> y como donador de grupos fosfato se utilizó ATP-P.<sup>32</sup> La enzima se estimuló con 10 uM de acetato de forbol 12-miristato (PMA) y 280 ug/ml de fosfatidil serina (PS) y como control, se inhibió con el péptido altamente específico PKC.<sup>19,36</sup>

Análisis estadístico; los datos se analizaron con la prueba de t de Student.

## Resultados

La actividad de la MPKII se determinó en la fracción de proteínas eluida de una columna de sepharosa S con 150 mM de NaCl (fracción 150). Como se muestra en la Figura 1, la incorporación de  $\text{P}^{32}$  se estimuló 600 veces en presencia de CaM. Este incremento se abolió al quelar el  $\text{Ca}^{2+}$  con EGTA e inactivar a la CaM (fig 1). Debido a que la fracción 150 contiene otras cinasas y que el syntide 2 es sustrato tanto de la MPKII como de la proteína cinasa C, los efectos de la MEL sobre la actividad de la multiproteína cinasa II se probaron en presencia de un inhibidor específico de la PKC. Como se observa en la figura 1, la activación de la MPKII por CaM no se modificó en presencia del inhibidor de PKC.

En la figura 2 se muestra el efecto de la MEL sobre la actividad de la MPKII dependiente de CaM. La MEL a una concentración de  $10^{-9}$ M inhibió significativamente



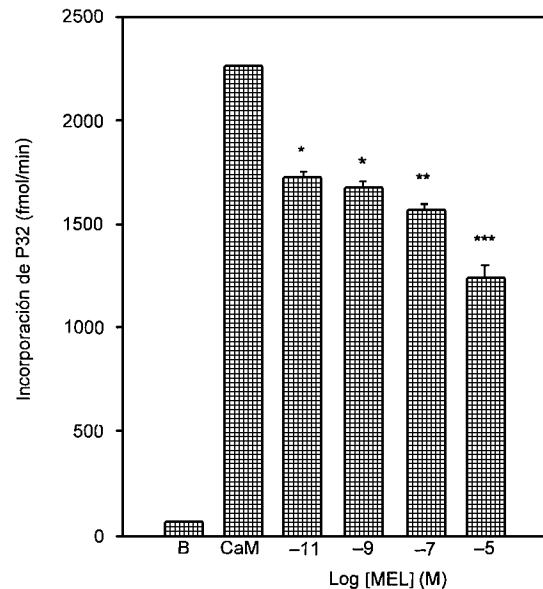
**Figura 1.** Determinación de la actividad de la multiproteína cinasa II en la fracción 150 separada en una columna de sepharosa S. 1  $\mu$ g de proteína separada en una columna de sepharosa S y eluida con 150 mM de NaCl, se incubó como se describió en métodos en ausencia de CaM (Basal), en presencia de 1  $\mu$ g de CaM (Ca<sup>2+</sup>-CaM), o en presencia de 1  $\mu$ g de CaM y 5 mM de EGTA. Todas las muestras se incubaron con 1 mM de CaCl<sub>2</sub><sup>+</sup> en presencia (□) o (■) ausencia de inhibidor de PKC. Los resultados son la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado  $\pm$  el error estandar.

la actividad de la enzima en un 40% ( $p < 0.01$ ). El efecto tuvo una relación dosis-respuesta (Fig. 2).

Debido a que se ha descrito que los antagonistas de CaM, además de inhibir la actividad de la CaM también inhiben la actividad de la PKC,<sup>18</sup> se compararon los efectos de la MEL sobre la actividad de esta enzima con los producidos por dos antagonistas de CaM (TFP, y W-7) y por dos inhibidores específicos de la PKC (estaurosporina y H-7). Como se esperaba, la TFP (fig. 3D y 3E), el W-7 (fig. 3H y 3I), la estaurosporina (fig. 3J y 3K) y el H-7 (fig. 3F y 3G) abolieron completamente la actividad de la PKC estimulada por PMA y PS (fig. 3A). Sorpresivamente, la MEL incrementó en un 30% la actividad de la enzima con concentraciones de 10<sup>-9</sup> y 10<sup>-7</sup>M ( $p < 0.007$ ) (fig. 3B y 3C).

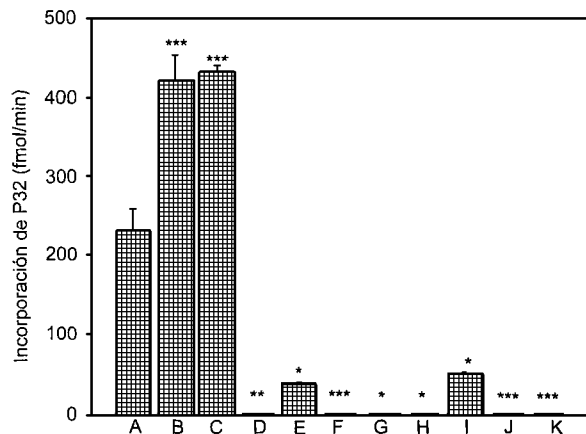
En la figura 4 se muestra la curva dosis-respuesta del efecto de la MEL sobre la actividad de la PKC semipurificada y estimulada con PMA y PS. Con todas las concentraciones probadas de MEL (10<sup>-11</sup> a 10<sup>-5</sup>M) se observó el efecto estimulador sobre la actividad de la PKC. Sin embargo se obtuvo una curva dosis respuesta en forma de campana, con el máximo de estimulación con 10<sup>-8</sup>M de MEL.

El efecto directo de la MEL sobre la actividad de PKC, se probó con la enzima pura, sin estimular con PMA y PS. En estas condiciones, la MEL incrementó la actividad de la enzima con una relación dosis-respuesta

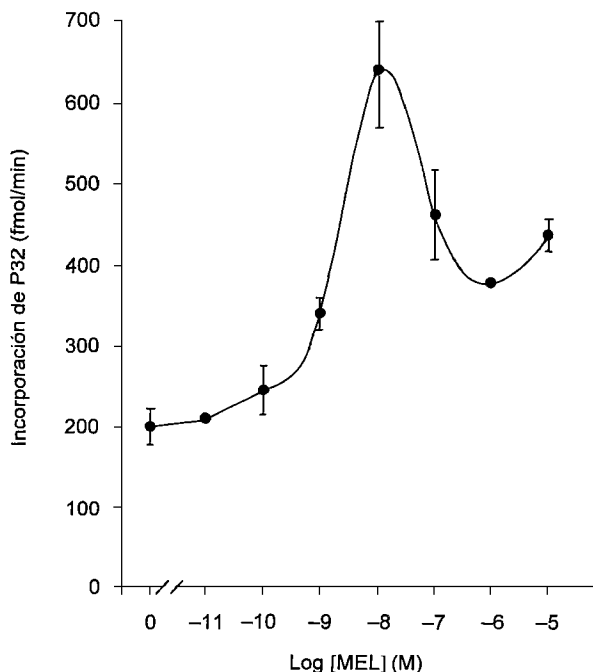


**Figura 2.** Efecto de la melatonina sobre la actividad de la multiproteína cinasa II dependiente de calmodulina. La enzima presente en la fracción 150 (1  $\mu$ g) se incubó con vehículo y varias concentraciones de MEL según se describió en métodos. Los resultados son la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado  $\pm$  el error estandar. Los niveles de significancia se determinaron con la prueba de t de Student: \*  $p < 0.03$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.007$ .

obteniéndose el máximo de estimulación con la concentración más alta de hormona probada (10<sup>-5</sup>M). Con concentraciones de 10<sup>-13</sup> a 10<sup>-9</sup> de MEL y en presencia de PMA y PS se sinergizó el efecto estimulador de la hormona sobre la actividad de la enzima (fig 5). Con con-



**Figura 3.** Efecto comparativo de la melatonina, trifluoperazina, W-7, H-7 y estaurosporina sobre la actividad de la proteína cinasa C. La proteína cinasa C obtenida de células MDCK y semipurificada en una columna de DEAE celulosa se estimuló con PMA y PS en presencia del vehículo (A), 10<sup>-9</sup> (B) o 10<sup>-7</sup> M (C) de MEL, 10<sup>-3</sup> M (D) o 5 x 10<sup>-4</sup> M (E) de TFP, 3 x 10<sup>-4</sup> M (F) o 1 x 10<sup>-4</sup> M (G) de H-7, 10<sup>-3</sup> M (H) o 5 x 10<sup>-4</sup> M (I) de W-7 y 10<sup>-4</sup> M (J) o 10<sup>-5</sup> M de estaurosporina. La actividad de la enzima se determinó como está descrito en métodos. Los resultados son la media  $\pm$  el error estandar de dos experimentos realizados por cuadruplicado. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo A: \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

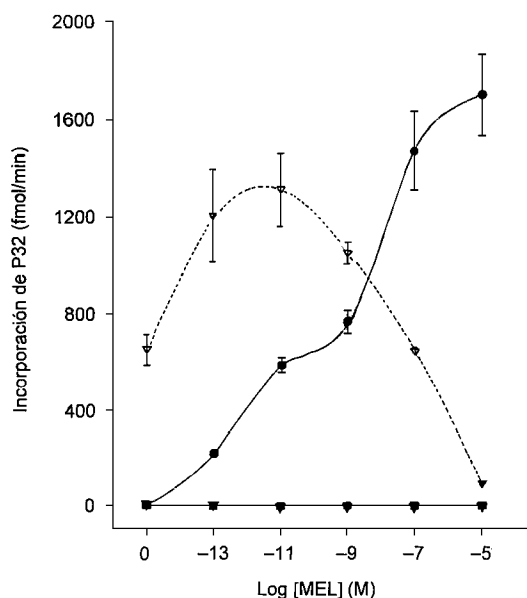


**Figura 4.** Curva dosis-respuesta del efecto de la melatonina sobre la actividad de la proteína cinasa C semipurificada. El efecto de la melatonina sobre la actividad de la PKC estimulada con PMA y PS se determinó midiendo la incorporación de P<sup>32</sup> al péptido AC-MBP (4-14) según se describió en métodos. Los resultados son la media de dos experimentos realizados por cuadruplicado  $\pm$  el error estandard.

centraciones mayores ( $10^{-7}$  y  $10^{-5}$ ), la estimulación fue menor (fig 5) a la obtenida con MEL. Tanto el efecto directo de la MEL sobre la actividad de la PKC como el efecto sinérgico de la hormona sobre la enzima estimulada con PMA y PS, se abolió en presencia del inhibidor específico de la PKC (fig 5).

## Discusión

En este trabajo se demostró que la MEL inhibe la actividad de la MPKII dependiente de CaM y activa a la PKC. La CaM, en ausencia de Ca<sup>2+</sup>, tiene una estructura al azar y se encuentra en su forma inactiva.<sup>5</sup> En presencia de Ca<sup>2+</sup> sufre un cambio conformacional exponiendo una región hidrofóbica que es la que interacciona con varias enzimas blanco, tales como la MPKII.<sup>30,33</sup> La actividad de la MPKII se midió utilizando como fuente de enzima un extracto de proteínas parcialmente purificado, por lo que fue necesario caracterizar la actividad fosforilante conducida por la MPKII. En condiciones control, la actividad de MPKII dependiente de CaM se inhibe al quelar el Ca<sup>2+</sup> con 5 mM de EGTA. Esto, aunado a la presencia de un inhibidor específico de PKC y un sustrato específico de MPKII, indican que se midió la actividad fosforilante de la MPKII que es dependiente de



**Figura 5.** Efecto directo de la melatonina sobre la actividad de la proteína cinasa C. El efecto directo de la MEL sobre la actividad de la PKC se determinó con una enzima pura de origen comercial. La proteína cinasa C se incubó con la hormona en las siguientes condiciones: MA y PS (▼), con PMA, PS y el inhibidor específico de PKC, en ausencia de PMA y PS (●), y en ausencia de PMA y PS y en presencia del inhibidor de PKC (□). Los resultados son la media de dos experimentos realizados por duplicado  $\pm$  el error estandard.

CaM. La MEL inhibe esta actividad, ya que  $10^{-9}$ M de la hormona disminuyó la actividad de la enzima estimulada con concentraciones crecientes de CaM (0.25 a 2  $\mu$ M) (datos no mostrados).

Anteriormente se demostró que la MEL se une a la CaM con alta afinidad y en presencia de Ca<sup>2+</sup>.<sup>11</sup> La unión MEL-CaM inhibe la actividad de CaM, previniendo el efecto inhibitorio de esta proteína sobre la polimerización de tubulina,<sup>4</sup> e inhibiendo las actividades de la fosfodiesterasa<sup>8</sup> y de la ATPasa<sup>4</sup> dependientes de CaM. Estos efectos se producen con concentraciones fisiológicas de la hormona (1 nM) y también son producidos por la TFP, pero con una concentración 10 000 veces mayor (10  $\mu$ M), lo que sugiere que la MEL actúa como un antagonista de la CaM a concentraciones fisiológicas. En este trabajo se confirmó el efecto antagonista de la MEL sobre CaM ya que la hormona inhibió la actividad de la MPKII con una relación dosis-respuesta.

La TFP y el compuesto W-7 son moléculas lipofílicas que, además de inhibir a la CaM,<sup>31</sup> también inhiben la actividad de la PKC<sup>21</sup> al interferir con la unión de los activadores PMA, PS y diacilglicerol a la subunidad reguladora de la enzima.<sup>21</sup> A diferencia de estos compuestos, la MEL estimuló la actividad de la PKC, y sinérgizó el efecto estimulador del PMA y la PS, sugiriendo

do que se une a la PKC. Se ha demostrado que los activadores de PKC poseen cierto grado de hidrofobicidad en su estructura química y que al unirse a la subunidad reguladora de la enzima desenmasacaran a la subunidad catalítica activándola.<sup>20</sup> La MEL es una molécula hidrofóbica, de tal manera que es posible que por un mecanismo semejante se una y active a la PKC. Aun cuando los estudios iniciales señalaban que la MEL actúa intracelularmente por unión a la CaM,<sup>12</sup> los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la hormona es capaz de unirse a otras proteínas intracelulares con actividad funcional modulando su actividad. Es importante mencionar que la MEL por sí sola activa a la PKC con una relación dosis-respuesta, en cambio, en presencia de PMA y PS, la hormona sinergiza el efecto de estos estimuladores en un margen de concentración restringido. El óptimo de estimulación se obtuvo con concentraciones fisiológicas ( $10^{-9}$  M), sin embargo la MEL con concentraciones farmacológicas ( $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  M), no solamente no incrementó la estimulación de la PKC por el PMA y la PS, sino que la abolió completamente. Se ha demostrado que otros antagonistas de CaM (W-7 y TFP), por ser moléculas lipofílicas, interaccionan directamente con la fosfatidilserina.<sup>1,31</sup> Es posible que la MEL, al ser una molécula lipofílica, interaccione con la PS y el PMA a concentraciones farmacológicas impidiendo su propia unión y la de los activadores, a la molécula de PKC. Los efectos de la MEL sobre PKC se observaron en presencia de  $Ca^{2+}$ ; esto y el hecho de que la actividad de la enzima y los efectos de la MEL se inhiben completamente al quelar este catión con EGTA, sugiere que la MEL actúa sobre el grupo de isoformas de PKC activadas por  $Ca^{2+}$ .<sup>21</sup> Los antagonistas de CaM, además de inhibir a la CaM, y a la PKC, también inhiben a la proteína cinasa A (PKA)<sup>31</sup> y se unen a los receptores D<sub>2</sub>. A diferencia de ellos, la MEL no inhibe la actividad de la PKA (datos no mostrados) y no se une a los receptores D<sub>2</sub><sup>16</sup> por lo que su efecto parece ser específico sobre la PKC y la CaM. Como la MEL actúa selectivamente sobre la PKC y la MPKII, la hormona podría constituir un enlace en la información cruzada entre dos caminos de traducción de señales, el del calcio y el del fosfatidil inositol.

En el SNC la activación de la PKC se ha relacionado con un aumento en la liberación de neurotransmisores, con la regulación de canales iónicos y el control del crecimiento y la diferenciación neuronal.<sup>19,20</sup> A su vez, la CaM, mediante la activación de la MPKII, modula procesos celulares, como la síntesis y liberación de neurotransmisores, el metabolismo de carbohidratos y la expresión genética,<sup>17,22</sup> de tal manera que la hormona podría sincronizar la actividad neuronal con el fotoperiodo no sólo por medio de su antagonismo sobre CaM y la regulación cíclica del citoesqueleto, sino también por

medio de una modulación selectiva de la fosforilación de proteínas, que a su vez, incidiría sobre el arreglo del citoesqueleto.

### Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por Conacyt donativo 1781-NG210. Durante el desarrollo de este trabajo Aida Martínez Hernández recibió una beca de Conacyt para realizar tesis de Licenciatura.

### Referencias

1. AFTAB DT, BALLAS LM, LOONIS CR, HAIT WN: Structure activity relationships of phenothiazines and related drugs for inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol*, 40:798-805, 1991.
2. ANTON-TAY F, WURTMAN RJ: Regional uptake of <sup>3</sup>H-melatonin from blood or cerebrospinal fluid by rat brain. *Nature*, 221:474-475, 1969.
3. ANTON-TAY F, FORRAY C, ORTEGA-CORONA BG: Subneuronal fate of intracerebroventricular injected <sup>3</sup>H-Melatonin. *J Pineal Res*, 5:125-133, 1988.
4. ANTON-TAY F, HUERTO-DELGADILLO L, ORTEGA-CORONA BG, BENITEZ-KING G: Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. *Proceedings of Melatonin and the Pineal Gland From Basic Science to Clinical Application*. Elsevier, Amsterdam. pp. 41-46, 1993.
5. BABU YS, SACK JS, GREENHOUGH TV, BUGG CE, MEANS AR, COOK WJ: Three dimensional structure of calmodulin. *Nature*, 315:37-40, 1985.
6. BLAZER I, HARDELAND R: Photoperiodism and effects of indoleamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. *Science*, 795-797, 1991.
7. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. *J Pineal Res*, 9:209-220, 1990.
8. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res*, 557:289-292, 1991.
9. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Changes in calmodulin compartmentalization in MDCK cells induced by melatonin. *Proc Neurosci Soc*, 17:1193 Abstr. 473.19, 1991.
10. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, SAMANO-CORONEL L, ANTON-TAY F: Melatonin effects on cell growth and calmodulin synthesis in MDCK and N1E-115 cell lines. *Adv Pineal Res*, (en prensa).
11. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Binding of <sup>3</sup>H-Melatonin to calmodulin. *Life Sci*, 53:201-207, 1993.
12. BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F: Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, 49:635-641, 1993.
13. BUCHNER K, OTTO H, HILBERT R, LINDSCHAU C, HALLER H, HUCHO F: Properties of protein kinase C associated with nuclear membrane. *Biochem J*, 286:369-375, 1992.
14. CARDINALI DP: Melatonin a mammalian pineal hormone. *Endocr Rev*, 2:327-354, 1981.
15. CASSONE VM: Effects of melatonin on vertebrate circadian systems. *Trends Neurosci*, 13:457-463, 1990.
16. CHAVEZ JL, ANTON-TAY F, BENITEZ-KING G: Melatonin binding to D<sub>2</sub> receptors in rat striatum: A comparative study with calmodulin antagonists. *Proc West Pharmacol Soc*, 34:413-416, 1991.
17. COHEN P: The calmodulin-dependent multiprotein kinase. En: *Molecular Aspects of Cellular Regulation V 5. Calmodu-*

- lin. Cohen P., Klee C.B. (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 145-193, 1988.
18. HIDAKA H, KOBAYASHI R: Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 32:377-397, 1992.
19. HUANG KP: The mechanism of protein kinase C activation. *TINS*, 2:425-433, 1989.
20. HUANG KP, HUANG FL: How is protein kinase C activated in the CNS. *Neurochem Int*, 22:417-433, 1993.
21. KIKKAWA U, KISHIMOTO A, NISHIZUKA Y: The protein kinase C family. Heterogeneity and its implications. *Ann Rev Biochem*, 58:31-44, 1989.
22. KLEE CB: Concerted regulation of protein phosphorylation dephosphorylation by calmodulin. *Neurochem Res*, 16:1059-1065, 1992.
23. KOPIN IJ, PARE CM, AXELROD J, WWIAABACH H: The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem*, 236:3072-3075, 1961.
24. KRAUSE DN, DUBOCOVICH ML: Melatonin receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 31:549-568, 1991.
25. LERNER AB, CASE JD, TAKAHASHI Y, LEE TH, MORI W: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightness melanocytes. *J Amer Chem Soc*, 80:2587, 1958.
26. LOWRY OH, ROSENBOUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
27. ORTEGA A, LOPEZ I, BENITEZ-KING G, ANTON-TAY F: Melatonin increases calmodulin mRNA levels in MDCK and N1E-115 cell lines. 1st Locarno International Meeting on Neuroendocrinology. The Pineal Gland in Relation with the Immune System and Cancer p. 65, 1993.
28. ROSSENTHAL NE, SACK DA, JACOBSEN FM, JAMES SP, PARRY BL, ARENDT J, TAMARKIN L, WEHR TA: Melatonin in seasonal affective disorder and phototherapy. *J Neural Transm*, [suppl] 21:257-268, 1986.
29. STANKOV B, FRASCHINI F, REITER RJ: Melatonin binding sites in the central nervous system. *Brain Res Rev*, 16:245-246, 1991.
30. STOCLET JC, GERARD D, KILHOFFER MC, LUGNIER C, MILLER R, SCHAEFFER P: Calmodulin and its role in intracellular calcium regulation. *Progr Neurobiol*, 29:321-364, 1987.
31. SCHATZMAN RC, RAYNOR RL, KUO JF: N-(6-aminoheptil)-5-cloro-1-naftalensulfonamida (W7), a calmodulin antagonist, also inhibits phospholipid-sensitive calcium-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Acta*, 755:144-147, 1983.
32. TAN DX, CHEN LD, POEGGELER B, MANCHESTER LC, REITER RJ: Melatonin a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J*, 1:57-60, 1993.
33. TANAKA T, HIDAKA H: Hydrophobic regions function in calmodulin enzyme(s) interactions. *J Biol Chem*, 255:11078-11080, 1980.
34. VALLANO ML: Identification and regional distribution of a type II calcium/calmodulin-dependent kinase in mouse brain. *Biochem Pharmacol*, 37:2381-2388, 1988.
35. WITT JJ, ROSKOSKI JR: Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption. *Ann Biochem*, 66:253-258, 1975.