

El efecto de la melatonina sobre la fosforilación de proteínas en una preparación de sinaptosomas del hipotálamo de la rata

Ma Eugenia Hernández*
Lourdes Galicia*
Fernando Antón-Tay**
Gloria Benítez-King*

Summary

It has been suggested that melatonin may be involved in the etiology of some mental illnesses. This hormone is a neuromodulator that modifies both neurotransmitter synthesis and release in the Central Nervous System. Phosphorylation of synaptic proteins plays a crucial role in neuronal function. In particular, phosphorylation of synapsin I by calmodulin dependent multiprotein kinase II modulates both vesicle transport and neurotransmitter release at the synaptic cleft. Recently, it has been described that melatonin may modulate protein phosphorylation through inhibition of calmodulin dependent protein kinase II activity. As a first step to elucidate the mechanism involved in melatonin inhibition of neurotransmitter release, in this work we studied the effects of the hormone on hypothalamic synaptosome protein phosphorylation. The results indicate that used synaptosomes in phosphorylation assays were functional since ^3H -GABA release and an increase of 50 % in protein phosphorylation were elicited with a high potassium concentration. Melatonin at 1 nM inhibited phosphorylation of 50, 54, 58-60 and 87 Kd protein bands in both basal synaptosomes (30 %) and KCl depolarized (50 %). The results suggest that melatonin may modulate neurotransmitter release through an inhibition of synaptosomal protein phosphorylation mediated by calmodulin dependent protein kinase II.

Key words: Melatonin, synaptosomes, calmodulin, phosphorylation.

Resumen

Hay evidencias de que la melatonina podría participar en la patofisiología de algunas enfermedades mentales. Esta hormona modifica la síntesis y liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso central. La fosforilación de proteínas desempeña un papel crucial en la fisiología neuronal. En particular, la fosforilación de la sinapsina I por la cinasa II depen-

diente de calmodulina, modula el transporte de las vesículas y la liberación de los neurotransmisores en la terminal sináptica. Recientemente se describió que la melatonina *in vitro* inhibe la actividad y la autofosforilación de la cinasa II dependiente de calmodulina. Como una primera etapa para entender el mecanismo por medio del cual la melatonina modula la liberación de neurotransmisores, en este trabajo se estudiaron los efectos de la hormona sobre la fosforilación de proteínas en una preparación de sinaptosomas obtenidos del hipotálamo de la rata. Los resultados señalaron que los sinaptosomas despolarizados con concentraciones altas de potasio liberaron ^3H -GABA y aumentaron la fosforilación de las proteínas en un 50 %. La melatonina (1 nM) inhibió la fosforilación de las proteínas de peso molecular de 50,54, 58-60 y 87 kd en sinaptosomas basales (30 %) y despolarizados con concentraciones altas de potasio (50 %). Los resultados sugieren que la hormona, al actuar como un antagonista de calmodulina e inhibir la fosforilación de proteínas, puede modular la liberación de neurotransmisores.

Palabras clave: Melatonina, sinaptosomas, calmodulina, fosforilación.

Introducción

La fosforilación de proteínas neuronales desempeña un papel crucial en la modulación de la liberación y el metabolismo de los neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) (10). Algunas de las fosfoproteínas que participan en la modulación de la síntesis y liberación de los neurotransmisores son: la sinapsina I, las hidroxilasas de tirosina y triptófano, las proteínas asociadas a los microtúbulos, MAPs y Tau y la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos [para una revisión ver Dunkley y Klee (10,13)].

Hay evidencias que indican que la melatonina (MEL) está involucrada en la patofisiología de algunas enfermedades mentales (15). Esta hormona actúa como un neuromodulador en el sistema nervioso central (SNC) al modificar la síntesis y liberación de neurotransmisores. Se ha descrito que la hormona modifica los niveles de serotonina y GABA en el mesencéfalo de la rata (1); inhibe la concentración de AMPc en las células de la

* Instituto Mexicano de Psiquiatría, Depto. Neurofarmacología, DIC., México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco.

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

Correspondencia: Dra. Gloria Benítez-King. Instituto Mexicano de Psiquiatría, Depto. Neurofarmacología, DIC., Calz. México-Xochimilco No. 101. Col San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F.

astroglia y en el hipotálamo (12,19); disminuye la recaptura de noradrenalina, serotonina, dopamina y glutamato en el hipotálamo de la rata (8) y disminuye la liberación de dopamina en la retina y el hipotálamo de diversas especies de roedores (9,21). Además, en algunos estudios se indica que la melatonina puede ser útil en la clínica para el tratamiento del insomnio y como anticonvulsivante (2,20).

Los sinaptosomas constituyen una preparación de terminales nerviosas funcionales que ha sido ampliamente utilizada para estudiar la fosforilación de proteínas y la liberación de neurotransmisores (10). La despolarización de los sinaptosomas con concentraciones altas de potasio, induce la liberación de neurotransmisores que se acompaña de aumento en la fosforilación de las proteínas sinaptosomales. En particular, el grado de fosforilación de la sinapsina I por la cinasa II dependiente de calmodulina, modula el anclaje de las vesículas sinápticas (18) a los microfilamentos de actina (4) y, por lo tanto, el transporte de las vesículas y la liberación de los neurotransmisores en la terminal sináptica.

Recientemente se ha descrito que la MEL puede modular la fosforilación de proteínas por inhibición de la actividad de la cinasa II dependiente de calmodulina (7). La MEL se une a la calmodulina con alta afinidad (6) y actúa como un antagonista de esta proteína (5). *In vitro*, las concentraciones nanomolares de la hormona inhiben la actividad de varias enzimas dependientes de la calmodulina (3); entre éstas, la actividad de la cinasa II, así como su autofosforilación (7). En este trabajo se estudiaron los efectos de la MEL sobre la fosforilación de proteínas en una preparación de sinaptosomas funcionales obtenidos del hipotálamo de la rata, como una etapa inicial para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la inhibición de la liberación de neurotransmisores causada por MEL. Los resultados señalaron que la MEL inhibió la fosforilación de las proteínas con pesos moleculares de 50,54, 58-60 y 87 kd en los sinaptosomas mantenidos en condiciones basales y despolarizados con concentraciones altas de potasio. Estos datos sugieren que la hormona modula la liberación de neurotransmisores por medio de la modulación de la fosforilación de proteínas sinaptosomales mediada por la cinasa II dependiente de calmodulina.

Material y métodos

Obtención de sinaptosomas del hipotálamo de la rata

Se sacrificaron por decapitación ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g), mantenidas en ciclos de luz oscuridad (12/12 hrs). Se les quitaron los cerebros y se mantuvieron en una solución de sacarosa 0.32 M a 4°C. Los hipotálamos se disecaron de acuerdo con el método de Glowinsky (11) y se homogeneizaron en una solución de sacarosa 0.32 M (1:10P/V) durante 30 seg a 4°C en un ultrasonificador de Cole Parmer (40Hz). El homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 12000 rpm a 4°C durante 20 min. La pastilla

obtenida de esta segunda centrifugación (fracción sinaptosomal) se resuspendió en un amortiguador de Krebs pH 7.4 (118 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgCl₂, 100 μM CaCl₂, 10 mM Glucosa). Finalmente, la concentración de proteína se determinó mediante el método de Lowry (14).

Ensayo de liberación de ³H-GABA

Los sinaptosomas resuspendidos en la solución de Krebs se preincubaron con 2.5 μCi/ml de ³H-GABA (250 μCi/mMol) durante 8 minutos a 37°C para capturar el neurotransmisor radioactivo. Las alícuotas de 850 ml de la suspensión de los sinaptosomas se depositaron en cámaras de perfusión sobre filtros Millipore, DAWP (0.65 μ) para separar el ³H-GABA capturado del liberado. En una primera etapa, los sinaptosomas se perfundieron en condiciones basales durante 30 minutos con el amortiguador de Krebs a un flujo de 1 ml/min. Se colectaron tres fracciones del perfusado cada 2 min. Posteriormente, se indujo la liberación de ³H-GABA de los sinaptosomas, despolarizándolos con una solución de 35 mM de KCl en amortiguador de Krebs. Se tomaron 3 muestras de 2ml cada 2 min (estímulo con concentración alta de potasio). Por último, los sinaptosomas se perfundieron con el amortiguador de Krebs sin potasio y se recogieron 2 fracciones de 5 ml. Los experimentos se hicieron por sextuplicado. La radioactividad en las fracciones colectadas se cuantificó por espectrometría líquida en un contador de centelleo líquido de Beckman.

Marcaje de los sinaptosomas del hipotálamo de la rata con ³²P-ortofosfato.

Los sinaptosomas crudos (5 mg de proteína/ml) se incubaron con 750 μCi/ml de ortofosfato marcado con ³²P (8500 Ci/mMol) durante 45 min en el amortiguador de Krebs, en un volumen final de 70 μl. La MEL (10⁻⁹ M) o el Vehículo (DMSO diluido 1:10), fueron adicionados a la mezcla de incubación 5, 15, 30, o 45 min antes de finalizar el marcaje con el ortofosfato radioactivo. En otra serie de tubos, la MEL se añadió a la suspensión de sinaptosomas 15 min antes de iniciar el marcaje con el ³²P-ortofosfato (60 min de incubación con MEL). Posteriormente, los sinaptosomas se despolarizaron con 70 ml de una solución que contenía una concentración alta de potasio (46 mM NaCl, 110 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgCl₂, 100 μM CaCl₂, 10 mM Glucosa) por 15 segundos a 37°C. La reacción se detuvo con 70 μl de una solución amortiguadora de muestra para electroforesis 3X (200mM Tris pH 6.8, 28 % Glicerol, 8 % SDS, 6mM EGTA, B-Mercaptoetanol).

Separación de las proteínas sinaptosomales por electroforesis unidimensional

Las proteínas sinaptosomales se separaron por electroforesis unidimensional en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8 % (4). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se destiñeron y se secaron. Posteriormente, se expusieron a placas sensibles a rayos X para detectar las fosfoproteínas por autoradio-

grafía. Los autoradiogramas se analizaron con un densitómetro Hoefler GS300.

Materiales

El ^{32}P [10 mCi/ml] y el ^3H -GABA [250 mCi/ml] fueron de NEN-Dupont (Boston, MA U.S.A.). Los otros reactivos utilizados fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO U.S.A.). Las placas para autoradiografía fueron GBX-2 de Kodak.

Resultados

Antes de estudiar los efectos de la MEL sobre la fosforilación de proteínas en los sinaptosomas, se determinó si esta preparación, al ser estimulada con concentraciones altas de potasio, era capaz de liberar algún neurotransmisor capturado y de incrementar la fosforilación de las proteínas en los sinaptosomas. Como se muestra en la figura 1, los sinaptosomas liberaron ^3H -GABA cuando fueron estimulados con 35 mM de KCl. Además, se demostró por microscopía electrónica la integridad de los sinaptosomas (datos no mostrados). En la figura 2 se muestran los perfiles densito-

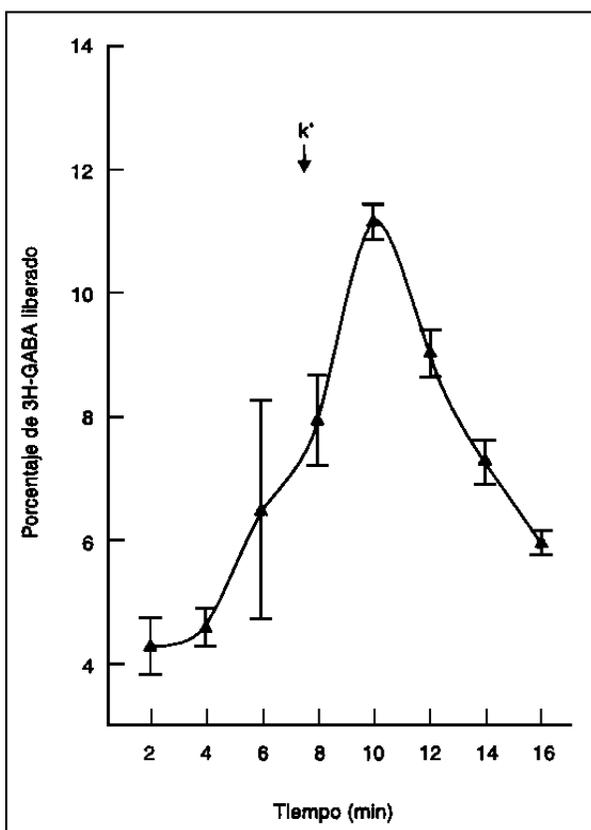


Figura 1. Liberación de ^3H -GABA en los sinaptosomas crudos del hipotálamo de la rata. La fracción cruda de sinaptosomas obtenida de cerebro de rata se incubó con ^3H -GABA como está descrito en la sección de métodos. La flecha indica la despoliarización con $[\text{K}^+] = 35\text{mM}$. Los datos representan la media \pm S.E.M. de un experimento realizado con una $n = 6$.

métricos de las proteínas fosforiladas en condiciones basales (fig. 2a) o en condiciones de despoliarización con concentraciones altas de potasio (fig. 2b), en presencia de MEL o del vehículo. La electroforesis de las proteínas sinaptosomales corridas en paralelo a proteínas de pesos moleculares conocidos (de 45 a 116 kd), mostró 4 proteínas con pesos moleculares de 50, 54, 58-60 y 87 kd. En presencia del vehículo, la fosforilación de estas proteínas se incrementó alrededor del 50 % al despoliarizar los sinaptosomas con concentraciones altas de potasio (fig. 2a y 2b). Tanto en condiciones basales como de despoliarización, la MEL inhibió la fosforilación de estas proteínas en los sinaptosomas incubados durante 30 min con la hormona (fig. 2a y 2b).

En las figuras 3 y 4 se muestra el curso temporal de la inhibición causada por 1 nM de MEL sobre la fosforilación de las proteínas sinaptosomales en condiciones basales y de despoliarización con concentraciones altas de potasio. Como se observa en las figuras 3 y 4, la MEL, hasta los 45 min de incubación, inhibió en un 30 % la fosforilación de todas las proteínas estudiadas en los sinaptosomas mantenidos en condiciones basales. Sin embargo, en los sinaptosomas despoliarizados, la inhibición por MEL fue clara a los 5 y 15 min, y la máxima inhibición se observó a los 30 min de incubación. La fosforilación de las proteínas de 50 y 54 se inhibió

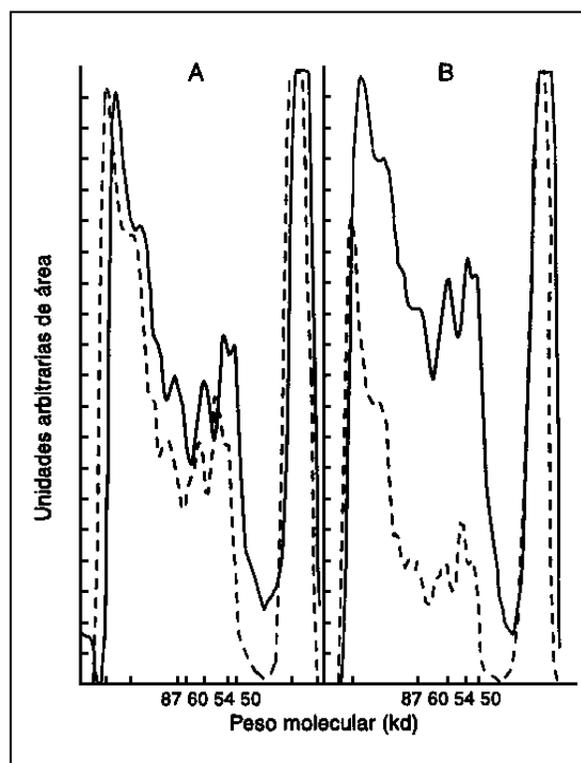


Figura 2. Perfiles densitométricos de las fosfoproteínas de los sinaptosomas del hipotálamo de la rata. Los sinaptosomas crudos fueron mantenidos en condiciones basales (A), o despoliarizados con 55 mM de potasio (B), según se describió en la sección de métodos. Los sinaptosomas se incubaron con vehículo (—) o con 1 nM de MEL (- -) durante 30 min, previos a la despoliarización. Los datos representan dos experimentos realizados por cuadruplicado.

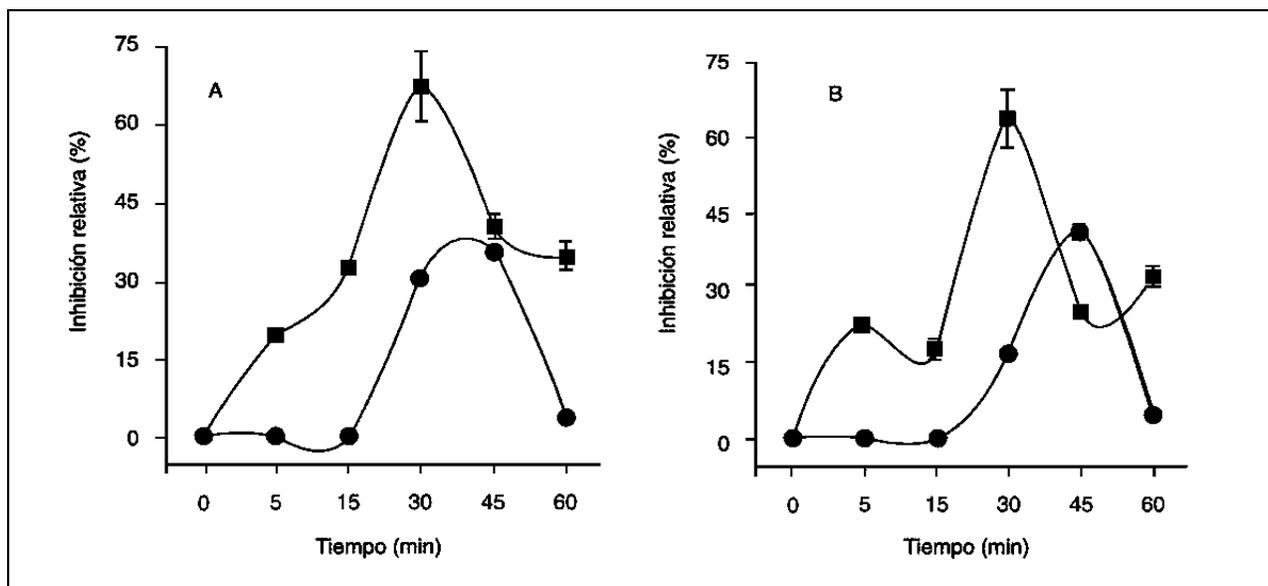


Figura 3. Curso temporal del efecto de la MEL sobre la fosforilación de las proteínas de 50 y 54 kd en los sinaptosomas del hipotálamo de la rata. Los sinaptosomas crudos se marcaron con ^{32}P , según se describió en la sección de métodos, y se mantuvieron en condiciones basales (●) o se despolarizaron con 55 mM de KC1 (■) a los tiempos indicados de incubación con 1 nM de MEL. El tiempo cero representa los datos obtenidos en presencia del vehículo (45 min de incubación). Panel A: proteína de 50 kd; panel B: proteína de 54 kd. Los datos representan la media \pm S.E.M. de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

un 52 %, y la de 58-60 y 87 kd fue de 37 y 46 %, respectivamente. El efecto inhibitorio disminuyó con mayores tiempos de incubación (45 y 60 min) (figs. 3 y 4).

Discusión

En este trabajo se demostró que la MEL inhibe la fosforilación de cuando menos cuatro proteínas con peso molecular de 50, 54, 58-60 y 87 kda, tanto en los

sinaptosomas del hipotálamo de la rata mantenidos en condiciones basales, como en los sinaptosomas despolarizados con concentraciones altas de potasio.

La funcionalidad de los sinaptosomas utilizados en los ensayos de fosforilación se demostró por su capacidad de liberar ^3H -GABA y de aumentar la fosforilación de proteínas al ser despolarizados con una concentración alta de potasio. Se ha descrito que en estado de reposo, la sinapsina I establece el anclaje de las vesículas sinápticas a los microfilamentos de actina (4). Du-

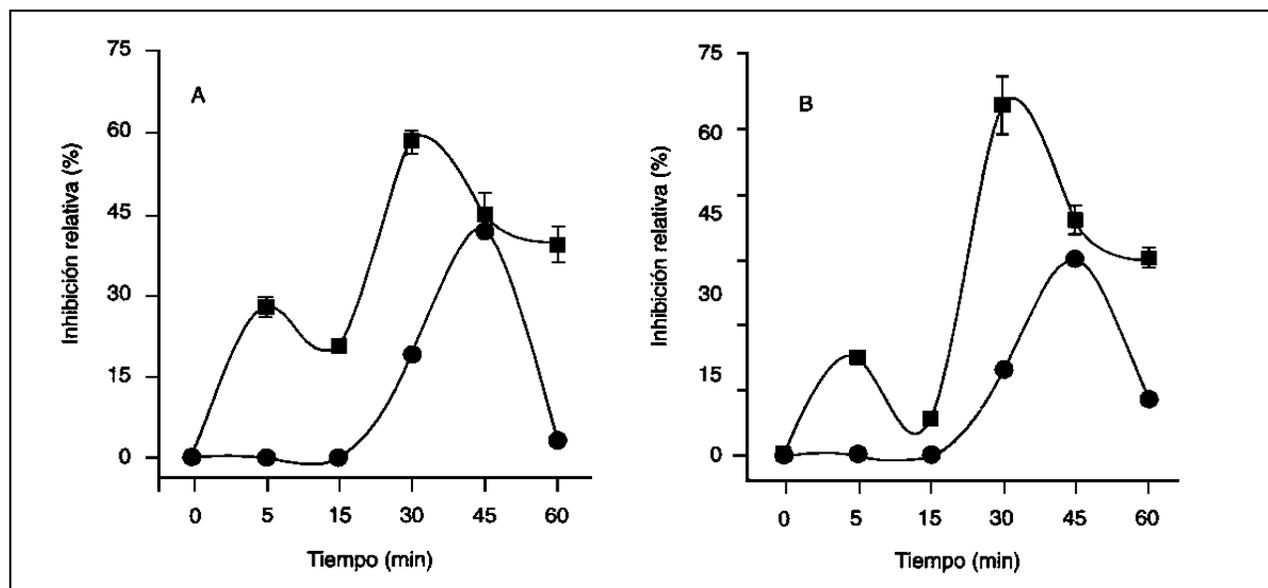


Figura 4. Curso temporal del efecto de la MEL sobre la fosforilación de las proteínas de 58-60 y 87 kd en los sinaptosomas del hipotálamo de la rata. Los sinaptosomas crudos se marcaron con ^{32}P , según se describió en la sección de métodos, y se mantuvieron en condiciones basales (●) o se despolarizaron con 55 mM de KC1 (■) a los tiempos indicados de incubación con 1 nM de MEL. El tiempo cero representa los datos obtenidos en presencia del vehículo (45 min de incubación). Panel A: proteína de 58-60 kd; panel B: proteína de 87 kd. Los datos representan la media \pm S.E.M. de dos experimentos realizados por cuadruplicado.

rante el proceso de liberación de neurotransmisores, la cinasa II se activa por el complejo Ca^{2+} /calmodulina, se autofosforila, fosforila a la sinapsina I y, como consecuencia, esta proteína sufre un cambio conformacional y suelta las vesículas sinápticas ancladas a los microfilamentos(10). La cinasa II dependiente de la calmodulina está compuesta por tres subunidades: α de 50 kd; β' de 58 kd y β de 60 kd (18), y la sinapsina I tiene un peso molecular de 87 kd (10). En este trabajo se encontró que la MEL inhibió la fosforilación de las proteínas que corresponden a estos pesos moleculares. Estas evidencias sugieren que la hormona podría inhibir *in vivo* la autofosforilación de la cinasa II dependiente de calmodulina, impedir la fosforilación de la sinapsina I y, por medio de este mecanismo, inhibir la liberación de neurotransmisores. En apoyo a lo anterior se ha demostrado que la MEL, al unirse (6) y antagonizar a la calmodulina, inhibe *in vitro* la autofosforilación y la actividad de la cinasa II dependiente de la calmodulina del cerebro de la rata (7). La interacción de la MEL con la calmodulina impide la formación del complejo Ca^{2+} /calmodulina/cinasa II, necesario para la activación de la enzima. Esto, aunado a que la MEL inhibe la liberación de neurotransmisores en las rebanadas

del hipotálamo de la rata (21), sugiere que la hormona, por medio del antagonismo de la calmodulina y la inhibición de la cinasa II, podría modular la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, para confirmar este mecanismo es necesario hacer estudios sobre la correlación directa entre los efectos de la MEL sobre la liberación de neurotransmisores, la fosforilación de proteínas y la participación de la calmodulina.

En este trabajo se observó que la MEL inhibió la fosforilación de proteínas sinaptosomales con concentraciones de la hormona que se alcanzan durante la noche en el plasma de los seres humanos y de otras especies de mamíferos (16). Esto, junto con el hecho de que la MEL es una hormona lipofílica que cruza las membranas biológicas, sugiere que la hormona puede sincronizar la actividad neuronal al fotoperíodo.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el donativo Conacyt, No. 3220P-N9607. Agradecemos a la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto Mexicano de Psiquiatría y al QFB José Mendoza Sotelo, las micrográficas electrónicas de la preparación de sinaptosomas.

REFERENCIAS

1. ANTON-TAY F, CHOU C, ANTON S, WURTMAN RJ: Brain serotonin concentrations: Elevation following intraperitoneal administration of melatonin. *Science*, 162:277-278, 1968.
2. ANTON-TAY F, DIAZ JL, FERNANDEZ-GUARDIOLA A: On the effect of melatonin upon human brain: its possible therapeutic implications. *Life Sci*, 10:841-850, 1971.
3. ANTON-TAY F, HUERTO-DELGADILLO L, ORTEGA-CORONA BG, BENITEZ-KING G: Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. E: *Melatonin and the Pineal Gland From Basic Science to Clinical Application*. Y Toitou, J, Arendt, P Pevet (eds), Elsevier, Amsterdam.
4. BÄHLER M, GREENGARD P: Synapsin I bundles F-Actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature*, 326:704-707, 1987.
5. 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.
6. BENITEZ-KING G, HUERTO-DELGADILLO L, ANTON-TAY F: Binding of 3H -Melatonin to calmodulin. *Life Sci*, 53:201-207, 1993.
7. BENITEZ-KING G, RIOS A, MARTINEZ A, ANTON-TAY F: *in vitro* inhibition of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta*, 1290:191-196, 1996.
8. CARDINALI DP, NAGLE CA, FREIRE F, ROSNER JM: Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 18:72-85, 1975
9. DUBOCOVICH ML: Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature*, 306:782-784, 1983.
10. DUNKLEY PR: Autophosphorylation of neuronal calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II. *Molec Neurobiol*, 5:179-202, 1991.
11. GLOWINSKI J, IVERSEN LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain I. The disposition of 3H -norepinephrine, 3H -dopamine and 3H -DOPA in various regions of the brain *J Neurochem*, 13:655-669, 1966.
12. HAAG M, VAN VUUREN RJJ: Melatonin potentiates forskolin-stimulated cyclic AMP levels in rat hypothalamus synaptosomes. *Med Sci Res*, 22:267-268, 1994.
13. KLEE CB: Concerted regulation of protein phosphorylation and desphosphorylation by calmodulin. *Neurochem Res*, 16:1059-1065, 1991.
14. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265-275, 1951.
15. MILES A, PHILBRICK DRS: Melatonin and psychiatry. *Biol Psychiatry*, 23:405-425, 1988.
16. REITER RJ: Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, 12:151-80, 1991.
17. ROSTAS JAP, DUNKLEY PR: Multiple forms and distribution of calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II in Brain. *J Neurochem*, 59:1191-1202, 1992.
18. SCHIEBLER W, JAHNR, DOUCET JP, ROTHLEIN J, GREENGARD P: Characterisation of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J Biol Chem*, 261:8383-8390, 1986.
19. VACAS MI, BERRIA MI, CARDINALE DP, LASCANO EF: Melatonin inhibits b-adrenoceptor-stimulated cycle AMP accumulation in rat astroglial cell cultures. *Neuroendocrinology*, 38:176-181, 1984.
20. ZHDANOVA IV, WURTMAN RJ, LYNCH HJ, IVES JR, DOLLINS AB, MORABITO C, MATHESON JK, SCHOMER DL: Pharmacodynamics and drug action. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Therap*, 57:552-558, 1995.
21. ZISAPEL N, EGOZIY, LANDON M: Circadian variations in the inhibition of dopamine release from adult and newborn rat hypothalamus by melatonin. *Neuroendocrinology*, 40:102-108, 1985.