

Received: 2009.06.08
Accepted: 2009.07.31
Published: 2009.09.15

Receptory melatoninowe MT1 oraz ich rola w onkostatycznym działaniu melatoniny

MT1 melatonin receptors and their role in the oncostatic action of melatonin

Karolina Danielczyk¹, Piotr Dziegiel^{1,2}

¹ Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

² Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Melatonina, podstawowy hormon wytwarzany głównie przez szyszynkę, wykazuje m.in. silne właściwości hamujące wzrost komórek nowotworowych, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Dane literaturowe wskazują, iż dodanie melatoniny do medium spowalnia proliferację niektórych linii komórek nowotworowych. Sugeruje się również, że stosowanie melatoniny jako leczenia wspomagającego chemioterapię poprawia jej skuteczność i tolerancję. Mechanizmy tych zjawisk nie zostały jeszcze w pełni poznane, ale jednym z ważniejszych ich elementów mogą być receptory melatoninowe. U ludzi zidentyfikowano dwa główne typy błonowych receptorów melatoninowych o wysokim powinowactwie: receptory MT1 (Mel1a) oraz MT2 (Mel1b). Podtypy te wykazują 60% homologii na poziomie aminokwasowym. Receptory MT1 zakwalifikowano do nadrodziny receptorów związanych z białkami G (GPCR). Za pośrednictwem podjednostki α białka G receptory melatoninowe MT1, stymulując wytwarzanie cykazy adenylowej, hamują wytwarzanie cAMP, a tym samym mają znaczący wpływ na przebieg procesu proliferacji komórek. Wpływ melatoniny na podziały komórkowe potwierdzają badania przeprowadzone na liniach komórkowych S-19, B-16 mysich komórek czerniaka, czy też na komórkach raka sutka. Wydaje się, że ekspresja receptorów melatoninowych MT1 podnosi efektywność onkostatycznego działania melatoniny. W rezultacie melatonina i jej błonowe receptory mogą stanowić obiecujące ogniwa w osiągnięciu nowych alternatywnych terapeutycznych rozwiązań w leczeniu różnych typów nowotworów człowieka.

Słowa kluczowe:

melatonina • błonowe receptory melatoninowe: MT1 i MT2 • choroba nowotworowa

Summary

Melatonin, the main hormone produced by the pineal gland, strongly inhibits the growth of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Some publications indicate that the addition of melatonin to culture medium slows the proliferation of some cancer cell lines. It is also suggested that melatonin used as an adjuvant benefits the effectiveness and tolerance of chemotherapy. The mechanisms of this are not fully understood, but melatonin receptors might be one of the most important elements. Two distinct types of membrane-bound melatonin receptors have been identified in humans: MT1 (Mel1a) and MT2 (Mel1b) receptors. These subtypes are 60% homologous at the amino-acid level. MT1 receptors are G-protein-coupled receptors. Through the α subunit of G protein, melatonin receptors stimulate an adenylate cyclase and decrease the level of cAMP. This has a significant influence on cell proliferation and has been confirmed in many tests on different cell lines, such as S-19, B-16 murine melanoma cells, and breast cancer cells. It seems that expression of the MT1 melatonin receptors benefits the efficacy of melatonin treatment. Melatonin and its re-

ceptors may provide a promising way to establish new alternative therapeutic approaches in human cancer prevention.

Key words: melatonin • membrane-bound melatonin receptors MT1 and MT2 • neoplastic disease

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=894415>

Word count: 3662

Tables: 2

Figures: 2

References: 79

Adres autorki: mgr Karolina Danielczyk, Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich, ul. Chałubińskiego 6a, 50-368 Wrocław; e-mail: karolka_d@hist.am.wroc.pl

Wykaz skrótów: **CREB** – czynnik transkrypcyjny wiążący miejsca na DNA zależne od poziomu cAMP (cAMP response element-binding); **DAG** – diacylglicerol; **DMBA** – dimetylobenzantracen (dimethylbenz[a]anthracene); **ERK1/2** – kinazy regulowane zewnątrzkomórkowo (extracellularly regulated protein kinases); **GIRK Kir3** – kanały potasowe wewnątrzprzostownicze (G-protein-activated inward rectifier potassium channel); **GPCR** – nadrodzina receptorów sprzężonych z białkami G (G-protein coupled receptor); **IHC** – reakcja immunohistochemiczna (immunohistochemistry); **IP3** – trifosfoinozytol (triphosphoinositol); **MEK1/2** – kinazy kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (mitogen-activated protein kinase kinase); **MT1, MT2** – receptory melatoninowe MT1, MT2 (melatonin receptors); **PGF2 α** – prostaglandyna F2 α (prostaglandyn F2 α); **PKA** – kinaza białkowa A (protein kinase A); **PLC** – fosfolipaza C (phospholipase C); **ROR/RZR** – sieroce retinoidowe receptory jądrowe (retinoid orphan receptors/retinoid Z receptors); **SCN** – jądro nadskrzyżowaniowe (suprachiasmatic nucleus).

WSTĘP

W ostatnich 20–30 latach przedmiotem intensywnych zainteresowań wielu naukowców stała się aktywna biologicznie substancja powszechnie znana jako melatonina. Doniesienia sugerujące jej działanie jako czynnika opóźniającego proces starzenia, pobudzającego układ odpornościowy, a także mającego działanie antynowotworowe sprawiły, iż substancja ta jest nie tylko tematem publikacji naukowych, ale jest również szeroko reklamowana w środkach masowego przekazu.

Historia badań nad melatoniną ma swój początek w latach dwudziestych XX wieku, kiedy to McCord i Allen omówili po raz pierwszy biologiczne działanie melatoniny w artykule zatytułowanym *Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation* [43]. Zaobserwowali oni, iż skóra kijanek żaby *Rana pipiens* jaśnieje w wyniku polania jej wyciągiem z szyszynki wołowych [43]. Wiele lat później, w 1958 r., grupa amerykańskich dermatologów pod kierunkiem A. B. Lerner, wyizolowała związek odpowiedzialny za agregację ziaren pigmentu (melaniny) w melanoforach skóry płazów i określiła jego budowę chemiczną [38]. Wspomniany związek nazwano melatoniną (5-metoksy-N-acetylotryptamina): mela (od nazwy barwnika i komórek wrażliwych na jego działanie) + tonina (ponieważ substancja ta jest pochodną serotoniny) [38].

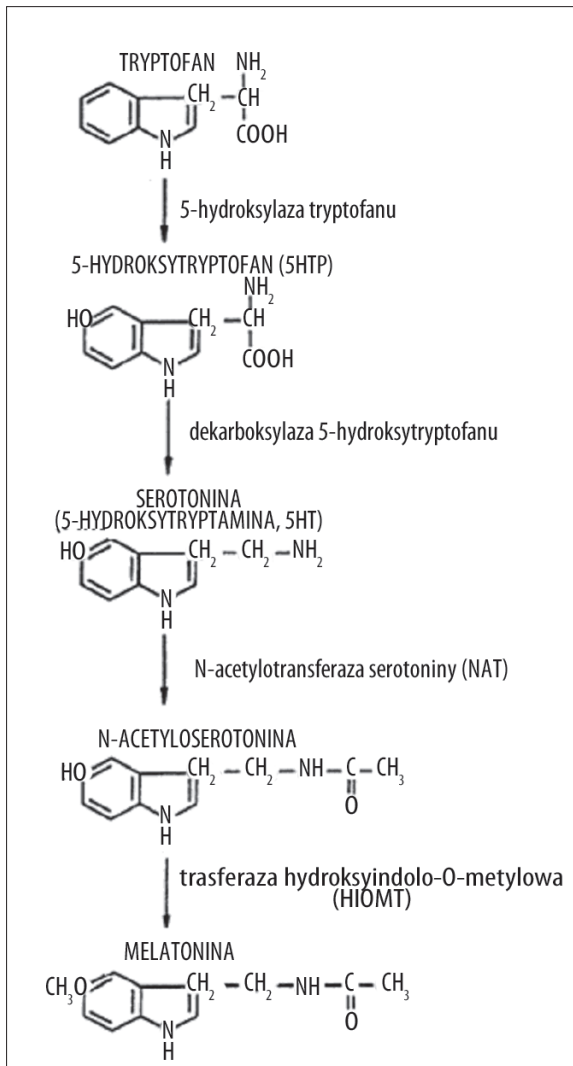
Melatonina jest szeroko rozpowszechniona zarówno w świecie roślin, jak i zwierząt. Zidentyfikowano ją nawet u bakterii, jednokomórkowych Eukariota, makroglonów oraz u licznych

gatunków bezkręgowców i kręgowców [52]. U kręgowców melatonina jest głównie syntetyzowana w pinealocytach szyszynki – małego gruczołu leżącego w nadwzgorzu. Po raz pierwszy proces biosyntezy tego hormonu opisał Axelrod w 1974 r. [3]. Prekursorem syntezy tej indolowej pochodnej jest tryptofan pobierany z krwi. Pod wpływem 5-hydroksylazy tryptofanowej ulega hydroksylacji do 5-hydroksytryptofanu, który następnie jest dekarboksylowany do serotoniny. Synteza melatoniny z serotoniny jest katalizowana przez dwa enzymy: N-acetylotransferazę serotoniny oraz transferazę hydroksyindolo-O-metylową (ryc. 1) [44,52].

Poza szyszynką miejscem syntezy melatoniny jest również m.in. siatkówka, gruczoły łzowe Hardera, przewód pokarmowy, ludzkie i mysie komórki szpiku kostnego, płytki krwi i limfocyty [52].

Sekrecja melatoniny jest zsynchronizowana z cyklem światła/ciemność i informuje organizm o długości dnia i nocy [52]. Jej wydzielanie wzrasta wkrótce po zapadnięciu ciemności, osiąga szczyt między godziną 2 a 4 i stopniowo obniża się w drugiej połowie nocy. Stężenie melatoniny we krwi waha się od 0–20 pg/ml w dzień do 20–100 pg/ml w nocy [33]. Szczytowy poziom tej substancji we krwi jest jednak swoisty dla danego organizmu i zmienia się wraz z wiekiem. U młodych osób poziom melatoniny we krwi mieści się w zakresie 54–75 pg/ml, a u starszych spada do wartości między 18 a 40 pg/ml [33,44]. Okres półtrwania we krwi endogennej melatoniny wynosi 30–60 min, natomiast w przypadku egzogennej melatoniny ten czas jest krótszy i wynosi 12–48 min [33,44]. Melatonina krąży we





Ryc. 1. Synteza melatoniny w szyszynce (wg [40] zmodyfikowano)

krwi związana z albuminami i glikoproteinami w 70% [33]. Ze względu na to, iż hormon ten jest małą, lipofilową cząsteczką, może dyfundować także do innych płynów organizmu człowieka (ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy, limfa, płyn nasienny, płyn pęcherzyków jajnikowych i płyn komory przedniej oka) [33,50].

Melatonina jest metabolizowana w wątrobie i częściowo w nerkach. Ulega hydroksylacji do 6-hydroksymelatoniny przez monooksygenazy cytochromu P450, a następnie sprzężeniu z kwasem siarkowym lub glukuronowym. Powstały siarczan lub glukuronian 6-hydroksymelatoniny wydalany jest z moczem [50,52].

Publikacje najczęściej przedstawiają cztery podstawowe mechanizmy działania melatoniny u ssaków. Wśród nich możemy wyróżnić: wiązanie do wewnątrzkomórkowych białek, takich jak kalmodulina, działanie antyoksydacyjne, wiązanie do receptorów jądrowych oraz wiązanie do receptorów melatoninowych umiejscowionych w błonie komórkowej [40].

Pierwszy z wymienionych mechanizmów opiera się na doniesieniach, iż melatonina ma zdolność regulacji aktyw-

ności kalmoduliny – białka modulatorowego wiążącego jony wapnia [6]. Aktywowana wapniem kalmodulina jest zaangażowana w inicjację fazy S i M cyklu komórkowego, w ekspresję genów związanych z cyklem komórkowym, a także w powrót komórek z fazy spoczynkowej G0 do G1 cyklu komórkowego [6]. Melatonina wiąże się do kalmoduliny, utrudniając aktywację danego białka, jego dystrybucję i prawidłowy przebieg cyklu komórkowego. Przypuszcza się, że mechanizm ten może wyjaśniać antyproliferacyjny wpływ melatoniny na dzielące się komórki, w tym komórki nowotworowe [6].

Wiele danych potwierdza także zdolność melatoniny do przenoszenia elektronów i unieczynniania wolnych rodników, takich jak: tlen singletowy, tlenek azotu, rodnik wodorotlenkowy [17,18,31]. Ma ona również stymulujący wpływ na antyoksydacyjne enzymy, takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza czy peroksydaza glutationowa [18, 46]. Dodatkowo hamuje peroksydację lipidów *in vivo* znacznie skuteczniej niż witaminy C lub E [26]. Użyteczność wspomnianych właściwości antyoksydacyjnych melatoniny bada się w różnych patologicznych warunkach związanych z działaniem wolnych rodników, począwszy od stanów zapalnych, niedokrwienia/reperfuzji, działania promieniowania jonizującego czy też przy stosowaniu chemioterapeutyków [18,54].

Zdolność melatoniny do wiązania i aktywacji receptorów jądrowych należących do podrodziny ROR/RZR (retinoid orphan receptors/retinoid Z receptors) stanowi trzeci spośród wymienionych mechanizmów działania tego hormonu [69]. Jak sama nazwa tych receptorów wskazuje, zalicza się je do tzw. sierocych receptorów jądrowych, czyli takich, dla których nie udało się jeszcze całkowicie udokumentować istnienia endogennego liganda [69]. Podrodzina ta obejmuje produkty trzech genów: różne warianty ROR α powstałe w wyniku alternatywnego składania pre-mRNA (ROR α 1, ROR α 2, ROR α 3 i RZR α) oraz RZR β i RZR γ [69]. W budowie tych receptorów można wyróżnić kilka domen: N końcową domenę o konstytutywnej transaktywacyjnej funkcji 1 (AF1), domenę C wiążącą DNA, zmienną domenę D, domenę E wiążącą ligand, mającą też zależną od liganda funkcję transaktywacyjną 2 (AF2) oraz opcjonalnie występującą domenę F [69]. Ekspresja danych receptorów odbywa się w różnych narządach. RZR β występuje głównie w komórkach nerwowych związanych z układem sensorycznym, neuroendokrynnym i limbicznym, podczas gdy ROR α /RZR α występuje m.in. w przysadce mózgowej, mózdzku, wątrobie, tkance tłuszczowej, tkance chrzęstnej czy w skórze, a RZR γ w mięśniach szkieletowych [69]. Receptory te uczestniczą w regulacji procesów immunologicznych, różnicowaniu ośrodkowego układu nerwowego oraz w dojrzewaniu limfocytów T [69]. Przykładem immunomodulującego wpływu melatoniny wynikającego z pobudzenia receptorów jądrowych RZR α jest prawdopodobnie zmniejszenie ekspresji mRNA dla 5-lipooksygenazy [70]. 5-lipooksygenaza jest enzymem katalizującym powstanie leukotrienów z kwasu arachidonowego, a leukotrieny odgrywają znaczącą rolę w procesach zapalnych i alergicznych [70].

Ostatni sposób działania melatoniny jest związany z bezpośrednim oddziaływaniem owego hormonu z receptorami melatoninowymi umiejscowionymi w błonie komórkowej.

Wyniki doświadczeń przeprowadzanych głównie na melanoforach skóry płazów, a zwłaszcza żaby płatany (*Xenopus laevis*), stały się punktem wyjściowym do dalszych badań nad tymi receptorami [4]. Przełomem było m.in. otrzymanie cDNA tych receptorów, które pozwoliło na poznanie jakże ważnej struktury pierwszorzędowej tych białek [4,56].

BŁONOWE RECEPTORY MELATONINOWE

Klasyfikacja

Odpowiednie uszeregowanie poszczególnych receptorów melatoninowych może zostać sporządzone z uwzględnieniem różnego typu kryteriów począwszy od lokalizacji receptorów, poprzez siłę oddziaływania z ligandem, a na systemie przekazywania sygnału skończywszy. Zaawansowane badania z użyciem technik biologii molekularnej pozwoliły wyodrębnić dwie główne podklasy tych receptorów:

- I. ML1 Receptory błonowe związane z białkami G. Wśród receptorów tej grupy wyróżniono dodatkowo trzy podtypy: MT1 (Mel1a), MT2 (Mel1b) oraz Mel1c. Charakteryzują się one dużym powinowactwem i wiążą melatoninę przy pikomolarnym stężeniu hormonu [56].
- II. ML2 (zwane też MT3). Receptory błonowe związane z reduktazą chinonową. Wiążą melatoninę przy nanomolarnym stężeniu hormonu i jak dotąd nie udało się otrzymać cDNA kodującego syntezę tego receptora [48].

Śród wymienionych grup błonowych receptorów melatoniny, u ssaków zidentyfikowano jedynie receptory MT1 oraz MT2 [60]. Podtypy te wykazują 60% homologii na poziomie sekwencji aminokwasowej i zostały wyróżnione farmakologicznie z wykorzystaniem różnego typu agonistów i antagonistów [67].

W 1998 r. Komitet IUPHAR ustanowił nazewnictwo receptorów melatoninowych (tabela 1) [15]. Niestety nowa nomenklatura nie uwzględnia receptorów znalezionych u innych poza ssakami gatunków, dlatego w ich badaniu sugeruje się stosowanie nazewnictwa funkcjonującego przed 1998 r. [15].

W kolejnych podrozdziałach zamieszczono charakterystykę białek MT1, zarówno pod względem ich budowy, sposobu oddziaływania z ligandem, jak również ze względu na mechanizm przekazywania sygnału z udziałem białek G.

Rozmieszczenie receptorów melatoninowych

Pierwotnie w analizie właściwości i rozmieszczenia receptorów melatoninowych stosowano różnego typu ligandy znakowane izotopami. Do najczęściej wykorzystywanych radioligandów należy 2-[125I]-jodomelatonina, względem której receptory MT1 i MT2 wykazują duże powinowactwo o wartości Kd 10–300 pM [72]. Rozwój autoradiograficznych metod detekcji pozwolił na dokładniejsze, morfologiczne zlokalizowanie receptorów melatoniny w różnego typu tkankach ośrodkowego układu nerwowego, krwionośnego, rozrodczego oraz pokarmowego [19,72]. Jeśli wspomniana metoda nie jest wystarczająco czuła, do detekcji receptorów wykorzystuje się reakcję PCR z odwrotną transkrypcją. W ten sposób badano m.in. receptor MT2 w jądrze nadskrzyżowaniowym (SCN) u myszy [30].

Tabela 1. Nazewnictwo receptorów melatoninowych

Przed 1998 r.	Po 1998 r.
Mel1a, ML1A	mt1, MT1
Mel1b, ML1B	MT2
ML2	MT3

Rozmieszczenie i funkcje receptorów MT1, MT2 są niezwykle zróżnicowane w różnych tkankach ludzkiego organizmu (tabela 2).

Geny kodujące receptory melatoninowe

Pierwsze badania nad sklonowaniem receptorów melatoninowych opierały się na klasycznych metodach wykazujących podobieństwa w strukturze pierwszorzędowej receptorów należących do nadrodziny receptorów związanych z białkami G. Dopiero wykorzystanie łańcuchowej reakcji polimerazy, poprzedzonej odwrotną transkrypcją (RT-PCR), pozwoliło na uzyskanie cDNA kodującego receptory MT1 i MT2. Znaczące zasługi w tych badaniach ma grupa naukowców z Bostonu pod kierunkiem Stevena Repperta, którzy w 1994 r. otrzymali cDNA kodujący receptor MT1 w mózgu człowieka i owcy, a rok później sklonowali ludzki receptor MT2 [55,56].

Struktura genu receptorów MT1, MT2 jest podobna. Gen jest zbudowany z dwóch eksonów przedzielonych długim intronem. Pierwszy ekson obejmuje cały niekodujący obszar 5' i obszar kodujący fragment białka receptorowego od N-końca do końca pierwszej pętli cytosolowej. Ekson drugi obejmuje obszar kodujący pozostały fragment receptora i niekodujący obszar 3' [58]. Obecność intronu wskazuje na możliwość przebiegu alternatywnego składania (splicingu) mRNA, prowadzącego do powstania izoform receptorów melatoninowych [58]. Ludzki gen kodujący receptor MT1 zlokalizowano na chromosomie 4 prążek q35.1, natomiast gen receptora MT2 znajduje się na chromosomie 11 prążek q21-22 [55].

Budowa receptorów typu ML1

Współczesna biologia strukturalna i biofizyka białek, wykorzystując wiele technik eksperymentalnych umożliwiających poznanie przestrzennej budowy makrocząsteczek. W dotychczasowym badaniu trójwymiarowych struktur białek, najistotniejszą rolę odgrywa zarówno analiza rentgenowska, jak również jądrowy rezonans magnetyczny. Są to jednak metody niezwykle czasochłonne i kosztowne. W przypadku receptorów melatoninowych, jak dotąd udało się uzyskać kryształy bardzo małe, o nieuporządkowanej strukturze, co uniemożliwiło przeprowadzenie badania z wykorzystaniem promieniowania X [73]. Ze względu na ograniczenia w zakresie metod doświadczalnych, posłużono się metodami teoretycznymi, co w rezultacie pozwoliło na skonstruowanie hipotetycznych modeli receptorów melatoninowych [73,74]. Jako pierwowzór w komputerowych projektach wykorzystano model przestrzennej cząsteczki rodopsyny oraz informacje na temat budowy przestrzennej receptorów sprzężonych z białkami G [49].



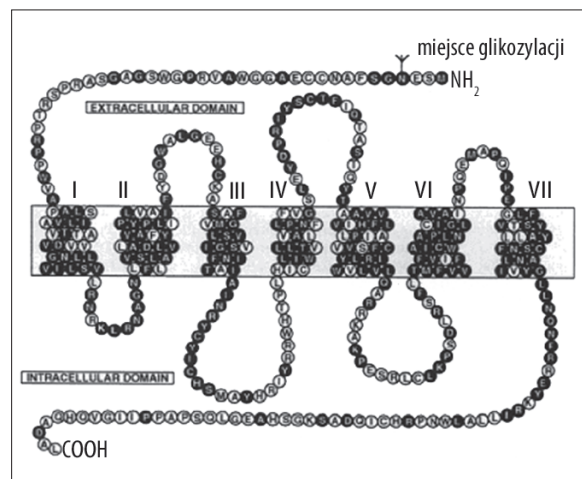
Tabela 2. Rozmieszczenie i funkcje receptorów MT1, MT2 w organizmie ludzkim

Układ	Lokalizacja receptora	Typ receptora	Funkcje	Źródło
Układ nerwowy	jądro nadkrzyżowaniowe	MT1	regulacja rytmu okołodobowego, regulacja snu	[8]
	siatkówka	MT1, MT2	regulacja adaptacji do światła o mniejszej intensywności	[14]
	hipokamp	MT1, MT2	regulacja neuronalnej aktywności	[61,62]
	mózdzek	MT1, MT2	przyspieszenie osiągnięcia progu pobudliwości przez obniżenie funkcji GABA receptora	[1]
Układ krwionośny	aorta	MT1, MT2	rozszerzenie naczyń krwionośnych	[45]
	ściana lewej komory serca	MT1, MT2	zmniejszenie siły skurczu	[20,21]
	naczynia wieńcowe	MT1, MT2	rozszerzenie naczyń krwionośnych	[20,21]
Układ rozrodczy	mięśniówka gładka	MT1, MT2	mniejsza ekspresja u kobiet w ciąży, regulacja skurczów macicy	[63]
	komórki warstwy ziarnistej jajnika	MT1, MT2	wzrost poziomu mRNA receptora LH	[76]
Układ pokarmowy	nabłonek pęcherzyka żółciowego	MT1	regulacja procesów absorpcji i/lub sekrecji	[2]
	enterocyty nabłonka dwunastnicy	MT2	stymulacja sekrecji HCO ₃ ⁻	[66]
Inne	komórki skóry	MT1, (MT2)	działanie antyproliferacyjne	[57]
	adipocyty	MT1, MT2	obniżenie poziomu GLUT4 i absorpcji glukozy	[7]
	komórki układu immunologicznego	MT1	działanie immunostymulujące	[29]
	komórki raka stercza	MT1	działanie antyproliferacyjne	[65]

Podobnie jak inne receptory zaklasyfikowane do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (nadrodzina GPCR), receptory melatoninowe MT1 oraz MT2 są zbudowane z siedmiu transbłonowych obszarów hydrofobowych o strukturze helikalnej (TM I–TM VII). Siedem skupionych i spiętych wiązaniami dwusiarczkowymi odcinków receptora tworzy na zewnątrz komórki kieszonkę, która jest miejscem wiązania agonisty. Dodatkowo można wyróżnić trzy pętle, które są położone wewnątrzkomórkowo oraz trzy pętle zewnątrzkomórkowe. N-koniec białka umiejscowiony jest w przestrzeni międzykomórkowej, natomiast C-koniec receptora skierowany jest do wnętrza komórki (ryc. 2) [74].

W budowie większości białek zaliczanych do GPCR obserwuje się występowanie, charakterystycznych dla tej nadrodziny, konserwatywnych motywów sekwencyjnych. W przypadku receptorów melatoninowych część z tych motywów jest nieco odmienna. Między innymi w początkowym odcinku drugiej pętli cytosolowej TM II nastąpiła zamiana kwasu asparaginowego na asparaginę, w wyniku czego zamiast motywu DRY obecny jest motyw NRY, po którym pojawia się kolejno sekwencja CXXCH [4]. Za pośrednictwem fragmentu NRY odbywa się aktywacja białka G sprzężonego z receptorem melatoninowym [4]. Dodatkowo w końcowym odcinku obszaru TM VII zamiast reszty prolinowej w motywie NPXXY występuje reszta alaninowa NAXXY [4].

Wśród najbardziej istotnych podobieństw receptorów melatoninowych do białek GPCR należą: pojedyncze reszty cysteinowe w pierwszej i drugiej pętli zewnątrzkomórko-



Ryc. 2. Schemat budowy receptora melatoninowego MT1 (wg [55] zmodyfikowano)

wej, obecność dwóch miejsc N-glikozylacji na N-końcu białka receptorowego, a także reszty prolinowe w czwartej, piątej i szóstej domenie TM, biorące udział w tworzeniu kieszeni wiążącej ligand [4,73,74].

Dotychczasowe badania dowodzą, iż w wiązaniu melatoniny przez białko receptora melatoninowego bierze udział kilka swoistych miejsc w obszarze transbłonowym, przy czym główną rolę odgrywają helisy TM V, TM VI, TM VII [4,11,28,35,73,74].

Wyniki ukierunkowanej mutagenyzy pozwoliły określić, które z aminokwasów wchodzi w skład kieszeni wiążącej i które pełnią zasadniczą rolę w zakotwiczeniu liganda. W licznych modelach komputerowych wykazano, iż w domenie piątej TM V, konserwatywna reszta histydyny His195(208) tworzy wiązanie wodorowe z tlenem grupy 5-metoksy melatoniny. Grupa metoksylova (CH_3O^-) melatoniny silnie oddziałuje także z TM V poprzez usytuowanie w hydrofobowej kieszeni tworzonej przez reszty Val191(204), Val192(205) i Ile112(125) [74]. W starszych modelach komputerowych receptorów melatoninowych sugeruje się, iż grupa N-acetylowa cząsteczki melatoniny jest rozpoznawana przez parę Ser110(123) – Ala72(85) w TM VII oraz Met107(121) w TM III, lecz z badań T. Kokkola [35] wynika, że reszty te nie biorą udziału w rozpoznaniu liganda. Wielu autorów donosi też o znaczeniu Gly w TM VI, zarówno w wiązaniu liganda, jak i w działaniu receptora [28, 35]. Dodatkowo interakcja indolowego pierścienia melatoniny z aromatycznym pierścieniem fenylalaniny w TM VI wzmacnia zakotwiczenie hormonu w kieszeni wiążącej [4,11,28,35,73,74].

Molekularne efekty działania melatoniny na receptory MT1

Receptory MT1 są sprzężone z wrażliwymi na toksynę krztuśca białkami G. Białka te charakteryzują się aktywnością GTP-azy i są heterotrimerami zbudowanymi z podjednostek: α , β i γ . Za pośrednictwem podjednostki α białka G, receptory MT1 hamują aktywność białka efektorowego, jakim jest cykloaza adenylova, a tym samym zmniejszają ilość wyprodukowanego cAMP [4,47]. Zjawisko to potwierdzono doświadczalnie badając wpływ melatoniny na zwiększony poziom cAMP po uprzednim podaniu forskoliny, farmakologicznego aktywatora cykloazy adenylovej. Podawana melatonina poprzez receptory MT1 obniżała poziom cAMP w komórkach [47,72].

Zmiana stężenia cAMP w komórce pozwala m.in. na regulację aktywności białkowej kinazy C (PKC), białkowej kinazy A (PKA), MAPK, kanałów potasowych, poziomu cGMP, czy też wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} [6]. Obniżenie aktywności kinazy białkowej A (PKA) w szlaku sygnalizacyjnym wpływa niekorzystnie na poziom ufosforylowania czynników transkrypcyjnych, tj. CREB (cAMP response element-binding) i ekspresję swoistych genów [41,75]. W sposób pośredni kinaza białkowa A jest także zaangażowana w regulację aktywności białek Raf biorących udział w procesie proliferacji, angiogenezy, różnicowania i migracji komórek [27]. Zaktywowane Raf uruchamia kaskadę kinaz białkowych aktywowanych mitogenem MEK1/2 (mitogen-activated protein kinase) oraz kinazy ERK1/2 (extracellularly regulated protein kinases) aktywowane przez sygnały zewnątrzkomórkowe. Kinazy przemieszczają się do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do fosforylacji i aktywacji rybosomalnych kinaz i czynników transkrypcyjnych, takich jak c-jun, c-fos, c-myc, co w konsekwencji prowadzi do indukcji ekspresji genów związanych z procesem proliferacji [19, 27]. Hamujący wpływ melatoniny na podziały komórkowe potwierdzają badania przeprowadzone m.in. na liniach komórkowych S-19, B-16 mysich komórek czerniaka, komórkach czerniaka tęczówki, czy też na komórkach raka piersi [12,34,53,57]. Co więcej, za po-

średnictwem receptorów MT1 melatonina może aktywować duże kanały potasowe aktywowane jonami wapnia BKCa^{2+} , a także wewnątrzprzostonnicze kanały potasowe GIRK Kir3 (G-protein-activated inward rectifier potassium channel) [19,75]. Dodatkowo hormon ten może wspomagać stymulację fosfolipazy C (PLC) wywołaną przez prostaglandynę $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) [4,72]. Wzrost aktywności PLC powodują podjednostki $\beta\gamma$ białka G, co prowadzi w efekcie do hydrolizy błonowych fosfolipidów i powstania wtórnych przekaźników informacji: trifosfoinozytolu (IP3) stymulującego uwalnianie jonów wapnia z retikulum endoplazmatycznego oraz nagromadzenie się diacyloglicerolu (DAG) wspomagającego aktywację białkowej kinazy C (PKC) [4,19,72]. Podwyższony poziom wapnia w cytosolu uruchamia procesy, takie jak skurcz mięśni gładkich, rozpad glikogenu i egzocytozę, podczas gdy PKC fosforyluje reszty seryny i treoniny w wielu białkach docelowych [4,72].

Modulowanie funkcji receptorów MT1

Istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju i homeostazy organizmu ma zarówno odbiór, jak i przekazywanie sygnałów przez receptory komórkowe. Zakłócenia funkcji receptorów są w wielu przypadkach głównymi czynnikami przyczyniającymi się do zaburzeń rozwojowych i chorób. Właściwa reakcja komórki na bodźce zewnętrzne w dużym stopniu zależy nie tylko od transdukcji sygnału i aktywacji odpowiednich szlaków metabolicznych, ale również od czasu trwania sygnału. Jego wydłużenie może prowadzić do tzw. desensytyzacji, czyli niezdolności komórki do odpowiedzi na określoną informację. Wykształcone zostały zatem pewne mechanizmy kontrolujące funkcjonowanie receptorów [75].

W przypadku receptorów melatoninowych możemy wyróżnić dwa rodzaje regulacji: homologiczną z udziałem melatoniny oraz heterologiczną za pośrednictwem innych czynników, takich jak naświetlenie czy estradiol [75]. Do głównych mechanizmów leżących u podstaw homologicznej regulacji receptorów MT1 należą m.in.: utrata połączenia receptorów z białkami G, fosforylacja, czy internalizacja [75]. Wykazano, iż ilość melatoniny krążącej w organizmie reguluje aktywność receptorów melatoninowych w sposób odwrotnie proporcjonalny. W wyniku usunięcia endogennego źródła hormonu poprzez pinealektomię, czy też nocną ekspozycję na światło, następuje zwiększenie gęstości receptorów w mózgu, bez wpływu na ich powinowactwo do agonisty [64]. Dodatkowo, ze względu na sekrecję melatoniny w rytmie dobowym, zaobserwowano także zjawisko dobowych zmian gęstości receptorów melatoninowych. W fazie jasnej liczba receptorów jest zdecydowanie większa niż w fazie ciemnej cyklu [42,64]. Pojawiają się też doniesienia wskazujące na zmniejszenie liczby receptorów melatoninowych MT1 w zależności od wieku. U chomika syryjskiego dochodzi do gwałtownego spadku liczby receptorów w jądrach nadskrzyżowaniowych podwzgórza tuż po narodzinach [16]. Regulacja owych receptorów może również przebiegać z udziałem hormonów płciowych. U samic szczura po usunięciu jajników, zaobserwowano zmniejszenie gęstości receptorów MT1 w podwzgórzu. Po podaniu estradiolu liczba miejsc wiązania melatoniny była zbliżona do kontrolnych wartości wyjściowych [10].



Udział receptorów melatoninowych MT1 w onkostatycznym działaniu melatoniny

Dotychczasowe wyniki badań, przeprowadzonych na licznych modelach doświadczalnych, wskazują na onkostatyczne działanie melatoniny [23]. Zarówno fizjologiczne, jak i farmakologiczne stężenia głównego hormonu szyszynki, działają hamująco na różnego typu nowotwory w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* [22,24,25,32,51,59,71,77]. Melatonina stosowana w terapii wspomagającej podnosi efektywność chemioterapeutyków oraz łagodzi negatywne skutki ich stosowania [23]. Może także hamować rozwój jak i progresję różnych typów nowotworów [18,33,52].

Podstawy tego zjawiska nie są w pełni poznane. Już w latach 80 ub.w. sugerowano związek między powstawaniem nowotworu, a działaniem szyszynki [5]. W wielu przypadkach zaobserwowano wyższy, dzienny poziom hormonu we krwi u osób chorujących na nowotwór w porównaniu z osobami zdrowymi [39]. Istnieje prawdopodobieństwo, że synteza i sekrecja melatoniny zwiększa się w odpowiedzi na rozwój raka, co stanowi rodzaj mechanizmu obronnego organizmu przed powstającym nowotworem [39]. Możliwe, że proliferujące komórki wydzielają odpowiednie, lecz niepoznane dotąd czynniki wywołujące syntezę i sekrecję hormonu z szyszynki [39]. Są to jednak przypuszczenia wymagające potwierdzenia w badaniach doświadczalnych.

Eksperymentalnie wykazano znacznie większą częstotliwość powstawania nowotworów indukowanych DMBA (dimetylobenzantracemem) u pinealektomizowanych (pozbawionych szyszynki) szczurów, niż w przypadku nieoperowanych osobników [37]. Dodatkowo, podawanie melatoniny skutecznie zmniejsza ryzyko powstania guza [37]. Prowadzone są liczne badania na hodowlach komórkowych, mające na celu wytlumaczenie antyproliferującego wpływu melatoniny na komórki nowotworowe [33,44]. Hamujące działanie tego hormonu potwierdzono głównie w przypadku komórek raka piersi MCF-7, komórek raka okrężnicy HT-29, ludzkich komórek czerniaka M-6, mysich komórek wątroby HEPA1-6, komórek neuroblastomy SK-N-MC, komórek chromochłonnych guza nadnerczy PC12, czy też komórek raka prostaty LNCaP [22,24,25,32,51,59,71,77,79]. Mechanizm tego zjawiska nie jest w pełni wyjaśniony.

Melatonina, jako mała cząsteczka o amfifilowej naturze, z łatwością dociera do wielu kompartmentów komórki. Może działać bezpośrednio, niezależnie od receptorów lub za ich pośrednictwem, co znacznie utrudnia interpretację jej sposobu działania w poszczególnych przypadkach. Wpływ tego hormonu na rozwój nowotworu może wynikać zarówno z jego właściwości antyutleniających, jak i z hamującego działania na kalmodulinę, czy kaskadę sygnałną MEK/ERK z udziałem receptorów melatoninowych MT1, MT2 [6,17,18,26,31,46].

Wcześniejsze badania receptorów melatoninowych opierały się głównie na wiązaniu odpowiednich radioligandów, autoradiografii *in vitro*, technikach biochemicznych, na badaniu kultur komórkowych oraz tkanek, takich jak: siatkówka, skóra, gruczoł piersiowy, okrężnica, mózg [13]. Istnieje jednak zbyt wiele niejasności w funkcjonowaniu receptorów melatoninowych MT1. Zdecydowana większość dostępnych publikacji na temat receptorów MT1 opiera się

na badaniu różnorodnych linii komórkowych w hodowli, natomiast brak jest danych wynikających z badań immunohistochemicznych [9,23,78,79]. Dopiero Dillon i wsp. [13] po raz pierwszy określili ekspresję receptorów MT1 w prawidłowej tkance gruczołu sutkowego oraz w guzach tego narządu na skrawkach parafinowych. Autorzy ci przeanalizowali zależności między ekspresją MT1, a wybranymi kliniczno-patologicznymi parametrami prognostycznymi [13]. Uzyskane przez nich wyniki oparte na badaniu nowotworów gruczołu sutkowego nie potwierdzają istnienia korelacji między ekspresją MT1, a wielkością guza, a także wiekiem pacjentek, liczbą węzłów chłonnych z przerzutami, receptorami estrogenowymi, receptorami progesteronowymi, czy też receptorami HER2. Wskazują jednak na istnienie dodatniej korelacji między ekspresją receptorów MT1, a stopniem złośliwości w rakach gruczołu sutkowego [13]. Wyniki najnowszych badań immunohistochemicznych receptorów MT1 w prawidłowej tkance gruczołu sutkowego oraz w guzach nowotworowych tego narządu stanowią kolejny dowód, iż wyższy poziom ekspresji tych receptorów obserwujemy w tkance zmienionej nowotworowo niż w tkance prawidłowej [35]. Dodatkowo, w przeciwieństwie do badań prowadzonych przez Dillona i wsp. [13], zaobserwowano odwrotną korelację między ekspresją receptora MT1 i poziomem ekspresji receptorów estrogenowych ER α i progesteronowych PR, co sugeruje, iż zwiększonej ekspresji receptorów MT1 towarzyszy niski poziom ER α i PR [36]. Biorąc pod uwagę, iż melatonina poprzez badane receptory MT1 wpływa na zmniejszenie aktywności transkrypcyjnej i ekspresję receptorów estrogenowych i progesteronowych, może przyczynić się tym samym do zmniejszenia prawdopodobieństwa remisji raka sutka receptorowo dodatniego po zastosowaniu hormonoterapii [36].

Ekspresja błonowych receptorów melatoninowych może znacząco wpływać na efekty działania melatoniny [13]. Badania tkanek nowotworowych wykazują wyraźne różnice w nasileniu ich ekspresji [13]. Na przykład niski poziom ekspresji MT1 odnotowano w komórkach gruczolakoraka pęcherzyka żółciowego, podczas gdy komórki raka piersi MCF-7 ekspresjonują wyższy niż w prawidłowej tkance poziom receptorów MT1 [2,13]. Receptory MT1 w komórkach raka piersi MCF-7 oraz w mysich komórkach czerniaka S-91 zwiększają, poprzez swoją obecność, onkostatyczne działanie hormonu, co może mieć znaczenie przy ewentualnym wykorzystaniu melatoniny w terapii [13,32,34].

Receptory MT1 są głównym miejscem wiązania melatoniny w ludzkiej skórze [68]. Wykazano ich obecność w takich komórkach jak keratynocyty, melanocyty, fibroblasty, w komórkach czerniaka oraz raka płaskonabłonkowego [67]. Wielokrotnie potwierdzono na różnych liniach komórkowych czerniaka, iż hamujący wpływ melatoniny odbywa się za pośrednictwem jej receptorów [13,23,71]. W przypadku komórek czerniaka błony naczyń oka, melatonina powoduje inhibicję wzrostu wyłącznie komórek nowotworowych, bez wpływu na prawidłowe melanocyty [57]. Obserwacje te sugerują zróżnicowaną ekspresję receptorów błonowych, zależną od typu komórek, co może posłużyć w ewentualnej ocenie podatności komórek czerniaka na melatoninę. W dużym stopniu jednak nieznane są przyczyny plastyczności tych receptorów. Liczne dane literaturowe wskazują, iż ekspresja receptora MT1 w komórkach

melanoma malignum podnosi efektywność antyproliferującego działania melatoniny [34]. Wykazano również korzystny wpływ melatoniny w chemioterapii niektórych nowotworów, w tym melanoma [18]. Zespół Słomińskiego zbadał hamujący wpływ melatoniny w czterech liniach komórkowych czerniaka, reprezentujących odmienny etap wzrostu i fenotyp [23]. Okazuje się, że melatonina w farmakologicznych stężeniach 10^{-3} – 10^{-7} M, hamuje proliferację komórek, każdej z badanych linii: począwszy od komórek fazy wzrostu radialnego (SBCE2), poprzez komórki fazy wzrostu wertykalnego (WM-98), komórki metastatyczne (WM-164) i komórki wytwarzające melaninę (SKMEL-188) [23]. Podobne rezultaty uzyskano dla mysich komórek czerniaka B16 oraz ludzkich komórek czerniaka linii M6 [78,79].

PODSUMOWANIE

Melatonina, główny hormon wytwarzany przez szyszynkę, wykazuje wszechstronne właściwości, począwszy od

działania antyulenającego poprzez działanie immunostymulujące i antynowotworowe. W dostępnych publikacjach przedstawia się cztery podstawowe mechanizmy działania melatoniny, wśród których wyróżnia się interakcję z błonowymi receptorami melatoninowymi należącymi do grupy receptorów ML1. Istnieje jednak wciąż wiele niejasności zarówno w budowie jak i funkcjonowaniu receptorów melatoninowych MT1. Opublikowane dotychczas wyniki badań nad melatoniną oraz nad receptorami tego hormonu są zachęcające i sugerują możliwość uzyskania nowych alternatywnych terapeutycznych rozwiązań w leczeniu raka skóry i innego typu nowotworów. Dane dotyczące ekspresji receptorów MT1 mogą stanowić pewien przyczynek do dalszych eksperymentów oraz lepszego rozumienia ich roli w różnego typu nowotworach. Ewentualna korelacja ekspresji MT1 z głębokością naciekania oraz z ekspresją różnorodnych antygenów, może wskazywać na możliwość wykorzystania w przyszłości analizy ekspresji tych receptorów do oceny prognostycznej nowotworów.

PIŚMIENICTWO

- [1] Al-Ghoul W.M., Herman M.D., Dubocovich M.L.: Melatonin receptor subtype expression in human cerebellum. *Neuroreport*, 1998; 9: 4063–4068
- [2] Aust S., Thalhammer T., Humpeler S., Jäger W., Klimpfner M., Tucek G., Obrist P., Marktl W., Penner E., Ekmekcioglu C.: The melatonin receptor subtype MT1 is expressed in human gallbladder epithelia. *J. Pineal Res.*, 2004; 36: 43–48
- [3] Axelrod J.: The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science*, 1974; 184: 1341–1348
- [4] Barrett P., Conway S., Morgan P.J.: Digging deep-structure-function relationships in the melatonin receptor family. *J. Pineal Res.*, 2003; 35: 221–230
- [5] Bartsch H., Bartsch C.: Effect of melatonin on experimental tumors under different photoperiods and times of administration. *J. Neural. Transm.*, 1981; 52: 269–279
- [6] Blask D.E., Sauer L.A., Dauchy R.T.: Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanism of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002; 2: 113–132
- [7] Brydon L., Petit L., Delagrange P., Strosberg A.D., Jockers R.: Functional expression of MT2 melatonin receptors in human PAZ6 adipocytes. *Endocrinology*, 2001; 142: 4264–4271
- [8] Cajochen C., Krauchi K., Wirz-Justice A.: Role of melatonin in regulation of human circadian rhythms and sleep. *J. Neuroendocrinol.*, 2003; 15: 432–437
- [9] Carlson J.A., Ross J.S., Słomiński A., Linette G., Myślubski J.: Molecular diagnostics in melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2005; 52: 743–775
- [10] Clemens J.W., Jarzyńska M.J., Witt-Enderby P.A.: Down regulation of mt1 melatonin receptors in rat ovary following estrogen exposure. *Life Sciences*, 2001; 69: 27–35
- [11] Conway S., Drew J.E., Mowat E.S., Barrett P., Delagrange P., Morgan P.J.: Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 20602–20609
- [12] Cos S., Garcia-Bolado A., Sanchez-Barcelo E.J.: Direct antiproliferative effects of melatonin on two metastatic cell sublines of mouse melanoma (B16BL6, PG19). *Melanoma Res.*, 2001; 11: 197–201
- [13] Dillon D.C., Easley S.E., Asch B.B., Cheney R.T., Brydon L., Jockers R., Winston J.S., Brooks J.S., Hurd T., Asch H.L.: Differential expression of high-affinity melatonin receptors (MT1) in normal and malignant human breast tissue. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2002; 118: 451–458
- [14] Djamgoz M.B., Wagner H.J.: Localization and function of dopamine in the adult vertebrate retina. *Neurochem. Int.*, 1992; 20: 139–191
- [15] Dubocovich M.L., Cardinali D.P., Guardiola-Lemaitre B., Hagan R.M., Krause D.N., Sudegen D., Vanhoutte P.M., Yocca F.D.: The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. IUPHAR Media, London, 1998; 187–193
- [16] Duncan M.J., Davis F.C.: Developmental appearance and age related changes in specific 2-[125I] iodomelatonin binding sites in the suprachiasmatic nuclei of female Syrian hamsters. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.*, 1993; 73: 205–212
- [17] Dziegiel P., Murawska-Ciałowicz E., Jethon Z., Januszewska L., Podhorska-Okolów M., Surowiak P., Zawadzki M., Rabczyński J., Zabel M.: Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *J. Pineal Res.*, 2003; 35: 183–187
- [18] Dziegiel P., Podhorska-Okolów M., Zabel M.: Melatonin: adjuvant therapy of malignant tumors. *Med. Sci. Monit.*, 2008; 14: RA64–RA70
- [19] Ekmekcioglu C.: Melatonin receptors in humans: biological role and clinic relevance. *Biomed. Pharmacother.*, 2006; 60: 97–108
- [20] Ekmekcioglu C., Halsmayer P., Philipp C., Mehrabi M.R., Glogar H.D., Grimm M., Thalhammer T., Marktl W.: 24h variation in the expression of the mt1 melatonin receptor subtype in coronary arteries derived from patients with coronary heart disease. *Chronobiol. Int.*, 2001; 18: 973–985
- [21] Ekmekcioglu C., Thalhammer T., Humpeler S., Mehrabi M.R., Glogar H.D., Holzenbein T., Markovic O., Leibetseder V.J., Strauss-Blasche G., Marktl W.: The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system. *J. Pineal Res.*, 2003; 35: 40–44
- [22] Fic M., Podhorska-Okolów M., Dziegiel P., Gębarowska E., Wysocka T., Drag-Zalesińska M., Zabel M.: Effect of melatonin on cytotoxicity of Doxorubicin toward selected cell lines (human keratinocytes, lung cancer cell-line A-549, laryngeal cancer line HEP-2). *In vivo*, 2007; 21: 513–518
- [23] Fisher T.W., Żmijewski M.A., Zbytek B., Sweatman T.W., Słomiński R.M., Wortsman J., Słomiński A.: Oncostatic effects of the indole melatonin and expression of its cytosolic and nuclear receptors in cultured human melanoma cell lines. *Int. J. Oncol.*, 2006; 29: 665–672
- [24] García-Navarro A., González-Puga C., Escames G., López L.C., López A., López-Cantarero M., Camacho E., Espinosa A., Gallo M.A., Acuña-Castroviejo D.: Cellular mechanisms involved in the melatonin inhibition of HT-29 human colon cancer cell proliferation in culture. *J. Pineal Res.*, 2007; 43: 195–205
- [25] García-Santos G., Antolín I., Herrera F., Martín V., Rodríguez-Blanco J., del Pilar Carrera M., Rodríguez C.: Melatonin induces apoptosis in human neuroblastoma cancer cells. *J. Pineal Res.*, 2006; 41: 130–135
- [26] Gitto E., Tan D.X., Reiter R.J., Karbownik M., Manchester L.C., Cuzzocrea S., Fulia F., Barberi I.: Individual and synergistic antioxidative actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferrioxamine (desferoxamine) in rat liver homogenates. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001; 53: 1393–1401
- [27] Gollob J.A., Wilhelm S., Carter C., Kelley S.L.: Role of Raf kinase in cancer: Therapeutic potential of targeting the Raf/Mek/Eerk signal transduction pathway. *Sem. Oncol.*, 2006; 33: 392–406



- [28] Gubitza A.K., Reppert S.M.: Chimeric and point-mutated receptors reveal that a single glycine residue in transmembrane domain 6 is critical for high affinity melatonin binding. *Endocrinol.*, 2000, 141: 1236–1244
- [29] Guerrero J.M., Reiter R.J.: Melatonin-immune system relationships. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2002; 2: 167–179
- [30] Hunt A.E., Al-Ghoul W.M., Gillette M.U., Dubocovich M.L.: Activation of MT2 melatonin receptors in rat SCN phase advances the circadian clock. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2001; 280: C110–C118
- [31] Iżykowska I., Piotrowska A., Podhorska-Okołów M., Cegielski M., Zabel M., Dziegiel P.: Ochronna rola melatoniny podczas działania promieniowania UV. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 23–27
- [32] Jawed S., Kim B., Ottenhof T., Brown G.M., Werstuk E.S., Niles L.P.: Human melatonin MT1 receptor induction by valproic acid and its effects in combination with melatonin on MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007; 560: 17–22
- [33] Jung B., Ahmad N.: Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Res.*, 2006; 66: 9789–9793
- [34] Kadekaro A.L., Andrade L.N., Floeter-Winter L.M., Rollag M.D., Virador V., Vieira W., Castrucci A.M.: MT-1 melatonin receptor expression increases the antiproliferative effect of melatonin on S-91 murine melanoma cells. *J. Pineal Res.*, 2004; 36: 204–211
- [35] Kokkola T., Foord S.M., Watson M.A., Vakkuri O., Laitinen J.T.: Important amino acids for the function of the human MT1 melatonin receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 65: 1463–1471
- [36] Lai L., Yuan L., Cheng Q., Dong C., Mao L., Hill S.M.: Alteration of the MT1 melatonin receptor gene and its expression in primary human breast tumors and breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.*, 2008 (w druku)
- [37] Lenoir V., de Jonage-Canonica M.B., Perrin M.H., Martin A., Scholler R., Kerdelhué B.: Preventive and curative effect of melatonin on mammary carcinogenesis induced by dimethylbenz[a]anthracene in the female Sprague-Dawley rat. *Breast Cancer Res.*, 2005; 7: R470–R476
- [38] Lerner A.B., Case J.D., Takahashi Y.: Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J. Biol. Chem.*, 1960; 235: 1992–1997
- [39] Lissoni P., Crispino S., Barni S., Sormani A., Brivio F., Pelizzoni F., Brenna A., Bratina G., Tancini G.: Pineal gland and tumor cell kinetics: serum levels of melatonin in relation to Ki-67 labeling rate in breast cancer. *Oncology*, 1990; 47: 275–277
- [40] Macchi M.M., Bruce J.N.: Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrinol.*, 2004; 25: 177–195
- [41] Masana M.I., Dubocovich M.L.: Melatonin receptor signaling: finding the path through the dark. *Sci. STKE*, 2001: PE39
- [42] Masson-Pevet M., Gauer F., Schuster C., Guerrero H.Y.: Photic regulation of mt1 melatonin receptors and 2-jodomelatonin binding in the rat and Syrian hamster. *Biol. Signals Recept.*, 2000; 9: 188–196
- [43] McCord C.P., Allen F.P.: Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J. Exp. Zool.*, 1917; 23: 207–224
- [44] Melatonin. *Monograph. Altern. Med. Rev.*, 2005; 10: 326–336
- [45] Monroe K.K., Watts S.W.: The vascular reactivity of melatonin. *Gen. Pharmacol.*, 1998; 30: 31–35
- [46] Montilla P., Tunes I., Munoz M.C., Soria J.V., López A.: Antioxidative effect of melatonin in rat brain oxidative stress induced by adriamycin. *Rev. Esp. Fisiol.*, 1997; 53: 301–305
- [47] Morgan P.J., Barrett P., Hazlerigg D., Milligan G., Lawson W., MacLean A., Davidson G.: Melatonin receptors couple through a cholera toxin-sensitive mechanism to inhibit cyclic AMP in the ovine pituitary. *J. Neuroendocrinol.*, 1995; 7: 361–369
- [48] Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J.M., Lefoulon F., Fauchere J.L., Delagrangé P., Canet E., Boutin J.A.: Identification of the melatonin binding site MT3 as quinine reductase 2. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 31311–31317
- [49] Okada T., Fujiyoshi Y., Silow M., Navarro J., Landau E.M., Shichida Y.: Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 5982–5987
- [50] Paakkonen T., Makinen T.M., Leppaluoto J., Vakkuri O., Rintamaki H., Palinkas L.A., Hassi J.: Urinary melatonin: a noninvasive method to follow human pineal function as studied in three experimental conditions. *J. Pineal Res.*, 2006; 40: 110–115
- [51] Pandey S., Lopez C., Jammu A.: Oxidative stress and activation of proteasome protease during serum deprivation-induced apoptosis in rat hepatoma cells; inhibition of cell death by melatonin. *Apoptosis*, 2003; 8: 497–508
- [52] Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R.: Melatonin: nature's most versatile biological signal? *FEBS J.*, 2006; 273: 2813–2838
- [53] Ram P.T., Dai J., Yuan L., Dong C.: Involvement of the mt1 melatonin receptor in human breast cancer. *Cancer Lett.*, 2002; 179: 141–150
- [54] Reiter R.J., Tan D.X., Gitto E., Sainz R.M., Mayo J.C., Leon J., Manchester L.C., Vijayalaxmi, Kilic E., Kilic U.: Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular level. *Pol. J. Pharmacol.*, 2004; 56: 159–170
- [55] Reppert S.M., Godson C., Mahle C.D., Weaver D.R., Slangenaupt S.A., Gusella J.F.: Molecular characterization of a novel melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 8734–8738
- [56] Reppert S.M., Weaver D.R., Ebisawa T.: Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron.*, 1994; 13: 1177–1185
- [57] Roberts J.E., Wiechmann A.F., Hu D.N.: Melatonin receptors in human uveal melanocytes and melanoma cells. *J. Pineal Res.*, 2000; 28: 165–171
- [58] Roca A., Godson C., Weaver D.R., Reppert S.: Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology*, 1996; 137: 3469–3477
- [59] Roth J.A., Rosenblatt T., Lis A., Bucelli R.: Melatonin-induced suppression of PC12 cell growth is mediated by its Gi coupled transmembrane receptors. *Brain Res.*, 2001; 919: 139–146
- [60] Sallinen P., Saarela S., Ilves M., Vakkuri O., Leppaluoto J.: The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. *Life Sci.*, 2005; 76: 1123–1134
- [61] Savaskan E., Ayoub M.A., Ravid R., Angeloni D., Fraschini F., Meier F., Eckert A., Müller-Spahn F., Jockers R.: Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer Disease. *J. Pineal Res.*, 2005; 38: 10–16
- [62] Savaskan E., Olivieri G., Meier F., Brydon L.: Increased melatonin 1a-receptor immunoreactivity in the hippocampus of Alzheimer disease patients. *J. Pineal Res.*, 2002; 32: 59–62
- [63] Schlabritz-Loutsevitch N., Hellner N., Middendorf R., Muller D., Olcese J.: The human myometrium as target for melatonin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 88: 908–913
- [64] Schuster C., Gauer F., Malan A., Recio J., Pevet P., Masson-Pevet M.: The circadian clock, light/dark cycle and melatonin are differentially involved in the expression of daily and photoperiodic variations in mt1 melatonin receptors in the Siberian and Syrian hamsters. *Neuroendocrinology*, 2001; 74: 55–68
- [65] Siu S.W., Lau K.W., Tam P.C., Shiu S.Y.: Melatonin and prostate cancer cell proliferation: interplay with castration, epidermal growth factor, and androgen sensitivity. *Prostate*, 2002; 52: 106–122
- [66] Sjoblom M., Flemstrom G.: Melatonin in the duodenal lumen is a potent stimulant of mucosal bicarbonate secretion. *J. Pineal Res.*, 2003; 34: 288–293
- [67] Słomiński A., Pisarchik A., Zbytek B., Tobin D.J., Kausser S.: Functional activity of serotonergic and melatonergic systems expressed in the skin. *J. Cell Physiol.*, 2003; 196: 144–153
- [68] Słomiński A., Wortsman J., Tobin D.J.: The cutaneous serotonergic/melatonergic system securing a place under the sun. *FASEB J.*, 2005; 19: 176–194
- [69] Smirnov A.N.: Nuclear melatonin receptors. *Biochemistry*, 2001; 66: 19–26
- [70] Steinhilber D., Brungs M., Werz O., Wiesenberg I., Danielsson C., Kahlen J.P., Nayeri S., Schröder M., Carlborg C.: The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 1995; 270: 7037–7040
- [71] Tam C.W., Chan K.W., Liu V.W., Pang B.: Melatonin as a negative mitogenic hormonal regulator of human prostate epithelial cell growth: potential mechanisms and clinical significance. *J. Pineal Res.*, 2008; 45: 403–412
- [72] von Gall C., Stehle J.H., Weaver D.R.: Mammalian melatonin receptors: molecular biology and signal transduction. *Cell Tissue Res.*, 2002; 309: 151–162
- [73] Voronkov A.E., Ivanov A.A., Baskin I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S.: The study of the mechanism of binding of human ML1A melatonin receptor ligands using molecular modeling. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2004; 394: 49–52
- [74] Voronkov A.E., Ivanov A.A., Baskin I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S.: Molecular modeling study of the mechanism of ligand binding to human melatonin receptors. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2005; 403: 284–288

- [75] Witt-Enderby P.A., Bennett J., Jarzynka M.J., Firestone S., Melan M.A.: Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanism. *Life Sci.*, 2003; 72: 2183–2198
- [76] Woo M.M., Tai C.J., Kang S.K., Nathwani P.S., Pang S.F., Leung P.C.: Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 4789–4797
- [77] Xi S.C., Tam P.C., Brown G.M., Pang S.F., Shiu S.Y.: Potential involvement of mt1 receptor and attenuated sex steroid-induced calcium influx in the direct antiproliferative action of melatonin on androgen-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *J. Pineal Res.*, 2000; 29: 172–183
- [78] Yerneni L.K., Jayaraman S.: Pharmacological action of high doses of melatonin on B16 murine melanoma cells depends on cell number at time of exposure. *Melanoma Res.*, 2003; 13: 113–117
- [79] Ying S.W., Niles L.P., Crocker C.: Human malignant melanoma cells express high affinity receptors for melatonin: antiproliferative effects of melatonin and 6-chloromelatonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 1993; 246: 89–96

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

