

## МЕХАНИЗМЫ ROR $\alpha$ -ЗАВИСИМЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЛАТОНИНА

**Куклина Е.М.**

*Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия*

**Резюме.** Транскрипционному фактору ROR $\alpha$  традиционно не приписывали принципиальной роли в развитии клеток Th17, однако недавними исследованиями показано, что он необходим для формирования патогенного варианта клеток Th17 — так называемых Th1-поляризованных Th17 (Th17.1). Поскольку транскрипционная активность ROR $\alpha$  зависит от связывания лиганда, высокую актуальность имеет поиск таких лигандов, и в этой связи особый интерес представляет мелатонин — вопрос о способности ROR $\alpha$  напрямую связывать мелатонин на сегодняшний день остается открытым, данные по этой проблеме крайне противоречивы. В 1995 г. I. Wiesenberg с коллегами идентифицировали ROR $\alpha$  как ядерный рецептор для мелатонина, продемонстрировав способность гормона усиливать связывание данного фактора с ДНК и определив с помощью классического скэтчардовского анализа константу диссоциации для взаимодействия ROR $\alpha$  с мелатонином. В 2011 г. P.J. Lardone с коллегами «перепроверили» ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина, продемонстрировав копреципитацию мелатонина с ROR $\alpha$ . А в 2016 г. A.J. Slominski и соавт. опубликовали статью, которая поставила под сомнение возможность связывания мелатонина с ROR $\alpha$  — исходя из данных молекулярного моделирования лиганд-рецепторных взаимодействий, подкрепленных функциональными исследованиями. Однако внимательный анализ этих данных указывает на неоднозначность такого вывода, позволяя говорить, скорее, о средней или низкой аффинности связывания гормона с ROR $\alpha$ , но не о его отсутствии. В пользу этого заключения говорит и тот факт, что ROR $\alpha$  опосредует многие эффекты мелатонина — как физиологические, так и фармакологические, включая регуляцию циркадных ритмов и окислительного метаболизма, нейро- и кардиопротекцию, а также контроль иммунного ответа. В целом, имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют рассматривать транскрипционный фактор ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина со средней аффинностью, хотя не исключена и непрякая регуляция этого фактора гормоном, и ROR $\alpha$ -зависимые механизмы должны вносить вклад в ответ клеток на мелатонин как в физиологических условиях, так и в случае фармакологического применения гормона.

*Ключевые слова:* мелатонин, ROR $\alpha$ , T-хелперы, Th17, Th17.1, лиганд-рецепторные взаимодействия, MT1, MT2

## MECHANISMS OF ROR $\alpha$ -DEPENDENT EFFECTS OF MELATONIN

**Kuklina E.M.**

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

**Abstract.** The transcription factor ROR $\alpha$  has not traditionally been attributed a fundamental role in the development of Th17 cells, but recent studies have shown that it is necessary for the formation of a pathogenic

### Адрес для переписки:

Куклина Елена Михайловна  
Институт экологии и генетики микроорганизмов  
Уральского отделения Российской академии наук  
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.  
Тел.: 8 (902) 472-56-95.  
E-mail: ibis\_07@mail.ru

### Address for correspondence:

Elena M. Kuklina  
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms  
13 Golev St  
Perm  
614081 Russian Federation  
Phone: +7 (902) 472-56-95.  
E-mail: ibis\_07@mail.ru

### Образец цитирования:

Е.М. Куклина «Механизмы ROR $\alpha$ -зависимых эффектов мелатонина» // Российский иммунологический журнал, 2024. Т. 27, № 2. С. 203–206.  
doi: 10.46235/1028-7221-16625-MOR

© Куклина Е.М., 2024

Эта статья распространяется по лицензии  
Creative Commons Attribution 4.0

### For citation:

E.M. Kuklina “Mechanisms of ROR $\alpha$ -dependent effects of melatonin”, Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2024, Vol. 27, no. 2, pp. 203–206.  
doi: 10.46235/1028-7221-16625-MOR

© Kuklina E.M., 2024

The article can be used under the Creative  
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-16625-MOR

variant of Th17 cells, the so-called Th1-polarized Th17 (Th17.1). Since the transcriptional activity of ROR $\alpha$  depends on ligand binding, the search for such ligands is highly relevant, and in this regard, melatonin is of particular interest. The question of the ability of ROR $\alpha$  to directly bind melatonin remains open today; data on this problem are extremely contradictory. In 1995, I. Wiesenberg and colleagues identified ROR $\alpha$  as a nuclear receptor for melatonin, demonstrating the hormone's ability to enhance the binding of this factor to DNA and determining the dissociation constant for the interaction of ROR $\alpha$  with melatonin using classical Scatchard analysis. In 2011, P.J. Lardone and colleagues "rediscovered" ROR $\alpha$  as a receptor for melatonin by demonstrating the coprecipitation of melatonin with ROR $\alpha$ . And in 2016, A.J. Slominski and colleagues published a paper that cast doubt on the possibility of melatonin binding to ROR $\alpha$  based on molecular modeling of ligand-receptor interactions supported by functional studies. However, a careful analysis of these data indicates the ambiguity of this conclusion, allowing us to speak, rather, of medium or low binding affinity of the hormone to ROR $\alpha$ , but not of its absence. This conclusion is also supported by the fact that ROR $\alpha$  mediates many of the effects of melatonin, both physiological and pharmacological, including the regulation of circadian rhythms and oxidative metabolism, neuro- and cardioprotection, and control of the immune response. In general, the data available today allow us to consider the transcription factor ROR $\alpha$  as a receptor for melatonin with medium affinity, although indirect regulation of this factor by the hormone is not excluded, and ROR $\alpha$ -dependent mechanisms should contribute to the cellular response to melatonin, both under physiological conditions and in the case of pharmacological use of the hormone.

*Keywords: melatonin, ROR $\alpha$ , T helper cells, Th17, Th17.1, ligand-receptor interactions, MT1, MT2*

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 124020500027-7.

## Введение

ROR $\alpha$  — ядерный орфанный рецептор, родственный рецепторам ретиноевой кислоты, член суперсемейства стероид/тиреоидных рецепторов. Это лиганд-зависимый транскрипционный фактор: в ответ на связывание эндогенного или экзогенного лиганда он изменяет конформацию, ассоциирует с коактиватором или корепрессором и, соответственно, стимулирует или подавляет транскрипцию генов-мишеней. ROR $\alpha$  широко экспрессирован в тканях организма, включая скелетные мышцы, яички, клетки Пуркинье в мозжечке, сетчатку. В иммунной системе экспрессия этого фактора ограничивается преимущественно Т-хелперной популяцией Th17, для которой ROR $\alpha$  является одним из двух ключевых факторов дифференцировки, наряду с ROR $\gamma$ t [14]. Функции ROR $\alpha$  и ROR $\gamma$ t в развитии Th17 частично перекрываются: оба фактора индуцируют транскрипцию ключевых Th17-ассоциированных факторов, включая IL-17A, IL-23R, CCL20 and CCR6, что подтверждается и наличием Th17-зависимого ответа у животных с дефицитными по ROR $\alpha$  Т-лимфоцитами, хотя этот ответ и снижен [14]. Поэтому экспрессию ROR $\alpha$  в клетках Th17 традиционно считали необязательной, «дополнительной». Однако недавними исследованиями показано, что ROR $\alpha$  играет принципиальную роль в этом процессе: он необходим для развития патогенного варианта клеток Th17 — так называемых Th1-поляризованных Th17 (Th17.1), коэкспрессирующих Th1-ассоциированный транскрипционный фактор T-bet и копродукци-

рующих наряду с IL-17 Th1-зависимый IFN $\gamma$ , а также GM-CSF [5]. Учитывая, что транскрипционная активность ROR $\alpha$  зависит от связывания лиганда, высокую актуальность приобретает вопрос о регуляции данного фактора, и в этой связи особый интерес представляет мелатонин — вопрос о способности ROR $\alpha$  напрямую связывать мелатонин на сегодняшний день остается открытым, данные по этой проблеме крайне противоречивы. Между тем, внимательный анализ этих данных позволяет разрешить эти противоречия, что и является задачей данной работы.

## Материалы и методы

Поиск литературы о ROR-зависимых эффектах мелатонина в Т-лимфоцитах и нелимфоидных клетках проводился в базе данных PubMed с использованием соответствующих ключевых слов, без ограничения по языку и дате публикаций.

## Результаты и обсуждение

Способность мелатонина проникать сквозь клеточную мембрану и неоднократная демонстрация его присутствия в ядре, в частности, в ядерных фракциях тимоцитов и спленоцитов крысы, еще тридцать лет назад инициировали поиск ядерных рецепторов для гормона. В 1995 г. I. Wiesenberg с коллегами идентифицировали ROR $\alpha$  как ядерный рецептор для мелатонина [13], продемонстрировав способность гормона усиливать связывание данного фактора с ДНК и определив с помощью классического скэтчардовского анализа константу диссоциации для взаимодействия ROR $\alpha$  с мелатонином ( $K_d = 1,71$  nM). Строго говоря, данный эффект был показан для сплайсинг-варианта ROR $\alpha$ 1, но, согласно сик-

венс-анализу, лиганд-связывающие домены всех вариантов рецептора идентичны. Поэтому данные, полученные для ROR $\alpha$ 1, можно отнести и к другим вариантам ROR $\alpha$  – ROR $\alpha$ 2, ROR $\alpha$ 3 и ROR $\alpha$ 4 [13]. В 2011 г. P.J. Lardone с коллегами «переоткрыли» ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина [9], показав на Т-лимфоцитарной линии Jurkat, что мелатонин копреципитируется (иммуноблоттинг) и колокализуется с ROR $\alpha$  (иммунофлуоресцентный анализ), а также в наномолярных концентрациях вызывает перераспределение ROR $\alpha$  внутри клетки, регистрируемое с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии [9], что, хоть и косвенно, но убедительно указывает на взаимодействие гормона с ROR $\alpha$ .

В 2016 г. вышла статья А.А. Slominski и соавт. под названием “ROR $\alpha$  is not a receptor for melatonin”. Фактически, это комментарий, в котором автор обращает внимание на свою недавнюю работу [12], не выявившую взаимодействия мелатонина с ROR $\alpha$  с помощью молекулярного моделирования лиганд-рецепторных взаимодействий, а также функционального анализа способности мелатонина напрямую регулировать ROR $\alpha$  [12]. Однако внимательный анализ представленных в работе данных указывает на неоднозначность такого вывода, и прежде всего это относится к результатам молекулярного докинга, в котором на основе данных о кристаллической структуре лиганд-связывающего домена ROR $\alpha$  определялась конформация его связывания с лигандами (в том числе с мелатонином) и оценивалась потенциальная энергия такого взаимодействия. Во-первых, молекулярный докинг – это виртуальный анализ, и несмотря на довольно высокую точность, он рассматривается исключительно как инструмент предварительного скрининга, результаты которого требуют последующего экспериментального подтверждения. Во-вторых, по результатам молекулярного докинга, потенциальная энергия взаимодействия мелатонина с лиганд-связывающим доменом ROR $\alpha$  составляет –6,67 ккал/М [12], что позволяет говорить о среднем или низком родстве мелатонина к ROR $\alpha$ , но не о его отсутствии. И этот результат не противоречит полученным ранее экспериментальным данным, согласно которым аффинность связывания мелатонина с ROR $\alpha$  в 5–20 раз ниже таковой для его взаимодействия с классическими мембранными рецепторами, MT1 (Kd = 80,7 pM) и MT2 (Kd = 383 pM) [8]. Что касается функционального теста, использованного в работе, он был сконструирован специально для оценки активности антагонистов ROR: это вариант люциферазного репортерного анализа в клеточной системе с доксициклин-индуцируемой стабильной экспрессией ROR $\alpha$  – последнюю фиксировали по активности репортера, работающего под контролем RORE, в присутствии потенциальных ан-

тагонистов. Мелатонин в такой системе не оказывал значимого влияния на активность ROR $\alpha$ . Однако важно отметить, что в большинстве исследований мелатонин выступает в роли не антагониста, а агониста: он усиливает транскрипционную активность ROR $\alpha$  [7, 9, 13]. А оценка действия потенциального активатора ROR $\alpha$  в условиях изначальной интенсивной активации этого фактора малоинформативна. По крайней мере отсутствие эффектов мелатонина в данной системе не исключает способности гормона самостоятельно индуцировать или усиливать транскрипционную активность ROR $\alpha$ . Кроме того, мелатонин в функциональных тестах использован в микромолярных концентрациях, в которых он неспецифически взаимодействует со многими внутриклеточными мишенями, такими как кальмодулин или глутатион трансфераза, и действие гормона, опосредуемое этими мишенями, может просто перекрывать его ROR $\alpha$ -зависимые эффекты. В связи с вышесказанным, на сегодняшний день нет веских оснований исключать ROR $\alpha$  из состава мелатониновых рецепторов.

В пользу этого заключения говорит и тот факт, что ROR $\alpha$  опосредует многие важные эффекты мелатонина – как физиологические, так и фармакологические, включая регуляцию циркадных ритмов [10] и окислительного метаболизма [2, 6], нейро- и кардиопротекцию [6, 15], стимуляцию дифференцировки одонтобластов [7], а также контроль иммунного ответа [3, 4]. Эффекты мелатонина в этих исследованиях отменялись полностью или частично на фоне блокады ROR $\alpha$  *in vitro* [2, 4, 7] и *in vivo* [3, 10], тогда как блокада мембранных мелатониновых рецепторов (MT1/MT2) в аналогичных условиях не изменяла действия мелатонина. Следует, однако, отметить, что описанные выше эффекты, теоретически, могут быть результатом не прямого связывания мелатонина с ROR $\alpha$ , а опосредованного – в качестве такого посредника может выступать, например, сиртуин 1 (SIRT1), что показано в целом ряде работ [11]. Кроме того, имеется немало данных о посттрансляционных модификациях, модулирующих активность ROR $\alpha$  – так, он может фосфорилироваться протеинкиназой А (PKA) по Ser99 или протеинкиназой ERK2 по Thr128, что существенно усиливает транскрипционную активность данного фактора. Сумоилирование ROR $\alpha$ , т. е. ковалентное присоединение к остаткам лизинов малых убиквитин-подобных модифицирующих белков (SUMO), также приводит к его активации.

В целом имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют рассматривать транскрипционный фактор ROR $\alpha$  как рецептор для мелатонина со средней аффинностью, хотя не исключена и непрямая регуляция этого фактора гормоном, и ROR $\alpha$ -зависимые механизмы должны вносить

вклад в ответ клеток на мелатонин как в физиологических условиях, так и в случае фармакологического применения гормона.

## Заключение

В заключении следует отметить недавнюю работу N. Fang и соавт., демонстрирующую способность мелатонина напрямую взаимодействовать

с лиганд-связывающим доменом рецептора витамина D (VDR), также ядерного рецептора [1]. И хотя константа диссоциации для такого связывания ( $K_d$   $21,2 \pm 1,9$  мкМ) указывает на его низкую аффинность, авторы отмечают, что эти данные вновь открывают дискуссию о возможном существовании ядерных мишеней для мелатонина.

## Список литературы / References

1. Fang N., Chunyi H., Wenqi S., Ying X., Yeqi G., Le W., Qing P., Russel J. R., Lifeng L. Identification of a novel melatonin-binding nuclear receptor: Vitamin D receptor. *J. Pineal Res.*, 2018, Vol. 68, no. 1, e12618. doi.org/10.1111/jpi.12618.
2. Fang Y., Zhang J., Li Y., Guo X., Li J., Zhong R., Zhang X. Melatonin-induced demethylation of antioxidant genes increases antioxidant capacity through ROR $\alpha$  in cumulus cells of prepubertal lambs. *Free Radical Biol. Med.*, 2019, Vol. 131, pp. 173-183.
3. García J.A., Volt H., Venegas C., Doerrier C., Escames G., López L.C., Acuña-Castroviejo D. Disruption of the NF- $\kappa$ B/NLRP3 connection by melatonin requires retinoid-related orphan receptor- $\alpha$  and blocks the septic response in mice. *FASEB J.*, 2015, Vol. 29, pp. 3863-3875.
4. Glebezdina N.S., Nekrasova I.V., Olina A.A., Sadykova G.K., Kuklina E.M. Differentiation of T cells producing interleukin-17 (Th17) against the background of exogenous melatonin during pregnancy. *J. Pineal Res.*, 2023, Vol. 75, e12904. doi:10.1111/jpi.12904.
5. Hall J.A., Pokrovskii M., Kroehling L., Kim B.R., Kim S.Y., Wu L., Lee J.Y., Littman D.R. Transcription factor ROR $\alpha$  enforces stability of the Th17 cell effector program by binding to a Rorc cis-regulatory element. *Immunity*, 2022, Vol. 55, no. 11, pp. 2027-2043.
6. He B., Zhao Y., Xu L., Gao L., Su Y., Lin N., Pu J. The nuclear melatonin receptor ROR $\alpha$  is a novel endogenous defender against myocardial ischemia/reperfusion injury. *J. Pineal Res.*, 2016, Vol. 60, pp. 313-326.
7. Kang J., Chen H., Zhang F., Yan T., Fan W., Jiang L., He H., Huang F. ROR $\alpha$  regulates odontoblastic differentiation and mediates the pro-odontogenic effect of melatonin on dental papilla cells. *Molecules*, 2021, Vol. 26, 1098. doi: 10.3390/molecules26041098.
8. Kato K., Hirai K., Nishiyama K., Uchikawa O., Fukatsu K., Ohkawa S., Kawamata Y., Hinuma S., Miyamoto M. Neurochemical properties of ramelteon (TAK-375), a selective MT1/MT2 receptor agonist. *Neuropharmacology*, 2005, Vol. 48, no. 2, pp. 301-310.
9. Lardone P.J., Guerrero J.M., Fernández-Santos J.M., Rubio A., Martín-Lacave I., Carrillo-Vico A. Melatonin synthesized by T lymphocytes as a ligand of the retinoic acid-related orphan receptor. *J. Pineal Res.*, 2011, Vol. 51, pp. 454-462.
10. Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A., Hogenesch J.B. A functional genomics strategy reveals rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 2004, Vol. 43, pp. 527-537.
11. Shah S.A., Khan M., Jo M.H., Jo M.G., Amin F.U., Kim M.O. Melatonin stimulates the SIRT1/Nrf2 signaling pathway counteracting lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress to rescue postnatal rat brain. *CNS Neurosci. Ther.*, 2017, Vol. 23, pp. 33-44.
12. Slominski A.T., Kim T.K., Takeda Y., Janjetovic Z., Brozyna A.A., Skobowiat C., Wang J., Postlethwaite A., Li W., Tuckey R.C. ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  are expressed in human skin and serve as receptors for endogenously produced noncalcemic 20-hydroxy- and 20,23-dihydroxyvitamin D. *FASEB J.*, 2014, Vol. 28, pp. 2775-2789.
13. Wiesenberg I., Missbach M., Kahlen J.P., Schröder M., Carlberg C. Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res.*, 1995, Vol. 23, pp. 327-333.
14. Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R., Akimzhanov A., Kang H.S., Chung Y., Ma L., Shah B., Panopoulos A.D., Schluns K.S., Watowich S.S., Tian Q., Jetten A.M., Dong C. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity*, 2008, Vol. 28, pp. 29-39.
15. Zhang M., Zhao Y., Gao L., Zhong F., Qin Z., Tong R., Ai L., Petersen L., Yan Y., Gao Y. The circadian nuclear receptor ROR $\alpha$  negatively regulates cerebral ischemia-reperfusion injury and mediates the neuroprotective effects of melatonin. *BBA Mol. Basis Dis.*, 2020, Vol. 1866, 165890. doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165890.

### Автор:

**Куклина Е.М.** – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

### Author:

**Kuklina E.M.**, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunoregulation, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Поступила 22.03.2024

Отправлена на доработку 24.03.2024

Принята к печати 31.03.2024

Received 22.03.2024

Revision received 24.03.2024

Accepted 31.03.2024