(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 965043 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 965043

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C07K 14/705
C12N 15/12
C12Q 1/68

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **07.06.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.12.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **13.02.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **07.06.1995 PCT/US1995/007360**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

17.06.1994 US 261857
06.06.1995 US 466103
07.10.1994 US 319887

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **The General Hospital Corporation,** 55 Fruit Street, Boston, MA 02114, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Reppert, Steven M.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 • **Ebisawa, Takashi,** Tokyo 187, JAPANI, (JP)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Suuriaffiniteettisia melatoniinireseptoreita ja niiden käyttö
Melatoninreceptorer med hög affinitet och användning av dessa

Suuriaffiniteettisia melatoniinireseptoreita ja niiden käyttömuotoja

Liittovaltion tukemaa tutkimusta koskeva maininta

Tämä keksintö tehtiin ainakin osittain Yhdysvaltain hallituksen myöntämien apurahojen turvin ja tästä syystä hallituksella on oikeuksia tähän keksintöön.

Keksinnön tausta

Keksintö liittyy nukleiinihappoihin ja niiden koodaamiin suuriaffiniteettisiin melatoniinireseptoriproteiineihin.

Suuriaffiniteettinen melatoniinireseptori on membraaniproteiini, joka kytkeytyy guaniininukleotidia sitoviin proteiineihin (G-proteiineihin). G-proteiinit viestivät puolestaan ligandin aktivoiman reseptorin signaaleja asiaankuuluvalle(ville) solunsisäiselle(sille) efektorijärjestelmälle(mille). Hormoni, melatoniini, inhiboi adenylyylisyklaasia ja saa aikaan solunsisäisen syklisen AMP:n (cAMP) konsentraation pienenemisen.

Selkärankaisten käpylisäkkeen tärkeimmällä hormonilla, melatoniinilla, on voimakkaita neurobiologisia vaikutuksia. Melatoniini vaikuttaa vuorokausirytmiin ja toimii vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvissä nisäkkäissä lisääntymistoimintoihin kohdistuvien valojakson vaikutusten välittäjänä. Ihmisillä on melatoniinin antamisen osoitettu lievittävän aikaerorasituksen oireita useita aikavyöhykkeitä ylittäneen lentomatkan jälkeen. Hormonilla on ihmiseen myös voimakkaita rauhoittavia vaikutuksia ja se voi olla käyttökelpoinen unilääke.

Melatoniini saa aikaan valoperiodi- ja vuorokausirytmivaikutuksensa farmakologisesti spesifisten suuriaffiniteettisten reseptorien välityksellä [Dubocovich, M. L. ja Takahashi, J., P.N.A.S. USA 84 (1987) 3916 - 3920; Vanecek, J., J. Neurochem. 51 (1988) 1436 - 1440; Reppert, et al., (1988) edellä]. Käpylisäkkeen melatoniinin eritys

vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvillä eläimillä säätelee vuodenajan mukaan määräytyviä reaktioita päivän pituuden muutoksiin [Hartness, T. J. ja Goldman, B. D., Experientia 45 (1989) 939 - 945; Karsch, et al., Recent Prog. Horm. Res. 40 (1984) 185 - 232]. Aivolisäkkeen osan muodostava pars tuberalis (PT) on ainoa kohta, joka sisältää melatoniini 1a -reseptoreja kaikissa tähän päivämäärään mennessä tutkituissa valoperiodeihin reagoivassa lajeissa [Weaver, et al., Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Klein, D. C., Moore, R. Y. ja Reppert, S. M., toim., New York: Oxford University Press; (1991) 289 - 308]. Muista lajeista poiketen ei ihmisellä esiinny PT:ssä yhdenmukaisesti melatoniini 1a -reseptoreja.

Suuriaffiniteettisia melatoniini-1a (Mel-1a) -reseptoreja sijaitsee rajoitetuilla alueilla useiden selkärankaisiin kuuluvien nisäkäslajien, mukaan lukien ihmisten, keskushermostoa. 2-[^{125}I]-jodimelatoniiniligandin (^{125}I-melatoniinin eli [^{125}I]Mel:n) käyttöön perustuvilla ligandinsitomistutkimuksilla on tunnistettu suuriaffiniteettisia melatoniini 1a -reseptoreita (K_d < 2 x 10^{-10} M) kohteissa, kuten näköhermoristin yläpuoliset tumakkeet (SCN), joka on useita vuorokausirytmejä säätelevän biologisen kellon sijaintipaikka [Reppert, et al., Science 242 (1988) 78 - 81]. Tähän päivämäärään mennessä ei suuriaffiniteettisia melatoniinireseptoreja ole tunnistettu aivojen ulkopuolisissa keskushermoston kudoksissa.

Reseptoriaffiniteetti reagoi herkästi guaniininukleotideihin ja reseptorien aktivoituminen saa poikkeuksetta aikaan adenylyylisyklaasin inhiboitumisen hinkuyskätoksiinille herkän mekanismin välityksellä [Rivkees, S. A., et al., P.N.A.S. USA 86 (1989) 3883 - 3886; Carlson, L. L., et al., Endocrinology 125 (1989) 2670 - 2676; Morgan, P. J., et al., Neuroendocrinology 50 (1989) 358 - 362; Morgan, P.J., et al., J. Neuroendocrinol. 2 (1990) 773 - 776; Laitinen, J.T. ja Saavedra, J.M., Endocrinology

126 (1990) 2110 - 2115]. Suuriaffiniteettiset melatoniini-reseptorit näyttävät siten kuuluvan G-proteiiniin kytkeytyvien reseptorien yläryhmään.

Keksinnön yhteenveto

Keksintö koskee yleisellä tasolla huomattavan puhdasta DNA:ta (cDNA:ta tai perimän DNA:ta), joka koodaa aivoissa esiintyvää suuriaffiniteettista melatoniini 1a -reseptoria ja verkkokalvolla esiintyvää melatoniini 1b -reseptoria. Keksintö koskee myös huomattavan puhtaita suuriaffiniteettisen melatoniini 1a- ja 1b -reseptorin polypeptidejä. Reseptori sisältää melatoniini 1a -reseptorien edullisissa sovellutusmuodoissa aminohapposekvenssin, joka on huomattavassa määrin identtinen aminohapposekvenssin suhteen, joka on esitetty kuviossa 1 (sekvenssi nro 2), kuviossa 2 (sekvenssi nro 4); kuviossa 3 (sekvenssi nro 14); kuviossa 5 (sekvenssi nro 12) tai joka sisältää kuvion 4 mukaisen aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 6).

Keksintö koskee myös uutta melatoniinireseptoriryhmää, jolle on annettu nimitys melatoniini-1b (Mel-1b), joka on erotettavissa omaksi ryhmäkseen kudoksiin jakautumisensa ja ligandinsitomisominaisuuksiensa perusteella. Mel-1b-reseptori sisältää edullisissa sovellutusmuodoissa aminohapposekvenssin, joka on huomattavassa määrin identtinen kuviossa 6 esitetyn aminohapposekvenssin suhteen (sekvenssi nro 16).

Tämä keksintö sisältää polypeptidin, jossa on aminohapposekvenssi, joka sisältää domeenin, joka kykenee sitomaan melatoniinia ja saamaan aikaan solunsisäisen cAMP:n konsentraation pienenemisen, ja joka sekvenssi on vähintään 80-%:isesti identtinen kuvioissa 1 - 6 esitetyn aminohapposekvenssin suhteen. Tämä keksintö koskee myös huomattavan puhdasta polypeptidiä, joka on suuriaffiniteettisen melatoniini-1a- tai melatoniini-1b-reseptorin fragmentti tai analogi ja joka sisältää domeenin, joka

kykenee sitomaan melatoniinia ja saamaan aikaan solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemisen.

Reseptori tai reseptorifragmentti on useissa erilaisissa edullisissa sovellutusmuodoissa peräisin selkärankaisesta eläimestä, edullisesti ihmisestä, lampaasta, hiirestä tai Xenopus laeviksesta.

Termi "suuriaffiniteettinen melatoniinireseptoripolypeptidi" tarkoittaa kokonaista selkärankaissolun pintaproteiinia tai tämän osaa, joka sitoo spesifisesti melatoniinia ja tuottaa signaalin asiaankuuluvalle melatoniinin välityksellä tapahtuvalle biologisten ilmiöiden sarjalle (esimerkiksi solunsisäisen cAMP:n konsentraation pienenemiselle). Polypeptidille on luonteenomaista, että sen ligandia sitovat ominaisuudet (mukaan lukien agonistia ja antagonistia sitovat ominaisuudet ja jakautuminen kudoksiin) ovat tässä keksinnössä kuvattujen ominaisuuksien mukaiset.

Termi "polypeptidi" tarkoittaa mitä tahansa aminohappoketjua katsomatta siihen, minkä pituinen se on tai millä tavoin se on modifioitu (esimerkiksi glykosyloitu) translaation jälkeen.

Termi "huomattavan puhdas" tarkoittaa, että tästä keksinnöstä saatava suuriaffiniteettinen melatoniinireseptoripolypeptidi on vähintään 60 paino-%:isesti sellainen, ettei siinä ole niitä proteiineja ja muita luonnossa esiintyviä orgaanisia molekyylejä, joiden yhteydessä se esiintyy luonnossa. Preparaatti on edullisesti vähintään 75-paino-%:isesti, edullisesti vähintään 90 paino-%:isesti ja edullisimmin vähintään 99 paino-%:isesti suuriaffiniteettista melatoniinireseptoripolypeptidiä. Huomattavan puhdasta suuriaffiniteettista melatoniinireseptoripolypeptidiä voidaan saada esimerkiksi siten, että sitä eristetään luonnossa esiintyvästä materiaalilähteestä; sitä ilmennetään suuriaffiniteettista melatoniinireseptoripolypeptidiä koodaavasta yhdistelmänukleiinihaposta tai pro-

teiinia syntetoidaan kemiallisesti. Puhtausaste voidaan määrittää millä tahansa asiaankuuluvalla menetelmällä, esimerkiksi kolonnikromatografialla, polyakryyliamidigeelielektroforeesilla tai HPLC-analyysillä.

Termi "huomattavan identtinen" aminohapposekvenssi tarkoittaa aminohapposekvenssiä, joka poikkeaa alkuperäisestä ainoastaan konservatiivisten aminohapposubstituutioiden perusteella, esimerkiksi siten, että yksi aminohappo on korvautunut toisella saman ryhmän aminohapolla (esimerkiksi glysiini valiinilla, lysiini arginiinilla ja niin edelleen) tai yhden tai useamman ei-konservatiivisen aminohapposubstituution, -deleetion tai -insertion perusteella, jotka sijaitsevat aminohapposekvenssissä sellaisissa asemissa, joiden vaikutuksesta reseptori ei menetä biologista aktiivisuutta. Tällaisia vastaavanlaisia reseptoreja voidaan eristää uuttamalla niitä sellaisen eläimen kudoksista tai soluista, joka tuottaa tällaista reseptoria luontaisesti tai joka voidaan indusoida tuottamaan tätä käyttäen tuonnempana kuvattavia menetelmiä tai näitä vastaavia menetelmiä; tai niitä voidaan eristää syntetoimalla kemiallisesti; tai niitä voidaan eristää tavallisin yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmin, esimerkiksi eristämällä tällaista reseptoria koodaava cDNA tai perimän DNA.

Termi "peräisin" tarkoittaa kyseessä olevan organismin perimän koodaamaa ja organismin solujen alaryhmän pinnalla esiintyvää.

Vielä yhdessä näihin liittyvässä kohteessa tämä keksintö koskee eristettyä DNA:ta, joka koodaa edellä kuvattua suuriaffiniteettista melatoniini-1a- tai melatoniini-1b-reseptoria (tai reseptorifragmenttia tai tämän analogia). Puhdistettu DNA on edullisesti cDNA:ta; ja se on cDNA:ta, joka koodaa Xenopus laeviksen suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria; ja se on cDNA:ta, joka koodaa lampaan suuriaffiniteettista melatoniini-1a-reseptoria; ja se on cDNA:ta, joka koodaa ihmisen suuriaffiniteettista

melatoniini-1a-reseptoria; ja se on cDNA:ta, joka koodaa ihmisen suuriaffiniteettista melatoniini-1b-reseptoria.

Termi "eristetty DNA" tarkoittaa DNA:ta, joka ei ole keskeytyksettä yhtäjaksoinen (toisin sanoen liittynyt kovalenttisesti) molempien niiden koodaavien sekvenssien suhteen, joiden kanssa se on keskeytyksettä yhtäjaksoinen (toisin sanoen toinen 5'-päässä ja toinen 3'-päässä sijaitseva sekvenssi) sen organismin luonnossa esiintyvässä perimässä, josta tämän keksinnön mukainen DNA on peräisin. Tämä termi sisältää tästä syystä esimerkiksi yhdistelmä-DNA:n, joka on liitetty vektoriin; itsenäisesti replikoituvaan plasmidiin tai virukseen; tai prokaryootin tai eukaryootin perimän DNA:han; tai joka esiintyy erillisenä molekyylinä (esimerkiksi cDNA:na tai perimän tai cDNA:n fragmenttina, joka on valmistettu käyttämällä PCR:ää tai pilkkomista restriktioendonukleaasilla) muista sekvensseistä riippumattomassa muodossa. Se sisältää myös yhdistelmä-DNA:n, joka on osa ylimääräistä polypeptidisekvenssiä koodaavaa hybridigeeniä.

Muissa tähän liittyvissä kohteissa tämä keksintö koskee vektoreita, jotka sisältävät tällaista eristettyä DNA:ta ja jotka kykenevät edullisesti ohjaamaan tämän DNA:n koodaaman proteiinin ilmentymistä vektoria sisältävässä solussa; sekä tällaisia vektoreita sisältäviä soluja (edullisesti eukaryoottisoluja), esimerkiksi CHO-soluja (ATCC; luettelon nro CCL61) tai COS-7-soluja (ATCC; luettelon nro CRL1651). Nämä solut transfektoidaan edullisesti pysyvästi tällaisella eristetyllä DNA:lla.

Termi "transformoitu solu" tarkoittaa solua, johon (tai jonka lähtömuotoon) on liitetty geenien muokkauskeinoin DNA-molekyyli, joka koodaa suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria (tai tämän fragmenttia tai analogia). Tämä DNA-molekyyli "on sijoitettu ilmentämiseen soveltuvaan asemaan", mikä tarkoittaa sitä, että DNA-molekyyli on asetettu tämän sekvenssin transkriptiota ja translaatiota

ohjaavan DNA-sekvenssin perään (toisin sanoen edistää suuriaffiniteettisen melatoniinireseptoriproteiinin tai tämän fragmentin tai analogin muodostumista).

Termi "sitoo spesifisesti" tarkoittaa tässä keksinnössä ainetta, kuten melatoniinia, melatoniinianalogia tai jotakin muuta kemiallista ainetta, mukaan lukien polypeptidejä, kuten vasta-ainetta, joka sitoo suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria, reseptoripolypeptidiä tai tämän fragmenttia tai analogia mutta joka ei huomattavassa määrin sido muita molekyylejä, joita esiintyy näytteessä, esimerkiksi suuriaffiniteettista melatoniinireseptoripolypeptidiä luontaisesti sisältävässä biologisessa näytteessä. Edullisessa tapauksessa tämä aine aktivoi tai inhiboi sitomansa proteiinin biologista aktiivisuutta in vivo -olosuhteissa. Termi "biologinen aktiivisuus" tarkoittaa suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin kykyä sitoa melatoniinia ja tuottaa signaalin asiaankuuluvalle peräkkäisten biologisten ilmiöiden sarjalle (tässä keksinnössä kuvatulla tavalla).

Vielä yhdessä tämän keksinnön kohteessa keksintö koskee menetelmää, jolla ehdolle asetetuista yhdisteistä seulotaan esiin yhdisteet, jotka kykenevät toimimaan suuriaffiniteettisen melatoniini-1a-reseptorin ligandin tai melatoniini-1b-reseptorin ligandin agonistina. Tämä menetelmä sisältää sen, että: a) saatetaan ehdolle asetettu agonistinen yhdiste kosketukseen suuriaffiniteettisen yhdistelmä-melatoniinireseptorin (tai melatoniinia sitovan fragmentin tai analogin) kanssa; b) määritetään ligandin sitoutuminen reseptoriin, reseptoripolypeptidiin tai reseptorifragmenttiin tai -analogiin; ja c) tunnistetaan agonistiyhdisteet yhdisteiksi, jotka sitovat yhdistelmäreseptoria ja käynnistävät solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemisen.

Termi "agonisti" tarkoittaa molekyyliä, joka jäljittelee tiettyä nimenomaista aktiivisuutta, tässä tapauk-

sessa suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin ligandin kykyä sitoutua suuriaffiniteettiseen melatoniinireseptoriin ja saattaa käyntiin tämän vuorovaikutuksen aikaansaamat biologisen ilmiöt (esimerkiksi solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemisen). Agonistin aktiivisuus voi olla luonnossa esiintyvän suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin ligandin aktiivisuutta suurempi.

Vielä yhdessä kohteessa tämä keksintö koskee menetelmää, jolla ehdolle asetetuista yhdisteistä seulotaan esiin yhdiste, joka kykenee toimimaan antagonistina melatoniinin ja suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin vuorovaikutukselle. Tämä menetelmä sisältää sen, että: a) saatetaan ehdolle asetettu antagonistinen yhdiste kosketukseen toisaalta ensimmäisen yhdisteen kanssa, joihin yhdisteisiin kuuluvat suuriaffiniteettinen yhdistelmä-melatoniinireseptori (tai melatoniinia sitova fragmentti tai analogi), ja toisaalta toisen yhdisteen kanssa, joihin yhdisteisiin kuuluu melatoniini; b) määritetään ensimmäisen ja toisen yhdisteen mahdollinen sitoutuminen; ja c) tunnistetaan antagonistiset yhdisteet yhdisteiksi, jotka estävät ensimmäisen yhdisteen sitoutumisen toiseen yhdisteeseen ja jotka rajoittavat melatoniinin välityksellä syntyvää solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemistä.

Termi "antagonisti" tarkoittaa molekyyliä, joka inhiboi tiettyä nimenomaista aktiivisuutta, tässä tapauksessa melatoniinin kykyä olla vuorovaikutuksessa suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin kanssa ja käynnistää tämän vuorovaikutuksen aikaansaamat biologiset ilmiöt, (esimerkiksi solunsisäisen cAMP-konsentraation pieneneminen).

Molempien seulontamenetelmien edullisissa sovellutusmuodoissa nisäkässolu, jonka pinnalla tavallisesti ei esiinny olennaisesti lainkaan suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria (toisin sanoen solu, jossa ei esiinny lainkaan merkittävää melatoniinin välityksellä tapahtuvaa solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemistä) ilmentää

pysyvästi suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria; nisäkässolu on CHO-solu tai COS-7-solu; ja ehdolla oleva antagonisti tai ehdolla oleva agonisti on melatoniinianalogi tai jokin muu kemiallinen aine, mukaan lukien polypeptidi, kuten vasta-aine.

Tämän keksinnön mukaiset reseptoriproteiinit osallistuvat todennäköisesti selkärankaisten vuorokausirytmin säätelyyn. Nämä proteiinit ovat tästä syystä käyttökelpoisia sellaisten terapeuttisten aineiden kehittämiseen, jotka soveltuvat fysiologisten tilojen, kuten aikaerorasituksen, hoitoon, helpottavat joidenkin endogeenisten melatoniinirytmien rytmittämistä uudelleen, synkronoivat häiriytynyttä uni-valverytmiä sokeilla; lievittävät unihäiriöitä vuorotyössä olevilla, edistävät uni-valverytmin ilmaantumista vastasyntyneillä, säätelevät munasarjojen syklistä toimintaa naisilla, säätelevät murrosiän alkamista ja ajoitusta ihmisillä, ja muuttavat lisääntymiskiertoa vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvillä eläimillä, kuten lampailla. Edullisia terapeuttisia aineita ovat 1) agonistit, esimerkiksi melatoniinianalogit tai muut yhdisteet, jotka jäljittelevät melatoniinin vaikutusta sen jälkeen kun ne on saatettu vuorovaikutukseen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin kanssa; ja 2) antagonisteja, esimerkiksi melatoniinianalogeja, vasta-aineita tai muita yhdisteitä, jotka estävät melatoniinin tai suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin toiminnan estämällä melatoniinin ja reseptorin välisen vuorovaikutuksen.

"Transgeeninen eläin" tarkoittaa tässä keksinnössä eläintä (kuten ihmislajiin kuulumatonta nisäkästä), jonka joissakin tai kaikissa tumallisissa soluissa on yksi tai useampi geeni, joka on peräisin eri lajista (ulkopuolinen geeni); jos eläimen ituradan solut kuuluvat ulkopuolista geeniä sisältäviin soluihin, niin geenille voi olla mahdollista siirtyä eläimen jälkeläisiin. Eri eläinlajista peräisin olevat geenit ovat tässä keksinnössä ulkopuolisia

geenejä. Ulkopuoliset geenit sisältävät edullisesti nukleotidisekvenssejä, jotka saavat geenin ilmentymään endogeenisella tavalla kudoksiin jakautuneena.

Koska reseptorikomponenttia voidaan nykyisin valmistaa yhdistelmä-DNA-menetelmillä ja koska ehdokkaaksi asetettuja agonisteja ja antagonisteja voidaan seuloa käyttäen transformoituja viljeltyjä soluja, niin tästä keksinnöstä saadaan käyttöön yksinkertainen ja nopea lähestymistapa käyttökelpoisten terapeuttisten aineiden tunnistamiseksi. Tällaista lähestymistapaa oli aikaisemmin vaikeaa käyttää, koska reseptori paikantui useimpien eläinten keskushermoston muutamiin harvoihin erillisiin alueisiin. Koska suuriaffiniteettinen melatoniinireseptorigeeni on eristetty (cDNA:na), niin tämä tekee mahdolliseksi ilmentää sitä solutyypissä, jonka pinnalla ei tavallisesti esiinny suuriaffiniteettisia melatoniinireseptoreja, mistä saadaan käyttöön järjestelmä melatoniinin ja reseptorin vuorovaikutuksen määrittämiseksi.

Muut tämän keksinnön ominaisuudet ja edut käyvät ilmi seuraavasta sen edullisten sovellutusmuotojen selityksestä ja patenttivaatimuksista.

Yksityiskohtainen selitys

Ensimmäiseksi tarkastellaan lyhyesti piirroksia

Piirrokset

Kuvio 1 on Xenopus laeviksen suuriaffiniteettisen reseptorigeenin koodaavan alueen cDNA:n täydellinen nukleotidi- ja aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 1 ja sekvenssi nro 2, tässä järjestyksessä ilmoitettuna). Nukleotidisekvenssin alapuolella on esitetty reseptorin päätelty aminohapposekvenssi (lukukehys b) ja se sisältää 420 aminohappoa. Päätelty aminohapposekvenssi alkaa nukleotideista 32, 33 ja 34 (ATG = Met) ja päättyy nukleotideihin 1292, 1293, 1294 (TGA = lopetuskodoni).

Kuvio 2 on lampaan sellainen suuriaffiniteettisen melatoniini-1a-reseptorigeenin koodaavan alueen täydelli-

nen nukleotidi- ja aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 3 ja sekvenssi nro 4, tässä järjestyksessä ilmoitettuna), joka on 5'-puoleiselta alueelta peräisin olevan perimän DNA:n ja 3'-puoleiselta alueelta peräisin olevan cDNA:n geneettinen fuusio sellaisena kuin se on kuvattu alla. Reseptorin päätelty aminohapposekvenssi on esitetty nukleotidisekvenssin alla ja se sisältää (lukukehys a) 366 aminohappoa. Päätelty aminohapposekvenssi alkaa nukleotideista 49, 50, 51 (ATG = Met) ja päättyy nukleotideihin 1147, 1148, 1149 (TAA = lopetuskodoni).

Kuvio 3 on hiiren suuriaffiniteettisen melatoniini-1a-reseptorin geenin koodaavan alueen täydellinen nukleotidi- ja aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 13 ja sekvenssi nro 14, tässä järjestyksessä ilmoitettuna). Nukleotidisekvenssin alapuolella on esitetty reseptorin päätelty aminohapposekvenssi (lukukehys a) ja se sisältää 353 aminohappoa. Päätelty aminohapposekvenssi alkaa nukleotideista 1 - 3 (ATG = Met) ja päättyy nukleotideihin 1060 - 1062 (TAA = lopetuskodoni).

Kuvio 4 on ihmisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin geenin koodaavan alueen perimän DNA:n fragmentin nukleotidisekvenssi ja päätelty aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 5 ja sekvenssi nro 6, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna). Koodaava sekvenssi vastaa ensimmäistä intronista myötäsuuntaan (3') olevaa aluetta. Päätelty aminohapposekvenssi, joka on peräisin reseptori-DNA:n sekvensoidusta osasta, on esitetty nukleotidisekvenssin (lukukehys a) alapuolella ja se sisältää 288 aminohappoa. Osittaisen sekvenssin koodaava alue alkaa nukleotideista 1, 2, 3 (GGA = Gly) ja päättyy nukleotideihin 865, 866, 867 (TAA = lopetuskodoni).

Kuvio 5 on suuriaffiniteettisen humaanimelatoniinireseptorin cDNA:n täydellinen nukleotidi- ja aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 11 ja sekvenssi nro 12, tässä järjestyksessä ilmoitettuna). Reseptorin päätelty amino-

happosekvenssi on esitetty nukleotidisekvenssin alapuolella (lukukehys c), joka alkaa nukleotideista 33 - 35 (ATG = Met) ja sisältää 350 aminohappoa ja päättyy nukleotideihin 1083 - 1085 (TAA = lopetuskodoni).

Kuvio 6 on suuriaffiniteettisen humaanimelatoniini--1b-reseptorin cDNA:n täydellinen nukleotidi- ja aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 15 ja sekvenssi nro 16, tässä järjestyksessä ilmoitettuna). Reseptorin päätelty aminohapposekvenssi on esitetty nukleotidisekvenssin alapuolella (lukukehys c), joka alkaa nukleotideista 13 - 15 (ATG = Met), päättyy nukleotideihin 1096 - 1098 (TAA = lopetuskodoni) ja sisältää 362 aminohappoa.

Kuvio 7 esittää Xenopuksen ja lampaan kokonaisen ja ihmisen osittaisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin pääteltyjen aminohapposekvenssien (sekvenssin nro 2, sekvenssin nro 4 ja sekvenssin nro 6, tässä järjestyksessä mainittuna) ja hydrofobisten alueiden (suorakaiteet I - VII) kohdistamisen toistensa suhteen.

Kuvio 8 esittää Xenopuksen, lampaan ja ihmisen kokonaisten suuriaffiniteettisten melatoniinireseptorien pääteltyjen aminohapposekvenssien (sekvenssin nro 2, sekvenssin nro 4 ja sekvenssin nro 12, tässä järjestyksessä mainittuna) ja hydrofobisten alueiden (suorakaiteet I - VII) kohdistamisen toistensa suhteen. (Täytetyt palkit korostavat otaksuttuja transmembraanidomeeneja I - VII). Homologian osoittamiseksi on kolmeen sekvenssiin tehty aukkoja (nämä on esitetty pisteillä).

Kuvio 9 on solumembraanissa olevan Xenopuksen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin ehdotettu rakenne. Kuviossa on kuvattu päätelty aminohapposekvenssi (sekvenssi nro 2). Y, mahdollinen N:n välityksellä tapahtuvan glykosyloitumisen kohta. Täytetyt ympyrät edustavat proteiinikinaasi C:n fosforylaation konsensus-kohtia.

Kuviot 10a ja 10b esittävät ^{125}I-melatoniinin sitoutumismäärityksen tuloksia, jotka on saatu käyttämällä

COS-soluja, jotka sisältävät Xenopuksen melatoniinireseptorin cDNA:ta. Kuvio 11a esittää kylläisyystason saavuttamiskäyrää. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin käyttäen 10 μM melatoniinia. Kuvio 11b esittää kylläisyystason saavuttamista koskevien koetulosten edustavaa Scatchard-kuvaajaa, joka koe oli suoritettu Xenopuksesta peräisin olevan transfektoidun suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorigeenin suhteellisten ^{125}I-melatoniinisitoutumisvakioiden määrittämiseksi.

Kuvio 11 esittää useiden eri ligandien kilpailua ^{125}I-melatoniinin sitoutumisen suhteen COS-7-soluissa, jotka oli transfektoitu Xenopuksesta peräisin olevalla melatoniinireseptori-cDNA:lla. Soluja inkuboitiin käyttäen 100 pM ^{125}I-melatoniinia ja useita eri konsentraatioita 2-jodimelatoniinia (I-Mel), melatoniinia (Mel), 6-kloorimelatoniinia (6Cl-Mel), 6-hydroksimelatoniinia (6OH-MEL), N-asetyyli-5-hydroksitryptamiinia (NAS) tai 5-hydroksitryptamiinia (5-HT). Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin 10 μM melatoniinin läsnä ollessa. K_i-arvot ovat: I-MEL, 1,1 x 10^{-10} M; MEL, 1,3 x 10^{-9} M; 6Cl-MEL, 3,0 x 10^{-9} M; 6OH-MEL, 2,0 x 10^{-8} M; NAS, 2,0 x 10^{-6} M; 5HT, > 1,0 x 10^{-4} M. Koetulokset ovat edustavia koetuloksia kolmesta kokeesta.

Kuvio 12 esittää forskoliinilla stimuloidun cAMP:n akkumuloitumisen inhibointia melatoniinilla CHO-soluissa, jotka on transfektoitu stabiilisti Xenopuksesta peräisin olevalla melatoniinireseptori-cDNA:lla. 100 %:n arvo on 10 μM forskoliinilla aikaansaatu cAMP-arvon keskiarvo. Koetulokset ovat edustavia tuloksia kolmesta kokeesta.

Kuvio 13 on melatoniinireseptorin transkriptiotuotteiden Northern-blotti Xenopuksesta peräisin olevissa melanoforeissa. Kuviossa on esitetty RNA:n kokomarkkerien (Life Technologies, Bethesda, MD) sijainti. Röntgenfilmiä valotettiin blotilla yön yli.

Kuvio 14 esittää ^{125}I-melatoniinin sitoutumismäärityksen tuloksia COS-7-soluista, jotka sisältävät lampaan melatoniinireseptorin cDNA:ta. Kuvio 14a esittää kylläisyystason saavuttamiskäyrää. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin käyttäen 10 μM melatoniinia. Kuvio 14a (sisäkuvio) esittää kylläisyystason saavuttamista koskevien koetulosten Scatchard-kuvaajaa, joka koe oli suoritettu transfektoidun lampaasta peräisin olevan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorigeenin suhteellisten ^{125}I-melatoniinisitoutumisvakioiden määrittämiseksi. Lampaan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin K_d-arvo on 3,6 x 10^{-11} M ja B_{max}-arvo on 104 fmol/mg proteiinia. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia kolmesta kokeesta. Kuvio 14b on kuvaaja, joka esittää useiden eri ligandien kilpailua ^{125}I-melatoniinin sitoutumisen suhteen COS-7-soluissa, jotka oli transfektoitu lampaan melatoniinireseptori-cDNA:lla (sekvenssi nro 3). Soluja inkuboitiin käyttäen 100 pM ^{125}I-melatoniinia ja useita eri konsentraatioita 2-jodimelatoniinia (I-Mel), melatoniinia (Mel), 6-kloorimelatoniinia (6Cl-Mel), 6-hydroksimelatoniinia (6OH-MEL), N-asetyyli-5-hydroksitryptamiinia (NAS) tai 5-hydroksitryptamiinia (5-HT). Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin 10 μM melatoniinin läsnä ollessa. K_i-arvot ovat: I-MEL, 3,7 x 10^{-11} M; MEL, 2,4 x 10^{-10} M; 6Cl-MEL, 2,5 x 10^{-10} M; 6OH-MEL, 3,0 x 10^{-9} M; NAS, 1,4 x 10^{-7} M; 5HT, > 1,0 x 10^{-4} M. Inhibitiokäyrät valmistettiin käyttämällä Ligandia [Munson, P. L. ja Rodbard, D., Anal. Biochem. 107 (1980) 220 - 239] käyttäen yksipaikkaista mallia. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia vähintään kolmesta kokeesta. 2-jodimelatoniinia on saatavilla yhtiöstä Research Biochemicals Inc., Natick, MA; 6-kloorimelatoniinia on saatavilla yhtiöstä Ely Lily, Indianapolis, IN; kaikkia muita tässä keksinnössä käytettyjä lääkeaineita on saatavilla yhtiöstä Sigma, St. Louis, MO.

Kuvio 15 esittää ^{125}I-melatoniinin sitoutumismääritystuloksia COS-7-soluista, jotka sisältävät täydellisen humaanimelatoniini 1a -reseptorin cDNA:ta (sekvenssi nro 11). Kuvio 15a esittää kylläisyystason saavuttamiskäyrää. Kuvio 15a (sisäkuvio) esittää kylläisyystason saavuttamista koskevien koetulosten Scatchard-kuvaajaa, joka koe oli suoritettu transfektoidun ihmisestä peräisin olevaa suuriaffiniteettista melatoniinireseptorigeeniä koskevien suhteellisten ^{125}I-melatoniinin sitoutumisvakioiden määrittämiseksi. Ihmisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin K_d-arvo on 2,6 x 10^{-11} M ja B_{max}-arvo on 220 fmol/mg proteiinia. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin käyttäen 10 μM melatoniinia. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia kolmesta kokeesta. Kuvio 16b on kuvaaja, joka esittää useiden eri ligandien kilpailua ^{125}I-melatoniinin sitoutumisen suhteen COS-7-soluissa, jotka oli transfektoitu ihmisen melatoniinireseptori-cDNA:lla (sekvenssi nro 11). Soluja inkuboitiin käyttäen 100 pM ^{125}I-melatoniinia ja useita eri konsentraatioita 2-jodimelatoniinia (I-Mel), melatoniinia (Mel), 6-kloorimelatoniinia (6Cl-Mel), 6-hydroksimelatoniinia (6OH-MEL), N-asetyyli-5-hydroksitryptamiinia (NAS) tai 5-hydroksitryptamiinia (5-HT). Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin 10 μM melatoniinin läsnä ollessa. K_i-arvot ovat: I-MEL, 1,8 x 10^{-11} M; MEL, 2,3 x 10^{-10} M; 6Cl-MEL, 2,0 x 10^{-9} M; 6OH-MEL, 2,0 x 10^{-9} M; NAS, 1,7 x 10^{-7} M; 5HT, > 1,0 x 10^{-4} M. Inhibitiokäyrät valmistettiin käyttämällä Ligandia [Munson ja Rodbard (1980), edellä] käyttäen yksipaikkaista mallia. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia vähintään kolmesta kokeesta.

Kuvio 16 on esitys sellaisten tutkimusten tuloksista, jotka osoittavat, että nisäkkäiden yhdistelmämelatoniinireseptori kytkeytyy G_i:hin. Kuvio 16a esittää, että melatoniini inhiboi forskoliinin stimuloimaa cAMP:n akkumuloitumista NIH 3T3 -soluihin, jotka on transfektoitu pysyvästi lampaan melatoniinireseptorin cDNA:lla (sekvenssi

nro 3). 100 %:n arvo on 10 μM forskoliinilla aikaansaadun cAMP-pitoisuuden keskiarvo. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia neljästä kokeesta. Kuvio 16b esittää, että hinkuyskätoksiini estää melatoniinin kyvyn inhiboida forskoliinin aikaansaamaa cAMP:n akkumuloitumista NIH 3T3 -soluissa, jotka on transfektoitu pysyvästi lampaan melatoniinireseptorin cDNA:lla (sekvenssi nro 3). Soluja esiinkuboitiin 18 tunnin ajan joko kantaja-aineen tai hinkuyskätoksiinin läsnä ollessa (PTX: 100 ng/ml; hinkuyskätoksiini hankittiin yhtiöstä List, Campbell, CA). C, perustasot; F, pelkkä 10 μM forskoliini; FM, 10 μM forskoliini ynnä 1 μM melatoniini. Koetulokset ovat kunkin käsittelyn keskiarvoja ynnä standardipoikkeama kolmen levyn kyseessä ollessa. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia kolmesta kokeesta.

Kuvio 17 esittää lampaan aivojen pohjan ja aivolisäkkeen kautta kulkevaa poikittaista kudosleikettä. Kuvio 17a on kudosleikkeen histologinen värjäys, joka esittää pars tuberalista (PT) ja pars distalista (PD). Kuvio 17b on kuva autoradiografiafilmistä, joka on valmistettu kudosleikkeestä, jossa PT:ssa havaitaan [^{125}I]MEL:n sitoutumista. Kuvio 17c on kuva autoradiografiafilmistä, joka on valmistettu kudosleikkeen in situ -hybridisaatiosta, jossa on käytetty kloonatusta reseptorin sekvenssistä valmistettua lampaan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin riboprobe-koetinta. Hybridisaatiotulos osoittaa, että mRNA, joka hybridisoituu lampaan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin riboprobe-koettimeen, tuottaa samanlaisen ilmentymistuloksen kuin endogeeninen reseptoriproteiini.

Kuvio 18 on kaavio ihmisen Mel-1b-reseptoriproteiinin rakenteesta. Kuvio 18a on humaani Mel-1b-reseptoriproteiinin ennustettu membraanitopologia. Y, mahdollinen N:n välityksellä tapahtuvan glykosyloitumisen kohta. Varjostetut aminohapot ovat identtisiä humaani-Mel-1b- ja

humaani-Mel-1a-melatoniinireseptorien kesken. Kuvio 18b on humaani Mel-1b- ja humaani 1a-melatoniinireseptorien (GenBank numero U14109) ja Xenopuksen melatoniinireseptorin (U09561) pääteltyjen aminohapposekvenssien vertailu. Homologisuuksien maksimoimiseksi on näihin kolmeen sekvenssiin tehty aukkoja (pisteet). Seitsemän transmembraanialueiksi otaksutun alueen (I - VII) ylle on vedetty viiva. N:n välityksellä tapahtuvan glykosyloitumisen konsensus-kohdat on alleviivattu. Humaanimelatoniini-1b-reseptorin sekvenssi on talletettu talletuslaitokseen GenBank hakunumerolla U25341.

Kuvio 19 on humaani Mel-1b-reseptorin ilmentymistä koskeva kuvaaja COS-1-soluissa määritettynä ^{125}I-Mel:n sitoutumisen perusteella. o kokonaissitoutuminen; ● spesifinen sitoutuminen; ▲ epäspesifinen sitoutuminen (määritetty 10 μM melatoniinin läsnä ollessa). Sisäkuvio: kylläisyystason saavuttamista koskevien tulosten Scatchard-kuvaaja. Kuvattu K_d-arvo on 1,5 x 10^{-10} M. B_{max}-arvo on 2,62 pmol/mg membraaniproteiinia. Esitetyt koetulokset ovat edustavia tuloksia viidestä kokeesta.

Kuvio 20 on graafinen esitys, joka esittää, kuinka useat eri ligandit kilpailevat ^{125}I-Mel:n kanssa sitoutumisesta COS-1-soluihin, jotka on transfektoitu joko humaani Mel-1b- tai humaani-Mel-1a-melatoniinireseptorin cDNA:lla. Soluja inkuboitiin käyttäen 200 pM (Mel-1b-reseptori) tai 100 pM ^{125}I-Mel:aa (Mel-1a-reseptori) ja useita eri konsentraatioita 2-jodimelatoniinia (I-Mel), melatoniinia (Mel), 6-kloorimelatoniinia (6Cl-Mel) tai N-asetyyli-5-hydroksitryptamiinia (NAS). Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin 10 μM melatoniinin läsnä ollessa. Esitetyt koetulokset ovat keskiarvoja kolmesta viiteen kokeesta kunkin lääkeaineen kyseessä ollessa. K_i-arvot on lueteltu taulukossa 1.

Kuvio 21 on graafinen esitys, joka esittää, että melatoniini inhiboi forskoliinilla stimuloitua cAMP:n ak-

kumuloitumista NIH 3T3 -soluissa, jotka on transfektoitu pysyvästi humaani-Mel-1b-reseptorilla. 100 %:n arvo on 10 μM forskoliinilla saatavan cAMP-arvon keskiarvo. Esitetyt koetulokset ovat keskiarvoja kahdesta kokeesta.

Kuvio 22 on kuudessa ihmisen kudoksessa tapahtuvan Mel-1b- ja Mel-1a-reseptorigeenin ilmentymisen vertaileva RT-PCR-analyysi. Aivot tarkoittavat kokonaisten aivojen analyysiä. H3.3 on histoni 3.3.

Kuvio 23 on kaavio, joka esittää Mel-1b-reseptorigeenin paikkaa kromosomissa. Humaanikromosomin 11 idiogrammi kuvaa sellaisten somaattisten soluhybridien kromosomisisältöä, joita käytettiin Mel-1b melatoniinireseptorigeenin (MTNR1 B) paikantamiseen segmenttiin 11q21-22.

Seuraavaksi kuvataan tässä keksinnössä käyttökelpoisten Xenopus laeviksesta peräisin olevan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin cDNA:n, lampaasta, hiirestä ja ihmisestä peräisin olevan suuriaffiniteettisen melatoniini-1a-reseptorin, sekä ihmisestä peräisin olevan suuriaffiniteettisen melatoniini-1b-reseptorin kloonausta ja luonnehtimista. Siinä on myös kuvattu transformoituja soluja, jotka sisältävät ja jotka ilmentävät tämän keksinnön mukaista cDNA:ta. Tämä esimerkki esitetään tämän keksinnön kuvaamiseksi eikä sen ole katsottava sitä rajoittavan.

Xenopus laeviksesta peräisin olevan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin molekulaarinen kloonaus

Melatoniinireseptoreita esiintyy sammakkoeläinten ihon melanoforeissa [Bagnara, J. T. ja Hadley, M. E., Am. Zoologist 10 (1970) 201 - 216]. Melatoniinin vaikutus, joka tapahtuu suuriaffiniteettisen G_i-proteiiniin kytketyn melatoniinireseptorin välityksellä [Abe, K., et al., Endocrinology 15 (1969) 674 - 682; White, B. H., et al., J. Comp. Physiol. B 157 (1987) 153 - 159], johtaa siihen, että melaniinia aggregoituu ihon melanoforeihin. Xenopuk-

sen ihon melanoforeista peräisin olevaa mRNA:ta käytettiin Xenopuksen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin cDNA:n kloonaukseen [Ebisawa, T., et al., PNAS USA 91 (1994) 6133 - 6137]. mRNA:n eristämistarkoituksiin voidaan käyttää joko primaarisia soluja tai jatkoviljeltäviä soluja. Xenopuksen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin cDNA:n kloonaus suoritettiin korkeampien eukaryoottien suuriaffiniteettisten melatoniinireseptorien kloonaukseen tähtäävänä käyttökelpoisena alkuvaiheena.

mRNA:n eristämiseen käytetyn jatkoviljeltävän solulinjan havaittiin ilmentävän voimakkaasti ^{125}I-melatoniinin sitoutumista (≥ 100 fmol/mg solun kokonaisproteiinia käyttäen 50 pM ^{125}I-melatoniinia). Soluja viljeltiin Daniolos, et al:n [Pigment Cell Res. 3 (1990) 38 - 43] menetelmällä. Solujen kokonais-RNA eristettiin vakiomenetelmin melanoforeista uuttamalla guanidiumtiosyanaatilla, minkä jälkeen tämä erotettiin sentrifugissa keesiumkloriditiheysgradientissa [Sambrook, et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour Lab. Press, Plainview, NY), (1989) 2nd Ed.]. Melanosomit poistettiin ennen erottamista keesiumkloridigradientissa Karne, et al:n [J. Biol. Chem. 268 (1993) 19126 - 19133] kuvaamalla tavalla. Poly(A)$^+$-RNA eristettiin käyttäen hyväksyttyjä menetelmiä julkaisussa Rivkees, et al. [P.N.A.S. USA 84 (1989) 3916 - 3920] kuvatulla tavalla.

Xenopuksen ihon melanoforeista peräisin olevaa poly(A)$^+$-RNA:ta käytettiin mallijuosteena satunnaisalukkeiden avulla valmistetun cDNA-kirjaston valmistamiseksi (cDNA Synthesis Kit, Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). Kaksijuosteiseen cDNA:han valmistettiin kohesiiviset päät ligatoimalla näihin BstX1- ja EcoR1-sovitteet (adapter) (InVitrogen, San Diego, CA). cDNA fraktioitiin koon mukaan agaroosigeelissä ja cDNA, jonka pituus oli yhtä suuri tai suurempi kuin 2 kiloemäsparia (ke), otettiin talteen elektroeluution avulla. Koon mukaan valittu

cDNA ligatoitiin pcDNAI-ilmentämisvektoriin (InVitrogen, San Diego, CA) ja liitettiin E. coli -kantaan MC1061/P3 elektroporaation avulla.

5 μg:sta poly(A)$^+$-RNA:ta saatiin yhteensä 4 x 10^5 rekombinanttia ja ne jaettiin 54 yhdistelmään, joista kukin sisälsi noin 7 400 kloonia. Plasmidi-DNA valmistettiin kustakin yhdistelmästä alkalisella hajotusmenetelmällä ja tämä transfektoitiin COS-7-soluihin DEAE-dekstraanimenetelmällä [Cullen, B.R., Methods Enzymol 152 (1987) 684 - 704]. COS-7-soluja kasvatettiin yhden solun paksuisina kerroksina 5-%:isessa CO_2:ssa 37 °C:ssa Dulbeccon modifioimassa Eaglen mediumissa, jota oli täydennetty 10 %:lla fetaalista vasikanseerumia, penisilliinillä (50 U/ml) ja streptomysiinillä (50 μg/ml). Soluja inkuboitiin 3 päivää transfektion jälkeen 2 tunnin ajan huoneenlämmössä 90 pM ^{125}I-melatoniinin kanssa Tris-HCl:ssä, jonka pH oli 7,4 ja joka sisälsi 100 mM NaCl:ää, 5 mM KCl:ää, 2 mM $CaCl_2$:ta ja 5 % Nu-Serum I:tä. Solut pestiin, kuivattiin ilmassa, ja niiden annettiin valottaa röntgenfilmiä 14 päivän ajan. Se klooniyhdistelmä, jossa esiintyi positiivisia signaaleja, jaettiin osiin ja transfektiomenettely toistettiin. Tätä osiinjakomenettelyä jatkettiin siihen asti, kunnes tunnistettiin yksi klooni, joka antoi COS-7-soluille kyvyn sitoa spesifisesti ^{125}I-melatoniinia.

Tämä klooni, joka sisälsi 2,2 ke:n suuruisen cDNA-insertiosekvenssin, eristettiin, ja molemmat koodaavan alueen juosteet sekvensoitiin (sekvenssi nro 1). Nukleotidisekvenssit analysoitiin käyttämällä Sanger, F., et al:n [P.N.A.S. USA 74 (1977) 5463 - 5467] mukaista dideoksinukleotideillä suoritettavaa ketjun kasvun päättämismenetelmää käyttämällä Sequenasea® (United States Biochemical, Cleveland, OH). Sekvensoinnissa oli mallijuosteena kaksijuosteinen plasmidi-DNA. Sekvensointialukkeet olivat synteettisiä oligonukleotideja, jotka oli-

vat joko vektorispesifisiä tai ne oli saatu sekvenssistä käytettävissä olevan informaation perusteella.

Eristetty Xenopuksen cDNA koodaa 420 aminohapon suuruista proteiinia (kuvio 1) (sekvenssi nro 2), jonka arvioitu suhteellinen moolimassa on 47 424. Tässä lukukehyksessä esiintyvien kahden metioniinikodonin vieressä oleva DNA-sekvenssi sisälsi molemmissa tapauksissa Kozakin konsensussekvenssin translaation aloittamiseksi [Kozak, M., Nucleic Acids Res. 15 (1987) 8125 - 8148]. Ennustetun aminohapposekvenssin hydropaattisuusanalyysistä [Kyte, J. ja Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157 (1982) 195 - 232] kävi ilmi, että tässä esiintyi 7 hydrofobista domeenia (ks. kuviot 4 ja 5), jotka todennäköisesti edustavat G-proteiiniin kytketyn reseptorin transmembraanialueita. Aminoterminaalinen pää sisältää N:n välityksellä tapahtuvaa glykosyloitumista vastaavan konsensus-kohdan, mikä ominaisuus on tyypillistä useimmille G-proteiiniin kytketyille reseptoreille [Pearson, W. R., Methods Enzymol. 183 (1990) 63 - 98]. Melatoniinireseptoriproteiini ei muistuta mitään tiettyä nimenomaista G-proteiiniin kytkettyjen reseptorien ryhmää, mutta se muistuttaa suurta määrää reseptoreita; suurin aminohappoidentiteettiarvo oli noin 25 % sekä mu-opioidireseptorin että tyypin 2 somatostatiinireseptorin kyseessä ollessa. Käyttäen G-proteiiniin kytkeytyvien reseptorien tietokantaa [Kornfeld, R. ja Kornfeld, D., Ann. Rev. Biochem. 54 (1985) 631 - 664] vaikuttaa melatoniinireseptori muodostavan ryhmän, joka poikkeaa muista tunnetuista biogeenisten amiinien ja peptidien reseptoreista. Mitään sekvenssihomologiaa ei tunnistettu melatoniinireseptorin ja metabotrooppisten glutamaatti- tai paratyroidihormoni/kalsitoniini/sekretiinireseptorigeeniperheiden kesken [Masu, et al., Nature 349 (1991) 760 - 765; Juppner, et al., Science 254 (1991) 1024 - 1026; Lin, et al., Science 254 (1991) 1022 - 1024].

Melatoniinireseptorilla on amiini- ja peptidireseptorien kanssa joitakin yhteisiä yleisiä rakenteellisia ominaisuuksia. Se sisältää esimerkiksi kummassakin ensimmäisessä kahdessa solunulkoisessa silmukassa yhden kysteiiniryhmän, jonka opsiini- ja amiinireseptorien mutageneesitutkimusten perusteella [Dixon, et al., EMBO J. 6 (1987) 3269 - 3275; Karnic, et al., P.N.A.S. USA 85 (1988) 8459 - 8463] arvellaan muodostavan reseptorin rakennetta stabiloivan disulfidisillan. Transmembraanidomeeneissa IV, V ja VI (kuvio 7 ja kuvio 8) esiintyy lisäksi proliiniryhmiä, joiden on ehdotettu muodostavan alfa-kierteisiin polvekkeita, jotka voivat olla tärkeitä ligandia sitovan syvennyksen muodostamisessa [Findlay, J. ja Eliopoulos, E., Trends Pharmacol. Sci. 11 (1990) 492 - 499; Hibert, M. F., et al., Mol. Pharmacol. 40 (1991) 8 - 15]. Lähes kaikissa muissa G-proteiiniin kytkeytyneissä reseptoreissa esiintyvässä transmembraanidomeenissa 7 olevassa NPXXY (sekvenssi nro 7) -motiivissa esiintyvän proliinin tilalla on melatoniinireseptorissa alaniini. Melatoniinireseptorin karboksyylipään puoleinen jatke on 119 aminohapporyhmää pitkä ja se sisältää useita proteiinikinaasi C:n fosforylaation konsensus-kohtia, jotka voivat liittyä reseptorin säätelyyn [Sibley, et al., Cell 48 (1987) 913 - 922].

Xenopuksen suuriaffiniteettisen yhdistelmä-melatoniinireseptorin ligandien sitomista koskevat tutkimukset

cDNA:n koodaaman Xenopuksen reseptorin (sekvenssi nro 2) ligandin sitomista koskevien ominaisuuksien selvittämiseksi ilmennettiin pcDNAI:n sisältämää cDNA:ta väliaikaisesti COS-7-soluissa. Medium poistettiin 3 päivää transfektion jälkeen, elatusmaljat pestiin PBS:lla ja solut koottiin talteen. Tämän jälkeen solut sentrifugoitiin napeiksi (2 500 kierrosta minuutissa; 10 minuuttia, 4 °C) ja ne varastoitiin -80 °C:ssa. Ligandin sitomista koskevia tutkimuksia kokonaisilla soluilla suoritettiin sulattamal-

la solut ja suspendoimalla ne uudelleen sitoutumispuskuriin (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, joka sisälsi 5 mM $MgCl_2$:ta) konsentraatioon 456 μg proteiinia millilitrassa. Solususpensiota inkuboitiin ^{125}I-melatoniinin (90 pM) kanssa 0,2 ml:n kokonaisreaktiotilavuudessa sitoutumispuskurissa melatoniiniagonistin tai -antagonistin kanssa tai ilman näitä; suspensiota inkuboitiin ravistelevalla hauteella 1,5 tuntia 25 °C:ssa. Proteiinimääritykset suoritettiin käyttäen Pierce BCA Protein Assay -määritystä (The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Sitoutumiskoetulokset analysoitiin tietokoneella käyttäen Munsonin ja Rodbardin [(1980), edellä] Ligand-ohjelmaa. Tulokset on esitetty kuvioissa 8 ja 9.

cDNA:n koodaaman Xenopuksen reseptorin (sekvenssi nro 2) ligandinsitomisominaisuuksien tarkempaa selvittämistä varten ilmennettiin pcDNAI:ssa esiintyvää cDNA:ta väliaikaisesti COS-7-soluissa. Kolme päivää transfektion jälkeen suoritettiin kylläisyystason saavuttamistutkimukset käyttäen nousevia konsentraatioita ^{125}I-melatoniinia (5 - 1 280 pM) (kuvio 10a). Scatchard-analyysistä (kuvio 10b) kävi ilmi, että transfektoidut COS-7-solut sitoivat ^{125}I-melatoniinia suurella affiniteetillä (K_d = 63 ± 3 x 10^{-12}; n = 3 koetta). B_{max}-arvo, joka oli saatu käyttäen kokonaisilla soluilla suoritettua sitoutumismääritystä, oli 67 ± 7 fmol/mg proteiinia. Valetransfektoiduissa COS-7-soluissa ei havaittu ^{125}I-melatoniinin spesifistä sitoutumista.

Seuraavaksi tutkittiin ^{125}I-melatoniinin spesifisen sitoutumisen farmakologisia ominaisuuksia akuutisti transfektoiduissa COS-7-soluissa (kuvio 11). Se järjestys, jolla kuusi ligandia inhiboi ^{125}I-melatoniinin spesifistä sitoutumista Xenopuksen yhdistelmä-melatoniinireseptoriin, oli suuriaffiniteettiselle melatoniinireseptorille tyypillistä [Dubocovich, M.L. ja Takahasi, J. (1987) edellä; Rivkees, et al. (1989) edellä], ja suhteellisten sitoutu-

misaffiniteettien järjestys oli: 2-jodimelatoniini > melatoniini > 6-kloorimelatoniini > 6-hydroksimelatoniini > N-asetyyli-5-hydroksitryptamiini > 5-hydroksitryptamiini. Siten tämän keksinnön mukainen Xenopus laeviksen eristetty cDNA koodaa proteiinia, jonka affiniteetti ja farmakologiset ominaisuudet ovat sellaiset, kuin mitä suuriaffiniteettisen melatoonireseptorin ominaisuuksien odotetaan olevan.

Xenopuksen ihon melanoforeissa esiintyvä endogeeninen suuriaffiniteettinen melatoniinireseptori kytkeytyy adenylyylisyklaasin inhibitioon [Abe, K., et al. (1969) edellä; White, B. H., et al. (1987) edellä]. Sen määrittämiseksi, oliko Xenopuksen yhdistelmä-cDNA:n (sekvenssi nro 1) koodaama reseptori kytkeytynyt adenylyylisyklaasia säätelevään järjestelmään, transfektoitiin CHO:n klonaalinen solulinja (ATCC; luettelon nro CCL61-solut) pysyvästi yhdistelmä-reseptori-cDNA:lla ja määritettiin forskoliinin stimuloiman cAMP:n akkumuloitumisen inhiboituminen melatoniinilla.

Transformoituja CHO-soluja maljattiin 35 mm:n läpimittaisille elatusmaljoille. Solut pestiin 48 tunnin kuluttua kaksi kertaa Hamin F-12:lla (Life Technologies, Bethesda, MD). Tämän jälkeen soluja inkuboitiin melatoniinianalogien läsnä ollessa tai ilman näitä (nämä oli laimennettu F-12:een) 10 minuutin ajan 37 °C:ssa. Elatusaine poistettiin käsittelyn jälkeen imulla ja elatusmaljoille lisättiin 1 ml 50 mM etikkahappoa. Solut koottiin talteen, ne siirrettiin Eppendorf-putkeen, niitä kiehutettiin 5 minuutin ajan ja sentrifugoitiin (13 750 kierrosta minuutissa 15 minuutin ajan). Supernatantti koottiin talteen ja siitä määritettiin cAMP. Kaikki määritykset suoritettiin kolmena rinnakkaisena määrityksenä. Syklisen AMP:n pitoisuudet määritettiin kahtena rinnakkaisena kokeena radioimmunomäärityksellä (New England Nuclear, Boston, MA).

Melatoniini inhiboi annoksesta riippuvaisella tavalla sitä cAMP:n konsentraation nousun käynnistymistä, jonka 10 μM forskoliini saa aikaan (kuvio 12); forskoliinin stimuloiman cAMP:n konsentraation keskiarvon maksimaalinen inhibitio oli 68 % melatoniinikonsentraatiossa 1 x 10^{-8} M. IC_{50}-arvo, jonka suuruudeksi saatiin noin 8 x 10^{-10} M, määritettiin sovittamalla käyrä käsivaraisesti kuviossa 12 esitettyihin koetuloksiin. Tämä arvo oli hyvin samanlainen kuin kuviossa 11 esitetty tietokoneen tuottama K_i-arvo (1,3 x 10^{-9} M), joka oli määritetty ^{125}I-melatoniinin spesifisen sitoutumisen inhiboitumiselle melatoniinilla. Havaittiin, että melatoniini ei yksinään (1 x 10^{-6} M) muuttanut cAMP:n perustasoja pysyvästi transfektoiduissa CHO-soluissa. Lisäksi melatoniini (1 x 10^{-6} M) ei inhiboinut forskoliinin stimuloimaa cAMP-pitoisuuksien nousua CHO-soluissa, jotka oli transfektoitu pysyvästi vektorilla, josta Xenopuksen cDNA puuttui. Yhdistelmä-melatoniinireseptori on siten kytketty negatiivisesti cAMP:n säätelyjärjestelmään.

Xenopuksen melatoniinireseptorin transkriptiotuotteiden ilmentäminen

Xenopuksen ihon melanoforien Northern-blottianalyysistä (tätä on käsitelty tuonnempana) kävi ilmi, että erittäin rajoittavissa olosuhteissa (tätä on käsitelty tuonnempana) esiintyi ainakin kolme hybridisoituvaa transkriptiotuotetta, joiden koko oli 2,4 - 4,4 ke (kuvio 13). Useiden hybridisoituvien vyöhykkeiden esiintyminen voi edustaa yhden saman geenin transkription jälkeisiä modifikaatioita tai sitä, että soluissa esiintyy transkriptiotuotteita erilaisista mutta rakenteellisesti toisiaan muistuttavista samanlaisista geeneistä.

Northern-analyysi suoritettiin käyttäen vakiomenetelmiä [näitä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, (1989)]. Poly(A)$^+$-RNA:lle

suoritettiin elektroforeesi 1-%:isessa agaroosi-formaldehydigeelissä, se blotattiin Genescreenille (New England Nuclear, Boston, MA) ja hybridisoitiin [α-^{32}P]dCTP-leimalla (2 000 Ci/mmol) varustetun reseptorin cDNA:n koodaavan alueen fragmenttiin satunnaisalukemenetelmällä (Promega, Madison, WI). Hybridisointiolosuhteet olivat 50 % formamidi, 1 M natriumkloridi, 1 % SDS, 10 % dekstraanisulfaatti ja 100 μg/ml denaturoitua lohen maidin DNA:ta suoritettuna 42 °C:ssa yön yli. Blotti pestiin viimeiseksi 65 °C:ssa 40 minuutin ajan seoksessa, joka sisälsi 0,2 x SSC:n ja 0,1 % SDS:n seosta. Blottien annettiin valottaa röntgenfilmiä -80 °C:ssa vahvistusverkkoa käyttäen.

Lampaan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin eristäminen

Lampaasta peräisin olevan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin kloonaamiseksi suunniteltiin täysin degeneratiivisia alukkeita, jotka perustuivat esimerkiksi Xenopuksen sekvenssin (sekvenssi nro 1) (kuvio 1) peptidisekvensseihin 5' AIAINRY (sekvenssi nro 8) (ryhmät 125 - 131) ja 3' FAVCWAPL (sekvenssi nro 9) (ryhmät 252 - 259). Näitä degeneratiivisten alukkeiden populaatioita käyttäen monistui lampaan pars tuberaliksen mRNA:lle suoritetussa RT PCR:ssä noin 400 ep:n suuruinen cDNA-fragmentti, joka oli 65-%:isesti identtinen aminohappotasolla Xenopuksen melatoniinireseptorin vastaavan alueen suhteen.

Pidemmän cDNA-sekvenssin eristämiseksi tämä fragmentti varustettiin leimalla (esimerkiksi [^{32}P]dCTP:lla satunnaisalukkeiden avulla), mistä saatiin koetin, ja hybridisaatio (erittäin rajoittavissa olosuhteissa) suoritettiin käyttäen ZAP II -vektoriin (Stratagene, La Jolla, CA) konstruoitua lampaan pars tuberaliksen cDNA-kirjastoa tavallisten hybridisaaatiomenetelmien (näitä on käsitelty esimerkiksi teoksessa Ausubel et al., Molecular Biology, edellä) avulla. Seulotuista 1 x 10^6 rekombinantista eristettiin kaksi hybridisoituvaa kloonia ja ne puhdistettiin

vakiomenetelmin yksittäisten plakkien eristämisvaiheen kautta. Molemmat kloonit sisälsivät koko 3'-puoleisen koodaavan alueen ennustetun kolmannen transmembraanidomeenin kohdan suhteen myötäsuuntaan. Yksi klooni ulottui 5'-puolelle aminoterminaaliselle alueelle ensimmäisen transmembraanidomeenin suhteen vastasuuntaan mutta se ei sisältänyt koodaavan alueen koko 5'-puoleista päätä. Tämän cDNA-kloonin 5'-pään 160 ep:n suuruinen fragmentti varustettiin leimalla (esimerkiksi radioaktiivisella leimalla) vakiomenetelmin (näitä on käsitelty esimerkiksi teoksessa Ausubel, et al., edellä) ja sitä käytettiin koettimena (esimerkiksi edellä kuvattuja vakiomenetelmiä käyttäen) lampaan perimän kirjaston analysointiin (tämä oli valmistettu EMBL-3:een, tuoteluettelon numero UL 1001d, Clontech, Palo Alto, CA). Eristettiin yksi klooni ja sen havaittiin normaaleja sekvensointimenetelmiä käyttäen sisältävän koodaavan alueen jäljellä olevan 5'-puoleisen sekvenssin. Tämän perimän kloonin 50 ep:n suuruinen fragmentti, joka sisälsi metioniinin sekä translaation aloituksen konsensus-sekvenssin, eristettiin, ja se ligatoitiin vakiomenetelmiä käyttäen [näitä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Sambrook (1989), edellä] vektoriin (esimerkiksi pcDNAI, InVitrogen, San Diego, CA) samassa lukukehyksessä vastaavan cDNA:n myötäsuuntaan koodaavan alueen suhteen. Ligatoitu konstruktio koodaa 366 aminohapon mittaista proteiinia (sekvenssi nro 4), joka sitoo [^{125}I]Mel:ää suurella affiniteetilla.

Lampaan suuriaffiniteettiselle yhdistelmä-melatoniinireseptorille suoritetut ligandinsitomistutkimukset

COS-7-soluissa ilmennettiin väliaikaisesti pcDNAI:hin kloonattua lampaan suuriaffiniteettisen melatoniini-1a-reseptorin (sekvenssi nro 3) DNA:ta. COS-7-soluihin liitettiin ligandinsitomistutkimuksia varten pcDNAI:hin valmistettu lampaan reseptorin cDNA (sekvenssi

nro 3) käyttäen DEAE-dekstraanimenetelmää [Cullen, B. R., Methods Enzymol. 152 (1987) 684 - 704]. Solujen elatusmedium poistettiin noin 2 - 3 päivää transfektion jälkeen, elatusmaljat pestiin PBS:lla ja solut koottiin talteen. Tämän jälkeen solut sentrifugoitiin napeiksi (2 500 kierrosta minuutissa; 10 minuuttia, 4 °C) ja ne varastoitiin -80 °C:ssa. Ligandin sitomista koskevia tutkimuksia kokonaisilla soluilla suoritettiin sulattamalla solut ja suspendoimalla ne uudelleen sitoutumispuskuriin (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, joka sisälsi 5 mM $MgCl_2$:ta) konsentraatioon 200 - 500 µg proteiinia millilitrassa. Solususpensiota inkuboitiin ^{125}I-melatoniinin kanssa 0,2 ml:n kokonaisreaktiotilavuudessa sitoutumispuskurissa, joka sisälsi lääkeaineita tai josta nämä oli jätetty pois; suspensiota inkuboitiin ravistelevalla hauteella 1,5 h 25 °C:ssa. Kaikki määritykset tehtiin kahtena tai kolmena rinnakkaismäärityksenä. Proteiinimääritykset suoritettiin käyttäen Pierce BCA Protein Assay -määritystä. Sitoutumiskoetulokset analysoitiin tietokoneella käyttäen Munsonin ja Rodbardin (1980) Ligand-ohjelmaa.

Scatchard-analyysistä (tämä oli suoritettu samalla tavoin kuin mitä oli kuvattu edellä Xenopuksen kloonin kyseessä ollessa) kävi ilmi, että lampaan Mel-1a-reseptorikloonilla transfektoidut COS-7-solut sitoivat ^{125}I-melatoniinia suurella affiniteetilla (K_d = 3,6 ± 0,1 x 10^{-11}; keskiarvo ± SE, n = 3 koetta). Lampaan reseptorikloonin B_{max}-arvo, joka oli saatu käyttäen kokonaisilla soluilla suoritettua sitoutumismääritystä, oli yli 112 ± 5 fmol/mg proteiinia (kuvio 14a). Valetransfektoiduissa COS-7-soluissa ei havaittu ^{125}I-melatoniinin spesifistä sitoutumista.

Lampaan Mel-1a-reseptorin melatoniinijohdannaisten suhteellisen sitoutumisaffiniteettien farmakologisen profiilin osoitettiin olevan samanlainen kuin Xenopuksella käyttäen samoja määritysmenetelmiä kuin mitä oli kuvattu

Xenopuksen kyseessä ollessa. Kuuden ligandin kompetitiivinen sitoutuminen lampaan melatoniinireseptoriin, jota oli ilmennetty akuutisti transfektoiduissa COS-7-soluissa, osoitti, että inhiboitaessa ^{125}I-Mel:n spesifistä sitoutumista kuudella ligandilla näiden suuruusluokan mukainen järjestys oli 2-jodimelatoniini > melatoniini = 6-kloorimelatoniini > 6-hydroksimelatoniini > N-asetyyli-5-hydroksitryptamiini > 5-hydroksitryptamiini (kuvio 14b).

Lampaan yhdistelmä-melatoniini-1a-reseptorin koodaamaa reseptoria tutkittiin sen määrittämiseksi, oliko se kytkeytynyt inhibitoriseen G-proteiiniin (G_i), jollaisen on osoitettu esiintyvän useiden nisäkkäiden endogeenisen reseptorin yhteydessä, mukaan lukien lammas [Carlson, et al., (1989) edellä; Morgan, et al., (1990) edellä]. Tähän käytettiin klonaalisia NIH 3T3 -soluja, jotka oli transfektoitu pysyvästi lampaan reseptorin cDNA:lla (sekvenssi nro 3) ja jotka oli jatkokloonattu pcDNAI NEO:hon (In-Vitrogen, San Diego, CA) ja joissa ligandin sitoutuminen melatoniinireseptoriin oli kiivasta (> 10 fmol yhden 60 mm:n maljan sisältämiä soluja kohti käyttäen 100 pM ^{125}I-Meliä). Transformoidut NIH 3T3 -solut maljattiin 35 mm:n maljoille. Solut pestiin 48 tunnin kuluttua kaksi kertaa DMEM:lla ja niitä inkuboitiin sitten lääkeaineiden kanssa tai ilman näitä (nämä oli laimennettu DMEM:ään) 10 minuutin ajan 37 °C:ssa. Medium poistettiin käsittelyn lopussa imulla ja maljoihin lisättiin 1 ml 50 mM etikkahappoa. Solut koottiin talteen, ne siirrettiin Eppendorf-putkeen, niitä kiehutettiin 5 minuutin ajan ja sentrifugoitiin (13 750 kierrosta minuutissa 15 minuutin ajan). Kaikki määritykset suoritettiin kolmena rinnakkaisena määrityksenä. Syklisen AMP:n pitoisuudet määritettiin kahtena rinnakkaisena kokeena radioimmunomäärityksellä vakiomenetelmin.

Vaikka melatoniini ei muuttanut cAMP:n perustasoja pysyvästi transfektoituneissa solulinjoissa, niin se sai

aikaan annoksesta riippuvaisella tavalla 10 μM forskoliinilla aikaansaadun cAMP:n konsentraation nousun inhiboitumisen (kuvio 16a). Arvioitu IC_{50}-arvo melatoniinille oli 1 x 10^{-10} M, joka oli verrattavissa arvoon 2,4 x 10^{-10} M, joka oli määritetty ^{125}I-melatoniinin spesifisen sitoutumisen melatoniini-inhibitiolle, ks. kuvio 14b). On tärkeää panna merkille, että melatoniini (1 μM) ei muuttanut forskoliinin stimuloimaa cAMP:n akkumuloitumista pysyvästi sellaisella vektorilla (pcDNAI NEO) transfektoituneissa NIH 3T3 -soluissa, joka ei sisältänyt Mel-1a-reseptorin cDNA:ta.

Reseptori-transfektoitujen NIH 3T3 -solujen esikäsittely hinkuyskätoksiinilla (PTX; 100 ng/ml) 18 tunnin ajan esti täydellisesti 1 μM melatoniinin kyvyn inhiboida forskoliinin stimuloimaa cAMP:n pitoisuuden nousua (kuvio 16b). Selkärankaisten endogeenisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin tavoin [Carlson, et al., (1989) edellä; Morgan, et al., (1990) edellä; White et al., (1987) edellä] lampaan yhdistelmä-Mel-1a-reseptori inhiboi siten adenylyylisyklaasia hinkuyskätoksiinille herkän mekanismin välityksellä.

Lampaan PT:n Northern-blottianalyysissä havaittiin yli 9,5 ke:n suuruinen hybridisoituva päätranskriptiotuote ja 4,2 ke:n suuruinen sivutranskriptiotuote. Pars distaliksessa ei havaittu hybridisoituvia signaaleja (koetuloksia ei ole esitetty). Endogeenisen mRNA:n in situ -olosuhteissa suoritetussa hybridisaatiossa havaittiin lampaan melatoniini 1a -reseptorin cDNA:n avulla valmistettuja antisense-cRNA-koettimia käyttäen voimakas hybridisaatiosignaali, joka oli näkyvissä lampaan PT:n autoradiografiafilmissä (kuvio 17); pars distaliksessa ei havaittu mitään signaalia. mRNA:n jakautuminen PT:ssa oli identtinen sen suhteen kuin mitä oli havaittu reseptoriproteiinin kyseessä ollessa käyttämällä ^{125}I-Mel-autoradiografiaa in vitro -olosuhteissa. Melatoniinireseptorin mRNA:ta ei tutkittu

lampaan SCN-alueesta, koska suuriaffiniteettisia melatoniinireseptoreja ei ole tunnistettu lampaan SCN:ssa käyttäen ^{125}I-Mel:ää autoradiografisissa tutkimuksissa in vitro -olosuhteissa [Bittman, E.L. ja Weaver, D.R., Biol. Reprod. 43 (1990) 986 - 993].

Siperianhamsterin ja rotan aivokudosta tutkittiin sen kuvaamiseksi, millainen melatoniinireseptorin jakautuminen on muiden sellaisten lajien aivoissa, joissa melatoniinilla tiedetään olevan vaikutuksia lisääntymisrytmeihin ja vuorokausirytmeihin [Hartness, T. J., et al., J. Pineal Res. 15 (1993) 161 - 190; Margraf, R. R. ja Lynch, G. R., Am. J. Physiol. 264 (1993) R615 - R621; ja Cassone, V. M., Trends Neurosci. 13 (1990) 457 - 464]. Siperianhamsterin aivoissa tärkeimmät spesifisen ^{125}I-Mel:n sitoutumisen ja reseptorin transkriptiotuotteiden hybridisoitumiskohdat ovat PT, SCN ja talamuksen paraventrikulaarinen tumake tarkasteltuna vierekkäisissä kudosleikkeissä autoradiografian avulla in vitro -olosuhteissa [koetuloksia ei ole esitetty; tätä kysymystä on myös käsitelty julkaisussa Weaver, D. R., et al., J. Neurosci. 9 (1989) 2582 - 2588]. Tässä lajissa melatoniini 1a -reseptorin mRNA:n ja -proteiinin jakaantuminen ovat siten identtisiä ja rajoittuneet vain muutamiin kohtiin aivoissa. Aikuisissa ja kehittyvissä rotissa PT- ja SCN-alueilla esiintyy reseptorin transkriptiotuotteen hybridisoitumista ja ^{125}I-Mel:n sitoutumista (koetuloksia ei ole esitetty). Melatoniini 1a -reseptorin mRNA:n jakautuminen osui yhteen ^{125}I-Mel:n sitoutumisen suhteen sekä rotan että hamsterin SCN:n kokonaan kattavalla alueella.

Kaikissa tutkimissamme nisäkkäissä, jotka eivät kuulu ihmislajiin ja joita ovat lammas (kuvio 15), siperianhamsteri, syyrianhamsteri ja rotta, on in situ -olosuhteissa suoritetuilla hybridisaatiotutkimuksilla havaittu PT:ssa vaikeuksitta suuriaffiniteettista melatoniini 1a -reseptoria vastaavaa mRNA:ta. PT vaikuttaa nykyisin ole-

van tärkeä kohde, jonka välityksellä melatoniini saa aikaan lisääntymistoimintoihin vaikuttavat valoperiodiset vaikutukset. PT on ainoa kohde, joka sisältää melatoniini 1a -reseptoreita (sellaisena kuin nämä on havaittu käyttäen ^{125}I-Mel:a autoradiografiassa in vitro -olosuhteissa kaikissa vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvissä nisäkkäissä, joita on tutkittu tähän päivämäärään mennessä [Weaver, et al., (1991) edellä]. Ne mekanismit, joilla PT muokkaa päivittäistä melatoniinisignaalia ja välittää tämän tiedon hypotalamuksen hermoeritysjärjestelmään vaikuttavien vaikutusten aikaansaamiseksi, on tuntematon. Ihmisen PT:ssa ei ole havaittu yhdenmukaisesti suuriaffiniteettisia melatoniinireseptoreita in vitro -olosuhteissa suoritettavaa ^{125}I-Mel-autoradiografiaa käyttäen, mikä viittaa siihen, että neuroendokriiniset vasteet melatoniiniin voivat tapahtua ihmisillä perustavanlaatuisesti erilaisten mekanismien välityksellä kuin mitä ovat ne mekanismit, joihin lisääntymisen säätely vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvillä lajeilla perustuu [Weaver, D. R., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 16 (1993) 295 - 301].

Hiiren suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin eristäminen

Käyttäen muiden nisäkkäiden Mel-1a-reseptorien cDNA-molekyyleissä (kuten lampaasta peräisin olevissa molekyyleissä (ks. kuvio 2) muuttumattomina säilyneitä alueita suunniteltiin degeneratiivisia alukkeita. Hiiren perimän DNA:lle suoritettu polymeraasiketjureaktio (PCR) tuotti 466 ep:n suuruisen fragmentin, joka oli aminohappotasolla 94-%:isesti identtinen rotan ja Djungarianhamsterin Mel-1a-reseptorin cDNA-molekyylien suhteen. Aikuisen C57BL/65-hiiren aivojen in situ -hybridisaatiosta PCR:n avulla valmistettua fragmenttia käyttäen saatiin hybridisaatiotulos, joka oli yhdenmukainen Mel-1a-melatoniinireseptorilta odotettavan tuloksen suhteen. Hybridisaatiosignaali oli voimakkain aivolisäkkeen pars

tuberaliksessa. Perimän DNA:n Southern-blottianalyysi osoitti tässä esiintyvän geenin kappalelukumäärä olevan yksi. RNA eristettiin Mel-1a-reseptoria ilmentävästä hiiren solulinjasta (RT2-2). Poly(A)$^+$-RNA:n Northern-analyysi osoitti, että tässä esiintyi noin 1,9 ke:n pituinen transkriptiotuote. RT-PCR:ää käytettiin reseptorin täysimittaisen koodaavan alueen (1 059 ep) valmistamiseen, joka reseptori osoittautui aminohappojensa puolesta olevan 84-%:isesti identtinen humaani-Mel-1a-reseptorin suhteen.

RNaasilta suojatun alueen analyysista, 5'- ja 3'-RACE-kloonauksesta ja EMBL3 SP6/T7:ään valmistetun BALB/c-hiiren perimän kirjaston seulonnasta kävi ilmi, että reseptorigeeni koostui suuren (> 8 ke) intronin erottamasta kahdesta eksonista. 3'-puoleisen translaatioon osallistumattoman alueen pituus oli 444 ep ja se sisälsi polyadenylaatiosignaalin AUUAAA. RNaasilta suojattujen alueiden määritys viittaa siihen, että transkription pääaloituskohta sijaitsee noin 100 ep vastasuuntaan aloituskodonista. Hiiren Mel-1a-reseptorin nukleotidisekvenssi ja tästä päätelty aminohapposekvenssi on esitetty kuviossa 3.

COS-7-soluissa ilmennetty hiiren yhdistelmä-Mel-1a-reseptori sitoi melatoniinia suurella affiniteetilla, joka oli verrattavissa lampaan ja ihmisen Mel-1a-reseptorien ligandinsitomisaffiniteettiin.

Ihmisen suuriaffiniteettisen Mel-1a-reseptorin fragmentin eristäminen

Ihmisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin kloonaamiseksi käytettiin edellä kuvatulla tavalla degeneratiivisia alukkeita, jotka perustuivat peptidisekvensseihin 5' AIAINRY (sekvenssi nro 8) [Xenopuksen päätellyn aminohapposekvenssin (sekvenssi nro 2) ryhmät 125 - 131] ja 3' FAVCWAPL (sekvenssi nro 9) [Xenopuksen päätellyn aminohapposekvenssin (sekvenssi nro 2) ryhmät 252 - 259]. Ihmisen perimän DNA monistettiin tavallisia PCR-menetelmiä käyttäen näiden degeneratiivisten alueiden avulla ja noin

400 ep:n suuruinen fragmentti eristettiin ja sekvensoitiin vakiomenetelmiä käyttäen. 400 ep:n suuruisen fragmentin päätelty aminohapposekvenssi oli 65-%:isesti identtinen aminohappotasolla vastaavan Xenopuksen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin osan suhteen. 400 ep:n suuruinen fragmentti varustettiin leimalla (esimerkiksi käyttäen leimalla varustamista satunnaisalukkeiden avulla; tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Ausubel, edellä) ja tätä käytettiin ihmisen perimän kirjaston (tämä oli valmistettu EMBL-3-vektoriin, Clontech, Palo Alto, CA, tuoteluettelon numero HL1067J) seulontaan erittäin rajoittavissa olosuhteissa käyttäen tavallisia hybridisaatiomenetelmiä (tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi edellä olevassa julkaisussa Ausubel). Seulotuista 1 x 10^6 yhdistelmäkloonista tunnistettiin useita positiivisesti hybridisoituvia klooneja. Kloonit puhdistettiin erillisistä plakeista vakiomenetelmin, ne pilkottiin asiaankuuluvilla restriktioentsyymeillä ja jatkokloonattiin sekvensointiin soveltuvaan sopivaan vektoriin (esimerkiksi pBluescript®, Stratagene, La Jolla, CA). Yhden kloonin humaani-insertio-DNA (sekvenssi nro 5) sekvensoitiin vakiomenetelmin. Käyttäen vertailua varten lampaan (sekvenssi nro 3) ja Xenopuksen (sekvenssi nro 1) nukleotidisekvenssejä ja päätellyt aminohapposekvenssejä (sekvenssi nro 4 ja sekvenssi nro 2, mainitussa järjestyksessä ilmoitettuna) (ks. kuvio 7 ja kuvio 8), havaittiin ihmisen insertio-DNA:n sisältävän osan koodaavaa aluetta, joka oli peräisin "GNXFVV (sekvenssi nro 10) -motiivista", joka sijaitsee heti myötäsuuntaan ensimmäisen transmembraanidomeenin (ks. kuviot 7 ja 8) suhteen ja ulottuu koodaavan alueen 3'-päähän. Sekvensoidun kloonin humaani-DNA on noin 82-%:isesti identtinen lampaan nukleotidisekvenssin (sekvenssi nro 5) vastaavan alueen suhteen. Lampaan ja ihmisen päätellyt aminohapposekvenssit (sekvenssi nro 4 ja sekvenssi nro 6, tässä järjestyksessä mainittuna) ovat vastaavilla alueilla

noin 80-%:isesti identtisiä. Siten edellä mainituilla menetelmillä eristetty humaani-DNA-fragmentti (sekvenssi nro 5) koodaa proteiinia, joka on voimakkaasti identtinen vastaavan toisessa eläimessä, lampaassa, olevan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin osan suhteen.

Ihmisen perimän DNA sisältää intronin (pituus > 2,0 ke), joka sijaitsee "GNXFVV-motiivin" (sekvenssin nro 10) suhteen vastasuuntaan. Humaanireseptorin koodaavan alueen 5'-puoleisen osan aikaansaamiseksi käytettiin lampaan reseptorin koodaavan alueen 160 ep:n suuruista fragmenttia ihmisen perimäkirjaston käsittelemiseksi uudelleen koettimella vähäisesti rajoittavissa olosuhteissa [esimerkiksi vähäisesti rajoittavissa hybridisaatio-olosuhteissa, tätä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Ausubel, et al. (1989), edellä]. Eristettiin yksi positiivisesti hybridisoituva klooni ja sen havaittiin tavallisen sekvenssin analyysin perusteella sisältävän koodaavan alueen 5'-pään. Humaanimelatoniinireseptorin alueen koodaavan alueen sisältävä odotettu cDNA saatiin monistettua ihmisen hypotalamuksesta peräisin olevan mRNA:n RT-PCR:lla [tätä on esimerkiksi käsitelty julkaisussa Reppert, et al., Mol. Endocrinol. 5 (1991) 1037 - 1048] käyttäen otaksutun koodaavan alueen 5'- ja 3'-päihin suunnattuja spesifisiä alukkeita. cDNA jatkokloonattiin pcDNAI:hin sekvenssin analysoimiseksi ja reseptoripolypeptidin ilmentämiseksi väliaikaisesti.

Sekvensointitulokset osoittavat, että tässä keksinnössä kloonatut cDNA-molekyylit koodaavat Xenopuksesta, lampaasta ja ihmisestä peräisin olevaa suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria. Lampaan reseptorin ja ihmisen täydellisen reseptorin koodaavat alueet ovat kaiken kaikkiaan noin 60-%:isesti identtisiä Xenopuksen melatoniinireseptorin koodaavan alueen suhteen. Transmembraanidomeeneissa identiteetti on 77 %. Kaikkein eniten toisistaan poikkeavia alueita nisäkkään ja sammakon reseptorien

välillä oli amino- ja karboksiterminaalisissa alueissa. Nisäkkäiden reseptorien aminoterminaalinen pää sisältää kaksi N:n välityksellä tapahtuvan glykosyloitumisen konsensus-kohtaa, kun taas sammakon reseptori sisältää yhden kohdan. Lampaan ja ihmisen reseptorien karboksiterminaalinen jatke on lisäksi 65 aminohapporyhmää lyhyempi kuin Xenopuksen reseptorin jatke. Ihmisen täydellisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin DNA:lla esiintyy voimakasta identiteettiä (nukleotiditasolla noin 82 % ja aminohappotasolla noin 80 %) lampaan suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria kohtaan ja aminohapot ovat identtiset 87-%:isesti silloin, kun vertailu rajoitetaan transmembraanidomeeneihin. Tämä voimakas rakenteellinen homologia viittaa siihen, että ihmisen ja lampaan kloonit ovat saman reseptorin lajien välisiä homologeja.

Suuriaffiniteettisen yhdistelmä-humaani-Mel-1a-reseptorin lidagandinsitomistutkimukset

Täydellistä suuriaffiniteettista humaani-melatoniini-1a-reseptori (sekvenssin nro 11) -DNA:ta, joka oli kloonattu pcDNAI:hin, ilmennettiin väliaikaisesti COS-7-soluissa ja ligandinsitomistutkimuksia suoritettiin samalla tavoin kuin mitä oli kuvattu edellä lampaan reseptorin kyseessä ollessa. Scatchard-analyysistä (tämä oli suoritettu samoin kuin mitä oli kuvattu edellä Xenopuksen ja lampaan kloonien kyseessä ollessa), kävi ilmi, että COS-7-solut, jotka oli transfektoitu ihmisen täydellisen reseptorin kloonilla (tämä sisälsi sekvenssin nro 11 DNA:ta) sitoi ^{125}I-melatoniinia suurella affiniteetilla (K_d = 2,6 ja 2,3 x 10^{-11} M; n = 2 koetta). B_{max}-arvo kokonaisiin soluihin perustuvaa sitoutumismääritystä käyttäen oli kahdessa kokeessa 210 ja 220 fmol/mg proteiinia ihmisen reseptorin kyseessä ollessa (kuvio 15). Valetransfektoiduissa COS-7-soluissa ei havaittu ^{125}I-melatoniinin spesifistä sitoutumista. Ihmisen kloonin kyseessä ollessa oli inhibition suuruusluokan mukainen järjestys samanlainen kuin lampaan

kyseessä ollessa, lukuunottamatta sitä, että 6-kloorimelatoniinin kyky inhiboida spesifistä ^{125}I-Mel:n sitoutumista oli 10-kertaisesti heikompaa (K_i-arvot on lueteltu kuvion 13b selityksessä). Siten lampaan ja ihmisen yhdistelmäreseptorit sitovat ^{125}I-Mel:ia suurella affiniteetillä ja niiden suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin farmakologiset ominaisuudet ovat asiaankuuluvaa tyyppiä (Dubocovich ja Takahashi (1987), edellä; Morgan, et al., J. Endocrinol. 1 (1989) 1 - 4; Rivkees, et al., PNAS USA 86 (1989) 3883 - 3886; Vanecek, J., J. Neurochem. 51 (1988) 1436 - 1440].

Ihmisen suuriaffiniteettisen Mel-1b-reseptorin eristäminen

Melatoniinireseptorin alatyyppien kloonaamiseksi käytettiin ihmisen perimän DNA:n monistamiseksi PCR:ää degeneratiivisilla oligonukleotidialukkeilla, jotka perustuivat Xenopuksen melatoniinireseptorin ja nisäkkäiden Mel-1a-melatoniinireseptorin kolmannessa ja kuudennessa transmembraanidomeenissa esiintyviin muuttumattomina säilyneisiin aminohapporyhmiin.

Degeneratiivisilla alukkeilla suoritettavaa PCR:ää varten tehtiin perimän DNA:lle 30 monistussykliä käyttäen 200 nM (lopullinen konsentraatio) kutakin oligonukleotidialuketta. Kukin reaktiosykli koostui inkuboinneista, jotka suoritettiin 94 °C:ssa 45 sekunnin ajan, 45 °C:ssa 2 minuutin ajan ja 72 °C:ssa 2 minuutin ajan ja joissa käytettiin AmpiTaq-DNA-polymeraasia (Perkin-Elmer Cetus). Monistettu DNA erotettiin agaroosigeelissä. DNA-vyöhykkeet jatkokloonattiin pCRTMII:hin käyttäen TA Cloning Kit -reagenssipakkausta (InVitrogen) ja yhdistelmäkloonit sekvensoitiin. Spesifisillä alukkeilla suoritettavan PCR:n kyseessä ollessa tehtiin joko perimän DNA:lle tai RNA:sta käänteistranskriptoidulle ensimmäisen juosteen cDNA:lle 25 - 35 monistussykliä käyttäen inkubointeja, jotka suoritettiin 94 °C:ssa 45 sekunnin ajan, 60 °C:ssa 45 sekunnin

ajan ja 72 °C:ssa 2 tai 3 minuutin ajan. Monistettu DNA erotettiin agaroosigeelissä. DNA-vyöhykkeet jatkokloonattiin pcDNA3:een (InVitrogen) ilmentämistutkimuksia ja sekvenssin analysointia varten tai niille suoritettiin Southern-analyysi vertailevaa käänteistranskriptiopolymeraasiketjureaktio (RT-PCR) -määritystä varten (tätä on selitetty edempänä).

EMBL-3 SP6/T7:ään valmistettu ihmisen perimän kirjasto (Clontech) maljattiin ja siirrettiin Colony Plaque Screen -suodattimille (New England Nuclear). Suodattimilla suoritettiin seulonta joko erittäin rajoittavissa tai tätä vähemmän rajoittavissa olosuhteissa. Erittäin rajoittavat olosuhteet koostuivat yön yli 42 °C:ssa suoritetusta hybridisaatiosta seoksessa, jonka koostumus oli 50-%:inen formamidi, 1 M natriumkloridi, 1-%:inen SDS, 10-%:inen dekstraanisulfaatti, 100 µg/ml denaturoitua lohen maitia, ja suodattimia pestiin 2 x SSC:ssa, 1-%:isessa SDS:ssa 65 °C:ssa tunnin ajan. Vähemmän rajoittavat olosuhteet koostuivat samasta hybridisaatioliuoksesta, jota käytettiin 42 °C:ssa, lukuunottamatta sitä, että formamidikonsentraatio oli 25 %; suodattimet pestiin 2 x SSC:ssa 1-%:isessa SDS:ssa 55 °C:ssa yhden tunnin ajan. Koettimeen hybridisoituva lamda-fagi puhdistettiin erillisten plakkien eristämisen kautta.

Uuden cDNA-fragmentin (364 ep) havaittiin vakiomenetelmin suoritetun sekvenssianalyysin perusteella olevan aminohappotasolla 60-%:isesti identtinen joko ihmisen Mel-1a-reseptorin tai Xenopuksen melatoniinireseptorin suhteen. Tämä PCR-fragmentti varustettiin leimalla käyttäen tavanomaista satunnaisalukemenetelmää ja sitä käytettiin ihmisen perimän kirjaston koetinkäsittelyyn voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa. 1 x 10^6 rekombinantista tunnistettiin seitsemän positiivisesti hybridisoituvaa kloonia ja ne puhdistettiin yksittäisten plakkien eristämisen kautta. 6 ke:n suuruinen SacI-fragmentti, joka oli

peräisin yhdestä niistä perimän klooneista, jotka hybridisoituivat PCR:n avulla valmistettuun cDNA-fragmenttiin, jatkokloonattiin ja sekvensoitiin osittain. Tämä fragmentti sisälsi otaksutun koodaavan alueen 3'-puoleisen pään ja se ulottui 5'-suunnassa ensimmäisessä sytoplasmisessa ja näennäisen intronin sisältävässä silmukassa olevaan GN-motiiviin; identtinen kohta ihmisen ja lampaan Mel-1a-reseptorigeeneissä [sekvenssi nro 11 ja sekvenssi nro 3, vastaavassa järjestyksessä ilmoitettuna, sisältää intronin konsensus-silmukointikohdan; Reppert, S.M., Weaver, D.R. & Ebisawa, T., Neuron 13 (1994) 1177 - 1185]. Lampaan Mel-1a-melatoniinireseptorin ensimmäistä transmembraanidomeenia koodaavaa 160 ep:n suuruista fragmenttia käytettiin koettimena koodaavan alueen 5'-puoleisen osan aikaansaamiseksi käsittelyssä, joka suoritettiin seitsemälle positiiviselle perimän kloonille vähäisesti rajoittavissa olosuhteissa [Reppert, S.M., et al. (1994), edellä]. 2,3 ke:n suuruinen SacI-fragmentti, joka oli peräisin yhdestä lampaan reseptorifragmenttiin hybridisoituvista perimän klooneista, jatkokloonattiin ja sekvensoitiin vakiomenetelmin. Tämä SacI-fragmentti sisälsi sellaisen koodaavan alueen näennäisen 5'-puoleisen pään, joka sisältää samassa lukukehyksessä olevan ja vastasuuntaan sijaitsevan metioniinin ja tämän yhteydessä esiintyvän translaation aloituksen konsensus-sekvenssin [Kozak, M., Nucleic Acids Res. 15 (1987) 8125 - 8148] ja N:n välityksellä tapahtuvan glykosyloitumisen konsensus-kohdan. Ihmisen aivoista peräisin olevan RNA:n RT-PCR:llä, jossa käytettiin otaksutun koodaavan alueen 5'- ja 3'-päitä kohtaan suunnattuja spesifisiä alukkeita, saatiin monistettua sellainen odotettu cDNA, jossa silmikoituminen tapahtui perimän analyysin perusteella ennustetulla asiaankuuluvalla tavalla, mikä osoitti, että otaksuttu reseptorigeeni transkriptoituu. PCR:n avulla valmistettu humaani-Mel-1b-reseptorin koodaavan alueen konstruktio jatkokloonattiin pcDNA3:een

ilmentämistutkimuksia ja sekvenssin analyysiä varten. Humaani-Mel-1b-reseptorin päätelty aminohapposekvenssi oli identtinen perimän SacI-fragmenttien vastaavan sekvenssin suhteen.

Humaanimelatoniini-1b-reseptori koodaa 362 aminohapon suuruista proteiinia (sekvenssi nro 16) ja tämän ennustettu suhteellinen moolimassa on 40 188, mihin ei ole otettu mukaan translaation jälkeen tapahtuvia modifikaatioita (kuvio 6). Humaani-Mel-1b on sellaisen äskettäin kuvatun melatoniinireseptoriryhmän jäsen, joka poikkeaa muista reseptoriryhmistä (esimerkiksi biogeenisten amiinien, neuropeptidien ja valopigmenttireseptorien ryhmistä), joka sisältää prototyyppisen G-proteiiniin kytkeytyneen reseptoriryhmän [Ebisawa, et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 91 (1994) 6133 - 6137; Reppert, S.M., et al. (1994) edellä]. Tämän ryhmän ainutlaatuisia piirteitä ovat heti kolmannen transmembraanidomeenin jälkeen sijaitseva NRY-motiivi (tämä sijaitsee DRY-motiivin tilalla) ja transmembraanialueessa 7 esiintyvä NAXXY-motiivi (sekvenssi nro 17) [tämä sijaitsee NPXXY-motiivin tilalla (sekvenssi nro 7)] (kuvio 18). Lisäksi Mel-1b-reseptorissa, nisäkkäiden Mel-1a-reseptorissa ja Xenopuksen melatoniinireseptorissa esiintyy kaikissa näissä tapauksissa CYICHS-motiivi (sekvenssi nro 18) välittömästi kolmannessa sytoplasmissessa silmukassa esiintyvästä NRY:sta myötäsuuntaan, joka on sytokromi c -molekyyliryhmässä esiintyvä konsensus-heminsitomiskohta [Mathews, F. S. Prog. Biophys. Mol. Biol. 45 (1985) 1 - 56]. Kun humaani-Mel-1b-resptoria, humaani-Mel-1a-reseptoria ja Xenopuksen melatoniinireseptoria verrataan toisiinsa pareittain, niin tästä ilmenee, että mikä tahansa näiden kolmen sekvenssin pareista on noin 60-%:isesti identtinen aminohappojensa suhteen (kuvio 18). Aminohappojen identtisyysaste minkä tahansa näistä kolmesta sekvenssistä otetun kahden sekvenssin transmembraanidomeenien alueella on 73 %. Toisistaan eni-

ten poikkeavat alueet missä tahansa näistä kolmesta reseptorista otetussa kahdessa reseptorissa ovat amino ja -karboksiterminaalisilla alueilla ja toisessa ja kolmannessa sytoplasmisessa silmukassa. Aminoterminaalisessa päässä esiintyy yksi N:n välityksellä glykosyloitumisen konsensus-kohta Xenopuksen melatoniinireseptorin kyseessä ollessa ja humaani-Mel-1b-reseptorin kyseessä ollessa, kun taas humaani-Mel-1a-reseptorin aminoterminaalisessa päässä on kaksi kohtaa (kuvio 18, alempi osakuvio). Sitä mahdollisuutta, että vastasuunnassa esiintyisi muita translaation aloituskohtia, ei voida sulkea ulkopuolelle.

Suuriaffiniteettisen humaani-yhdistelmä-Mel-1b-reseptorin ligandinsitomistutkimukset

Humaani-Mel-1b-reseptorin ligandinsitomisominaisuuksia ja farmakologisia ominaisuuksia tutkittiin ilmentämällä reseptorin cDNA:ta väliaikaisesti COS-1-soluissa.

Ilmentämistutkimukset suoritettiin seuraavasti. COS-1- ja NIH 3T3 -soluja kasvatettiin yhden solun paksuisina kerroksina 5-%:isessa CO_2:ssa 37 °C:ssa Dulbeccon modifioimassa Eaglen mediumissa (DMEM), jota oli täydennetty 10-%:isella fetaalisella vasikanseerumilla, penisilliinillä (50 U/ml) ja streptomysiinillä (50 µg/ml). Ligandinsitomistutkimuksia varten liitettiin pcDNA3:aan valmistettuja reseptori-cDNA-molekyylejä COS-1-soluihin käyttäen DEAE-dekstraanimenetelmää [Cullen, B., Methods Enzymol. 152 (1987) 684 - 704]. Elatusaine poistettiin kolmen päivän kuluttua transfektiosta ja maljat pestiin PBS:lla. Solut koottiin talteen Hankin tasapainotettuun suolaliuokseen ja ne sentrifugoitiin (1 400 x g; 10 minuuttia, 4 °C). Tulokseksi saadut napit varastoitiin -80 °C:ssa. Membraaniraakahomogenaatit valmistettiin sulattamalla napit jäillä ja suspendoimalla ne uudelleen TME-puskuriin (pH 7,4), jonka koostumus oli 50 mM Tris-emäs, 12,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA ja jota oli täydennetty 10 µg:lla aprotiniinia ja leupeptiiniä millilitrassa ja 100 µM fenyyli-

metyylisulfonyylifluoridilla. Tämän jälkeen solut homogenoitiin dounce-homogenisaattoria ja ne sentrifugoitiin (45 000 x g; 15 minuuttia 4 °C:ssa). Tulokseksi saatu nappi suspendoitiin uudelleen dounce-homogenisaattorilla TME:ssa ja seos pakastettiin pieninä erinä -80 °C:seen.

Sitoutumismäärityksiä suoritettiin kahtena rinnakkaisena kokeena 200 µl:n lopputilavuudessa, joka sisälsi 20 µl radioaktiivista ligandia, 20 µl TME:ta, joka sisälsi joko melatoniinia tai syrjäyttävää yhdistettä, ja 160 µl membraanihomogenaatteja. Inkuboinnit aloitettiin lisäämällä membraanipreparaatti ja ne suoritettiin 37 °C:ssa 60 minuutin ajan. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin käyttämällä 10 µM melatoniinia. Kaikki määritykset suoritettiin joko kahtena rinnakkaisena tai kolmena rinnakkaisena kokeena.

Proteiinimääritykset suoritettiin Bradfordin menetelmällä [Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248 - 254] käyttäen standardina naudan seerumialbumiinia. Sitoutumiskoetulokset analysoitiin tietokoneella käyttämällä Munsonin ja Rodbardin Ligand-ohjelmaa [Munson, P. L. ja Rodbard, D., Anal. Biochem. 107 (1980) 220 - 239].

Vertailua varten määritettiin rinnakkaisissa kokeissa humaani-Mel-1a-reseptoria väliaikaisesti ilmentävien COS-1-solujen ligandien sitominen ja farmakologinen käyttäytyminen. Kylläisyystason saavuttamista koskevien koetulosten Scathard-muunnos osoitti, että kummallakin reseptorilla transfektoidut COS-solut sitovat ^{125}I-Mel:ää suurella affiniteetilla. Humaani-Mel-1b-reseptorin K_d oli 1,6 ± 0,3 x 10^{-11} M (keskiarvo + SE; n = 5 koetta) (kuvio 19). Tämä arvo edustaa nelinkertaisesti pienempää affiniteettia kuin rinnakkaisissa kokeissa havaittu humaani-Mel-1a-reseptorin affiniteetti (K_d = 6,5 ± 0,6 x 10^{-11} M). B_{max}-arvot olivat 2,7 ± 0,1 pmol/mg membraaniproteiinia humaani-Mel-1b-reseptorin kyseessä ollessa ja 2,8 ± 0,4 pmol/mg membraaniproteiinia humaani-Mel-1a-reseptorin ky-

seessä ollessa. Mel-1b-reseptorista tutkittiin seuraavaksi ^{125}I-Mel:n spesifisen sitoutumisen inhibition farmakologiset ominaisuudet akuutisti transfektoiduissa COS-1-soluissa ja näitä verrattiin humaani-Mel-1a-reseptorin vastaaviin ominaisuuksiin (kuvio 20; taulukko 1).

Taulukko 1

Useiden eri ligandien kompetitio sitoutumisesta spesifisesti ^{125}I-Mel:aan joko humaani-Mel-1b- tai -Mel-1a-reseptorin cDNA:lla transfektoiduissa COS-1-soluissa

Yhdiste	K_i nM		Suhde (Mel-1a/ Mel-1b)
	Mel-1b	Mel-1a	
2-jodimelatoniini	0,17 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,5
2-fenyylimelatoniini	0,26 ± 0,06	0,21 ± 0,06	0,8
S20098	0,23 ± 0,04	0,72 ± 0,11	3,1
6-kloorimelatoniini	0,66 ± 0,04	6,78 ± 0,91	10,3
melatoniini	1,11 ± 0,13	1,48 ± 0,21	1,3
NAS	595 ± 127	986 ± 137	1,6
5-HT	> 10 000	> 10 000	---
pratsosiini	> 10 000	> 10 000	---

K_i-arvot ovat keskiarvoja ± SE 3 - 5 kokeesta kunkin lääkeaineen kyseessä ollessa.
NAS: N-asetyyli-5-hydroksitryptamiini. 5-HT: 5-hydroksitryptamiini.
S20098, Bristol Myers Squibb -yhtiöstä, Princeton, NJ, saatu melatoniinianalogi.

Humaani-Mel-1b:n kyseessä ollessa oli ^{125}I-Mel:n spesifistä sitoutumista inhiboivien yhdisteiden suuruusluokan mukainen järjestys 2-jodimelatoniini > 2-fenyylimelatoniini > S-20098 > 6-kloorimelatoniini > melatoniini > N-asetyyli-5-hydroksitryptamiini (kuvio 20a; taulukko 1). Mikromolaariset pratsosiini- tai 5-hydroksitryptamii-

nikonsentraatiot eivät inhiboineet ^{125}I-Mel:n spesifistä sitoutumista. Inhiboitaessa ^{125}I-Mel:n spesifistä sitoutumista humaani-Mel-1b-reseptoriin havaittiin inhibition suuruusluokan mukaisen järjestyksen olevan hyvin samanlainen kuin rinnakkaisissa kokeissa humaani-Mel-1a-melatoniinireseptorin kyseessä ollessa lukuunottamatta sitä, että 6-kloorimelatoniini inhiboi humaani-Mel-1b-reseptoria ilmentävissä soluissa ^{125}I-Mel:n spesifistä sitoutumista 10 kertaa voimakkaammin (kuvio 20 b; taulukko 1). Humaani-Mel-1b-reseptorin cDNA koodaa siten sellaisia ^{125}I-Mel:ia sitovia ominaisuuksia sisältävää proteiinia, jotka ovat melko samanlaiset kuin Mel-1a-melatoniinireseptorin vastaavat ominaisuudet.

Melatoniini inhiboi cAMP:n akkumuloitumista soluihin Mel-1b:tä ilmentävissä soluissa

Yhdistelmä-Mel-1b-reseptori kytkeytyy Mel-1a-melatoniinireseptorin tavoin adenylyylisyklaasin inhibitioon [Reppert, S. M., et al. (1994) edellä].

Näihin tutkimuksiin käytettiin NIH 3T3 -solujen klonaalisia solulinjoja, jotka oli transfektoitu stabiilisti pcDNA3:een valmistetulla reseptorin cDNA:lla. COS-1- ja NIH 3T3 -soluja kasvatettiin 37 °C:ssa 5-%:isessa CO_2:ssa yhden solun paksuisina kerroksina Dulbeccon modifioimassa Eaglen mediumissa (DMEM), jota oli täydennetty 10-%:isella fetaalisella vasikanseerumilla, penisilliinillä (50 U/ml) ja streptomysiinillä (50 µg/ml).

Ligandinsitomistutkimuksia varten pcDNA3:een valmistetut melatoniinireseptori-cDNA-molekyylit liitettiin COS-1-soluihin käyttäen DEAE-dekstraanimenetelmää [Cullen, B. (1987) edellä]. Medium poistettiin kolme päivää transfektion jälkeen ja maljat pestiin PBS:lla. Solut koottiin talteen Hankin tasapainotettuun suolaliuokseen ja ne sentrifugoitiin (1 400 x g; 10 minuuttia, 4 °C). Tulokseksi saadut napit varastoitiin -80 °C:ssa. Membraaniraakahomogenaatit valmistettiin sulattamalla napit jäillä ja sus-

pendoimalla ne uudelleen TME-puskuriin (pH 7,4), jonka koostumus oli 50 mM Tris-emäs, 12,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA ja jota oli täydennetty 10 µg:lla aprotiniinia ja leupeptiiniä millilitrassa ja 100 µM fenyylimetyylisulfonyylifluoridilla. Tämän jälkeen solut homogenoitiin dounce-homogenisaattorilla ja ne sentrifugoitiin (45 000 x g; 15 minuuttia 4 °C:ssa). Tulokseksi saatu nappi suspendoitiin uudelleen dounce-homogenisaattorilla TME:ssa ja seos pakastettiin pieninä erinä -80 °C:seen. Sitoutumismäärityksiä suoritettiin kahtena rinnakkaisena kokeena 200 µl:n lopputilavuudessa, joka muodostui 20 µl:sta radioaktiivista ligandia, 20 µl:sta TME:tä, joka sisälsi joko melatoniinia tai syrjäyttävää yhdistettä, ja 160 µl:sta membraanihomogenaatteja. Inkuboinnit aloitettiin lisäämällä membraanipreparaatti ja ne suoritettiin 37 °C:ssa 60 minuutin ajan. Epäspesifinen sitoutuminen määritettiin käyttämällä 10 µM melatoniinia. Kaikki määritykset suoritettiin joko kahtena rinnakkaisena tai kolmena rinnakkaisena kokeena. Proteiinimääritykset suoritettiin Bradfordin menetelmällä [Bradford, M. M., (edellä)] käyttäen standardina naudan seerumialbumiinia. Sitoutumiskoetulokset analysoitiin tietokoneella käyttämällä Munsonin ja Rodbardin Ligand-ohjelmaa [Munson, P. J. ja Rodbard, D., (edellä)]. cAMP-tutkimuksia varten pcDNA3:n sisältämä reseptori-cDNA liitettiin NIH 3T3 -soluihin käyttäen Lipofektamiinia (Gibco/BRL). Eristettiin transformoituja NIH 3T3 -soluja, jotka olivat resistenttejä genetisiinille, G418:lle (käytettynä konsentraatiossa 1,0 mg/ml; Gibco/BRL) ja eristettiin yksittäisiä pesäkkeitä, joissa ilmentyi melatoniinireseptorin mukaista sitoutumista (> 200 fmol milligrammassa solujen kokonaisproteiinia).

Transformoituneita NIH 3T3 -soluja maljattiin kolmena rinnakkaisena kokeena 35 mm:n läpimittaisille maljoille. 48 tuntia myöhemmin solut pestiin (2 x) DMEM:lla ja niitä esi-inkuboitiin DMEM:een valmistetun 250 µM 3-

isobutyyli-1-metyyliksantiinin (IBMX) kanssa 10 minuutin ajan 37 °C:ssa. Tämän jälkeen soluja inkuboitiin 10 minuutin ajan 37 °C:ssa lääkeaineiden kanssa tai ilman näitä DMEM:ssa, joka sisälsi 200 μM IBMX:ää. Käsittelyn lopussa medium poistettiin imulla ja sen tilalle lisättiin 0,5 ml 50 mM etikkahappoa. Solut koottiin talteen Eppendorf-putkeen, niitä pidettiin kiehumispisteessä 5 minuutin ajan ja ne sentrifugoitiin (13 750 kierrosta minuutissa 15 minuutin ajan). Supernatantti koottiin talteen ja siitä määritettiin cAMP. Kaikki määritykset suoritettiin kolmena rinnakkaisena määrityksenä. Syklisen AMP:n pitoisuudet määritettiin kahtena rinnakkaisena määrityksenä radioimmunomääritystä (New England Nuclear) käyttäen. ^{125}I-Mel hankittiin yhtiöstä New England Nuclear. Kaikki kompetitiotutkimuksissa käytetyt lääkeaineet oli hankittu yhtiöstä Sigma, Research Biochemicals, tai ne oli syntetoitu vakiomenetelmin. Kaikki muut kemikaalit hankittiin Sigmalta.

Näiden tutkimusten tulokset osoittivat, että melatoniini (1 μM) ei nostanut cAMP:n perustason pitoisuuksia pysyvästi transfektoituneissa NIH 3T3 -soluissa. Melatoniinilla oli vaikutus, jossa se inhiboi annoksesta riippuvaisella tavalla 10 μM forskoliinilla indusoidun cAMP:n akkumuloitumisen lisääntymistä (kuvio 21); forskoliinin stimuloiman cAMP-määrän keskiarvon maksimaalinen inhibitio tapahtui 10^{-8} M melatoniinikonsentraatiossa. Tämän vasteen arvioitu IC_{50}-arvo (noin 1 x 10^{-9} M) oli hyvin samanlainen kuin tietokoneella saatu K_i-arvo (1,11 ± 0,13 x 10^{-9} M), joka oli määritetty spesifisen ^{125}I-Mel:n sitoutumisen melatoniini-inhibitiolle (kuvio 20; taulukko 1). Siten yhdistelmä-melatoniini-1b-reseptorilla on negatiivinen kytkeytymistapa cAMP:n säätelyjärjestelmään.

Suuriaffiniteettisenhumaani-Mel-1b-reseptorigeenin ja sen ilmentymisen ominaisuudet

Perimän kloonien restriktioendonukleaasikartoitus ja PCR-analyysi osoitti, että osa geenistä, joka koodaa

humaani-Mel-1b-reseptorin koodaavaa aluetta, koostuu kahdesta eksonista, joita erottaa noin 9,0 ke:n pituinen introni. Suoritettiin useilla eri restriktioendonukleaaseilla pilkotun ihmisen perimän DNA:n Southern-analyysi käyttäen hybridisaatiokoettimena humaani-Mel-1b-DNA:n toisen eksonin PCR-fragmenttia. Erittäin voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa havaittiin yksittäisten vyöhykkeiden muodostama tulos, mikä viittaa siihen, että humaani-Mel-1b-reseptoria koodaavan geenin kappalelukumäärä on yksi.

Humaani-Mel-1b:n geenin paikantamiseksi kehitettiin intron-PCR-määritys, joka monistaisi ainoastaan humaani-Mel-1b-reseptorigeenin. Suoritettiin seulonta, johon käytettiin paneelia, joka oli koottu 43 ihmisen ja jyrsijän somaattisten solujen hybrideistä, jotka sisälsivät selvärajaisia toistensa suhteen limittäisiä ihmisten kromosomien alajoukkoja [Geissler, E. N., Liao, M., Brook, J. D., Martin, F. H., Zsebo, K. M., Housman, D. E. & Galli, S. J., Somatic Cell Genet. 17 (1991) 207 - 214; Pelletier, J., Brook, D.J. & Housman, D.E., Genomics 10 (1991) 1079 - 1082; NIGMS Mapping Panel #2, Coriell Institute, Camden, NJ]. Käyttäen aluketta 5'-CTGTGCCTCTAAGAGCCACTTGGTTTC-3' (sekvenssi nro 19) ja aluketta 5'TATTGAAGACAGAGCCGATGACGCTCA3' (sekvenssi nro 29), monistui PCR:lla ainoastaan yksi vyöhyke niissä solulinjoissa, jotka sisälsivät humaanikromosomin 11. Mel-1b-reseptorigeeni paikannettiin tarkemmin vyöhykkeeseen 11 q21-22 seulomalla PCR:n avulla paneelia, joka oli koottu sellaisista somaattisten solujen hybrideistä, jotka sisälsivät useita erilaisia humaanikromosomin 11 deleetiofragmentteja [Glaser, T., Housman, D., Lewis, W. H., Gerhard, D. & Jones, C., Somat. Cell. Mol. Genet. 15 (1989) 477 - 501; kuvio 23]. Humaani-Mel-1b-resptoria koodavalle geenille annettiin nimitys MNTR1 B.

Sen määrittämiseksi, miten humaani Mel-1b:n mRNA jakautuu kudoksiin, suoritettiin vertaileva RT-PCR-analyy-

si käyttäen aikaisemmin kuvatun menetelmän modifikaatiota [Kelly, M. R., Jurgens, J. K., Tentler, J., Emanuele, N. V., Blutt, S. E., Emanuele, M. A., Alcohol 10 (1993) 185 - 189]. Poly(A)$^+$-RNA hankittiin Clontech-yhtiöstä ja 2 µg näytettä kustakin kudoksesta käsiteltiin alukkeilla käyttäen satunnaisesti koostettuja heksameerejä ja käänteistranskriptio suoritettiin aikaisemmin kuvatulla tavalla [Reppert, S. M., Weaver D. R., Stehle, J. H. & Rivkees, S. A., Mol. Endocrinol. 5 (1991) 1037 - 1048]. cDNA:lle suoritettiin 25 monistussykliä käyttäen kumpaakin kahdesta spesifisestä alukkeesta konsentraatiossa 200 nM.

Mel-1b-ja Mel-1a-reseptorien alukkeet oli suunniteltu sellaisiksi, että ne monistaisivat cDNA:n ensimmäisessä sytoplasmisessa silmukassa esiintyvän intronin silmukoitumiskohtien välisen alueen ylittäen. Koska sekä Mel-1b-että Mel-1a-reseptorigeenien intronit ovat suuria (> 8 ke), niin perimän DNA:n monistumismahdollisuus eliminoituisi käyttämällä monistamiseen sopivankokoisia cDNA-fragmentteja. Humaan-Mel-1b-reseptorialukkeet olivat 5'-TCCTGGTGATCCTCTCCGTGCTCA-3' (sekvenssi nro 20) ja 5'-AGCCAGATGAGGCAGATGTGCAGA-3' (sekvenssi nro 21) ja ne monistivat 321 ep:n suuruisen vyöhykkeen. Mel-1a-reseptorin alukkeet olivat 5'-TCCTGGTCATCCTGTCGGTGTATC-3' (sekvenssi nro 22) ja 5'-CTGCTGTACAGTTTGTCGTACTTG-3' (sekvenssi nro 23) ja ne monistivat 285 ep:n suuruisen vyöhykkeen. Histoni-H3.3 toimi kontrollina kunkin näytteen mallijuosteen määrän varmistamiseksi. Histoni H3.3:n alukkeet olivat 5'-GCAAGAGTGCGCCCTCTACTG-3' (sekvenssi nro 24) ja 5'-GGCCTCACTTGCCTCCTGCAA-3' (sekvenssi nro 25) ja ne monistivat 217 ep:n suuruisen vyöhykkeen.

PCR:n jälkeen reaktiotuotteille suoritettiin elektroforeesi 1,5-%:isessa agaroosigeelissä ja ne blotattiin Genescreenlle (New England Nuclear). Määrityksen spesifisyyden lisäämiseksi hybridisoitiin molemmat blotit 25-meerisillä oligonukleotideillä, jotka oli varus-

tettu [γ-32P]ATP-leimalla käyttäen T4-polynukleotidikinaasia. Kunkin alukeparin kyseessä ollessa olivat oligonukleotidikoettimet spesifisiä alukkeiden välillä monistuneen fragmentin sekvenssin suhteen. Oligonukleotidisekvenssit olivat 5'-CTAATCCTCGTGGCCAATCTTCTATG-3' (sekvenssi nro 26) humaani-Mel-1b-reseptorin kyseessä ollessa; 5'-TTGGTGCTGATGTCGATATTTAACA-3' (sekvenssi nro 27) humaani-Mel-1a-reseptorin kyseessä ollessa; ja 5'-CACTGAACTTCTGATTCGCAAACTT-3' (sekvenssi nro 28) histoni H3.3:n kyseessä ollessa. Hybridisaatio-olosuhteet olivat käsittely 45 °C:ssa yön yli seoksessa, jonka koostumus oli 0,5 M $NaPO_4$ (pH 7,2), 7 % SDS, 1 % BSA ja 1 mM EDTA. Blotit pestiin kaksi kertaa seoksessa, jonka koostumus oli 0,2 M $NaPO_4$, 1 % SDS ja 1 mM EDTA, 45 °C:ssa 30 minuutin ajan.

Ihmisen Mel-1b-reseptorin cDNA:n rottahomologin 364 ep:n suuruinen fragmentti kloonattiin RT-PCR:n avulla rotan aivojen RNA:sta; rotan cDNA:n fragmentti oli aminohappotasolla 81-%:isesti identtinen humaani-Mel-1b-reseptorin kanssa. Rotan fragmenttia käytettiin sellaisen Northern-blotin koettimena, joka sisälsi 5 μg poly(A)$^+$-RNA:ta kustakin rotan 20:stä eri kudoksesta. Ei havaittu mitään positiivista hybridisaatiosignaalia. Lisäksi in situ -hybridisaatiossa, jossa käytettiin rotan fragmenttiin kohdistuvaa antisense-cRNA-koetinta, ei PT:ssa eikä SCN:ssa havaittu hybridisaatiosignaalia, joissa kohteissa saatiin positiivinen hybridisaatiosignaali samassa in situ -olosuhteissa suoritetussa kokeessa käyttämällä Mel-1a-reseptoriin kohdistuvaa antisense-cRNA-koetinta [Reppert, S. M., Weaver, D. R. & Ebisawa, T., Neuron 13 (1994) 1177 - 1185].

Koska reseptorien transkriptiotuotteet näyttivät esiintyvän pienissä konsentraatioissa, suoritettiin humaani-Mel-1b- ja -Mel-1a-reseptorigeenien ilmentymisen vertaileva RT-PCR-määritys kuudessa ihmisen kudoksessa (kuvio 22). Humaani-Me-1b-reseptori ilmentyi verkkokalvolla ja

sen ilmentyminen oli paljon pienempää kokonaisissa aivoissa ja hippokampuksessa. Humaani-Mel-1a-reseptori ilmentyi selvästi kokonaisissa aivoissa ja ilmentyminen oli juuri havaittavissa verkkokalvolla ja hippokampuksessa. Aivolisäkkeessä, maksassa tai pernassa ei havaittu Mel-1b- eikä Mel-1a-reseptorin mRNA:ta. Käänteistranskriptoituneen RNA:n määrän yhdenmukaisuuden ja käänteistranskriptioreaktioiden tehokkuuden varmistamiseksi tutkituissa kudoksissa monistettiin kustakin tutkitusta kudoksesta histoni H3.3:n cDNA:ta; näissä kuudessa kudoksessa tapahtui erittäin hyvin vertailukelpoisia monistumisia (kuvio 22).

Ihmisen suuriaffiniteettisten Mel-1a- ja Mel-1b-reseptorien ominaisuudet toisiinsa verrattuna

Yksi piirre, joka erottaa Mel-1b-reseptorin Mel-1a-resptorista, on sen jakautuminen kudoksiin. Mel-1b-reseptorin huomattavasti voimakkaampi ilmentyminen verkkokalvolla viittaa siihen, että melatoniini voi aikaansaada vaikutuksensa nisäkkäiden verkkokalvon fysiologiaan tämän reseptorin välityksellä. Melatoniini inhiboi kaniinin verkkokalvolla Ca^{+2}-riippuvaista dopamiinin vapautumista sellaisten reseptorien aktivoitumisen välityksellä, joiden farmakologinen spesifisyys on verrattavissa siihen, mitä tässä keksinnössä on raportoitu Mel-1b-reseptorin kyseessä ollessa [Dubocovich, M. L. & Takahashi, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 3916 - 3920; Dubocovich, M. L., Nature 306 (1983) 782 - 4]. Melatoniini vaikuttaa toimivan verkkokalvossa siten, että se vaikuttaa useisiin valosta riippuvaisiin toimintoihin, mukaan lukien valopigmenttikiekkojen irtoaminen ja fagosytoosi [Besharse, J. C. & Dunis, D. A., Science 219 (1983) 1341 - 1343; Cahill, G. M., Grace, M. S. & Besharse, J. C., Cell. Mol. Neurobiol. 11 (1991) 529 - 560].

Ligandinsitomisominaisuuksiensa ja toiminnallisten ominaisuuksiensa puolesta Mel-1a-reseptoria muistuttavan Mel-1b-reseptorin löytäminen tekee ymmärrettäväksi,

että Mel-1b-reseptori osallistuu myös melatoniinin vuorokausirytmejä koskeviin ja/tai lisääntymistä koskeviin toimintoihin. Vaikkakaan Mel-1b-reseptorin mRNA ei ole havaittavissa in situ -olosuhteissa suoritettavalla hybridisaatiolla rotan SCN:ssa tai PT:ssa, niin se voi esiintyä ja olla toimintakykyinen näissä ja muissa kohteissa hermostossa sellaisissa pitoisuuksissa, jotka eivät ole havaittavissa tavallisia havaitsemismenetelmiä käyttäen.

Toinen Mel-1b-reseptorille ominainen piirre on sen kromosomaalinen sijainti. Mel-1b-melatoniinireseptori kartoittuu ihmisen kromosomiin 11 q21-22-alueelle, joka on synteeninen hiiren kromosomin 9 suhteen D2-dopamiinireseptori- (DRD2) ja kateenkorvasoluantigeeni 1- (THY1)-lokusten alueeseen nähden [Goldsborough, et al., Nucl. Acids Res. 21 (1993) 127 - 132; Seldin, M. F., Saunders, A. M., Rochelle, J. M. ja Howard, T. A., Genomics 9 (1991) 678 - 685]. Tämä muodostaa jyrkän vastakohdan Mel-1a-reseptorin suhteen, joka kartoittuu ihmisen kromosomin 4 q35.1:een ja hiiren kromosomiin 8. Siten nämä kaksi rakenteellisesti ja toiminnallisesti toisiaan muistuttavaa melatoniinireseptoria eivät ole kehittyneet pelkästään esimuotoa edustavan geenin yksinkertaisen peräkkäisen duplikaation avulla, vaan tämä viittaa siihen, että kehitykseen liittyi muita mekanismeja, kuten kromosomien uudelleenjärjestyminen ja duplikaatio.

Uuden G-proteiiniin kytketyn melatoniinireseptoriryhmän löytäminen osoittaa, että melatoniinin toimintojen edistämiseen on kehittynyt vähintään kaksi geeniä. Sellaisen menetelmän kehittäminen, jolla kyetään tunnistamaan farmakologisia aineita, jotka vaikuttavat spesifisesti Mel-1a- ja Mel-1b-reseptorin toimintaan, on tärkeä terapeuttinen sovellutus, jonka tämä keksintö on tuonut saataville.

Xenopuksen ja nisäkkäiden suuriaffiniteettisten melatoniini-1a-reseptorien ominaisuudet toisiinsa verrattuna

Kun COS-7-soluja transfektoidaan akuutisti Xenopuksen melatoniinireseptorikloonilla ja lampaan Mel-1a-reseptorikloonilla, niin tämä johtaa sellaisten reseptorien väliaikaiseen ilmentymiseen, jotka sitovat ^{125}I-melatoniinia suurella affiniteetilla (kuvio 9, kuvio 12b). ^{125}I-melatoniinin spesifinen sitoutuminen solujen väliaikaisesti ilmentämään Xenopuksen reseptoriin inhiboituu lisäksi kuudella ligandilla siinä suuruusluokkajärjestyksessä, joka on identtinen sen suuruusluokkajärjestyksen suhteen kuin mitä on raportoitu matelijoissa, linnuissa ja nisäkkäissä esiintyvän endogeenisen Mel-1a-resptorin suhteen (kuvio 9) [Dubocovich, et al. (1987), edellä; Rivkees, et al. (1989), edellä; Morgan, P.J., et al. (1989) edellä]. Se, että Xenopuksen suuriaffiniteettinen yhdistelmä-melatoniinireseptori kykenee inhiboimaan pysyvästi transfektoiduissa CHO-soluissa forskoliinin stimuloimaa cAMP:n akkumuloitumisen lisääntymistä, on yhdenmukaista endogeenisesta reseptorista suoritettujen tutkimusten mukaan, jotka osittavat, että suuriaffiniteettisen Mel-1a-resptorin tärkein signaalintransduktioreaktiotie on adenylyylisyklaasin inhibitio [Abe, K., et al. (1969), edellä; White, et al. (1987), edellä]. Lopuksi Xenopuksen melatoniinireseptorin mRNA:ta ilmentyy kohtalaisen voimakkaasti soluissa, joiden RNA:ta käytettiin cDNA-kirjaston valmistamiseen. Melatoniinin voimakkaat vaikutukset pigmentin kerääntymiseen sammakon melanoforeissa tapahtuvat siten todennäköisesti kloonatun reseptorin välityksellä. Melatoniinireseptorin cDNA:n koodaama proteiini määrittelee rakenteellisesti uuden reseptoriryhmän G-proteiiniin kytkettyjen reseptorien suuressa yläryhmässä.

Aikaisemmat tutkimukset, joissa humaani-SCN:ää koskevissa tutkimuksissa on käytetty kvantitatiivista

^{125}I-Mel-autoradiografiaa, ovat tavallisesti osoittaneet affiniteetin melatoniinia ja 6-kloorimelatoniinia kohtaan olevan korkean ja affiniteetin serotoniinia kohtaan hyvin pienen [Reppert, et al., (1988) edellä], mitkä kaikki ovat yhdenmukaiset humaani-yhdistelmäreseptorin farmakologisten ominaisuuksien suhteen (kuvio 15). Lampaan yhdistelmä-Mel-1a-reseptorin farmakologiset ominaisuudet ovat käytännöllisesti katsoen identtiset lampaan PT:ssa esiintyvän endogeenisen melatoniini 1a -reseptorin ominaisuuksien suhteen [Morgan, et al., J. Endocrinol. 1 (1989) 1 - 4]. Lampaan ja ihmisen Mel-1a-reseptorien affiniteettien välinen ero 6-kloorimelatoniinia kohtaan on toistettavissa ja ilmenee samanlaisena tutkittaessa lampaan ja ihmisen Mel-1a-reseptoreja samassa määrityskokeessa.

Polypeptidien ilmentäminen

Tämän keksinnön mukaisia polypeptidejä voidaan tuottaa transformoimalla sopiva isäntäsolu kokonaista tai osittaista suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria koodaavalla cDNA-fragmentilla (esimerkiksi edellä kuvatuilla cDNA-molekyyleillä) sopivaan ilmentämiskantajamolekyyliin liitettynä, ja ilmentämällä reseptoria.

Molekyylibiologian alan ammattikokemuksen perusteella on selvää, että yhdistelmä-reseptoriproteiinin aikaansaamiseen voidaan käyttää suurta määrää useita erilaisia ilmentämisjärjestelmiä. Tietty nimenomainen käytettävä isäntäsolu ei ole ratkaisevaa tälle keksinnölle. Reseptoria voidaan tuottaa prokaryoottisessa isännässä (esimerkiksi E. colissa) tai eukaryoottisessa isännässä (esimerkiksi Saccharomyces cerevisiaessa tai nisäkässoluissa, esimerkiksi COS-6M-, COS-7-, NIH/3T3- tai kiinanhamsterin munasarjasoluissa). Näitä soluja on saatavilla suuresta määrästä erilaisia materiaalilähteitä (esimerkiksi talletuslaitoksesta American Type Culture Collection, Rockville, MD). Transfektiomenetelmän ja ilmentämiskantajamolekyylin valinta on riippuvainen valitusta isäntäjär-

jestelmästä. Transformaatiomenetelmää ja nisäkässolujen transfektiomenetelmiä on kuvattu esimerkiksi teoksessa Ausubel, et al. [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, (1989)]; ilmentämiskantajamolekyylejä voidaan valita niiden kantajamolekyylien joukosta, joita on käsitelty esimerkiksi teoksessa Cloning Vectors: A Laboratory Manual [Pouwels, P. H., et al., (1985), Supp. 1987].

Yksi erityisen edullinen ilmentämisjärjestelmä on kiinanhamsterin munasarja (CHO) -solu (ATCC-hakunumero CCL61), joka on transfektoitu pcDNAI/NEO-ilmentämisvektorilla (InVitrogen, San Diego, CA). PcDNAI/NEO tarjoaa käyttöön SV40:n replikaation alkukohdan, jonka avulla replikoituminen on mahdollista nisäkäsjärjestelmissä, selektoitavan neomysiinigeenin ja SV40:n silmikoitumis- ja polyadenylaatiokohdat. Ihmisen, lampaan tai Xenopuksen suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria tai asiaankuuluvaa reseptorifragmenttia tai -analogia (sellaisena kuin tämä on kuvattu edellä) koodaava DNA liitettäisiin pcDNAI/NEO-vektoriin sellaisessa orientaatiossa, joka on suunniteltu tekemään ilmentymisen mahdolliseksi. Muita edullisia isäntäsoluja, joita voidaan käyttää pcDNAI/NEO-ilmentämiskantajan yhteydessä, ovat NIH/3T3-solut (ATCC-hakunumero 1658). Ilmentämistä voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisessa seulontamenetelmässä (tätä on kuvattu tuonnempana) tai haluttaessa yhdistelmäreseptoriproteiini voidaan eristää alla kuvatulla tavalla.

Suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria (tai reseptorin fragmenttia tai analogia) ilmennetään vaihtoehtoisesti käyttämällä pysyvästi transfektoitua nisäkässolulinjaa.

Useita nisäkässolujen pysyvään transfektointiin soveltuvia vektoreita on yleisesti saatavilla, näitä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Pouwels, et al. (edellä); menetelmiä tällaisten solulinjojen konstruoimiseksi

on myös yleisesti saatavilla, esimerkiksi teoksessa Ausubel, et al. (edellä). Yhdessä esimerkissä reseptoria (tai reseptorin fragmenttia tai analogia) koodaava cDNA kloonataan ilmentämisvektoriin, joka sisältää dihydrofolaattireduktaasi (DHFR) -geenin. Selektio, jolla havaitaan plasmidin ja tästä syystä suuriaffiniteettisen melatoniinireseptoria koodaavan geenin, integroituminen isäntäsolun kromosomiin, suoritetaan lisäämällä solujen elatusaineeseen 0,01 - 300 μM metotreksaattia (teoksessa Ausubel, et al., edellä, kuvatulla tavalla). Tämä dominanttiin ominaisuuteen perustuva selektio voidaan suorittaa useimmissa solutyypeissä. Yhdistelmäproteiinin ilmentämistä voidaan voimistaa käyttämällä transfektoidun geenin monistamista DHFR:n välityksellä. Menetelmiä geenien monistustuotteita sisältävien solulinjojen valitsemiseksi on kuvattu teoksessa Ausubel, et al. (edellä); näihin menetelmiin liittyy tavallisesti se, että soluja kasvatetaan pitkän aikaa elatusaineessa, joka sisältää vähitellen suurentuvia konsentraatioita metotreksaattia. Tähän tarkoitukseen tavallisesti käytettäviä DHFR:ää sisältäviä ilmentämisvektoreita ovat pCVSEII-DHFR ja pAdD26SV(A) (nämä on kuvattu teoksessa Ausubel, et al., edellä). Pysyvästi transfektoituneen solulinjan selektointiin DHFR:n avulla tai geenien monistamiseen DHFR:n välityksellä ovat edullisia isäntäsoluja mitkä tahansa edellä kuvatuista isäntäsoluista tai edullisesti DHFR:n suhteen vaillinainen CHO-solulinja (esimerkiksi CHO DHFR -solut, ATCC-hakunumero CRL 9096).

Yksi erityisen edullinen pysyvä ilmentämisjärjestelmä on CHO-solut (ATCC), jotka on transfektoitu pysyvästi pcDNAI/NEO (InVitrogen, San Diego, CA) -ilmentämisvektorilla.

Yhdistelmävektorin ilmentyminen (esimerkiksi millä tahansa tässä keksinnössä kuvatulla ilmentämisjärjestelmällä aikaansaatu ilmentyminen) voidaan määrittää käyt-

tämällä immunologisia menetelmiä, kuten yhdistelmä-soluuutteiden Western-blottia tai immunosaostusanalyysiä, tai kokonaisten yhdistelmäsolujen immunofluoresenssin avulla (käyttäen esimerkiksi teoksessa Ausubel, et al., edellä) kuvattuja menetelmiä). Yhdistelmä-reseptoriproteiini havaitaan käyttäen reseptoria vastaan suunnattua vasta-ainetta. Seuraavaksi on kuvattu suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin vasta-aineiden valmistamiseen soveltuvia menetelmiä, joissa immunogeeninä on käytetty kokonaista reseptoria tai peptidiä, joka sisältä sopivan suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin epitoopin. Suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorifragmentin tai -analogin ilmentymisen havaitsemiseksi vasta-aine tuotetaan edullisesti käyttäen immunogeeninä tähän fragmenttiin tai analogiin sisältyvää epitooppia.

Suuriaffiniteettinen yhdistelmäreseptoriproteiini (tai tämän fragmentti tai analogi) eristetään ilmentämisen jälkeen esimerkiksi käyttäen immunoaffiniteettikromatografiaa. Yhdessä esimerkissä voidaan suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria vastaan suunnattu vasta-aine kiinnittää kolonniin ja käyttää kokonaisen reseptorin tai reseptorifragmenttien tai analogien eristämiseen. Reseptoreja sisältävät solut voidaan hajottaa ja fraktioida ennen affiniteettikromatografiaa vakiomenetelmin (näitä on tarkasteltu esimerkiksi teoksessa Ausubel, et al., edellä). Kun yhdistelmäproteiini on eristetty, niin se voidaan haluttaessa jatkopuhdistaa esimerkiksi korkean suorituskyvyn nestekromatografialla [tätä on käsitelty esimerkiksi teoksessa Fisher, Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology, eds., Work and Burdon, Elsevier, (1980)].

Tämän keksinnön mukaisia reseptoreja, erityisesti reseptorin lyhyitä fragmentteja, voidaan myös valmistaa kemiallisen synteesin avulla [esimerkiksi käyttämällä menetelmiä, jotka on kuvattu teoksessa Solid Phase Peptide

Synthesis, (1984) 2nd ed., The Pierce Chemical Co., Rockford, IL].

Suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin toiminnan määritykset

Tässä keksinnössä käyttökelpoisia reseptorifragmentteja tai analogeja ovat ne fragmentit tai analogit, jotka osallistuvat vuorovaikutukseen melatoniinin kanssa. Tällainen vuorovaikutus voidaan havaita in vitro -olosuhteissa suoritettavalla toiminnallisella määrityksellä (esimerkiksi tässä keksinnössä kuvatulla cAMP:n akkumuloitumismäärityksellä). Tämän määrityksen komponentteja ovat cAMP:n akkumuloitumisen indusoitumisen aikaansaamiseksi käytettävä forskoliini, melatoniini sekä suuriaffiniteettinen yhdistelmä-melatoniinireseptori (tai tämän sopiva fragmentti tai analogi), joka on konfiguroitu sellaiseksi, että niiden on mahdollista sitoa melatoniinia (esimerkiksi tässä keksinnössä kuvatut polypeptidit). Melatoniini ja forskoliini voidaan hankkia Sigma-yhtiöstä (St. Louis, MO) tai tätä vastaavalta toimittajalta.

Suuriaffiniteettista melatoniinireseptorikomponenttia valmistetaan edullisesti käyttämällä solua, jonka pinnalla ei ole luontaisesti olennaisesti lainkaan reseptoria, esimerkiksi muokkaamalla tällainen solu sopivassa ilmentämisjärjestelmässä sellaiseksi, että se sisältää reseptorikomponenttia koodaavaa nukleiinihappoa. Sopivia soluja ovat esimerkiksi yhdistelmäreseptorin valmistamisen kyseessä ollessa edellä tarkastellut solut, kuten CHO-solut tai COS-7-solut.

Suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin antagonistien ja agonistien seulonta

Kuten edellä tarkasteltiin, sisältää tämän keksinnön yksi kohde sellaisten yhdisteiden seulonnan, joilla on antagonistinen vaikutus melatoniinin ja suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin väliseen vuorovaikutukseen ja jotka tämän vaikutuksesta estävät tai tekevät heikom-

maksi tämän vuorovaikutuksen välityksellä tapahtuvan tapahtumasarjan. Seulonnan elementtejä ovat solunsisäisen cAMP:n akkumuloitumisen aikaansaamiseksi käytettävä forskoliini, melatoniini ja suuriaffiniteettinen yhdistelmäreseptori (tai sopiva reseptorin fragmentti tai analogi, joka on pääpiirteittäin esitetty edellä), ja joka on saatettu sellaiseen muotoon, että sen avulla on mahdollista havaita melatoniinin toiminta. Kuten edellä kuvattiin, voidaan melatoniini ja forskoliini hankkia Sigma-yhtiöstä ja täysimittainen lampaan Mel-1a-reseptori tai Xenopuksen suuriaffiniteettinen melatoniinireseptori tai suuriaffiniteettinen ihmisen melatoniini-1a- tai -1b-reseptori (Xenopuksen, lampaan tai ihmisen reseptorien melatoniinia sitova fragmentti tai analogi) voidaan valmistaa tässä keksinnössä kuvatulla tavalla. Tällainen seulontamääritys suoritetaan edullisesti käyttämällä suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin suhteen pysyvästi transfektoituja solulinjoja. Transfektoitumattoman solulinjan pinnalla ei edullisimmin esiinny mitään reseptoria.

Heterologisen suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin aktivoituminen melatoniinilla tai agonistilla (tätä on käsitelty edellä) johtaa solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemiseen, mistä saadaan käyttökelpoinen keino melatoniinien tai agonistin aktiivisuuden määrittämiseksi. Tällaisen agonistin voidaan olettaa olevan käyttökelpoinen terapeuttinen aine käytettäväksi vuorokausirytmin sairauksiin, kuten aikaerorasitus, päivä/yörytmin häiriöt ihmisellä, tai eläimillä, kuten lampaalla, esiintyviin lisääntymissyklien muutoksiin. Asiaankuuluvia ehdolla olevia agonisteja ovat melatoniinianalogit tai muut aineet, jotka jäljittelevät melatoniinin vaikutusta.

Kun seulontamääritykseen lisätään melatoniinin ohella potentiaalisia antagonisteja, niin tämän avulla on mahdollista seuloa ja tunnistaa reseptorin autenttiset antagonistit sellaisina yhdisteinä, jotka vähentävät mela-

toniinin välityksellä tapahtuvan solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemistä. "Kontrollina", jota vastaan antagonistimääritykset määritetään, käytetään reseptoria sisältäviä soluja, joita on inkuboitu forskoliinin kanssa (cAMP:n konsentraation nostamiseksi kokeen alussa) tai melatoniinin kanssa (yksinään, toisin sanoen inhibiittorin puuttuessa).

Asiaankuuluvia ehdolla olevia antagonisteja ovat suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin fragmentit, erityisesti ne proteiinin fragmentit, joiden ennustetaan olevan solunulkoisia (ks. kuvio 7) ja tästä syystä sitovat todennäköisesti melatoniinia; nämä fragmentit sisältävät edullisesti viisi tai tätä suuremman määrän aminohappoja. Muita ehdolla olevia antagonisteja ovat melatoniinianalogit sekä muut peptidi- ja ei-peptidiyhdisteet ja suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria vastaan suunnatut vasta-aineet.

Vielä yksi tämän keksinnön kohde sisältää sellaisten yhdisteiden seulonnan, jotka vaikuttavat suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin agonisteina; nämä yhdisteet tunnistetaan yhdisteinä, jotka sitovat suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria ja jäljittelevät sitä tapahtumasarjaa, joka tavallisesti tapahtuu tämän vuorovaikutuksen välityksellä. Tämä seulonta vaatii yhdistelmäsoluja, jotka ilmentävät suuriaffiniteettista yhdistelmä-melatoniinireseptoria (tai sopivaa reseptorin fragmenttia tai analogia, sellaisena kuin tämä on esitetty pääpiirteittäin tässä keksinnössä), joka on konfigurioitu sellaiseksi, että sen avulla on mahdollista havaita suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin toiminta. Yhdessä esimerkissä ehdokkaana olevaa agonistia lisätään yhdistelmäreseptoria pysyvästi ilmentäviin CHO-soluihin, ja solunsisäiset cAMP-pitoisuudet määritetään (edellä kuvatulla tavalla). Tässä keksinnössä käyttökelpoinen agonisti on agonisti, joka jäljittelee melatoniinin välityksellä

tapahtuvaa signaalin transduktioreaktiotietä, joka johtaa esimerkiksi solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemiseen.

Sopivia ehdolla olevia agonisteja ovat melatoniinianalogit tai muut kemialliset aineet, jotka kykenevät jäljittelemään melatoniinin vaikutusta.

Yhdistelmä-melatoniini-1a- ja/tai -melatoniini-1b-geenejä sisältävän transgeenisen eläimen valmistus

On olemassa useita keinoja, joilla transgeenisiä eläimiä voidaan valmistaa. Transgeeninen eläin (kuten nisäkäs) voidaan konstruoida yhdellä useista menetelmistä, mukaan lukien ulkopuolisen melatoniinireseptorigeenin liittäminen haluttuun kohtaan eläimen endogeeniseen geeniin tai muilla alan ammattikokemuksen perusteella tunnetuilla menetelmillä.

Transgeeninen nisäkäs, jonka sukusolut ja somaattiset solut sisältävät ulkopuolista melatoniini-1a- tai melatoniini-1b-reseptorigeeniä, valmistetaan tällä alalla tunnetuin menetelmin. Tätä kysymystä on käsitelty esimerkiksi US-patenttijulkaisussa nro 4 736 866, jossa on kuvattu transgeenisen nisäkkään valmistaminen ja joka on liitetty tähän keksintöön siihen oikeuttavien säännösten nojalla. Ulkopuolista melatoniini-1a- tai -1b-reseptorigeeniä koodaava DNA-sekvenssi liitetään tavallisesti eläimeen tai eläimen kantamuotoon alkiovaiheessa (edullisesti yksisoluvaiheessa tai hedelmöitetyssä oosyyttivaiheessa eikä vaihe ole tavallisesti noin 8-soluvaihetta myöhempi vaihe). Tällä alalla on olemassa useita menetelmiä vieraan geenin liittämiseksi eläimen alkioon vieraan geenin pysyvän ilmentymisen aikaansaamiseksi. Yksi menetelmä on transfektoida alkio geenillä siinä muodossa kuin missä se esiintyy luonnossa ja valikoida transgeeniset eläimet, joissa vieras geeni on liittynyt perimään sellaiseen kohtaan, joka tuottaa sen oman ilmentymisen. Muita menetelmiä

ovat vieraan geenin tai sen säätelysekvenssien muokkaaminen ennen sen liittämistä alkioon. Melatoniini-1a- tai -1b-reseptorigeeniä voidaan esimerkiksi modifioida käyttäen voimakkaasti toimivaa, indusoitavissa olevaa tai kudosspesifistä promoottoria.

Transgeenisten nisäkkäiden kudoksista analysoidaan ulkopuolisen melatoniinin-1a- tai -1b-reseptorin esiintyminen joko analysoimalla mRNA suoraan tai määrittämällä kudoksesta ulkopuolinen melatoniini-1a- tai -1b-reseptori.

Transgeenisen nisäkkään käyttö melatoniiniagonistiin tai -antagonistiin liittyvien ilmiöiden määrittämiseksi

Edellä kuvattuja eläimiä voidaan käyttää sen määrittämiseksi, ovatko ehdolla olevat yhdisteet melatoniiniantagonisteja vai -agonisteja Mel-1a- tai Mel-1b-reseptorin kyseessä ollessa.

Melatoniiniagonistien tai -antagonistien määritys in vivo -olosuhteissa

Tämän keksinnön yksi kohde sisältää sen, että yhdisteistä seulotaan esiin ne, joilla on agonistista tai antagonistista vaikutusta melatoniinin aktiivisuuteen in vivo -olosuhteissa. Seulonnan elementit ovat transgeeninen Mel-1a- tai Mel-1b-nisäkäs ja potentiaalinen melatoniiniagonisti tai -antagonisti valmistettuna sopivaan formulaatioon sen antamiseksi nisäkkäälle. Jos fenotyypin (esimerkiksi uni-valverytmin tai lisääntymissyklin) havaitaan muuttuneen halutulla tavalla kontrollina käytettyyn transgeeniseen nisäkkääseen verrattuna, jolle ei ole annettu agonistia tai antagonistia, niin tämä viittaa siihen, että ehdolla oleva yhdiste on mahdollisesti käyttökelpoinen.

Suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria vastaan suunnatut vasta-aineet

Suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria (tai reseptorin immunogeenisiä fragmentteja tai analogeja) voi-

daan käyttää tässä keksinnössä käyttökelpoisten vasta-aineiden muodostamiseen. Kuten edellä kuvattiin, ovat vasta-aineiden valmistamiseen edullisia reseptorifragmentteja ne fragmentit, joiden on päätelty tai osoitettu kokeellisesti olevan solunulkoisia.

Suuriaffiniteettisiamelatoniinireseptoripeptidejä vastaan suunnattuja vasta-aineita valmistetaan seuraavalla tavalla. Peptidejä, jotka vastaavat kokonaisia otaksuttuja solunulkoisia silmukoita tai näiden osaa tai kokonaista N-terminaalista domeenia tai tämän osaa, valmistetaan käyttäen peptidien syntetointilaitetta vakiomenetelmin. Peptidit kytketään KLH:hon (keyhole limpet hemocyanin, reikäkotilon hemosyaniini) käyttäen m-maleimidibentsoehappo-N-hydroksisukkinimidiesteriä. KLH-peptidi yhdistetään Freundin adjuvanttiin ja ruiskutetaan eläimiin, esimerkiksi marsuihin tai vuohiin, polyklonaalisten vasta-aineiden aikaansaamiseksi. Monoklonaalisia vasta-aineita voidaan valmistaa käyttäen edellä kuvattuja suuriaffiniteettisen melatoniinin polypeptidejä ja tavallisia hybridoomamenetelmiä [näitä on käsitelty esimerkiksi julkaisuissa Kohler, et al., Nature 256 (1975) 495; Kohler, et al., Eur. J. Immunol. 6 (1976) 292; Kohler, et al., Eur. J. Immunol. 6 (1976) 511; Hammerling, et al., teoksessa Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, NY, (1981); ja Ausubel, et al., edellä]. Vasta-aineita puhdistetaan peptidiantigeeniaffiniteettikromatografialla.

Vasta-aineista tutkitaan niiden valmistamisen jälkeen Western-blotilla tai immunosaostusanalyysillä (menetelmillä, joita on kuvattu teoksessa Ausubel, et al., edellä) se, että ne tunnistavat spesifisesti suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin.

Vasta-aineiden, jotka tunnistavat spesifisesti suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin, katsotaan olevan todennäköisiä ehdolla olevia vasta-aineita käyttö-

kelpoisina antagonisteina käytettäviksi; näistä ehdokkaista suoritetaan tässä keksinnössä kuvattuja toiminnallisia antagonistimäärityksiä käyttäen jatkotutkimuksia sen suhteen, miten ne kykenevät estämään spesifisesti melatoniinin ja sen reseptorin välistä vuorovaikutusta. Vasta-aineet, jotka toimivat melatoniinin ja suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin ligandien sitomisen tai suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin toiminnan vastavaikuttajina, katsotaan olevan käyttökelpoisia tämän keksinnön mukaisina antagonisteina.

Terapia

Erityisen soveltuvia terapeuttisia aineita ihmisillä esiintyvien vuorokausirytmin häiriöiden hoitoon sekä säätelemään vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvien eläinten lisääntymissyklissä esiintyviä muutoksia ovat edellä kuvatut agonistit ja antagonistit, jotka on formuloitu asiaankuuluvaan puskuriin, kuten fysiologiseen suolaliuokseen. Silloin kun on erityisen haluttua jäljitellä reseptorifragmentin konformaatiota membraanin ja ulkopuolisen ympäristön rajapinnassa, niin fragmentti voi sisältää riittävän määrän sen vieressä olevia transmembraanialueen ryhmiä. Tässä tapauksessa fragmentti voi olla sopivan lipidifraktion yhteydessä (esimerkiksi lipidivesikkeleissä tai liitettynä fragmentteihin, jotka on aikaansaatu hajottamalla solumembraania). Vaihtoehtoisesti voidaan terapeuttisena aineena käyttää suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria vastaan suunnattuja vasta-aineita, joita on valmistettu edellä kuvatulla tavalla. Tässäkin tapauksessa vasta-aineita annettaisiin farmaseuttisesti hyväksyttävässä puskurissa (esimerkiksi fysiologisessa suolaliuoksessa). Vasta-ainevalmiste voidaan yhdistää sopivaan adjuvanttiin, mikäli tällaisen käyttö on asiaankuuluvaa.

Terapeuttista valmistetta annetaan hoidettavan sairauden mukaisesti. Tavallisesti sitä annetaan suonensisäisesti sellaisena annoksena ja niin pitkän ajan ku-

luessa sekä sellaista ajoitusta käyttäen, että haluttu vaste saadaan aikaan. Asiaankuuluva ajoitus tarkoittaa luonnollisen vuorokausirytmin ajankohtaa, jona terapeuttisen valmisteen antaminen saa aikaan halutun vasteen. Vaihtoehtoisesti voi olla käyttökelpoista annostella terapeuttista ainetta oraalisesti, nenän kautta tai paikallisesti, esimerkiksi nesteenä tai sumutteena. Tässäkin tapauksessa annokset ovat edellä kuvattua tyyppiä olevia annoksia. Hoito voidaan uusia tarpeen mukaan sairauden oireiden lievittämiseksi.

Suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin agonisteja voidaan käyttää ihmisten endogeenisen melatoniinirytmin säätämiseen ennalleen; lievittämään aikaerorasituksen oireita ihmisillä, saamaan aikaan vaiheen siirtymisen uni-valverytmissä joillakin sokeilla ihmisillä, tehostamaan endogeenisten melatoniinirytmin palautumista ennalleen käyttäen pienivoimakkuuksista valo/pimeäsykliä; ovulaation säätelyyn ihmisillä; ja muuttamaan lisääntymissyklejä vuodenaikojen vaihtelun mukaan lisääntyvillä eläimillä. Antagonistit voivat olla käyttökelpoisoa murrosiän alkamisen tai ajoituksen säätelyyn ihmisillä.

Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan käyttää terapeuttisten reseptorin agonistien ja antagonistien seulontaan, jossa edellä kuvattuja määrityksiä käyttämällä selvitetään näiden tehokkuus solunsisäisen cAMP:n muodostumisen vähentämisessä in vitro -olosuhteissa; vuorokausirytmin muuttamisessa; tai lisääntymissyklien muuttamisessa. Hoidettaessa nisäkästä, joka ei kuulu ihmislajiin, tai seulottaessa terapeuttista ainetta, joka on tarkoitettu käytettäväksi eläimelle, joka ei kuulu ihmislajiin, on käytetty suuriaffiniteettinen melatoniinireseptori tai -reseptorifragmentti tai -analogi tai vasta-aine tälle lajille spesifinen.

Muut sovellutusmuodot

Tämän keksinnön mukaisiin polypeptideihin kuuluvat mitkä tahansa suuriaffiniteettiset melatoniinireseptorit (sellaisina kuin ne on kuvattu tässä keksinnössä). Tällaiset reseptorit voivat olla peräisin mistä tahansa materiaalilähteestä, mutta ne ovat edullisesti peräisin selkärankaisesta eläimestä, esimerkiksi ihmisestä, lampaasta tai sammakosta. Näitä polypeptidejä käytetään esimerkiksi sellaisten antagonistien seulontaan, jotka estävät melatoniinin vaikutuksen, tai sellaisten agonistien seulontaan, jotka jäljittelevät melatoniinin ja reseptorin välistä vuorovaikutusta (tätä kysymystä on käsitelty edellä).

Tämän keksinnön mukaisia polypeptidejä ovat myös mikä tahansa suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin analogi tai fragmentti, joka kykenee olemaan vuorovaikutuksessa melatoniinin kanssa (esimerkiksi ne polypeptidit, jotka ovat peräisin suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin solunulkoisista domeeneista). Näitä analogeja ja fragmentteja voidaan myös käyttää suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin antagonistien tai agonistien seulontaan. Lisäksi sitä reseptorifragmenttien tai analogien alaryhmää, jotka sitovat melatoniinia ja ovat edullisesti liukoisia (tai liukenemattomia ja formuloitu lipidivesikkeliin), voidaan käyttää antagonisteina pienentämään endogeenisen melatoniinisyklin amplitudia, millä mahdollisesti kyetään saamaan aikaan murrosiän alkaminen ihmisillä. Reseptorin analogin tai fragmentin tehokkuus on riippuvainen sen kyvystä osallistua vuorovaikutukseen melatoniinin kanssa; tällainen vuorovaikutus voidaan vaikeuksitta määrittää käyttäen suuriaffiniteettisesta melatoniinireseptorista tehtäviä toiminnallisia määrityksiä (esimerkiksi tässä keksinnössä kuvattuja määrityksiä).

Haluttuja spesifisiä reseptorianalogeja ovat täysimittaiset tai osittaiset reseptoriproteiinit, mukaan

lukien aminohapposekvenssi, joka poikkeaa ainoastaan konservatiivisten aminohapposubstituutioiden perusteella, esimerkiksi samaan ryhmään kuuluvan yhden aminohapon korvaaminen toisella samaan ryhmän aminohapolla, esimeriksi glysiinin valiinilla, lysiinin arginiinilla ja niin edelleen) tai yhden tai useamman ei-konservatiivisen aminohapposubstituution perusteella, deleetion perusteella tai insertion perusteella, jotka sijaitsevat sellaisissa aminohapposekvenssin asemissa, joiden vaikutuksesta reseptori ei menetä kykyään signaalin muodostamiseen melatoniinin välityksellä tapahtuvan solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemiselle (esimerkiksi määritettynä edellä kuvatulla tavalla).

Spesifisiä haluttuja reseptorifragmentteja ovat mikä tahansa suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin osa, joka kykenee olemaan vuorovaikutuksessa melatoniinin kanssa, esimerkiksi solunulkoiset domeenit kokonaisuudessaan tai osittain (nämä on kuvattu edellä). Tällaiset fragmentit voivat olla käyttökelpoisia antagonisteina (edellä kuvatulla tavalla) ja ne ovat myös käyttökelpoisia immunogeeneinä sellaisten vasta-aineiden muodostamiseksi, jotka neutraloivat suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin aktiivisuutta in vivo -olosuhteissa (esimerkiksi estämällä reseptorin ja melatoniinin välisen vuorovaikutuksen; tätä on käsitelty tuonnempana).

Uusien suuriaffiniteettisten melatoniinireseptorien solunulkoiset alueet voidaan tunnistaa vertaamalla niitä vastaaviin proteiineihin, joiden rakenne on samanlainen (esimerkiksi muihin G-proteiineihin kytkettyjen reseptorien yläryhmän jäsenten kanssa); käyttökelpoisia alueita ovat alueet, joissa esiintyy homologiaa tämän ryhmän hyvin luonnehdittujen jäsenten solunulkoisten domeenien kanssa.

Solunulkoisen domeenin alueet voidaan vaihtoehtoisesti päätellä puolikokeellisesti primäärisen amino-

happosekvenssin perusteella, sekundaarisen proteiinirakenteen perusteella käyttäen hydrofobisuus/hydrofiilisyyslaskutoimituksia, kuten Choun ja Fasmanin menetelmää [tätä on käsitelty esimerkiksi julkaisussa Chou ja Fasman, Ann. Rev. Biochem. 47 (1978) 251]. Hydrofiiliset domeenit, erityisesti hydrofobisten yhtäjaksoisten alueiden ympäröimät domeenit (esimerkiksi transmembraanidomeenit), soveltuvat vahvoiksi ehdokkaiksi solunulkoisina domeeneina käytettäväksi. Lopuksi solunulkoiset domeenit voidaan tunnistaa kokeellisesti käyttäen tavallisia entsymaattisia pilkkomiseen perustuvia analyyseja, esimerkiksi analyysia, jossa pilkkomiseen käytetään trypsiiniä.

Ehdolla olevista fragmenteista (esimerkiksi solunulkoisesta fragmentista) tutkitaan sen osallistuminen vuorovaikutukseen melatoniinin kanssa käyttämällä tässä keksinnössä kuvattuja määrityksiä (esimerkiksi edellä kuvattua määritystä). Tällaisista fragmenteista tutkitaan myös niiden kyky toimia melatoniinin ja sen endogeenisen reseptorin välisen vuorovaikutuksen antagonistina käyttäen tässä keksinnössä kuvattuja määrityksiä. Käyttökelpoisten reseptorifragmenttien analogeja (sellaisena kun ne on kuvattu edellä) voidaan myös valmistaa ja niistä voidaan tutkia tehokkuus seulonnassa käytettävinä komponentteina tai antagonisteina (käyttäen tässä keksinnössä kuvattuja määrityksiä); näiden analogien katsotaan myös olevan käyttökelpoisia tässä keksinnössä.

Muut sovellutusmuodot sisältyvät patenttivaatimuksiin.

Patenttivaatimukset

1. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se koodaa suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA, t u n n e t t u siitä, että mainittu DNA on perimän DNA.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA, t u n n e t t u siitä, että mainittu DNA on cDNA.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen DNA, t u n n e t t u siitä, että mainittu DNA on nisäkkään DNA:ta.

5. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että sen sekvenssi on kuvion 1 mukainen sekvenssi (sekvenssi nro 1) tai jokin tämän degeneratiivisista varianteista ja siitä, että se koodaa kuvion 1 mukaista aminohapposekvenssiä (sekvenssiä nro 2).

6. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että sen sekvenssi on kuvion 2 mukainen DNA-sekvenssi (sekvenssi nro 3) tai jokin tämän degeneratiivisista varianteista ja siitä, että se koodaa kuvion 2 mukaista aminohapposekvenssiä (sekvenssiä nro 4).

7. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuvion 4 mukaisen DNA-sekvenssin (sekvenssin nro 5) tai jonkin tämän degeneratiivisista varianteista ja siitä, että se koodaa aminohapposekvenssiä, joka sisältää kuvion 4 mukaisen aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 6).

8. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuvion 5 mukaisen DNA-sekvenssin (sekvenssin nro 11) tai jonkin tämän degeneratiivisista varianteista ja siitä, että se koodaa aminohapposekvenssiä, joka sisältää kuvion 5 mukaisen aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 12).

9. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuvion 3 mukaisen DNA-sekvenssin (sekvenssin nro 13), tai jonkin tämän degeneratiivisista varianteista ja siitä, että se koodaa aminohapposekvenssiä, joka sisältää

kuvion 3 mukaisen aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 14).

10. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuvion 6 mukaisen DNA-sekvenssin (sekvenssin nro 15) tai jonkin tämän degeneratiivisista varianteista ja siitä, että se koodaa aminohapposekvenssiä, joka sisältää kuvion 6 mukaisen aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 16).

11. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se on sekvenssiltään 50-%:isesti tai tätä enemmän identtinen kuvion 2 mukaisen DNA-sekvenssin (sekvenssin nro 3) suhteen ja siitä, että se koodaa proteiinia, joka kykenee sitomaan melatoniinia.

12. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu kuvion 1 mukaiseen DNA-sekvenssiin (sekvenssiin nro 1) voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa.

13. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu kuvion 2 mukaiseen DNA-sekvenssiin (sekvenssiin nro 3) voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa.

14. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu kuvion 4 mukaiseen DNA-sekvenssiin (sekvenssiin nro 5) voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa.

15. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu kuvion 5 mukaiseen DNA-sekvenssiin (sekvenssiin nro 11) voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa.

16. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu kuvion 3 mukaiseen DNA-sekvenssiin (sekvenssiin nro 13) voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa.

17. Eristetty DNA, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu kuvion 6 mukaiseen DNA-sekvenssiin (sekvenssiin nro 15) voimakkaasti rajoittavissa olosuhteissa.

18. Huomattavan puhdas suuriaffiniteettinen melatoniinireseptoriproteiini.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen reseptoriproteiini, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposek-

venssi on huomattavassa määrin identtinen kuviossa 1 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 2) suhteen.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen reseptoriproteiini, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposekvenssi on huomattavassa määrin identtinen kuviossa 2 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 4) suhteen.

21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen reseptoriproteiini, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuvion 4 mukaisen aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 6).

22. Patenttivaatimuksen 18 mukainen reseptoriproteiini, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposekvenssi on huomattavassa määrin identtinen kuviossa 5 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 12) suhteen.

23. Patenttivaatimuksen 18 mukainen reseptoriproteiini, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposekvenssi on huomattavassa määrin identtinen kuviossa 3 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 14) suhteen.

24. Patenttivaatimuksen 18 mukainen reseptoriproteiini, t u n n e t t u siitä, että sen aminohapposekvenssi on huomattavassa määrin identtinen kuviossa 6 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 16) suhteen.

25. Huomattavan puhdas polypeptidi, joka sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen kuviossa 1 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 2) suhteen, t u n n e t t u siitä, että

a) mainittu polypeptidi sitoo melatoniinia; ja

b) cAMP:n solunsisäinen konsentraatio mainittua polypeptidiä pinnallaan ilmentävässä solussa pienenee mainitun polypeptidin välityksellä.

26. Huomattavan puhdas polypeptidi, joka sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen kuviossa 2 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 4) suhteen, t u n n e t t u siitä, että

a) mainittu polypeptidi sitoo melatoniinia; ja

b) cAMP:n solunsisäinen konsentraatio mainittua polypeptidiä pinnallaan ilmentävässä solussa pienenee mainitun polypeptidin välityksellä.

27. Huomattavan puhdas polypeptidi, joka sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen kuviossa 5 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 12) suhteen, t u n n e t t u siitä, että

a) mainittu polypeptidi sitoo melatoniinia; ja

b) cAMP:n solunsisäinen konsentraatio mainittua polypeptidiä pinnallaan ilmentävässä solussa pienenee mainitun polypeptidin välityksellä.

28. Huomattavan puhdas polypeptidi, joka sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen kuviossa 3 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 14) suhteen, t u n n e t t u siitä, että

a) mainittu polypeptidi sitoo melatoniinia; ja

b) cAMP:n solunsisäinen konsentraatio mainittua polypeptidiä pinnallaan ilmentävässä solussa pienenee mainitun polypeptidin välityksellä.

29. Huomattavan puhdas polypeptidi, joka sisältää aminohapposekvenssin, joka on vähintään 80-%:isesti identtinen kuviossa 6 esitetyn aminohapposekvenssin (sekvenssin nro 16) suhteen, t u n n e t t u siitä, että

a) mainittu polypeptidi sitoo melatoniinia; ja

b) cAMP:n solunsisäinen konsentraatio mainittua polypeptidiä pinnallaan ilmentävässä solussa pienenee mainitun polypeptidin välityksellä.

30. Huomattavan puhdas polypeptidi, joka on suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin fragmentti tai analogi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää domeenin, joka kykenee sitomaan melatoniinia ja jonka välityksellä solunsisäinen cAMP-konsentraatio saadaan pienentymään.

31. Patenttivaatimuksen 1 mukaista DNA:ta sisältävä vektori.

32. Patenttivaatimuksen 1 mukaista DNA:ta sisältävä solu.

33. Menetelmä, jolla ehdokkaana olevasta yhdisteestä tutkitaan sen kyky toimia suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin ligandin agonistina, t u n n e t t u siitä, että mainittu menetelmä käsittää sen, että:

a) saatetaan ehdokkaana oleva yhdiste kosketukseen sellaisen solun kanssa, joka ilmentää pinnallaan suuriaffiniteettista yhdistelmä-melatoniinireseptoriproteiinia tai tämän melatoniinia sitovaa fragmenttia tai analogia;

b) määritetään mainitun solun solunsisäinen cAMP-konsentraatio; ja

c) tunnistetaan mainittu ehdokkaana oleva yhdiste agonistiksi silloin, kun mainittu kosketukseen saattaminen saa aikaan solunsisäisen cAMP-konsentraation pienenemisen.

34. Menetelmä, jolla ehdokkaana olevasta yhdisteestä tutkitaan sen kyky toimia suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin ligandin antagonistina, t u n n e t t u siitä, että mainittu menetelmä käsittää sen, että:

a) saatetaan ehdokkaana oleva yhdiste kosketukseen sellaisen solun kanssa, joka ilmentää pinnallaan suuriaffiniteettista yhdistelmä-melatoniinireseptoriproteiinia tai tämän melatoniinia sitovaa fragmenttia tai analogia;

b) määritetään sitoutuminen mainitun reseptoriproteiinin ja melatoniinin kesken; ja

c) tunnistetaan mainittu ehdokkaana oleva yhdiste antagonistiksi silloin, kun mainittu kosketukseen saattaminen saa aikaan mainitun suuriaffiniteettisen yhdistelmä-melatoniinireseptoriproteiinin ja melatoniinin välisen sitoutumisen vähentymisen.

35. Patenttivaatimuksen 33 tai 34 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainittu solu on nisä-

kässolu, jonka pinnalla ei normaalisti esiinny olennaisesti lainkaan suuriaffiniteettista melatoniinireseptoria.

36. Terapeuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se sisältää aktiivisena ainesosana suuriaffiniteettisen melatoniinireseptorin agonistia ja siitä, että mainittu aktiivinen ainesosa on formuloitu fysiologisesti hyväksyttävään kantaja-aineeseen.

Fig. 1

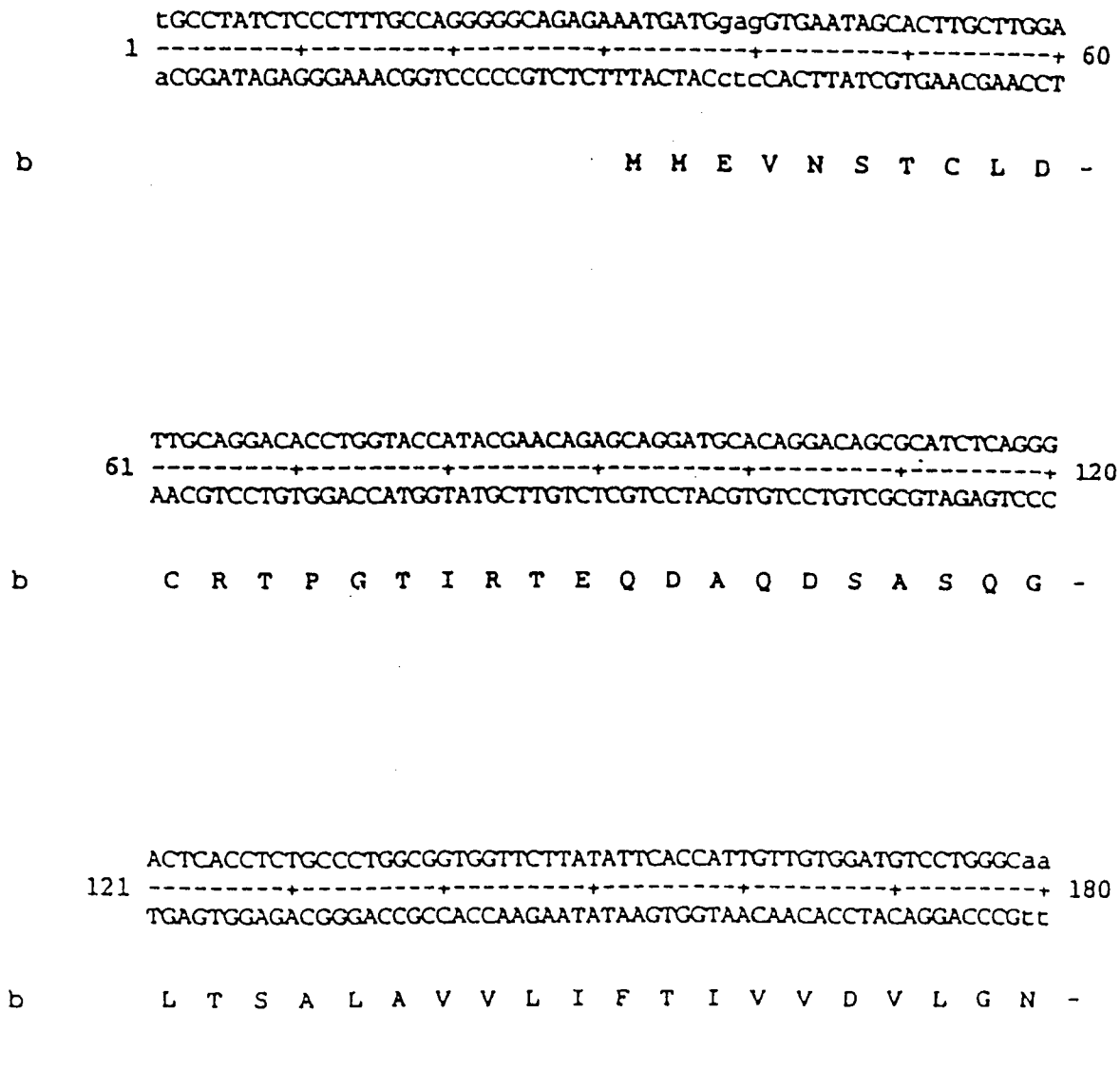

tGCCTATCTCCCTTTGCCAGGGGGCAGAGAAATGATGgagGTGAATAGCACTTGCTTGGA
1
60
aCGGATAGAGGGAAACGGTCCCCCGTCTCTTTACTACctcCACTTATCGTGAACGAACCT
b
M M E V N S T C L D -
TTGCAGGACACCTGGTACCATACGAACAGAGCAGGATGCACAGGACAGCGCATCTCAGGG
61
120
AACGTCCTGTGGACCATGGTATGCTTGTCTCGTCCTACGTGTCCTGTCGCGTAGAGTCCC
b
C R T P G T I R T E Q D A Q D S A S Q G -
ACTCACCTCTGCCCTGGCGGTGGTTCTTATATTCACCATTGTTGTGGATGTCCTGGGCaa
121
180
TGAGTGGAGACGGGACCGCCACCAAGAATATAAGTGGTAACAACACCTACAGGACCCGtt
b
L T S A L A V V L I F T I V V D V L G N -

Fig. 1
(jatkoa)

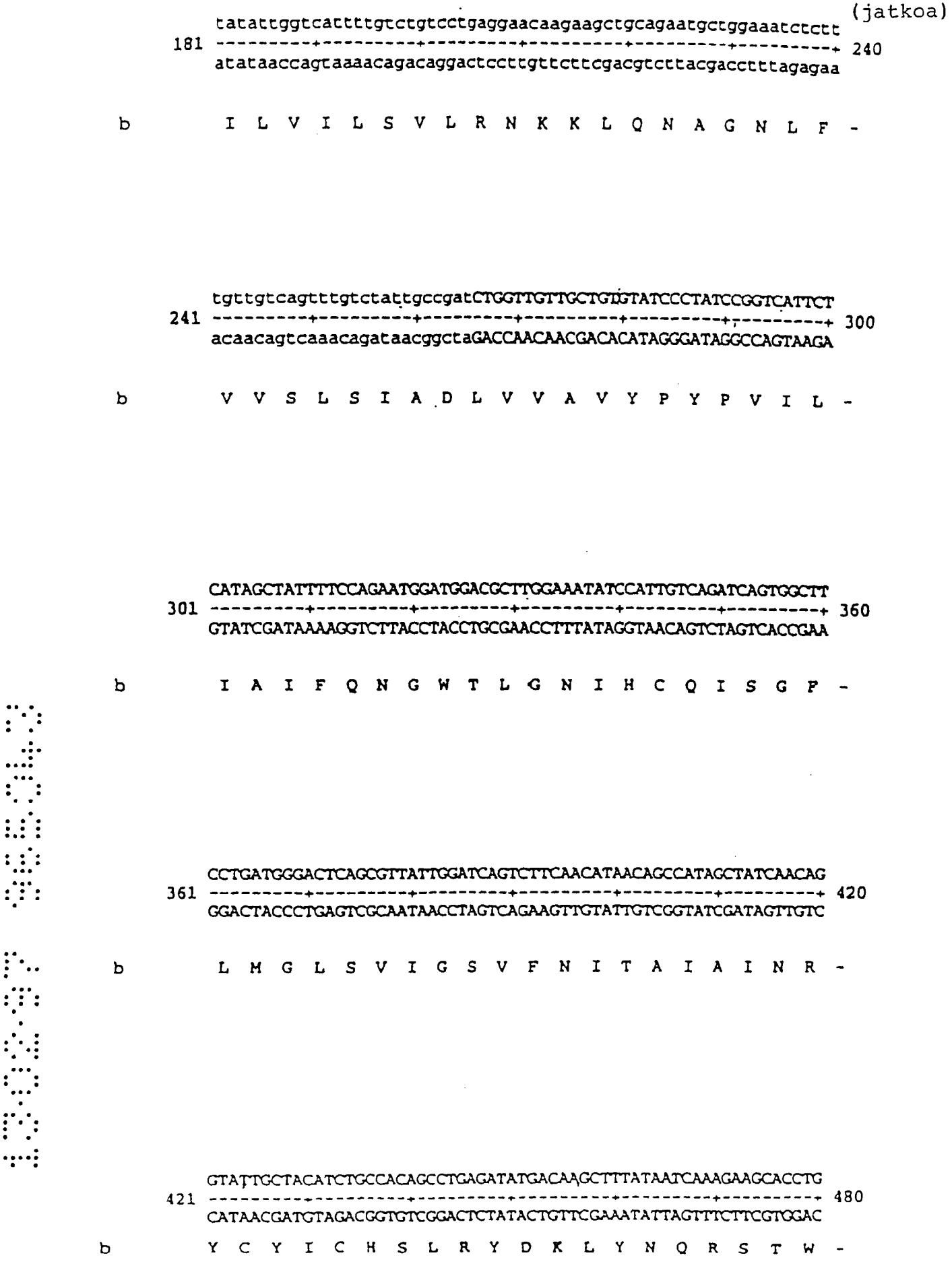

tatattggtcattttgtctgtcctgaggaacaagaagctgcagaatgctggaaatctctt
181
240
atataaccagtaaaacagacaggactccttgttcttcgacgtcttacgacctttagagaa
b I L V I L S V L R N K K L Q N A G N L F -
tgttgtcagtttgtctattgccgatCTGGTTGTTGCTGTGTATCCCTATCCGGTCATTCT
241
300
acaacagtcaaacagataacggctaGACCAACAACGACACATAGGGATAGGCCAGTAAGA
b V V S L S I A D L V V A V Y P Y P V I L -
CATAGCTATTTTCCAGAATGGATGGACGCTTGGAAATATCCATTGTCAGATCAGTGGCTT
301
360
GTATCGATAAAAGGTCTTACCTACCTGCGAACCTTTATAGGTAACAGTCTAGTCACCGAA
b I A I F Q N G W T L G N I H C Q I S G F -
CCTGATGGGACTCAGCGTTATTGGATCAGTCTTCAACATAACAGCCATAGCTATCAACAG
361
420
GGACTACCCTGAGTCGCAATAACCTAGTCAGAAGTTGTATTGTCGGTATCGATAGTTGTC
b L M G L S V I G S V F N I T A I A I N R -
GTATTGCTACATCTGCCACAGCCTGAGATATGACAAGCTTTATAATCAAAGAAGCACCTG
421
480
CATAACGATGTAGACGGTGTCGGACTCTATACTGTTCGAAATATTAGTTTCTTCGTGGAC
b Y C Y I C H S L R Y D K L Y N Q R S T W -

Fig. 1 (jatkoa)

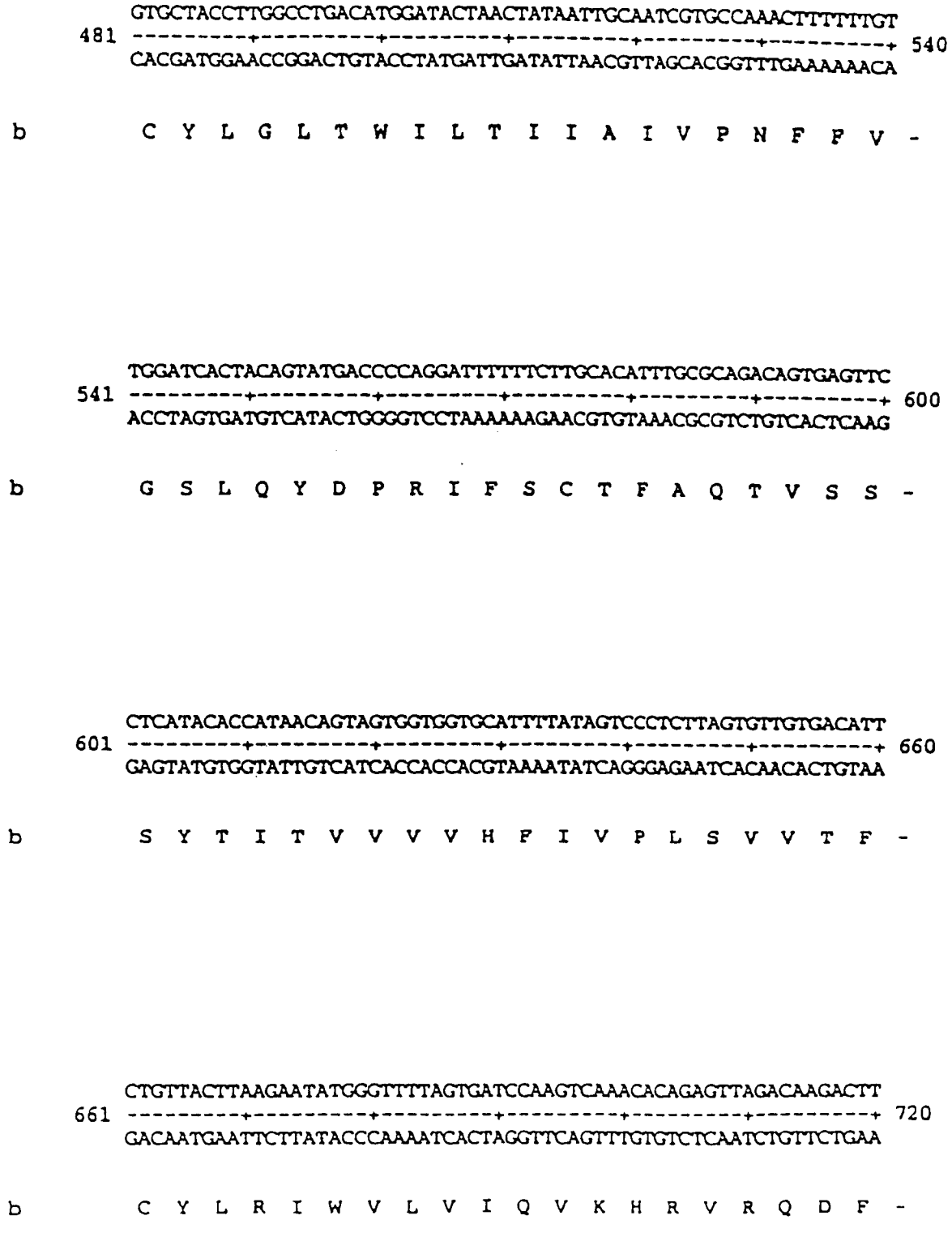

GTGCTACCTTGGCCTGACATGGATACTAACTATAATTGCAATCGTGCCAAACTTTTTTGT
481
540
CACGATGGAACCGGACTGTACCTATGATTGATATTAACGTTAGCACGGTTTGAAAAAACA
b C Y L G L T W I L T I I A I V P N F F V -
TGGATCACTACAGTATGACCCCAGGATTTTTTCTTGCACATTTGCGCAGACAGTGAGTTC
541
600
ACCTAGTGATGTCATACTGGGGTCCTAAAAAAGAACGTGTAAACGCGTCTGTCACTCAAG
b G S L Q Y D P R I F S C T F A Q T V S S -
CTCATACACCATAACAGTAGTGGTGGTGCATTTTATAGTCCCTCTTAGTGTTGTGACATT
601
660
GAGTATGTGGTATTGTCATCACCACCACGTAAAATATCAGGGAGAATCACAACACTGTAA
b S Y T I T V V V V H F I V P L S V V T F -
CTGTTACTTAAGAATATGGGTTTTAGTGATCCAAGTCAAACACAGAGTTAGACAAGACTT
661
720
GACAATGAATTCTTATACCCAAAATCACTAGGTTCAGTTTGTGTCTCAATCTGTTCTGAA
b C Y L R I W V L V I Q V K H R V R Q D F -

Fig. 1 (jatkoa)

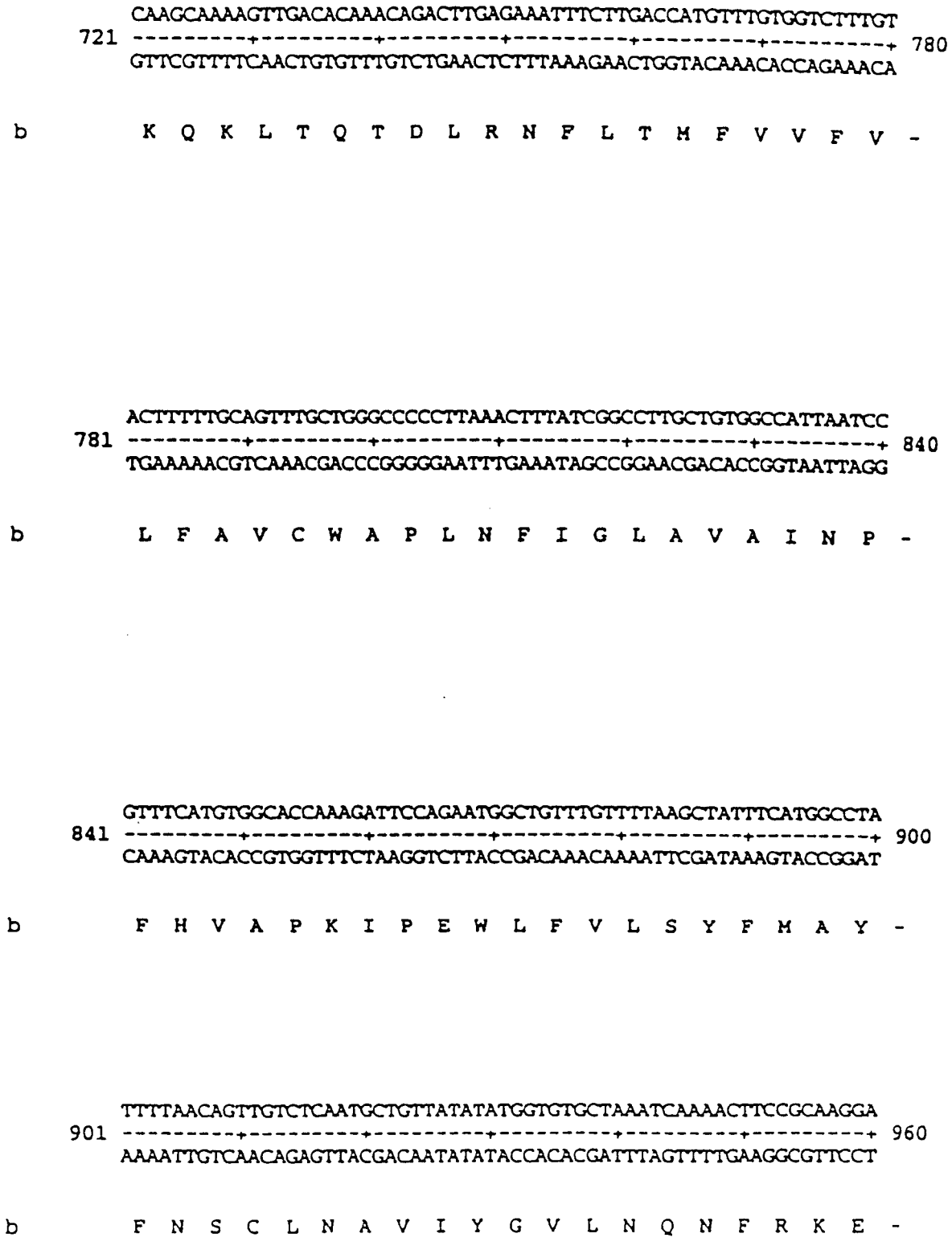

CAAGCAAAAGTTGACACAAACAGACTTGAGAAATTTCTTGACCATGTTTGTGGTCTTTGT
721
780
GTTCGTTTTCAACTGTGTTTGTCTGAACTCTTTAAAGAACTGGTACAAACACCAGAAACA
b
K Q K L T Q T D L R N F L T M F V V F V -
ACTTTTTGCAGTTTGCTGGGCCCCCTTAAACTTTATCGGCCTTGCTGTGGCCATTAATCC
781
840
TGAAAAACGTCAAACGACCCGGGGGAATTTGAAATAGCCGGAACGACACCGGTAATTAGG
b
L F A V C W A P L N F I G L A V A I N P -
GTTTCATGTGGCACCAAAGATTCCAGAATGGCTGTTTGTTTTAAGCTATTTCATGGCCTA
841
900
CAAAGTACACCGTGGTTTCTAAGGTCTTACCGACAAACAAAATTCGATAAAGTACCGGAT
b
F H V A P K I P E W L F V L S Y F M A Y -
TTTTAACAGTTGTCTCAATGCTGTTATATATGGTGTGCTAAATCAAAACTTCCGCAAGGA
901
960
AAAATTGTCAACAGAGTTACGACAATATATACCACACGATTTAGTTTTGAAGGCGTTCCT
b
F N S C L N A V I Y G V L N Q N F R K E -

Fig. 1 (jatkoa)

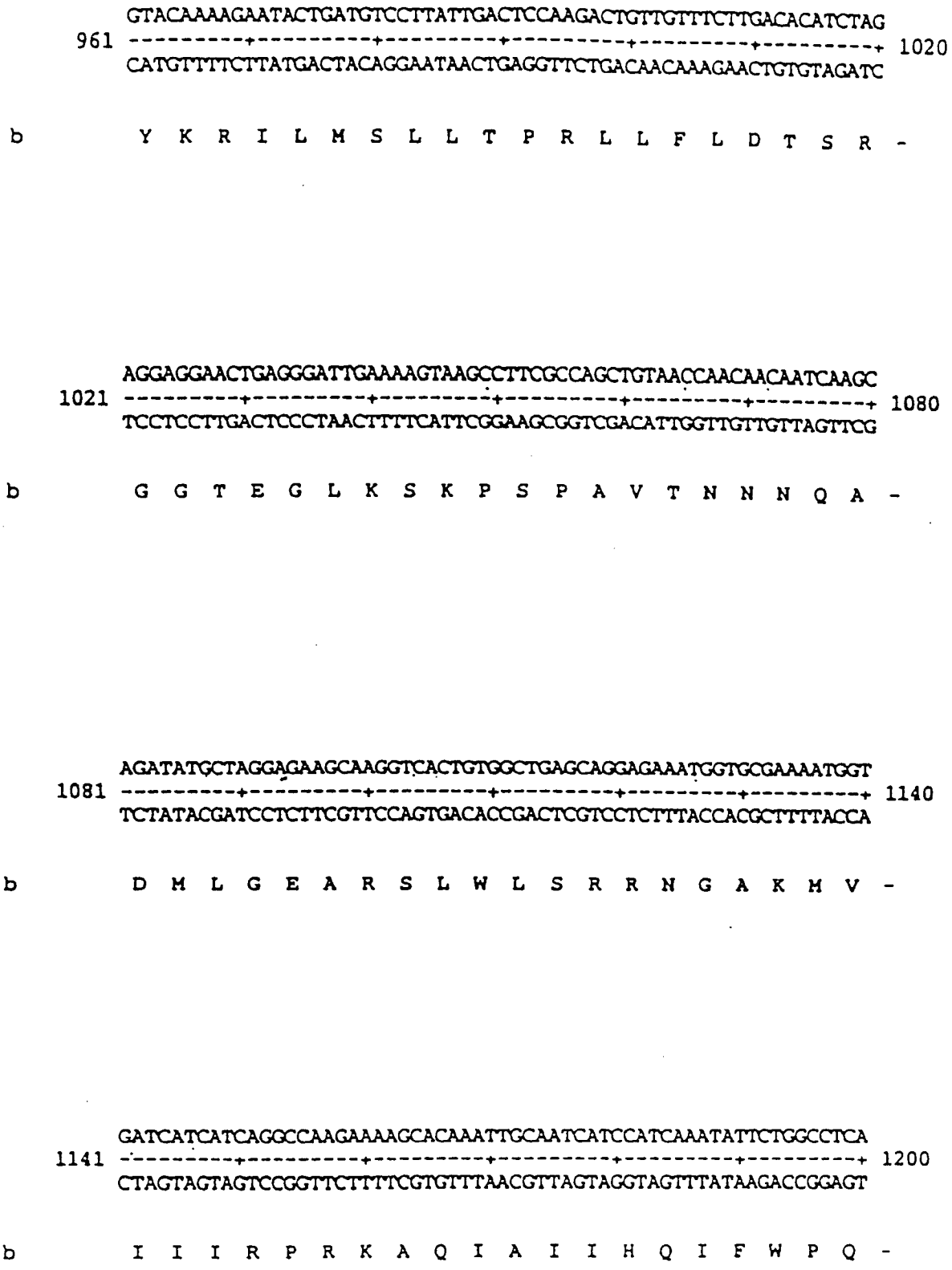

GTACAAAAGAATACTGATGTCCTTATTGACTCCAAGACTGTTGTTTCTTGACACATCTAG
961
1020
CATGTTTTCTTATGACTACAGGAATAACTGAGGTTCTGACAACAAAGAACTGTGTAGATC
b Y K R I L M S L L T P R L L F L D T S R -
AGGAGGAACTGAGGGATTGAAAAGTAAGCCTTCGCCAGCTGTAACCAACAACAATCAAGC
1021
1080
TCCTCCTTGACTCCCTAACTTTTCATTCGGAAGCGGTCGACATTGGTTGTTGTTAGTTCG
b G G T E G L K S K P S P A V T N N N Q A -
AGATATGCTAGGAGAAGCAAGGTCACTGTGGCTGAGCAGGAGAAATGGTGCGAAAATGGT
1081
1140
TCTATACGATCCTCTTCGTTCCAGTGACACCGACTCGTCCTCTTTACCACGCTTTTACCA
b D M L G E A R S L W L S R R N G A K M V -
GATCATCATCAGGCCAAGAAAAGCACAAATTGCAATCATCCATCAAATATTCTGGCCTCA
1141
1200
CTAGTAGTAGTCCGGTTCTTTTCGTGTTTAACGTTAGTAGGTAGTTTATAAGACCGGAGT
b I I I R P R K A Q I A I I H Q I F W P Q -

Fig. 1 (jatkoa)

```
      GAGTTCATGGGCAACATGCCGTCAAGACACAAAGATTACCGGAGAAGAAGATGGCTGCCG
1201  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1260
      CTCAAGTACCCGTTGTACGGCAGTTCTGTGTTTCTAATGGCCTCTTCTTCTACCGACGGC

b          S  S  W  A  T  C  R  Q  D  T  K  I  T  G  E  E  D  G  C  R  -

      TGAACTGTGCAAGGACGGGATTTCCCAAAGGTGAGACCCAATGCACTATATCCACATTAT
1261  ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1320
      ACTTGACACGTTCCTGCCCTAAAGGGTTTCCACTCTGGGTTACGTGATATAGGTGTAATA

b          E  L  C  K  D  G  I  S  Q  R  *
```

Sekvenssi nro 2

Fig. 2

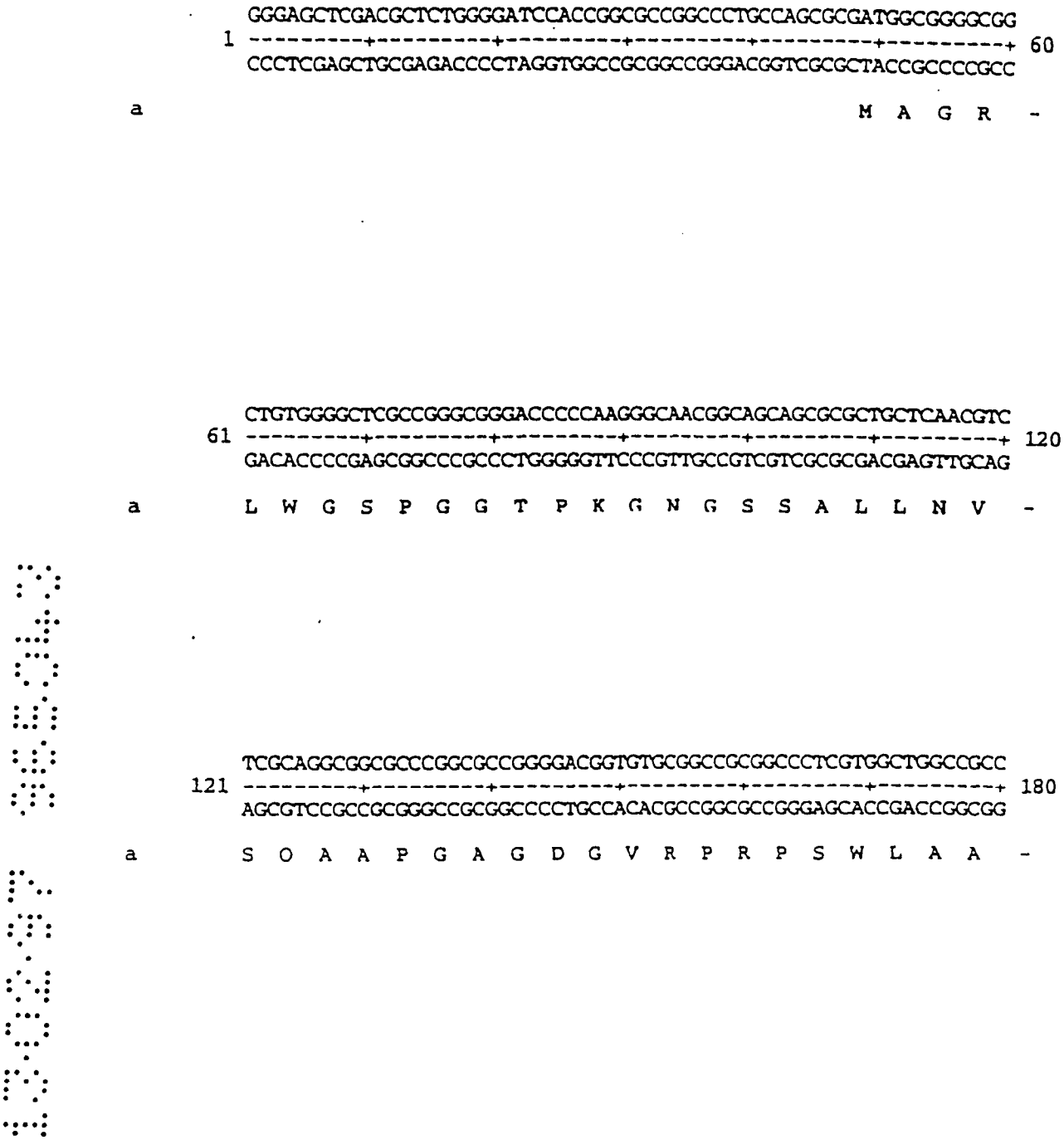

GGGAGCTCGACGCTCTGGGGATCCACCGGCGCCGGCCCTGCCAGCGCGATGGCGGGGCGG
1
60
CCCTCGAGCTGCGAGACCCCTAGGTGGCCGCGGCCGGGACGGTCGCGCTACCGCCCCGCC
a
M A G R -
CTGTGGGGCTCGCCGGGCGGGACCCCCAAGGGCAACGGCAGCAGCGCGCTGCTCAACGTC
61
120
GACACCCCGAGCGGCCCGCCCTGGGGGTTCCCGTTGCCGTCGTCGCGCGACGAGTTGCAG
a
L W G S P G G T P K G N G S S A L L N V -
TCGCAGGCGGCGCCCGGCGCCGGGGACGGTGTGCGGCCGCGGCCCTCGTGGCTGGCCGCC
121
180
AGCGTCCGCCGCGGGCCGCGGCCCCTGCCACACGCCGGCGCCGGGAGCACCGACCGGCGG
a
S O A A P G A G D G V R P R P S W L A A -

Fig. 2 (jatkoa)

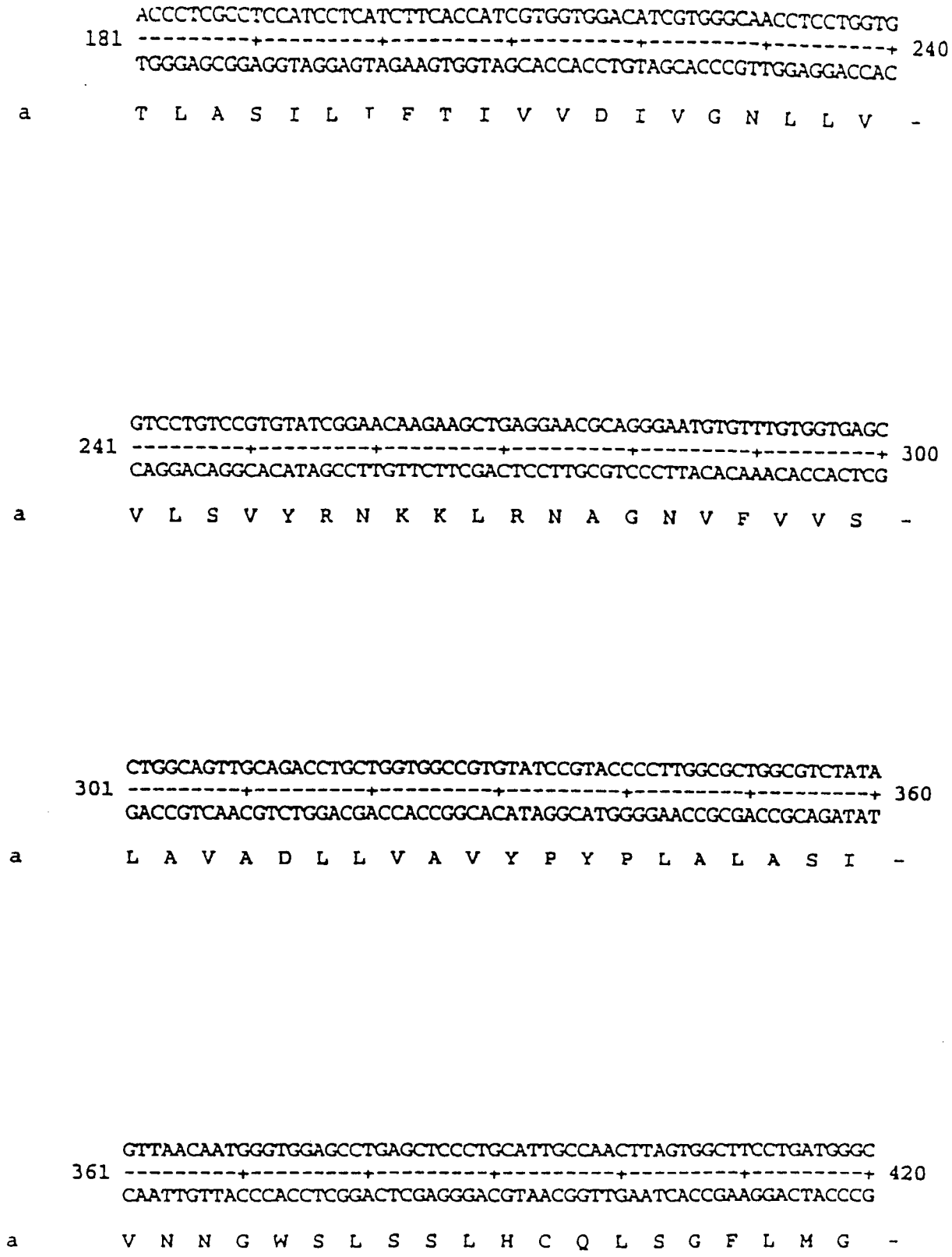

ACCCTCGCCTCCATCCTCATCTTCACCATCGTGGTGGACATCGTGGGCAACCTCCTGGTG
181
240
TGGGAGCGGAGGTAGGAGTAGAAGTGGTAGCACCACCTGTAGCACCCGTTGGAGGACCAC
a T L A S I L F T I V V D I V G N L L V -
GTCCTGTCCGTGTATCGGAACAAGAAGCTGAGGAACGCAGGGAATGTGTTTGTGGTGAGC
241
300
CAGGACAGGCACATAGCCTTGTTCTTCGACTCCTTGCGTCCCTTACACAAACACCACTCG
a V L S V Y R N K K L R N A G N V F V V S -
CTGGCAGTTGCAGACCTGCTGGTGGCCGTGTATCCGTACCCCTTGGCGCTGGCGTCTATA
301
360
GACCGTCAACGTCTGGACGACCACCGGCACATAGGCATGGGGAACCGCGACCGCAGATAT
a L A V A D L L V A V Y P Y P L A L A S I -
GTTAACAATGGGTGGAGCCTGAGCTCCCTGCATTGCCAACTTAGTGGCTTCCTGATGGGC
361
420
CAATTGTTACCCACCTCGGACTCGAGGGACGTAACGGTTGAATCACCGAAGGACTACCCG
a V N N G W S L S S L H C Q L S G F L M G -

Fig. 2 (jatkoa)

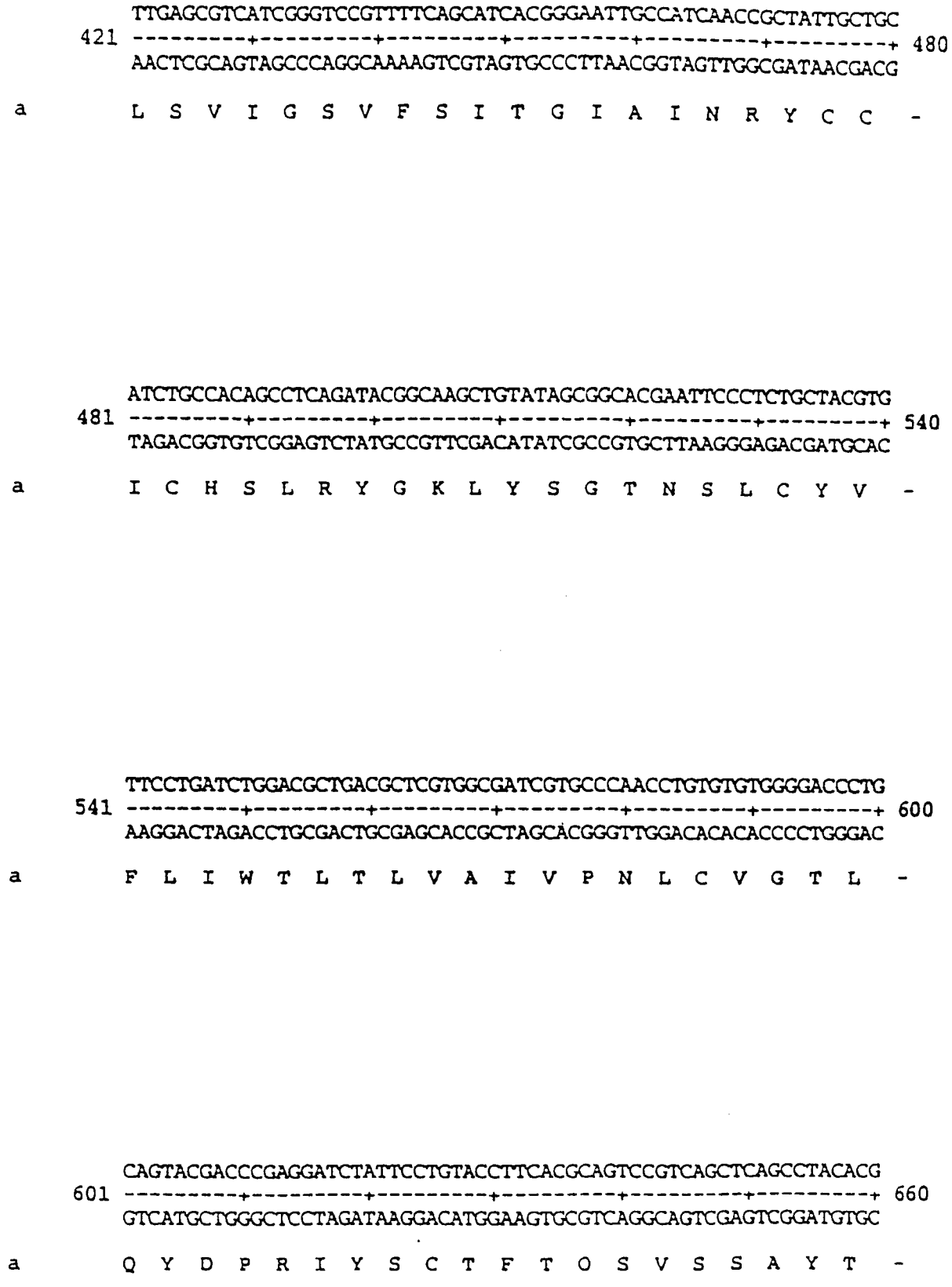

TTGAGCGTCATCGGGTCCGTTTTCAGCATCACGGGAATTGCCATCAACCGCTATTGCTGC
421
480
AACTCGCAGTAGCCCAGGCAAAAGTCGTAGTGCCCTTAACGGTAGTTGGCGATAACGACG
a
L S V I G S V F S I T G I A I N R Y C C -
ATCTGCCACAGCCTCAGATACGGCAAGCTGTATAGCGGCACGAATTCCCTCTGCTACGTG
481
540
TAGACGGTGTCGGAGTCTATGCCGTTCGACATATCGCCGTGCTTAAGGGAGACGATGCAC
a
I C H S L R Y G K L Y S G T N S L C Y V -
TTCCTGATCTGGACGCTGACGCTCGTGGCGATCGTGCCCAACCTGTGTGTGGGGACCCTG
541
600
AAGGACTAGACCTGCGACTGCGAGCACCGCTAGCACGGGTTGGACACACACCCCTGGGAC
a
F L I W T L T L V A I V P N L C V G T L -
CAGTACGACCCGAGGATCTATTCCTGTACCTTCACGCAGTCCGTCAGCTCAGCCTACACG
601
660
GTCATGCTGGGCTCCTAGATAAGGACATGGAAGTGCGTCAGGCAGTCGAGTCGGATGTGC
a
Q Y D P R I Y S C T F T O S V S S A Y T -

Fig. 2 (jatkoa)

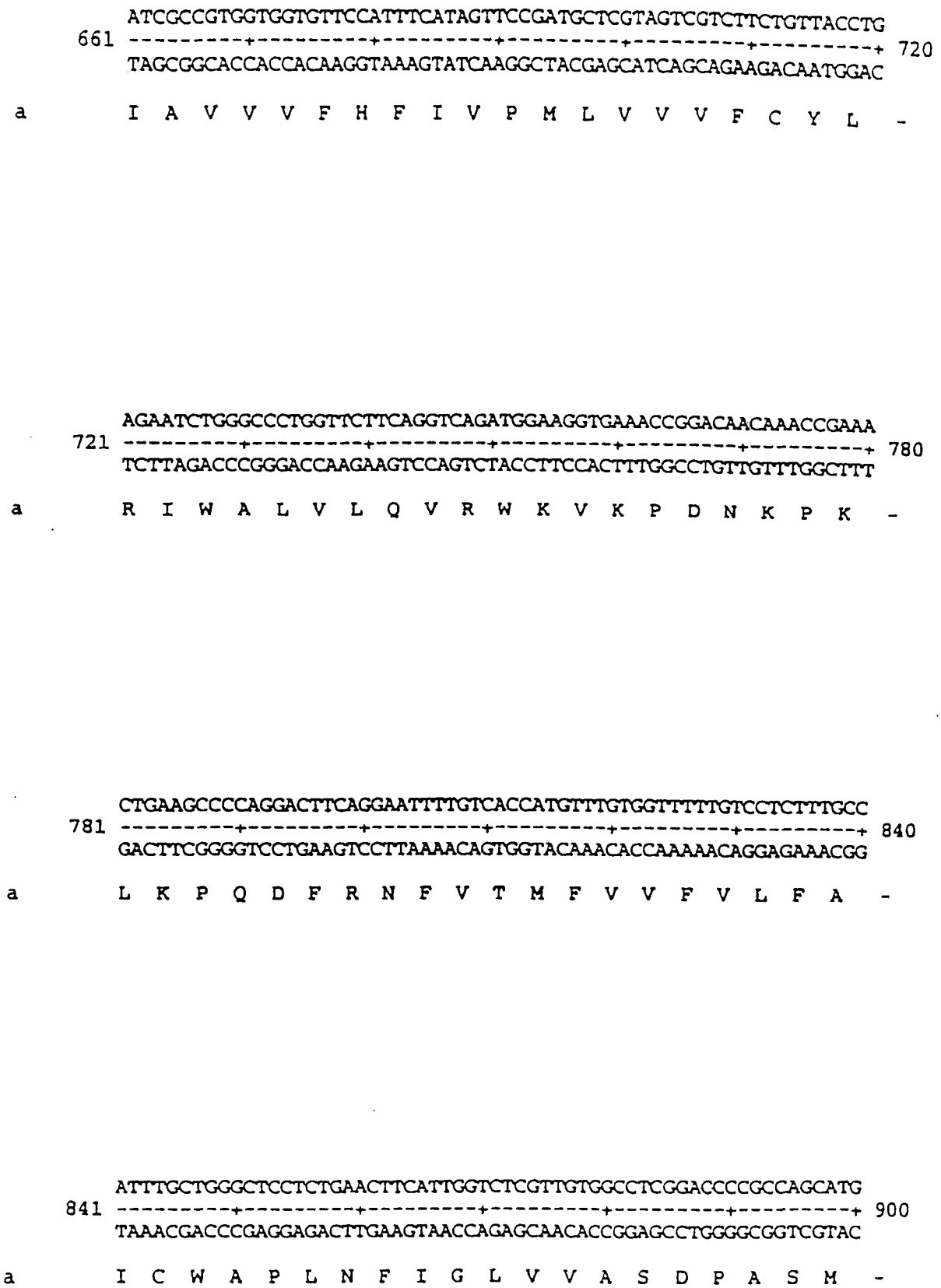

ATCGCCGTGGTGGTGTTCCATTTCATAGTTCCGATGCTCGTAGTCGTCTTCTGTTACCTG
661
720
TAGCGGCACCACCACAAGGTAAAGTATCAAGGCTACGAGCATCAGCAGAAGACAATGGAC
a I A V V V F H F I V P M L V V V F C Y L -
AGAATCTGGGCCCTGGTTCTTCAGGTCAGATGGAAGGTGAAACCGGACAACAAACCGAAA
721
780
TCTTAGACCCGGGACCAAGAAGTCCAGTCTACCTTCCACTTTGGCCTGTTGTTTGGCTTT
a R I W A L V L Q V R W K V K P D N K P K -
CTGAAGCCCCAGGACTTCAGGAATTTTGTCACCATGTTTGTGGTTTTTGTCCTCTTTGCC
781
840
GACTTCGGGGTCCTGAAGTCCTTAAAACAGTGGTACAAACACCAAAAACAGGAGAAACGG
a L K P Q D F R N F V T M F V V F V L F A -
ATTTGCTGGGCTCCTCTGAACTTCATTGGTCTCGTTGTGGCCTCGGACCCCGCCAGCATG
841
900
TAAACGACCCGAGGAGACTTGAAGTAACCAGAGCAACACCGGAGCCTGGGGCGGTCGTAC
a I C W A P L N F I G L V V A S D P A S M -

Fig. 2 (jatkoa)

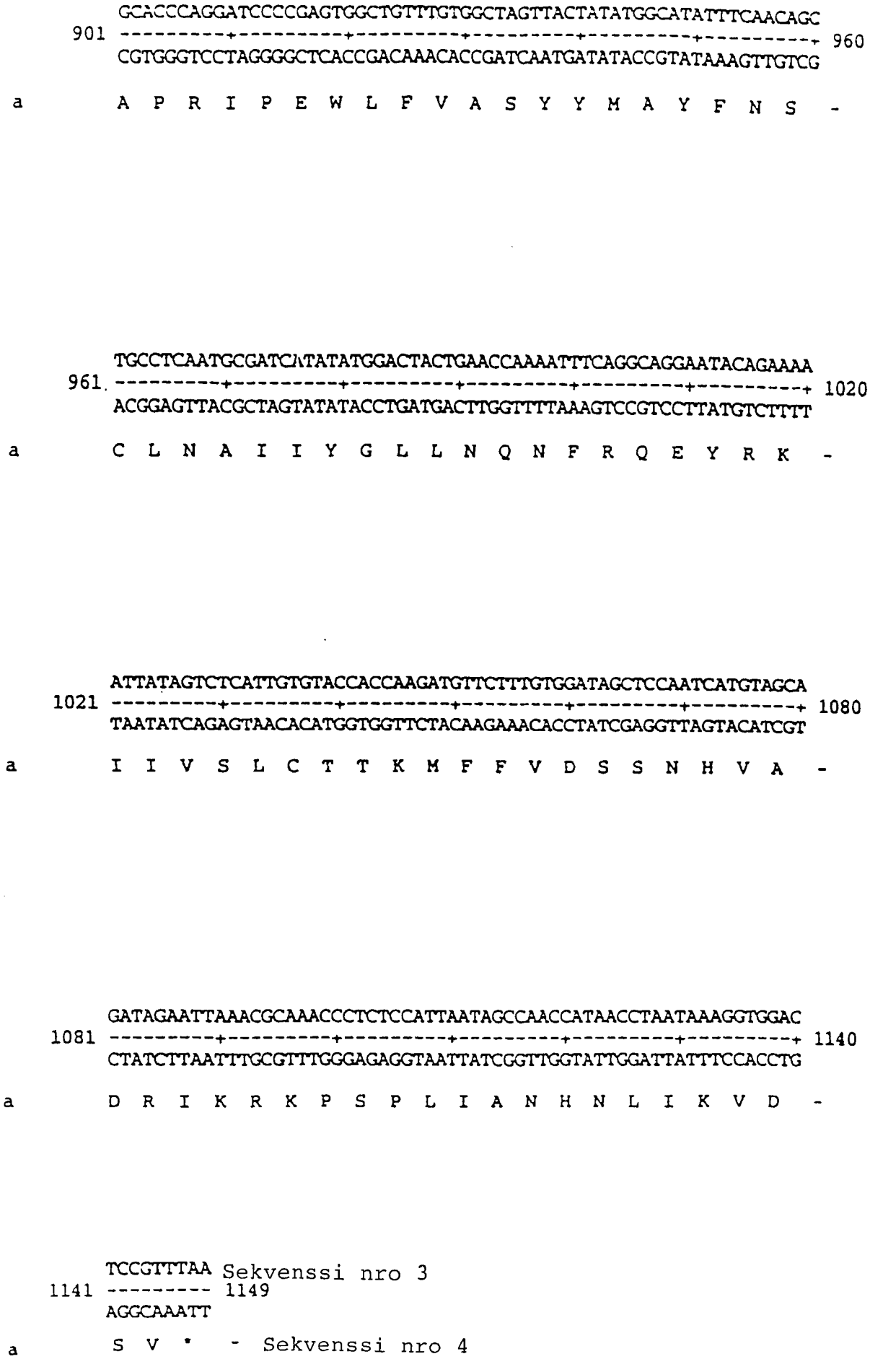

GCACCCAGGATCCCCGAGTGGCTGTTTGTGGCTAGTTACTATATGGCATATTTCAACAGC
901 960
CGTGGGTCCTAGGGGCTCACCGACAAACACCGATCAATGATATACCGTATAAAGTTGTCG
a A P R I P E W L F V A S Y Y M A Y F N S -
TGCCTCAATGCGATCATATATGGACTACTGAACCAAAATTTCAGGCAGGAATACAGAAAA
961 1020
ACGGAGTTACGCTAGTATATACCTGATGACTTGGTTTTAAAGTCCGTCCTTATGTCTTTT
a C L N A I I Y G L L N Q N F R Q E Y R K -
ATTATAGTCTCATTGTGTACCACCAAGATGTTCTTTGTGGATAGCTCCAATCATGTAGCA
1021 1080
TAATATCAGAGTAACACATGGTGGTTCTACAAGAAACACCTATCGAGGTTAGTACATCGT
a I I V S L C T T K M F F V D S S N H V A -
GATAGAATTAAACGCAAACCCTCTCCATTAATAGCCAACCATAACCTAATAAAGGTGGAC
1081 1140
CTATCTTAATTTGCGTTTGGGAGAGGTAATTATCGGTTGGTATTGGATTATTTCCACCTG
a D R I K R K P S P L I A N H N L I K V D -
TCCGTTTAA Sekvenssi nro 3
1141 1149
AGGCAAATT
a S V * - Sekvenssi nro 4

Fig. 3

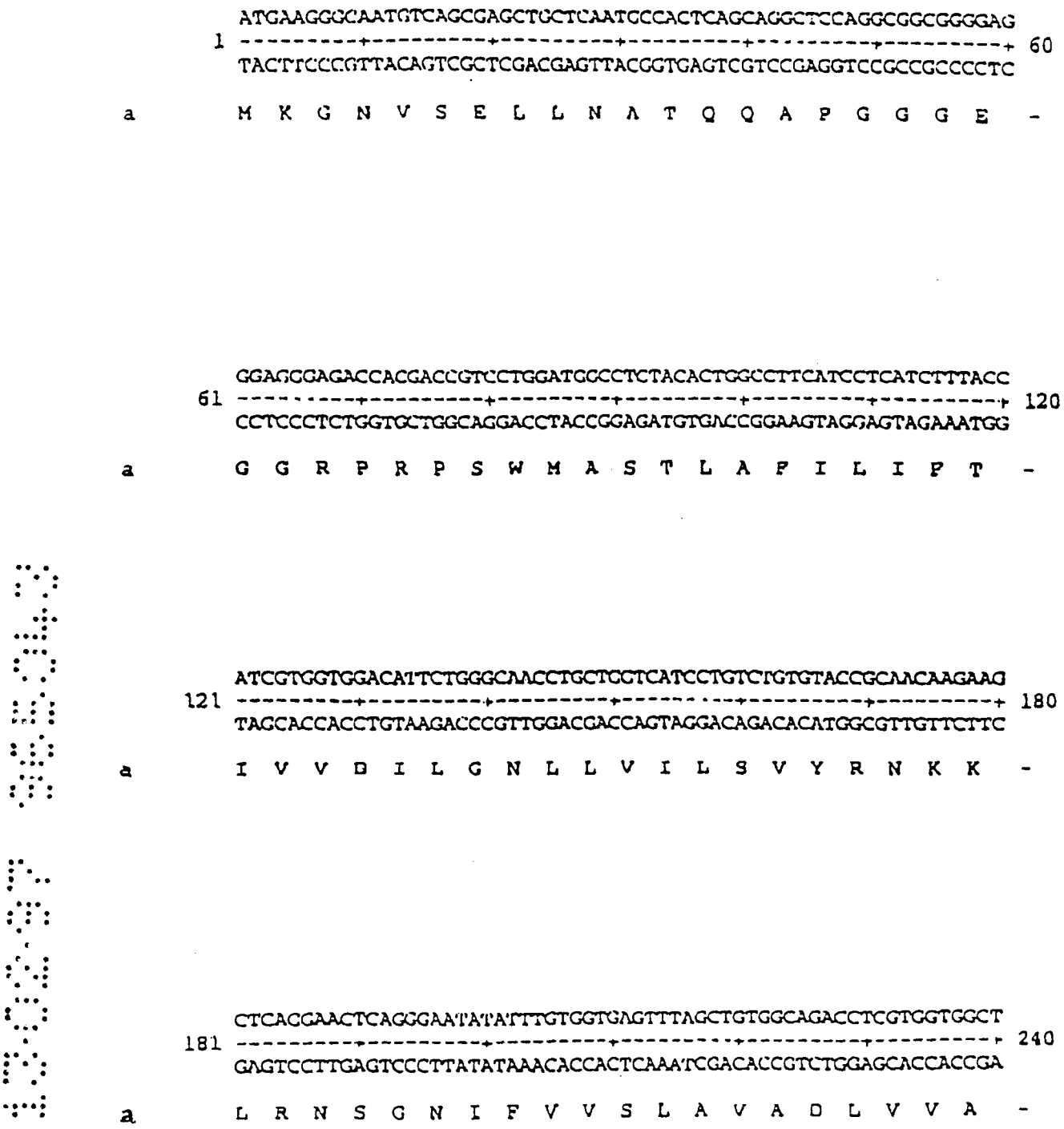

ATGAAGGGCAATGTCAGCGAGCTGCTCAATGCCACTCAGCAGGCTCCAGGCGGCGGGGAG
1
60
TACTTCCCGTTACAGTCGCTCGACGAGTTACGGTGAGTCGTCCGAGGTCCGCCGCCCCTC
a M K G N V S E L L N A T Q Q A P G G G E -
GGAGCGAGACCACGACCGTCCTGGATGGCCTCTACACTGGCCTTCATCCTCATCTTTACC
61
120
CCTCCCTCTGGTGCTGGCAGGACCTACCGGAGATGTGACCGGAAGTAGGAGTAGAAATGG
a G G R P R P S W M A S T L A F I L I F T -
ATCGTGGTGGACATTCTGGGCAACCTGCTGGTCATCCTGTCTGTGTACCGCAACAAGAAG
121
180
TAGCACCACCTGTAAGACCCGTTGGACGACCAGTAGGACAGACACATGGCGTTGTTCTTC
a I V V D I L G N L L V I L S V Y R N K K -
CTCACGAACTCAGGGAATATATTTGTGGTGAGTTTAGCTGTGGCAGACCTCGTGGTGGCT
181
240
GAGTCCTTGAGTCCCTTATATAAACACCACTCAAATCGACACCGTCTGGAGCACCACCGA
a L R N S G N I F V V S L A V A D L V V A -

Fig. 3 (jatkoa)

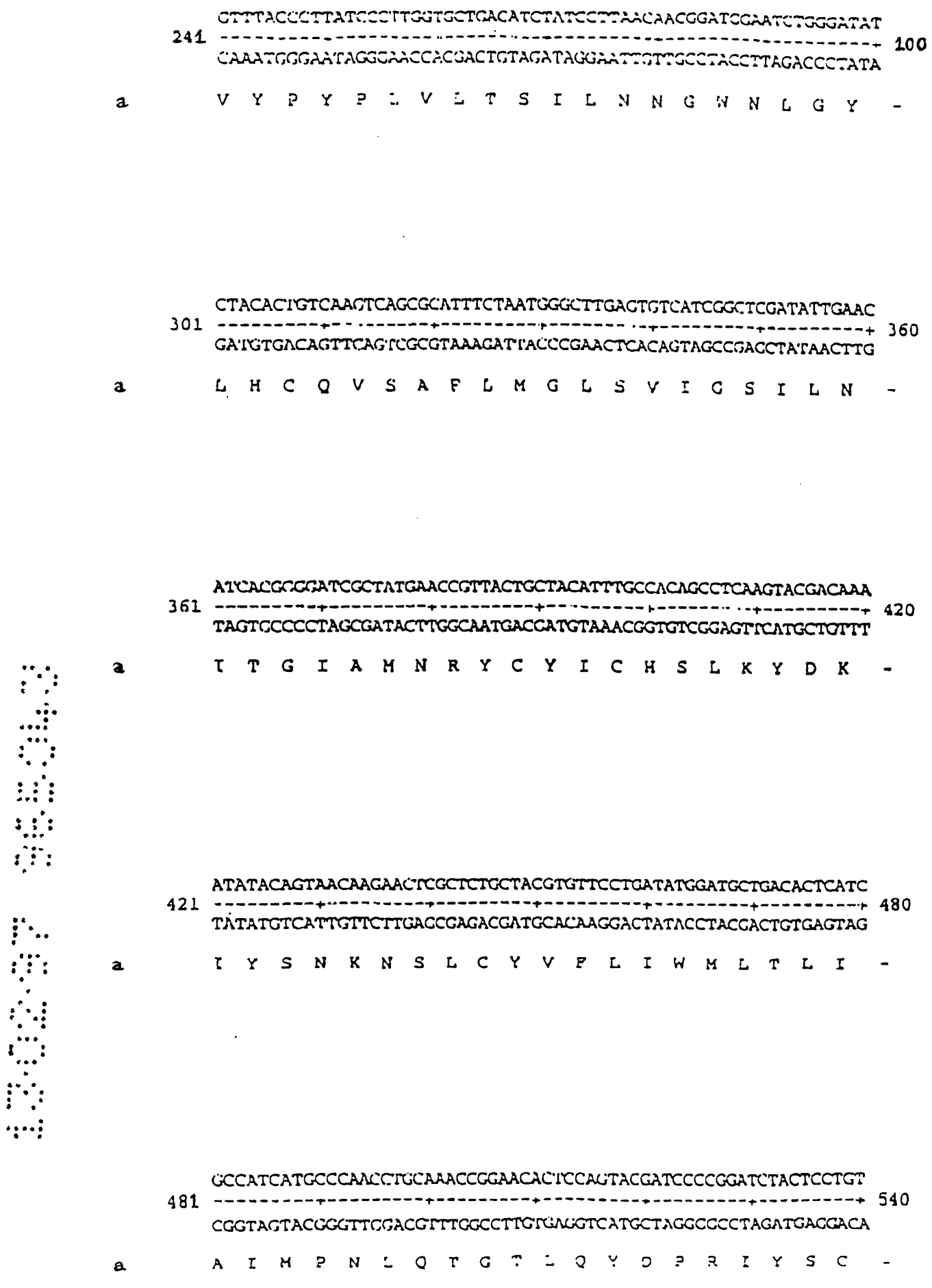

241
100
a
V Y P Y P L V L T S I L N N G W N L G Y -
301
360
a
L H C Q V S A F L M G L S V I G S I L N -
361
420
a
I T G I A M N R Y C Y I C H S L K Y D K -
421
480
a
I Y S N K N S L C Y V F L I W M L T L I -
481
540
a
A I M P N L Q T G T L Q Y D P R I Y S C -

Fig. 3 (jatkoa)

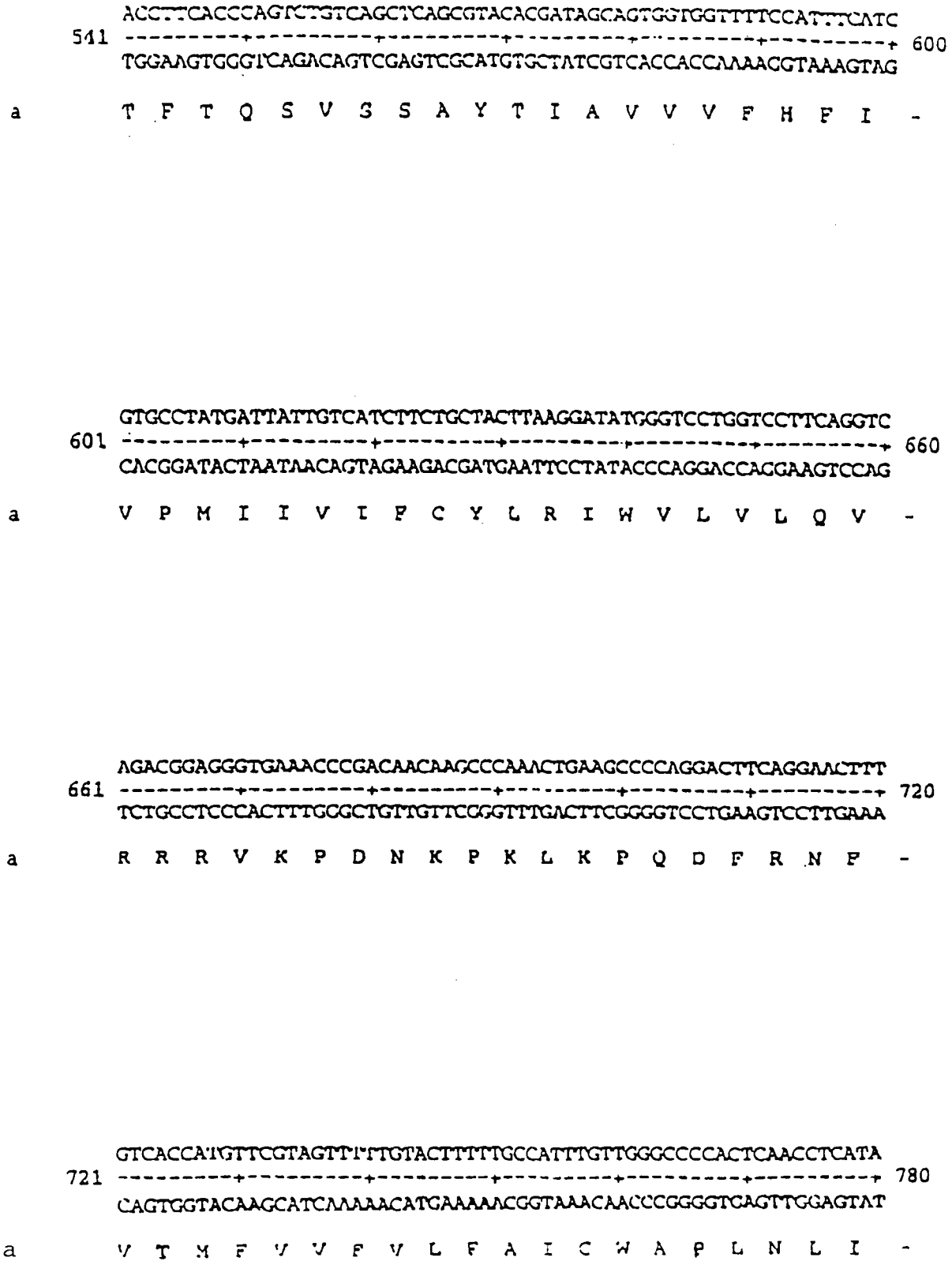

ACCTTCACCCAGTCTGTCAGCTCAGCGTACACGATAGCAGTGGTGGTTTTCCATTTCATC
541
600
TGGAAGTGGGTCAGACAGTCGAGTCGCATGTGCTATCGTCACCACCAAAACGTAAAGTAG
a
T F T Q S V S S A Y T I A V V V F H F I -
GTGCCTATGATTATTGTCATCTTCTGCTACTTAAGGATATGGGTCCTGGTCCTTCAGGTC
601
660
CACGGATACTAATAACAGTAGAAGACGATGAATTCCTATACCCAGGACCAGGAAGTCCAG
a
V P M I I V I F C Y L R I W V L V L Q V -
AGACGGAGGGTGAAACCCGACAACAAGCCCAAACTGAAGCCCCAGGACTTCAGGAACTTT
661
720
TCTGCCTCCCACTTTGGGCTGTTGTTCGGGTTTGACTTCGGGGTCCTGAAGTCCTTGAAA
a
R R R V K P D N K P K L K P Q D F R N F -
GTCACCATGTTCGTAGTTTTTGTACTTTTTGCCATTTGTTGGGCCCCACTCAACCTCATA
721
780
CAGTGGTACAAGCATCAAAAACATGAAAAACGGTAAACAACCCGGGGTCAGTTGGAGTAT
a
V T M F V V F V L F A I C W A P L N L I -

Fig. 3 (jatkoa)

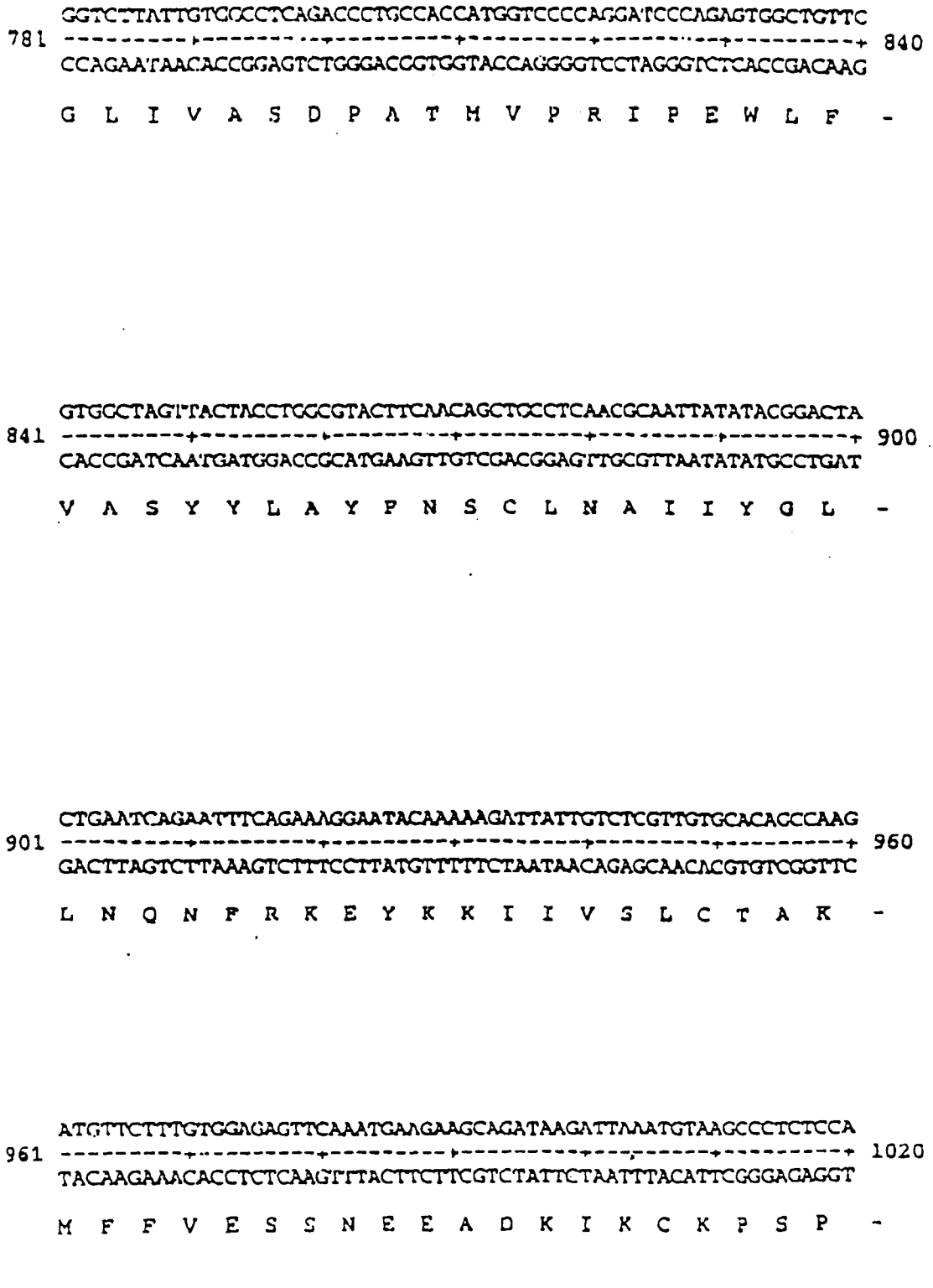

GGTCTTATTGTGCCCTCAGACCCTGCCACCATGGTCCCCAGGATCCCAGAGTGGCTGTTC
781
840
CCAGAATAACACCGGAGTCTGGGACCGTGGTACCAGGGGTCCTAGGGTCTCACCGACAAG
G L I V A S D P A T M V P R I P E W L F -
GTGGCTAGTTACTACCTGGCGTACTTCAACAGCTGCCTCAACGCAATTATATACGGACTA
841
900
CACCGATCAATGATGGACCGCATGAAGTTGTCGACGGAGTTGCGTTAATATATGCCTGAT
V A S Y Y L A Y F N S C L N A I I Y G L -
CTGAATCAGAATTTCAGAAAGGAATACAAAAAGATTATTGTCTCGTTGTGCACACCCAAG
901
960
GACTTAGTCTTAAAGTCTTTCCTTATGTTTTTCTAATAACAGAGCAACACGTGTCGGTTC
L N Q N F R K E Y K K I I V S L C T A K -
ATGTTCTTTGTGGAGAGTTCAAATGAAGAAGCAGATAAGATTAAATGTAAGCCCTCTCCA
961
1020
TACAAGAAACACCTCTCAAGTTTACTTCTTCGTCTATTCTAATTTACATTCGGGAGAGGT
M F F V E S S N E E A D K I K C K P S P -

Fig. 3 (jatkoa)

CTAATACCCAATAATAACTTCCTCCCGGTGGACTCTGTTTAA Sekvenssi nro 13

1021 ----------+----------+----------+----------+--

GATTATGGGTTATTATTGAAGGAGGGCCACCTGAGACAAATT

a L I P N N N F L P V D S V * Sekvenssi nro 14

Fig. 4

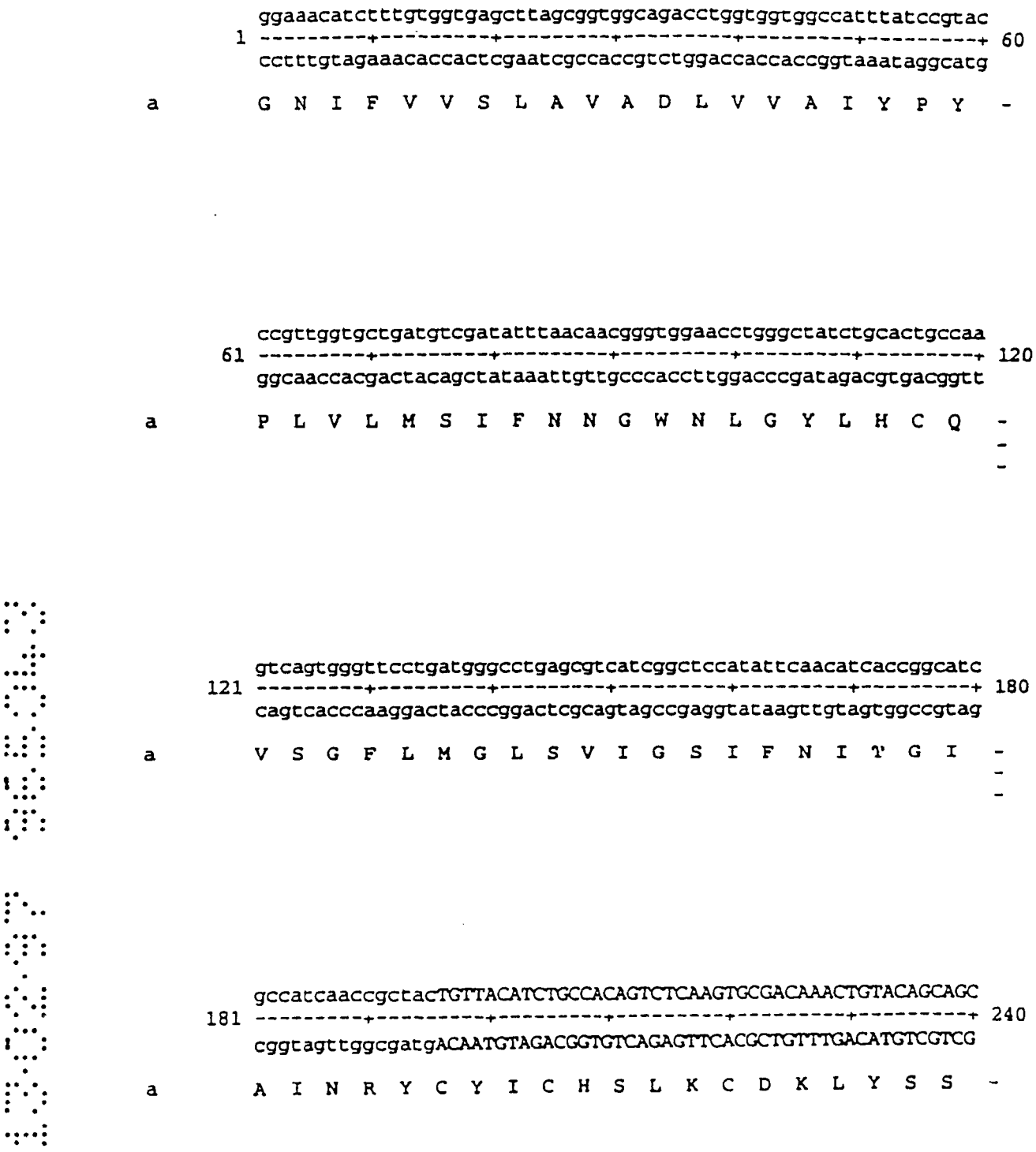

ggaaacatctttgtggtgagcttagcggtggcagacctggtggtggccatttatccgtac
1
60
cctttgtagaaacaccactcgaatcgccaccgtctggaccaccaccggtaaataggcatg
a G N I F V V S L A V A D L V V A I Y P Y -
ccgttggtgctgatgtcgatatttaacaacgggtggaacctgggctatctgcactgccaa
61
120
ggcaaccacgactacagctataaattgttgcccaccttggacccgatagacgtgacggtt
a P L V L M S I F N N G W N L G Y L H C Q - - -
gtcagtgggttcctgatgggcctgagcgtcatcggctccatattcaacatcaccggcatc
121
180
cagtcacccaaggactacccggactcgcagtagccgaggtataagttgtagtggccgtag
a V S G F L M G L S V I G S I F N I T G I - - -
gccatcaaccgctacTGTTACATCTGCCACAGTCTCAAGTGCGACAAACTGTACAGCAGC
181
240
cggtagttggcgatgACAATGTAGACGGTGTCAGAGTTCACGCTGTTTGACATGTCGTCG
a A I N R Y C Y I C H S L K C D K L Y S S -

Fig. 4 (jatkoa)

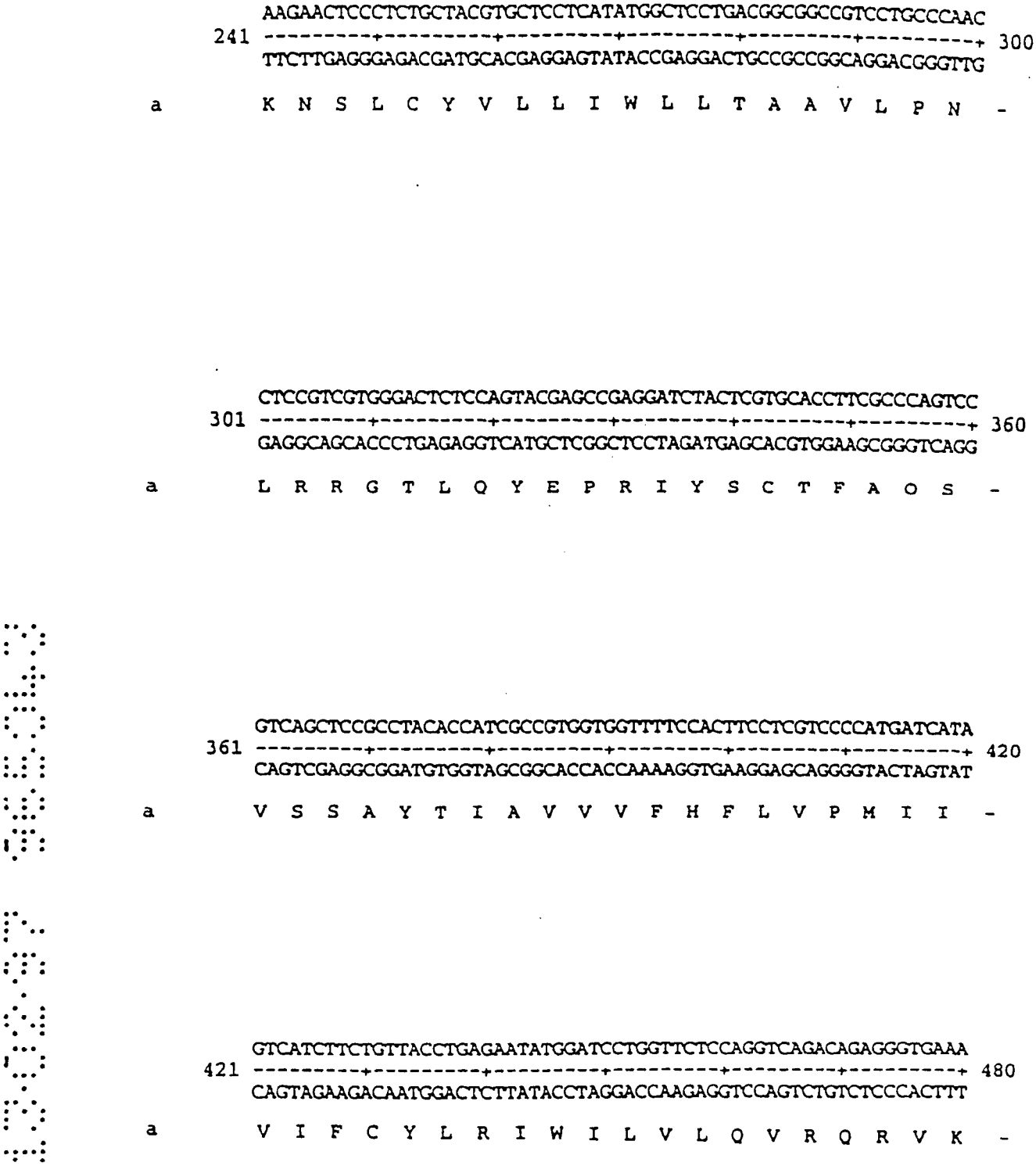

AAGAACTCCCTCTGCTACGTGCTCCTCATATGGCTCCTGACGGCGGCCGTCCTGCCCAAC
241
300
TTCTTGAGGGAGACGATGCACGAGGAGTATACCGAGGACTGCCGCCGGCAGGACGGGTTG
a K N S L C Y V L L I W L L T A A V L P N -
CTCCGTCGTGGGACTCTCCAGTACGAGCCGAGGATCTACTCGTGCACCTTCGCCCAGTCC
301
360
GAGGCAGCACCCTGAGAGGTCATGCTCGGCTCCTAGATGAGCACGTGGAAGCGGGTCAGG
a L R R G T L Q Y E P R I Y S C T F A O S -
GTCAGCTCCGCCTACACCATCGCCGTGGTGGTTTTCCACTTCCTCGTCCCCATGATCATA
361
420
CAGTCGAGGCGGATGTGGTAGCGGCACCACCAAAAGGTGAAGGAGCAGGGGTACTAGTAT
a V S S A Y T I A V V V F H F L V P M I I -
GTCATCTTCTGTTACCTGAGAATATGGATCCTGGTTCTCCAGGTCAGACAGAGGGTGAAA
421
480
CAGTAGAAGACAATGGACTCTTATACCTAGGACCAAGAGGTCCAGTCTGTCTCCCACTTT
a V I F C Y L R I W I L V L Q V R Q R V K -

Fig. 4 (jatkoa)

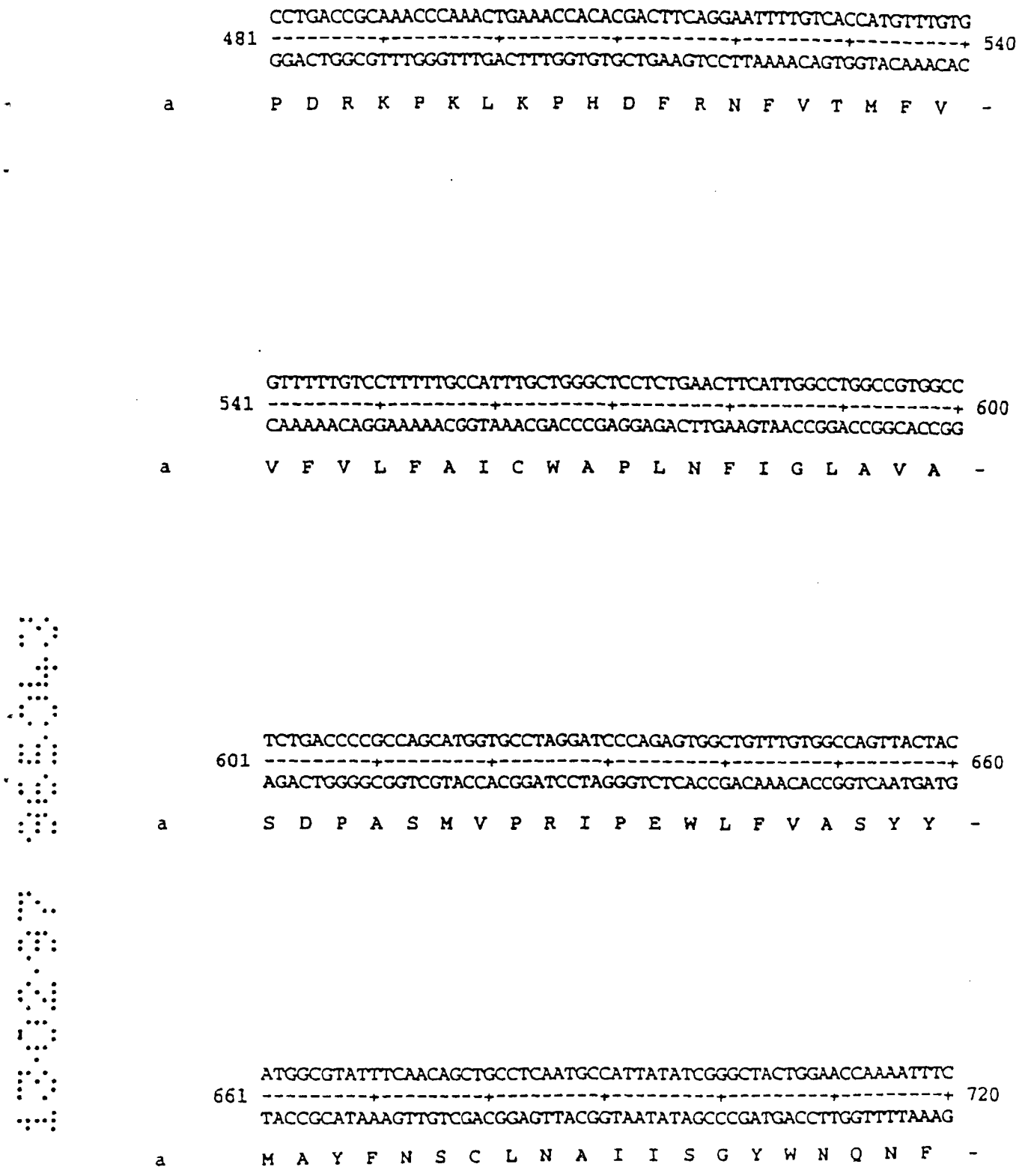
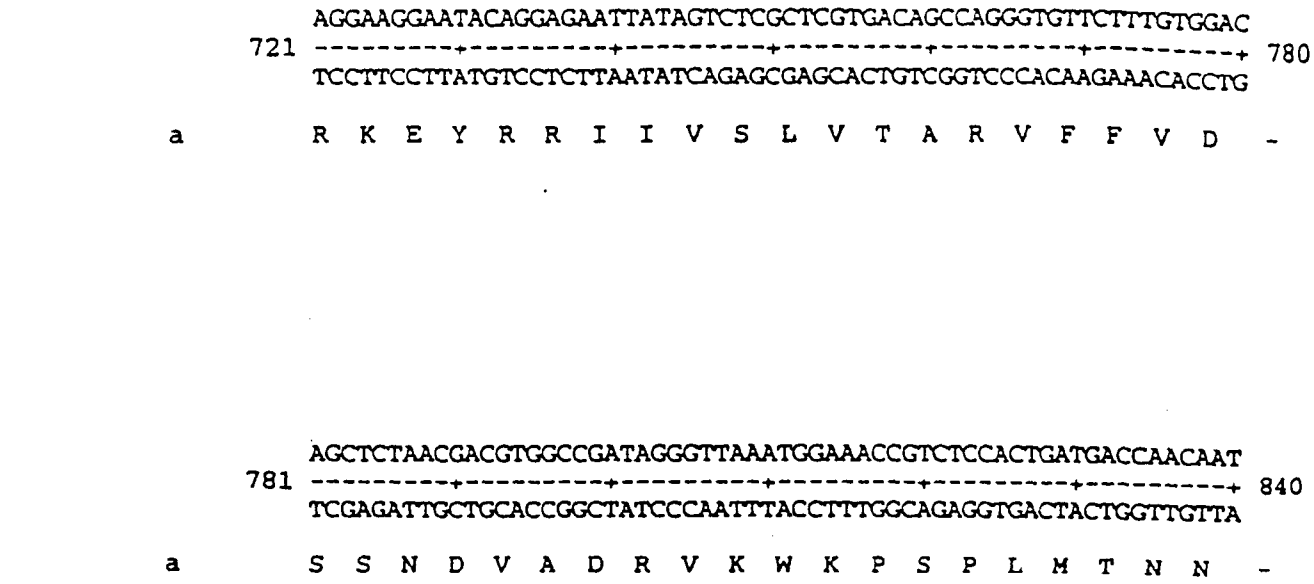

CCTGACCGCAAACCCAAACTGAAACCACACGACTTCAGGAATTTTGTCACCATGTTTGTG
481
540
GGACTGGCGTTTGGGTTTGACTTTGGTGTGCTGAAGTCCTTAAAACAGTGGTACAAACAC
a P D R K P K L K P H D F R N F V T M F V -
GTTTTTGTCCTTTTTGCCATTGCTGGGCTCCTCTGAACTTCATTGGCCTGGCCGTGGCC
541
600
CAAAAACAGGAAAAACGGTAAACGACCCGAGGAGACTTGAAGTAACCGGACCGGCACCGG
a V F V L F A I C W A P L N F I G L A V A -
TCTGACCCCGCCAGCATGGTGCCTAGGATCCCAGAGTGGCTGTTTGTGGCCAGTTACTAC
601
660
AGACTGGGGCGGTCGTACCACGGATCCTAGGGTCTCACCGACAAACACCGGTCAATGATG
a S D P A S M V P R I P E W L F V A S Y Y -
ATGGCGTATTTCAACAGCTGCCTCAATGCCATTATATCGGGCTACTGGAACCAAAATTTC
661
720
TACCGCATAAAGTTGTCGACGGAGTTACGGTAATATAGCCCGATGACCTTGGTTTTAAAG
a M A Y F N S C L N A I I S G Y W N Q N F -

Fig. 4 (jatkoa)


AGGAAGGAATACAGGAGAATTATAGTCTCGCTCGTGACAGCCAGGGTGTTCTTTGTGGAC
721
780
TCCTTCCTTATGTCCTCTTAATATCAGAGCGAGCACTGTCGGTCCCACAAGAAACACCTG
a
R K E Y R R I I V S L V T A R V F F V D -
AGCTCTAACGACGTGGCCGATAGGGTTAAATGGAAACCGTCTCCACTGATGACCAACAAT
781
840
TCGAGATTGCTGCACCGGCTATCCCAATTTACCTTTGGCAGAGGTGACTACTGGTTGTTA
a
S S N D V A D R V K W K P S P L M T N N -

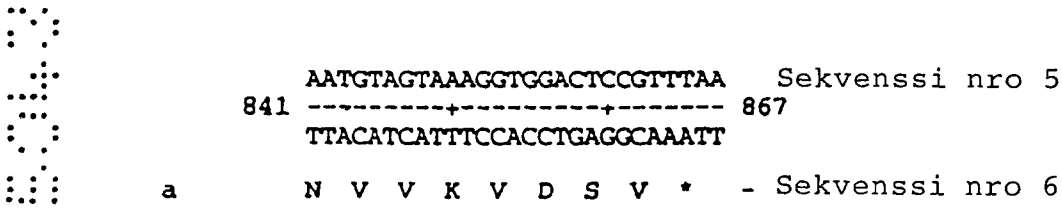

AATGTAGTAAAGGTGGACTCCGTTTAA
Sekvenssi nro 5
841
867
TTACATCATTTCCACCTGAGGCAAATT
a
N V V K V D S V * - Sekvenssi nro 6

Fig. 5

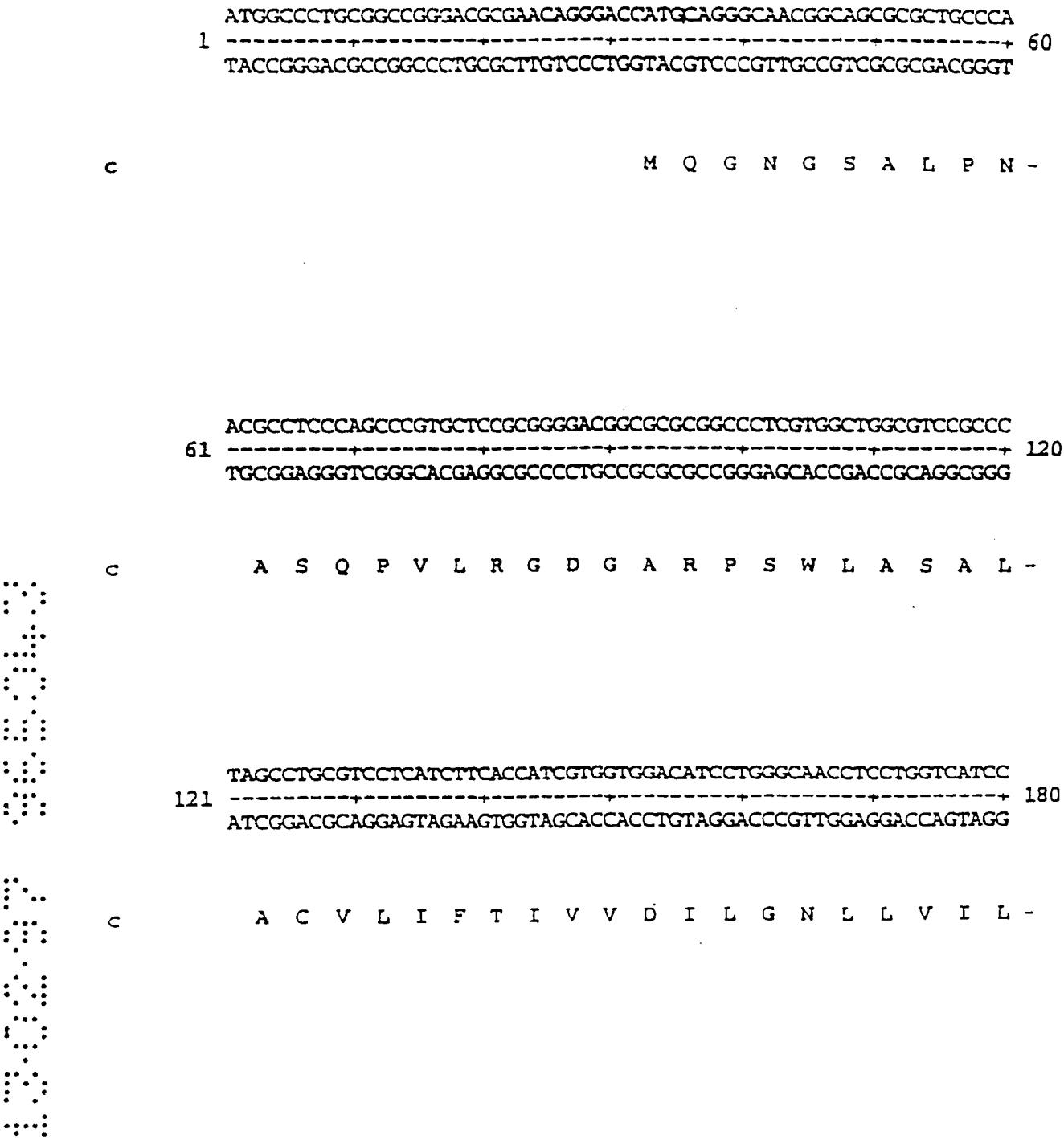

ATGGCCCTGCGGCCGGGACGCGAACAGGGACCATGCAGGGCAACGGCAGCGCGCTGCCCA
1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
TACCGGGACGCCGGCCCTGCGCTTGTCCCTGGTACGTCCCGTTGCCGTCGCGCGACGGGT
c M Q G N G S A L P N -
ACGCCTCCCAGCCCGTGCTCCGCGGGGACGGCGCGCGGCCCTCGTGGCTGGCGTCCGCCC
61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
TGCGGAGGGTCGGGCACGAGGCGCCCCTGCCGCGCGCCGGGAGCACCGACCGCAGGCGGG
c A S Q P V L R G D G A R P S W L A S A L -
TAGCCTGCGTCCTCATCTTCACCATCGTGGTGGACATCCTGGGCAACCTCCTGGTCATCC
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
ATCGGACGCAGGAGTAGAAGTGGTAGCACCACCTGTAGGACCCGTTGGAGGACCAGTAGG
c A C V L I F T I V V D I L G N L L V I L -

Fig. 5
(jatkoa)

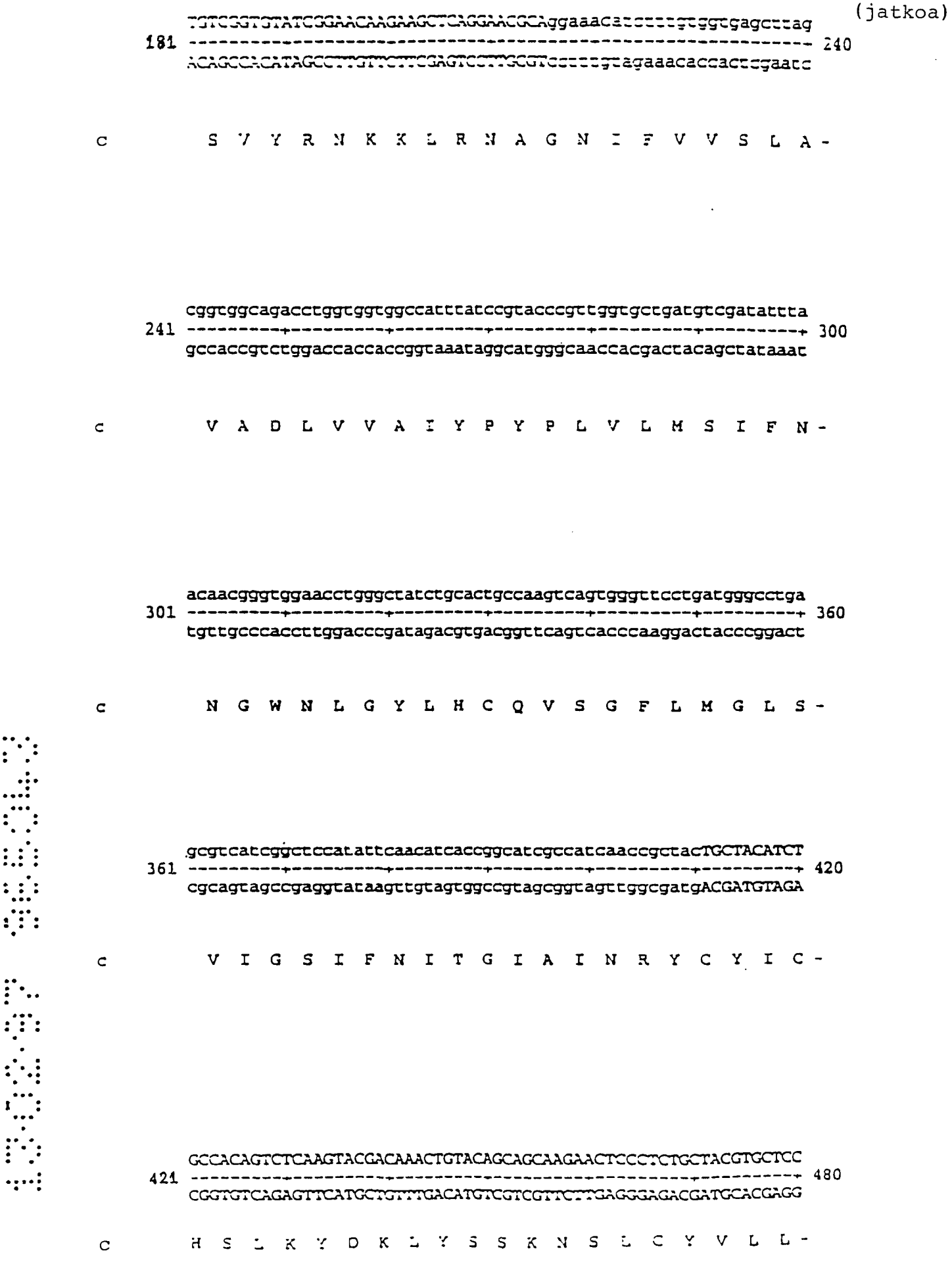


Fig. 5 (jatkoa)

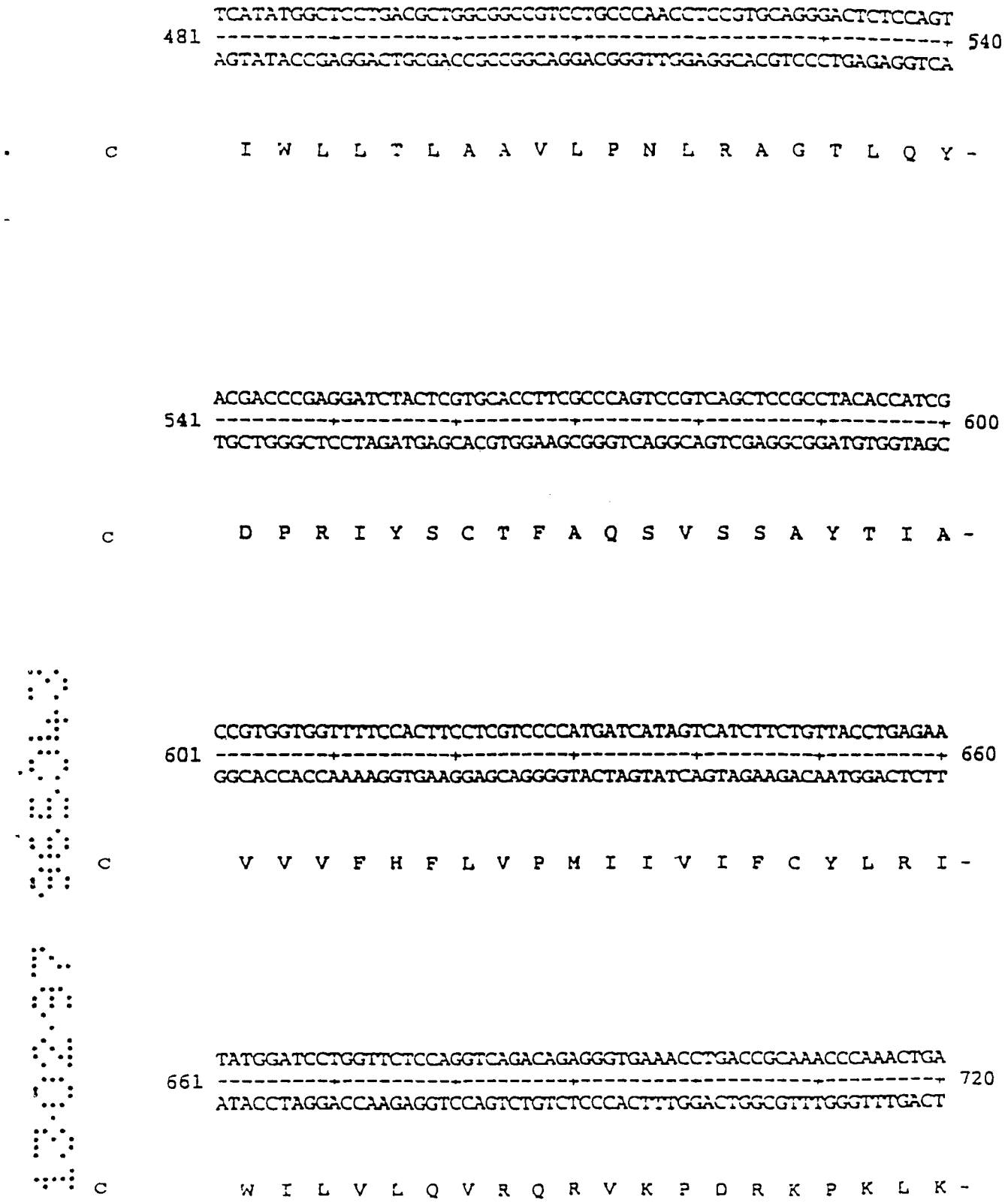

TCATATGGCTCCTGACGCTGGCGGCCGTCCTGCCCAACCTCCGTGCAGGGACTCTCCAGT
481
540
AGTATACCGAGGACTGCGACCGCCGGCAGGACGGGTTGGAGGCACGTCCCTGAGAGGTCA
C I W L L T L A A V L P N L R A G T L Q Y -
ACGACCCGAGGATCTACTCGTGCACCTTCGCCCAGTCCGTCAGCTCCGCCTACACCATCG
541
600
TGCTGGGCTCCTAGATGAGCACGTGGAAGCGGGTCAGGCAGTCGAGGCGGATGTGGTAGC
C D P R I Y S C T F A Q S V S S A Y T I A -
CCGTGGTGGTTTTCCACTTCCTCGTCCCCATGATCATAGTCATCTTCTGTTACCTGAGAA
601
660
GGCACCACCAAAAGGTGAAGGAGCAGGGGTACTAGTATCAGTAGAAGACAATGGACTCTT
C V V V F H F L V P M I I V I F C Y L R I -
TATGGATCCTGGTTCTCCAGGTCAGACAGAGGGTGAAACCTGACCGCAAACCCAAACTGA
661
720
ATACCTAGGACCAAGAGGTCCAGTCTGTCTCCCACTTTGGACTGGCGTTTGGGTTTGACT
C W I L V L Q V R Q R V K P D R K P K L K -

Fig. 5 (jatkoa)

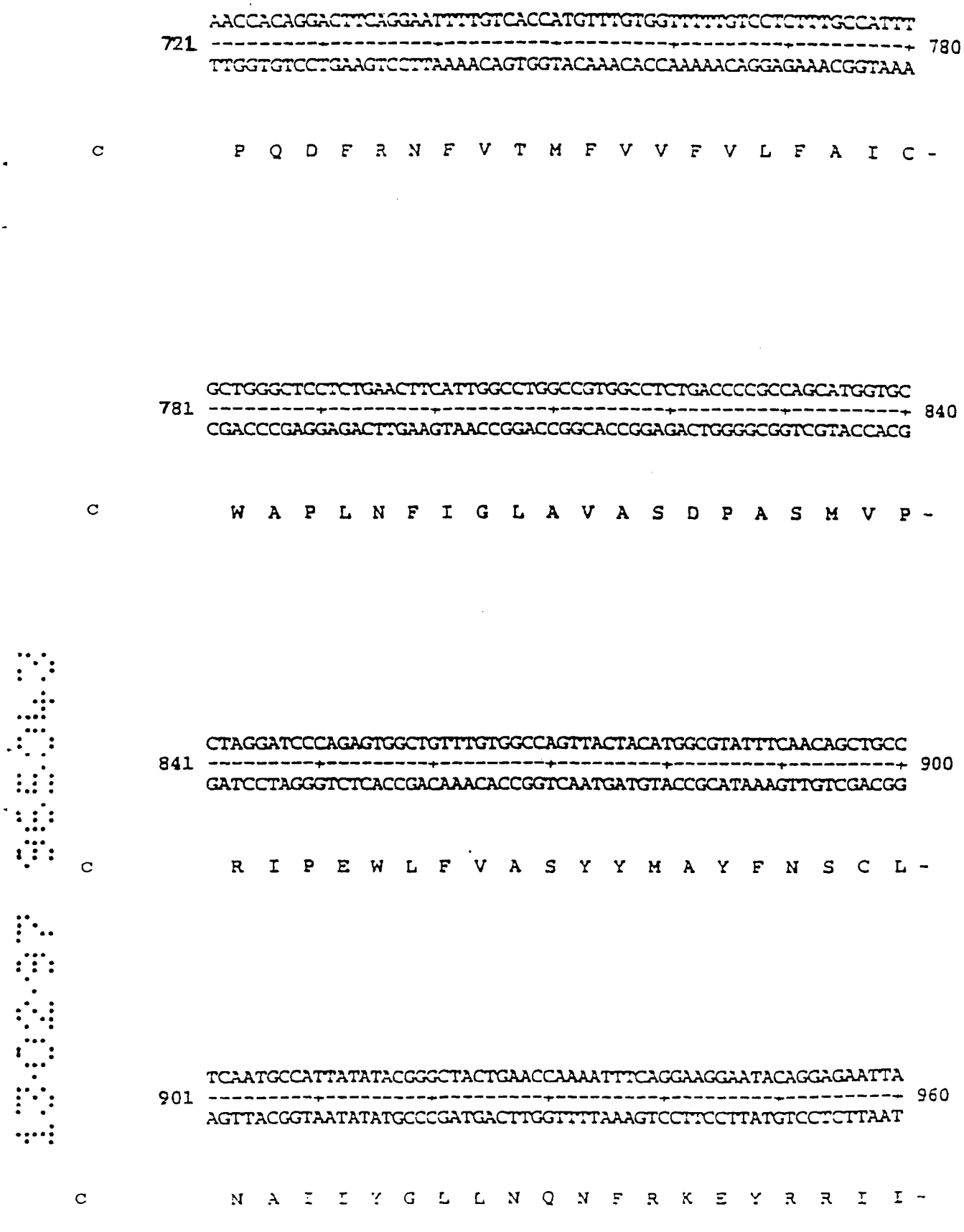

AACCACAGGACTTCAGGAATTTTGTCACCATGTTTGTGGTTTTTGTCCTCTTTGCCATTT
721
780
TTGGTGTCCTGAAGTCCTTAAAACAGTGGTACAAACACCAAAAACAGGAGAAACGGTAAA
C P Q D F R N F V T M F V V F V L F A I C -
GCTGGGCTCCTCTGAACTTCATTGGCCTGGCCGTGGCCTCTGACCCCGCCAGCATGGTGC
781
840
CGACCCGAGGAGACTTGAAGTAACCGGACCGGCACCGGAGACTGGGGCGGTCGTACCACG
C W A P L N F I G L A V A S D P A S M V P -
CTAGGATCCCAGAGTGGCTGTTTGTGGCCAGTTACTACATGGCGTATTTCAACAGCTGCC
841
900
GATCCTAGGGTCTCACCGACAAACACCGGTCAATGATGTACCGCATAAAGTTGTCGACGG
C R I P E W L F V A S Y Y M A Y F N S C L -
TCAATGCCATTATATACGGGCTACTGAACCAAAATTTCAGGAAGGAATACAGGAGAATTA
901
960
AGTTACGGTAATATATGCCCGATGACTTGGTTTTAAAGTCCTTCCTTATGTCCTCTTAAT
C N A I I Y G L L N Q N F R K E Y R R I I -

Fig. 5 (jatkoa)

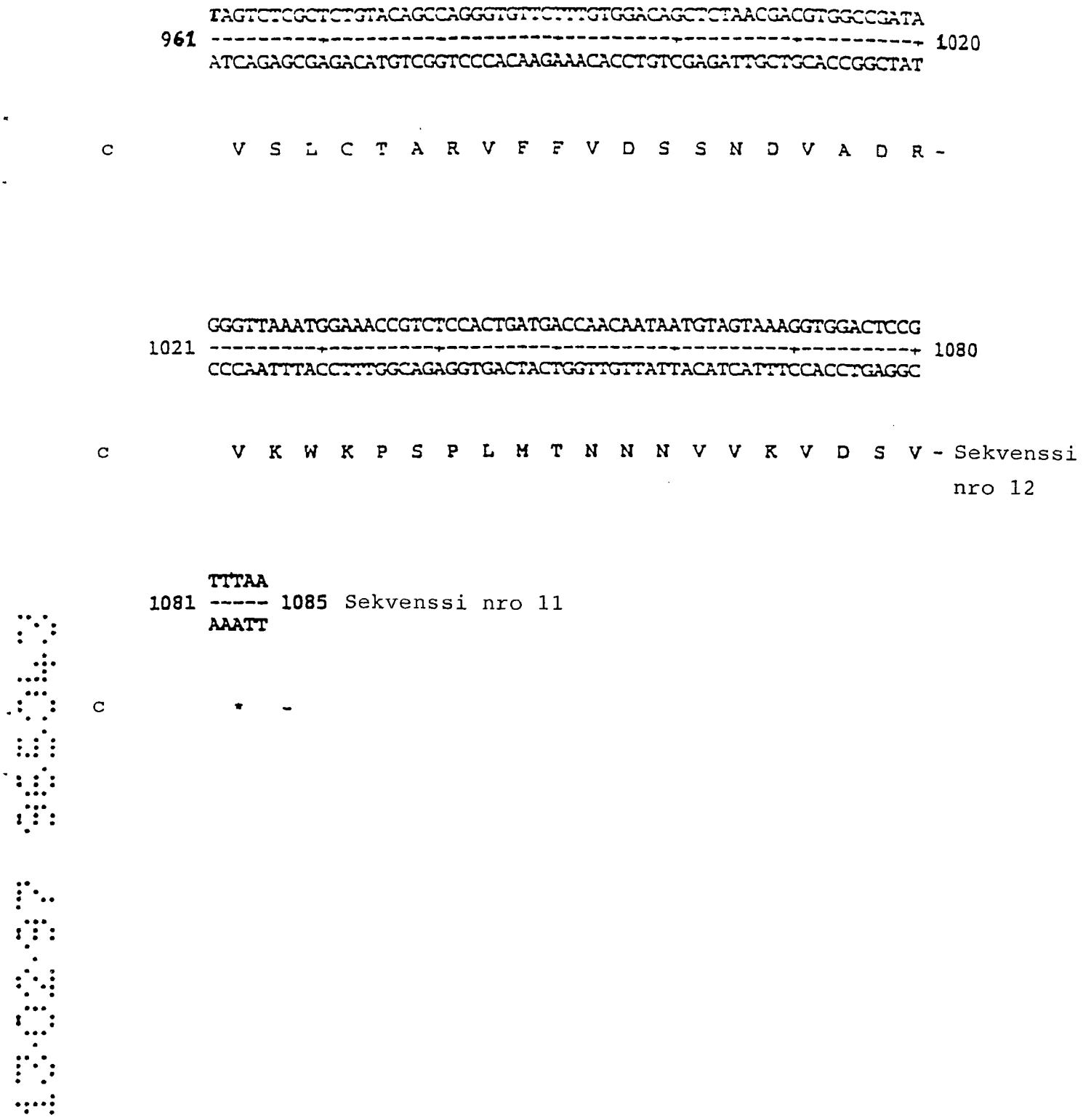

TAGTCTCGCTCTGTACAGCCAGGGTGTTCTTTGTGGACAGCTCTAACGACGTGGCCGATA
961
1020
ATCAGAGCGAGACATGTCGGTCCCACAAGAAACACCTGTCGAGATTGCTGCACCGGCTAT
C V S L C T A R V F F V D S S N D V A D R -
GGGTTAAATGGAAACCGTCTCCACTGATGACCAACAATAATGTAGTAAAGGTGGACTCCG
1021
1080
CCCAATTTACCTTTGGCAGAGGTGACTACTGGTTGTTATTACATCATTTCCACCTGAGGC
C V K W K P S P L M T N N N V V K V D S V - Sekvenssi nro 12
TTTAA
1081
----- 1085 Sekvenssi nro 11
AAATT
C * -

Fig. 6

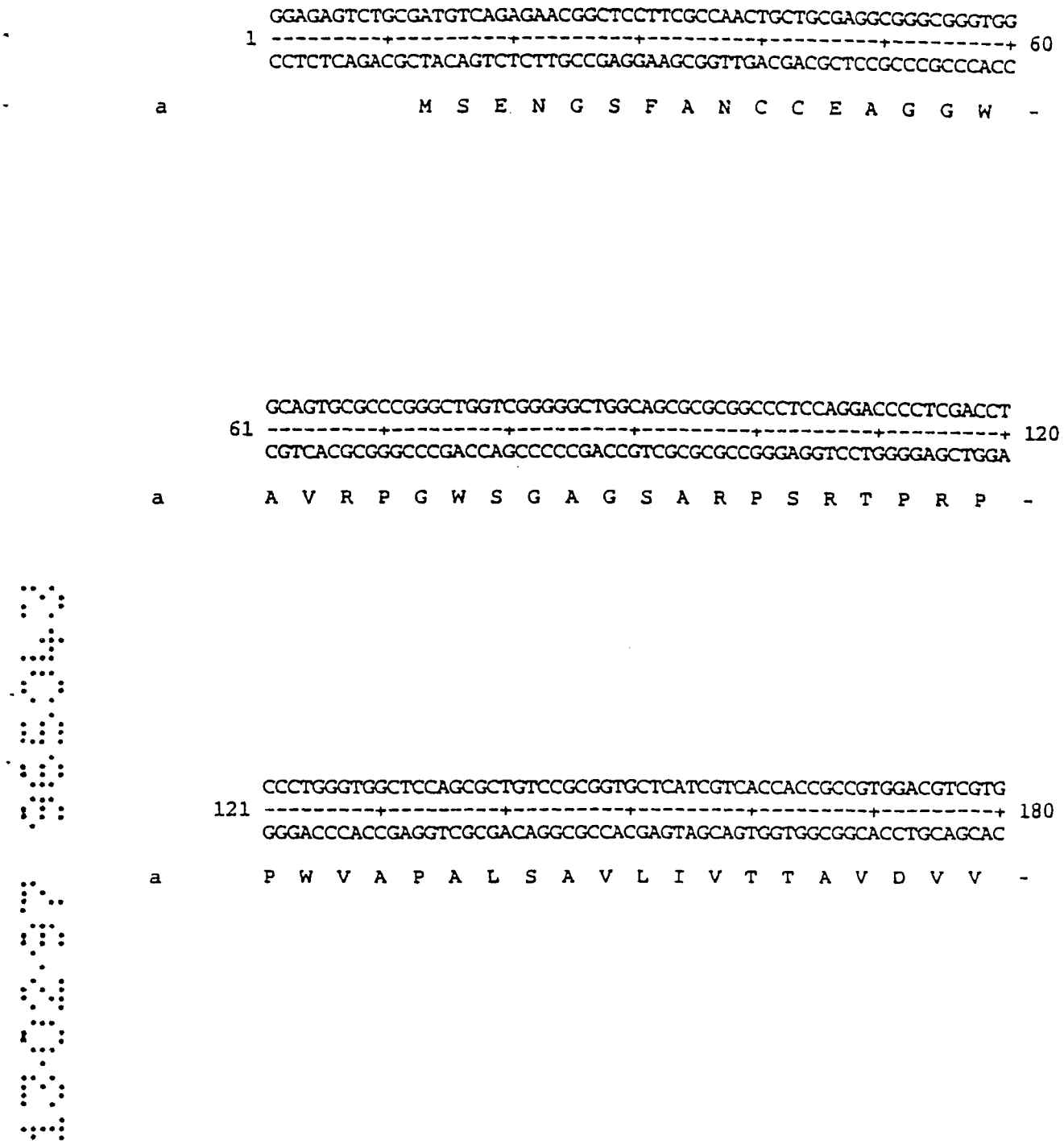

GGAGAGTCTGCGATGTCAGAGAACGGCTCCTTCGCCAACTGCTGCGAGGCGGGCGGGTGG
1
60
CCTCTCAGACGCTACAGTCTCTTGCCGAGGAAGCGGTTGACGACGCTCCGCCCGCCCACC
a
M S E N G S F A N C C E A G G W -
GCAGTGCGCCCGGGCTGGTCGGGGGCTGGCAGCGCGCGGCCCTCCAGGACCCCTCGACCT
61
120
CGTCACGCGGGCCCGACCAGCCCCCGACCGTCGCGCGCCGGGAGGTCCTGGGGAGCTGGA
a
A V R P G W S G A G S A R P S R T P R P -
CCCTGGGTGGCTCCAGCGCTGTCCGCGGTGCTCATCGTCACCACCGCCGTGGACGTCGTG
121
180
GGGACCCACCGAGGTCGCGACAGGCGCCACGAGTAGCAGTGGTGGCGGCACCTGCAGCAC
a
P W V A P A L S A V L I V T T A V D V V -

Fig. 6 (jatkoa)

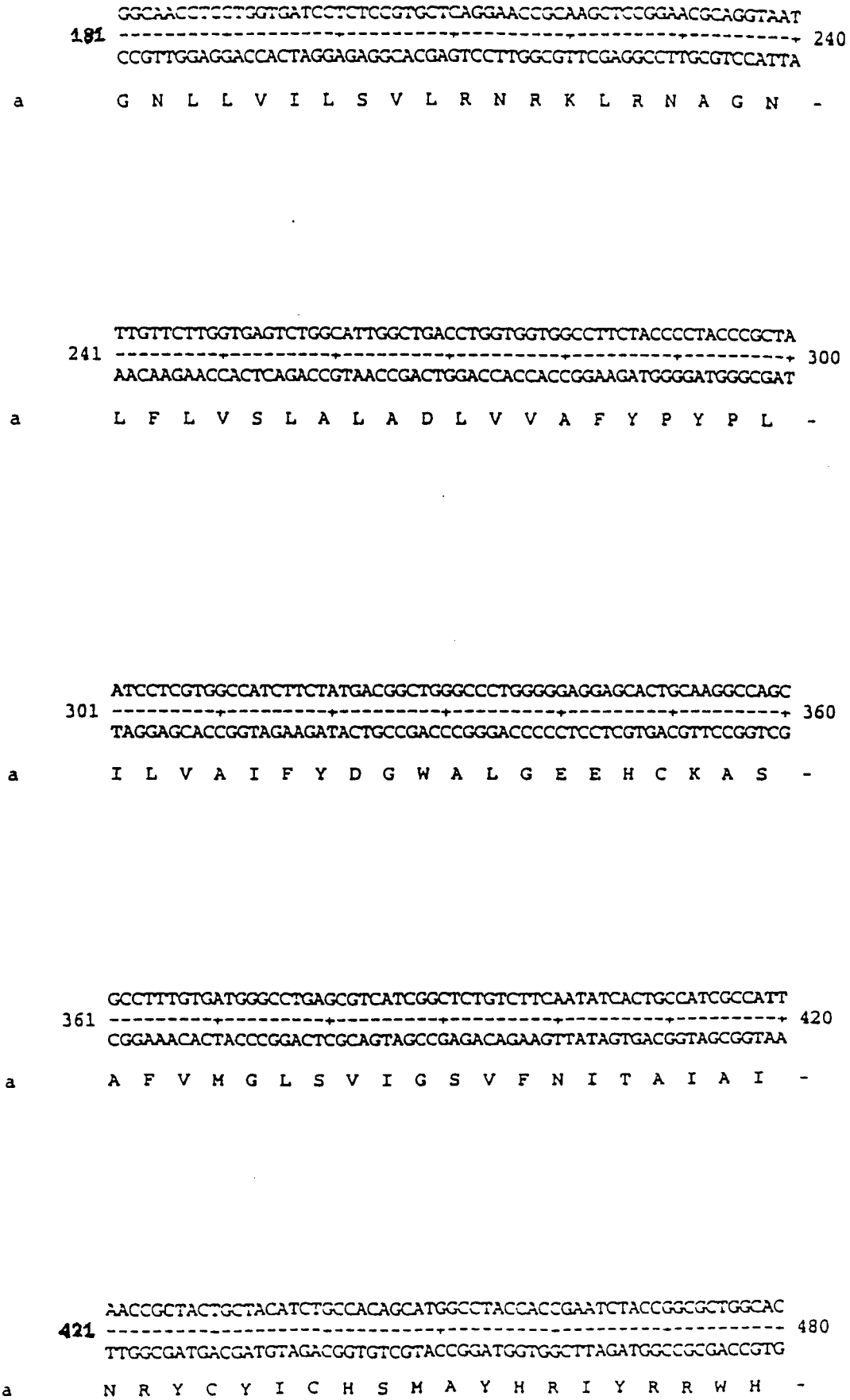

GGCAACCTCCTGGTGATCCTCTCCGTGCTCAGGAACCGCAAGCTCCGGAACGCAGGTAAT
181
240
CCGTTGGAGGACCACTAGGAGAGGCACGAGTCCTTGGCGTTCGAGGCCTTGCGTCCATTA
a G N L L V I L S V L R N R K L R N A G N -
TTGTTCTTGGTGAGTCTGGCATTGGCTGACCTGGTGGTGGCCTTCTACCCCTACCCGCTA
241
300
AACAAGAACCACTCAGACCGTAACCGACTGGACCACCACCGGAAGATGGGGATGGGCGAT
a L F L V S L A L A D L V V A F Y P Y P L -
ATCCTCGTGGCCATCTTCTATGACGGCTGGGCCCTGGGGGAGGAGCACTGCAAGGCCAGC
301
360
TAGGAGCACCGGTAGAAGATACTGCCGACCCGGGACCCCCTCCTCGTGACGTTCCGGTCG
a I L V A I F Y D G W A L G E E H C K A S -
GCCTTTGTGATGGGCCTGAGCGTCATCGGCTCTGTCTTCAATATCACTGCCATCGCCATT
361
420
CGGAAACACTACCCGGACTCGCAGTAGCCGAGACAGAAGTTATAGTGACGGTAGCGGTAA
a A F V M G L S V I G S V F N I T A I A I -
AACCGCTACTGCTACATCTGCCACAGCATGGCCTACCACCGAATCTACCGGCGCTGGCAC
421
480
TTGGCGATGACGATGTAGACGGTGTCGTACCGGATGGTGGCTTAGATGGCCGCGACCGTG
a N R Y C Y I C H S M A Y H R I Y R R W H -

Fig. 6 (jatkoa)

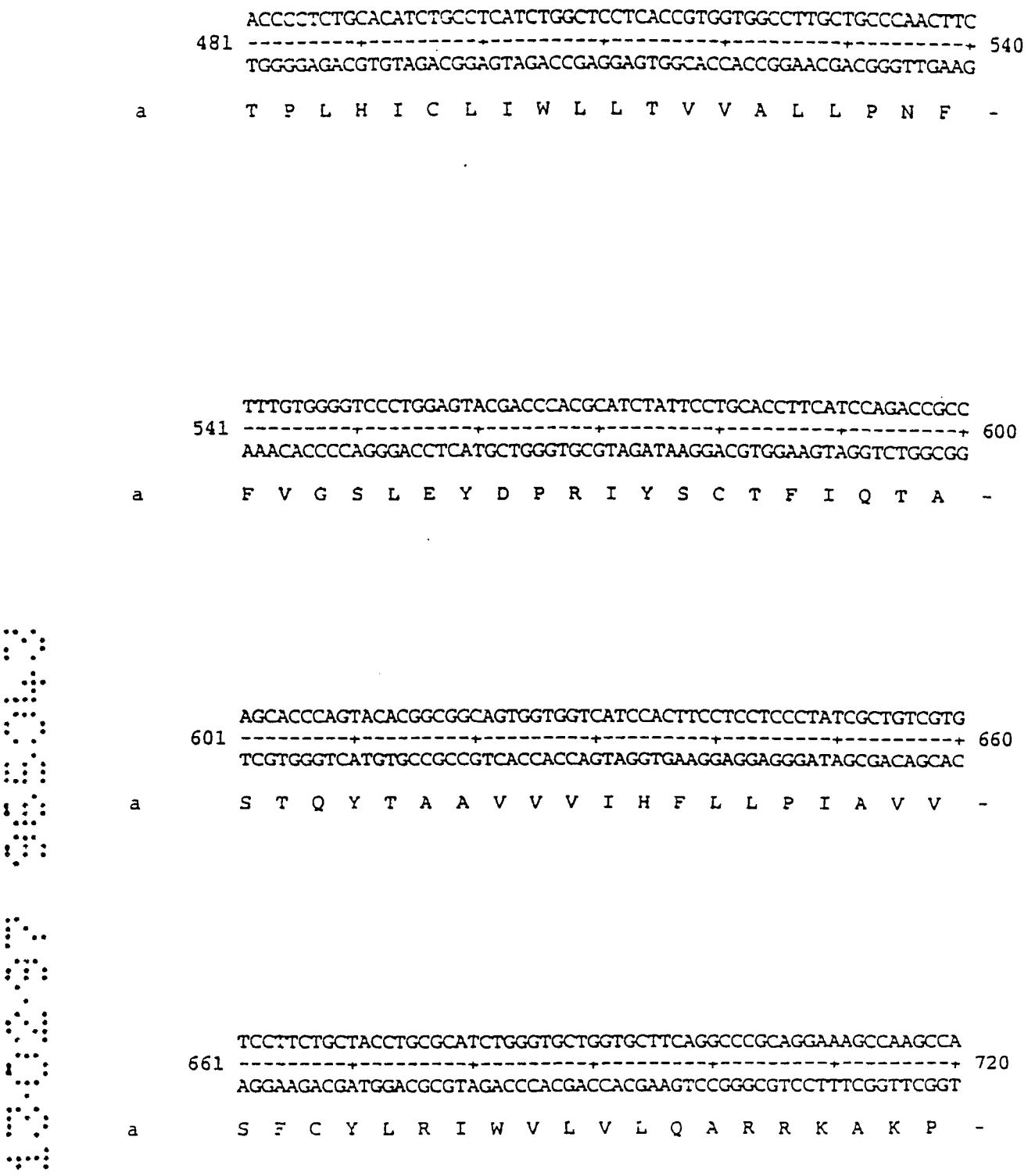

ACCCCTCTGCACATCTGCCTCATCTGGCTCCTCACCGTGGTGGCCTTGCTGCCCAACTTC
481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 540
TGGGGAGACGTGTAGACGGAGTAGACCGAGGAGTGGCACCACCGGAACGACGGGTTGAAG
a T P L H I C L I W L L T V V A L L P N F -
TTTGTGGGGTCCCTGGAGTACGACCCACGCATCTATTCCTGCACCTTCATCCAGACCGCC
541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
AAACACCCCAGGGACCTCATGCTGGGTGCGTAGATAAGGACGTGGAAGTAGGTCTGGCGG
a F V G S L E Y D P R I Y S C T F I Q T A -
AGCACCCAGTACACGGCGGCAGTGGTGGTCATCCACTTCCTCCTCCCTATCGCTGTCGTG
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660
TCGTGGGTCATGTGCCGCCGTCACCACCAGTAGGTGAAGGAGGAGGGATAGCGACAGCAC
a S T Q Y T A A V V V I H F L L P I A V V -
TCCTTCTGCTACCTGCGCATCTGGGTGCTGGTGCTTCAGGCCCGCAGGAAAGCCAAGCCA
661 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 720
AGGAAGACGATGGACGCGTAGACCCACGACCACGAAGTCCGGGCGTCCTTTCGGTTCGGT
a S F C Y L R I W V L V L Q A R R K A K P -

Fig. 6 (jatkoa)

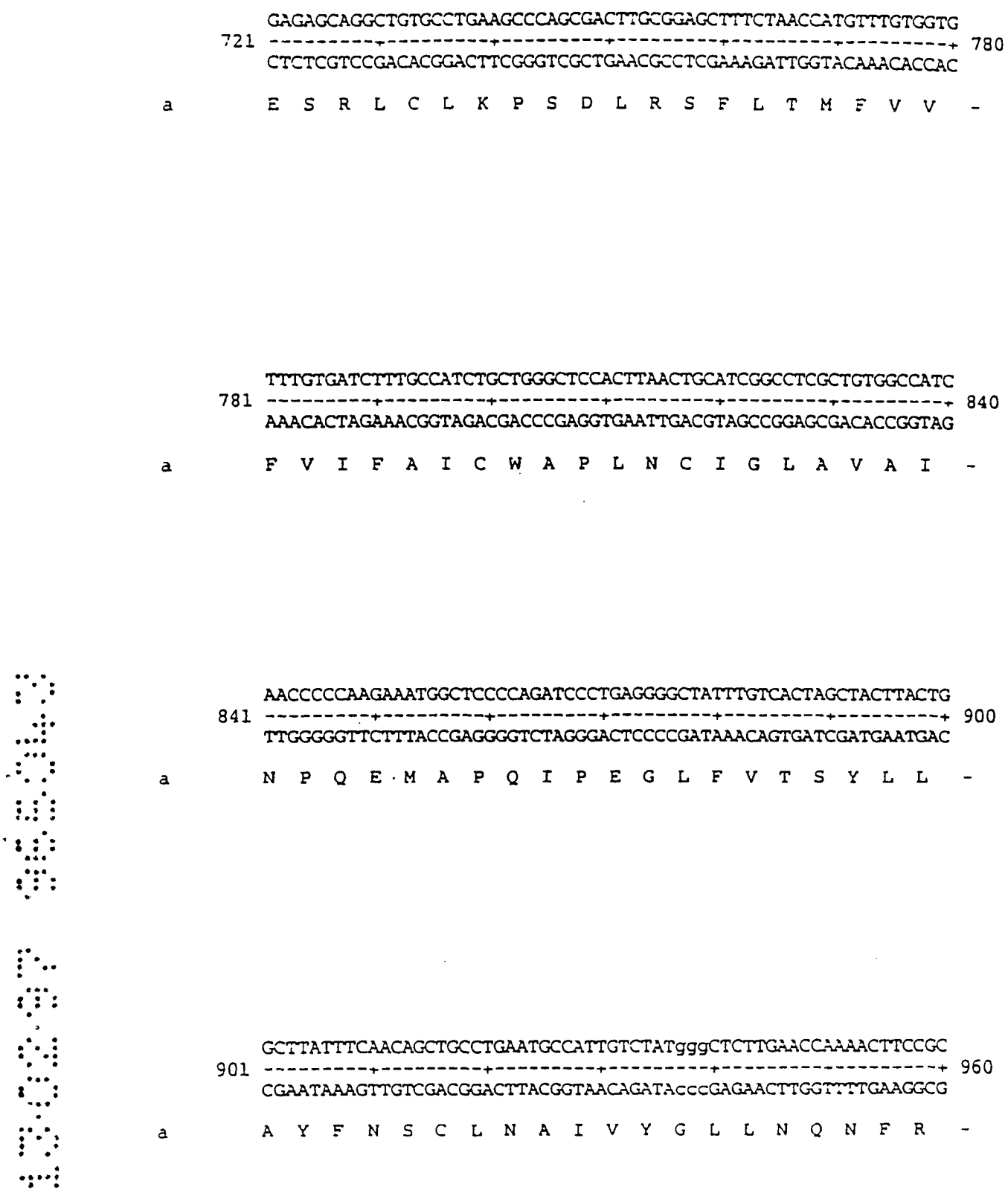

GAGAGCAGGCTGTGCCTGAAGCCCAGCGACTTGCGGAGCTTTCTAACCATGTTTGTGGTG
721
780
CTCTCGTCCGACACGGACTTCGGGTCGCTGAACGCCTCGAAAGATTGGTACAAACACCAC
a E S R L C L K P S D L R S F L T M F V V -
TTTGTGATCTTTGCCATCTGCTGGGCTCCACTTAACTGCATCGGCCTCGCTGTGGCCATC
781
840
AAACACTAGAAACGGTAGACGACCCGAGGTGAATTGACGTAGCCGGAGCGACACCGGTAG
a F V I F A I C W A P L N C I G L A V A I -
AACCCCCAAGAAATGGCTCCCCAGATCCCTGAGGGGCTATTTGTCACTAGCTACTTACTG
841
900
TTGGGGGTTCTTTACCGAGGGGTCTAGGGACTCCCCGATAAACAGTGATCGATGAATGAC
a N P Q E M A P Q I P E G L F V T S Y L L -
GCTTATTTCAACAGCTGCCTGAATGCCATTGTCTATgggCTCTTGAACCAAAACTTCCGC
901
960
CGAATAAAGTTGTCGACGGACTTACGGTAACAGATAcccGAGAACTTGGTTTTGAAGGCG
a A Y F N S C L N A I V Y G L L N Q N F R -

Fig. 6 (jatkoa)

```
          AGGGAATACAAGAGGATCCTCTTGGCCCTTTGGAACCCACGGCACTGCATTCAAGATGCT
      961 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1020
          TCCCTTATGTTCTCCTAGGAGAACCGGGAAACCTTGGGTGCCGTGACGTAAGTTCTACGA

a             R  E  Y  K  R  I  L  L  A  L  W  N  P  R  H  C  I  Q  D  A  -

          TCCAAGGGCAGCCACGCGGAGGGGCTGCAGAGCCCAGCTCCACCCATCATTGGTGTGCAG
     1021 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 1080
          AGGTTCCCGTCGGTGCGCCTCCCCGACGTCTCGGGTCGAGGTGGGTAGTAACCACACGTC

a             S  K  G  S  H  A  E  G  L  Q  S  P  A  P  P  I  I  G  V  Q  -

          CACCAGGCAGATGCTCTCTAGCCTG  Sekvenssi nro 15
     1081 ---------+---------+----- 1105
          GTGGTCCGTCTACGAGAGATCGGAC

a             H  Q  A  D  A  L  *   Sekvenssi nro 16
```

Fig. 7

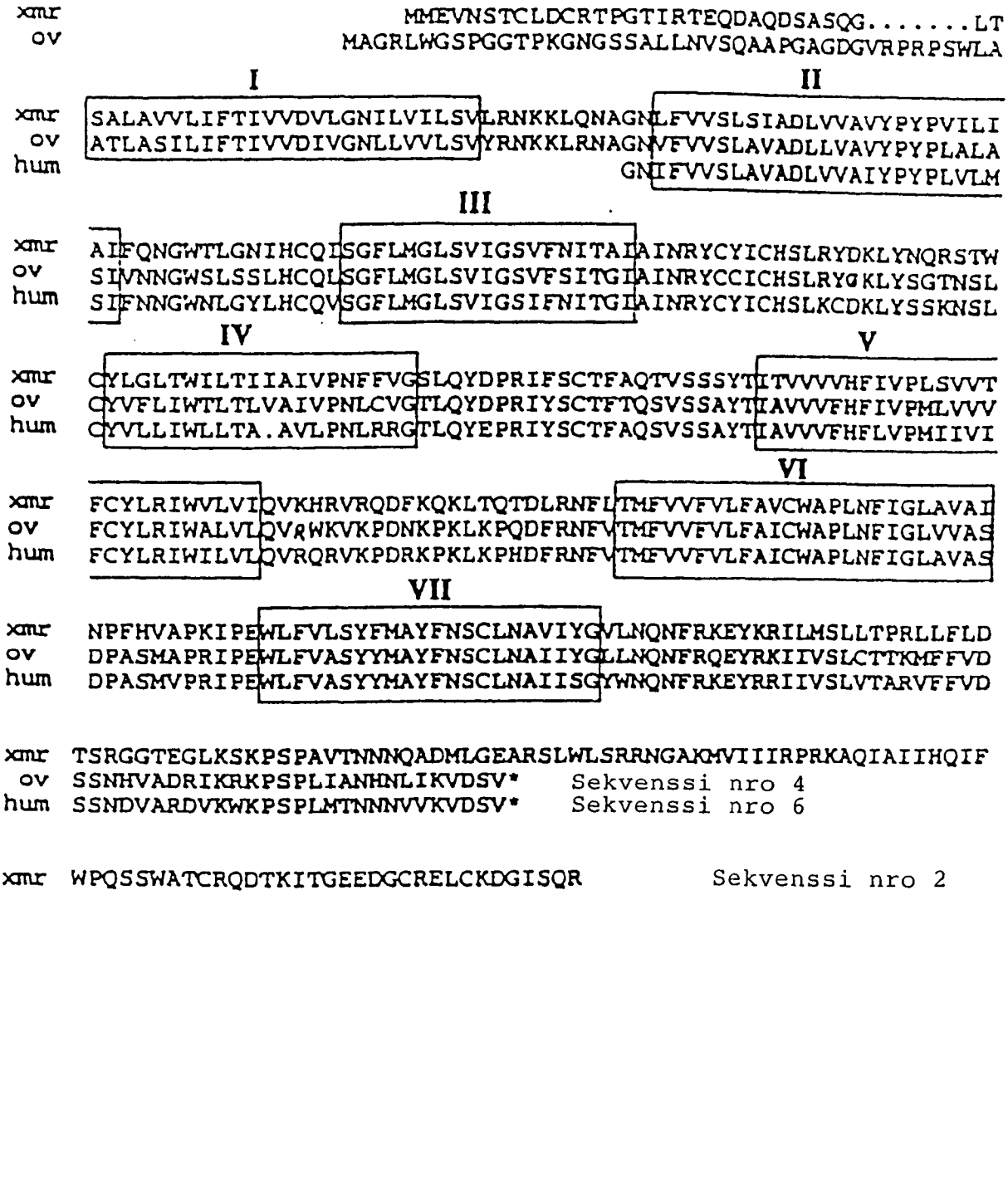

xmr MMEVNSTCLDCRTPGTIRTEQDAQDSASQG.....LT
ov MAGRLWGSPGGTPKGNGSSALLNVSQAAPGAGDGVRPRPSWLA
I
II
xmr SALAVVLIFTIVVDVLGNILVILSVLRNKKLQNAGNLFVVSLSIADLVVAVYPYPVILI
ov ATLASILIFTIVVDIVGNLLVVLSVYRNKKLRNAGNVFVVSLAVADLLVAVYPYPLALA
hum GNIFVVSLAVADLVVAIYPYPLVLM
III
xmr AIFQNGWTLGNIHCQISGFLMGLSVIGSVFNITAIAINRYCYICHSLRYDKLYNQRSTW
ov SIVNNGWSLSSLHCQLSGFLMGLSVIGSVFSITGIAINRYCCICHSLRYGKLYSGTNSL
hum SIFNNGWNLGYLHCQVSGFLMGLSVIGSIFNITGIAINRYCYICHSLKCDKLYSSKNSL
IV
V
xmr CYLGLTWILTIIAIVPNFFVGSLQYDPRIFSCTFAQTVSSSYTITVVVVHFIVPLSVVT
ov CYVFLIWTLTLVAIVPNLCVGTLQYDPRIYSCTFTQSVSSAYTIAVVVFHFIVPMLVVV
hum CYVLLIWLLTA.AVLPNLRRGTLQYEPRIYSCTFAQSVSSAYTIAVVVFHFLVPMIIVI
VI
xmr FCYLRIWVLVIQVKHRVRQDFKQKLTQTDLRNFLTMFVVFVLFAVCWAPLNFIGLAVAI
ov FCYLRIWALVLQVRWKVKPDNKPKLKPQDFRNFVTMFVVFVLFAICWAPLNFIGLVVAS
hum FCYLRIWILVLQVRQRVKPDRKPKLKPHDFRNFVTMFVVFVLFAICWAPLNFIGLAVAS
VII
xmr NPFHVAPKIPEWLFVLSYFMAYFNSCLNAVIYGVLNQNFRKEYKRILMSLLTPRLLFLD
ov DPASMAPRIPEWLFVASYYMAYFNSCLNAIIYGLLNQNFRQEYRKIIVSLCTTKMFFVD
hum DPASMVPRIPEWLFVASYYMAYFNSCLNAIISGYWNQNFRKEYRRIIVSLVTARVFFVD
xmr TSRGGTEGLKSKPSPAVTNNNQADMLGEARSLWLSRRNGAKMVIIIRPRKAQIAIIHQIF
ov SSNHVADRIKRKPSPLIANHNLIKVDSV* Sekvenssi nro 4
hum SSNDVARDVKWKPSPLMTNNNVVKVDSV* Sekvenssi nro 6
xmr WPQSSWATCRQDTKITGEEDGCRELCKDGISQR Sekvenssi nro 2

Fig. 8

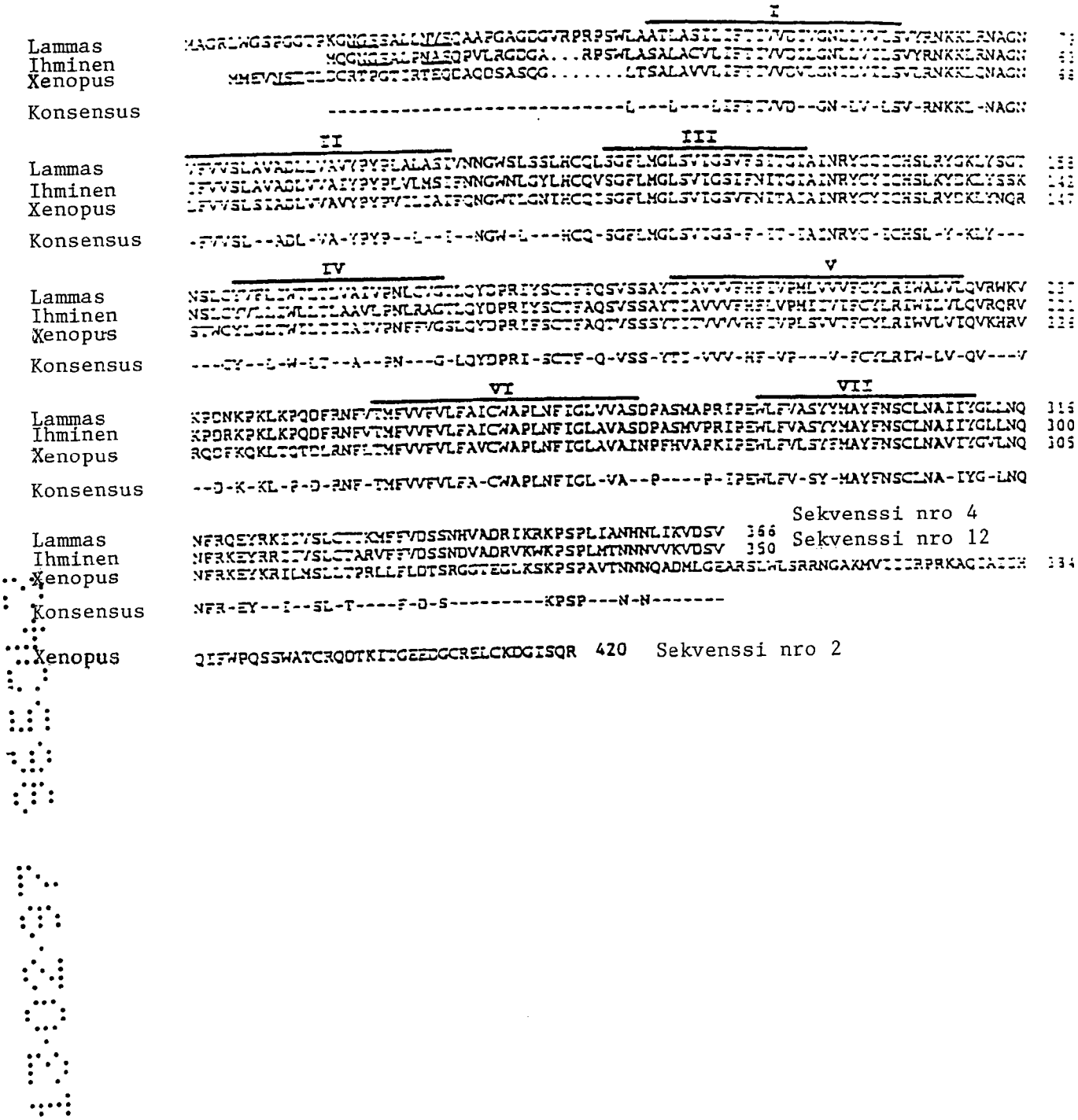

I
II
III
IV
V
VI
VII
Lammas
Ihminen
Xenopus
Konsensus
Sekvenssi nro 4
Sekvenssi nro 12
Sekvenssi nro 2

Fig. 9

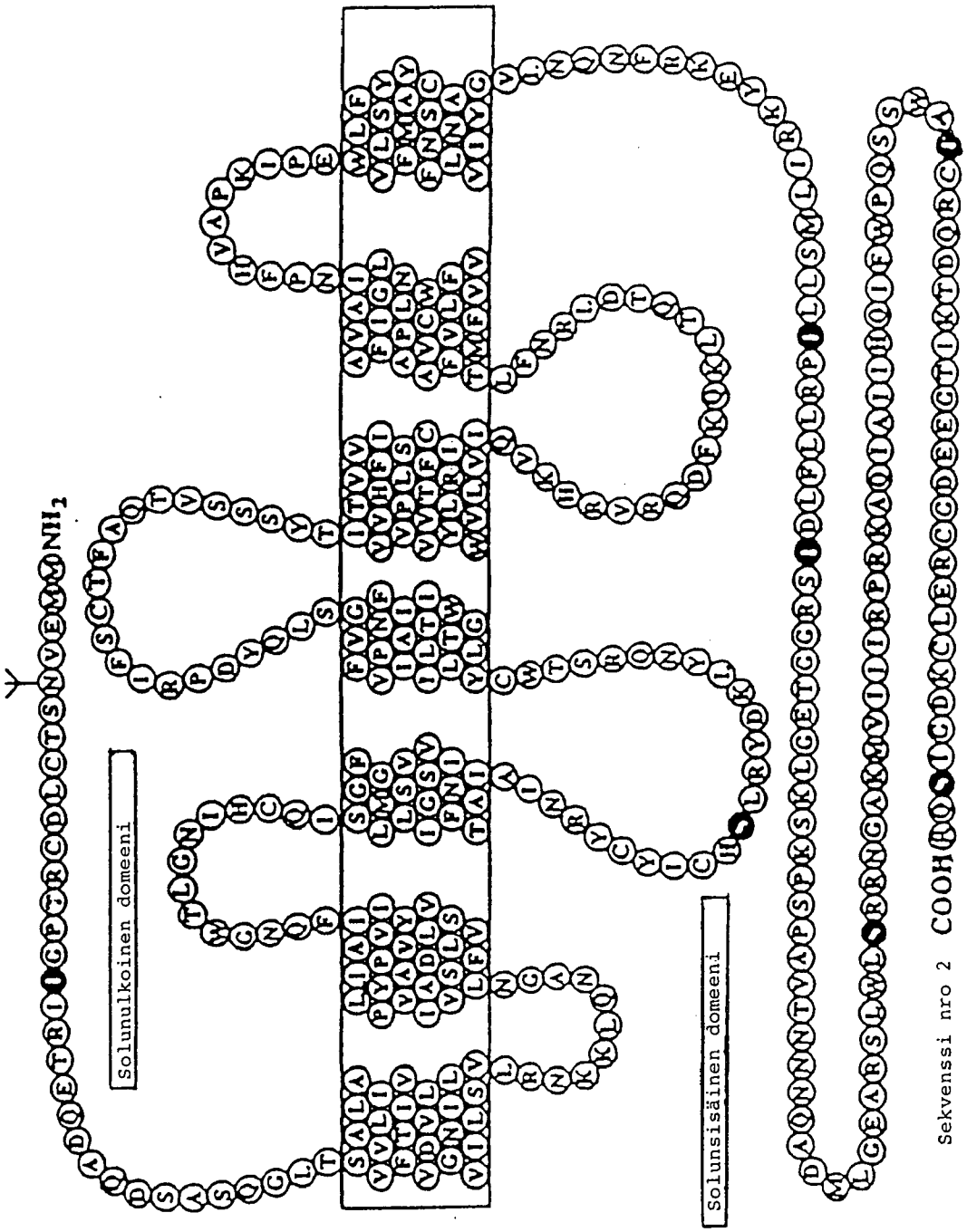

Solunulkoinen domeeni
Solunsisäinen domeeni
Sekvenssi nro 2

Fig. 10a

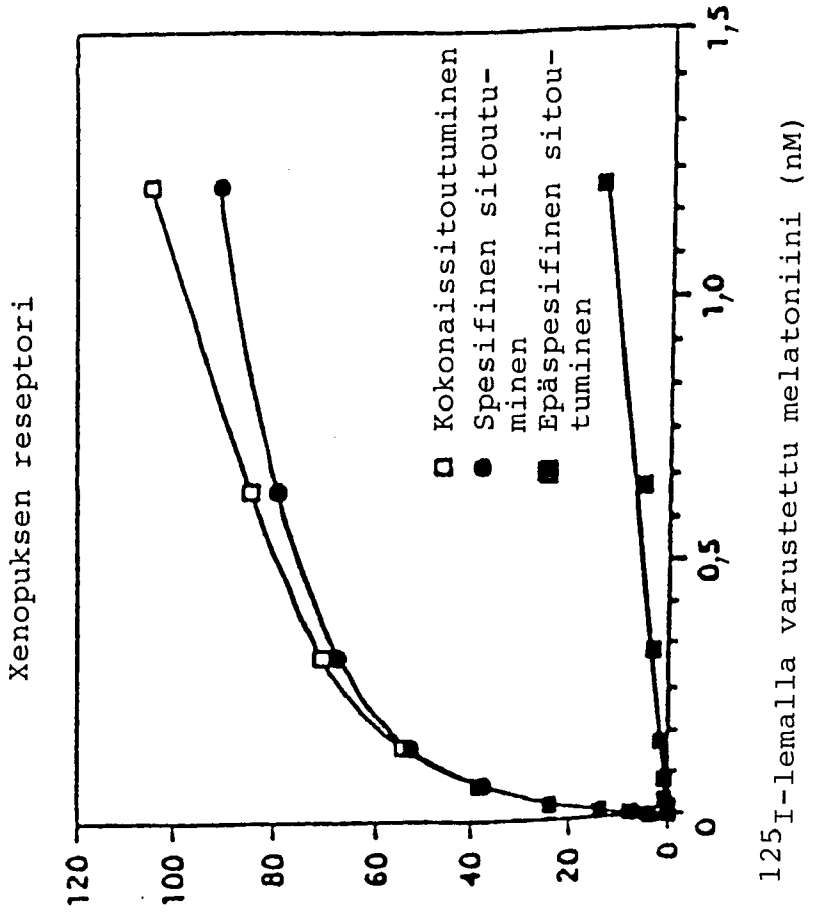

Xenopuksen reseptori
Kokonaissitoutuminen
Spesifinen sitoutuminen
Epäspesifinen sitoutuminen
120
100
80
60
40
20
0
0,5
1,0
1,5
^{125}I-lemalla varustettu melatoniini (nM)
Sitoutunut ^{125}I-leimalla varustettu melatoniini (fmol/mg proteiinia)

Fig. 10b

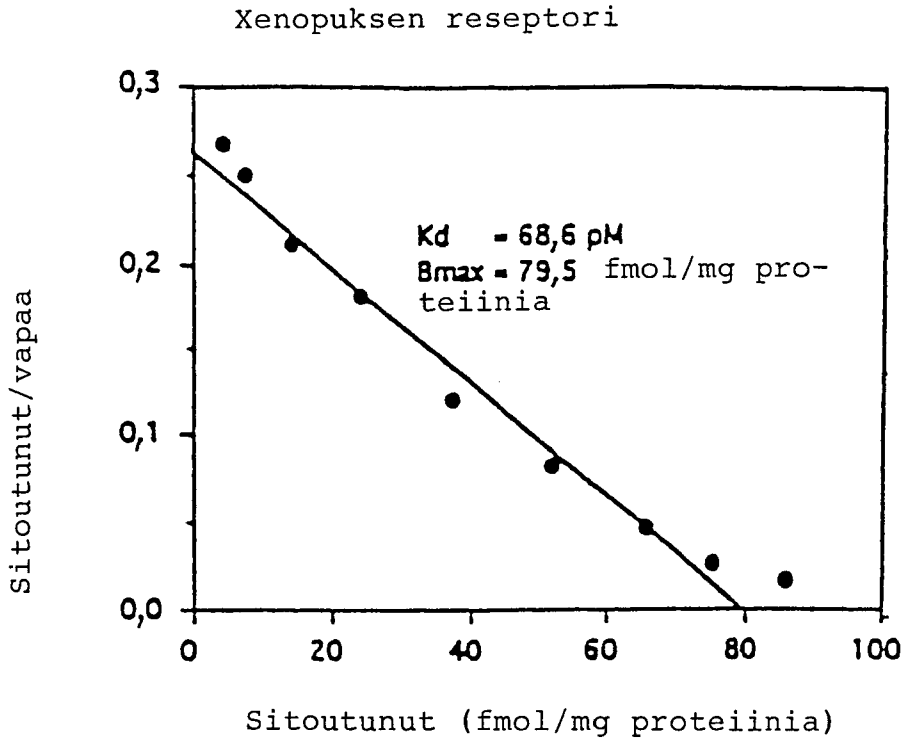

Xenopuksen reseptori
Kd = 68,6 pM
Bmax = 79,5 fmol/mg proteiinia
Sitoutunut/vapaa
Sitoutunut (fmol/mg proteiinia)
0,3
0,2
0,1
0,0
0
20
40
60
80
100

Fig. 11

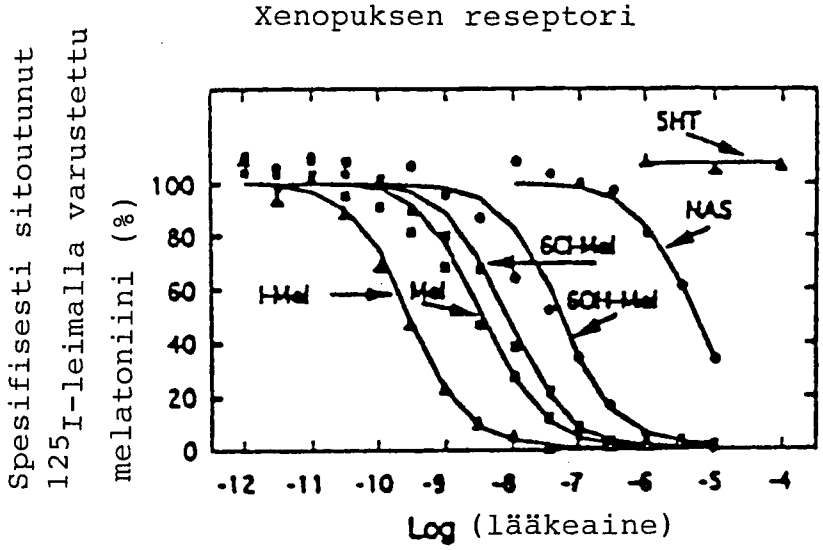

Xenopuksen reseptori
Spesifisesti sitoutunut
125I-leimalla varustettu
melatoniini (%)
100
80
60
40
20
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
-4
Log (lääkeaine)
5HT
NAS
6CH-Mel
Mel
6CH-Mel

Fig. 12

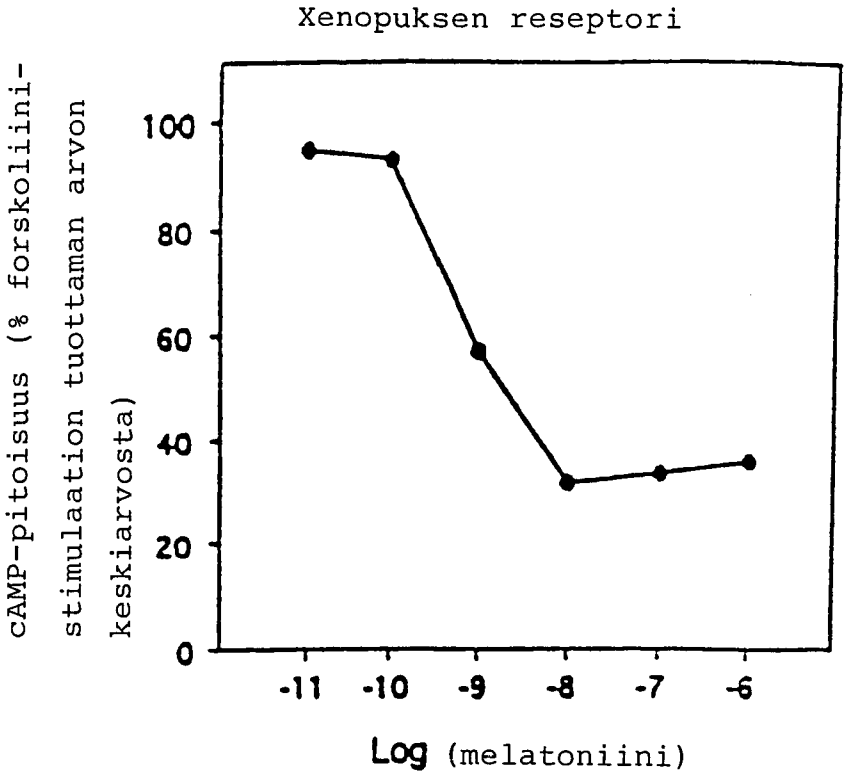

Xenopuksen reseptori
cAMP-pitoisuus (% forskoliini-stimulaation tuottaman arvon keskiarvosta)
100
80
60
40
20
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
Log (melatoniini)

Fig. 13

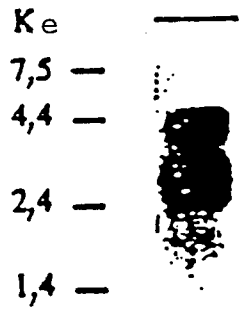
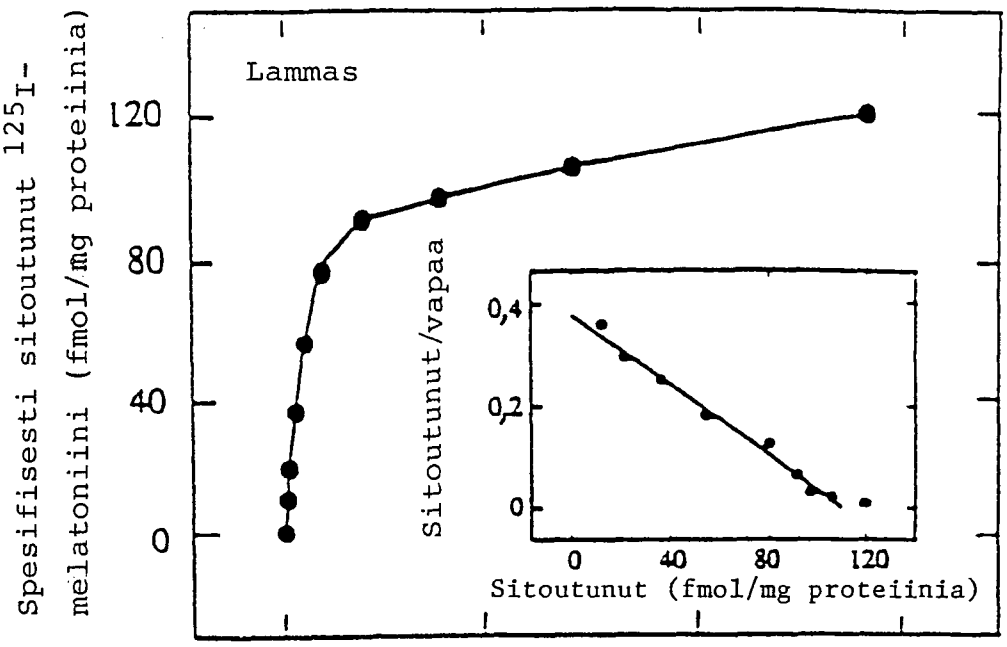


Fig. 14

14a



14b

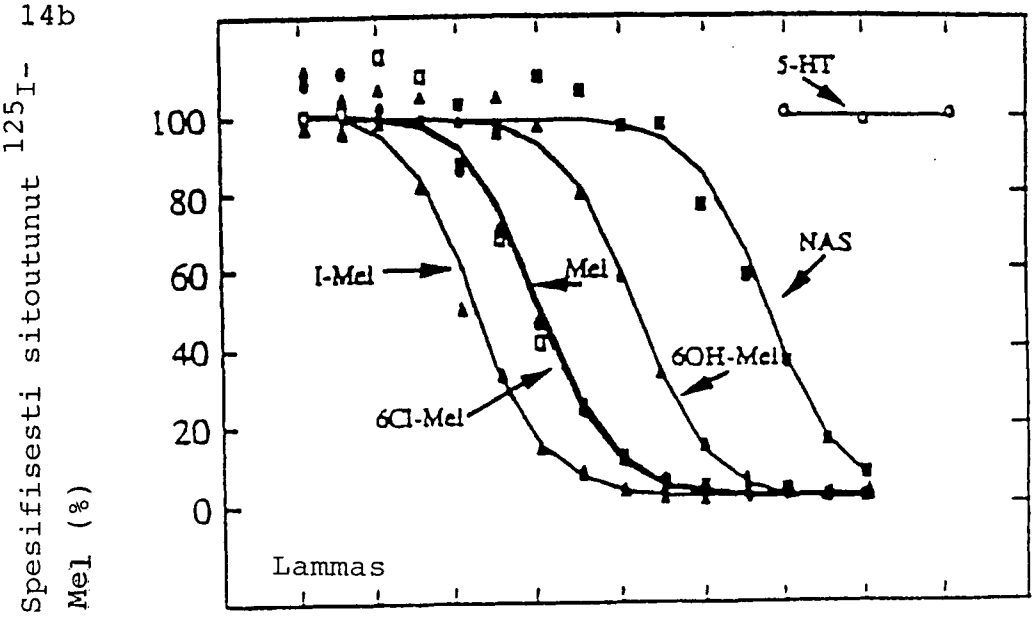
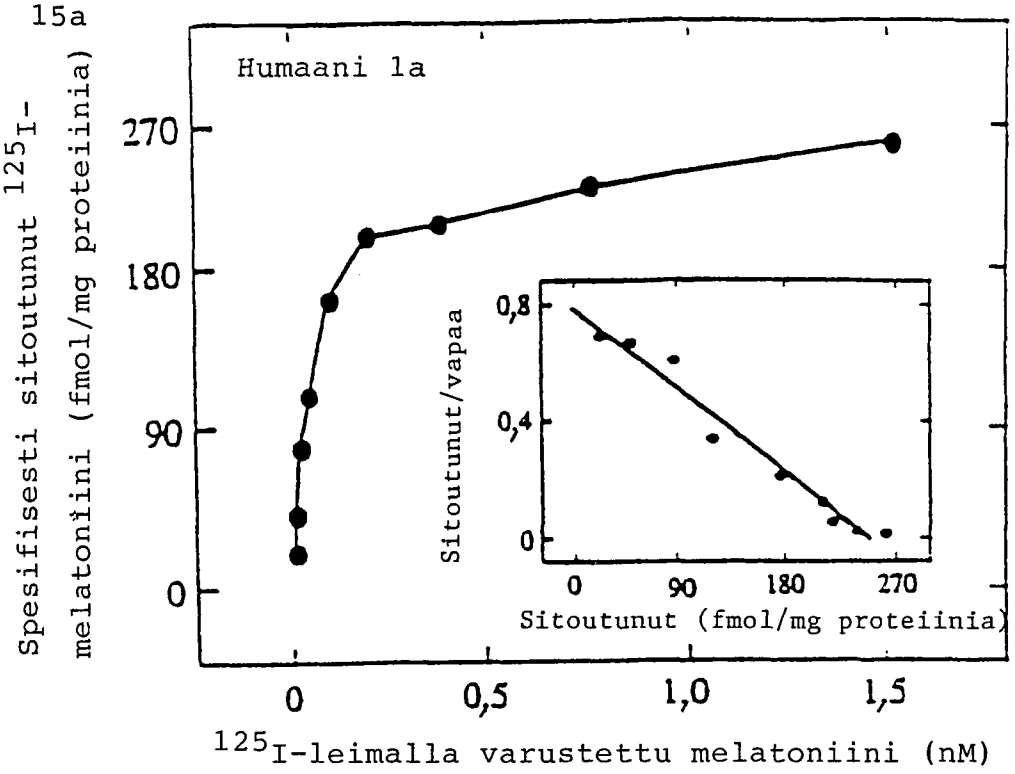


Fig. 15

15a



15b

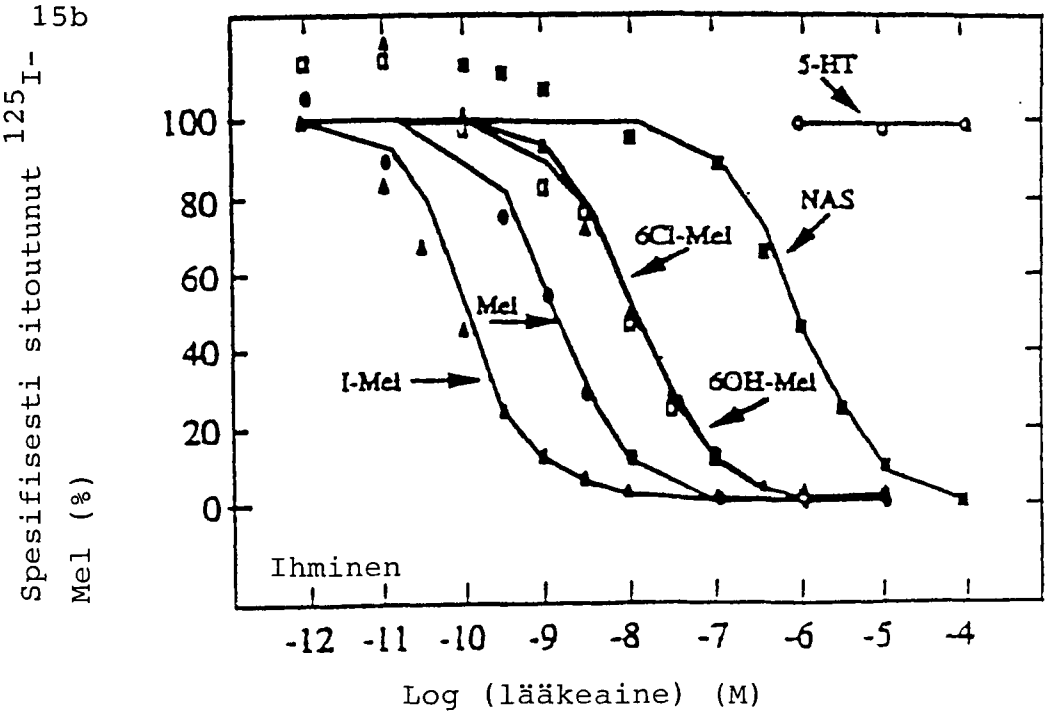
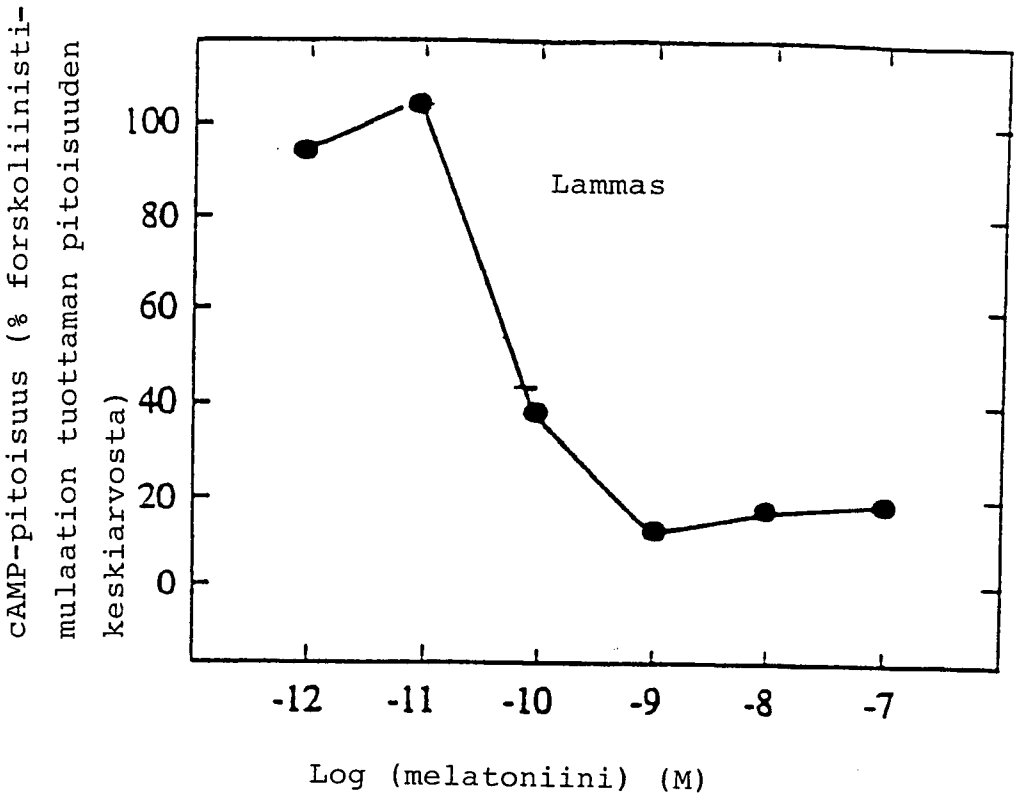


Fig. 16

16a



16b

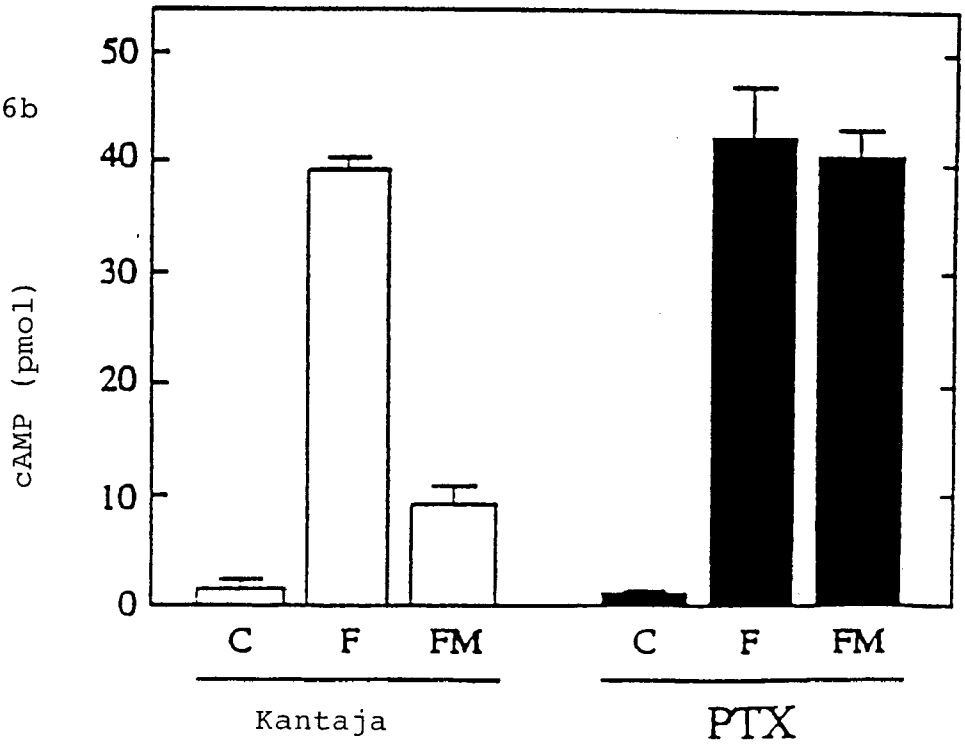
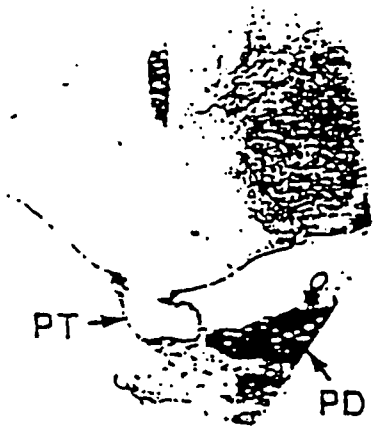


Fig. 17

Histologinen määritys

^{125}I-Mel:n sitoutuminen

mRNA







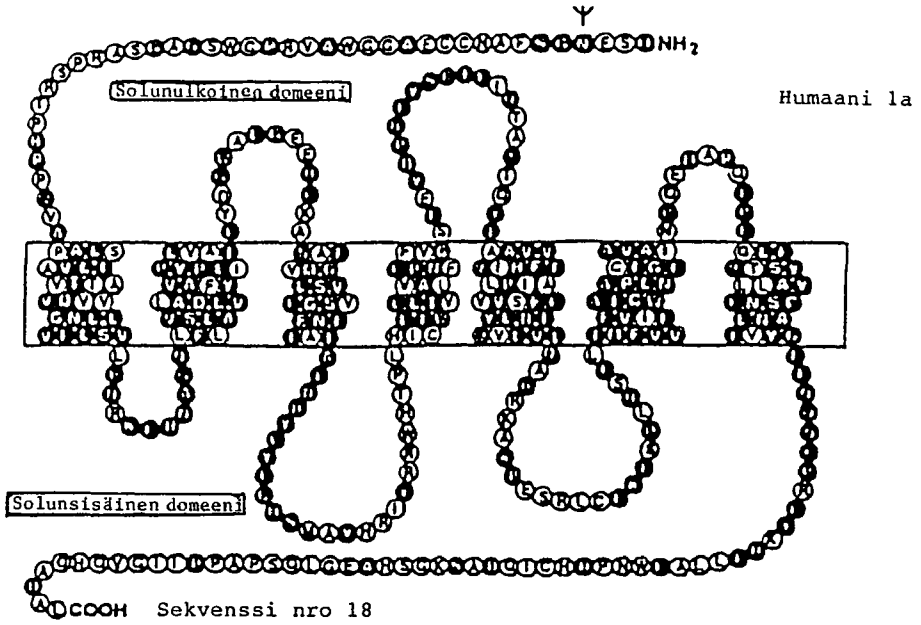
17a

17b

17c

Fig. 18

18a



18b

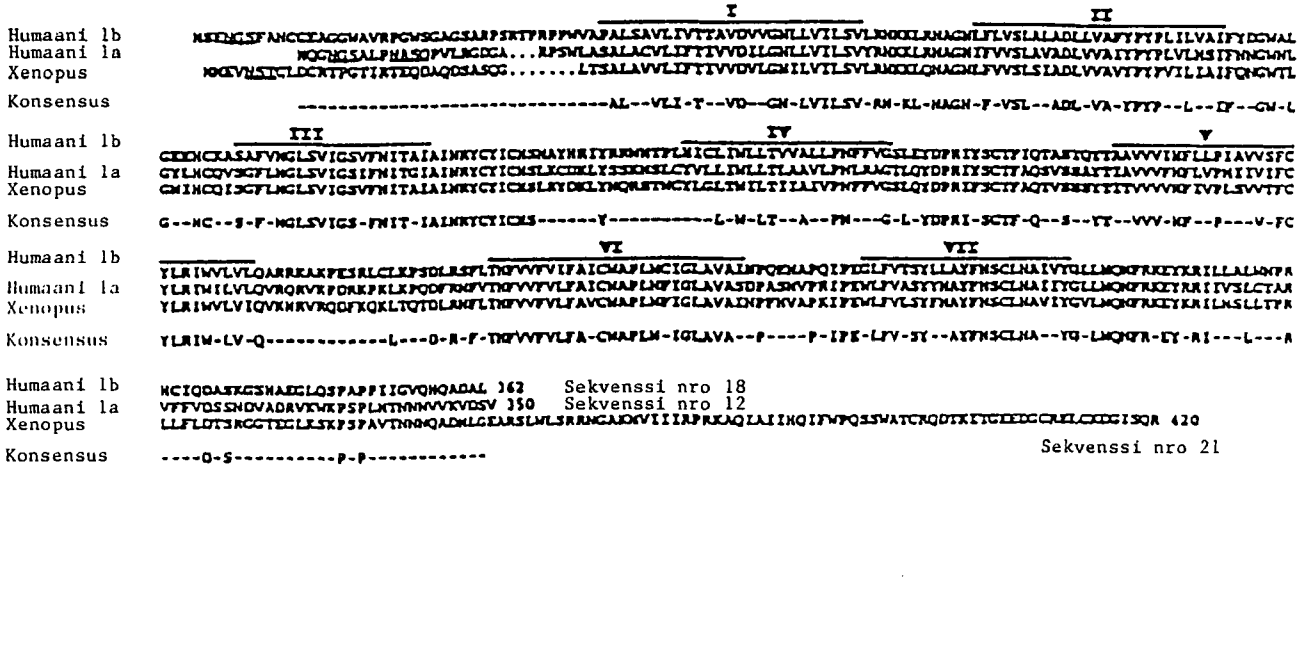


Fig. 19

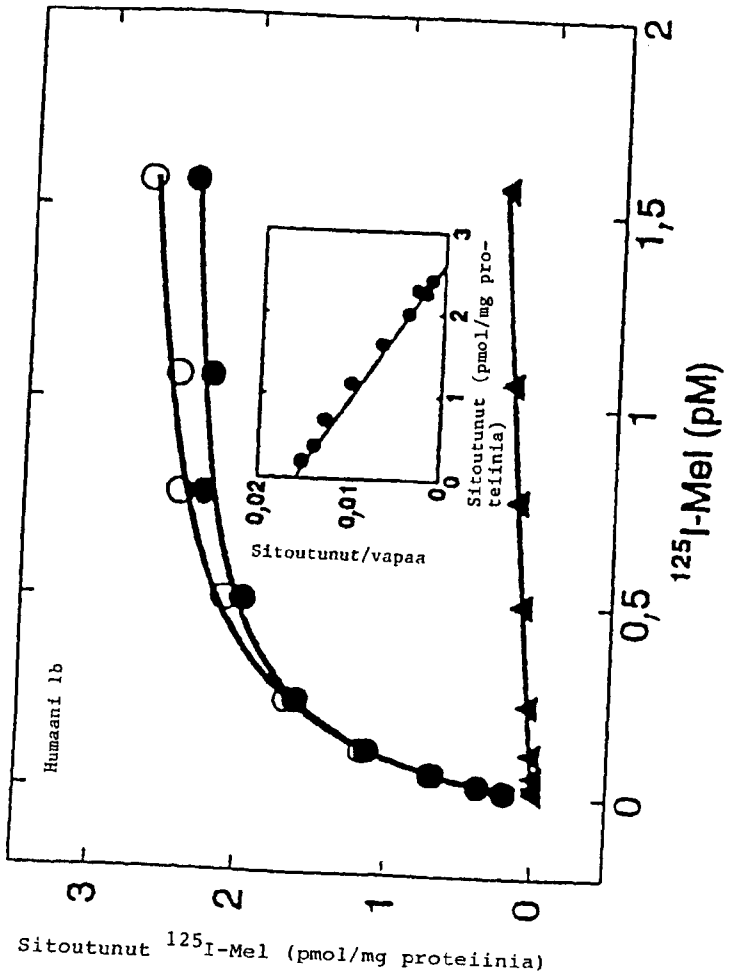

Humaani 1b
Sitoutunut/vapaa
Sitoutunut (pmol/mg proteiinia)
^{125}I-MeI (pM)
Sitoutunut ^{125}I-MeI (pmol/mg proteiinia)

Fig. 20

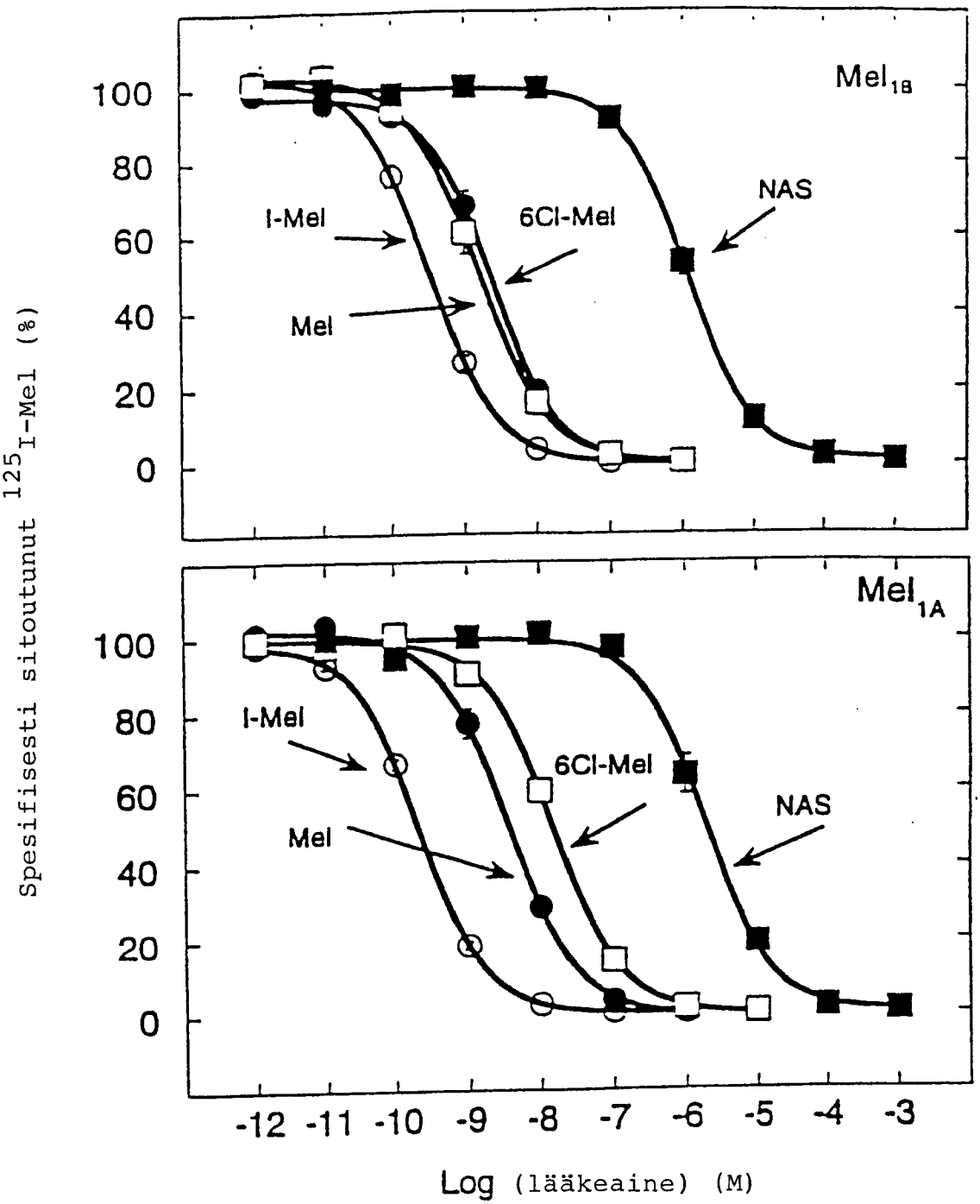

Mel1B
Mel1A
I-Mel
6Cl-Mel
Mel
NAS
100
80
60
40
20
0
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3
Spesifisesti sitoutunut 125I-Mel (%)
Log (lääkeaine) (M)

Fig. 21

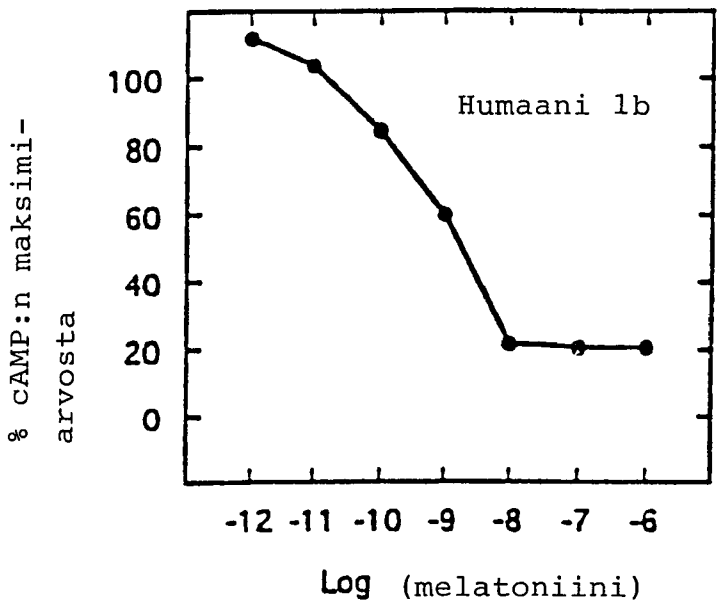

% cAMP:n maksimi-
arvosta
100
80
60
40
20
0
Humaani 1b
-12 -11 -10 -9 -8 -7 -6
Log (melatoniini)

Fig. 22

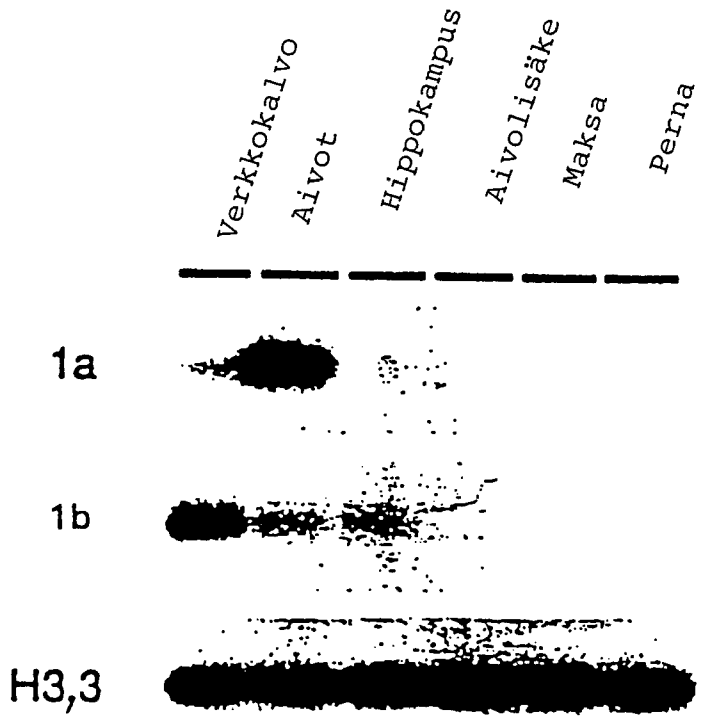
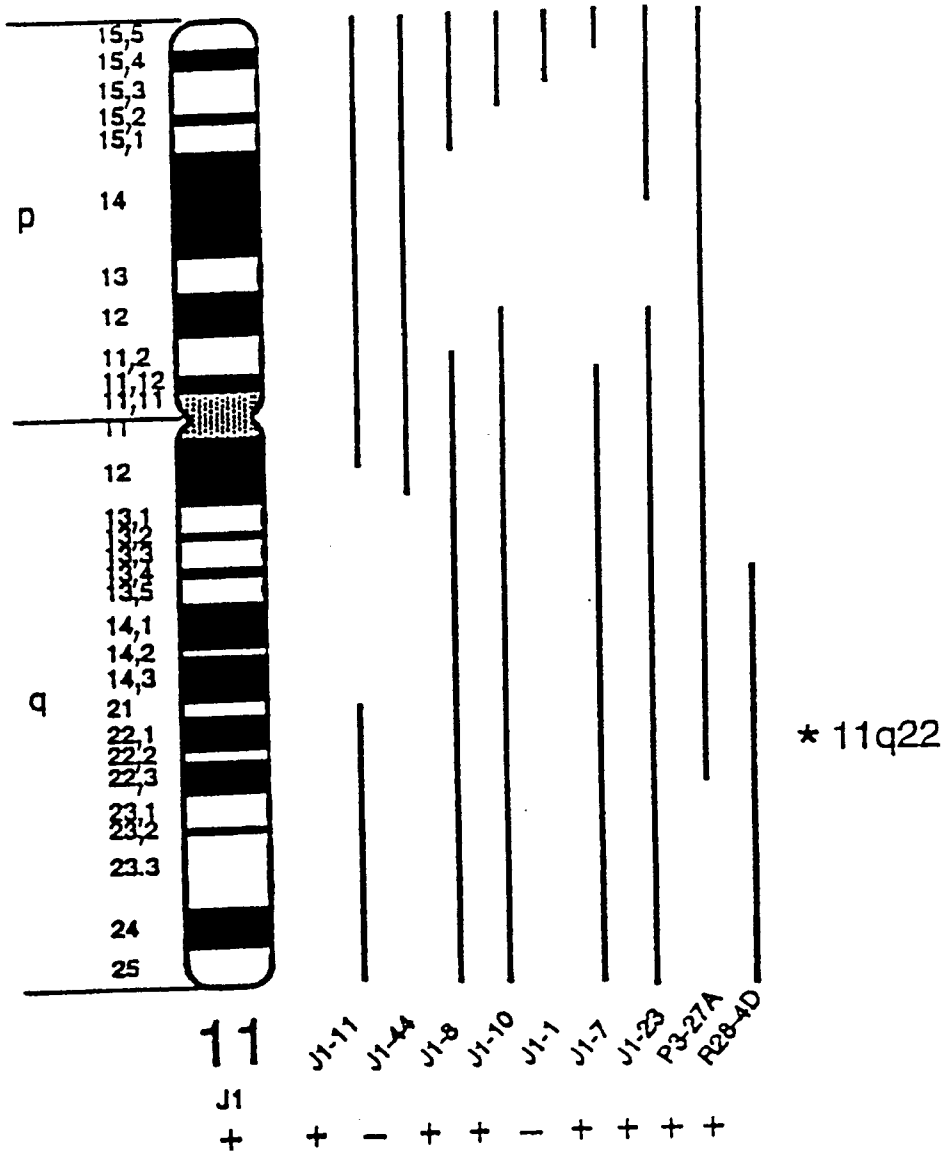

Verkkokalvo
Aivot
Hippokampus
Aivolisäke
Maksa
Perna
1a
1b
H3,3

Fig. 23


p
q
15,5
15,4
15,3
15,2
15,1
14
13
12
11,2
11,12
11,11
11
12
13,1
14,1
14,2
14,3
21
22,1
22,2
22,3
23,1
23,2
23.3
24
25
11
J1
J1-11
J1-44
J1-8
J1-10
J1-1
J1-7
J1-23
P3-27A
R28-4D
+ + − + + − + + + +
* 11q22