

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Adéla Hovorková**

Vliv pineálního hormonu melatoninu na produkci inzulínu

The effect of pineal melatonin on insulin production

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: Doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha 2022

## **Poděkování**

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za příjemnou spolupráci, ochotu, trpělivost a za všechny čas, který mi během psaní práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům, kteří mě při celém procesu podporovali.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 30. dubna 2022

---

Adéla Hovorková

## Abstrakt

Produkce a sekrece inzulínu jsou závislé na cirkadiálních rytmech. Ty jsou řízeny endogenními cirkadiálními hodinami, které jsou ovlivněny vnějšími podněty jako je světlo a tma. Centrální hodiny, řídící synchronizaci rytmických dějů v organismu, jsou tvořeny strukturou tzv. suprachiasmatického jádra. Vylučování melatoninu neboli hormonu noci, je řízeno centrálními hodinami a slouží k jejich synchronizaci s hodinami periferními. Ty se nachází např. ve slinivce břišní, játrech, nebo jiných orgánech. Ve slinivce se nachází tzv. Langerhansovy ostrůvky, tvořené  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ - buňkami. Tyto buňky hrají významnou roli při udržení glykémie, neboť produkují hormony inzulín a glukagon, které jsou zásadní pro regulaci hladiny glukózy v krvi.

V této práci je popsáno, jak narušení cirkadiálního systému světelným pulzem v noci ovlivňuje sekreci inzulínu. Důsledkem fázového posunu je anomální sekrece melatoninu, která inhibuje sekreci inzulínu a v konečném důsledku zapříčiňuje zvýšení koncentrace glukózy v krvi. Hyperglykemie a inzulínová rezistence jako důsledek dlouhodobého narušení rytmu může vést až k diabetu 2. typu.

**Klíčová slova:** cirkadiální rytmy, SCN, melatonin, MT1 receptor, MT2 receptor,  $\beta$ -buňky, inzulín, glukagon, inzulínová rezistence, diabetes 2. typu

## **Abstract**

Both production and secretion of insulin depend on the circadian rhythms. These are set by the internal circadian clock reacting to the external stimuli such as the light or the darkness. The central clock synchronization of the rhythmic processes in the organism is formed by the structure so-called suprachiasmatic nucleus. Secretion of melatonin, aka “hormone of the night,” is controlled by the central clock and serves to align them with the peripheral clocks. Peripheral clocks are located, for example, in pancreas, liver or other body organs. Langerhans’ islets in pancreas consist of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cells. These play an important role in maintaining glucose homeostasis as they produce hormones insulin and glucagon, key blood glucose level regulators.

This text describes how the corruption of circadian system by a light pulse at night impacts insulin secretion. A phase shift results in melatonin secretion anomaly (increase), which inhibits insulin levels and thus gives rise to elevated glucose levels. Hyperglycaemia and insulin resistance because of a long-term rhythm corruption may result in type 2 diabetes.

**Key words:** circadian rhythm, SCN, melatonin, MT1 receptor, MT2 receptor,  $\beta$ -cell, insulin, glucagon, insulin resistance, type 2. diabetes

## Seznam zkratek

AA-NAT	Arylalkylamine N-acetyltransferase
AC	Adenylyl cyclase
BMAL1/ <i>Bmal1</i>	Brain and muscle Amt-like protein/gen
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CK1 $\epsilon/\delta$	Casein kinase 1 $\epsilon$ or $\delta$
CLOCK/ <i>Clock</i>	Circadian locomotor output cycles kaput protein/gen
CREB	Calcium/cAMP response element binding protein 1
CRY/ <i>Cry1, Cry2</i>	Cryptochrom 1,2 protein/gen
DBP	D-box binding protein
FRK	Fázově-responzivní křivka
GABA	$\gamma$ -aminobutyric acid
GLUT2, GLUT4	Glucose transporter 2,4
5-HTP	5-hydroxytryptofan
IML	Intermediolateral cell column
IP3	Inositol trisphosphate
ipRGCs	Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells
mRNA	Messenger RNA
NE	Norepinephrine
NFIL3	Nuclear factor interleucin-3-regulated protein
PER/ <i>Per 1, Per 2, Per 3</i>	Period protein/gen
PI3K	Phosphoinositide 3- kinase
PKA	Protein kinase A
PKB (AKT)	Serin/threonin protein kinase B
PKG	Cyclic GMP–dependent protein kinase
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussis toxin
PVN	Paraventricular nucleus of hypothalamus

RHT	Retinohypotalamický trakt
ROR $\alpha$ , ROR $\beta$ , ROR $\gamma$ / <i>Ror</i>	Retinoid-related orphan receptor $\alpha$
RORE	ROR element protein
SCG	Superior cervical ganglion
SCN	Suprachiasmatic nucleus
TTFL	Transcription–translation feedback loop

# Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Cirkadiánní systém.....	1
1.2. Zpětnovazebná smyčka / molekulární mechanismy savců .....	2
1.2.1 Primární smyčka .....	2
1.2.2 Sekundární smyčka .....	3
1.2.3 Terciární smyčka.....	4
1.3 Hierarchická síť buněčných hodin .....	4
1.3.1 Suprachiasmatické jádro .....	4
1.3.2. Periferní hodiny .....	5
1.4 Světelná synchronizace .....	5
2. Melatonin .....	6
2.1 Epifýza .....	7
2.2 Biosyntéza melatoninu.....	7
2.3 Interakce SCN s epifýzou .....	8
3. Inzulín (a jeho antagonistu glukagon).....	9
3.1 Biosyntéza inzulínu a jeho funkce .....	9
3.2 Inzulínová rezistence .....	10
3.3 Glukagon.....	11
4. Vliv melatoninu na inzulín.....	12
4.1 Melatoninové receptory .....	12
4.2 Výskyt melatoninových receptorů .....	12
4.2.1. Oligomery melatoninových receptorů .....	13
4.3. Signalizační dráha melatoninových receptorů .....	13

4.3.1	Signalizační dráha melatoninových receptorů v $\beta$ -buňkách.....	15
4.3.2	Signalizační dráha melatoninových receptorů v $\alpha$ -buňkách a vliv na sekreci inzulínu .....	16
4.4.	Vazebná afinita melatoninu k MT1 a MT2 receptorům .....	17
4.5.	Cirkadiánní systém v pankreatu zprostředkovaný melatoninovými receptory .....	17
4.6	Změny v sekreci melatoninu vyvolané umělým světlem v noci a jejich vliv na sekreci inzulínu .....	18
5.	Závěr .....	19
6.	Citace .....	20



# 1. Úvod

Rozvoj lidské společnosti přináší mimo jiné i významné změny životního stylu. Přibylo stresu, je běžné pracovat dlouhé hodiny až do pozdního večera, ubylo zdravého pohybu na čerstvém vzduchu a volného času obecně. S tím úzce souvisí posun ve stravovacích zvycích směrem k vysoké kalorické hustotě konzumované často v nevhodnou dobu (večer/noc). Tyto masivní změny logicky představují velkou zátěž pro lidský organismus a jeho správnou funkci. Výsledkem je celá škála tzv. civilizačních nemocí, se kterými se současná populace potýká. Jednou z těch nejnebezpečnějších je diabetes (Tuomi et al. 2016), nejčastěji tzv. druhého typu, který se projevuje sníženou schopností organismu produkovat inzulín a narušeným transportem glukózy do buňky a jejím metabolickým využitím (inzulínová rezistence).

Glukózy musí být v krvi v každém okamžiku správné množství, které bude dopraveno k cílovým tkáním a tam správnou souhrou dvou antagonistických hormonů – inzulínu a glukagonu – zpřístupněno intracelulárnímu prostředí k využití. Metabolické dráhy jsou navíc regulovány vnitřními hodinami organismu řídicími cirkadiánními rytmy, jejichž narušení vnějšími vlivy má na citlivou rovnováhu signalizačních dějů nepříznivý vliv. Zejména této části se bude věnovat předkládaná bakalářská práce. Narušení cirkadiánního rytmu se – mimo jiné – projevuje anomáliemi ve vylučování hormonu melatoninu, který svou vazbou na receptory buněk zasahuje do signalizace tvorby a s největší pravděpodobností i využití inzulínu a glukagonu. Tím nepřímo ovlivňuje transportní chování glukózy. Pro boj s diabetem je pochopení tohoto zdroje inzulínové sekrece a posléze rezistence mimořádně důležité (la Fleur et al. 2001; McMullan et al. 2013).

## 1.1 Cirkadiánní systém

Slovo cirkadiánní je spojením latinských výrazů pro „zhruba“ (circa) a „den“ (diem) a vyjadřuje skutečnost, že cirkadiánní rytmus má periodu přibližně 24 hodin (Pittendrigh et al. 1993). Historie cirkadiánních hodin sahá do první poloviny osmnáctého století a francouzskému astronomu Jean Jacques Ortois de Marainovi. Na základě pozorování citlivky stydlivé, jejíž listy se otevíraly a zavíraly bez ohledu na absenci světla, vyslovil Ortois de Marain domněnku, že chování rostliny je řízeno jakýmsi vnitřními hodinami. Tento a následující pokusy prokázaly, že organismy nemusí být řízeny vnějšími časovými signály, ale mají vlastní sebeudržující biologické hodiny (Schibler

2007). Cirkadiánní rytmy sice přetrvávají při absenci vnějších signálů, ale přesto jsou tyto podněty důležité (Pittendrigh et al. 1976). Mají významnou roli v synchronizaci a udržování rytmu generovanému autoregulačními smyčkami tzv. „hodinových genů,“ které můžeme najít v houbách, rostlinách, hmyzu, zvířatech i lidech (Sato et al. 2004). Dnes již víme, že cirkadiánní systém hraje v organismu významnou roli. Je klíčový pro spánkové procesy i časování činností v bdělém stavu, kontroluje tělesnou teplotu, imunitní funkce a ovlivňuje příjem potravy a metabolismus (Korf and von Gall 2016).

## **1.2. Zpětnovazebná smyčka / molekulární mechanismy savců**

Podstatou molekulárních cirkadiánních hodin jsou tři provázané tzv. transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky (TTFL; transcription–translation feedback loop) hodinových genů a jejich proteinů. Perioda, s jakou se hodinové geny vracejí do výchozího stavu, trvá cca 24 hodin, a proto je zásadní pro udržení cirkadiánních rytmů. Mechanismy zahrnují genovou regulaci transkripčními faktory CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput) /BMAL1 (Brain and muscle ARNT-like protein 1), REV-ERB/ROR (retinoid-related orphan receptor) a DBP (D-box binding protein; Ripperger et al. 2006; Ueda et al. 2002).

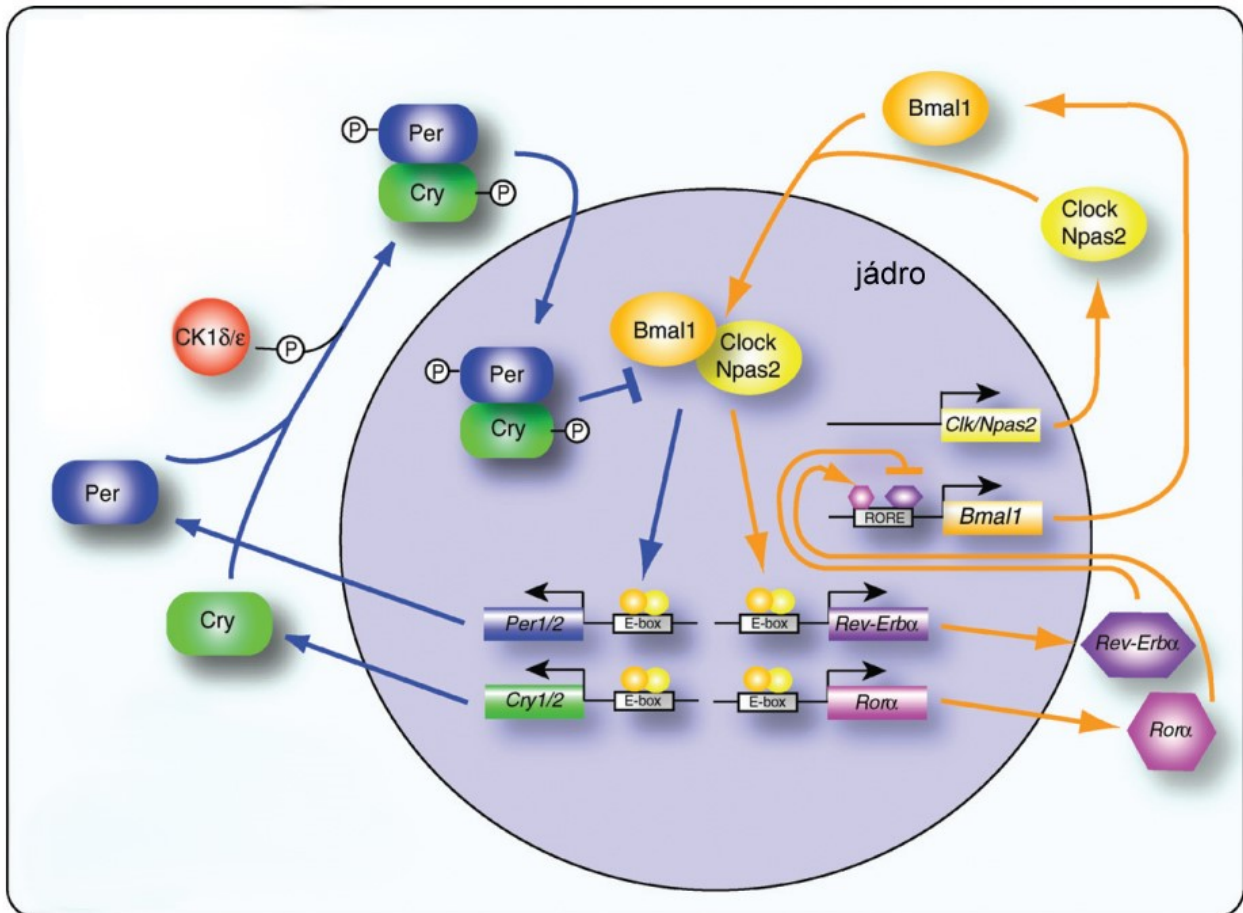
### **1.2.1 Primární smyčka**

Hlavní smyčku tvoří transkripční aktivátory BMAL1 a CLOCK (nebo Npas2 v nervové tkáni). Dále se uplatňují transkripční represory, mezi které patří proteiny PERIOD (PER 1, PER 2, PER 3) a CRYPTOCHROM (CRY 1 a CRY 2; Lamia et al. 2011).

Transkripční faktory BMAL1 a CLOCK se v cytoplazmě spojí a vytvoří heterodimer BMAL1/CLOCK. Ten následně putuje do jádra, kde se musí nejdříve navázat na sekvenci zvanou E-box v promotorech *Period* genu (*Per1*, *Per2*) a *Cryptochromu* (*Cry1*, *Cry2*; Kume et al. 1999). Tím se spouští negativní smyčka – dochází k fosforylaci a dimerizaci PER a CRY proteinů, které následně vstupují do jádra. Tam blokují funkci BMAL1/CLOCK komplexu, což potlačuje jejich vlastní genovou transkripci. K zahájení nového cyklu přes aktivaci transkripčních faktorů CLOCK a BMAL1 dochází až po dostatečném snížení hladiny PER/CRY v jádře (Lee et al. 2001).

### 1.2.2 Sekundární smyčka

Další cílové geny pro CLOCK/BMAL1 regulaci přes E-box kódují jaderné receptory REV-ERB $\alpha$  a REV-ERB $\beta$  (REV-ERB $\alpha/\beta$ ; Preitner et al. 2002). Tyto molekuly společně s receptory ROR $\alpha$ , ROR $\beta$  a ROR $\gamma$  tvoří sekundární smyčku, která reguluje expresi *Bmal1*. Komplexy REV-ERB $\alpha/\beta$  a ROR $\alpha$ /ROR $\beta$ /ROR $\gamma$  soutěží o vazebné místo v promotoru *Bmal1* a dochází buďto k indukci (ROR) či represi (REV-ERB) jeho transkripce (obr. 1; Sato et al. 2004).



Obr. 1: Schéma molekulárních hodin popsaných v kapitolách 1.2.1 a 1.2.2 - **Primární smyčka** (modré šipky) – Dimer BMAL1/CLOCK nasedá v jádře na sekvenci E-box v promotorech genu *Per* a *Cry*, které jsou transkribovány. Proteiny PER a CRY se v cytoplasmě fosforylují kasein kinázou (CK1 $\epsilon/\delta$ ) a dimerizují. Následně dimer PER/CRY vstupuje do jádra, kde inhibuje aktivitu dimeru BMAL1/CLOCK. **Sekundární smyčka** (oranžové šipky) – Dimer BMAL1/CLOCK nasedá v jádře na sekvenci E-box v promotorech *Rev-erb* a *Ror*. Jejich proteiny si navzájem konkurují o místo na sekvenci zvanou ROR element (RORE) v promotoru *Bmal1* genu. Zatímco REV-ERB transkripci potlačuje, ROR ji podporuje. V přítomnosti ROR proteinu dochází tedy k vzniku BMAL1 proteinu, který společně s CLOCK vytvoří heterodimer a vstupují do jádra (Albrecht et al. n.d.).

### 1.2.3 Terciární smyčka

Regulační funkce terciární smyčky spočívá v přítomnosti D-boxu – sekvenci v promotorech genů *Per*, *Rev-Erb* a *Ror*. Na D-box může nasednout DBP, exprese kterého je regulována CLOCK/BMAL1 komplexem (Ripperger et al. 2006), nebo NFIL3 (nuclear factor interleucin-3-regulated protein; Mitsui et al. 2001). DBP transkripci těchto genů podporuje, zatímco NFIL3 ji inhibuje.

## 1.3 Hierarchická síť buněčných hodin

Molekulární nástroj generování cirkadiálních oscilací je obsažen v každé buňce těla. Z hlediska vzájemných vztahů a regulačních mechanismů tvoří tyto buněčné oscilátory provázaný cirkadiální systém s hierarchickou strukturou. Cirkadiální systém je složen z hlavních hodin uložených v suprachiasmatickém jádře hypotalamu (SCN; suprachiasmatic nucleus) a periferních hodin v orgánech a tkáních. Jejich sladění je vedeno nervovými drahami, či řízeno hormony, které působí jako tzv. vnitřní „zeitgebery.“ Za ty lze označit také veškeré vnější podněty, prostřednictvím kterých tělo získává pojem o solárním čase. Mezi ně se řadí např. světlo, teplota, potrava a pohyb, či sociální synchronizátory. Pod tím si lze představit např. nastavení ranního budíku (Korf and von Gall 2016).

### 1.3.1 Suprachiasmatické jádro

Skupina neuronů, lokalizovaná v mozku ve ventrální části hypotalamu nad optickým chiasmatem, která reguluje cirkadiální chování, je označována jako suprachiasmatické jádro (Moore et al. 2002). Jde o hlavní cirkadiální pacemaker, který synchronizuje periferní oscilace ve všech buňkách organismu (Schibler 2007).

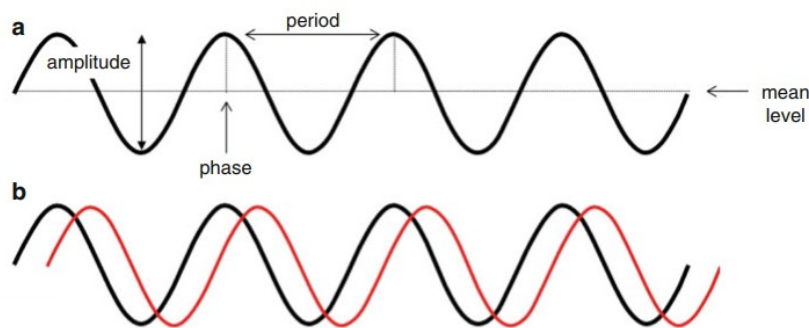
Genetický mechanismus generování cirkadiálních oscilací v SCN vytváří endogenní periodu, která není přesně 24 hodinová a je proto nutné procesy v SCN denně synchronizovat s vnějším, přesně 24h cyklem. Působením světla dochází k posunu fáze cirkadiálních oscilací a tím ke srovnání délky periody k 24 hodinám. Informace o přítomnosti světla jsou zachycovány specializovanými populacemi buněk sítnice oka zvanými ipRGC (intrinsically photosensitive retinal ganglion cells; Provencio et al. 2000), které vytváří svými axony retinohypotalamický trakt (RHT; retinohypothalamic tract) vedoucí do SCN. Zde se tato informace zpracuje a určí další dění v cirkadiálním systému (Berson et al. 2002).

### 1.3.2. Periferní hodiny

Zeitgebery působí nejen na centrální hodiny v SCN, ale i na periferní hodiny vyskytující se v tkáních. Ty byly nalezeny v srdci, plicích, kosterní svalovině, játrech, ledvinách a mnoha dalších tkáních (Paulose et al. 2012). Vrozenou schopností periferních orgánů je generování cirkadiálních oscilací. Ty samy o sobě neběží přesně a synchronně (Yoo et al. 2004). K tomu je zapotřebí SCN, které je zásadní pro synchronizaci periferních hodin (Balsalobre et al. 1998), které bez něj udržují synchronní rytmus jen omezenou dobu. Oproti SCN, které je synchronizováno především světlem, jsou periferní orgány ovlivněny signály z SCN a dále také příjmem potravy a jinými zeitgebery.

### 1.4 Světelná synchronizace

Cirkadiální rytmy lze znázornit sinusovou křivkou, jak je zobrazeno na obr. 2. Po světelném pulzu dochází ke změnám fáze během subjektivní noci nebo dne. Jak je blíže znázorněno na obr. 3, křivka se může fázově posouvat – může se předbíhat či zpožďovat

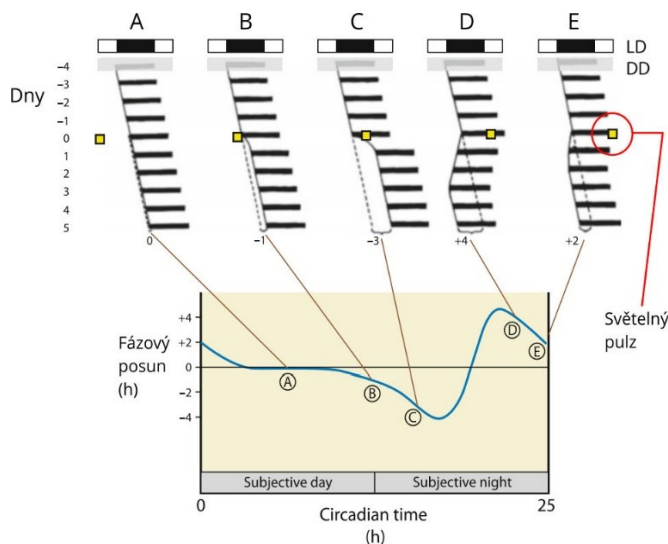


Obr. 2: Sinusoidální model a základní parametry cirkadiálních oscilací. (a) Křivku lze charakterizovat: periodou, která určuje dobu, za kterou se děj jedenkrát zopakuje, fází a amplitudou. (b) Znázornění fázového zpoždění červené křivky (upraveno podle: Korf and von Gall 2016).

(Korf and von Gall 2016). Bylo zjištěno, že v případě, kdy je aplikován světelný pulz zvečera nebo těsně před subjektivní nocí, nastává fázové zpoždění a perioda dne se prodlužuje. Naopak při zasvěcení těsně před rozbřeskem dochází k fázovému předběhnutí rytmu a perioda noci se zkracuje.

Světelné záření je vnímáno buňkami ipRGC, které obsahují melanopsin, a reagují na světlo hlavně v modré části spektra (Melyan et al. 2005). Transdukcí energie fotonu do akčního potenciálu v těchto buňkách je aktivována RTH dráha, která vede přímo do SCN v hypothalamu. RTH produkuje glutamát, který navázáním na NMDA receptory spouští intracelulární signalizační kaskádu v SCN, a dochází k zvýšení intracelulárního  $Ca^{2+}$  a produkci oxidu dusnatého.

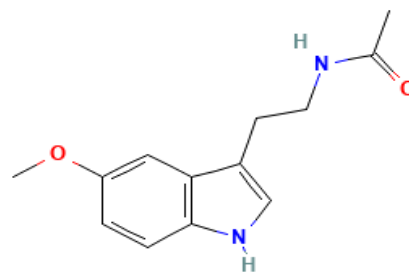
Signalizační kaskáda vede k fosforylaci transkripčního faktoru CREB a indukci transkripce hodinového genu *Per1* (*Per2*) v jiné době, než probíhá aktivace dimerem CLOCK/BMAL1. Mění se tím dynamika molekulárních smyček a dochází k posunům v cirkadiánních rytmech (Benarroch 2008).



Obr. 3: Schématické znázornění vytvoření fázově-responzivní křivky (FRK; na spodní části obrázku) – Na horní části obrázku je vyznačen volný běh aktivity potkana, měřený ve stálé tmě, a žluté čtverečky vyznačují světelný pulz. Čerchovaná čára odkazuje k velikosti fázové změny (v hodinách), která je vyjádřena FRK níže. Situace (A) ukazuje, že světelný pulz během subjektivního dne neovlivní FRK. (B) Světelný pulz těsně před temnostní fází ovlivní fázi a zpozdí cirkadiánní rytmy zhruba o 1 hodinu. (C) Světelný pulz v průběhu noci zpozdí fázi cirkadiánních hodin o 3 hodiny. (D i E) Světelný pulz těsně před svítáním způsobí předběhnutí fáze cirkadiánních oscilací (převzato z: Rouyer 2013).

## 2. Melatonin

Jednou z nejdůležitějších molekul v cirkadiánním systému je melatonin, poprvé izolovaný Aaronem B. Lernerem (Lerner et al. 1960). Melatonin je triviální chemický název pro N-acetyl-5-methoxytryptamin (obr. 4), hydrofobní derivát tryptofanu s molekulární hmotností 232,278 g mol<sup>-1</sup> (National Center for Biotechnology Information 2022). Tento neurohormon v organismu funguje jako signalizační molekula, jejíž syntéza je regulována signály z SCN. Synchronizace cirkadiánního systému s vnějším časem závisí na světelném záření, přenášeným ze sítnice přes RHT. Synchronizované časové signály z SCN za normálních okolností regulují syntézu melatoninu tak, aby probíhala v noci. Je proto nazýván hormonem noci – zeitgeberem, který indukuje fázové posuny a synchronizaci hlavních i periferních cirkadiánních hodin.



Obr. 4: Struktura melatoninu (National Center for Biotechnology Information 2022).

Syntéza a distribuce melatoninu v těle probíhá z epifýzy (Korf and von Gall 2016).

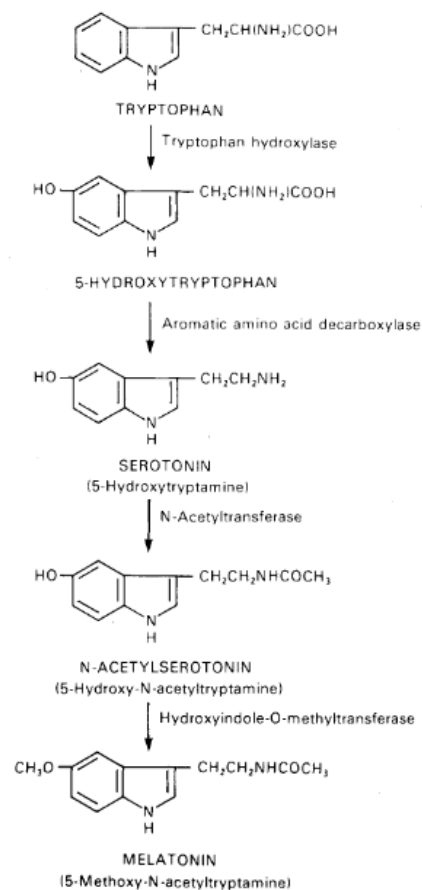
## 2.1 Epifýza

Epifýza je struktura, která tvoří přímý kontakt s třetí mozkovou komorou nad středním mozkem pod cerebrální žilou. Hlavními buňkami epifýzy, ve kterých probíhá syntéza melatoninu, jsou pinealocyty (Tosini et al. 2000; Zimmerman et al. 1975). Z epifýzy je hormon vypouštěn do krve a mozkomíšní tekutiny (Ozaki et al. 1976).

## 2.2 Biosyntéza melatoninu

Biosyntéza melatoninu probíhá v několika stupních z aminokyseliny tryptofanu. Enzymy, potřebné k této přeměně, jsou v epifýze přítomny.

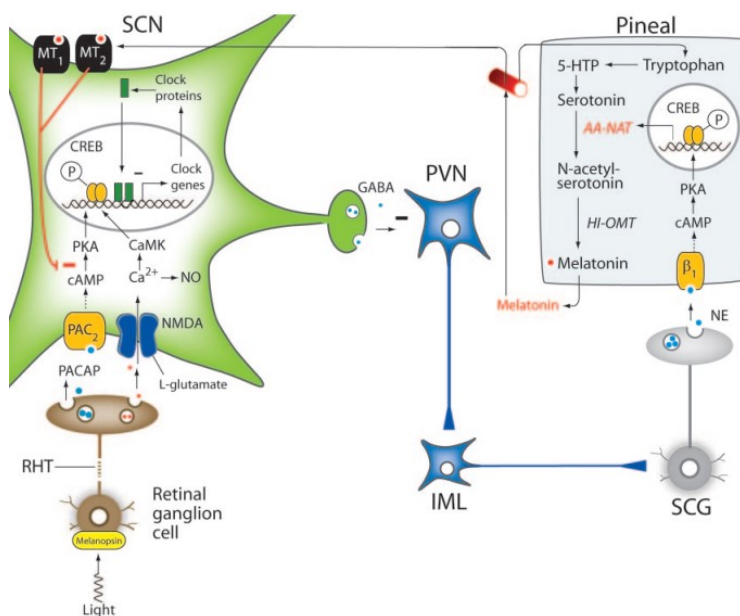
Prvním krokem biosyntetické dráhy je hydroxylace tryptofanu, který se dostává do epifýzy z krevního řečiště (Green and Sawyer 1966). Tato reakce je katalyzována enzymem tryptofanhydroxylázou a vzniklý 5-hydroxytryptofan (5-HTP) se v další fázi dekarboxyluje na serotonin (5-hydroxytryptamin). Přeměna serotoninu na melatonin vyžaduje dva enzymy – oba jsou přítomny v epifýze. Prvním z nich je aralkylamin N-acetyltransferáza (AA-NAT) acetylující serotonin na dusíku. AA-NAT je v chronobiologii důležitý, neboť hraje významnou roli v regulaci denních rytmů syntézy melatoninu. Jak je vidět na obr. 5, jako poslední do syntetické dráhy vstupuje enzym hydroxyindol-O-methyltransferáza, která methyluje aromatický hydroxyl acetylserotoninu a poskytuje finální molekulu melatoninu (Sugden et al. 1987).



Obr. 5: Biosyntéza melatoninu (Sugden et al. 1987).

## 2.3 Interakce SCN s epifýzou

Cirkadiánní cyklus melatoninu je řízen endogenními hodinami a světlem. Světlo vede k fázovým posunům cirkadiánních oscilací, ale také k okamžitému potlačení aktivity enzymu AA-NAT (Klein et al. 1983). Jak je znázorněno na obr. 6, hlavní dráha regulace epifýzy prochází přes paraventriculární jádro hypotalamu (PVN). Za dne je PVN neaktivní, neboť je inhibováno neurotransmiterem  $\gamma$ -aminomáselnou kyselinou (GABA), který je produkován SCN. V noci je tato inhibice potlačena a PVN aktivuje sympatický nervový systém působením na intermediolaterální sloupec páteřní míchy (IML), které následně aktivují superiorní cervikální ganglion (SCG; Benarroch 2008). Uvolní se norepinefrin (NE), který se váže na  $\beta$ -adrenergní receptory na pinealocytech. Kaskádou intracelulárních procesů, zahrnujících aktivaci PKA a fosforylaci



Obr. 6: Schéma ke kapitole 2.2 a 2.3 – Vlevo dole je naznačeno, jak světlo působí na ipRGC s melanosinem a tento signál je dále veden RHT k buňkám SCN (zeleně). Glutamatergní signalizace s kotransmiterem PACAP spouští v buňce kaskádu procesů zahrnujících aktivaci proteinkinázy A (PKA) sekundárním poslem cAMP a aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$  signalizační kaskády glutamatergním receptorem NMDA. Tyto kaskády vedou k fosforylaci transkripčního faktoru CREB a spuštění transkripce hodinových genů. Aktivované SCN produkuje inhibiční neurotransmiter GABA, který působí na PVN (modře). V případě však, kdy je PVN aktivní, inhibuje strukturu IML, která nemůže působit na SCG. Jeho aktivním působením pak dochází k uvolnění norepinefrinu (NE), který působením na  $\beta$ -adrenergní receptory v epifýze (světle modře) spouští kaskádu procesů zahrnujících aktivaci PKA sekundárním poslem cAMP. To vede k fosforylaci CREB a spuštění transkripce genu kódujících enzym AA-NAT, který je zapojen do biosyntézy melatoninu. Melatonin je pak distribuován krevním řečištěm (červeně) dále po těle. Může působit i na SCN přes své melatoninové receptory MT1 či MT2 (ilustrace použita z Benarroch 2008).



transkripčního faktoru CREB, dochází k indukci transkripce enzymu AA-NAT, který je zapojen do biosyntézy melatoninu přeměnou serotoninu na N-acetylserotonin (Sugden et al. 1987).

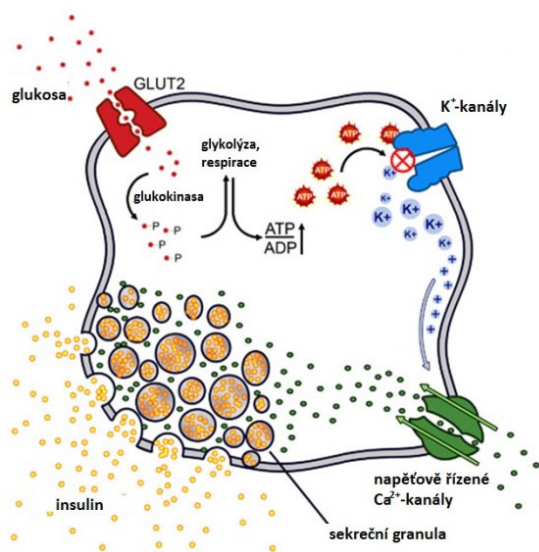
### 3. Inzulín (a jeho antagonistu glukagon)

#### 3.1 Biosyntéza inzulínu a jeho funkce

Inzulín je anabolický hormon, který hraje významnou roli v regulaci lidského metabolismu. Mezi jeho hlavní funkce patří regulace absorpce glukózy, stimulace glykolýzy, podpora syntézy jaterního i svalového glykogenu a potlačení glukoneogeneze.

Inzulín je syntetizován v  $\beta$ -buňkách Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Exprese inzulínového genu *INS* poskytuje tzv. pro-inzulín, který je následně převeden na inzulín a skladován v sekrečních granulích  $\beta$ -buněk (Steiner et al. 1967). Inzulín se skládá ze dvou řetězců,  $\alpha$  a  $\beta$  (Sanger 1949), které jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky (Dixon et al. 1960) a jeho uvolňování je iniciováno zvýšenou koncentrací glukózy v plazmě. Vylučování inzulínu může být buď pomalé a pozvolné, tzv. bazální sekrece, nebo rychlé a intenzivní, které je reakcí na příjem potravy a vzestup hladiny glukózy v krvi (tzv. prandiální inzulín; Thompson et al. 2006).

Glukóza vstupuje do  $\beta$ -buňky hlodavců na inzulínu nezávislým glukózovým přenašečem GLUT2 (u lidí GLUT1; McCulloch et al. 2011) a je metabolizována glykolyticky v mitochondriích. Velké množství uvolněného ATP vede k uzavření ATP-závislých- $K^+$ kanálů (Tarasov et al. 2013), nahromadění draselných iontů v buňce, změně elektrického potenciálu (depolarizace buňky) a následně otevření na potenciálu závislých  $Ca^{2+}$  kanálů (Ashcroft et al. 1984). Nitrobuněčné zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  kationtů spouští vylučování inzulínových



Obr. 7: Sekrece inzulínu – Transport glukózy přes glukózový přenašeč GLUT2 (červeně) spouští kaskádu reakcí vedoucí k zvýšení ATP v buňce. To vede k uzavření  $K^+$  kanálů (modře) a následně k otevření  $Ca^{2+}$  kanálů (zeleně) vyvolávající exocytózu inzulínu (žlutě; převzato z: Shankar 2015).

granulí ven z buňky do krevního oběhu (obr. 7; Hutton et al. 1983; Schafer et al. 1974).

Jednotlivé pankreatické buňky nepracují izolovaně – buňky v celém ostrůvku a ostrůvky v celé slinivce koordinují své signály  $\text{Ca}^{2+}$  (Zarkovic et al. 2004) a ovlivňují sekreci inzulínu ve formě rytmické oscilace, která se u lidí opakuje s periodou 5–10 min (Lang et al. 1979).

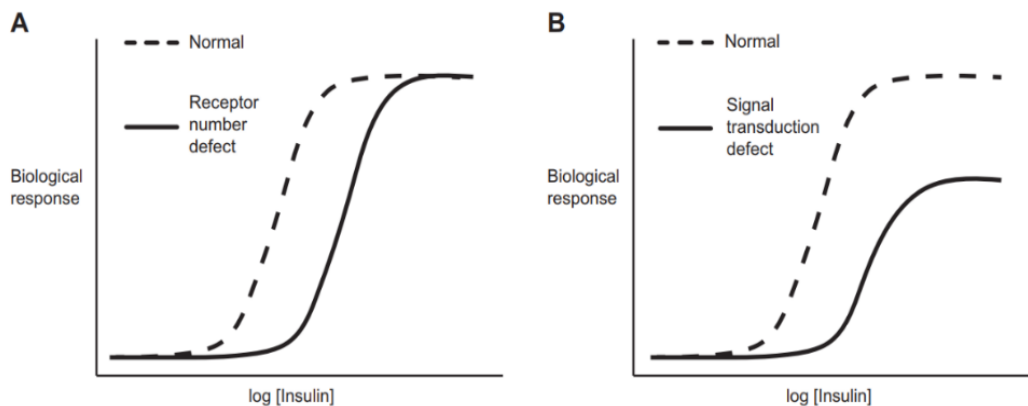
V cílových buňkách se inzulín, vyloučený do krevního oběhu z pankreatu, váže na membránové receptory tyrozin-kinázového typu. Aktivace receptoru spouští sekvenci fosforylačních reakcí přes fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3K) a serin/threonin protein kinázu B (PKB/AKT), která nakonec vyústí v zabudování glukózového transportéru GLUT4 do buněčné membrány. Tím je brána do buňky pro glukózu otevřena, tato může vstoupit a – podle typu buňky – podstoupit glykolytickou reakci nebo naopak syntézu glykogenu (Wu et al. 2008).

Většina inzulínu, který se váže na jaterní inzulínové receptory, je degradována (Duckworth 1988). Degradací proces začíná na membráně bezprostředně po navázání inzulínu (Yokono et al. 1982).

### **3.2 Inzulínová rezistence**

Zdravý člověk reaguje na zvýšení hladiny glukózy v krvi vyloučením dostatečného množství inzulínu. Ten umožní buňkám glukózu metabolicky využít a tím sníží její obsah v krvi. U lidí s tzv. inzulínovou rezistencí, jinými slovy u pacientů, jejichž cílové tkáně nevykazují dostatečnou citlivost na inzulín, do značné míry chybí koordinovaná reakce snižující obsah glukózy v krevním oběhu. Glukóza se v krvi dále hromadí a přes vysokou koncentraci inzulínu se její hladina nejen nesnižuje absorpcí do buněk, ale naopak je podpořena její další tvorba glukoneogenezí v játrech (Olefsky et al. 1982).

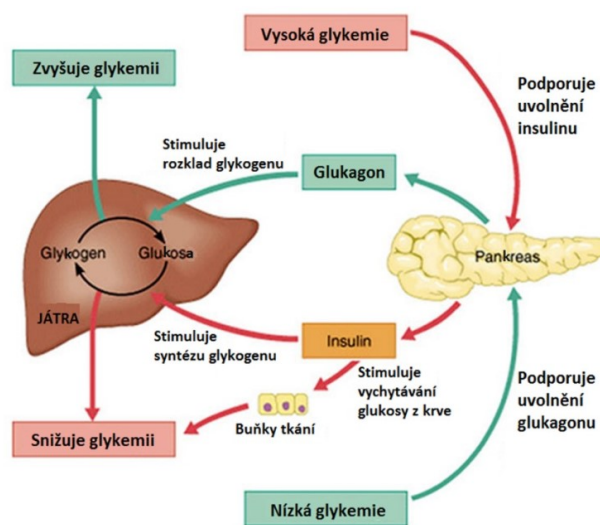
Ranné studie původu inzulínové rezistence (Himsworth 1936) se zaměřovaly na testování dvou hypotéz: (i) nedostatečným počtem příslušných receptorů a tím sníženou možností inzulín vázat, nebo (ii) změnami „post-receptorovými“, neboli narušenou signální transdukcí (Kolterman et al. 1981), jak názorně ukazuje obr. 8. Dnes se má za to, že jde především o poruchu v signalizačním řetězci inzulínu (Bollag et al. 1986; Sun et al. 2012).



Obr. 8: Inzulínová rezistence v křivkách závislosti odezvy na dávce: (A) v hypotetické buňce se sníženým počtem receptorů je závislost odezvy na dávce posunuta doprava, ale maximální biologická odpověď je zachována, dokud není ztraceno 90% receptorů na membráně buňky. (B) v buňce s poruchou signalizace inzulínu, nebo s kombinací defektů receptor/post-receptor, křivka je posunuta doprava a je pozorována snížená maximální odpověď. Křivka vpravo je typická pro inzulínovou rezistenci v jaterních, svalových a tukových tkáních spojenou s obezitou (upraveno podle: Petersen et al. 2018).

### 3.3 Glukagon

K pochopení regulace homeostáze glukózy v krvi je kromě inzulínu nutné zmínit k němu antagonistický hormon glukagon. Ten je produkován pankreatickými  $\alpha$ -buňkami, dojde-li k poklesu koncentrace glukózy v krvi (hypoglykémii). Glukagon je iniciátorem procesů, které v játrech spustí glykogenolýzu (přeměnu glykogenu na glukózu) a glukoneogenezi (syntézu glukózy z pyruvátu) a zajišťuje tak dostatečné množství glukózy v krvi



Obr. 9: Schématické znázornění regulace glykemie prostřednictvím inzulínu a glukagonu (ilustrace z Marieb, 2001).

(obr. 9). Stejně jako u pankreatické sekrece inzulínu, sekrece glukagonu vykazuje jasný denní rytmus (Grapengiesser et al. 2006), který je závislý na biologických hodinách umístěných v SCN (Ruiter et al. 2003).

## 4. Vliv melatoninu na inzulín

### 4.1 Melatoninové receptory

Funkce melatoninu je zprostředkována zejména membránovými receptory MT1 a MT2, které jsou kódovány blízce příbuznými *MTNR1A* a *MTNR1B* geny.

Jedna z hlavních funkcí melatoninu je šíření časových signálů do periferních struktur. Receptory se exprimují např. v imunitních buňkách, v sítnici, v hypothalamických jádrech, dalších periferních orgánech nebo i v SCN, kde vykazují cirkadiánní rytmus (Waly et al. 2015). Bylo zjištěno, že množství receptoru MT1 je v SCN nejvyšší za soumraku a svítání. Oproti tomu MT2 receptor nebyl nalezen v SCN vůbec nebo pouze v zanedbatelném množství (Dubocovich et al. 1998; Poirel et al. 2002). Funkce MT1 a MT2 receptorů byla u myši objasněna genetickou delecí MT1 nebo MT2 melatoninového receptoru (Jin et al. 2003).

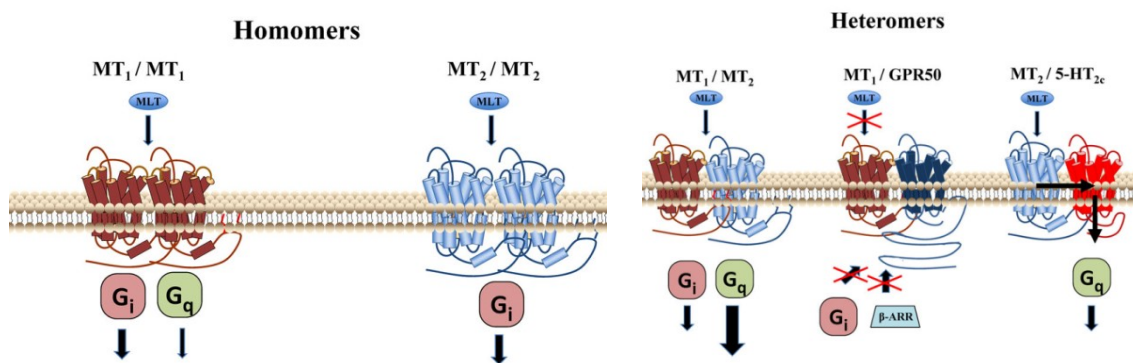
### 4.2 Výskyt melatoninových receptorů

Melatoninové receptory se nacházejí nejen v mozku, ale i v periferních orgánech. V rámci této práce je však nutné objasnit především výskyt melatoninových receptorů ve slinivce břišní, přesněji v  $\alpha$ - a  $\beta$ -buňkách. Situaci komplikuje fakt, že se MT receptory prezentují v různých organismech odlišně.

Ramracheya a kolektiv prokázali identifikaci lidské mRNA *MTNR1A*, že se v lidských  $\alpha$ -buňkách vyskytují převážně MT1 receptory (Ramracheya et al. 2008). Následně to potvrdili Lyssenko a Nagorny a doplnili, že zatímco u myši byly MT1 receptory exprimovány zejména v  $\alpha$ -buňkách, receptory MT2 se nacházejí hlavně v  $\beta$ -buňkách (Lyssenko et al. 2009; Nagorny et al. 2011). Další výzkum prokázal, že se melatoninové receptory obou typů mohou vyskytovat jak v  $\alpha$ -, tak i v  $\beta$ -buňkách, což bylo ověřeno sekvenací RNA (Blodgett et al. 2015) či experimentem na myší buněčné linii  $\alpha$ TC1.9 (jde o buněčnou linii napodobující  $\alpha$ -buňky slinivky břišní, u které byla prokázána přítomnost obou melatoninových receptorů (Bähr et al. 2011)). Úplné pochopení výskytu melatoninových receptorů na  $\alpha$ - a  $\beta$ -buňkách živočichů bude vyžadovat další výzkum. V této souvislosti lze spekulovat o roli oligomerů melatoninových receptorů, zmíněných v další kapitole (4.2.1).

### 4.2.1. Oligomery melatoninových receptorů

Literární data ukazují, že receptory MT1 a MT2 se nemusí v buněčných membránách vyskytovat pouze jako monomerní jednotky. Ayoub se spolupracovníky jako první v roce 2002 navrhli (Ayoub et al. 2002), že podobně jako jiné receptory spřažené s G-proteiny, i melatoninové receptory MT1 a MT2 mohou tvořit homo- či heterodimery a tvorba heterodimerů převažuje nad tvorbou homodimerů (Ayoub et al. 2004). Aktivace melatoninem nemá vliv na stav oligomerizace receptoru, v případě heterodimeru si oba receptory zachovávají svou povahu a nevykazují negativní kooperativitu (Ayoub et al. 2004). K plnému objasnění fyziologické relevance dimerů melatoninových receptorů je zapotřebí dalšího studia. S G-proteiny spřažené receptory mohou mít přirozenou tendenci se v tkáních asociovat, do jaké míry k tomu však skutečně dochází není zatím úplně jasné a prokázat relevanci takové asociace pro výsledné působení se podařilo pouze v několika případech (Ferré et al. 2014).



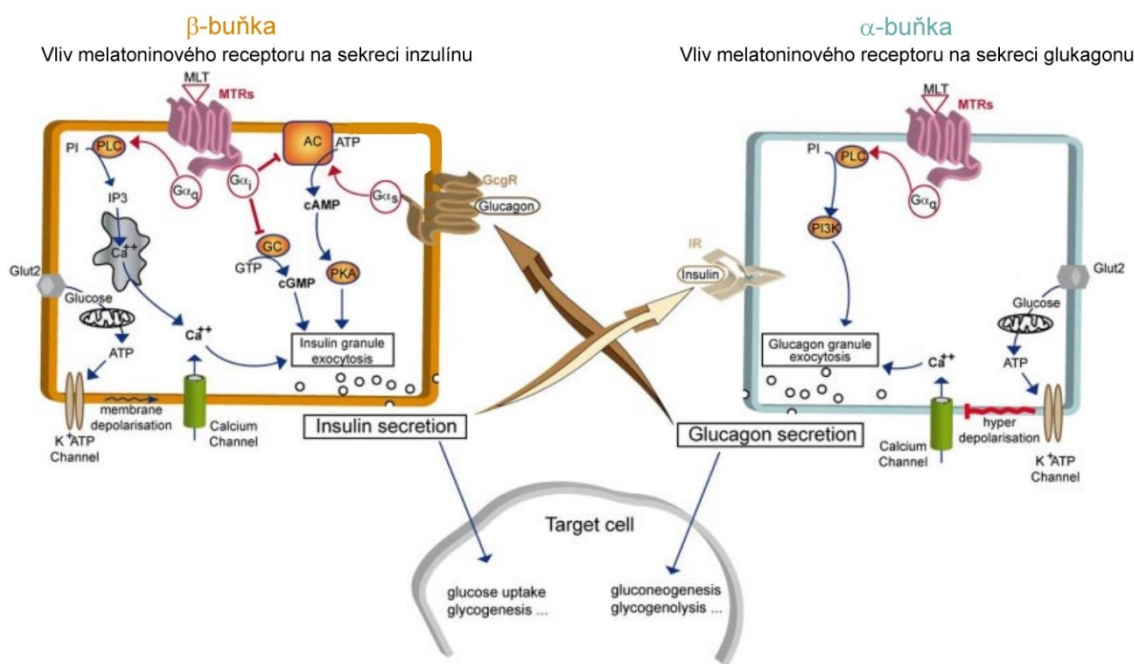
Obr. 10: **Vlevo** tvorba homodimerů z melatoninových receptorů MT1 a MT2 a jejich pravděpodobné signalizační účinky – Gi inhibiční a Gq stimulační. **Vpravo** tvorba heterodimerů z melatoninových receptorů MT1 a MT2 a jejich signalizační účinky (převzato z: Cecon et al. 2018).

### 4.3. Signalizační dráha melatoninových receptorů

Melatoninové receptory jsou receptory sedmkrát procházející membránou, což je klasická charakteristika receptorů spřažených s G-proteiny (Dubocovich et al. 2005). Hlavní dráha **MT1** signalizace je spojena s proteiny Gi, které mají inhibiční efekt na adenylátcyklázu (AC), což v důsledku inhibuje tvorbu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP; Abe et al. 1969; Mulder et al. 2009; Reppart et al. 1996). Tento sekundární posel za normálních okolností aktivuje proteinkinázu A (PKA), jejíž hlavní funkcí je fosforylace proteinů. Je-li však produkce cAMP

snížena, nedochází k aktivaci PKA, její schopnost fosforylace je potlačena, a řada biochemických procesů se tak neaktivuje (Carlston et al. 1989). U MT1 receptorů bylo prokázáno i spojení s Gq proteiny, které svým stimulačním efektem vyvolají přes fosfolipázu C (PLC) a následně produkovaný inositol trifosfát (IP3) zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$ .

U druhého melatoninového receptoru **MT2** nebyl nalezen stimulační efekt, projevující se zvýšením koncentrace  $Ca^{2+}$ . Stumpf s kolektivem svými experimenty na potkaní linii INS-1 však dokázali, že MT2 receptor je spojen s inhibičním Gi proteinem, a ten snižuje produkci sekundárního posla, cyklického guanosin monofosfátu (cGMP; Stumpf et al. 2009; Stumpf et al. 2008). Tím nedochází k aktivaci cGMP-závislé protein kinázy (PKG), následně fosforylaci a řada procesů tak zůstane neaktivních. Důsledky snížené fosforylace oběma kinázami pro metabolické děje vysvitnou z následujících kapitol.



Obr. 11: (Vlevo) **Signalizace melatoninového receptoru v  $\beta$ -buňce** – melatoninové receptory (růžově) brání sekreci inzulínu inhibicí AC a nízkou produkcí cAMP (cGMP). Sekundární posel cAMP se za normálních okolností váže na PKA a přispívá k sekreci inzulínu. Melatoninové receptory mají však stimulační vliv na PLC, umožňují vstup  $Ca^{2+}$  iontů do intracelulárního prostoru a tím je sekrece podpořena. (Vpravo) **Signalizace melatoninového receptoru v  $\alpha$ -buňce** – melatoninové receptory (růžově) na  $\alpha$ -buňce mají stimulační vliv na PLC a tím na vylučování glukagonu. Na  $\alpha$ -buňkách se nachází inzulínové receptory, na  $\beta$ -buňkách glukagonové receptory, přispívající ke vzájemné regulaci. Hormony se pak krevním oběhem distribuují do cílových buněk, kde spouští jednotlivé děje. Do obou buněk transportérem GLUT2 vstupuje glukóza, která je v mitochondriích metabolizována a vzniklý ATP zavírá ATP-závislý  $K^+$  kanál. Tím dojde k depolarizaci buněčné membrány a otevření  $Ca^{2+}$  kanálu (převzato z Karamitri et al. 2013).

Obrázek 11. přehledně shrnuje signalizaci melatoninového receptoru v  $\alpha$ - a  $\beta$ -buňkách (viz 4.3.1 a 4.3.2) a zobrazuje souhru biochemických procesů, klíčových pro udržení potřebné koncentrace glukózy v krvi.

#### 4.3.1 Signalizační dráha melatoninových receptorů v $\beta$ -buňkách

Studie melatoninových receptorů v  $\beta$ -buňkách a jejich vlivu na exocytózu inzulínu vedou v případě člověka k odlišným výsledkům než v případě myši. Zatímco u myši dochází po aplikaci exogenního melatoninu k snížené sekreci inzulínu (Peschke et al. 2002; Picinato et al. 2002), u lidí byl nalezen přesně opačný efekt, a to zvýšení inzulínové sekrece (Ramracheya et al. 2008). Autoři konstatují, že u lidských ostrůvků pankreatu je spojení melatoninových receptorů s  $G_i$ -vyvolanou inhibicí AC buď nefunkční, či zcela chybějící, a vazba  $G_q$  na PLC je hlavní cestou aktivovanou melatoninem (Bach et al. 2005; Peschke et al. 2006). Pro větší přehlednost jsou rozdíly mezi výsledky studií shrnuty v tabulce 1.

	<b>cAMP</b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Sekrece inzulínu</b>
<b>Lidské buňky</b>	Žádný vliv	Stimulační	Zvýšená
<b>Myší buňky</b>	Inhibiční	Stimulační	Snížená

Sekundární posel cAMP je hlavním aktérem při uzavírání ATP-závislých  $K^+$  kanálů. Tyto kanály fungují tak, že je ATP pomocí AC cykлизováno na cAMP, ten následně aktivuje PKA, ta  $K^+$  kanál fosforyluje a tím ho uzavře (Peschke et al. 2002). Takto lze vysvětlit rozdíl v sekreci inzulínu u myši a u lidí: nemají-li u lidí melatoninové receptory na cAMP vliv,  $\beta$ -buňka nedostává z tohoto směru žádný inhibiční signál, a naopak produkce  $Ca^{2+}$ , která je povahy stimulační, sekreci podporuje. Naproti tomu u myši je aktivace melatoninového receptoru doprovázena inhibicí cAMP. K uzavření  $K^+$  kanálů tak nedochází, buněčná membrána se nedepolarizuje a intracelulární  $Ca^{2+}$  se nezvýší. Vyplavení inzulínu je tak potlačeno. Přestože melatoninové receptory mají i stimulační dráhu přes PLC (Brydon et al. 1999), ze studií vyplývá, že inhibiční efekt melatoninových receptorů je pro buňku důležitější než stimulační.

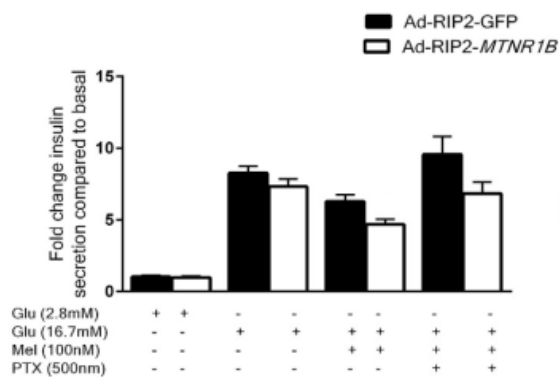
Přestože se z výše uvedeného zdá být logika působení melatoninu na  $\alpha$ - a  $\beta$ -buňky v hlavních obrysech jasná, celá věc je stále předmětem zkoumání a její detailní mechanismus nelze považovat

za definitivně objasněný (Nagorny et al. 2011). Situaci činí ještě komplikovanější, že reakce na melatonin lidských buněk a buněk hlodavců, mnohdy geneticky manipulovaných, se může významně lišit. Fakt, že u lidí a myši je vylučování inzulínu různé, je podpořeno i jejich časovou nikou. U lidí, stejně jako u hlodavců, hladiny melatoninu vrcholí v noci a jsou nízké během dne (Ramracheya et al. 2008). Na rozdíl od hlodavců, kteří patří mezi noční zvířata, lidé jsou obecně neaktivní během noci a během tohoto postabsorpčního období jsou hladiny glukózy v plazmě udržovány glukoneogenezí a sníženým využitím glukózy.

#### 4.3.2 Signalizační dráha melatoninových receptorů v $\alpha$ -buňkách a vliv na sekreci inzulínu

Jak je znázorněno na obr. 11, melatoninové receptory  $\alpha$ -buňky podporují exocytózu glukagonu a touto cestou přes ovlivnění hladiny glukózy v krvi sekundárně ovlivňují sekreci inzulínu (Ramracheya et al. 2008). Zároveň jsou na  $\beta$ -buňkách vystavovány glukagonové receptory. Tyto receptory jsou též spřažené s G proteiny. Spouští signalizační kaskádu přes cAMP, která vede k zvýšení exocytózy inzulínu.

Z dalších studií nicméně obecně vyplývá, že melatonin má inhibiční vliv na sekreci inzulínu a stimulační efekt na exocytózu glukagonu. To bylo prokázáno pomocí Pertussis toxinu (PTX) bakterie *Bordetella pertussis*, který inhibuje G-proteiny, které jsou spřažené s melatoninovými receptory. Po přidání toxinu do buňky, došlo k potlačení vlivů melatoninu a sekrece inzulínu se zvýšila (obr. 12; Tuomi et al. 2016).



Obr. 12: Využití Pertussis toxinu (PTX) k důkazu, že melatoninový receptor inhibuje sekreci inzulínu: Ad-RIP2-GFP – geneticky upravená potkaní buňka schopná inzulínové sekrece – byla použita jako kontrola s fluorescenční značkou. Ad-RIP2-MTNR1B je pozměněná potkaní buňka schopná inzulínové sekrece, která má větší počet melatoninových receptorů. Osa y udává kvantitativní změnu sekrece inzulínu kontrolní a upravené buňky. (První sloupec) Při nízké koncentraci glukózy (2.8 mM) je i nízká hladina inzulínu – obě buňky reagují na hladinu glukózy podobně. (Druhý sloupec) Při zvýšení hladiny glukózy v krvi (16.7 mM) dochází k sekreci inzulínu. U buňky s větším počtem melatoninových receptorů byl zaznamenán menší nárůst inzulínu. (Třetí sloupec) Po přidání exogenního melatoninu došlo k inhibici inzulínové sekrece. To je patrné jak na kontrole, tak pak zřetelněji na buňce, která má více melatoninových receptorů. (Čtvrtý sloupec) Po přidání PTX bylo zabráněno inhibičnímu efektu melatoninu na sekreci inzulínu a došlo tak k jeho zvýšené sekreci u obou buněk (Tuomi et al. 2016).



#### **4.4. Vazebná afinita melatoninu k MT1 a MT2 receptorům**

Pro úplnost je ještě třeba zmínit důležitou skutečnost, že vazba melatoninu k receptorům MT1 a MT2 neprobíhá se stejnou afinitou. Ve studii, ve které imunocytochemickými metodami dokazují, že jak u lidí, tak u myší se v jaterních ostrůvcích MT1 receptory tvoří v  $\alpha$ -buňkách, zatímco MT2 v  $\beta$ -buňkách, Nagorny se spolupracovníky stanovili vazebné afinity melatoninu k oběma receptorům (Nagorny et al. 2011). Vazebná afinita k MT1 je čtyři až osmkrát vyšší, než k MT2 –  $K_d$  20-40 vs. 160pM<sup>1</sup> (Legros et al. 2014). To vysvětluje, proč signalizace melatoninu přes MT2 receptor probíhá především v noci, kdy koncentrace melatoninu v plazmě kulminuje (Bayarri et al. 2004). Uvolňování inzulínu je potlačováno a jeho koncentrace je v noci nízká. Naopak, během dne je koncentrace melatoninu nízká a hlavní slovo tak má receptor MT1 v  $\alpha$ -buňkách, který iniciací tvorby glukagonu stimuluje následnou tvorbu glukózy a tím sekundárně vyplavování inzulínu.

#### **4.5. Cirkadiánní systém v pankreatu zprostředkovaný melatoninovými receptory**

Cirkadiánní rytmus je u inzulínu opačný k rytmu melatoninu – když je inzulín na maximu, melatonin je na nejnižší úrovni a naopak (Boden et al. 1996). Nejběžnějším způsobem ověření vzájemných interakcí mezi dvěma faktory je v biologických systémech model knock-out jednoho z faktorů (Mühlbauer et al. 2009). V případě ověření cirkadiánního rytmu v pankreatických buňkách myší byl proveden např. knock-out MT1 receptorů, při kterém došlo k výraznému ovlivnění fáze sekrece inzulínu. Dále byl cirkadiánní rytmus sekrece inzulínu studován u myší s chirurgicky odstraněnou epifýzou (Lima et al. 2001; Mellado et al. 1989). Bylo jasně ukázáno, že epifýza hraje klíčovou roli při synchronizaci metabolických procesů – pinealektomie u pokusných zvířat vedla k významnému fázovému předbíhání vylučování inzulínu a změnám jeho amplitudy. U všech skupin pokusných zvířat byla pozorována silnější glukózou vyvolaná sekrece inzulínu (Maria C. Picinato et al. 2002).

---

<sup>1</sup> čím menší má hodnotu, tím vyšší a lepší je vazba k receptoru

## 4.6 Změny v sekreci melatoninu vyvolané umělým světlem v noci a jejich vliv na sekreci inzulínu

Jak bylo popsáno v předešlých kapitolách, melatonin inhibuje uvolnění inzulínových granul z  $\beta$ -buněk a tím ovlivňuje jeho množství v krvi. Otázkou zůstává, jak se inzulínová odpověď změní při snížené sekreci melatoninu vlivem umělého světla v noci, které vyvolává fázový posun cirkadiálního cyklu. Studie na lidech potvrdily vliv fázového posunu (předstihu i zpoždění) sekrece na homeostázu glukózy a koncentraci inzulínu v krvi (Gonnissen et al. 2012). Stanovení hodnot při fázovém předběhnutí vyvolané umělým světlem před svítáním ukázalo zvýšenou hladinu inzulínu, avšak bez velkých změn v koncentraci glukózy. Oproti tomu, při fázovém zpoždění vyvolaném umělým světlem před spaním, byla pozorována zvýšená hladina glukózy v krvi, avšak nebyl zaznamenán velký rozdíl v hladině inzulínu (Gonnissen et al. 2012). Zvýšená koncentrace glukózy beze změn inzulínu během fázového zpoždění naznačuje sníženou účinnost vychytávání glukózy působením inzulínu. Nedostatečná inzulínová odpověď tak může napomáhat vzniku hyperglykémie. Uvedené výsledky jsou v souladu s dalšími pracemi, které dochází k závěru, že adekvátní inzulínová odpověď při fázovém předběhnutí, ale nedostatečná při fázovém zpoždění, je nejspíše zapříčiněna chybnou odpovědí a nedostatečnou citlivostí pankreatických  $\beta$ -buněk (Aparicio et al. 1974; Qian et al. 2013; Ribeiro et al. 1998).

Studie na potkanech přinesly podobné výsledky a ukázaly na výskyt akutní glukózové intolerance v důsledku nočního světla (Opperhuizen et al. 2017). Zatímco světelný pulz těsně před subjektivní nocí se projevil zvýšenou koncentrací glukózy, stejný světelný pulz časně z rána vyvolal fázové přeběhnutí a projevil se zvýšenou koncentrací inzulínu v krvi.

Výše uvedené naznačuje, že fázové posuny mohou vést k poruše metabolismu glukózy i inzulínu. Vyšší koncentrace glukózy a nižší koncentrace inzulínu způsobené světlem na začátku subjektivní noci mohou být důvodem glukózové intolerance. Oproti tomu světlem způsobená glukózová intolerance na konci subjektivní noci může být způsobená zvýšenou produkcí inzulínu (Opperhuizen et al. 2017).

Studie také naznačují, že rozdílné hodnoty koncentrací glukózy a inzulínu jsou někdy patrné až od pokročilejší fáze experimentu. Např. vliv světla na hladinu glukózy a inzulínu pokusného subjektu byl první den zřetelně nižší než třetí den experimentu (Gonnissen et al. 2012; Morris et al. 2015).

Nabízí se dále otázka, je-li hladina inzulínu v krvi kromě doby světelného pulzu ovlivněna také jeho intenzitou a vlnovou délkou. Výsledky naznačují, že větší změny inzulínové odpovědi nastávají za jasnějšího světla, avšak nezávisí na jeho barvě (Opperhuizen et al. 2017). Slabé světlo sice také ovlivňuje cirkadiánní režim, ale především až po delším působení. Pod slabým světlem si lze představit např. tzv. světelné znečištění, které je v této době značným problémem. Vystavení organismu stálému světlu ruší rytmus buněčných procesů a zapříčiňuje sníženou glukózovou toleranci (Fonken et al. 2010).

## 5. Závěr

V rámci práce byl shrnut vliv cirkadiánních rytmů na biosyntézu melatoninu, jeho transport a působení na buňky periferních orgánů. V pankreatických buňkách melatonin inhibuje tvorbu cAMP, v jejímž důsledku je v noci potlačena sekrece inzulínu. Melatonin jako přímý posel cirkadiánního systému přenáší rytmy z SCN do periferních orgánů a přispívá tak k tomu, aby byl inzulín vylučován ve vhodném množství ve vhodnou dobu v souladu s centrálními hodinami. Působením na melatoninové receptory se může kromě sekrece uplatnit i vliv na signalizaci inzulínu (Zhang et al. 2010). V této práci však k podrobnějšímu zkoumání signalizační dráhy nedošlo. K udržení glykemie přispívá i hormon glukagon, který při hladovění stimuluje štěpení glykogenu a podporuje glukoneogenezi z pyruvátu, a tak zvyšuje hladinu glukózy v krvi. Narušení temnostní fáze má za následek fázové posuny, které se projevují zvýšenou inzulínovou sekrecí a hyperglykemií (Marcheva et al. 2010). Neadekvátní sekrece může vést k metabolickým poruchám jako je inzulínová rezistence. Je například známo, že u laboratorních potkanů vyvolávají poruchy sekrece melatoninu, způsobené světlem v noci, výraznou inzulínovou rezistenci. Molekulární mechanismus tohoto vlivu nebyl zatím zcela objasněn, nicméně zdá se pravděpodobné, že jednou z možných příčin inzulínové rezistence je chybná signalizační dráha inzulínu, a to především v jaterních a svalových buňkách (Faria et al. 2013; Jang et al. 2016). Další výzkum v tomto směru bude velmi důležitý.

## 6. Citace

- Abe, Kaoru et al. 1969. "Role of Cyclic AMP in Mediating the Effects of MSH, Norepinephrine, and Melatonin on Frog Skin Color." *Endocrinology* 85(4): 674–82.
- \*Albrecht, Urs, and Jürgen A. Ripperger. "Clock Genes." In *Encyclopedia of Neuroscience*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 759–62.
- Aparicio, Néstor J et al. 1974. "Circadian Variation of the Blood Glucose, Plasma Insulin and Human Growth Hormone Levels in Response to an Oral Glucose Load in Normal Subjects." *Diabetes* 23(2): 132–37.
- Ashcroft, Frances M., Donna E. Harrison, and Stephen J. H. Ashcroft. 1984. "Glucose Induces Closure of Single Potassium Channels in Isolated Rat Pancreatic  $\beta$ -Cells." *Nature* 312(5993): 446–48.
- Ayoub, Mohammed A. et al. 2002. "Monitoring of Ligand-Independent Dimerization and Ligand-Induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer." *Journal of Biological Chemistry* 277(24): 21522–28.
- Ayoub, Mohammed A., Angélique Levoye, Philippe Delagrangé, and Ralf Jockers. 2004. "Preferential Formation of MT<sub>1</sub>/MT<sub>2</sub> Melatonin Receptor Heterodimers with Distinct Ligand Interaction Properties Compared with MT<sub>2</sub> Homodimers." *Molecular Pharmacology* 66(2): 312–21.
- Bach, Andreas G., Sabine Wolgast, Eckhard Mühlbauer, and Elmar Peschke. 2005. "Melatonin Stimulates Inositol-1,4,5-Trisphosphate and Ca<sup>2+</sup> Release from INS1 Insulinoma Cells." *Journal of Pineal Research* 39(3): 316–23.
- Bähr, Ina, Eckhard Mühlbauer, Helena Schucht, and Elmar Peschke. 2011. "Melatonin Stimulates Glucagon Secretion in Vitro and in Vivo." *Journal of Pineal Research* 50(3): 336–44.
- Balsalobre, Aurélio, Francesca Damiola, and Ueli Schibler. 1998. "A Serum Shock Induces Circadian Gene Expression in Mammalian Tissue Culture Cells." *Cell* 93(6): 929–37.

- Bayarri, M.J. et al. 2004. "Binding Characteristics and Daily Rhythms of Melatonin Receptors Are Distinct in the Retina and the Brain Areas of the European Sea Bass Retina (*Dicentrarchus Labrax*).” *Brain Research* 1029(2): 241–50.
- \*Benarroch, Eduardo E. 2008. "Suprachiasmatic Nucleus and Melatonin: Reciprocal Interactions and Clinical Correlations.” *Neurology* 71(8): 594–98.
- \*Berson, David M., Felice A. Dunn, and Motoharu Takao. 2002. "Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock.” *Science* 295(5557): 1070–73.
- Blodgett, David M. et al. 2015. "Novel Observations From Next-Generation RNA Sequencing of Highly Purified Human Adult and Fetal Islet Cell Subsets.” *Diabetes* 64(9): 3172–81.
- Boden, G., J. Ruiz, J. L. Urbain, and X. Chen. 1996. "Evidence for a Circadian Rhythm of Insulin Secretion.” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 271(2): E246–52.
- Bollag, G E et al. 1986. "Protein Kinase C Directly Phosphorylates the Insulin Receptor in Vitro and Reduces Its Protein-Tyrosine Kinase Activity.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(16): 5822–24.
- Brydon, Lena et al. 1999. "Dual Signaling of Human Mel1a Melatonin Receptors via Gi2, Gi3, and Gq/11 Proteins.” *Molecular Endocrinology* 13(12): 2025–38.
- Carlston, Linda L., David R. Weaver, and Steven M. Reppert. 1989. "Melatonin Signal Transduction in Hamster Brain: Inhibition of Adenylyl Cyclase by a Pertussis Toxin-Sensitive G Protein.” *Endocrinology* 125(5): 2670–76.
- \*Cecon, Erika, Atsuro Oishi, and Ralf Jockers. 2018. "Melatonin Receptors: Molecular Pharmacology and Signalling in the Context of System Bias.” *British Journal of Pharmacology* 175(16): 3263–80.
- Dixon, G. H., and A. C. Wardlaw. 1960. "Regeneration of Insulin Activity from the Separated and Inactive A and B Chains.” *Nature* 188(4752): 721–24.
- Dubocovich, Margarita L. et al. 1998. "Selective MT2 Melatonin Receptor Antagonists Block Melatonin-mediated Phase Advances of Circadian Rhythms.” *The FASEB Journal* 12(12): 1211–20.

- \*Dubocovich, Margarita L., and Magdalena Markowska. 2005. "Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals." *Endocrine* 27(2): 101–10.
- \*Duckworth, William C. 1988. "Insulin Degradation: Mechanisms, Products, and Significance\*." *Endocrine Reviews* 9(3): 319–45.
- Faria, Juliana A. et al. 2013. "Melatonin Acts through MT1/MT2 Receptors to Activate Hypothalamic Akt and Suppress Hepatic Gluconeogenesis in Rats." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 305(2): E230–42.
- \*Ferré, Sergi et al. 2014. "G Protein–Coupled Receptor Oligomerization Revisited: Functional and Pharmacological Perspectives." *Pharmacological Reviews* 66(2): 413–34.
- la Fleur, Susanne E. et al. 2001. "A Daily Rhythm in Glucose Tolerance." *Diabetes* 50(6): 1237–43.
- Fonken, Laura K. et al. 2010. "Light at Night Increases Body Mass by Shifting the Time of Food Intake." *National Academy of Sciences of the United States of America* 107(43): 18664–69.
- Gonniissen, Hanne K.J. et al. 2012. "Effect of a Phase Advance and Phase Delay of the 24-h Cycle on Energy Metabolism, Appetite, and Related Hormones." *American Journal of Clinical Nutrition* 96(4): 689–97.
- Grapengiesser, Eva, Albert Salehi, Saleem S. Qader, and Bo Hellman. 2006. "Glucose Induces Glucagon Release Pulses Antisynchronous with Insulin and Sensitive to Purinoceptor Inhibition." *Endocrinology* 147(7): 3472–77.
- Green, Harry, and John L. Sawyer. 1966. "Demonstration, Characterization, and Assay Procedure of Tryptophan Hydroxylase in Rat Brain." *Analytical Biochemistry* 15(1): 53–64.
- Himsworth, H.P. 1936. "Diabetes Mellitus ." *The Lancet* 227(5864): 127–30.
- Hutton, J C, E J Penn, and M Peshavaria. 1983. "Low-Molecular-Weight Constituents of Isolated Insulin-Secretory Granules. Bivalent Cations, Adenine Nucleotides and Inorganic Phosphate." *Biochemical Journal* 210(2): 297–305.
- Jang, Hagoon et al. 2016. "SREBP1c-CRY1 Signalling Represses Hepatic Glucose Production by Promoting FOXO1 Degradation during Refeeding." *Nature Communications* 7(1): 12180.

- Jin, Xiaowei et al. 2003. “ Targeted Disruption of the Mouse Mel 1b Melatonin Receptor .” *Molecular and Cellular Biology* 23(3): 1054–60.
- \*Karamitri, Angeliki et al. 2013. “Minireview: Toward the Establishment of a Link between Melatonin and Glucose Homeostasis: Association of Melatonin MT<sub>2</sub> Receptor Variants with Type 2 Diabetes.” *Molecular Endocrinology* 27(8): 1217–33.
- Klein, D.C. et al. 1983. “Lesions of the Paraventricular Nucleus Area of the Hypothalamus Disrupt the Suprachiasmatic→ Spinal Cord Circuit in the Melatonin Rhythm Generating System.” *Brain Research Bulletin* 10(5): 647–52.
- Kolterman, O G et al. 1981. “Receptor and Postreceptor Defects Contribute to the Insulin Resistance in Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus.” *Journal of Clinical Investigation* 68(4): 957–69.
- \*Korf, Horst Werner, and Charlotte von Gall. 2016. “Circadian Physiology.” In *Neuroscience in the 21st Century*, Springer New York, 2203–39.
- Kume, Kazuhiko et al. 1999. “MCRY1 and MCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop.” *Cell* 98(2): 193–205.
- Lamia, Katja A. et al. 2011. “Cryptochromes Mediate Rhythmic Repression of the Glucocorticoid Receptor.” *Nature* 480(7378): 552–56.
- Lang, D. A., D. R. Matthews, J. Peto, and R. C. Turner. 1979. “Cyclic Oscillations of Basal Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Human Beings.” *New England Journal of Medicine* 301(19): 1023–27.
- Lee, Choogon et al. 2001. “Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock.” *Cell* 107(7): 855–67.
- Legros, Céline et al. 2014. “Melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> Receptors Display Different Molecular Pharmacologies Only in the G-Protein Coupled State.” *British journal of pharmacology* 171(1): 186–201.
- Lerner, A.B., J. D. Case, and Y. Takahashi. 1960. “Isolation of Melatonin and 5-Methoxyindole-3-Acetic Acid from Bovine Pineal Glands.” *The Journal of biological chemistry* 235: 1992–97.

- Lima, L. M. B. de, L. C. dos Reis, and M. A. de Lima. 2001. "Influence of the Pineal Gland on the Physiology, Morphometry and Morphology of Pancreatic Islets in Rats." *Revista Brasileira de Biologia* 61(2): 333–40.
- Lyssenko, Valeriya et al. 2009. "Common Variant in MTNR1B Associated with Increased Risk of Type 2 Diabetes and Impaired Early Insulin Secretion." *Nature Genetics* 41(1): 82–88.
- Marcheva, Biliiana et al. 2010. "Disruption of the Clock Components CLOCK and BMAL1 Leads to Hypoinsulinaemia and Diabetes." *Nature* 466(7306): 627–31.
- \*Marieb, Elaine, Nicpon. 2001. 1249 pp *Human Anatomy & Physiology*. 5th ed. San Francisco: Cummings Benjamin.
- McCulloch, Laura J. et al. 2011. "GLUT2 (SLC2A2) Is Not the Principal Glucose Transporter in Human Pancreatic Beta Cells: Implications for Understanding Genetic Association Signals at This Locus." *Molecular Genetics and Metabolism* 104(4): 648–53.
- McMullan, C. J., G. C. Curhan, E. S. Schernhammer, and J. P. Forman. 2013. "Association of Nocturnal Melatonin Secretion With Insulin Resistance in Nondiabetic Young Women." *American Journal of Epidemiology* 178(2): 231–38.
- Mellado, Consuelo et al. 1989. "Effect of Pinealectomy and of Diabetes on Liver Insulin and Glucagon Receptor Concentrations in the Rat." *Journal of Pineal Research* 6(4): 295–306.
- Melyan, Z. et al. 2005. "Addition of Human Melanopsin Renders Mammalian Cells Photoresponsive." *Nature* 433(7027): 741–45.
- Mitsui, Shigeru et al. 2001. "Antagonistic Role of E4BP4 and PAR Proteins in the Circadian Oscillatory Mechanism." *Genes and Development* 15(8): 995–1006.
- \*Moore, Robert Y., Joan C. Speh, and Rehana K. Leak. 2002. "Suprachiasmatic Nucleus Organization." *Cell and Tissue Research* 309(1): 89–98.
- Morris, Christopher J. et al. 2015. "Endogenous Circadian System and Circadian Misalignment Impact Glucose Tolerance via Separate Mechanisms in Humans." *National Academy of Sciences of the United States of America* 112(17): E2225–34.



- Mühlbauer, Eckhard et al. 2009. "Loss of Melatonin Signalling and Its Impact on Circadian Rhythms in Mouse Organs Regulating Blood Glucose." *European Journal of Pharmacology* 606(1–3): 61–71.
- Mulder, H., C. L. F. Nagorny, V. Lyssenko, and L. Groop. 2009. "Melatonin Receptors in Pancreatic Islets: Good Morning to a Novel Type 2 Diabetes Gene." *Diabetologia* 52(7): 1240–49.
- Nagorny, Cecilia L F et al. 2011. "Distribution of Melatonin Receptors in Murine Pancreatic Islets." *Journal of pineal research* 50(4): 412–17.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. "<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Melatonin>." *Compound Summary for CID 896, Melatonin*.
- Olefsky, J. M., O. G. Kolterman, and J. A. Scarlett. 1982. "Insulin Action and Resistance in Obesity and Noninsulin-Dependent Type II Diabetes Mellitus." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 243(1): E15–30.
- Opperhuizen, Anne Loes et al. 2017. "Light at Night Acutely Impairs Glucose Tolerance in a Time-, Intensity- and Wavelength-Dependent Manner in Rats." *Diabetologia* 60(7): 1333–43.
- Ozaki, Yoshisuke, and Harry J. Lynch. 1976. "Presence of Melatonin in Plasma and Urine of Pinealectomized Rats." *Endocrinology* 99(2): 641–44.
- Paulose, Jiffin K., Edmund B. Rucker, and Vincent M. Cassone. 2012. "Toward the Beginning of Time: Circadian Rhythms in Metabolism Precede Rhythms in Clock Gene Expression in Mouse Embryonic Stem Cells." *Plos one* 7(11).
- Peschke, Elmar et al. 2002. "Receptor (MT1) Mediated Influence of Melatonin on cAMP Concentration and Insulin Secretion of Rat Insulinoma Cells INS-1." *Journal of Pineal Research* 33(2): 63–71.
- Peschke, Elmar, Andreas G. Bach, and Eckhard Muhlbauer. 2006. "Parallel Signaling Pathways of Melatonin in the Pancreatic Beta-Cell." *Journal of Pineal Research* 40(2): 184–91.

- \*Petersen, Max C., and Gerald I. Shulman. 2018. "Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance." *Physiological Reviews* 98(4): 2133–2223.
- Picinato, Maria C., Esther P. Haber, Angelo R. Carpinelli, and José Cipolla-Neto. 2002. "Daily Rhythm of Glucose-Induced Insulin Secretion by Isolated Islets from Intact and Pinealectomized Rat." *Journal of Pineal Research* 33(3): 172–77.
- Picinato, Maria Cecília et al. 2002. "Melatonin Inhibits Insulin Secretion and Decreases PKA Levels without Interfering with Glucose Metabolism in Rat Pancreatic Islets." *Journal of Pineal Research* 33(3): 156–60.
- Pittendrigh, Colin S., and Serge Daan. 1976. "A Functional Analysis of Circadian Pacemakers in Nocturnal Rodents." *Journal of Comparative Physiology ? A* 106(3): 223–52.
- \*Pittendrigh, Colin S, and Harold A Miller. 1993. "Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher." *Annual Review of Physiology* 55(1): 17–54.
- Poirel, Vincent-Joseph, Mireille Masson-Pévet, Paul Pevét, and François Gauer. 2002. "MT1 Melatonin Receptor mRNA Expression Exhibits a Circadian Variation in the Rat Suprachiasmatic Nuclei." *Brain Research* 946(1): 64–71.
- Preitner, Nicolas et al. 2002. "The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB $\alpha$  Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator." *Cell* 110(2): 251–60.
- Provencio, Ignacio et al. 2000. "A Novel Human Opsin in the Inner Retina." *The Journal of Neuroscience* 20(2): 600–605.
- Qian, Jingyi, Gene D. Block, Christopher S. Colwell, and Aleksey v. Matveyenko. 2013. "Consequences of Exposure to Light at Night on the Pancreatic Islet Circadian Clock and Function in Rats." *Diabetes* 62(10): 3469–78.
- Ramracheya, Reshma D. et al. 2008. "Function and Expression of Melatonin Receptors on Human Pancreatic Islets." *Journal of Pineal Research* 44(3): 273–79.
- \*Reppart, Steven M., David R. Weaver, and Catherine Godson. 1996. "Melatonin Receptors Step into the Light: Cloning and Classification of Subtypes." *Trends in Pharmacological Sciences* 17(3): 100–102.

- Ribeiro, DC et al. 1998. "Altered Postprandial Hormone and Metabolic Responses in a Simulated Shift Work Environment." *Journal of Endocrinology* 158(3): 305–10.
- Ripperger, Jürgen A., and Ueli Schibler. 2006. "Rhythmic CLOCK-BMAL1 Binding to Multiple E-Box Motifs Drives Circadian Dbp Transcription and Chromatin Transitions." *Nature Genetics* 38(3): 369–74.
- \*Rouyer, François. 2013. "Circadian Timing." In *Neurosciences - From Molecule to Behavior: A University Textbook*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 609–27.
- Ruiter, Marieke et al. 2003. "The Daily Rhythm in Plasma Glucagon Concentrations in the Rat Is Modulated by the Biological Clock and by Feeding Behavior." *Diabetes* 52(7): 1709–15.
- Sanger, F. 1949. "Fractionation of Oxidized Insulin." *Biochemical Journal* 44(1): 126–28.
- Sato, Trey K. et al. 2004. "A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian Clock." *Neuron* 43(4): 527–37.
- Schafer, H. J., and G. Kloppel. 1974. "The Significance of Calcium in Insulin Secretion." *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histology* 362(3): 231–45.
- \*Schibler, Ueli. 2007. "The Daily Timing of Gene Expression and Physiology in Mammals." *Dialogues in Clinical Neuroscience* 9(3): 257–72.
- Shankar, Mani. 2015. "Advantages of Inhaled Insulin over Insulin Injection." *International journal of novel trends in pharmaceutical sciences* 5.
- Steiner, Donald F., Dennis Cunningham, Lilian Spigelman, and Bradley Aten. 1967. "Insulin Biosynthesis: Evidence for a Precursor." *Science* 157(3789): 697–700.
- Stumpf, Ina, Ivonne Bazwinsky, and Elmar Peschke. 2009. "Modulation of the CGMP Signaling Pathway by Melatonin in Pancreatic  $\beta$ -Cells." *Journal of Pineal Research* 46(2): 140–47.
- Stumpf, Ina, Eckhard Mühlbauer, and Elmar Peschke. 2008. "Involvement of the CGMP Pathway in Mediating the Insulin-Inhibitory Effect of Melatonin in Pancreatic  $\beta$ -Cells." *Journal of Pineal Research* 45(3): 318–27.
- Sugden, David, Valentin Ceña, and David C. Klein. 1987. "Hydroxyindole O-Methyltransferase." In *Methods Enzymol*, 590–96.

- Sun, Zheng et al. 2012. "Hepatic Hdac3 Promotes Gluconeogenesis by Repressing Lipid Synthesis and Sequestration." *Nature Medicine* 18(6): 934–42.
- Tarasov, Andrei I. et al. 2013. "Frequency-Dependent Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Accumulation Regulates ATP Synthesis in Pancreatic  $\beta$  Cells." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465(4): 543–54.
- \*Thompson, Rebecca, Deborah Christie, and Peter C. Hindmarsh. 2006. "The Role for Insulin Analogues in Diabetes Care." *Current Paediatrics* 16(2): 117–22.
- Tosini, Gianluca, Susan Doyle, Mike Geusz, and Michael Menaker. 2000. "Induction of Photosensitivity in Neonatal Rat Pineal Gland." *National Academy of Sciences of the United States of America* 97(21): 11540–44.
- Tuomi, Tiinamaija et al. 2016. "Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes." *Cell Metabolism* 23(6): 1067–77.
- Ueda, R. Hiroki et al. 2002. "A Transcription Factor Response Element for Gene Expression during Circadian Night." *Nature* 418(6897): 530–34.
- Waly, Nermien E., and Richard Hallworth. 2015. "Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus." *Journal of Circadian Rhythms* 13(1).
- Wu, Jinhua et al. 2008. "Structural and Biochemical Characterization of the KRLB Region in Insulin Receptor Substrate-2." *Nature Structural & Molecular Biology* 15(3): 251–58.
- Yokono, Koichi, Richard A. Roth, and Shigeaki Baba. 1982. "Identification of Insulin-Degrading Enzyme on the Surface of Cultured Human Lymphocytes, Rat Hepatoma Cells, and Primary Cultures of Rat Hepatocytes." *Endocrinology* 111(4): 1102–8.
- Yoo, Seung-Hee et al. 2004. "PERIOD2:LUCIFERASE Real-Time Reporting of Circadian Dynamics Reveals Persistent Circadian Oscillations in Mouse Peripheral Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(15): 5339–46.
- Zarkovic, Milos, and Jean-Claude Henquin. 2004. "Synchronization and Entrainment of Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Oscillations in Cell Clusters Prepared from Single or Multiple Mouse

Pancreatic Islets.” *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 287(2): E340–47.

Zhang, Eric E et al. 2010. “Cryptochrome Mediates Circadian Regulation of cAMP Signaling and Hepatic Gluconeogenesis.” *Nature Medicine* 16(10): 1152–56.

Zimmerman, B L, and M O Tso. 1975. “Morphologic Evidence of Photoreceptor Differentiation of Pinealocytes in the Neonatal Rat.” *Journal of Cell Biology* 66(1): 60–75.