



Vrije Universiteit Brussel

Faculteit Geneeskunde & Farmacie

Formuleren en verdedigen van een wetenschappelijke hypothese

"Orphan receptors": naar een nieuw type endocrinologie en farmacologie

Robin Van der Straeten

Promotor: Prof. Dr. Bart Van der Auwera

Coördinator: Prof. Dr. Christiaan van Schravendijk



Achtergrondinformatie

Orphan receptors zijn genproducten die de structurele kenmerken bevatten van receptoren en geïdentificeerd werden zonder voorafgaande kennis over hun (mogelijke) liganden. Wanneer (endogene) liganden van een orphan receptor ontdekt worden, wordt deze laatste een ‘adopted orphan’.¹ Op basis van overeenkomende functionele domeinen kunnen receptoren onderverdeeld worden in superfamilies, waarbinnen een grote overeenkomst van de genetische code bestaat. Met behulp van bioinformatica kunnen gelijkaardige sequenties aan deze van een gekende receptor opgespoord worden in databanken. Voor deze nieuw ontdekte, vermeende receptoren kunnen vervolgens liganden opgespoord worden, die de basis kunnen zijn voor biologische en pathofysiologische studies, teneinde de therapeutische waarde van de receptor als “drug target” te bepalen.¹⁻⁴

Gestelde vraag

Het viel me op dat de Rev-Erb- α -receptor een rol speelt in de regeling van het circadiaans ritme. Ik wist reeds dat slaapstoornissen een risicofactor zijn voor de ontwikkeling van obesitas en vroeg me af of Rev-Erb- α , zoals dit reeds voor de PPAR-receptoren het geval is, een potentieel therapeutisch doelwit zou kunnen zijn voor de behandeling van obesitas.

Zoekstrategie

De resultaten voor de zoekterm “orphan receptors” in de MeSH- en PubMed-database, maakte duidelijk dat er voor elke receptorfamilie orphan receptors geïdentificeerd waren. Met behulp van enkele recente reviews (Limits: Review en Published in last 3 years) stelde ik een overzicht op van aandoeningen waarin orphan receptors een mogelijke rol spelen. Ik besloot me te beperken tot orphan receptors behorend tot de superfamilie van de nucleaire hormoonreceptoren. Gebruik makend van de Mesh-term “Orphan Nuclear Receptors” en bovenstaande limits, stelde ik een tabel op met receptoren, geassocieerde aandoening(en) en hun liganden. Vervolgens zocht ik specifiek naar artikels die handelden over de invloed van een verstoring van het circadiaans ritme op obesitas met de MeSH-zoektermen “Circadian Rhythm” AND “Obesity”, alsook “Sleep Disorders, Circadian Rhythm” AND “Obesity” telkens met de reeds vernoemde limits. Om de specifieke rol die Rev-Erb- α speelt in het circadiaans mechanisme te achterhalen, maakte ik gebruik van de zoekquery ‘ “Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 1”[MeSH] AND “Circadian Rhythm”[MeSH] : De onderzoeksartikelen die ik gebruikte voor de onderbouwing van de hypothese en het voorstel tot experimentele toetsing werden geciteerd in de gevonden reviews. Ik verkreeg een specifiek artikel over de Rev-Erb- α -antagonist SR8278 via de IUPHAR-database.⁷ De opzoeking met MeSH-subheading “Nuclear Receptor Subfamily 1, Group D, Member 1/antagonists and inhibitors” leverde geen andere antagonisten op.

Literatuurstudie

Circadiaans ritme – Vele aspecten van de menselijke fysiologie en gedrag zijn onderhevig aan een 24-uursritme, het circadiaans ritme. Biologische manifestaties, zoals onder andere de slaap-waak cyclus, de lichaamstemperatuur, de hormoonsecretie, de bloeddruk en het metabolisme worden georchestreerd door een endogeen klokmechanisme. De instandhouding van dit intern ritme laat het organisme toe veranderingen in zijn omgeving te voorspellen en te anticiperen, om zo zijn gedrag en fysiologische functies hieraan aan te passen.^{8,9}

Het circadiaans systeem is hiërarchisch georganiseerd in zoogdieren met een ‘hoofdklok’ gesitueerd in de Nu. suprachiasmaticus (NSC) van de hypothalamus.¹⁰ De licht-donker cyclus is de voornaamste regulator van de klok in de NSC. Onder constante omgevingsfactoren, i.e. een continu donkere omgeving, blijkt de periode van het circadiaans ritme licht af te wijken van 24 uur, maar onder natuurlijke condities wordt het ritme dagelijks bijgesteld door middel van licht/donkersignalen.^{8,11}

Tevens blijken de meeste organen en individuele cellen over een eigen moleculaire klok te beschikken. Beïnvloeding van deze klokken door de NSC via neurohormonale wegen is nodig voor een synchronisatie op orgaan- en systemisch niveau. De perifere klokken zijn echter ook regelbaar door hormonale en metabole signalen onafhankelijk van de NSC. Zo bewerkstelligt voedselrestrictie een faseverschuiving van de leverklok.^{8,11}

Op het moleculair niveau wordt het circadiaans ritme in stand gehouden door meerdere onderling verwoven transcriptionele en post-translationele auto-regulatorische feedback lussen, die zorgen voor een oscillatie met een periode van 24 uur van de expressie van verschillende transcripten (Fig. 1 p.9).⁶ Aan de basis ligt een transcriptiecascade geïnitieerd door transcriptiefactoren Bmal1 en Clock.

Bmal1 vormt een heterodimeer met Clock of zijn paraloog Npas2. Deze heterodimeer activeert de transcriptie van PER1, PER2, CRY1 en CRY2. Per en Cry vormen eveneens een heterodimeer, die wanneer een kritische concentratie bereikt wordt naar de kern transloceert en er de activatie door Bmal1/Clock onderdrukt. Hierdoor wordt eveneens hun eigen transcriptie onderdrukt, resulterend in stopzetting van de Bmal1/Clock-repressie en opstarting van een nieuwe cyclus.⁶

Secundaire feedback lussen, waarvan Rora en Rev-Erb- α de belangrijkste regulatoren zijn, controleren de expressie van BMAL1, CLOCK en NPAS2.²² Rora treedt op als activator van transcriptie, terwijl Rev-Erb- α transcriptie onderdrukt. Beiden binden op ROREs aanwezig in de promotorregio's van bovenstaande genen. Hun onderlinge competitie moduleert de expressie van bovenstaande klokgenen.⁵ De expressie van REV-ERB- α en ROR α wordt indirect gecontroleerd door Bmal1/Clock.⁶ Door hun rol in de glucose- en lipidehomeostase zijn zij als het ware de integratoren van klokfunctie en metabolisme.¹¹

Verschillende metabole paden staan onder invloed van circadiaanse regulering, zowel direct als indirect. De circadiaanse variatie van de glycemie en insulinegevoeligheid is zeer goed gekend in het kader van type 1 insuline-dependente diabetes, waarbij patiënten hun dosis insuline dienen aan te passen aan het tijdstip van de dag. Er bestaat eveneens een circadiaans ritme in het lipidemetabolisme, waarvan de variërende leptinespiegels een bewijs zijn.^{10,12}

Circadiaanse ontregeling leidt tot metabole afwijkingen – Een verminderde slaapduur verhoogt het risico op de ontwikkeling van insulineresistentie, diabetes en obesitas. Slaapdeprivatie leidt tevens tot een verhoogde inname van voedsel. Niet alleen minder slapen, maar ook onregelmatig slapen zoals bij shiftwerken wordt geassocieerd met obesitas, verhoogde triglyceridewaarden en lager HDL.^{13,14} Werken in shifts blijkt een onafhankelijke risicofactor te zijn voor de ontwikkeling van obesitas en metabool syndroom.¹⁴ De redenen hiervoor zijn mogelijk belemmering van de circadiaanse klok en zijn inwerking op verschillende aspecten van voedselinname, –vertering, –absorptie en energieverbruik; of de tendens dat shiftwerkers een verhoogd aandeel vetten in hun dieet hebben.¹³ CLOCK–mutante muizen zijn obees en hyperfagisch.¹⁴ Bmal1–deficiënte muizen vertonen onderdrukte diurnale variaties in glucose en triglyceridewaarden, alsook niet correct functionerende gluconeogenese.¹² Verschillende studies hebben aangetoond dat er een associatie bestaat tussen bepaalde polymorfismen van klokgenen met een verhoogde incidentie van obesitas en metabool syndroom.^{14,15}

Invloed van obesitas op het circadiaans systeem – De relatie tussen het circadiaans ritme en het metabolisme is bidirectioneel.^{10,15} Reeds kort na de start van een vetrijk dieet vertoonden muizen een verhoogde voedselinname gedurende de normale rustperiode en een gewijzigd patroon van locomotorische activiteit. Deze veranderingen in gedrag waren gecorreleerd met een disruptie van de normale klokgenexpressie (zie infra) in lever en vetweefsel, alsook een alteratie van de cyclische hormonen, waaronder leptine.¹⁶ Een vetrijk dieet heeft geen invloed op de expressie van CLOCK, BMAL1 en PER2 in de mediobasale hypothalamus.¹⁶ Daarentegen hadden muizen op een vetrijk dieet significant verhoogde Clock– en Bmal1–expressie in de Nu. tractus solitarius (NTS) ten opzichte van normaal gevoede muizen.¹⁷ In lever en vetweefsel resulteert een vetrijk dieet in een attenuatie van Clock en Bmal1. PER2 expressie bleek selectief verminderd tijdens de donkere periode.¹⁶

Personen die een 28–uurs routine volgden gedurende 10 dagen vertoonden een onderdrukking van het circulerende leptine, verhoging van de glycemie en hypertensie. Daarom lijkt desynchronisatie een staat van energietekort te induceren met gewijzigde glucosehomeostase en verlaagde insulinegevoeligheid, allebei predisponerende factoren voor metabool syndroom.⁹

Obesitas leidt eveneens in mensen tot een gewijzigde expressie van klokgenen. Expressie van BMAL1, CRY1, CRY2 en PER2 was significant gewijzigd in mononucleairen uit perifeer bloed van de niet–diabetische, obese groep (BMI = 32.2±2.1, n = 10) vergeleken met een niet–obese controlegroep

(BMI = 21.7±0.6, n=10).¹⁸ Een verschil in klokgenexpressie kon echter niet aangetoond worden in vetweefsel (BMI = 30.2±2.3 vs. 23.2±1.4, n = 11 vs. 8), uitgezonderd een significant verlaagde expressie van BMAL1 in de obese, niet-diabetische groep op één enkel tijdstip.¹⁹ In tegenstelling tot de studie in mononucleairen was studiegroep in het tweede onderzoek slechts borderline obese wat een mogelijke verklaring is voor de afwezigheid van meer significante verschillen.

Hypothese

Het voeren van muizen met vetrijk voedsel resulteert in een wijziging in het expressiepatroon van klokgenen: een attenuatie van de expressie van BMAL1, CLOCK, klokgenen gecontroleerd door Bmal1/Clock en sequentiële veranderingen in de expressie van componenten uit verscheidene metabole paden, waaronder deze behorend tot de lipide- en glucosehomeostase.^{15,16} Tevens blijkt disruptie van de circadiaanse functie, o.a. door verandering van voedingsgedrag en geattenueerde leptinespiegels, bij te dragen tot ontwikkeling van obesitas. Dit doet vermoeden dat normalisatie van de klokfunctie de ontwikkeling van obesitas kan vertragen en eventueel de gewichtstoename – deels – tenietdoen. Rev-Erb- α is hiervoor door zijn functie als integrator van metabolisme en circadiaanse klokfunctie een ideaal doelwit. Daar de BMAL1-expressie gedownreguleerd is en Rev-Erb- α een repressor van transcriptie is, leidt toediening van een antagonist tot een verhoging van de expressie van BMAL1.²⁰ Bovenstaande gegevens leiden, rekening houdend met de mogelijkheden van experimentele toetsing, tot onderstaande hypothese:

Toediening van een synthetische Rev-Erb- α -antagonist heeft door herstel van de klokfunctie een vertragend effect op ontwikkeling van dieet-geïnduceerde obesitas in C57BL/6J muizen.

Experimentele toetsing

Proefdieren – De opzet van dit experiment dient goedgekeurd te worden door de Commissie voor Ethisch Proefdierengebruik (CEP) van de VUB en te voldoen aan alle eisen gesteld door Belgische wetgeving en internationale richtlijnen. Mannelijke C57BL/6J (B6) muizen worden ondergebracht in individuele kooien met *ad libitum* toegang tot voedsel en water. Gedurende het hele experiment worden de proefdieren gehouden onder een 12 uur licht/12 uur donker cyclus (12:12 LD-cyclus). Manipulatie van de proefdieren tijdens de donkere periode gebeurt onder zwak rood licht en met infrarood- of nachtkijkers om de constantheid van de LD-cyclus te waarborgen.

Er wordt gekozen voor het C57BL/6J (B6)-muizenras omwille van hun genetische voorbeschiktheid op de ontwikkeling van obesitas wanneer *ad libitum* gevoed met vetrijk voedsel, terwijl de muizen slank blijven onder een dieet laag in vetgehalte. De wijze waarop deze muizen obesitas ontwikkelen lijkt op de wijze waarop dit bij mensen gebeurt. Tenslotte zijn de metabole abnormaliteiten en de gewichtstoename nagenoeg volledig reversieel door overschakeling op een normaal of calorie-arm

dieet.²¹ Diermodellen voor obesitas met een mutatie van het leptine(receptor)gen, zoals o.a. ob/ob muizen werden niet gekozen omwille van de gerapporteerde activiteit van leptine op de intracellulaire klokken *in vitro* en *in vivo*.^{22,23}

Interventie – SR8278, een antagonist van Rev-Erb- α , (Fig. 2 p. 9) verhoogt de expressie van BMAL1 op een dosis-afhankelijke wijze *in vitro*. In HepG2 cellen, die van nature Rev-Erb- α uitdrukken resulteerde toevoeging van SR8278 (10 μ M) in een verhoogde expressie van Rev-Erb- α -doelwitgenen.²⁰ Daar SR8278 nog nooit *in vivo* is gebruikt, dient voorafgaandelijk farmacokinetisch onderzoek gedaan worden om de te gebruiken dosissen te bepalen. De mogelijkheid om SR8278 op dergelijke wijze toe te dienen, opdat een sinusoidaal of blokvormig plasmaprofiel bekomen zou worden, werd bekeken, maar omwille van complexiteit en lage praktische haalbaarheid uitgesloten. Toediening via de voeding werd eveneens overwogen, maar door de aangetoonde verandering van voedingsgedrag in respons op het dieet zou deze wijze van toediening onvoorspelbare en ongelijke plasmaconcentraties teweegbrengen; deze methode werd daarom niet weerhouden. Om constantheid van de plasmaconcentratie en minimale manipulatie van de proefdieren te bekomen, werd uiteindelijk geopteerd voor constante infusie met behulp van een subcutaan geïmplanteerd pompje (Ithetis, Antlia SA, Lausanne, Zwitserland), dat aan een constante snelheid infuseert zodat na accumulatie een constante plasmaconcentratie van 10 μ M behouden blijft.

Proefopzet – Volgende scenario's worden voorop gesteld: 1) continu op vetrijk dieet (VD), 2) na een periode van vetrijke voeding overschakelen op een normaal dieet (ND), 3) continu een normaal dieet (ND) en 4) een normaal dieet (ND) en overschakeling op vetrijk dieet (VD). Telkens twee groepen volgen hetzelfde scenario waarvan er één na 10 weken SR8278 krijgt en de andere enkel het vehikel. (zie schema) Binnen elke groep worden de muizen onderverdeeld in 4 subgroepen, die elk een tijdsidentificatie krijgen. (Fig. 3 p. 10)

Het experiment verloopt als volgt. Op dag 6 van de 10de week wordt het minipompje geïmplanteerd. De daaropvolgende dag worden de muizen gewogen en wordt er bloed afgenomen op het toepasselijke tijdstip naargelang de subgroep. Vanaf de start van week 11 tot het einde van week 16 loopt de infusie met SR8278 of vehikel. Op de eerste dag van weken 12 tot 16 wordt het gewicht gemeten. Op de eerste dag van de 17de week worden muizen na weging, opgeofferd met 6 uur intervallen (ZT^{*} 0,6,12,18) voor het nemen van weefselstalen (mediobasale hypothalamus, lever en epididymaal vet) alsook het collecteren van bloed (Fig. 4 p. 10).

Dieet – De muizen krijgen voedsel in pelletvorm waarvan de volledige samenstelling gekend is. Als VD wordt D12492 gebruikt, dat 60% van de calorieën in vetvorm bevat en dat optimaal is om obesitas

* 'Zeitgeber Time': Tijdsaanduiding onafhankelijk van de werkelijke tijd, maar afhankelijk van omgevingsstimuli, de zogenaamde 'zeitgebers'. ZT0 komt overeen met lichten aan, ZT12 met de start van de donkere periode.

te induceren bij B6–muizen. De controlegroep krijgt het door de fabrikant aangeduide controledieet D12450B dat slechts 10%–kcal vet bevat (Research Diets, New Brunswick, NJ, Verenigde Staten).

Steekproefgrootte – Om een significant verschil in gewicht of klokgenexpressie aan te kunnen tonen tussen twee groepen met hetzelfde dieetstramien zijn 3 proefdieren nodig per groep. Om het circadiaans expressiepatroon te kunnen vaststellen zijn meerdere (4) metingen gespreid over 24 uur nodig. Het aantal benodigde proefdieren dient dus vermenigvuldigd te worden met 4, resulterend in 12 muizen per groep.

METINGEN

Lichaamgewicht wordt voor de start van de interventie, wekelijks en voor opoffering gemeten en uitgedrukt in gram. Plasma wordt gescheiden door middel van centrifugatie en bewaard bij -80°C voor analyse. **Triglyciden** en **cholesterol** worden gemeten met IDEXX instrument (IDEXX Laboratories, USA) en uitgedrukt in mg/dL. Met behulp van een glucometer (Abbott Laboratories, Precision Elite Handheld Glucometer) wordt de **glycemie** bepaald (uitgedrukt in mg/dL) **Insuline**– en **leptinespiegels** worden bepaald met behulp van een ELISA (Crystal Chem, Chicago) en uitgedrukt in ng/mL. Telkens dienen de instructies van de fabrikant opgevolgd te worden.

Quantitatieve real–time–PCR voor BMAL1 en PER2 (Applied Biosystems 7900HT Fast Real–Time PCR system) wordt uitgevoerd op totaal RNA geëxtraheerd uit bevroren weefsel met TRI–reagens (Molecular Research Center, Inc.). Relatieve waarden van expressie worden bepaald met de comparatieve C_T –methode en normalisatie ten opzichte van Gapdh–mRNA.²⁴

Analyse van een circadiaans patroon bestaat enerzijds uit het bepalen of er überhaupt sprake is van een circadiaanse oscillatie; anderzijds uit het bepalen van parameters die deze oscillatie beschrijven om de oscillaties onderling te kunnen vergelijken tussen de groepen.

Locomotoractiviteit – De kooien zijn uitgerust met een infrarooddetector gekoppeld aan een computersysteem dat continue opslag van de data verzorgt (Chronobiology Kit, Stanford Software Systems). Met bovenstaande software kan het percentage van totale activiteit gedurende de licht(rust)periode voor elke muis berekend. Hiervan wordt een wekelijks gemiddelde genomen, waarvan per groep het gemiddelde en de standaardfout berekend wordt en onderling vergeleken.

Voedingsgedrag – Het gewicht van de voedseldispenser wordt continu gemonitord (Feed–Scale – Feeding Computer, Columbus Instruments of Episodic Intake Monitor, Research Diets). Vervolgens wordt voor elke muis een wekelijks gemiddelde van het percentage van de dagelijkse voedselinname dat gedurende de lichtperiode geconsumeerd werd berekend. Van deze percentages wordt een groepsgemiddelde bepaald, waarvoor gekeken wordt of dit significant verschilt tussen de groepen.

Statistische analyse – Een p –waarde $< 0,05$ wordt als statistisch significant beschouwd. Wanneer slechts 2 groepen vergeleken worden, dient gebruik gemaakt te worden van een Student t –test. In het

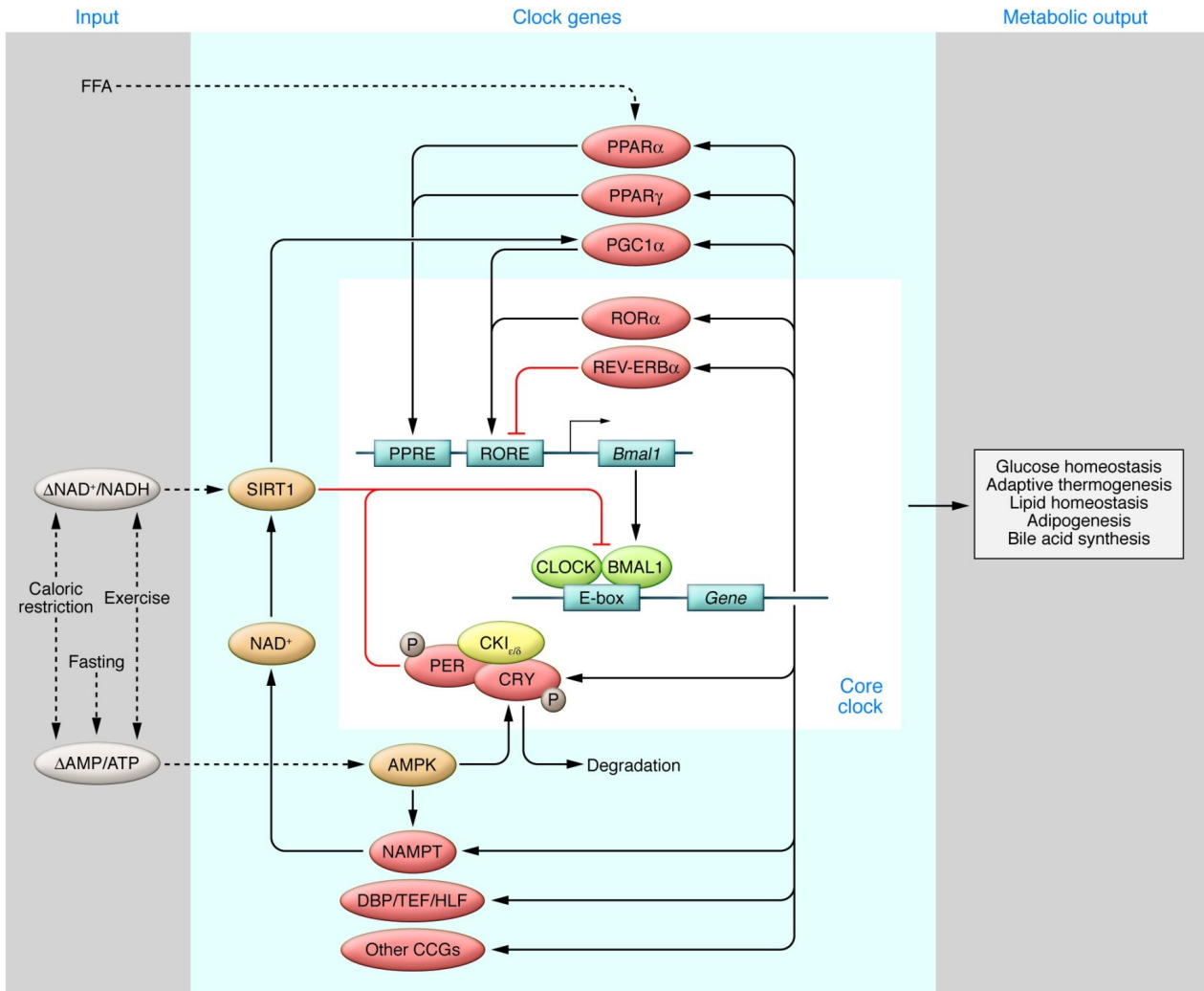
geval drie of meer groepen vergeleken worden, gebeurt dit met een ANOVA gevolgd door een post-hoc Scheffe's tests.

Interpretatie van de resultaten – Aan de ene kant dient gekeken te worden of toediening van SR8278 een daling van het gewicht en een verbetering van de metabole parameters teweegbracht. Aan de andere kant moet nagegaan worden of de interventie een normalisering van de klokfunctie tot gevolg had. Tenslotte kan ter versterking van bevestiging van de hypothese bekeken worden of de mate van normalisering van de circadiaanse functie gecorreleerd is met de grootte van de gewichtsafname en verandering van de metabole parameters. Tevens kan door analyse van de wekelijkse metingen bestaan van een oorzaak-gevolg-relatie tussen de correctie van het circadiaans systeem en de reversie van obesitas aangetoond worden.

Besluit

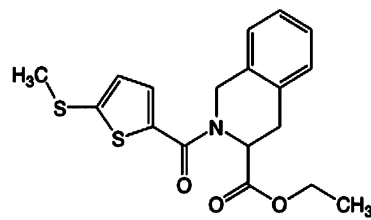
De circadiaanse klok beïnvloedt het metabolisme en wordt er op zijn beurt door gemoduleerd. Circadiaanse disfunctie blijkt naast obesitas, metabole aandoeningen en bepaalde slaapstoornissen eveneens geassocieerd met kankergroei en inflammatie.⁹ Nucleaire receptoren, waaronder Rev-Erb- α , zijn omwille van hun centrale positie in tal van pathways ideale therapeutische targets. Herstel van de normale klokfunctie zou een aanvulling kunnen zijn op de behandeling van obesitas, die nog steeds dient te bestaan uit een beperking van de calorieinname en een verhoging van de lichaamsbeweging.

Figuren



Figuur 1: Organisatie van de klok op moleculair niveau

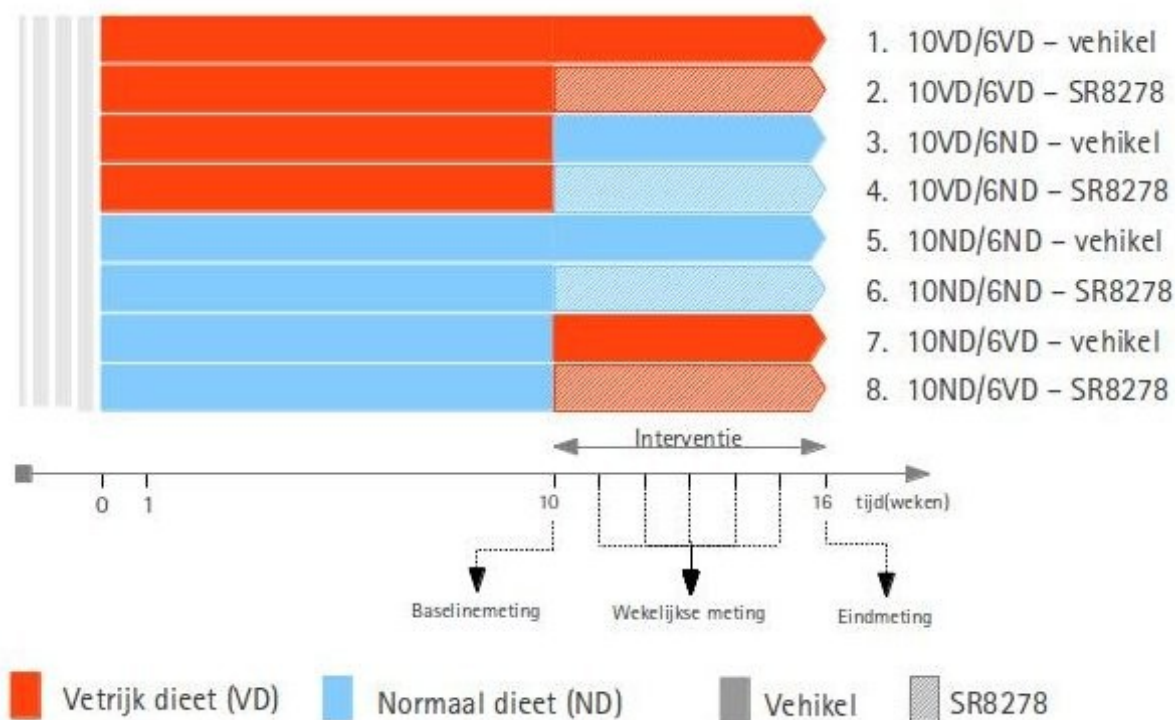
Het klokmechanisme bestaat uit verschillende transcriptie/translatie feedback lussen, waaronder ook posttranscriptionele regulatie (geel), die oscilleren met een periode van ongeveer 24 uur. Clock en Bmal1 (groen) activeren, als heterodimeer, de transcriptie van vele doelwitgenen (rood), die op hun beurt diverse metabole processen regelen en/of terugkoppelen naar de core klok. (Uit ref. 10)



SR8278

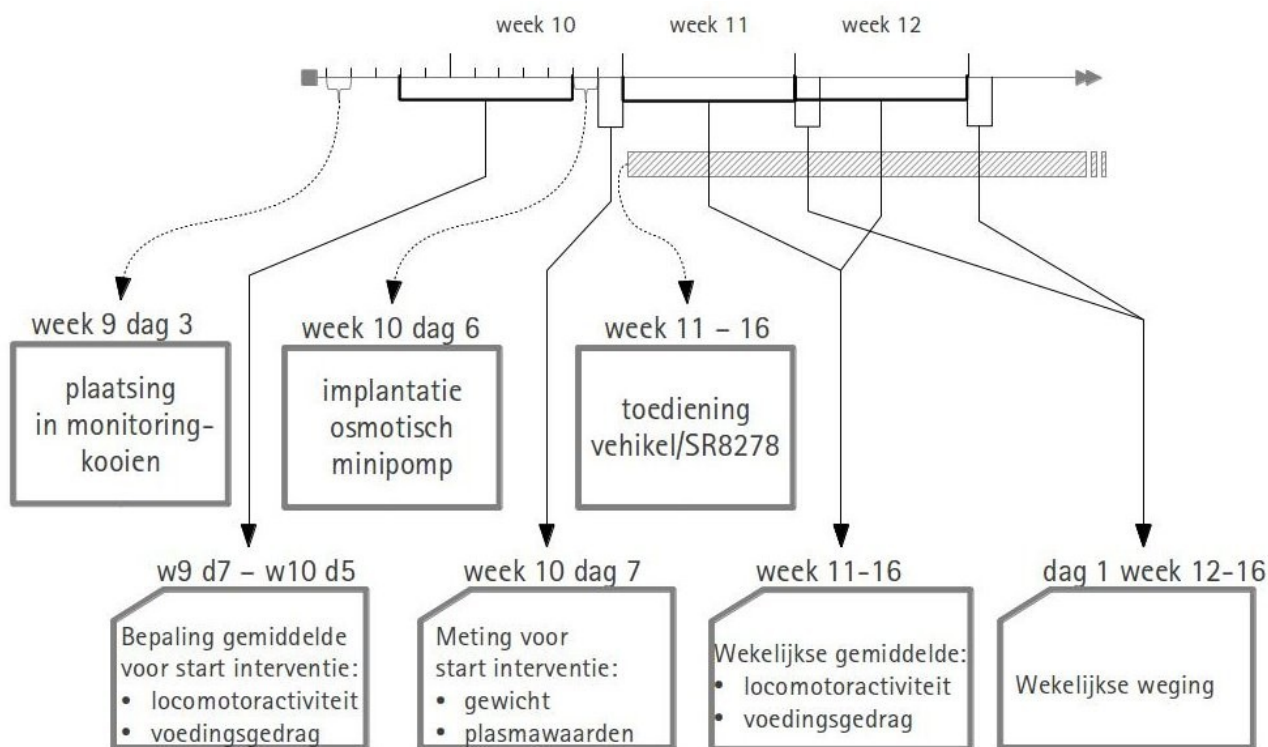
REV-ERB Antagonist

Figuur 2: Chemische structuur van SR8278 (Uit ref. 20)



Figuur 3: Tijdslijn van het voedingsregime van de groepen.

Notaties achter het groepsnummer duiden het aantal weken op een bepaald type dieet (ND, normaal dieet of VD, vetrijk dieet) aan en eventuele vehikel/SR8278 toediening. De kleur van de balk komt overeen met het type dieet. Arcering van de pijl wijst erop dat desbetreffende groep SR8278 toegediend krijgt. De andere groepen krijgen enkel het vehikel toegediend.



Figuur 4: Verloop van het experiment (week 9-12)

Referenties

1. Stadel JM, Wilson S, Bergsma DJ. (1997) Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 18:430-7.
2. Shi Y. (2007) Orphan nuclear receptors in drug discovery. *Drug Discov Today.* 12:440-5.
3. Schulman IG. (2010) Nuclear receptors as drug targets for metabolic disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 30;62:1307-15.
4. Schupp M, Lazar MA. (2010) Endogenous ligands for nuclear receptors: digging deeper. *J Biol Chem.* 24;285:40409-15.
5. Jetten AM. (2009) Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal.* 7:e003.
6. Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP. (2011) The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. *Future Med Chem.* 3:623-638.
7. 1D. Rev-Erb receptors: Rev-Erb- α . Laatst gewijzigd op 01/03/2012. Laatst geraadpleegd op 25/03/2012. IUPHAR database (IUPHAR-DB), <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=596>.
8. Teboul M, Gréchez-Cassiau A, Guillaumond F, Delaunay F. (2009) How nuclear receptors tell time. *J Appl Physiol.* 107:1965-71.
9. Bechtold DA, Gibbs JE, Loudon AS. (2010) Circadian dysfunction in disease. *Trends Pharmacol Sci.* 31:191-8.
10. Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. (2011) Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest.* 121:2133-2141.
11. Duez H, Staels B. (2009) Rev-erb- α : an integrator of circadian rhythms and metabolism. *J Appl Physiol.* 107:1972-80.
12. Froy O. (2010) Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev.* 31:1-24.
13. Ekmekcioglu C, Touitou Y. (2010) Chronobiological aspects of food intake and metabolism and their relevance on energy balance and weight regulation. *Obes Rev.* 12:14-25.
14. Gómez-Abellán P, Madrid JA, Ordovás JM, Garaulet M. (2012) Chronobiological aspects of obesity and metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr.* 59:50-61.
15. Delezie J, Challet E. (2011) Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Ann NY Acad Sci.* 124:30-46.
16. Kohsaka A, Laposky AD, Ramsey KM, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. (2007) High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab.* 6:414-21.
17. Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. (2009) Obesity alters circadian expressions of molecular clock genes in the brainstem. *Brain Res.* 1263:58-68.
18. Tahira K, Ueno T, Fukuda N, Aoyama T, Tsunemi A, Matsumoto S, Nagura C, Matsumoto T, Soma M, Shimba S, Matsumoto Y. (2011) Obesity alters the expression profile of clock genes in peripheral blood mononuclear cells. *Arch Med Sci.* 7:933-40.
19. Otway DT, Mäntele S, Bretschneider S, Wright J, Trayhurn P, Skene DJ, Robertson MD, Johnston JD. (2011) Rhythmic diurnal gene expression in human adipose tissue from individuals who are lean, overweight, and type 2 diabetic. *Diabetes.* 60:1577-81.
20. Kojetin D, Wang Y, Kamenecka TM, Burris TP. (2010) Identification of SR8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB. *ACS Chem Biol.* 6:131-4.
21. Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. (2004) Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav.* 81:243-8.
22. Ando H, Kumazaki M, Motosugi Y, Ushijima K, Maekawa T, Ishikawa E, Fujimura A. Impairment of peripheral circadian clocks precedes metabolic abnormalities in ob/ob mice. *Endocrinology.* 152:1347-54.
23. Vieira E, Marroquí L, Batista TM, Caballero-Garrido E, Carneiro EM, Boschero AC, Nadal A, Quesada I. (2012) The clock gene Rev-erb α regulates pancreatic β -cell function: modulation by leptin and high-fat diet. *Endocrinology.* 153:592-601.
24. Schmittgen TD, Livak KJ. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 3:1101-8.