

Mind your clocks! The role of the biological clock in human metabolic health

Citation for published version (APA):

Hansen, J. (2017). *Mind your clocks! The role of the biological clock in human metabolic health*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20171115jh>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20171115jh](https://doi.org/10.26481/dis.20171115jh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The growing increase in the prevalence of obesity and type 2 diabetes mellitus (T2D) imposes an important global health issue, as this is associated with high co-morbidity and mortality and causes a major burden on health care costs. Indeed, the major determinants of obesity and T2D are high caloric intake and reduced physical activity, but these factors cannot entirely explain the increasing prevalence of these clinical manifestations. Hence, it has been speculated that this development could be attributed to drastic lifestyle changes in response to the industrialization of our modern society, which may not be restricted to changes in diet and physical activity [1]. More particular, disruption of the biological rhythm has been subjected to play a central role in metabolic disease development. Such disruption can occur when our internal biological clock is misaligned to our behavioral cycle (food, sleep, activity), as in across time-zone travel. Misalignment can also occur in more common situations such as working shifts, partying through the night or sleeping in on weekends – also known as ‘social jetlag’. In Central Europe over 70% of a surveyed population suffers from social jetlag [2]. To date, it is not fully understood how disturbances of the biological clock promote the risk to develop obesity and T2D; yet epidemiological studies demonstrate compelling evidence for an association of shift work [3], late meal timing [4], late chronotype [5] and social jetlag [6] with increased risk for obesity and T2D. Hence, in this thesis we examined the possible link between the disruption of the human biological clock and derangements in human energy metabolism, and investigated to which extent this contributes to the etiology of obesity and type 2 diabetes mellitus.

In type 2 diabetes etiology altered skeletal muscle mitochondrial metabolism and insulin resistance are central, therefore we employed two strategies to examine the role of the skeletal muscle molecular clock: First, a cellular model was set up and used (**CHAPTER 2, 3, 4**) to characterize the molecular clock in skeletal muscle of healthy, obese, and type 2 diabetes patient donors. Subsequent human intervention studies were conducted to characterize the human energy metabolism under normal and misalignment conditions (**CHAPTER 5, 6**).

A methodological approach is described in **CHAPTER 2** that led to the development of a skeletal muscle cellular model to investigate circadian rhythms *in vitro*. For this purpose, we discuss the use of straight versus parallel timeline synchronization. In line with this, data reliability for time point and time course robustness was demonstrated by introduction of multiple reference gene correction, rather than conventional single gene correction. Serum shock was used to align the cellular rhythms of the individual cells in culture. Synchronization was highly reproducible also between cultures of different donors. Analysis of clock and metabolic genes at baseline was used to confirm that serum shock did not adversely alter target gene expression nor donor metabolic phenotype in culture. Intriguingly, we encountered first indications of altered gene expression between cultures of sedentary lean healthy subjects and type 2 diabetes patients for clock genes and regulators of the molecular clock (CLOCK, REVERBA and SIRT1).

Subsequently, in **CHAPTER 3** this model was used to investigate whether circadian rhythms were different amongst donors with different states of metabolic health. Hence, we examined circadian rhythms in *in vitro* synchronized cultures of donors with a wide range in metabolic health; from athletes to lean sedentary men, and obese but otherwise healthy men to obese type 2 diabetes patients. Over a 72-hour time course synchronized cultures of all four groups displayed robust circadian rhythms in core clock gene expression. Additionally, we found modest rhythmic expression of key-regulators in carbohydrate and lipid metabolism. It is noteworthy, that regulatory genes of the molecular clock with input from metabolic pathways, such as REVERBA and SIRT1 were dampened in amplitude in cultures of type 2 diabetes patients. Intriguingly, both genes are important regulators in energy metabolism and also in mitochondrial biogenesis.

Hence, in **CHAPTER 4**, we proceeded with the cellular model to explore whether such differences translate to changes in mitochondrial respiration, and to answer whether human mitochondrial function is intrinsically rhythmic. However, observed changes in mitochondrial respiration in a time course of 30 hours with 6-hourly measurements did not resemble rhythmicity. Unexpectedly, we encountered pronounced rhythmicity in protein content in cultures of all groups; the reason for the 24-hour variation in total cellular protein content could not be revealed from the present study. Yet, regardless of total protein

content, a markedly reduced mitochondrial function could be observed in cultures of type 2 diabetes donors at all time points, in comparison to the groups.

With the novel findings from the preceding chapters, in **CHAPTER 5** we hypothesized that human skeletal muscle is also rhythmic *in vivo*, as well as whole-body energy metabolism. To examine this, in **CHAPTER 5** young, lean, healthy men were enrolled in a standardized protocol with regular meals, physical activity and sleep to reflect our everyday lifestyle. Skeletal muscle biopsies were taken 5-hourly for 24 hours to assess mitochondrial function and gene expression. In addition, whole-body resting energy expenditure and substrate oxidation were measured. Indeed, clock expression was found to be circadian in human skeletal muscle. Interestingly, also skeletal muscle mitochondrial function, assessed by *ex vivo* high resolution respirometry, revealed a 24-hour rhythm, with a peak at 11PM and a trough at 1PM. Intriguingly, the peak of whole-body energy expenditure coincided with highest skeletal mitochondrial function, while being lowest at 4AM. These findings are of relevance, as type 2 diabetes is characterized by low energy expenditure and reduced mitochondrial function. It is tempting to speculate that disturbing the day-night rhythm could derange metabolic health by altering mitochondrial function.

It has been indicated by animal studies that the molecular clock drives important tissue-specific functions, that orchestrate whole-body homeostasis. Given the findings of the preceding chapter, we hypothesized that the molecular clock under circadian misalignment would not re-align rapidly resulting in metabolic disturbances such as insulin resistance and altered mitochondrial function. To this end, as described in **CHAPTER 6**, we conducted a randomized cross-over trial at which healthy young male subjects were examined during a 3-day control period and a 3.5-day misalignment period (12-hour rapid shift). Metabolism was assessed by measuring insulin sensitivity, mitochondrial function and whole-body energy expenditure. Indeed, under circadian misalignment the skeletal muscle molecular clock did not re-align to the new behavioral rhythm within 3 days. Furthermore, circadian misalignment led to decreased peripheral insulin sensitivity and disturbed plasma metabolites. Ultimately, increased mitochondrial oxidative capacity as well as increased sleeping metabolic rate, indicated mistimed and impaired mitochondrial efficiency.

Together, these findings support the association of circadian misalignment with the increased risk to develop type 2 diabetes.

As discussed in **CHAPTER 7**, these findings underscore that circadian misalignment as in Jetlag-conditions can inflict metabolic disturbances in healthy subjects. Hence, disruption of the biological clock by altered gene expression or circadian misalignment could indeed contribute to the development of metabolic disease such as type 2 diabetes mellitus.

Zusammenfassung

Die stetige Zunahme von Obesitas und Typ 2 Diabetes Mellitus (T2D) stellt ein großes gesundheitliches Problem dar, da diese mit Folgeerkrankungen und einer erhöhten Sterblichkeitsrate einhergeht. Darüber hinaus verursachen diese Erkrankungen weltweit eine hohe finanzielle Belastung für das Gesundheitssystem. Es ist bekannt, dass zu den Risikofaktoren von Obesitas und Typ 2 Diabetes sowohl eine hochkalorische Ernährung als auch eine geringe körperliche Aktivität gehören, doch diese Faktoren alleine können die zunehmende Prävalenz dieser Krankheitsbilder nicht vollständig erklären. Deshalb wird schon seit längerem vermutet, dass diese Entwicklung mit den drastischen Lebensstil-Veränderungen der heutigen Gesellschaft zusammenhängt, welche sich aus der Industrialisierung ergeben und sich nicht nur auf Veränderungen in der Ernährung und der körperlichen Aktivität beschränken. Es wird davon ausgegangen, dass eine Störung der biologischen Uhr eine maßgebliche Rolle bei der Entwicklung von Stoffwechselerkrankungen spielt. Diese Störungen kommen zustande, wenn unsere innere biologische Uhr nicht synchron zu unserem Verhalten läuft. Damit ist gemeint, dass die Nahrungsaufnahme, der Schlaf und die Aktivitätsphasen asynchron zu unserer inneren Uhr laufen, wie es z.B. bei Interkontinentalflügen der Fall ist. Doch dieser Zustand entsteht noch viel häufiger in unserem alltäglichen Leben, nämlich immer dann, wenn z.B. Schichtarbeit, „Durchfeiern“, oder langes Ausschlafen am Wochenende praktiziert werden. Dieser Zustand wird als „soziales Jetlag“ bezeichnet. Nach Erhebungen in Zentraleuropa sind mittlerweile mehr als 70% der Bevölkerung davon betroffen [3]. Zurzeit ist noch nicht geklärt, wie die Störungen der biologischen Uhr das Risiko fettleibig zu werden und Typ 2 Diabetes zu entwickeln, begünstigen. Jedoch weisen epidemiologische Studien darauf hin, dass Schichtarbeit [4], späte Nahrungsaufnahme am Abend [5], später Chronotyp [6] und „soziales Jetlag“ [7] das Risiko erhöhen Obesitas und Typ 2 Diabetes zu entwickeln.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie genau diese mögliche Verbindung zwischen der biologischen Uhr und dem humanen Stoffwechsel untersucht, mit dem Ziel mögliche Mechanismen in der Ätiologie von Obesitas und Typ 2 Diabetes zu identifizieren.

Charakteristisch für Typ 2 Diabetes ist die in Skelettmuskulatur vorliegende verminderte mitochondriale Kapazität sowie eine Insulinresistenz. Daher wurden zwei Strategien

angewendet, um die Rolle der molekularen biologischen Uhr im Skelettmuskel zu untersuchen. Zuerst wurde ein zelluläres Modell entwickelt und genutzt (**Kapitel 2, 3, 4**), um die molekulare Uhr des Skelettmuskels von gesunden, fettsüchtigen und Typ 2 Diabetikern zu charakterisieren. Des Weiteren wurde der Stoffwechsel in Humanstudien unter normalen Lebensbedingungen sowie nach einer zirkadianen Phasenverschiebung charakterisiert (**Kapitel 5, 6**).

Die methodische Entwicklung des Zellmodells zur Untersuchung, ob zirkadiane Rhythmen intrinsisch in Skelettmuskelzellen erzeugt werden können, wird in **Kapitel 2** beschrieben. Zu diesem Zweck wird zuerst der Nutzen eines singulären sowie parallelen Zeitlinien-Ansatzes demonstriert. Des Weiteren werden die Referenzgenpool-Normalisierung der Normalisierung mit einzelnen Referenzgenen gegenübergestellt, um die gesteigerte Robustheit der Normalisierung für einzelne Datenpunkte sowie Daten im Experimentenverlauf zu demonstrieren. Mit dem Ziel die individuellen Zellen einer Zellkultur zur Synchronisation anzuregen, wurden diese kurzzeitig mit Serum behandelt. Die Synchronisation war bei allen Spenderkulturen reproduzierbar. Eine Quantifizierung der molekularen Uhr-Gene sowie weiterer Gene des Stoffwechsels zeigten, dass die Prozedur der Synchronisation nicht den Phänotyp des Spenderstoffwechsels in den Zellkulturen beeinträchtigte.

Interessanterweise konnten bei dieser ersten Analyse Unterschiede in der Expression von Genen der molekularen Uhr sowie deren Regulatoren in den Zellkulturen von gesunden und Typ 2 Diabetikern festgestellt werden.

Anschließend wurde dieses Zellmodell in **Kapitel 3** zur Anwendung gebracht, um zu untersuchen, ob die zirkadiane Rhythmik durch den Spenderstoffwechsel in Zellkulturen verändert ist. Hierfür wurden Spenderzellen von Ausdauersportlern mit denen von schlanken gesunden Nichtsportlern verglichen. Des Weiteren wurden Spenderzellen von fettsüchtigen, aber darüber hinaus gesunden Freiwilligen, mit denen von Typ 2 Diabetikern verglichen. Über einen erfassten Zeitverlauf von 72 Stunden zeigten die synchronisierten Kulturen aller vier Gruppen robuste zirkadiane Rhythmen in der Genexpression der molekularen Uhr. Ferner wurden nur moderate Rhythmen in Stoffwechselgenen des Kohlehydrat- und Fettstoffwechsels festgestellt. Auffallend war jedoch, dass regulatorische

Gene der molekularen Uhr, die als Sensoren des Energiestoffwechsels wirken, (REVERBA und SIRT1) einen gedämpften Rhythmus in Zellkulturen der Typ 2 Diabetiker aufzeigten. Es handelt sich bei diesen Genen überdies um zentrale Regulatoren des Energiestoffwechsels und der mitochondrialen Biogenese.

Um zu untersuchen, ob diese Unterschiede in der Genexpression zu einer Veränderung im mitochondrialen Stoffwechsel führen könnten, und auch um zu beantworten, ob mitochondriale Kapazität einen intrinsischen zirkadianen Rhythmus hat, wurde erneut das Zellmodell verwendet, wie in **Kapitel 4** beschrieben. Hierzu wurde die mitochondriale Kapazität in einem Zeitverlauf von 30 Stunden 6-stündlich gemessen. Unerwarteterweise wurde nicht im mitochondrialen Stoffwechsel ein Rhythmus festgestellt, sondern in dem Gesamtproteingehalt der gemessenen Proben. Die Ursache für diese in allen Gruppen festgestellte rhythmische Fluktuation konnte in der vorliegenden Studie nicht abschließend geklärt werden. Jedoch, unabhängig vom Proteingehalt, konnte eine starke Reduktion der mitochondrialen Kapazität zu allen Zeitpunkten in den Zellkulturen der Typ 2 Diabetiker festgestellt werden.

Mit den Erkenntnissen der vorangehenden Kapitel wurde in **Kapitel 5** die Hypothese aufgestellt, dass der Energiestoffwechsel sowohl auf Ebene des Skelettmuskels als auch im gesamten Körper rhythmisch ist. Um dies zu untersuchen, wurden schlanke, junge männliche Freiwillige unter standardisierten normalen Lebensbedingungen gemessen (normale Mahlzeiten, durchschnittliche körperliche Aktivität und normaler Schlaf). Im Verlauf von 24 Stunden wurden 5-stündlich die mitochondriale Kapazität, der Ganzkörperstoffwechsel und die Genexpression gemessen.

Damit konnte bestätigt werden, dass in der Tat auch im Skelettmuskelgewebe die Expression von molekularen Uhr-Genen zirkadianer Natur ist. Auffallenderweise zeigten sowohl die mitochondriale Kapazität des Skelettmuskels als auch der Ganzkörperstoffwechsel einen Tag-Nacht-Rhythmus, der sein Maximum um 23 Uhr erreichte. Hingegen lag der Tiefpunkt des Ganzkörperstoffwechsels um 4 Uhr nachts vor, während dieser erst um 13 Uhr bei der mitochondrialen Kapazität des Skelettmuskels auftrat.

Mit dem Vorwissen, dass Typ 2 Diabetes durch eine niedrigere mitochondriale und Ganzkörperstoffwechselaktivität charakterisiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine Störung des Tag-Nacht-Rhythmus den Ganzkörperstoffwechsel durch eine veränderte mitochondriale Kapazität nachteilig beeinflussen kann.

Erkenntnisse aus Tierversuchen haben bereits Hinweise darauf geliefert, dass die molekulare Uhr wichtige gewebespezifische Funktionen steuert, um das Gleichgewicht des Körpers zu begünstigen. Anhand der vorangegangenen Studien wurde in **Kapitel 6** die Hypothese aufgestellt, dass sich bei einer akuten Verschiebung der zirkadianen Phase die molekulare Uhr nicht an die neue Phase anpasst, wodurch Skelettmuskelfunktionen gestört werden können, wie z.B. die mitochondriale Kapazität und die Insulinsensitivität.

Um dies näher zu untersuchen, wurden junge gesunde männliche Freiwillige für 3 Tage unter normalen Lebensbedingungen und für 3,5 Tage zur zirkadianen Phasenverschiebung einem standardisierten Alltag unterzogen. Die Analyse der Genexpression zeigte, dass die Gene der molekularen Uhr tatsächlich den ursprünglichen Rhythmus beibehalten. Stoffwechselbasierte Messungen der Probanden ergaben, dass bei Phasenverschiebung eine Reduktion der Insulinsensitivität auftritt. Des Weiteren konnte eine erhöhte mitochondriale Kapazität im Skelettmuskel sowie ein im Schlaf erhöhter Energiestoffwechsel vorgefunden werden; letztere Ergebnisse weisen auf eine verminderte mitochondriale Effizienz hin.

Wie in **Kapitel 7** ausführlich diskutiert, unterstreichen diese Erkenntnisse die Vermutung, dass zirkadiane Phasenverschiebung, wie sie im „sozialen Jetlag“ vorkommt, Stoffwechselstörungen in gesunden Menschen hervorrufen kann. Dementsprechend könnte die Störung der biologischen Uhr, durch sowohl veränderte Genexpression als auch durch zirkadiane Phasenverschiebung, zu der Entstehung von Stoffwechselstörungen wie Typ 2 Diabetes beitragen.