

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Jaanika Moro

**Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring une kestust määravate geneetiliste faktorite
identifitseerimiseks Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu andmetel
Une kestuse seos terviseseisunditega**

Magistritöö

Juhendajad: Maris Teder–Laving, MSc
Prof. Andres Metspalu, M.D., PhD

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Une ja metabolismiprotsesside rütmilisus	7
1.1.1. Une ja ärkveloleku rütm	7
1.1.2. Metabolismi rütm	8
1.1.2.1. Metaboliitide ööpäevased rütmid.....	10
1.2. Tsirkadiaanse kella ja metaboolse protsessi molekulaarne integratsioon.....	13
1.2.1. DNA pakkimine ja kromatiini remodelleerimine	15
1.2.1.1. SIRTUIN perekonna valgud	15
1.2.2. Metaboolsed geenid ja geeniproduktid.....	17
1.3. Tsirkadiaanse- ja kardiometaboolse häirituse seosed	18
1.3.1. Metaboolne fenotüüp häiritud tsirkadiaanse rütmi korral	18
1.3.2. Metaboolne fenotüüp ebapiisava ja ebakvaliteetse une korral	20
1.3.3. Tsirkadiaanne fenotüüp ebaregulaarse toitumise korral	22
1.4. Une kestust analüüsivad ülegenoomsed assotsatsiooniuuringud.....	23
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	26
2.1. Töö eesmärgid.....	26
2.2. Materjal ja meetodika	26
2.2.1. Valim	26
2.2.2. Ülegenoomne assotsatsiooniuuring keskmise une kestuse analüüsiks.....	27
2.2.2.1. Genotüüpiseerimine	27
2.2.2.2. Fenotüübiandmete ettevalmistamine	27
2.2.2.3. Genotüübiandmete ettevalmistamine.....	27

2.2.2.3.1. Kvaliteedikontroll	27
2.2.2.3.2. Imputeerimine	28
2.2.2.3.3. Statistiline analüüs	28
2.2.3. Une pikkuse ja haiguste vaheliste trendide kirjeldamine	29
2.3. Tulemused ja arutelu	31
2.3.1. Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud ja metaanalüüs.....	31
2.3.2. Une pikkuse ja haiguste vahelised trendid	46
KOKKUVÕTE	56
SUMMARY	58
TÄNUSÕNAD	60
KIRJANDUSE LOETELU.....	61
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	70
LISAD	71
Lisa 1.....	71
Lisa 2.....	72
Lisa 3.....	74
Lisa 4.....	75
Lisa 5.....	76
Lisa 6.....	77
Lisa 7.....	78
Lisa 8.....	79
LIHTLITSENTS.....	81

KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID

α -MSH	Melanokortiin (<i>α-melanocyte-stimulating hormone</i>)
Δ MS	Töö- ja puhkepäevade une keskaegade vahe ehk sotsiaalne „vööndivahetusväsimus” (<i>social jetlag</i>)
AgRP	Aguutiseoseline peptiid (<i>agouti-related protein</i>)
AMPK	Adenosiinmonofosfaat proteiini kinaas (<i>5`AMP-activated protein kinase</i>)
ap	Aluspaar (<i>base pair</i>)
ARC	Kaartuum (<i>nucleus arcuatus</i>)
AvSD	Keskmine unepikkus (<i>average sleep duration</i>)
<i>Bmal1</i> ehk <i>Arntl</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like</i> geen
CART	Kokaiini-amfetamiiniga reguleeritud transkript (<i>cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>)
CI	Usaldusintervall (<i>confidence interval</i>)
<i>Clock</i>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i> geen
<i>Cry</i>	<i>Cryptochrome</i> geen
DMH	Dorsomediaalne hüpotalamuse tuum (<i>dorsomedial hypothalamus</i>)
dSPZ	Dorsaalne subparaventrikulaarne tsoon (<i>dorsal subparaventricular zone</i>)
DST	Suveaeg (<i>daylight saving time</i>)
GC	Gaaskromatograafia (<i>gas chromatography</i>)
GWAS	Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (<i>genome-wide association study</i>)
HAT	Histoonide atsetüültransferaas (<i>histone acetyltransferase</i>)
HDAC	Histoonide deatsetülaas (<i>histone deacetylase</i>)
HDL	Kõrge tihedusega lipoproteiin (<i>high- density lipoprotein</i>)
HPA- telg	Hüpotalamuse-hüpofüüsi-neerupealise telg (<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>)
KMI	Kehamassiindeks
Konstantne rutiin	Konstantsed käitumuslikud- ja keskkonna tingimused, mis hõlmavad kontrollitud hämarat valgust ja temperatuuri ning kontrollitud aktiivsuse-toitumise- ja unerežiime.
LC	Vedelikkromatograafia (<i>liquid chromatography</i>)
Luks	Pinna valgustatuse ühik
MCTQ	Müncheni kronotüübi küsimustik (<i>Munich ChronoType Questionnaire</i>)
MetS	Metaboolne sündroom (<i>metabolic syndrome</i>)
MS	Mass-spektromeetria (<i>mass spectrometry</i>)
MSFscn	Une keskaeg vabadel päevadel, korrigeeritud töönädala jooksul kogunenud unepuuduse suhtes. Kronotüübi hinnang (<i>mid-sleep on free</i>)

	<i>days, sleep corrected).</i>
NAD	Nikotiinamiid adeniin dinukleotiid (<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
<i>Nampt</i>	Nikotiinamiid fosforibosültransferaasi geen (<i>nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>)
NPY	Neuropeptiid Y (<i>neuropeptide Y</i>)
<i>Ntrk2</i>	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2</i> geen
OR	Šansside suhe (<i>odds ratio</i>)
<i>Per</i>	<i>Period</i> geen
POMC	Proopiomelanokortiin (<i>pro-opiomelanocortin</i>)
<i>Rev-erba</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1(NR1D1)</i> geen
<i>Rora</i>	<i>RAR-related orphan receptor alpha</i> geen
SCN	Suprakiasmaatiline tuum (<i>suprachiasmatic nucleus</i>)
<i>Sfrp1</i>	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i> geen
SIRTUIN valgud	Klass III histoonide deatsetülaasid
SNP	Ühenukleotiidne polümorfism (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
<i>Zeitgeber</i>	Saksa keeles sünkroniseerija ehk aja andja. Väline nt keskkonnast tulev mõjur (valgus, toit), mis sünkroniseerib organismi bioloogilisi rütme Maa 24-tunnise öö ja päeva vaheldumise tsükliga.
TF	Transkriptsioonifaktor (<i>transcription factor</i>)
<i>Tmem17</i>	<i>Transmembrane protein 17</i> geen
<i>Trib1</i>	<i>Tribbles homolog 1</i> geen
T2D	II tüüpi diabeet (<i>type two diabetes</i>)
vSPZ	Ventraalne subparaventrikulaarne tsoon (<i>ventral subparaventricular zone</i>)

SISSEJUHATUS

Kõikide organismide elu struktureerib ööpäevane aktiivsuse ja puhkeperioodi ehk une ja ärkveloleku vaheldumine. Olenemata olulistest edusammudest une uurimisel, puuduvad meil senini vastused paljudele fundamentaalsetele une esinemisega seotud küsimustele. Füsioloogilisel tasemel teatakse, et uni tagab meile aja muuta, taastada ja parandada organismi. Molekulaarsel tasandil on teada, et endogeenset tsirkadiaanset kellasüsteemi sünkroniseeritakse aktiivselt keskkonna öö ja päeva tsükliga. Sünkroniseerimine omakorda tekitab füsioloogilisi ja käitumuslikke rütme, alustades geeniekspressiooni, hormoonide ja metaboliitide rütmiga ning lõpetades tervikliku une ja ärkveloleku perioodilisusega. (Roenneberg jt., 2015). Imetajate puhul on märgatud, et une integratsioon metabolismiga optimeerib energia kogumist ja tarbimist vastavalt ööpäeva kulgemisele (Marcheva jt., 2013). Une kolmest karakteristikust – ajastusest, kvaliteedist ja kestusest on just viimased kaks olulised metaboolsete protsesside mõjutajad (Allebrandt jt., 2013). Une kestus on kompleksne tunnus, sõltudes soost, vanusest ja veel paljudest eksogeensetest faktoritest (Allebrandt jt., 2010). Perekondlikult esinevad unehäired tõestavad, et une kestus on geneetiliselt määratletud ning ülegenoomsed assotsiatsioonianalüüsid on une multigeenset tagapõhja kinnitanud (Gottlieb jt., 2014).

Just viimasel kümnendil on enam hakatud tähelepanu pöörama tõsiasjale, et kellasüsteem ja metaboolsed protsessid on omavahel põimunud. Kehakaalu ning une kestuse ja ajastuse assotsiatsioone on korduvalt kinnitatud (Watson jt., 2010, Lauderdale jt., 2009, Bjorvatn jt., 2007). Uneparameetrite ning kardiometaboolsete häirete esinemiste vaheliste seoste uurimisel saadakse aina enam uusi tõendeid kahe protsessi integratsioonist (Baron ja Reid, 2014, Marcheva jt., 2013).

Käesoleval magistritööl on kaks omavahel läbipõimuvat eesmärki. Esimeseks eesmärgiks on Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu kohordis metaanalüüsi abil välja selgitada une kestust mõjutavaid uusi piirkondi genoomis, mis võiksid olla seotud ka metaboolsete protsessidega. Teiseks eesmärgiks on uurida samast kohordist pärit indiviidide une kestuse ja haiguslike seisundite, eelkõige metaboolse sündroomi, omavahelisi seoseid.

Märksõnad: *tsirkadiaansed rütmid, keskmine une kestus, GWAS, metaanalüüs, kardiometaboolsed haigused*

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Une ja metabolismiprotsesside rütmilisus

Endogeenne tsirkadiaanne (~24 tundi, *circa diem*) kellasüsteem reguleerib ööpäevast rütmi omavaid füsioloogilisi, metaboolseid ja käitumuslikke protsesse enamikes elusorganismides (Shi ja Zheng, 2013). Arvatakse, et olenevalt koe- ja rakutüübist on kuni 30% ringlevatest transkriptidest tsirkadiaanse kella kontrolli all. Mitmed geeniontoloogia uuringud on näidanud, et enamik tsirkadiaanse ekspressioonimustriga geenidest klasterduvad metabolismiprotsesse vahendavatesse geeniklassidesse, näiteks karbohüdraatide metabolism ja transport, lipiidide biosüntees, adipotsüütide diferentseerumine ning kolesterooli süntees ja degradatsioon (Aguilar-Arnal ja Sassone-Corsi, 2014, Panda jt., 2002).

1.1.1. Une ja ärkveloleku rütm

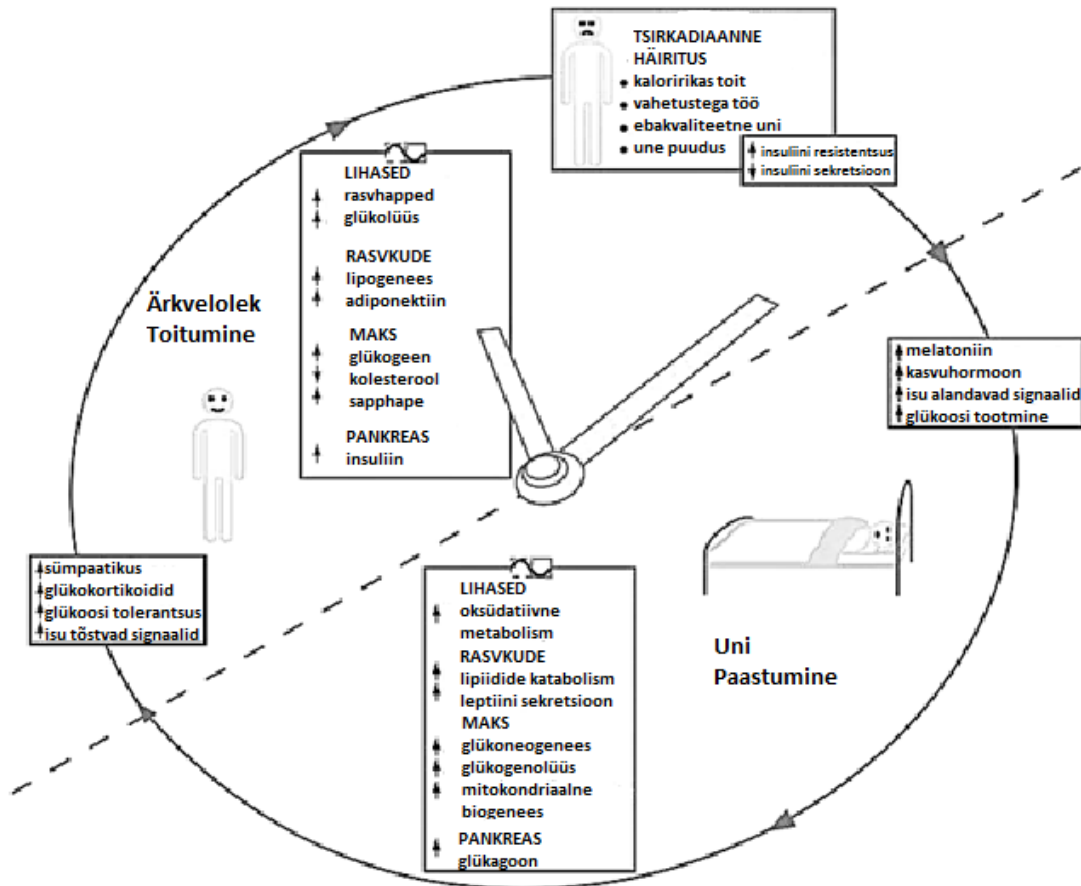
Põhiliseks signaaliks (*zeitgeber*), mis aitab imetajatel sisemist tsirkadiaanset kella ja väliskeskkonda omavahel sünkroniseerida, on valgus. Valgussignaali võtavad vastu reetinas paiknevad, melanopsiini sisaldavad fotosensitiivsed ganglioni rakkud (ipRGC rakud), mis edastavad signaali reetina ja hüpotalamuse vahelise närviühenduse kaudu suprakiasmaatilisele tuumale (SCN). SCN paikneb hüpotalamuses optilise kiasmi kohal ja koosneb ~20 000 paarilisest neuronist. SCN toimib kui peamine kell, mille ülesandeks on organismi hierarhilises kellasüsteemis erinevates organites, kudedes, aga ka individuaalsetes rakkudes olevate molekulaarsete kellasüsteemide omavaheline kooskõlastamine. Sünkroniseerimine toimub närviimplusside ja hormoonide kaudu (Eckel-Mahan ja Sassone-Corsi, 2013, Schibler ja Sassone-Corsi, 2002). SCN-i neuronid edastavad signaale paljudele teistele kesknärvisüsteemi osadele, millest enamik asub hüpotalamuses. Üheks eferendiks on paraventrikulaarne taalamuse tuum, mis koos intermediolateraalse tuuma ja seljaaju torakaalnärvidega moodustab ühenduse, mille abil SCN suhtleb käbikhega. Tänu viimasele saab toimuda käbikheas toodetava melatoniini rütmiline sekretsioon (Eckel-Mahan ja Sassone-Corsi, 2013). Päevase eluviisiga imetajatel on melatoniin kui und esilekutsuv hormoon, mille ekspressioon algab mõned tunnid enne uinumist ja saavutab maksimumi öisel ajal (Scheer ja Czeisler, 2005). Neerupeatliste koostes sünteesitava steroidhormooni kortisool rütm on melatoniiniga vastasfaasis. Kortisooli ekspressiooni kontsentratsiooni maksimum leiab aset vahetult enne ärkamist (Orth jt., 1979). Seega on melatoniini ja kortisooli tsirkadiaansed rütmid kooskõlas ööpäevase valguse muutumise rütmiga, tagades öisel ajal une

ja päeval ajal erksuse (Gooley ja Chua, 2014). Hilisõhtul kogetud kunstlik valgus (eelkõige sinine valgus, vahemikus 400–500 nm) lükkab melatoniini tootmise alguse hilisemaks ning mõjutab ka kortisooli normaalset ekspressiooni (Lazar jt., 2013, Santhi jt., 2012, Dijk jt., 2012). Juba 0,2 luks¹ suurune valgustatus pimedusfaasi ajal võib häirida und ja mõjutada tsirkadiaanset geeniekspressiooni. Pikemas perspektiivis võivad mainitud muutused põhjustada omakorda muutusi metabolismis ja toitumisharjumustes, suurendada insuliini resistentsust, vähendada glükoosi tolerantsust ja viia kehamassiindeksi (KMI) suurenemiseni (Fonken jt., 2010).

1.1.2. Metabolismi rütm

Endogeense kella üheks oluliseks funktsiooniks on tagada organismis toimuvate ainevahetuslike protsesside ajaline struktureerimine kindlatesse perioodidesse (Joonis 1, Marche va jt., 2013). Näiteks hoitakse ajaliselt lahus glükogeeni süntees ja utiliseerimine. Selline antagonistlike protsesside lahutamine ööpäeva lõikes optimeerib rakufüsioloogiat (Dibner ja Schibler, 2015). Kui metabolism ning une ja ärkveloleku tsükkel on üksteisega kooskõlas, võimaldavad mõlemad rütmid organismil ette valmistada igapäevasteks muutusteks, mis on seotud Päikese tõusu ja loojumisega (Marche va jt., 2013). Süsteemi tagamiseks moodustavad SCN-i neuronid sünapse rakukehadega, mis asetsevad ventraalses ja dorsaalses subparaventriculaartsoonis (vSPZ ja dSPZ) ning dorsomediaalses hüpotalamuse tuumas (DMH). Ventraalsed SPZ neuronid vastutavad une ja ärkveloleku rütmi ning dorsaalsed SPZ neuronid kehatemperatuuri rütmi tekkimise ja hoidmise eest. SPZ omab projektsiooni ka DMH-sse, mis on kui lüliti SCN-i ja erinevate ajuosade vahel, mis vastutavad une (ventrolateraalne preoptiline tuum), kehalise aktiivsuse, kehatemperatuuri, toitumise (lateraalne hüpotalamus) ja kortikosteroidide sekretsiooni (paraventriculaarne tuum) eest (Marche va jt., 2013, Chou jt., 2003, Lu jt., 2001). Lisas 1 on välja toodud illustratiivne tsirkadiaanse rütmi ja energiavahetuse kontrollis olulisust omavate närviteede ja metaboolsete hormoonide skeem.

¹ Valgustatuse ühik. 1 meetri kaugusel põlev küünal kiirgab valgust eredusega 1 luks.



Joonis 1. **Metaboolsete protsesside rütmilisus ööpäeva jooksul.** Kellasüsteem koordineerib vastavalt öö ja päeva tsükli seisule sobiva metaboolse vastuse ning suurendab energeetilist jõudlust tänu anaboolsete ja kataboolsete reaktsioonide ajalisele lahutamisele perifeersetes kudedes. Tsirkadiaanne ebakõla, mis tekib une häirimise, vahetustega töötamise, dieedi muutmise jm sellise käitumise korral, häirib tsirkadiaanse ja metaboolse süsteemi integratsiooni ja võib viia ebasoodsate metaboolsete seisunditeni (Marcheva jt., 2013, kohandatud).

Dorsomediaalne hüpotalamus ja lateraalne hüpotalamus saavad signaale kaartuumast (ARC). Tänu hormone ekspresseerivatele neuronitele on ARC oluline toitumise ja isu regulatsioonikeskus. Toodetavad oreksigeensed peptiidid on neuropeptiid Y (NPY) ja aguutiseoseline peptiid (AgRP) ning anoreksigeensed peptiidid on proopiomelanokortiin (POMC) ja kokaiin-amfetamiiniga seotud transkript (CART). POMC on eellasmolekul mitmele teistele neuropeptiididele, ka toitekäitumist reguleerivale melanokortiinile (α -MSH). α -MSH tootmist stimuleerib rasvkoos toodetav leptiin, mis samal ajal surub maha NPY ja AgRP sünteesi. Tulemiks on oreksigeensete peptiidide taseme langus lateraalses hüpotalamus ja söögiisu supressioon. Kui aga leptiini tase veres on madal, produtseerivad kaartuuma neuronid NPY ja AgRP hormone. Viimased stimuleerivad näljatunde teket ja vähendavad energiakulu. Leptiinile vastupidise efektiga on seedetraktis produtseeritav

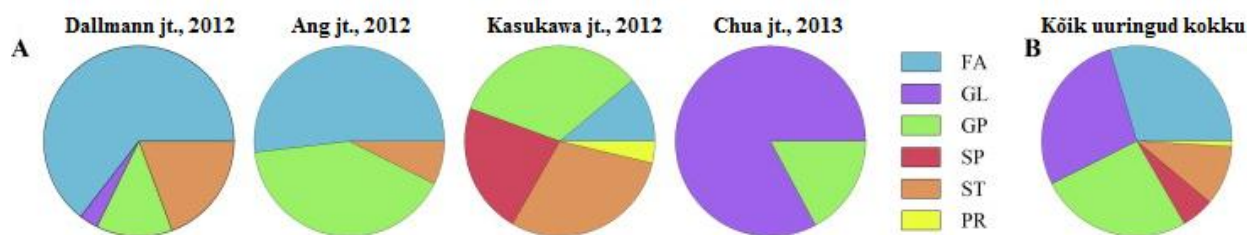
söögiisu stimuleeriv hormoon greliin, mis aktiveerib NPY ja AgRP tootvaid neuroneid ning inhibeerib POMC neuroneid. (Marcheva jt., 2013, Rünkorg, 2011, Cowley jt., 2001). On näidatud, et ka greliin on leptiinist mõjutatud. Nimelt inhibeerib leptiin nii greliini sekretsiooni seedetraktist kui ka hormooni mõju söögiisu tekitamisele (Kalra jt., 2005).

Oluline on aga see, et mainitud hormoonid omavad hüpotalamuses tsirkadiaanset ekspressioonimustrit (perifeersed organid on hetkel vähem uuritud). Leptiini kontsentratsioon hakkab tõusma õhtul pärast viimast söögikorda ja saavutab maksimumi öö esimeseks pooleks. Sel ajal on kõrgemad ka α -MSH kontsentratsioonid ja madalamad greliini kontsentratsioonid. Aktiivusperioodi saabumise alguses, kui leptiini hulk on vähenenud, saavad NPY, AgRP ja oreksiini ekspressiooni maksimumid (Pan ja Kastin, 2014, Lu jt., 2002).

1.1.2.1. Metaboliitide ööpäevased rütmid

Hiljutised arengud metaboliitide profiilide tuvastamisel mass-spektromeetria (MS) ja tuumamagnetresonants spektroskoopia meetodite abil on võimaldanud alustada tuhandete metaboliitide identifitseerimist ja nende kontsentratsioonide määramist. Sellega seoses on välja kujunenud uus valdkond, metaboolika, mis tegeleb kõigis rakkudes, kudedes ja organites esinevate metaboliitide uurimisega². Metaboolika tõuseb üha enam esile nii geneetikas üldiselt kui ka kronobioloogias (Ala-Korpela jt., 2012). Ööpäevaseid rütme ja nende seost füsioloogiga uuritakse järjepidevalt, kuid metabooli rütmilisusest on veel vähe teada (Ang jt., 2012). Erinevad plasma, sülje ja maksa metabooli uuringud nii hiirtel (Eckel-Mahan jt., 2012, Minami jt., 2009) kui ka inimestel, on kindlaks teinud, et kuni 20% metaboliitidest (enamjaolt lipiidid) omavad tsirkadiaanset rütmi (Joonis 2, Gooley ja Chua, 2014). Lisaks on selgunud, et erinevate metaboliitide kontsentratsioonid jõuavad maksimumi ööpäeva erinevatel aegadel ning see ajastus varieerub indiviiditi (Chua jt., 2013, Ang jt., 2012, Dallmann jt., 2012, Kasukawa jt., 2012).

² <http://www.thefreedictionary.com/metabolomics>



Joonis 2. **Lipiidide grupid, mis omavad tsirkadiaanset rütmi inimese plasmas.** **A.** Andmed on koostatud 4 erineva uurimuse põhjal, mis on kasutanud lipiidoomika või metabooloomika uurimismeetodeid tuvastamaks ööpäeva jooksul kogutud vereplasma andmetest tsirkadiaanselt muutuvaid metaboliite. **B.** Kõigi nelja töö tulemused grupeeritult. FA- rasvhapped, GL- glütserolipiidid, GP- glütserofosfolipiidid, SP- sfingolipiidid, ST- steroidid, PR- prenoolid (Gooley ja Chua, 2014, kohandatud).

Juba pikemat aega on teada, et glükoosi ja osade aminohapete kontsentratsioonid muutuvad plasmas tsirkadiaanselt. Minami jt., tõestasid aastal 2009, et sajad erinevad metaboliidid omavad tsirkadiaanset rütmi isaste hiirte plasmas. Sinna hulka kuulusid fosfolipiidid, aminohapped ja uurea tsükli metaboliidid. Nad väitsid, et kontsentratsioonide tsirkadiaanne kontroll on nii täpne, et ainete kontsentratsioonide mõõtmise alusel saab kindlaks teha indiviidi sisemist aega (*internal body time*). Mainitud kellaaja määramiseks kasutati 14 vedelikkromatograafia mass-spektromeetria (LC-MS) ning 28 kapillaarelektroforeesi mass-spektromeetria (CE-MS) abil identifitseeritud metaboliiti ning uurimisgrupi varem loodud molekulaarse ajakava meetodit (*molecular-timetable method*) (Ueda jt., 2004). Lisaks leiti uurimuses, et nende metaboliitide tsirkadiaanne rütm ei ole sõltuv hiirte vanusest ega soost (Minami jt., 2009). Tõestamaks, et molekulaarse ajakava meetod võiks omada ka kliinilist potentsiaali, koguti kuult tervelt meesindiviidilt konstantse rutiini tingimustega keskkonnas vereproove. Proovid võeti iga kahe tunni järel, 36 tunni jooksul. Identifitseeriti enam kui 300 molekuli, mis omasid ööpäevast rütmi. Enamik neist, mis suudeti tuvastada, kuulusid steroidhormoonide metabolismiradadesse (kortisool, kortisoon, urokortisool-3 glükoroniid). Lisaks ilmnes, et mida hilisem on produkt metabolismirajas, seda hilisem on ka tema kontsentratsiooni maksimum. Ka mitmete glütserofosfolipiidide ja sfingolipiidide kontsentratsioonid muutusid rütmiliselt. Tulemuste põhjal koostati referents metaboliitide ajakava, mis põhimõtteliselt võimaldab määrata indiviidi sisemist kella kahe 12 tunnise ajavahega eraldatud vereproovi abil (Kasukawa jt., 2012).

Suurema arvu indiviididega (10 meest) konstantse rutiini tingimustes läbiviidud uuring tuvastas gaas- ja vedelikkromatograafia ning MS meetoditega vere- ja süljeproove analüüsid 41 metaboliiti 281-st (15%), millel avaldus tsirkadiaanne rütm. Ka siin oli suurim

hulk rütmilistest metaboliitidest lipiidid (> 75%), täpsemalt rasvhapped veres, mis saavutasid kontsentratsiooni maksimumi hilishommiku ja lõuna vahel (Dallmann jt., 2012). Leiud on kooskõlas hiirte plasmas tuvastatud metaboliitide rütmidega (Eckel-Mahan jt., 2012). Lisaks leiti, et 34 metaboliiti plasmas ja 27 metaboliiti süljes olid kogu proovide võtmise aja konstantses tõususes või languses. Kuna 40 tundi kestev konstantne rutiin hõlmas une puudujäägi tekkimist katsealustel, siis võivad need metaboliidid, mis olid enamjaolt seotud immuunsüsteemi radadega, olla seotud une pressu kujunemisega (Dallmann jt., 2012).

Ang jt., uurimus põhines mitte-suunatud (*untargeted*) metabooloomika meetodil (LC-MS) ja erines eelmainitustest, kuna vabatahtlikud kogesid normaalset ruumi valgustatust päeval ning pimedust öösel. 8 terve meesindiviidi plasmast tuvastati kokku 1069 metaboliiti, millest 203 (19%) kontsentratsioonid olid olulise ööpäevase varieeruvusega. Identifitseerida õnnestus 34 tsirkadiaanse metaboliiti, kus domineerivateks olid fosfolipiidid ja atsüülkarnitiinid, aga ka kortikosteroidid, bilirubiin ja aminohapped (Met, Tyr, Pro, Lys, Phe, Leu). Aminohapped saavutasid maksimumi pigem lõunasel ajal nagu ka eelmainitud Dallmann jt., 2012 uuringus. Tulemused näitavad taaskord, et rasvhapete metabolism on tugeva tsirkadiaanse kontrolli all (Ang jt., 2012). Tõendust lisab atsüülkarnitiinide olulisus lipiidide metabolisimirajas, sest nad on rasvhapete β -oksüdatsiooni võtmeühendid (Kompore ja Rizzo, 2008).

Tsirkadiaanse lipidoomi erinevusi indiviidide vahel võrdleb uurimus, kus ainsana ei segatud indiviidide plasmaproove kokku, vaid analüüsiti eraldi. Uuringus osales 20 tervet noormeest, kellelt koguti plasmaproove iga nelja tunni järel, 28 tunni vältel. LC-MS meetodiga määrati 263 lipiidi ööpäevased kontsentratsioonid. Grupipõhine analüüs tuvastas tsirkadiaanse rütmi 35 lipiidil (13%). Suurim osa neist metaboliitidest olid di- ja triglütseriidid, mis saavutasid kõrgeima taseme veres ärkamisajal ning mõned fosfatidüülkoliinid, mis tõusid maksimumi õhtuks. Indiviidi tasemel oli rütmilisi lipiide 18%, kuid esinesid märkimisväärsed erinevused rütmi ajastuses katsealuste vahel. Eri indiviide võrreldes olid teatud metaboliitide rütmi kõverad kuni 12 tunnises nihkes. Lisaks oli teatud juhtudel metaboliit tsirkadiaanne indiviidid tasemel, aga mitte grupi tasemel (nt sfingomüeliinid). Nähtust seletati faktiga, et sfingomüeliinide individuaalsed rütmid olid niivõrd erineva faasiga, et nad tühistasid grupeeritult üksteist ja ühtne rütm ei saanud avalduda (Chua jt., 2013). Enim erinesid indiviidide vahel just glütserofosfolipiidide ja sfingolipiidide rütmid. Selline tulemus on kooskõlas ka Kasukawa jt., 2012 uuringuga.

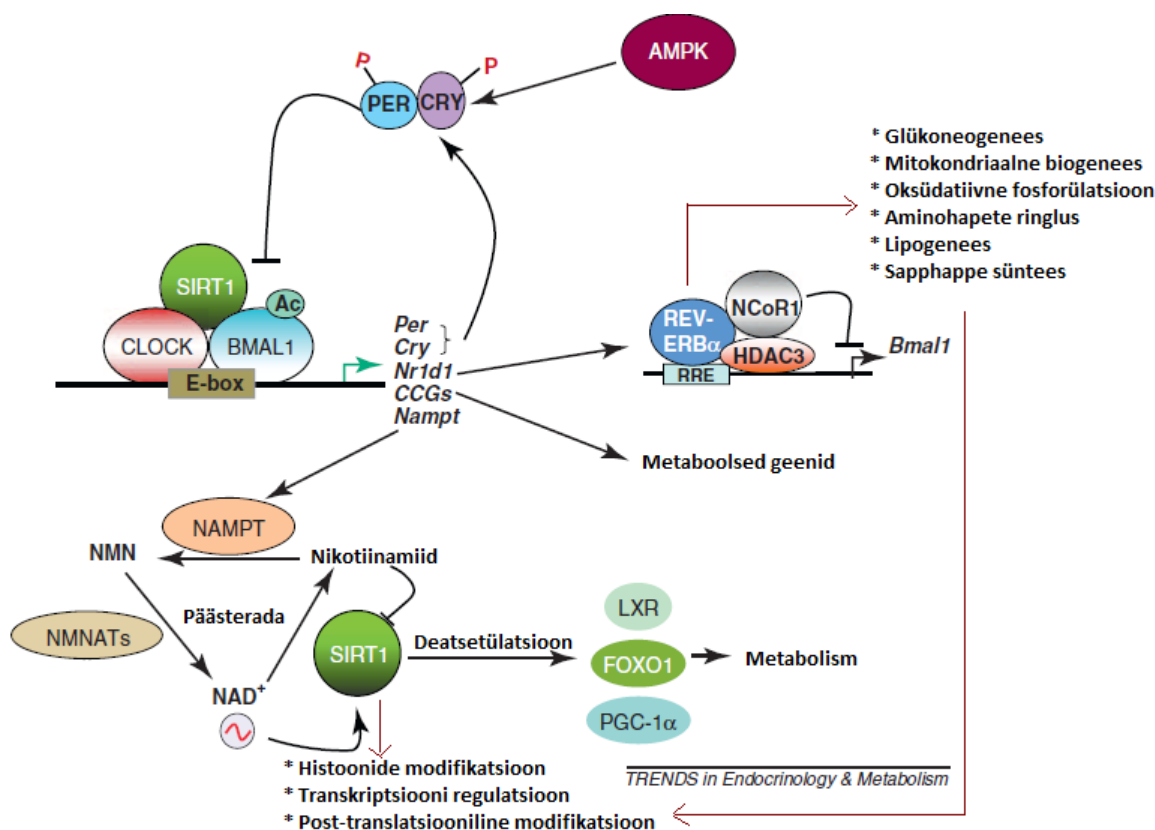
Arvatakse, et rasvhapete metabolism on küll tsirkadiaanse kella kontrolli all, aga kas see on otsene kella mõju, või hoopis kaudne efekt, mida mõjutab toitumine, aktiivsus ja nende seos kehatemperatuuri muutumisega, on siiski küsitav. Dallmann jt., töö kaldub tõestama, et tegu on otsese efektiga, sest lipiidid produktid kuhjusid plasmas kõikidel juhtudel lõuna ajal ning olid tunduvalt madalamad ülejäänud ajal. Seda kõike olenemata sellest, et katsealused tarbisid ühesuguse kalorisaldusega toiduportsjone iga tunni järel (Dallmann jt., 2012). Chua jt., töö toob välja aga tõsiasja, et olenemata uuringugrupi homogeensusest, klasterduvad indiviidid erinevatesse gruppidesse tulenevalt sellest, kas nende triglütseriidide ja teiste lipiidide maksimaalsed kontsentratsioonid esinevad pigem hommikul või õhtusel ajal. Seega saaks ikkagi plasmalipiidide fenotüübi järgi identifitseerida indiviidi tsirkadiaanset fenotüüpi (Gooley ja Chua, 2014, Chua jt., 2013).

1.2. Tsirkadiaanse kella ja metaboolse protsessi molekulaarne integratsioon

Raku aktiivsust mõjutav tsirkadiaanne regulatsioon hõlmab mitmesuguseid bioloogilisi protsesse, elektrilist aktiivsust, geenide ja valkude ekspressiooni ning erinevate ionide ja substantside kontsentratsioonide muutumisi. Seda kõike tagab konserveerunud molekulaarne kellasüsteem, mis koosneb autoregulaatorsest transkriptsioonilisest/post-translatsioonilisest negatiivse tagasiside võrgustikust (Hastings jt., 2008).

Imetajate kellasüsteemis on kesksel kohal kaks omavahel seotud geeniekspressiooni negatiivse tagasiside lünga, kus põhilisteks heeliks-ling-heeliks transkriptsioonifaktoriteks (TF) on CLOCK (*circadian locomotor output cycles kaput*) ja BMAL1 (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like, ARNTL*) (Joonis 3, Sahar ja Sassone-Corsi, 2012). CLOCK ja BMAL1 valgud heterodimeriseeruvad ja seonduvad sihtmärkgeenide promootoris olevale E-elementile (5'-CACGTG-3') (Sato jt., 2004). Esimese tagasiside mehhanismi puhul reguleeritakse sel viisil kolme *Per* (*Period, Per1, Per2, Per3*) ja kahe *Cry* (*Cryptochrome, Cry1, Cry2*) geeni ekspressiooni. PER ja CRY valgud akumulatsioonid päeva jooksul tsütoplasmas ja moodustavad teatud kontsentratsiooni saavutades kompleksi, mis liigub tagasi tuuma, seonduvad CLOCK:BMAL1 heterodimeeriga ning inhibeerib nii iseenda aga ka teiste CLOCK:BMAL1 mõjutatud geenide ja nende produktide ekspressiooni (Eckel-Mahan ja Sassone-Corsi, 2013, Brown jt., 2012). Teise tagasiside mehhanismi on kaasatud *Rev-erba*, *Rev-erbb* ja *Rora* geenid, millede transkriptsiooni algatab samuti CLOCK:BMAL1 heterodimeer. REV-ERB repressor valgud konkureerivad ROR-PGC-1 α

aktivaatorkompleksiga. Kui repressorkompleksi kontsentratsioon ületab aktivaatorkompleksi kontsentratsiooni, kaasab REV-ERB kompleks NcoR1-HDAC3 korepressorkompleksi ja interakteerub *Bmal1* promootoril asuva RRE (*Rev-erba/Rora-binding element*) järjestusega (5'-(A/T)A(A/T)NT(A/G)GGTCA-3'). Seondumine represserib geeniekspressiooni (Sato jt., 2004, Harding ja Lazar, 1993). Kaks toimivat negatiivse tagasiside lünga on üksteisega 12 tunnises nihkes. Kogu kellageenide tsükkel kestab ~24 tundi ja põhjustab allavoolu jäävate sihtmärkgeenide (ka metaboolsete radade regulaatorid) 24-tunnise perioodilisuse (Eckel-Mahan ja Sassone-Corsi, 2013).



Joonis 3. Tsirkadiaanse kella ja metabolismi regulaatorite vastastikkune mõju. CLOCK ja BMAL1 seonduvad tsentraalsete kellageenide poolt kontrollitavate geenide (CCG) promootoralas olevale E-elementile ja reguleerivad seeläbi tsirkadiaanset geeniekspressiooni. Mõned CCG-d on metaboolsete radade regulaatorid (nt *Pepck*, *Glut2*, *Hmgcr*) ja teised jällegi võivad mõjutada metaboliitide kontsentratsioone (nt *Nampt*, *Alas1*). Toitainete sensorid AMPK ja SIRT1 on tsirkadiaansel viisil reguleeritud ning nad võivad läbi võtmelementide post-translatsioonilise modifikatsiooni mõjutada tsirkadiaanseid rütme ja metabolismi (Sahar ja Sassone-Corsi, 2012, Hong jt., 2012, kohandatud).

1.2.1. DNA pakkimine ja kromatiini remodelleerimine

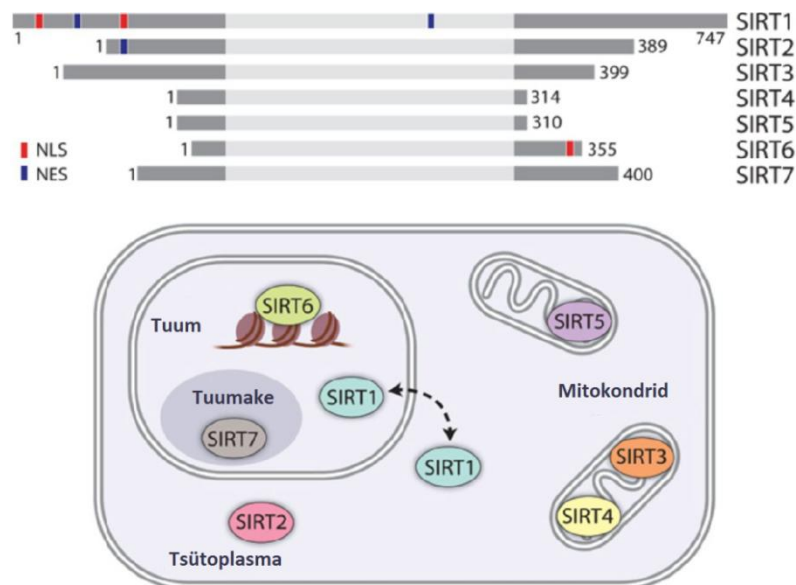
Kellageenide ekspressiooni transkriptsiooniline regulatsioon saab toimuda tsirkadiaanselt juhul, kui kromatiin assambleerub ja seondab endaga multiproteiinseid komplekse samuti rütmiliselt. Protsessis osutuvad oluliseks kromatiini modifitseerivad ensüümid, mis omavad 24-tunnist aktiivsusemustrit ja tagavad sellega tuumas tsükliliste sündmuste esinemise (Masri ja Sassone-Corsi, 2010). CLOCK:BMAL1 kompleksi seondatakse kromatiinile tsirkadiaanselt. CLOCK valk ise omab histoonide atsetültransferaas (HAT) aktiivsust, sest valgus esineb järjestuse homoloogia SRC perekonna HAT-de hulka kuuluva tuuma retseptori koaktivaator ACTR-ga. Mõlemad valgud omavad sarnast ensümaatilist spetsiifilisust ja nende ühised aminohapete jäägid on evolutsiooniliselt konserveerunud. CLOCK eelistab modifitseerida histoon H3 positsioone Lys9 ja Lys14. Nendes positsioonides destabiliseerib lisatud atsetülgrupp kromatiini struktuuri ja tänu sellele stimuleerib geeniekspressiooni (Doi jt., 2006). Lisaks on leitud, et CLOCK on võimeline atsetüleerima ka oma partnerit, mitte-histoonset BMAL1. Modifikatsioon hõlmab kõrgelt konserveerunud Lys jääki positsioonis 537. BMAL1 atsetüleerimine hõlbustab CRY1 seondumist CLOCK:BMAL1 kompleksiga, tagades nii transkriptsiooni repressiooni. Protsess on tsirkadiaanse rütmi säilitamise seisukohalt absoluutselt vajalik, sest muteerunud BMAL1 nimetatud positsioonis (Lys→Arg) ei ole võimeline rakumudelil tsirkadiaanset rütmilisust tagama (Hirayama jt., 2007).

1.2.1.1. SIRTUIN perekonna valgud

Lisaks atsetültransferaasidele, on kella funktsiooni tagamisel olulised ka teised valkude post-translatsioonilisi modifitseerimisi läbiviivad ensüümid. SIRT1 oli esimene SIRTUIN perekonda kuuluvast seitsmest ensüümist, mille ööpäevast rütmi ja seost endogeense tsirkadiaanse kellaga märgati nii tsentraalsel kui perifeersel tasandil. Nüüdseks on teada, et ka SIRT3 ja SIRT6 on olulised mitokondrites ja tuumas ööpäevase rütmi kontrolli tagamisel (Masri ja Sassone-Corsi, 2014).

SIRTUIN-d on nikotiinamiid adeniin dinukleotiid (NAD^+) sõltuvad klass III histoonide deatsetülaasid (HDAC), millest nii mõnigi modifitseerib just metabolismiradadesse kuuluvaid valke. Seega on nende funktsioon seotud raku energia ja metabolismiga. Kõik nad varieeruvad oma ensümaatilise aktiivsuse, bioloogiliste sihtmärkide, rakusisese funktsiooni ja raku paiknemise osas (Chang ja Guarente, 2014, Choi ja Mostoslavsky, 2014). Seejuures

suudab SIRT1 ainsana liikuda tuuma ja tsütoplasma vahel (Joonis 4, Masri ja Sassone-Corsi, 2014).



Joonis 4. **Imetajate seitse erinevat SIRTUIN valku.** Joonisel on kujutatud valkude struktuur (üleval) ja paiknemine rakus (all). SIRT valkude põhilised katalüütilised domäänid on näidatud heledana, N- ja C- terminaalsed domäänid tumedana. Punasega on tähistatud tuuma lokaliseerimise signaal (NLS) ja sinisega tuumast välja viimise signaal (NES) (Masri ja Sassone-Corsi, 2014, kohandatud).

SIRT1 aktiivsus on vastukaaluks CLOCK valgu HAT aktiivsusele, sest ta on võimeline deatsetüleerima nii H3 Lys9 ja Lys14, kui ka BMAL1 ja PER2 (Asher jt., 2008) valke. See hoiab kellageenide tsirkadiaanse rütmi tasakaalus. Oluline on aga teada, et tsirkadiaanne on just SIRT1 aktiivsus, mitte tema kontsentratsioon rakus. Viimasest võib järeldada, et SIRT1 aktiivsust mõjutavad sekundaarsed faktorid (Chang ja Guarente, 2014, Nakahata jt., 2008). Üheks selliseks faktoriks on NAD^+ kontsentratsiooni tsirkadiaanne rütm. Molekulaarne kell kontrollib *Nampt* (nikotiinamiid fosforibosültransferaas) ekspressiooni (Joonis 3, lk 14, Sahar ja Sassone-Corsi, 2012), mis on omakorda limiteerivaks etapiks NAD^+ biosünteesi rajas. CLOCK, BMAL1 ja SIRT1 seonduvad *Nampt* promotoris olevale E-elementile tsirkadiaansel viisil. Katsed geneetiliselt manipuleeritud *Clock* ja *Bmal1* hiirtega on näidanud, et neil isenditel kaob rütmiline *Nampt* ekspressioon ja sellest tulenevalt ka tsükliline NAD^+ ja SIRT1 aktiivsus. Ka farmakoloogiline NAMPT inhibitsioon vähendab NAD^+ hulka ja häirib SIRT1 aktiivsust hiire embrüonaalsetes fibroblastides. Järgneb BMAL1 hüperatsetülatsioon ja tsirkadiaanse rütmi kadumine (Nakahata jt., 2009).

NAD⁺ on küll peamine SIRT1 koensüüm, aga viimaste andmete põhjal on ka teisi metaboliite, mis SIRT1 valkude aktiivsuses rolli omavad. Vabad rasvhapped mõjutavad küll rohkem teiste SIRT1 ensüümide aktiivsust ja vähem SIRT1 aktiivsust (Feldman jt., 2013), kuid see näitab, et metabolism ja kromatiini remodelleerimine ristuvad tänu spetsiifilistele metaboolsetele kofaktoritele, mida vajavad erinevad ensüümid reakstioonide katalüüsiks (nt atsetüleerimine vajab atsetüül-CoA-d, mida produtseeritakse põhiliselt glükoosist) (Aguilar-Arnal ja Sassone-Corsi, 2014, Aguilar-Arnal ja Sassone-Corsi, 2013).

1.2.2. Metaboolsed geenid ja geeniproductid

SIRT1 deatsetüleerib ja seega reguleerib ka mitmeid metaboolseid valke (Joonis 3, lk 14, Sahar ja Sassone-Corsi, 2012). Glükoneogeneesis on olulised PGC-1 α (PPAR γ koaktivaator α) ja FOXO1 (*Forkhead box O1*) valkude deatsetüleerimised. PGC-1 α on glükoneogeneetiliste geenide ekspressiooni kaudne ning FOXO1 otsene regulaator (Schwer ja Verdin, 2008). Kolesterooli metabolismis on jällegi oluline LXR (*liver X receptor*) valgu aktiveerimine läbi deatsetüleerimise. Kõiki neid modifikatsioone viib läbi SIRT1 (Li jt., 2007).

AMPK (*5`AMP-activated protein kinase*) on heterotrimeerne proteiini kinaas, mis modifitseerib valke fosforüülimise läbi. AMPK on energeetilise homöostaasi sensor ja regulaator ning loob vastuse energia stressile rakus. Kinaasi aktiivsus kasvab kui rakus ATP varud ammenduvad. Nt maksas on AMPK aktiveeritud pikaajalise toidupuuduse korral (Witters jt., 1994). Endogeenses tsirkadiaanses kellasüsteemis on AMPK oluline, sest fosforüülib PER ja CRY valke (Joonis 3, lk 14, Sahar ja Sassone-Corsi, 2012). Fosforüülimise tulemusena degradeeritakse valgud proteosoomides (Jordan ja Lamia, 2013).

Kella funktsiooni ja metabolismi ühendavad lisaks eelpool mainitule veel tsirkadiaanse ekspressioonimustriga REV-ERB (α ja β) ja ROR α . valgud. Mõlemad on tuuma retseptor valgud ning on teada, et just see klass valke on olulised metabolismi regulaatorid (Duez ja Staels, 2010). REV-ERB α identifitseeriti kui tuuma retseptor valk, mis reguleerib lipiidide metabolismi ja adipogeneesi (Fontaine jt., 2003), kuid nüüd on teada ka tema roll tsirkadiaanses regulatsioonis. REV-ERB α värbab NcoR1/HDAC3 kompleksi ning repressseerib *Bmall* transkriptsiooni (Joonis 3, lk 14, Sahar ja Sassone-Corsi, 2012). Teise subtüübi, REV-ERB β rollist on vähem teada. Küll aga on hiirtel demonstreeritud, et ainult ühe REV-ERB valgu puudus ei mõjuta *Bmall* ekspressiooni nii tugevalt, kui mõlema REV-

ERB valgu puudus. Mõlema REV-ERB valgu defitsiit hiire maksas viib kellageenide derepressioonini ja rasvmaksa tekkeni (Bugge jt., 2012). Ka ROR α reguleerib lipiidseid teid. Juba eelmisel sajandil tõestati, et valgu tootmise eest vastutava geeni väljalülitamine hiirtel, kel esineb madal plasma HDL-kolesterooli (kõrge tihedusega lipoproteiin) tase, viib tõenäoliselt ateroskleroosi tekkimiseni (Mamontova jt., 1998). Kokkuvõtvalt võib öelda, et endogeenne molekulaarne kellasüsteem mõjutab otseselt riskifaktoreid, mis mängivad rolli kardiometaboolse düsfunktsiooni kujunemisel (Duez ja Staels, 2010).

1.3. Tsirkadiaanse- ja kardiometaboolse häirituse seosed

Tsirkadiaanse kella ja metaboolse protsessi integratsioonile tuginedes võib tõdeda, et kellamehhanism (nii keskne kell SCN-s kui perifeersed kellad kudedes ja rakkudes) on lähedalt seotud raku metabolismiga. Sellest tulenevalt võivad häired ööpäevases rütmis viia negatiivsete tulemiteni toitekäitumise regulatsioonis ja ebakorrapära toitekäitumises jällegi negatiivsetele muutustele une- ja ärkveloleku tsükli regulatsioonis. Tulemuseks võivad olla erinevad patoloogilised seisundid nt rasvumine, metaboolne sündroom (MetS), II tüüpi diabeet (T2D), kardiovaskulaarhaigused, põletikuprotsessid, mõningad kasvajalised protsessid ja muidugi psühhiaatrilised- ja unehäired (Baron ja Reid, 2014).

1.3.1. Metaboolne fenotüüp häiritud tsirkadiaanse rütmi korral

Enim on kellageenide funktsioone uuritud hiiremudelite abil. Need on olnud hindamatuteks vahenditeks, et defineerida individuaalsete kellageenide osa tsirkadiaanse rütmi tagamisel. Viimasel ajal on hiiremudelite abil avastatud ka kella metaboolseid funktsioone (Marcheva jt., 2013). Esimene seos kahe protsessi vahe avastati *Clock* ^{$\Delta 19/\Delta 19$} mutatsiooniga hiirtel. Sellised isendid muutusid arütmiliseks, neil esinesid hüperfaagia, hüperlipideemia, hüperleptineemia, maksa steatoos ja hüperglükeemiline hüpoonsulineemia. Lisaks kadus neil ka oluliste metaboolsete ja proliferatiivsete geenide rütmiline ekspressioon maksas, lihastes ja pankreases, mis omakorda viis tõsistele glükoosi ja lipiidide homöostaasi häireteni (Marcheva jt., 2010, Turek jt., 2005, Panda jt., 2002). *Clock* on oluline normaalse lipiidide metabolismi tagaja veel seetõttu, et mutatsioon suurendab soolestikus kolesterooli absorptsiooni ja võib viia aterogeneesi ja ateroskleroosi tekkeni. Seega on *Clock* ülesandeks ka madala kolesteroolitaseme hoidmine plasmas (Pan jt., 2013). *Bmall* geeni *knockout* fenotüüp on kõige tõsisem kellageeni mutatsioon. Geeni vaigistamine viib totaalse arrütmia

kujunemisele ning muutub ka metaboolne fenotüüp (Kondratov jt., 2006). Kaob glükoosi ja triglütseriidi tasemete ööpäevane rütmilisus, kahjustub adipogenees ja adipotsüütide diferentseerumine ning paljud olulised organid (põis, neerud, testised, süda, kopsud) ja ka lihased kärbuvad ajapikku (Lamia jt., 2008, Kondratov jt., 2006, Rudic jt., 2004). Lisas 2 on välja toodud kokkuvõttev tabel, kus on erinevate kellageenide mutatsioonid ja neile vastavad tsirkadiaansed ja metaboolsed fenotüübid hiirtel.

Geneetiline varieeruvus kellageenides mõjutab metaboolseid parameetreid ka inimestel. Nii mõnigi ülegenoomne assotsiatsiooniuuring (GWAS) on leidnud seoseid *Clock* geenis olevate ühenukleotiidsete polümorfismide (SNP) ja erinevate metaboolsete fenotüüpide vahel. Näiteks on leitud kõrgeenenud plasma greliini kontsentratsioone ja muutunud toitekäitumist, mis viivad suurema hulga kalorite tarbimiseni ja omakorda soodumuse hüpertensiooniks, rasvumiseks ja metaboolseks sündroomiks (Garaulet jt., 2011, Sookoian jt., 2008). SNP-d teistes kellageenides ei ole vähem olulised. *Bmal1* polümorfisme on samuti seostatud hüpertensiooni ja T2D tekkimisega (Woon jt., 2007). SNP-d *Cry2* geeni sees ja vahetusläheduses mõjutavad paastumisjärgse glükoosi ja insuliini kontsentratsioone (Dupuis jt., 2010). Samas kui näiteks harv variant *Nampt1* geeni intronis (rs10487818) omab hoops kaitsvat mõju rasvumisele. Kõige tõsisemalt rasvunud laste seas oli minoorse alleeli esinemissagedus 0% (Blakemore jt., 2009).

Tsirkadiaanse rütmi olulist mõju ainevahetusele demonstreerib uuring, milles katseisikud elasid laboratoorses oludes, 28-tunnise ööpäeva režiimil, konstantse rutiini tingimustes. Kümnenda päeva lõpuks olid katsealused oma normaalse magamisfaasiga võrreldes 12 tunnises nihkes. Selle tulemusel vähenes süsteemiselt leptiini tase (-17%, $p < 0,001$) ja insuliini taseme suurenemisest hoolimata (+22%, $p = 0,006$) tõusis ka glükoosi tase (+6%, $p < 0,001$). Nähti täiesti vastupidist kortisooli rütmi ($p < 0,001$), kõrgeenenud vererõhku (+3%, $p = 0,001$) ja unekvaliteedi langust (-20%, $p < 0,002$). Lisaks oli kolme indiviidi einejärgne glükoosivastus sarnane prediabeetilises seisundis oleva inimese glükoosivastusele. Võib järeldada, et lühiajaline tsirkadiaanse rütmi häiritus, mis ilmneb eriti tugevalt nt vööndivahetuse korral (reisimine) ja lausa krooniliselt nt vahetustega töötamise korral, viib kardiometaboolsete häireteni, sest alanenud leptiin stimuleerib isu ja vähendab energia kulutamist (Scheer jt., 2009).

1.3.2. Metaboolne fenotüüp ebapiisava ja ebakvaliteetse une korral

Krooniline unepuudus on muutunud tavaliseks nähtuseks nii laste kui täiskasvanute hulgas. 2014. aastal USA-s läbiviidud suuremahuline küsitlus leidis, et lapsed vanuses 6–17 eluaastat magavad 1–2 tundi vähem kui oleks soovitatav (56% 15–17 aastastest magab ≤ 7 tundi)³. Une vähenemise põhjusteks peetakse sotsiaalseid kohustusi, elektroonilisi vahendeid, kunstlikku valgust ja vahetustega ning öösiti töötamist. Mainitud tegurid koos vähenenud une ja langenud kvaliteediga on omakorda seotud nt halvenenud glükoosi tolerantsiga, vähenenud insuliini vastusega, vähenenud leptiini ja suurenenud greliini hulgaga ning kõrgenenud KMI-ga (Gutierrez-Repiso jt., 2014, Donga jt., 2010, Van Cauter jt., 2008). Pikaajalised (3 ja enam aastat) uuringud nii Euroopa (Gutierrez-Repiso jt., 2014) kui Aasia (Kobayashi jt., 2012) kohortides tõestavad, et aastaid alla viie tunni magavatel indiviididel on KMI ja ülekaalulisus pidevalt tõusnud. Seejuures on mitmetes uuringutes selgunud, et seos une pikkuse ja metaboolsete haiguste vahel võiks olla U-kujuline. See tähendab, et suure KMI, rasvumise, T2D ja teatud kardiovaskulaarhaiguste esinemiste tõenäosused on suuremad inimestel, kes magavad alla kuue või üle üheksa tunni (Grandner jt., 2013a, Bjorvatn jt., 2007). Samas on ka uurimusi, kus just pika une ja mainitud riskifaktorite vahel ühist seost ei leita (Grandner jt., 2014). Võiks järeldada, et nii une pikkuse, kui ka KMI regulatsioonis peavad olema jagatud geneetilised eeldused, kuid seni on neid mõlemat tunnust hõlmavatest geneetilistest analüüsides leitud vaid vähesel määral (Watson jt., 2010).

Une kestuse piiramine mõjutab organismi energiakasutust ja avaldub plasma metabooli muutustes. Metabooli muutuse uurimine aitaks leida ka täpsemaid seoseid ebapiisava une ja T2D ning teiste metaboolsete haiguste vahel. Ühes sellekohases uuringus võrreldi tervete perekondliku diabeedi riskiga indiviidide globaalset plasma metabooli tavalise (8,5 h, 8 ööd) ja piiratud (5,5 h, 8 ööd) une tingimuste korral. Valimis oli 5 naist ja 6 meest vanuses 20–27 aastat. Katsealuste toitumine, aktiivsus ja naiste puhul menstruaalfaas olid kontrollitud. Avastati, et pärast une piiramist muutusid oluliselt 16 biomarkeri (362-st) kontsentratsioonid (13 tõusid ja 3 langesid, $p \leq 0,05$). Lisaks nähti 17 bimolekuli puhul trendi muutumise suunas. Kõikide muutunud aminohapete ja kreatiini kontsentratsioonid olid tõusnud, mis omakorda viib ka paljude hormoonide ja neurotransmitterite tõusuni. Kõrgenenud olid ka mitmete rasvhapete ja sapphappe kontsentratsioonid. Huvitaval kombel olid paastumisjärgse glükoosi

³<http://sleepfoundation.org/sites/default/files/2014-NSF-Sleep-in-America-poll-summary-of-findings--FINAL-Updated-3-26-14-.pdf>

tasemed ning osade monosahhariidide ja glükonaadi tasemed peale une pikkuse lühenemist vähenenud. Seega ei leitud seost une puudujäägi ja glükolüüsi, glükoneogeneesi ega glükogeeni metabolismi muutustega. Autorite arvates on leid oodatav, arvestades, et katsealustel tekib unepuudusest ja kontrollitud toitumisest tulenevalt energiadefitsiit (Bell jt., 2013).

Plasmametaboloomi muutusi on kirjeldatud ka une täieliku piiramise korral. Kuna 24-tunnine ärkvelolek mõjutab eelkõige une homöostaasi protsesse, lubab selline katse hinnata homöostaasi metaboolset baasi. Katses osales 12 tervet meesindiviidi ning katse laboratoorsed tingimused olid sarnased eelpoolkirjeldatuga, kuid osalejad veetsid ühe ööpäeva normaalses une tsükliis, ning teise ööpäeva täielikus ärkvelolekus. LC-MS meetodil tuvastati 171 metaboliiti, millest enamikul ($n = 109$) esines ööpäevane rütm. Rütmi omavad metaboliidid olid kooskõlas varem tuvastatud rütmiliste metaboliitidega (Dallmann jt., 2012, Kasukawa jt., 2012). 78 metaboliiti säilitasid rütmi ka pärast 24 tunnist ärkvelolekut, kuigi rütmide amplituudid olid vähenenud. 27 metaboliidi (Trp, serotoniin, tauriin, 8 atsüülkarnitiini, 13 glütserofosfolipiidi ja 3 sfingolipiidi) ja ka melatoniini kontsentratsioonid tõusid märgatavalt pärast totaalset unepuudust. Tulemus on kooskõlas ideega, et endogeenne tsirkadiaanne süsteem kontrollib lipiidide metabolismi (Huang jt., 2011). Enim muutus serotoniin ($44 \pm 20\%$), mis on oluline neurotransmitter ärkveloleku tagamisel (Monti, 2011) ning mille tootmisrada algab L-trüptofaanist. Kõrgenenud trüptofaan ja tauriin võivad seletada ka melatoniini taseme suurenemist, kuna tauriini stimuleerib käbikemas melatoniini tootmist L-trüptofaanist (suurendab N-atsetüültransferaasset aktiivsust) (Wheler jt., 1979). Võimalik, et unel on tõusnud metaboliitide sünteesile inhibitoorne või degradatsioonile stimuleeriv mõju (Davies jt., 2014).

Selleks, et paremini mõista mehhanisme ebapiisava une ja metaboolsete haiguste vahel, on identifitseeritud ka mõlemas protsessis esile kerkivaid gene ja geenivõrgustikke. Mainitud eesmärgiga uuring piiras üheksa terve mehe und nelja tunnini viiel järjestikusel ööl (Aho jt., 2013). Samal ajal oli kontrollisikute une pikkuseks kaheksa tundi. Geeniekspressiooni analüüsiks eraldati RNA leukotsüütidest katse alguses, pärast une piiramist ja pärast taastusfaasi. Eksperimentaalne unekestuse vähenemine tõstis seerumis C-reaktiivse valgus taset ja muutis 117 geeni ekspressiooni (310-st), millest 62 olid just ülesse reguleeritud. 25-st enim ülesreguleeritud transkriptist 8 olid seotud immuunfunktsiooniga (*Tlr4*, *Ikzf1*, *Fpr2*, *Fcrl2*, *Cybb*, *Socs3*, *Swap70*, *Dlg19*), mõned veel stressi ja apoptoosiga ning 25-st kõige enam

allareguleeritud transkriptist tervelt 19 olid samuti seotud immuunsüsteemiga, eriti naturaalse hävitajarakkudega. Kuna unepuuduse tingimustes vähenes ka mainitud rakkude hulk, siis võib hävitajarakkude arvukuse langemise põhjuseks olla just nende geenide allaregulatsioon. Enim mõjutatud geenid, mis eksperimentaalselt tuvastati, korreleerusid ka subjektiivselt hinnatud unepuudusega (N = 472). *Stx16* korreleerus negatiivselt subjektiivse unepuudusega, olles unepuuduse järgselt ülesreguleeritud transkriptide hulgas, kuid oluliselt madalam ebapiisava unega indiviidide hulgas ($p = 0,0002$, $\beta = -1,31$). Allareguleeritud transkriptidest omasid populatsiooni tasemel negatiivselt korelatsiooni *Lgr6* ($p = 0,0007$, $\beta = -0,79$) ja *Tbx21* ($p = 1,8 \times 10^{-7}$, $\beta = -0,78$) ning positiivset korelatsiooni *Tgfbr3* ($p = 0,0001$, $\beta = +0,41$) (Aho jt., 2013). Ka varemalt on leitud, et ebapiisav uni kutsub organismis esile põletikueelse seisundi, mille korral tõusevad inflammatoorsete tsütokiinide tasemed (Vgontzas jt., 2004) ja C-reaktiivse valgu tase (van Leeuwen jt., 2009). Kusjuures C-reaktiivse valgu kontsentratsioon võib tõusta ka juhul, kui unekestus muutub pikemaks kui 9 tundi (Grandner jt., 2013a).

1.3.3. Tsirkadiaanne fenotüüp ebaregulaarse toitumise korral

Käesolev töö on seni kirjeldanud muutusi organismis, mis on põhjustatud une- ja ärkveloleku tsükliga manipuleerimisest, kuid on tõestatud, et esineb ka vastupidine efekt. Muutused metabolismis häirivad tsirkadiaanset rütmi (Hong jt., 2012). Näiteks kõrge kalorlusega dieet lühendab hiirte aktiivsusperioodi, muudab hormoonide produktsiooni, kellageenide tsüklit ja nende geenide poolt kontrollitavate geenide ekspressiooni. Huvitav on fakt, et võimalusel tarbivad hiired lisakaloreid just päeval ajal (näriiliste uneaeg), mis vihjab, et toitumine väljaspool normaalset aktiivsusperioodi suurendab kaloririkka toidu efekti rasvumisele (Kohsaka jt., 2007). Nähtuga kooskõlas on tõdemus, et toidu tarbimise ajastus mõjutab oluliselt kaalumuutust. Kui hiired jaotati kahte ühesuguse kalorisaldusega toitu saavasse gruppi, aga ühte grupi söödeti öisel ja teist päeval ajal, siis puhkusfaasi ajal toitunud isendid võtsid 6 nädalaga kaalus oluliselt rohkem juurde kui aktiivsusfaasi ajal toitunud isendid ($p < 0,004$). Olgugi, et mõlema grupi liikumisaktiivsus oli sama. Lisaks on näidatud, et geneetilist eelsoodumust rasvumisele omavate hiirte toitmine ainult öösel (näriiliste aktiivsusae), vähendab isendite ülekaalu ja metaboolsete häirete sümptomeid (Arble jt., 2009). Kaloririkast toitu manustavatel hiirtel tõuseb ka mitte-REM une osakaal ja une press ning seetõttu on neil raskem aktiivsusfaasi ajal ärkvel püsida (Jenkins jt., 2006). Geneetiliselt muundatud hiiremudelid on andnud sarnaseid tulemusi. Leptiini geeni

funktsiooni kaotamine (*ob/ob* hiired) nõrgestab ööpäevast aktiivsus- ja toitumisrütmi, summutab kellageenide ekspressiooni maksas ja rasvkoes ning vähendab kehatemperatuuri (Laposky jt., 2006).

Kõigest eelnevast järeldub, et toit käitub kui sünkroniseerija ning toitumise rütmilisus on kui vihje, mis aitab SCN-l perifeerseid kellasid sünkroonis hoida (Gooley ja Chua, 2014). Transgeensete rottide peal tehtud katsetega on demonstreeritud, et muutes toidu kättesaamise aega ööpäevas, häiruvad just perifeersetes kudedes olevad endogeensed tsirkadiaansed kellad, mitte aga tsentraalne kell SCN-s. Maksa kella rütm võib nihkuda kahe ööpäeva jooksul kuni kümme tundi, mis tekitab küsimuse, kas toitumise tsükkel võib mõjutada maksa sõltumata SCN-st ja valgusest (Stokkan jt., 2001).

Ülalmainitud muutuseid on kirjeldatud hiiremudelite baasil, sest hetkel ei ole veel inimestel süsteemselt ülekaalulisuse ja kaloririkka toidu tarbimise efekti tsirkadiaansetele metaboolsetele rütmidele uuritud (Gooley ja Chua, 2014). Kui epidemioloogilised ja assotsatsiooniuuringud leiavad rohkem tõendeid tsirkadiaanse kella ja metabolismi omavahelise interaktsiooni kohta, saab hakata ka kliinilisel tasandil rõhutama metaboolse homöostaasi ning une- ja ärkveloleku protsessi rütmilisuse hoidmise vajadust (Marcheva jt., 2013).

1.4. Une kestust analüüsivad üle genoomsed assotsatsiooniuuringud

Une kestus on geneetiliselt reguleeritud. Hetkel varieerub hinnang une kestuse päritavusele, jäädes vahemikku 31–44% (Watson jt., 2010, Heath jt., 1990, Partinen jt., 1983). Geenivariandid, mis tunnust mõjutavad, on suuresti veel teadmata, kuid järjest enam viiakse läbi üle genoomseid assotsatsiooniuuringuid, mis uusi genoomseid piirkondi tuvastavad ning uneparameetrite geneetilist tausta seletavad (Gottlieb jt., 2014, Ollila jt., 2014, Allebrandt jt., 2013).

Üks esimestest uneparameetrid analüüsivatest populatsioonipõhistest assotsatsioonianalüüsides oli võrdlemisi väike uuring (N = 749) aastal 2007. Vaatamata indiviidide arvule, tuvastati polümorfisme, millest osad jäid ka tsirkadiaanse kellasüsteemiga seotud kandidaatgeenide (*Csnk2a2* ja *Prok2*) lookustesse (Gottlieb jt., 2007). Siiani pole neid leide suudetud replitseerida. Juba suurema, austraallaste uuringu (N = 2323) parim leid rs7304986 kromosoomist 12 oli tugevaimas assotsatsioonis ($p = 1,38 \times 10^{-6}$) une latentsiga

(uinumiseks kulunud aeg). SNP-le lähimat geeni *Cacna1C* on varemalt psühhiaatriliste- ja meeleoluhäiretega seostatud (Sklar jt., 2011). Geen kodeerib L-tüüpi pigesõltuva kaltsiumikanali $\alpha 1$ subühiku valku⁴. Uuringus analüüsiti ka une kestust, kuid ükski polümorfism ei osutunud statistiliselt oluliseks (Byrne jt., 2013). Veelgi suurem Euroopa konsortium (N = 4251) leidis aga markeri, mis seletab ~5% une kestuse variatsioonist. Marker rs11046205 ($p = 3,99 \times 10^{-8}$) asub samuti 12ndas kromosoomis, ATP-sõltuva kaaliumikanali geeni *Abcc9* intronis. Mainitud geeni homoloogi väljalülitamine äädikakärbsel põhjustas ööune lühenemist. Leitud assotsiatsiooni õnnestus teadlastel näha ka replikatsioonianalüüsis, kuid alles siis, kui arvesse võeti ka indiviidide une keskaega (MSFscn) ja vööndi- ning suveaega (Allebrandt jt., 2013). Kahte eelnevat GWAS-i leidu üritasid replitseerida inglased, kuid katse õnnestus ainult *Cacna1C* geeniga. Leiti SNP rs16929277, mis on totaalses aheldatuses eelpool mainitud rs7304986-ga. Täheledata, et minoorse G alleeli kandjatel halveneb une kvaliteet. *Abcc9* geenis oleva SNP ja une kestuse vahel nähti seost ainult retsessiivse mudeli puhul. Sel juhul oli rs11046209 suhtes TT homosügootidel (N = 2) pikem une kestus ($8,3 \pm 0,4$) kui teistel genotüüpidel ($7,5 \pm 1,1$) (Parsons jt., 2013).

Viimase aja mahukaim une pikkust analüüsiv GWAS on metaanalüüs, kus osales 18 populatsioonipõhist kohorti, kõik Euroopa päritolu (N = 47 189). Statistiliselt olulisimaks osutus SNP (rs1191685, $p = 1,06 \times 10^{-9}$) teisest kromosoomist, 35–80 kilobaasi ülesvoolu türoidspetsiifilisest transkriptsioonifaktorist *Pax8*. Seda leidu õnnestus teadlastel replitseerida ka Aafrika-ameerika valimis (N = 4771). Vähem oluline leid kuuest kromosoomist (rs4587207, $p = 2,02 \times 10^{-8}$) jäi samuti geenidevahelisse regiooni. Avastus- ja replikatsioonipopulatsioone kombineerides osutus kõige parema statistilise väärtusega markeriks samuti teises kromosoomis paiknev rs1823125 ($p = 1,5 \times 10^{-10}$), mille puhul iga minoorse alleeli koopia seostus 3,1 minutit pikema une kestusega (Gottlieb jt., 2014).

Epidemioloogilised uuringud leiavad seoseid eelkõige une kestuse ja lipiidide metabolismi vahel. Soomlaste populatsioonis testiti totaalse une kestuse seost triglütseriidide, kõrge- ja madala tihedusega lipoproteiinide ja totaalse kolesterooliga. GWAS analüüs viidi läbi 6334 indiviidiga, kelle kohta olid teada mainitud lipiidid näitajad, sugu, vanus (25–74) ja küsitluse põhjal saadud uneparameetrid. Indiviidid, kelle uni oli ≤ 5 või ≥ 10 tunni, omasid kõige ebasoodsamaid lipiidiprofiile. Neil olid kõrgemad triglütseriidide ja kolesterooli

⁴<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/775>

tasemed ja madalamad HDL tasemed kui teistel. Madala tihedusega lipoproteiinide tasemed olid madalaimad pika unega indiviide grupis. Totaalset une pikkust seostati 60 varemalt lipiidide metabolismis oluliseks peetud SNP-ga. Tuvastati kaks statistiliselt olulist signaali *Trib1* (*tribbles homolog 1*) geenist allavoolu (rs17321515, $p_{\text{cor}}^5 = 0,0053$ ja rs2954029, $p_{\text{cor}}^5 = 0,015$), kus kaitsvad minoorsed alleelid olid vastavalt G ja T. Lisaks seostusid mõlemad SNP-d oluliselt vere lipiidide profiiliga. Tugevaim seos oli triglütseriidide kontsentratsioonidega (rs17321515, $p = 1,45 \times 10^{-5}$, $\beta = -1,004$ ja rs2954029, $p = 4,62 \times 10^{-5}$, $\beta = -0,95$). Mõlema SNP korral jäi assotsatsioon une pikkusega oluliseks ka pärast mudeli kohandamist kõigi nelja lipiidse parameetri suhtes (igal juhul $p < 0,05$) ja assotsatsioon triglütseriididega oluliseks pärast kohandamist une pikkuse suhtes ($p < 0,05$). Tulemusi replitseeriti edukalt kaksikute kohordis ($N = 2189$). Viimaks uuriti *Trib1* geeni ekspressiooni eksperimentaalselt esile kutsutud une piirangu tingimustes 19 terve mehe mononukleaarsetest leukotsüütidest eraldatud RNA põhjal. Leiti, et une lühenemise järgeselt tõuseb *Trib1* ekspressioon 1,6 korda ning langeb normi piiridesse kui algne une pikkus taastub ($p = 0,006$). Märgati ka *Trib1* ekspressiooni negatiivset seost mitte-REM unega, aga seda just une piirangust normaalsesse unne tagasilülitumise korral. Seos näitab, et geen võib omada rolli unepuudusest taastumisel. Uurimustöö leiud tõestavad MAPK signaalikaskaadi vahendava *Trib1* geeni pleiotroopset iseloomu ning võivad peegeldada une ja metabolismi molekulaarset seost (Ollila jt., 2012). Kuna *Trib1* aktiveeritakse põletikulise seisundi korral (Sung jt., 2006), siis on leid veelkord tõestuseks, et une puudujääk on seotud immunsüsteemi aktivatsiooniga (Ollila jt., 2012).

⁵P- väärtus, mis on läbinud Bonferroni korrigeerimise.

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva töö praktilise osa eesmärgiks on GWAS uuringuid kasutades leida genoomist une kestust mõjutavaid piirkondi ning võimalusel seostada tulemusi metabolismiradadega. Seeläbi sooviksime kirjeldada une- ja metabolismiprotsesside omavahelisi seoseid. Töö teiseks eesmärgiks on kirjeldada une kestuse ja erinevate haiguste esinemiste vahelisi trende ja prognoosida šanssi olla haige teatud uneparameetrite esinemise korral.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Valim

Valim koosneb Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramus aastatel 2007–2011 MCTQ (*Munich ChronoType Questionnaire*) küsimustikule vastanud indiviididest. Küsimustiku on välja töötanud prof. T. Roennebergi uurimisgrupp Müncheni Ülikooli Meditsiinilise Psühholoogia Instituudist. Subjektivne küsimustik, kus vastused antakse töö- ja puhkepäevade kohta eraldi, on valideeritud ja seda on kasutatud uneparameetrite hindamiseks paljudes populatsioonides (Roenneberg jt., 2003).

GWAS analüüside valimites on kokku 7432 indiviidi vanuses 18–76 eluaastat (sh 3107 meest). Une kestuse ja haiguste vaheliste trendide kirjeldamise valimis on 21 068 indiviidi (sh 6929 meest) vanuses 25–75 eluaastat. Une kestuse ja metaboolse sündroomi vahelise seose kirjeldamise valim koosneb 6375 indiviidist (sh 2411 meest) vanuses 18-103 eluaastat, kellest sündroomi põdejateks on defineeritud 965 indiviidi.

Uuringutesse kvalifitseerumiseks kasutati järgmisi kriteeriume:

- MCTQ andmete korrektsus;
- ei ole viimase 3 kuu jooksul vahetustega töötanud;
- ei kasuta und potentsiaalselt mõjutavaid ravimeid;
- keskmine une kestus üle nelja tunni;
- äratuskella mitte kasutamine puhkepäevadel;
- genotüübiandmete olemasolu (GWAS analüüsiks);
- metaboolomika andmete olemasolu (metaboolse sündroomi analüüsiks).

Käesolevas töös teostatavate uuringute läbiviimiseks on geenidoonorid andnud informeeritud nõusoleku ning on olemas Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee luba.

2.2.2. Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring keskmise une kestuse analüüsiks

2.2.2.1. Genotüpiseerimine

Indviidide genotüpiseerimine on teostatud kolme erineva kommertsiaalse Illumina[®] kiibiga: HumanOmniExpress, Human370CNV ja HumanCoreExome-12v1.0. Neist kõige suurema katvusega on HumanOmniExpress kiip, millel on > 715 000 markeri⁶. Genotüpiseerimised on läbi viidud vastavalt Illumina[®] poolt ettenähtud protokollidele Eesti Biokeskuse Tuumiklabori Genotüpiseerimiskeskuses.

2.2.2.2. Fenotüübiandmete ettevalmistamine

Fenotüüpe iseloomustav info koosneb kümnest peakomponendist, kuuest kovariaadist ja ühest kvantitatiivsest uuritavast tunnusest. Analüüsis on uuritavaks tunnuseks normaliseeritud nädala keskmine une kestus (AvSD, 5 tööpäeva ja 2 puhkepäeva). Kovariaatideks on indiviidi sugu, vanus, vanusest võetud ruutväärtus, kehamassiindeks, andmete kogumise aeg (suveaeg või vööndiaeg) ja kronotüüp (unevõla suhtes korrigeeritud puhkepäevade une keskaeg, MSFscn). MSFscn väärtus on samuti normaliseeritud. Andmete normaliseerimiseks on leitud igale väärtusele z-skoor ((x-keskväärtus)/standardhälve). Kõik nimetatud kovariaadid on valitud teadmiselega, et nad võivad mõjutada une kestust (Roenneberg jt., 2012, Bjorvatn jt., 2007), kaasa arvatud üleminek suveajale (Kantermann jt., 2007). Eemaldatud on isikud, kelle mõni tunnus erineb oluliselt valimi keskmisest (± 4 SD).

2.2.2.3. Genotüübiandmete ettevalmistamine

2.2.2.3.1. Kvaliteedikontroll

Genotüübiandmete kvaliteedikontrolli käigus oli juba eelnevalt eemaldatud isikud järgnevate parameetrite alusel:

- madal genotüpiseerimiskvaliteet (*call rate* < 95%) nii indiviidi kui iga SNP kohta;
- minoorse alleeli sagedus MAF < 1%;
- Hardy–Weinbergi tasakaaluseaduse testi p-väärtus < 10^{-6} ;

⁶<http://www.illumina.com/applications/genotyping/human-genotyping-arrays/omni-arrays.html>

- geneetilise ja fenotüübilise soo ebakõla.

Andmete kvaliteedi hindamine ja filtreerimine oli teostatud programmidega Illumina GenomeStudio 3.1, PLINK 1.07 (Purcell jt., 2007) ja R.

Lisaks mainitule, eemaldasime valimitest RelOut⁷ programmiga sugulased, kelle IBD (*Identical by descent*) väärtus PI_HAT oli $\geq 0,11$. Pärast kvaliteedikontrolle oli kolmeks eraldiseisvaks GWAS analüüsiks kasutatavates valimites HumanOmniExpress kiibiga genotüpiseeritud 3226 inimest, Human370CNV kiibiga genotüpiseeritud 1124 inimest ja HumanCoreExome-12v1.0 kiibiga genotüpiseeritud 3082 indiviidi. Metaanalüüsi valimi suuruseks jäi 6668 indiviidi, kuna metaanalüüsiks eemaldati kiipide vahel kattuvad isikud ja kiipidevahelised sugulased. Lisas 3 on välja toodud kõigi kolme kohordi ja metaanalüüsi kohordi struktuure iseloomustav kokkuvõtlik tabel.

2.2.2.3.2. Imputeerimine

Imputeerimine on statistiline meetod, mis võimaldab puuduolevaid andmeid referentsandmete abil ennustada⁸. Geneetikas tuletatakse nende markerite võimalikku genotüüpi, mis ei ole otse genotüpiseeritud või on genotüpiseeritud halva kvaliteediga (Evangelou ja Ioannidis, 2013). Antud töös kasutatavad puhastatud genotüpiseerimisandmed olid eelnevalt imputeeritud programmidega ShapeIT v2 (Delaneau jt., 2013) ja IMPUTE v2.2.2 (Howie jt., 2009). Referentspaneeliks on kõikide kiipide puhul kasutatud 1000 Genoomi Projekti raames oktoobris 2014 valminud Faas 3 paneeli (1000 Genomes Phase 3), mis sisaldab üle 79 miljoni geneetilise variandi. Referents koosneb 26-st erinevast populatsioonist pärit 2535 indiviidi genoomist⁹.

2.2.2.3.3. Statistiline analüüs

Statistilised analüüsid viidi läbi SNPTEST v2.5 programmiga, kasutades lineaarse regressiooni mudelit. Markereid analüüsiti aleeliefektide aditiivset mudeli baasil¹⁰. Lisaks

⁷<http://www.toomashaller.com/RELOUT.html>

⁸ <http://www.statcan.gc.ca/edu/power-pouvoir/ch3/imputation/5214784-eng.htm>

⁹ <http://www.1000genomes.org/announcements/initial-phase-3-variant-list-and-phased-genotypes-2014-06-24>

¹⁰ https://mathgen.stats.ox.ac.uk/genetics_software/snpctest/snpctest.html

kasutati GWAS-ide tegemiseks ka Perli-i (SNPTESTi väljundfailide liitmine) ja statistikaprogrammi R (versioon 3.1.2 „Pumpkin Helmet“).

Pärast assotsatsioonianalüüsi eemaldati tulemustest markerid, mille imputatsiooni kvaliteeti iseloomustav parameeter (*imputed info*) jäi alla 0,8 ja efektalleeli sagedus alla 1% (EAF < 0,01). Pärast markerite filtreerimist jäi analüüsidesse järgnev arv markereid: 9 008 927 (HumanOmniExpress), 8 620 236 (Human370CNV) ja 7 961 973 (HumanCoreExome-12v1.0).

Kõiki indiviide hõlmav kolme kiibi metaanalüüs viidi läbi programmiga METAL¹¹, kasutades *inverse variance-weighted* meetodit ja genomikontrolli (Gottlieb jt., 2014), mis arvestab võimaliku populatsiooni stratifikatsiooniga (Thompson jt., 2011). Metaanalüüsis oli imputatsioonikvaliteeti iseloomustav parameeter sama, mis magistritöö eelnevates GWAS-des. Metaanalüüs hõlmas endas 9 295 142 kordumatut markerit. Ülegenoomsete analüüsides ja metaanalüüsi tulemuste visualiseerimiseks tehti *Manhattan plot*, *QQ (quantile-quantile) plot* ja *Forest plot* joonised. Regionaal skeemide jaoks kasutati LocusTrack tarkvara (Cuellar-Partida jt., 2015). Keskmise une kestuse määramiseks erinevates genotüübiklassides kasutati GTOOL¹² ja Microsoft Office Excel tarkvaraprogramme.

Mitmesest testimisest tulenevate võimalike vale-positiivsete tulemuste vähendamiseks, loeti statistiliselt oluliseks tulemused, mille p-väärtused olid $\leq 5 \times 10^{-8}$ (vastab Bonferroni korrigeerimisele: miljon sõltumatut testi) (Evangelou ja Ioannidis, 2013).

2.2.3. Une pikkuse ja haiguste vaheliste trendide kirjeldamine

Nädala keskmise une kestuse seost kirjeldati esmajoones järgnevate haiguslike seisunditega: skisofreenia, skisotüüpsed ja luululised häired (F20–F29), meeleoluhäired (F30–F39), unehäired (G47.0–G47.9), epilepsia (G40), migreenid (G43.0, G43.1), peaajuveresoonte haigused (I60–I69), essentsiaalne primaarne hüpertensioon (I10), südamekahjustusega hüpertooniatõbi (I11), südame isheemiatõved (I20–I25), I tüüpi diabeet (E10), II tüüpi diabeet (E11), psoriaas (L40) ja metaboolne sündroom. Sulgudes on haiguste koodid Rahvusvahelise Haiguste klassifikatsiooni versioon nr 10 (RHK-10) järgi. Nimetatud haiguste olemasolu (va metaboolne sündroom) indiviididel on kliiniliselt kinnitatud.

¹¹<http://csg.sph.umich.edu/abecasis/Metal/>

¹² <http://www.well.ox.ac.uk/~cfreeman/software/gwas/gtool.html>

Metaboolne sündroom (MetS) ei ole doonoritel diagnoositud haigusseisund. Metaboolse sündroomi ja une kestuse vaheliste seoste leidmiseks kasutati indiviide, kel on tuumamagnetresonants spektroskoopia abil eraldatud ja identifitseeritud plasma metaboliidid. Indiviid loeti metaboolse sündroomi põdejaks kui tema vööümbermõõt ületas normi piiri (meestel ≥ 102 cm, naistel ≥ 89 cm)¹³ ning kui tal oli täidetud vähemalt 2 kriteeriumi järgnevast neljast: seerumi triglütseriidide tase $> 1,7$ mmol/l, HDL- kolesterooli tase meestel $< 1,03$ mmol/l ja naistel $< 1,29$ mmol/l, kõrgeenenud vererõhk (süstoolne ≥ 130 mmHg või diastoolne ≥ 85 mmHg) või vererõhku alandavate ravimite kasutamine või hüpertensiivsete haiguste usaldusväärne diagnoos ja plasmaglükoosi tase $\geq 7,0$ mmol/l või diabeedi usaldusväärne diagnoos (Alberti jt., 2006). Glükoosi piir oli seatud kõrgemaks (Alberti jt., artikli järgi on piir $\geq 5,6$ mmol/l), kuna paljude doonorite puhul ei ole tegemist hommikuse paastumisjärgse glükoosi näiduga. Lähtudes mainitud parameetritest defineeriti MetS-i haigeks 956 inimest 6375-st. Lisas 4A ja 4B (MetS) on välja toodud tabelid, mis iseloomustavad antud uuringute valimite koosseise.

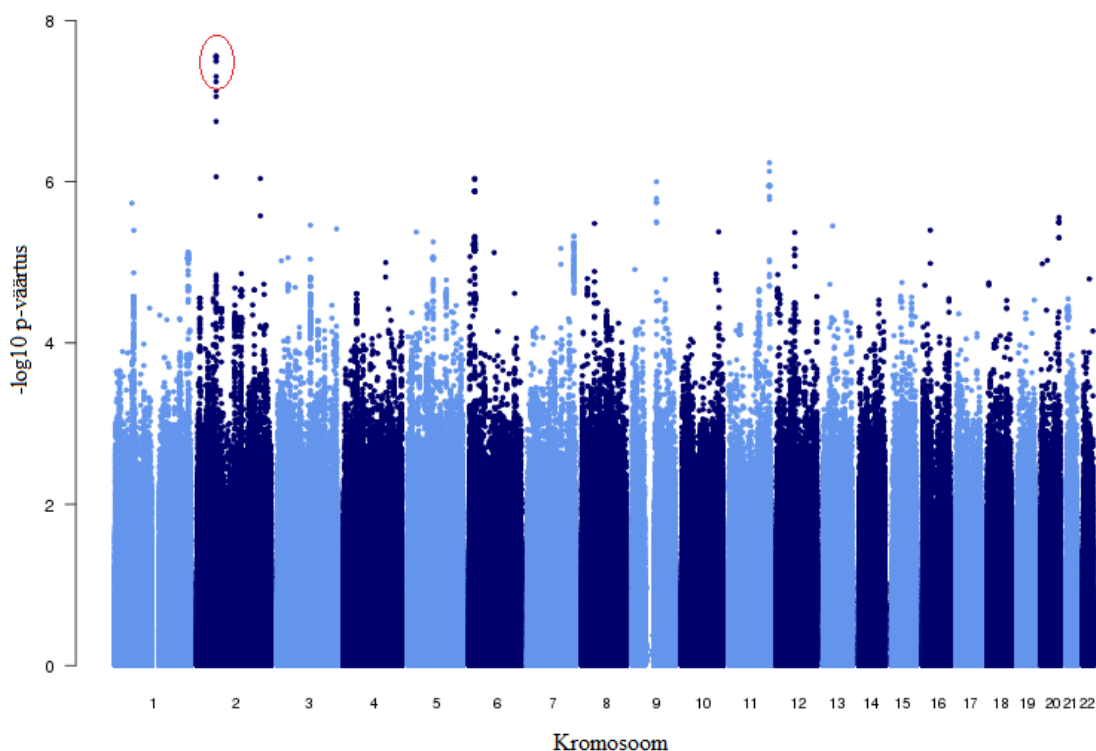
Algselt uuriti keskmise une kestuse (AvSD) seost 14 erineva ülalmainitud haigusseisundiga, kuid haiguse olemasolu tõenäosust prognoosiv logistilise regressiooni mudel loodi seisunditele, millel puhul ilmnes statistiliselt oluline seos une kestuse, kui pideva tunnusega. Mudelites kasutati lihtsuse ja võimaliku mittelineaarse seose tagamiseks AvSD-d faktortunnusena. Inimesed grupeeriti AvSD suhtes järgvenalt: < 6 , $6-7$, $7-8$, $8-9$ ja >9 tunni pikkune uni. Võimalikeks kovariaatideks valiti sugu, vanus, KMI, MSFscn, töönädala jooksul kogunenud une puudujääk (ΔMS) ja aeg, millal doonoritelt andmed koguti (suveaeg *versus* vööndiaeg). Mudelite koostamiseks kasutati statistikapaketti R (versioon 3.1.3 „Smooth Sidewalk“) koos RStudio-ga. Parima mudeli valimisel lähtuti Akaike informatsiooni kriteeriumist (AIC): mida väiksem AIC, seda parem mudel. Jooniste tegemiseks kasutati R lisapaketti ggplot2.

¹³<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/metabolic-syndrome/basics/tests-diagnosis/con-20027243>

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Ülegenoomsed assotsiatsiooniuuringud ja metaanalüüs

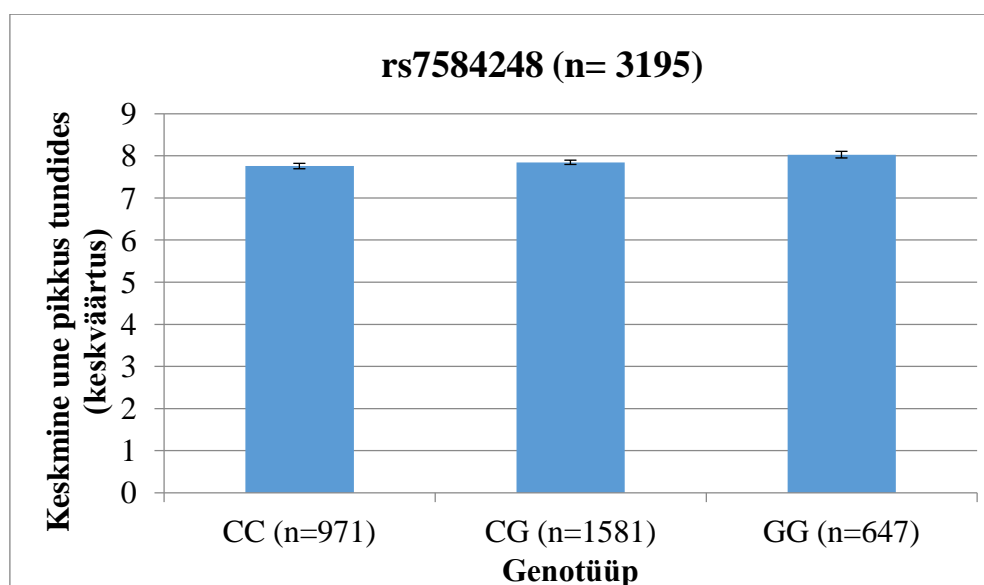
Ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute eesmärk oli tuvastada une kestust mõjutavaid genoomseid piirkondi, kasutades genotüübiandmeid eestlaste populatsioonist ning võimalusel seostada leide metabolismiradadega. Käesolevas magistritöös teostasime esmalt keskmise une kestuse suhtes kolm iseseisvat GWAS analüüsi. Isikud, kelle uneandmeid kasutasime, on genotüpiseeritud erinevate genotüpiseerimiskiipidega, mistõttu ei ole neid võimalik ühte assotsiatsioonianalüüsi ühendada. Seejärel viisime läbi neid uuringuid ühendava metaanalüüsi. Individuaalsetest uuringutest ainult üks, milles kasutati HumanOmniExpress kiibiga genotüpiseeritud isikuid ($N = 3226$), tuvastas 6 markerit (Joonis 5), mis ületasid GWAS-le kehtestatud statistilise olulisuse piiri ($\leq 5 \times 10^{-8}$). Lisas 5 on antud analüüsi kirjeldav *QQ plot* joonis.



Joonis 5. **Manhattan plot.** X-teljel on kromosoomid 1–22, Y-teljel on p-väärtusest võetud negatiivne kümnendlogaritm. Punase ovaali sees on 6 markerit, mille p-väärtus ületas statistilise olulisuse nivoo ($< 5 \times 10^{-8}$).

Kõik statistiliselt olulised markerid pärinesid teise kromosoomi lühikesest õlast, geenidevahelisest regionist ning jäävad vahemikku 62 657 219–62 662 704 ap (aluspaari) (GRCh37.p13 *assembly*). Lisaks on kõigi nende markerite efektalleeli suund negatiivne.

Parima p-väärtusega oli imputeeritud SNP rs7584248:62657219:G:C ($p = 2.75 \times 10^{-8}$, *imputed info* = 0,99), mille puhul efektalleeliks on C alleel sagedusega 0,55. Sagedus on kooskõlas 1000 Genoomi Projekti Faas 1 üldise alleelisagedusega, kuid vastupidine Euroopa alapopulatsiooni alleelisagedusega (C: 0,47 ja G: 0,53)¹⁴. Polümorfismi efekt uuritavale tunnusele on negatiivne ($\beta = -0,14$, standardviga = 0,025). C aalelidoosi kahanemisega pikeneb une kestus. CC genotüübiga indiviidide keskmise une kestuse keskvärtus oli $7,76 \pm 1,02$ tundi, samas kui heterosügootidel oli näitaja $7,85 \pm 1,04$ tundi ning GG homosügootidel $8,03 \pm 1,02$ tundi. Seega on homosügootide une kestuste keskvärtuste vahe 16,2 minutit (Joonis 6).



Joonis 6. **rs7584248:62657219:G:C mõju une kestusele.** Imputeeritud SNP genotüüp õnnestus tuvastada 99% valimist. Y-teljel on nädala keskmise une kestuse keskvärtus ning X- teljel erinevate genotüüpidega indiviidid. Tulpadel on tähistatud 95% usaldusintervallid.

Leidmaks, kas ülejäänud 5 statistiliselt olulist markerit omavad une kestusele iseseisvat mõju või ilmneb nende assotsatsioon uuritava tunnusega vaid tänu seotusele parima markeriga, teostati 2 kromosoomi kohta ka konditsionaalne analüüs (*Conditional Test of Association*¹⁵). Lisaks eelnevatele kovariaatidele kohandati nüüd analüüsi ka leitud parima SNP suhtes. Tulemustest järeldus, et leitud statistiliselt oluliste markerite mõju on vahendatud rs7584248:62657219:G:C mõju kaudu, sest pärast konditsionaalset analüüsi, kaotasid ülejäänud markerid täielikult statistilise olulisuse. Konditsionaalse analüüsi järgselt saavutas

¹⁴http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:62429584-62430584;v=rs7584248;vdb=variation;vf=5292061

¹⁵https://mathgen.stats.ox.ac.uk/genetics_software/snptest/snptest.html#conditional_tests

parima p-väärtuse ($p = 1,33 \times 10^{-6}$) polümorfism, mis jääb rs7584248:62657219:G:C-st 145 megaluspaari eemale ehk ei tohiks mõjutada eelnevalt leitud parima markeri efekti.

Hetkeseisuga ei leidnud me polümorfismile funktsionaalset tähendust, eelkõige markeri geenidevahelisel alal paiknemise tõttu. Ka ei ole töös tuvastatud kuuest statistiliselt olulisest polümorfismist ühtegi SNP-d publitseeritud GWAS analüüside kataloogis kirjeldatud¹⁶. Suurem osa GWAS abil tuvastatud markeritest (~88%)¹⁶ asetsevadki just intergeenselt või ka intronites. Seega väheneb tõenäosus mõjutatada geeniregulatsiooni otseselt. Oluline on aga see, et kolmedimensionaalse DNA voltimise läbi võivad omavahel kokku saada genomis üksteisest väga kaugel paiknevad alad. Kuid neid regulaatorseid signaale on keerulisem tuvastada (Edwards jt., 2013). Seega ei ole võimalik täpselt öelda, millise mehhanismi kaudu polümorfism une füsioloogiat mõjutada võiks.

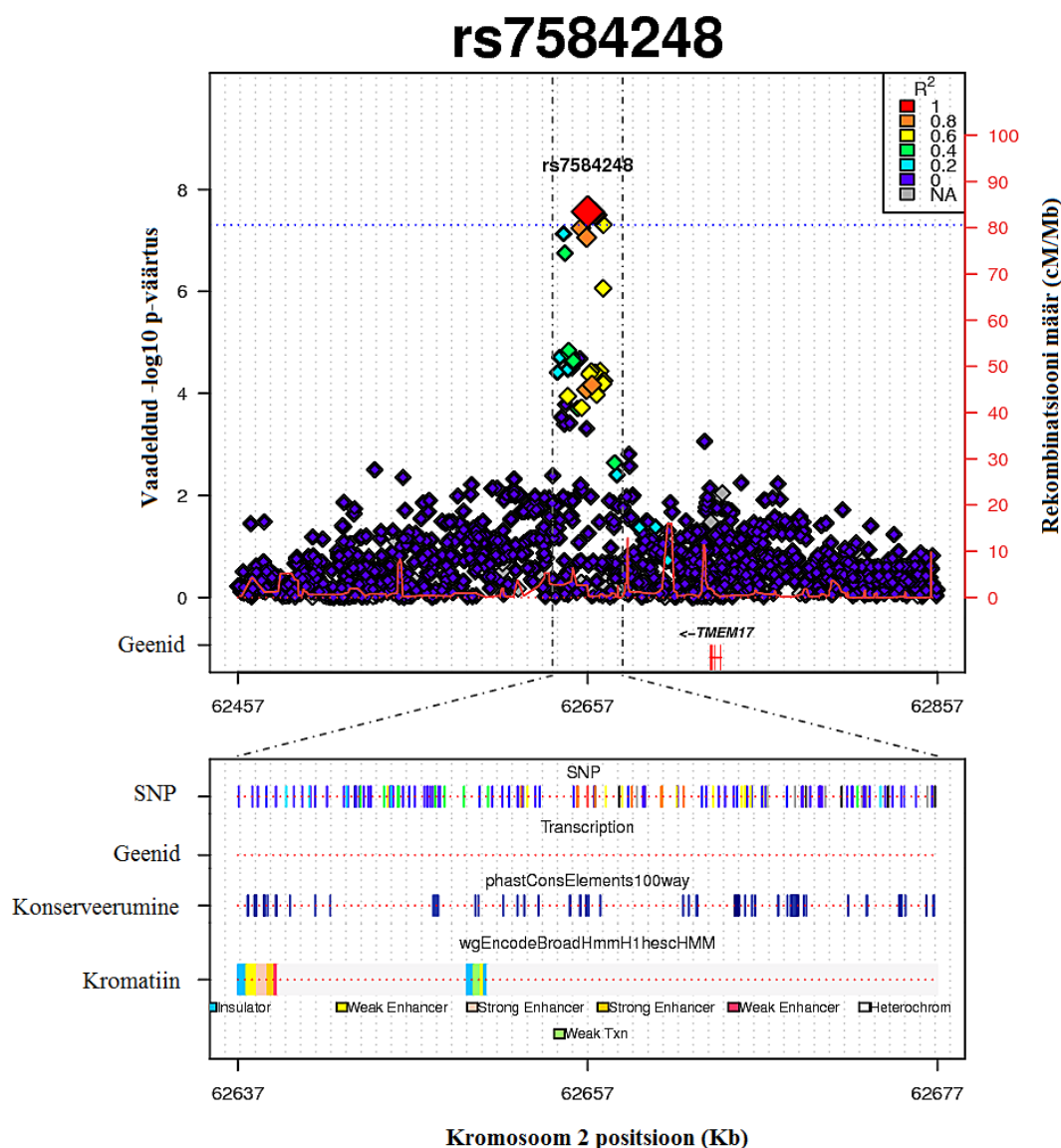
rs7584248:62657219:G:C-le kõige lähem geen on 2p15 lookuses paikev transmembraanne proteiin 17 (*Tmem17*), mis jääb markerist 70137 aluspaari¹⁷ ülesvoolu (Joonis 7). Geeniprodukt on tuvastatud paljudes kudedes kui tsiili ehk ripsme (*cilia*-ladina keeles 'ripsmed') basaalkelhas oleva 9-st proteiinist koosneva kompleksi (B9) komponent. Kompleks asetseb ripsme baasil, ülemineku tsoonis ja toimib kui barjäär, mis reguleerib valkude difusiooni plasma ja tsiliaarmembraani vahel. Kui kompleks häirub, suureneb plasmavalkude difusioon tsiliaarmembraani, mis omakorda viib ekstratsellulaarsete signaalide vääradele tõlgendamistele. TMEM17 ja TMEM231 omavad tsentraalselt rolli seondamaks kompleksi tsiliaarmembraanile. *Tmem17* ja temaga koos funktsioneerivate geenide vaigistamine mõjutab küll vähe ripsmete formeerumist, kuid häirib *sonic hedgehog* signaalirada ja vähendab tugevalt ripsmeid lokaliseeriva somatostatiini retseptor SSTSR3 hulka. Seega mõjutab TMEM17 valk ripsme, kui signaliseeriva organelli funktsioneerimist (Chih jt., 2012). Kuna aga TMEM17 valku on lokaliseeritud pea kõigist organsüsteemidest, kaasa arvatud seede- ja kesknärvisüsteemist¹⁸, siis võib spekuloida valgu võimalike teistesse kooslustesse kuulumise ja erinevate funktsioonide omamise üle. *Tmem17* geeni mõju uurimiseks tsirkadiaansetele ja metaboolsetele rütmidele, tuleks luua täielik või

¹⁶<http://www.genome.gov/gwastudies/>

¹⁷http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000186889;r=2:625002-21-62511894

¹⁸<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000186889-TMEM17/tissue>

konditsionaalne (nt kesknärvisüsteem, fotoretseptorid) *knockout* hiir või rott, kuna *C.elegans* ja *Drosophila* ei oma geeni homolooge¹⁹.

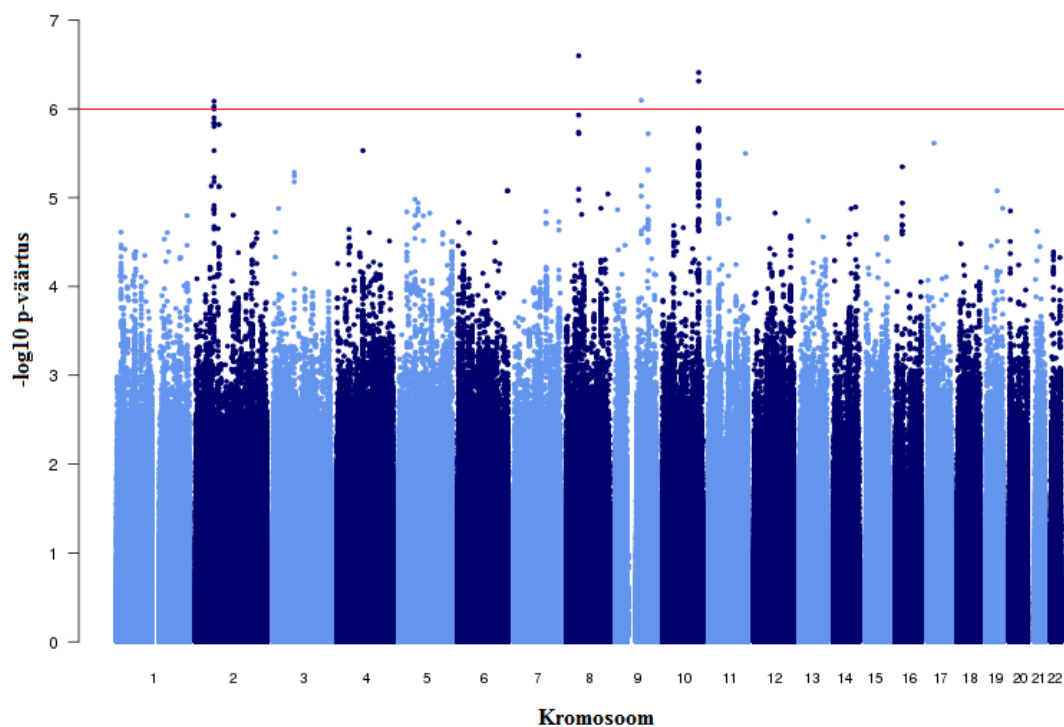


Joonis 7. HumanOmniExpress GWAS analüüsi parima markeri regionaal skeem. Joonise ülemisel paneelil on punasega tähistatud marker ja temaga lähedistiku olevad SNP-d. R^2 väärtus iseloomustab rs7584248 paariviisilist aheldatust ülejäänud markeritega. Punase joonega on välja toodud kahe lookuse vaheline rekombineerumise tõesus (rekombinatsiooni määr). SNP-st ülesvoolu jääb *Tmem17*. Joonise alumine osa on 10 kordne suurendus huvipakkuvasse piirkonda. Esimesel ja teisel rajal on vastavalt kõik piirkonda jäänud SNP-d ja geenid (antud alas puuduvad). Kolmandal rajal on sinisega tähistatud konserveerunud alad, mis on leitud *PhastCons* meetodi abil 100 erineva selgroogse organismi võrdlemisel. Viimasel rajal on Broad/MGH ENCODE grupi poolt genereeritud andmete põhjal iseloomustatud kromatiini võimalikku olekut antud piirkonnas inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes. Tuvastatud SNP paikneb võimalikus heterokromatiini alas.

¹⁹http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=26623

Human370CNV kiibiga genotüpiseeritud isikutega (N = 1124) läbiviidud GWAS-s saavutasid parimad tulemused kümnekond SNP-d 17ndast kromosoomist, millest väikseim p-väärtus ($1,10 \times 10^{-7}$) oli polümorfismil 17:21856674:C:A. 17ndale kromosoomile järgnes teine kromosoom, kuid eelpool nähtud rs7584248:62657219:G:C p-väärtus osutus nii selles analüüsis kui ka HumanCoreExome-12v1.0 kiibiga genotüpiseeritute analüüsis palju vähem oluliseks ($p > 0,01$). HumanCoreExome-12v1.0 kiibiga genotüpiseeritud isikutega tehtud analüüsis (N = 3082) ilmnemid parimad assotsatsioonid kromosoomides 3 ja 22, kuid p-väärtused ei jõudnud 10^{-8} tasemele. Parima markeri rs62290326:194835343:G:C p-väärtus oli $3,65 \times 10^{-7}$. Lisas 6 on välja toodud mõlemat analüüsi illustreerivad *Manhattan plot* joonised.

Kõigi kolme kiibiga genotüpiseeritud indiviididega tehtud GWAS analüüsid ühendati metaanalüüsi, mille valimi suuruseks kujunes 6668 indiviidi (2772 meest). Metaanalüüs ei tuvastanud ühtegi statistiliselt olulist ülegenoomset leidu ega võimendanud HumanOmniExpress kiibi kohordis leitud tulemust (rs7584248:62657219:G:C). Analüüsi kirjeldav *QQ plot* on nähtaval lisas 7. Kuna bioloogilised seosed võivad paikneda statistilise olulisuse piiri äärel (Thompson jt., 2011), peeti assotsatsioone, mille p-väärtus oli $\leq 10^{-6}$, piisavalt huvitavateks, et neile rohkem tähelepanu pöörata (Joonis 7).



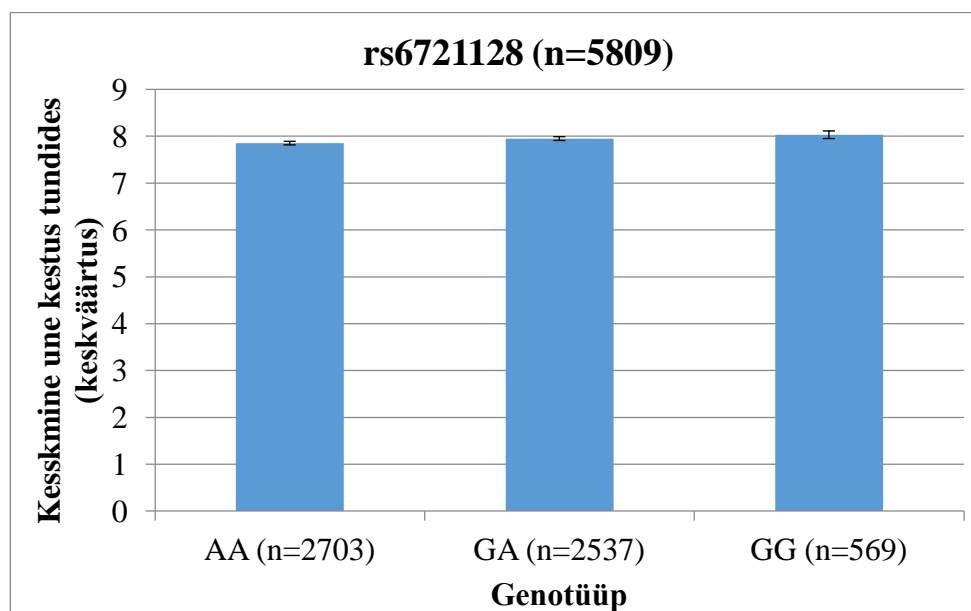
Joonis 7. **Metaanalüüsi tulemusi iseloomustav *Manhattan plot***. Punasest joonest ülespoole ($p \leq 10^{-6}$) jäävad huvipakkuvad markerid. X-teljel on kromosoomid 1–22, Y-teljel on p-väärtusest võetud negatiivne kümnendlogaritm.

Tabel 1. Metaanalüüsi tulemused: 10 kõige väiksema p-väärtusega SNP-d koos iseloomustavate statistikutega.

Metaanalüüs (N = 6668)				Omni (N = 3226)		370CNV (N = 1002)		CoreExome (N = 2441)		Metaanalüüs (N = 6668)		
Krom	SNP (Pos)	Efekt- alleel	Efekt (SE)	β (SE)	P	β (SE)	P	β (SE)	P	P	Efeki suund	Geen
8	rs138952930 (41152921)	A	0,350 (0,068)	0,436 (0,094)	3,30X10 ⁻⁶	0,510 (0,195)	0,009	0,172 (0,112)	0,127	2,53X10 ⁻⁷	+/+	<i>Sfrp1</i> intronis
10	rs149249098 (121941785)	C	0,285 (0,056)	0,321 (0,078)	3,64X10 ⁻⁵	0,228 (0,161)	0,156	0,252 (0,093)	0,007	3,91X10 ⁻⁷	+/+	Geenidevaheline (<i>Al353664.1</i> RNA geen)
10	rs138907357 (121987255)	T	0,301 (0,060)	0,327 (0,077)	2,21X10 ⁻⁵	-	-	0,262 (0,094)	0,005	4,89X10 ⁻⁷	+/?	Geenidevaheline (<i>Al353664.1</i> RNA geen)
9	rs188926905 (87581843)	T	0,252 (0,051)	0,295 (0,071)	2,94X10 ⁻⁵	0,258 (0,136)	0,057	0,184 (0,087)	0,034	8,02X10 ⁻⁷	+/+	<i>Ntrk2</i> intronis
2	rs6721128 (62643423)	A	-0,092 (0,019)	-0,142 (0,026)	7,43X10 ⁻⁸	-0,076 (0,048)	0,112	-0,028 (0,032)	0,372	8,24X10 ⁻⁷	-/-	Geenidevaheline (<i>Tmem17</i>)
2	rs13412212 (62662704)	G	0,084 (0,017)	-0,135 (0,024)	3,19X10 ⁻⁸	-0,047 (0,044)	0,286	-0,031 (0,028)	0,266	9,47X10 ⁻⁷	-/-	Geenidevaheline (<i>Tmem17</i>)
2	rs7594757 (62656660)	C	0,084 (0,017)	-0,132 (0,025)	8,78X10 ⁻⁸	-0,048 (0,044)	0,279	-0,036 (0,028)	0,196	1,00X10 ⁻⁶	-/-	Geenidevaheline (<i>Tmem17</i>)
2	rs13382199 (62657636)	G	0,084 (0,017)	-0,136 (0,025)	2,88X10 ⁻⁸	-0,042 (0,044)	0,340	-0,032 (0,028)	0,251	1,00X10 ⁻⁶	-/-	Geenidevaheline (<i>Tmem17</i>)
8	rs137860564 (41155358)	T	0,332 (0,068)	0,405 (0,093)	1,30X10 ⁻⁵	0,519 (0,197)	0,008	0,153 (0,116)	0,185	1,18X10 ⁻⁶	+/+	<i>Sfrp1</i> intronis
2	rs7584248 (62657219)	C	-0,083 (0,017)	-0,137 (0,025)	2,75X10 ⁻⁸	-0,039 (0,044)	0,380	-0,031 (0,028)	0,266	1,27X10 ⁻⁶	-/-	Geenidevaheline (<i>Tmem17</i>)

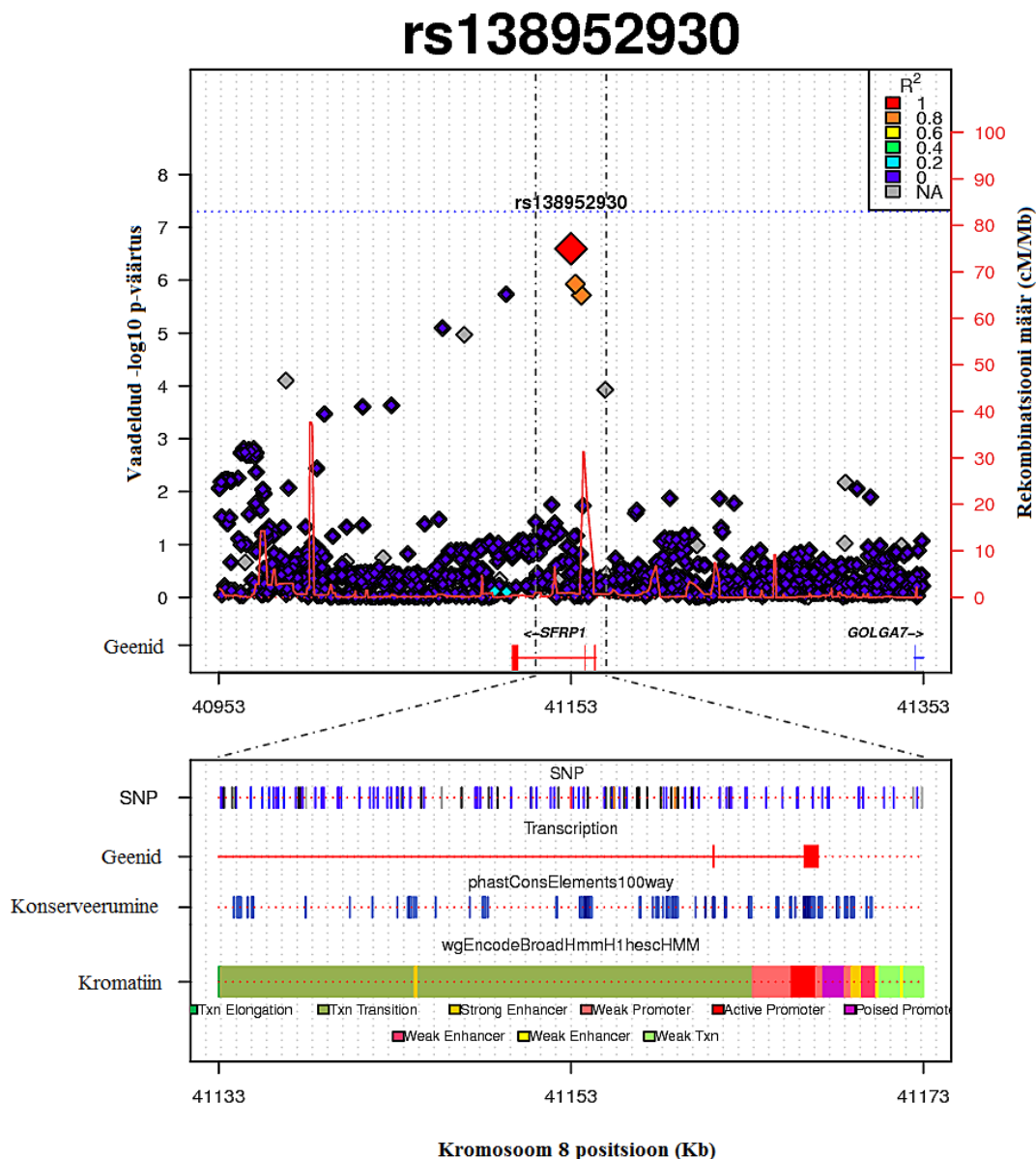
Krom- kromosoom; SNP- ühenukleotiidne polümorfism, Pos- positsioon (GRCh37.p13 *assembly*), SE- standardviga, β- efekt, P- p-väärtus. Kõik markerid va rs13412212 (otse genotüpiseeritud) on imputeeritud kvaliteediga > 0,8. SNP-de efekti suund metaanalüüsis on toodud vastavalt kõigi kolme kohordi kohta järgnevas järjekorras: HumanOmniExpress (Omni), Human370CNV (370CNV) ja HumanCoreExome-12v1.0 (CoreExome).

Metaanalüüsi parimad leiud tulid kromosoomidest 8, 10 ja 2. Tabelis 1 on välja toodud 10 kõige tugevama assotsatsiooniga markerit ja neid iseloomustavad statistikud nii metaanalüüsis kui ka kolmes eraldiseisva kohordiga tehtud GWAS-s, mille baasil metaanalüüs tehti. Tabelist ilmneb, et metaanalüüsi parimate markerite p-väärtused on üksikutes GWAS analüüsides kõige olulisemad HumanOmniExpress kiibiga genotüpiseeritud indiviidide analüüsis ($p < 10^{-5}$). Ülejäänud kahe kiibiga tehtud indiviidide analüüsis olid vastavad p-väärtused $> 0,005$. Metaanalüüsi kümne parima SNP hulka jäävad ka kolm kromosoom kahest pärit SNP-d, mis HumanOmniExpress kiibi kohordis ületasid statistilise olulisuse nivoo ($p \leq 5 \times 10^{-8}$). Teisest kromosoomist oli metaanalüüsis parima assotsatsiooniga geenidevaheline rs6721128:62643423:G:A ($p = 8,24 \times 10^{-7}$), mille geneetiline aheldatus ülejäänud nelja SNP-ga, mis tugevaimalt assortseerunud markeriga samas piirkonnas asetsevad, on vähene ($r^2 = 0,2-0,6$). rs6721128:62643423:G:A ja rs7584248:62657219:G:C omavaheline aheldatus on nõrk, r^2 näitaja on 0,39. rs6721128:62643423:G:A paikneb *Tmem17* geenist veelgi kaugemal (83933 ap) kui rs7584248:62657219:G:C (70137 ap) ja tema efektalleeli A seos une kestusega on samuti negatiivne (Joonis 8). 95% tõenäosusega jääb AA homosügootide keskmine une kestus vahemikku 7,81–7,89 tundi, ning GG homosügootide une kestus vahemikku 7,95–8,11 tundi ehk une kestuste keskväärtused erinevad üksteisest 10,8 minuti võrra.



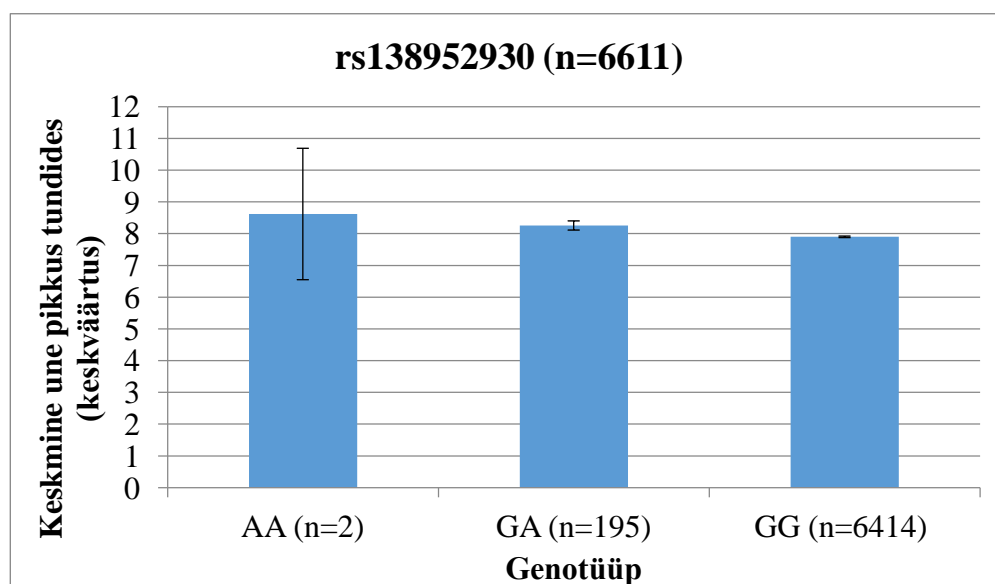
Joonis 8. rs6721128:62643423:G:A mõju une kestusele. Imputeeritud SNP genotüüp õnnestus tuvastada 87,1% valimist. Y-teljel on nädala keskmise une kestuse keskväärtus ning X-teljel erinevate genotüüpidega indiviidid. Tulpadel on tähistatud 95% usaldusintervallid.

Nädala keskmise une pikkusega kõige tugevamini seotud ja kõige suuremat efekti omav ühenukleotiidne polümorfism rs138952930:41152921:A:G asub 8. kromosoomi lühikeses õlas (8p11.21), *Sfrp1* (*secreted frizzled-related protein 1*) geeni intronis (Joonis 9).



Joonis 9. **Metaanalüüsi parima markeri regionaal skeem.** Joonise ülemisel paneelil on punasega tähistatud marker ja temaga lähestikku olevad SNP-d. R^2 väärtus iseloomustab rs138952903 paariviisilist aheldatust ülejäänud markeritega. Punase joonega on välja toodud kahe lookuse vaheline rekombineerumise tõenäosus (rekombinatsiooni määr). SNP jääb *Sfrp1* geeni intronisse. Joonise alumine osa on 10 kordne suurendus huvipakkuvasse piirkonda. Esimesel ja teisel rajal on vastavalt kõik piirkonda jäänud SNP-d ja geenid. Kolmandal rajal on sinisega tähistatud konserveerunud alad, mis on leitud *PhastCons* meetodi abil 100 erineva selgroogse organismi võrdlemisel. Viimasel rajal on Broad/MGH ENCODE grupi poolt genereeritud andmete põhjal iseloomustatud kromatiini võimalikku olekut antud piirkonnas inimese embrüonaalsetes tüvirakkudes. Antud SNP asub transkriptsioonilise transitsiooni alas, mis võib tähendada SNP regulatiivset rolli.

Leitud SNP imputatsioonikvaliteet on parim kõigist huvipakkuvatest polümorfismidest. Geneetiline aheldatus teise, kümne parima markeri hulka kuuluva, 8. kromosoomist pärit SNP-ga, on 0,8. Mõlema efektalleeli mõju uuritavale fenotüübile on samasuunaline (Tabel 1, lk 36). HumanOmniExpress kiibiga genotüpiseeritute valimis läbiviidud konditsionaalne analüüs kinnitas parima markeri iseseisvat mõju uuritavale tunnusele, sest analüüsi järgselt muutus ka geneetilises aheldatuses oleva SNP p-väärtus ebaoluliseks ($p = 0,82$). Seega keskenduti tulemustes rs138952930:41152921:A:G mõju uurimisele une kestusele. Polümorfismi rs138952930:41152921:A:G efektalleeliks on minoorne A alleel, sagedusega 0,016. Sagedus on kooskõlas 1000 Genoomi Projekti Faas 1 Euroopa alampopulatsioonis esineva alleelisagedusega. Huvitav on see, et näib nagu A alleel esinekski ainult Euroopa ja Ameerika populatsioonides²⁰. Polümorfismil on une kestusega positiivne korrelatsioon. A alleeli efekti suurus une kestusele on 0,350 (standardviga = 0,068). Alleeli hulga suurenemisega pikeneb keskmine une kestus, kuid kuna AA homosügoote oli valimis ainult 2 indiviidi, siis kattuvad 95% usaldusintervallid teiste genotüüpide usaldusintervallidega. Heterosügotide ja GG homosügotide puhul on aga uuritava tunnuse väärtused omavahel eristatavad. GA genotüübiga indiviidide keskmine une kestus jääb 95% tõenäosusega vahemikku 8,12–8,40 ja GG indiviidide keskmine une kestus vahemikku 7,88–7,93 tundi ehk keskmise une kestuse keskväärtused erinevad neil genotüüpidel 21,6 minuti võrra (Joonis 10).



Joonis 10. rs138952930:41152921:A:G mõju une kestusele. Imputeeritud SNP genotüüp õnnestus tuvastada 99,1% valimist. Y-teljel on nädala keskmise une kestuse keskväärtus ning X-teljel erinevate genotüüpidega indiviidid. Tulpadel on tähistatud 95% usaldusintervallid.

²⁰http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=8:41294902-41295902;v=rs138952930;vdb=variation;vf=30291402

Hetkeseisuga ei ole GWAS kataloogis avaldatud ühtegi tööd, mis *Sfrp1* geenipiirkonnas leitud polümorfisme oleks detekteerinud²¹. Sekreteeritav *frizzled* sarnane valk 1 kuulub transmembraansete valkude perekonda. Need valgud sisaldavad tsüsteiinirikast domääni, mis on homoloogne *frizzled* valkude wnt seostumissaidiga ja funktsioneerivad wnt signaaliraja modulaatoritena. Üldiselt on nad olulised signaaliraja blokeerimisel. Nad omavad funktsiooni mitmetes protsessides nt raku polaarsus, raku saatuse määramine ja rakkude ebanormaalne transformatsioon (Finch jt., 1997). Just viimase nimetatud funktsiooni tõttu on *Sfrp1* geeni seostatud erinevate organhäirete ja tumorigeensete protsessidega (Chen jt., 2014, Gauger jt., 2014). SFRP1 valku on lokaliseeritud erinevatest kudedest, eelkõige seedesüsteemist, testistest ja rinnakoest²². *Sfrp1* geeni ekspressiooni allareguleerimine rinnakoes omab rolli rinnavähi kujunemisel. *Sfrp1*^{-/-} hiirte rinnanäärmetes on wnt signalisatsioon tugevnenud, mis tähendab, et rakujagunemine suureneb ja apoptoos väheneb (Gauger jt., 2014). Üheks rinnakasvajate arengut mõjutavaks faktoriks on ka ülekaal, mille kaudseks põhjuseks võib olla plasma adipokiinide häiritus (Delort jt., 2015). Gauger jt., uurimisgrupp on leidnud, et *Sfrp1*^{-/-} hiirtele kõrge kalorlusega toidu manustamisel suureneb nende kehamass ja rasvaprotsent ning kasvab adipotsüütide hulk. Lisaks kõrgenevad neil paastumisjärgse glükoosi tasemed (Gauger jt., 2013). Seoses tumorigeneesiga sarananevad nende hiirte rinnanäärmete epiteelirakkude kasv ja omadused rinnavähi rakkudele (Gauger jt., 2014). Samas on nii ülekaal (Gutierrez-Repiso jt., 2014) kui ka kasvajalised protsessid (Hurley jt., 2015) seotud ööune pikkusega. On vägagi võimalik, et *Sfrp1* geen võib olla üheks uueks siduvaks faktoriks ööpäevaste rütmide ja ülekaalu, kardiometaboolsete haiguste ning kasvajaliste protsesside vahel. Sellise hüpoteesi tõestamine vajaks aga edasisi funktsionaalseid uuringuid.

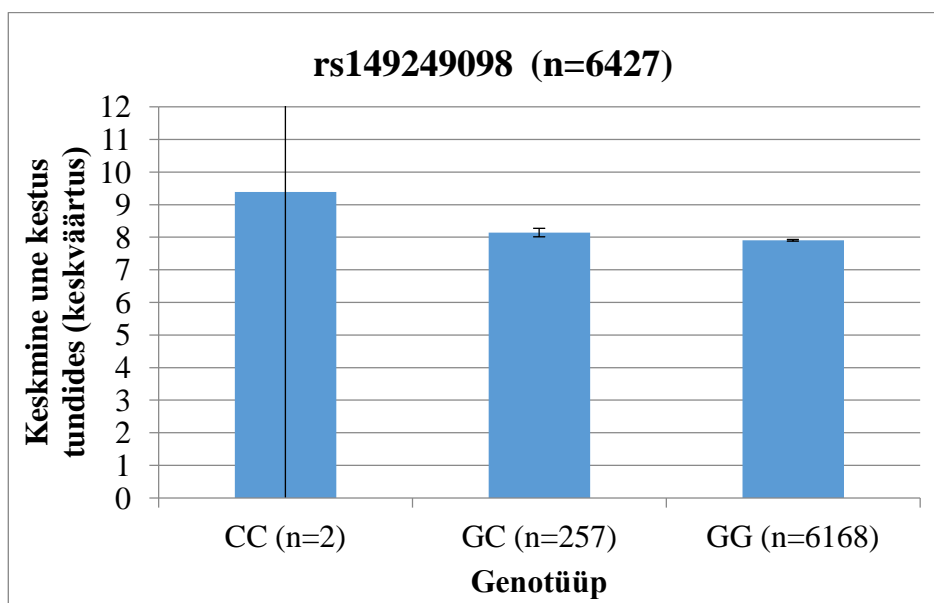
Järgnevalt eristusid metaanalüüsis kaks aheldunud ($r^2 = 0,8$) SNP-d kümnenda kromosoomi pikast õlast (10q26.12), geenidevahelisest alast: rs149249098:121941785:G:C ja rs138907357:121987255:G:T (Tabel 1, lk 36). Pärast konditsionaalse assotsatsioonianalüüsi läbiviimist 10. kromosoomist leitud parima markeri suhtes HumanOmniExpress genotüpiseerimiskiibi valimis, kaotasid mõlemad nimetatud markerid statistilise olulisuse. rs149249098:121941785:G:C-le lähim geen on 58047 ap allavoolu jääv uus miRNA geen AL353664.1, mis funktsioneerib geeniekspressiooni post-transkriptsioonilises regulatsioonis²³. Polümorfismi ja keskmise une kestuse vahel on positiivne seos. Efekti omab

²¹<http://www.genome.gov/gwastudies/index.cfm?pageid=26525384#searchForm>

²²<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000104332-SFRP1/tissue>

²³http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/SecondaryStructure?g=ENSG00000221402;r=10:120124132-120124226;t=ENST00000408475

C alleel, mis on ühtlasi ka minoorne alleel, sagedusega 0,02. Alleelisagedus on sama ka 1000 Genoomi Projekti Faas 1 Euroopa alapopulatsiooni hulgas. Ka selle SNP puhul paistab C alleel olevat levinud ainult Eurooplaste ja Ameeriklaste seas²⁴. C alleelidoosi kasvades pikeneb une kestus. C alleeli väikese sageduse tõttu identifitseeriti taaskord CC homosügootide ainult kaks ja seega on veapiirid keskmise une kestuse määramisel ülisuured. Samas aga tuleb C alleeli mõju nähtavale ka ainult heterosügootide ja GG homosügootide võrdlemisel. Heterosügootide une kestus jääb 95% tõenäosusega vahemikku 8,00–8,27 ning homosügootidel vahemikku 7,88–7,93 tundi, mis tähendab, et usaldusintervallid ei kattu ja keskmise une kestuste keskväärtused erinevad 14,4 minuti võrra (Joonis 11).



Joonis 11. **rs149249098:121941785:G:C mõju une kestusele.** Imputeeritud SNP genotüüp õnnestus tuvastada 96,4% valimist. Y-teljel on nädala keskmise une kestuse keskväärtus ning X-teljel erinevate genotüüpidega individidid. Tulpadel on tähistatud 95% usaldusintervallid.

Kromosoomist 9 pärinev rs188926905:87581843:C:T ($p = 8,02 \times 10^{-7}$) oli samuti meetaanalüüsi parimate tulemuste hulgas (Tabel 1, lk 36). SNP paikneb *Ntrk2* (*Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2*) geeni intronis. *Ntrk2* on türosiini kinaas, mis fosforüüleb ennast ja teisi MAPK signaaliraja komponente ja seeläbi on oluline rakkude diferentseerumises. SNP kohta ei olnud võimalik teostada regionaal skeemi, kuna vastavad tarkvarad kasutavad vanemaid referentspaneele ja ei sisalda oma andmetes leitud markerit. See võib olla ka põhjuseks, miks SNP-d eelnevates une kestust analüüsivates uuringutes välja toodud ei ole. Markerit minoorne alleel T on uuritava tunnusega positiivses seoses (efekt = 0,252). Markerit lähedusse jääb veel 5 SNP-d. Me ei tea nende omavahelist geneetilist aheldatust, kuid HumanOmniExpress kiibiga läbi viidud konditsionaalse analüüsi järgselt

²⁴http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=10:120181773-120182773;v=rs149249098;vdb=variation;vf=39264923

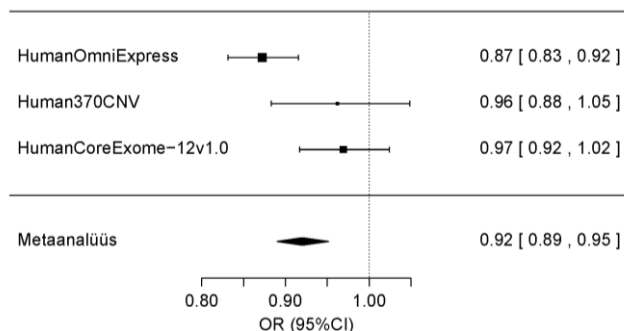
kaotasid need 5 markerit statistilise olulisuse. Polümorfismi muudab huvitavaks *Ntrk2* geen, milles olevaid mutatsioone on seostatud ülekaalulisuse ja meeleoluhäiretega²⁵. Geenist ülesvoolu jäävat SNP-d on kaksikute kohordis seostatud madala sünnikaaluga, mis omakorda on riskifaktoriks T2D, kardiovaskulaarhaiguste, kõrge vererõhu ja ülekaalu kujunemisel hilisemas elus (Metrustry jt., 2014). Lisaks on MAPK signaalirajast ka teisi genee une kestusega seostatud (Ollila jt., 2012).

Kromosoomidest 2, 8 ja 10 tuvastatud polümorfismide kohta on tehtud ka *Forest plot* skeemid, mis peegeldavad eri kohortide osatähtsust metaanalüüsis (Joonis 12). On näha, et iga SNP puhul on kõikides kohortides assotsatsioon samasuunaline, kuid HumanOmniExpress genotüpiseerimiskiibi kohort omab suurimat kaalu. Põhjuseks on tõsiasi, et mainitud kiibi katvus ja seega ka imputatsioonikvaliteet on kõige paremad. Sellest lähtudes toimus ka HumanOmniExpress kiibiga kattes olevate indiviidide ja sugulaste eemaldamine just teiselt kahelt kiibilt. See omakorda vähendas teistes kohortides valimit.

²⁵ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4915>

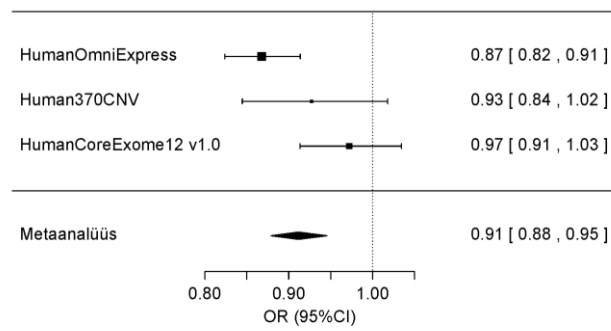
A Kromosoom 2

rs7584248:62657219:G:C
 Assotsiatsiooni p-väärtus= 1.10312064141881e-06
 Heterogeensuse p-väärtus= 0.0103257305248625



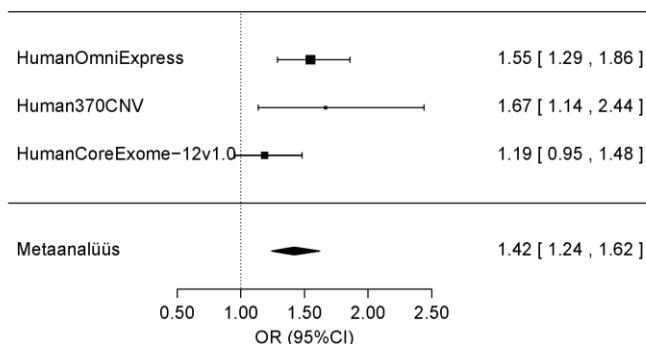
B Kromosoom 2

rs6721128:62643423:G:A
 Assotsiatsiooni p-väärtus= 7.21260741869724e-07
 Heterogeensuse p-väärtus= 0.0211940054615819



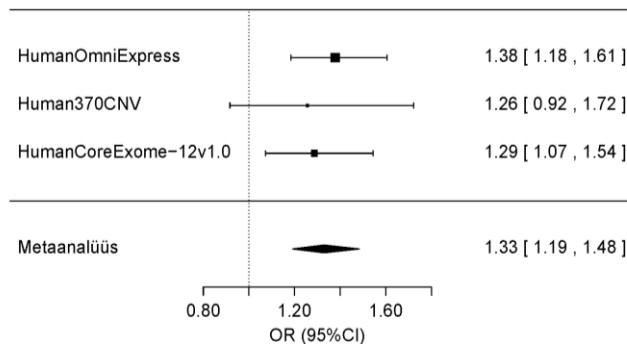
C Kromosoom 8

rs138952930:41152921:G:A
 Assotsiatsiooni p-väärtus= 2.24614954179583e-07
 Heterogeensuse p-väärtus= 0.133151370043969



D Kromosoom 10

rs149249098:121941785:G:C
 Assotsiatsiooni p-väärtus= 3.44993187504939e-07
 Heterogeensuse p-väärtus= 0.79375815164919



Joonis 12. Metaanalüüsi parimate leidude *Forest plot*-id. A ja B paneelidel on leiud 2. kromosoomist, C ja D paneelidel leiud vastavalt 8. ja 10. kromosoomist. Iga kohordi kohta käiv musta kasti suurus on proportsionaalne kaaluga, mis kohort metaanalüüsi andis. OR-šansside suhe. CI- usaldusintervallid. Punktiirjoonega on tähistatud efekti puudumine.

Käesolevas töös teostatud individuaalsetest GWAS analüüsides assotseerus statistiliselt oluliselt une kestusega rs7584248:62657219:G:C ning analüüse ühendavast metaanalüüsist osutus huvipakkuvaks rs138952930:41152921:A:G. Hetke teadmiste põhjal ei ole võimalik kummagi polümorfismi otsest mõju une füsioloogiale veenvalt seletada, sest polümorfismidega seotud geenide *Tmem17* ja *Sfrp1* produktid on inimorganismis väga laia lokaliseerimisega, olles esindatud pea kõigis organsüsteemides. Samas on katseid, mis näitavad, et *Sfrp1* geen mõjutab näriliste metabolismi ja tumorigeneesi (Gauger jt., 2014, Gauger jt., 2013). Mõlemad protsessid on mõjutatud ka une regulatsioonist (Hurley jt., 2015, Gutierrez-Repiso jt., 2014). Lisaks asub rs138952930:41152921:A:G *Sfrp1* geeni intronis, võimaliku transkriptsioonilise transitsiooni alas. Mainitu põhjal pälviks geen edasist tähelepanu.

Läbiviidud metaanalüüs on üks suuremaid une kestust uurivatest GWAS analüüsides, mis hetkel teostatud on. Käesoleva uuringu tugevuseks võib pidada asjaolu, et kõigil osalenud indiviididel on fenotüübiandmed kogutud ühesuguse meetodika järgi ning kõik GWAS analüüsid on teostatud samu meetodeid ja parameetreid kasutades. Andmete aga ka analüüside ühesus on eriti olulised sellise subjektiivse tunnuse uurimisel, nagu une pikkus. Antud uuringust suurema valimiga on ainult üks, eelmisel aastal avaldatud 18. kohordi põhine metaanalüüs, kus osales ~ 47 000 indiviidi. Metaanalüüsis oli kohortide piires une kestuse määramiseks kasutatud erinevaid meetodeid, mis ilmselt muudab fenotüüpi heterogeensemaks. Siiski leiti une kestuse ja türoidspetsiifilise transkriptsioonifaktori *Pax8* läheduses oleva polümorfismi omavaheline assotsatsioon (Gottlieb jt., 2014). Olenemata käesoleva magistr töö valimi suurusest (N = 6668) ei tuvastanud meie eestlaste populatsioonis olulisi efekte varem teadaolevatest spekulatiivsetest une kestust mõjutavatest piirkondadest.

Esimesed kaks une füsioloogiat uurivat GWAS analüüsi ei leidnud statistiliselt olulisi seoseid une kestusega (Byrne jt., 2013, Gottlieb jt., 2007). Byrne jt., avastas küll *Cacna1C* geeni intronis oleva polümorfismi, mida samal aastal ka replitseeriti (Parsons jt., 2013), aga mainitud geeni seostatakse pigem une homöostaasiga. Samas lisab replikatsioon tõendeid, et kaltsiumikanalid mängivad une regulatsioonis olulist rolli. Esimene geen, mille assotsiatsiooni usutavalt une kestusega kirjeldati, on ATP-sõltuva kaaliumikanali geen *Abcc9* (Allebrandt jt., 2013). Allebrandt jt., metaanalüüsis osales ka Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu kohort ning see analüüs on ka ainuke, kus uuritava tunnuse määramiseks kasutatakse MCTQ uneküsimustikku.

Eelpool mainitud GWAS analüüsid on kirjeldanud küll piirkondi teisest ja kaheksandast kromosoomist, kuid magistr töö tuvastatud polümorfismid jäävad neist lookustest vägagi kaugemale. Siiski ei tohiks käesoleva uuringu usaldusväärust kahtluse alla seada. Kasutasime küll sarnaseid metaanalüüsi läbiviimise meetodeid (kovariaadid, genomikontroll, *inverse variance-weighted method*), mis varasemates publitseeritud töödes (Gottlieb jt., 2014, Ollila jt., 2014, Allebrandt jt., 2013), kuid eri uuringute p-väärtusi on siiski raske võrrelda, sest selektsioonikriteeriumid ei ole alati ühesed. Kõikide ülegenoomsete assotsiatsiooniuuringute puhul on uneparameetrid saadud subjektiivsete küsimustikkude alusel ning välja on jäetud ekstreemsete näitajatega indiviidid, kuid tulem võib olla siiski erinev. Käesolevas töös kasutati uuritava tunnuseks nädala keskmist une kestust, kuid Byrne jt., 2013 ning Gottlieb jt., 2014 tööd kasutasid töönädala keskmist une kestust. Töönädala uneparameetrite kasutamise põhjenduseks toodi fakt, et Gottlieb jt., metaanalüüsi ühes kohordis läbiviidud pärilikkuse uuring (N = 2388) tuvastas, et nädalavahetuse une kestus on

poole võrra väiksema pärilikkusega (12,3%), kui nädala tööpäevade une kestus (23,6%) (Gottlieb jt., 2014). Magistritöös lähuti aga teadmised, et nädalavahetustel on inimesed võrdlemisi vähem mõjutatud sotsiaalsetest kohustustest, mis tähendab, et unetsükkel saab enam järgida bioloogilist eelistust (Roenneberg jt., 2003).

Teiseks põhjuseks, miks analüüsid omavahel kattuvaid tulemusi ei anna, võib olla tulemuste filtreerimine imputatsioonikvaliteeti iseloomustava parameetri alusel. Läbiviidud metaanalüüsi võeti kvaliteedi tagamise eesmärgil markerid, mille imputatsiooni info oli $\geq 0,8$. Näitaja on tunduvalt kõrgem kui nt Allebrandt jt., 2013 uuringus ($\geq 0,3$). Sellel põhjusel võisid meie metaanalüüsist kaduma minna nii Byrne jt., 2013 kui Parsons jt., 2013 uuringutes tuvastatud SNP-d *Cacna1C* geenist ja Allebrandt jt., 2013 artiklis leitud SNP-d *Abcc9* geenist. Meie metaanalüüsi markerite hulgas olid küll soomlaste kohortides tuvastatud *Trib1* (Ollila jt., 2012), *Ptpru* ja *Klf6* (Ollila jt., 2014) ning Gottlieb jt., 2014 töös tuvastatud *Pax8* geenide vahetusläheduses olevad SNP-d, kuid nende p-väärtused olid antud uuringus suuremad kui 0,001.

GWAS analüüsid avalikustavad alati huvitavaid seosed uuritava tunnuse ja polümorfismide vahel, kuid need seosed on puhtalt statistilised. Assotsatsioonide taga olevate molekulaarsete protsesside kirjeldamiseks ja seoste põhjuslikkuste leidmiseks on vaja täiendavaid analüüse (Dermitzakis, 2012). Üheks võimaluseks on eQTL analüüsid (*expression quantitative trait loci*), mis võimaldavad mittekodeerivas alas olevate geenivariantide reguleerivaid funktsioone uurida. Sellist võimalust kasutati Ollila jt., uuringus, kus RNA ekspressiooni taseme mõõtmine näitas polümorfismi minoorse alleeli assotsiatsiooni *Klf6* geeniekspressiooni tõusuga, mis omakorda oli seotud lühema une kestusega (Ollila jt., 2014). Teiseks võimaluseks, kui polümorfism on geenipiirkonna sees, oleks teostada funktsionaalseid katseid mudelorganismidega. Allebrandt jt., artikli leiu seost une kestusega kinnitati homoloogse geeni vaigistamisega *Drosophila* RNA interferentsi kasutades (Allebrandt jt., 2013). Nimetatud variandid on ühtedeks võimalusteks, kuidas antud magistritöös tuvastatud ühenukleotiidsed muutused otseselt mõju nädala keskmisele une kestusele täpsemalt hinnata. Tulemuste täpsemaks seostamiseks metabolismiradadega oleks kasulik esmalt analüüsi võimsuse tõstmiseks suurendada metaanalüüsi indiviidide hulka (Ball, 2013) ja seejärel identifitseerida ka geenivõrgustikke, milles uuringust leitud polümorfisme sisaldavad geenid esindatud on.

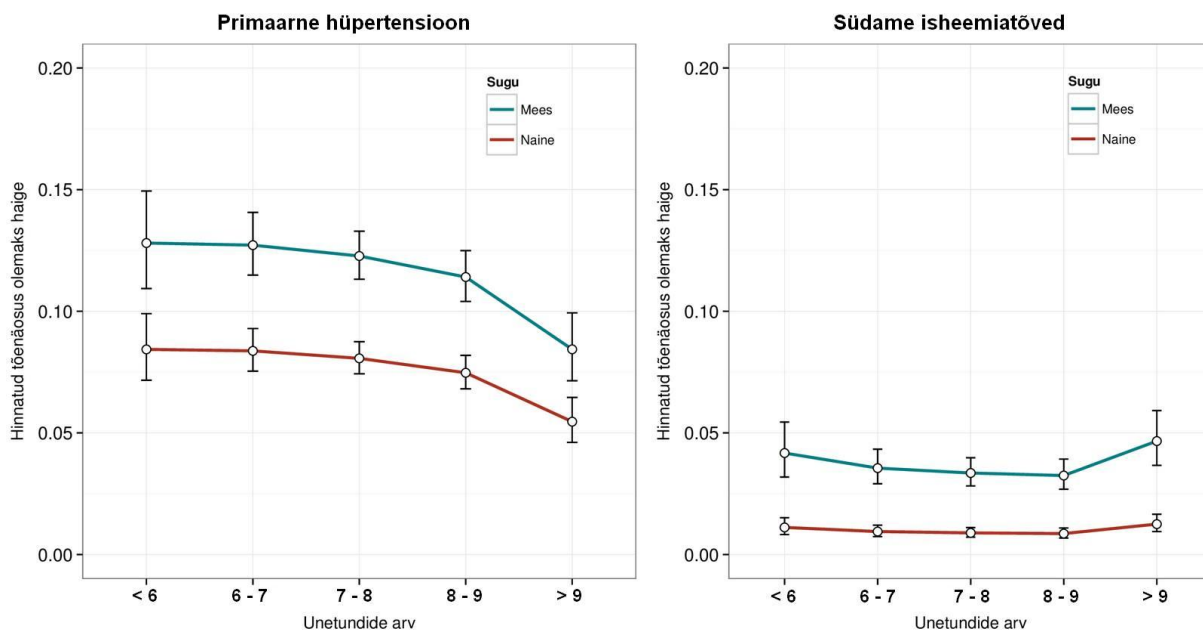
2.3.2. Une pikkuse ja haiguste vahelised trendid

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu suures uneandmete kohordis (N = 27 010) on une kestus normaaljaotusega. Levinuimaks nädala keskmiseks une kestuseks on 7–8 tundi (36,4% doonoritest, arvestades, et nädalas on 2 puhkepäeva)²⁶. Samas kohordis on 44,7% normaalkaalus olevaid inimesi (KMI = 19–24,9 kg/m²), 31,7% ülekaalulisi ja 19,6% rasvunud inimesi (KMI > 30 kg/m²). On teada, et KMI ja une kestus on omavahelises sõltuvuses (Watson jt., 2010) ning ülekaal on riskitegur südame- ja veresoonkonna ning metaboolsete haiguste kujunemisel (Sepahvand jt., 2015). Lisaks arvatakse, et ekstreemselt pikad ja lühikesed une kestused on seotud põletikueelsete seisundite tekkimistega, mis omakorda tõstavad kardiometaboolsete haiguste riski (Grandner jt., 2013b). Nendele teadmistele tuginedes uuritigi antud magistritöö käigus une kestuse ja erinevate kardiometaboolsete haiguste esinemiste vahelisi trende. Lisaks huvituti ka une kestuse ning psühhiaatriliste ning meeleoluhäirete omavahelistest seostest, kuna varasemad uuringud on tõendanud, et tsirkadiaanne regulatsioon mõjutab mainitud seisundeid (Soria jt., 2010, Kripke jt., 2009). Kõikide haigusi prognoosivate mudelite väljundid on nähtaval lisa 8.

Primaarse hüpertensiooni (I10) põdejaid oli 21 068 indiviidi (vanus 25–75) hulgas 2596 ning südame isheemiatõvede (I20–I25) põdejaid 995. Mõlemat haigust prognoosivas mudelis on kovariaatideks vanus, sugu, KMI ning vanuse ja soo vaheline koosmõju. Joonisel 13 toodud graafikud peegeldavad valimi keskmise KMI (26,6) ja vanusega (46,9) naiste ning meeste tõenäosust olla haige erinevate une kestuste korral. Samade une kestuste, vanuste ja kehamassiindeksite korral on mudelite järgi naistel 85,6% väiksem šanss põdeda primaarset hüpertensiooni ning 93,6% väiksem šanss põdeda südame isheemiatõvesid kui meestel. Mainitud protsendid tunduvad pealtnäha suured, kuid ühe konkreetse naise ja mehe kohta haiguse tõenäosust arvutades vahe nii suur ei tuleks. Näiteks on 35 aastasel naisel (AvSD = 7–8, KMI = 25) tõenäosus olla hüpertensiooni haige 3,5%, ning samade parameetritega mehel on see tõenäosus 7,8%. Üldiselt on graafikutelt näha, et mõlema haigusseisundi puhul une kestuse lühenemisega kasvab šanss olla haige. Naistel on graafikute tõusud lamedamad kui meestel. Siin võib rolli mängida vanuse ja soo koosmõju. Näiteks on mudeli järgi aasta vanemal mehel 3% suurem šanss, kuid aasta vanema naisel 6% suurem šanss põdeda primaarset hüpertensiooni (eeldusel, et une kestus ja KMI on võrreldavatel isikutel samad). Mainitud koosmõju tuleneb aga arvatavasti meie valimi koosseisust ja tuleks paremini esile, kui graafikul oleks une kestuse asemel vanus. Viimane ei olnud aga antud töö eesmärk. Ka

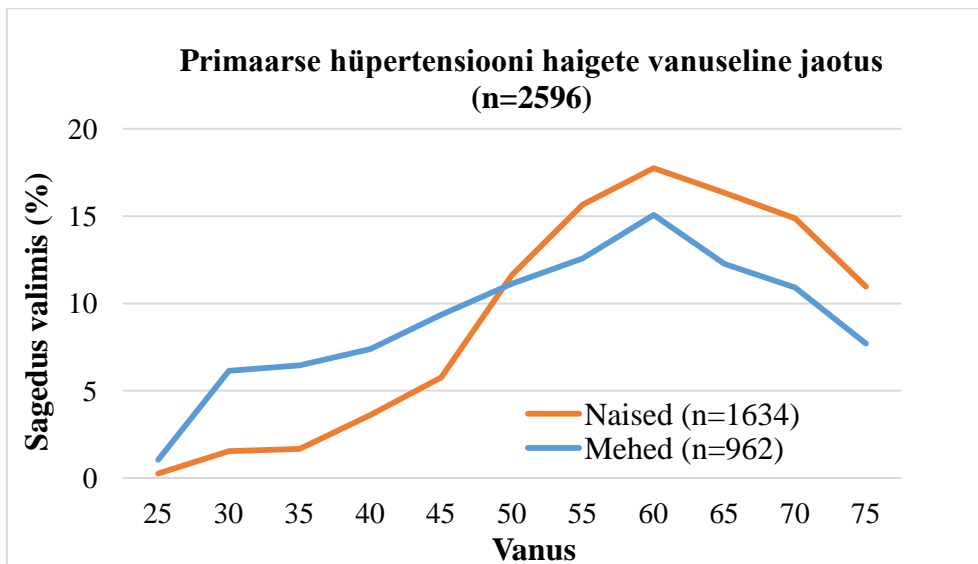
²⁶ http://www.tymri.ut.ee/sites/default/files/www_ut/bak2013_jaanika_moro.pdf

joonis 14 illustreerib seda, et primaarse hüpertensiooni valimis on alates 50ndast eluaastast haigete naiste sagedus suurem kui haigete meeste. Südame isheemiatõve puhul meenutab meestel une kestuse ja haiguse esinemise tõenäosuse vaheline seos kergelt U- kuju (Joonis 13). Ühesuguse soo, vanuse ja KMI korral on haige olemise tõenäosus suurim väga lühikese (OR = 1,26; 95% CI: 0,96–1,63) ja väga pika (OR = 1,41; 95% CI: 1,11–1,78) unega indiviididel, võrreldes normaalse unega indiviididega.



Primaarne hüpertensioon				Südame isheemiatõved			
Une grupp (referents: 7-8 h)	OR	2,5%	97,5%	Une grupp (referents: 7-8 h)	OR	2,5%	97,5%
<6 h	1,05	0,87	1,25	<6 h	1,26	0,96	1,63
6-7 h	1,04	0,92	1,17	6-7 h	1,06	0,88	1,28
8-9 h	0,92	0,83	1,03	8-9 h	0,97	0,81	1,16
>9 h	0,66	0,55	0,79	>9 h	1,41	1,11	1,78

Joonis 13. Une kestuse ja südame-veresoonkonna haiguste esinemiste vahelised trendid. Joonis kirjeldab primaarse hüpertensiooni ja südame isheemiatõvede esinemiste tõenäosust Eesti Geenivaramu 21 068 indiviidiga valimis (vanus 25–75) sõltuvalt une kestuse klassist. Tõenäosused on hinnatud logistilise regressiooni meetodil antud valimi keskmise KMI (26,6 kg/m²) ja vanusega (46,9 aastat) isikutele. X-teljel on une kestus ja Y-teljel tõenäosus olla haiguse põdeja. Joonisele on lisatud 95% usaldusintervallid. Tabeli osas on erinevate unegruppide ja 7–8 tunnise grupi vahelised šansside suhted (OR) haiguste esinemistele tingimustel, et võrreldakse teiste mudelis olevate parameetrite suhtes samade näitajatega indiviide.



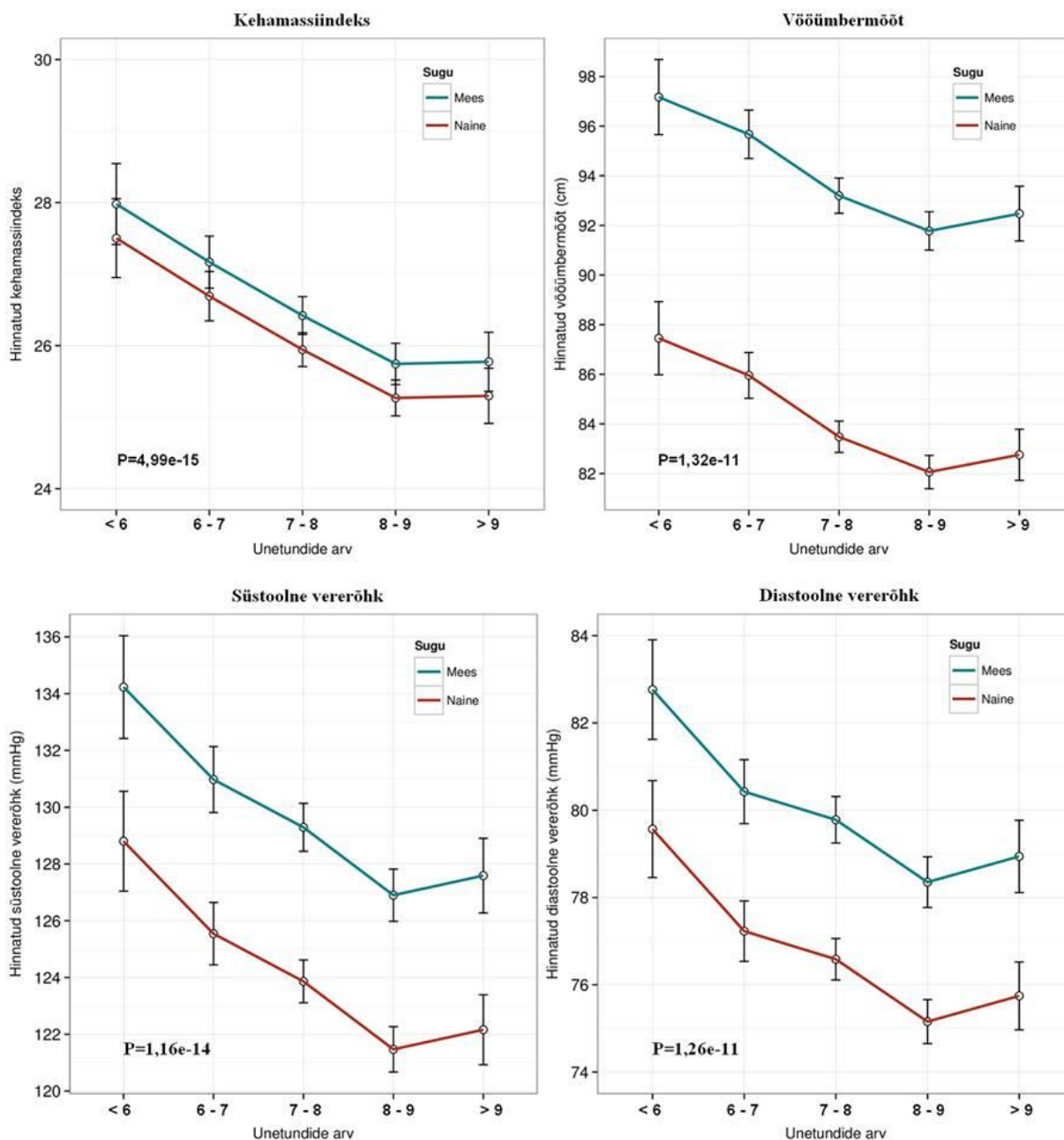
Joonis 14. **Primaarse hüpertensiooni põdejate vanuseline jaotus valimis.** Graafikul on erinevates vanusegruppides olevate haigete meeste ja naiste sagedusjaotus.

Paljud uuringud on samuti tõendanud, et ebapiisav uni aga ka unehäired, eelkõige une apnoe ja insomnia, on seotud kõrgema hüpertensiooni riskiga (Calhoun ja Harding, 2010). Populatsioonipõhised prospektiivsed analüüsid on teinud sarnaseid järeldusi, kuid tulemused on sooliste järelduste tegemisel olnud konfliktised. Subjektiivsete küsimustike põhjal on alla viie tunnist unekestust seostatud 60% võrra kõrgema hüpertensiooni riskiga keskealistel (32–59 aastat) ameeriklastel (korrigeeritud etnilise tausta suhtes), kuid mitte vanematel. Seos jäi püsima ka pärast kohandamist ülekaalulisuse ja diabeedi suhtes, mis tõendab, et une pikkusel on hüpertensiooni riskile iseseisev mõju (Gangwisch jt., 2006). Ka objektiivsetel andmetel põhinevad pikaajalised uuringud on leidnud, et lühike uni 50–60 aastastel on seotud kõrgema hüpertensiooni riskiga nii algselt tervetel meestel (OR = 2,27; 95% CI: 1,01–5,11) kui ka naistel (OR = 2,10; 95% CI: 1,08–4,09) (Jackowska ja Steptoe, 2015). Samas on avaldatud ka uuring, mis tuvastab seose ainult keskealistel naistel ning väidab, et efekt on suurim just menopausi eelsetel naistel (Stranges jt., 2010). Une kestus ja südame- veresoonekonna haigused on seotud, sest pikaajaline lühike uni ja ebaefektiivne uni mõjutavad süstoolse ja diastoolse vererõhu näidu suurenemist (Knutson jt., 2009). Ebapiisava une ja vererõhu kõrgenemise vaheline põhjus võib peituda sümpaatilises närvisüsteemis. Unehäiretega kaasneb epinefriini ja norepinefriini vabastamine sümpaatilistes närviteedes. See omakorda viib närvisüsteemi üleaktiivsioonini, mistõttu tõuseb pulss ja hingamissagedus. Selline konstantne aktivatsioon võib viia isheemia ning infarktini (Meerlo jt., 2008). Seejuures on leitud, et kardiovaskulaarsed näitajad (pulss, vererõhk) saavutavad maksimumi eelkõige varahommikul, mil ägenevad ka kardiovaskulaarsed haigused ja esineb enim infarkte (McLoughlin ja FitzGerald, 2013). Käesolevas töös kasutatud mudelite puhul on

hüpertensiooni ja isheemiliste südamehaiguste usaldusintervallide vahemikke arvestades ilmne, et tervislikkuse seisukohalt on optimaalseim 7–9 tunni pikkune uni. Alla 6 tunni pikkune uni on juba seotud suurema tõenäosusega põdeda hüpertensiooni (OR = 1,05; 95% CI: 0,87–1,25) ning üle 9 tunnine uni suurema tõenäosusega põdeda isheemilisi südamehaigusi (OR = 1,4; 95% CI: 1,11–1,78), võrreldes normaalse une kestusega.

Une puudus tõstab lisaks sümpaatilisele toonusele ka kortisooli taset ja võimendab põletikuprotsesse, häirib glükoosi metabolismi ning võib pikemas perspektiivis põhjustada ülekaalulisust ja metaboolseid häireid (Lam ja Ip, 2010). Järgevalt uuritigi magistritöös II tüüpi diabeedi (E11) ja metaboolse sündroomi esinemiste tõenäosuste seost une kestusega. II tüüpi diabeedi haigeid oli 21 068 indiviidi (vanus 25–75) hulgas 665. Metaboolne sündroom esines 956 inimesel (vanus 18–90) 6375 indiviidi suurusest alamvalimist, kellele oli tehtud plasma metaboliitide analüüs tuumamagnetresonants spektroskoopia meetodil. Mõlemat haigust prognoosivates mudelites on kovariaatideks vanus, sugu, KMI ning soo ja KMI vaheline koosmõju. Diabeedi puhul on kovariaadiks lisatud ka kronotüüp (MSFscn), mis kaotab statistilist olulisust, kui mudelisse KMI lisatakse, kuid jääb siiski oluliseks ($p = 0,01$). Kuna kronotüüp ise sõltub vanusest, soost (Roenneberg jt., 2004) ja KMI-st (Arora ja Taheri, 2015), siis on võimalik, et nimetatud parameetrid kirjeldavad juba enamiku haiguse ja une vahelisest seosest.

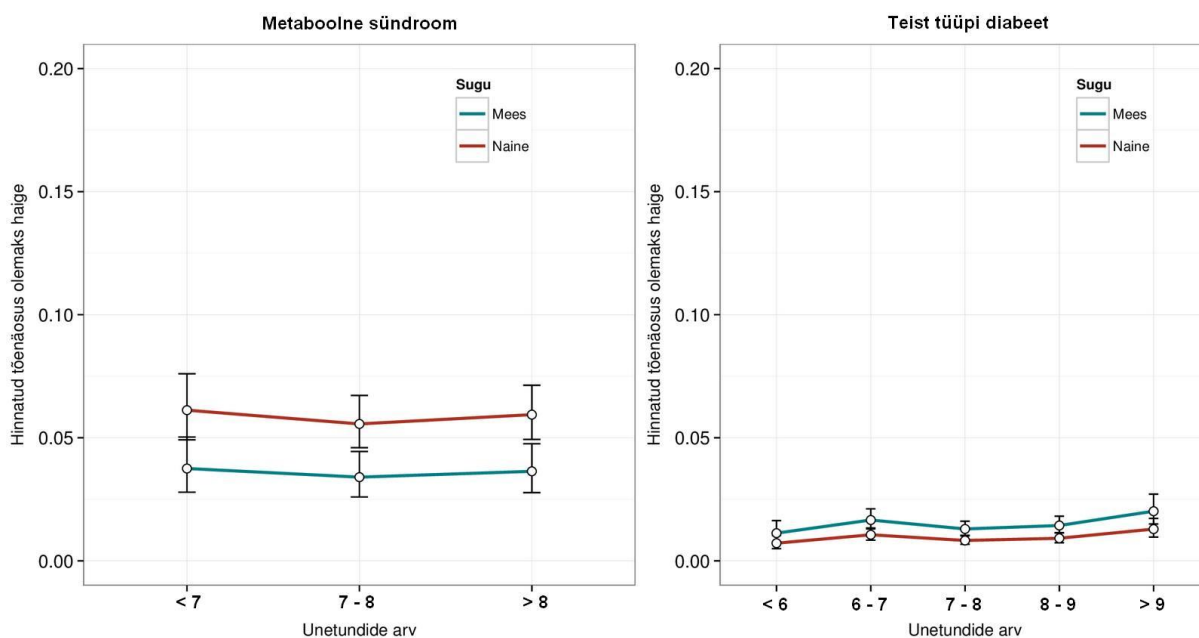
Metaboolse sündroomi puhul nähti, et haiguse vältimise seisukohalt on optimaalseim 7–8 tunnine uni. Seos ei olnud statistiliselt oluline, sest sama soo, vanuse ja KMI-ga indiviide võrreldes ei erinenud lühikese (<7) ega pika (>8) une puhul haiguse tõenäosuste šansside suhted oluliselt 1-st, võrreldes normaalse une kestusega (Joonis 16, lk 50). Tuleb aga arvestada, et MetS-i defineerimisel lähtuti mitmest erinevast kriteeriumist, mille puhul on meie valimis seos une kestusega olemas nii naistel kui meestel. Statistiliselt olulise tõenäosusega näeme, et ainuüksi une kestuse ja soo järgi saab hinnata indiviidi KMI-d ($p = 4,99 \times 10^{-15}$), vööümbermõõtu ($p = 1,32 \times 10^{-11}$), süstoolset vererõhku ($p = 1,16 \times 10^{-14}$) ja diastoolset vererõhku ($p = 1,26 \times 10^{-11}$). Seerumi triglütseriidid andsid nõrgema, kuid siiski ka olulise seose ($p = 0,0003$). Kõikidel juhtudel on selge, et näitaja hinnatakse väikseimaks indiviididel, kes kuuluvad 8–9 tunnisesse unegruppi. Mõlema soo puhul on < 6 tunni magavate indiviidide KMI 1,09 korda suurem kui 8–9 tundi magavate indiviidide KMI. Vööümbermõõdu puhul on samade näitajate vahe 1,06 kordne, süstoolse ning diastoolse vererõhu korral naistel 1,06 kordne ja meestel 1,05 kordne (Joonis 15).



Joonis 15. Une kestuse ja metaboolse sündroomi defineerimisel arvestatavate näitajate omavahelised seosed. Lineaarse regressiooni mudelid, mis kirjeldavad KMI, vööübermõõdu ning süstoolse- ja diastoolse vererõhu näitude sõltuvust une kestusest. Kasutatud on metaboolseid näitajaid omavatest indiviididest koosnevat alavalimit (N = 6375). X-teljel on une kestuse grupid ja Y-teljel parameetri hinnang. P on p-väärtus, mis näitab mudeli võimet keskmise une kestuse järgi parameetreid hinnata. Joonisel on 95% usaldusintervallid.

Varasemad uuringud on pigem kirjeldanud seoseid une kestuse ja MetS-i riskifaktorite (kehakaal, KMI, kardiovaskulaarsed funktsioonid) kui haiguse enda vahel. Wisconsin-i une kohordi (N = 1024) uuringus leiti, et 5 tundi magavate inimeste kehakaal oli 4–5% kõrgem kui 8 tundi magavatel inimestel, sest lühike uni on seotud leptiini hulga vähenemise (15,5% langus) ja greliini (14,9% tõus) hulga tõusmisega. Need kaks muutust koos stimuleerivadki isu (Taheri jt., 2004). Ka käesoleva töö KMI ja une kestuse mudeli põhjal (Joonis 15) võib

järeldada, et une lühenemine on seotud kõrgema kehakaaluga, sest sama soo korral on alla 6 tunni magavate indiviidide risk kõrgemaks kehamassiindeksiks palju suurem kui 8–9 tundi magavatel indiviididel (OR = 9,34; 95% CI: 5,18–16,85). Siiski on ka uuringuid, milles erinevalt käesolevast magistritööst, tuvastati une kestuse ja metaboolse sündroomi kujunemise riski vaheline statistiliselt oluline seos, kasutades populatsioonipõhist andmestikku. 1214 indiviidi hõlmav uuring leidis, et šanss haigestuda on lühikese ja pika unega indiviididel 45% suurem kui 7–8 tundi magavatel indiviididel. Lisaks kinnitab antud uuring ka meie nähtud seost une kestuse ja vistseraalse rasvumise vahel (Hall jt., 2008). Suuremas 4222 indiviidiga tehtud Korea uuringus leiti samuti, et suurim šanss haigestuda on neil, kes magavad alla 5 tunni (OR = 1,74, $p < 0,001$), kuid riskigrupis on ka üle 9 tunni magajad (OR = 1,69, $p = 0,006$) (Choi jt., 2008).



Metaboolne sündroom				II tüüpi diabeet			
Une grupp (referents: 7-8 h)	OR	2,5%	97,7%	Une grupp (referents: 7-8 h)	OR	2,5%	97,5%
<7	1,11	0,88	1,39	<6	0,87	0,60	1,23
>8	1,07	0,87	1,32	6-7	1,29	1,03	1,60
				8-9	1,11	0,89	1,38
				>9	1,57	1,78	2,07

Joonis 16. Une kestuse ja metaboolsete haiguste esinemiste vahelised trendid. Joonis kirjeldab metaboolse sündroomi esinemise tõenäosust Eesti Geenivaramu 6375 indiviidi valimis (vanus 18–103) ja II tüüpi diabeedi esinemise tõenäosust Eesti Geenivaramu 21 068 indiviidi valimis (vanus 25–75) sõltuvalt une pikkuse klassist. Tõenäosused on hinnatud logistilise regressiooni meetodil MetS valimi keskmise KMI ($26,0 \text{ kg/m}^2$) ja vanusega (44,7 aastat) isikutele ja T2D valimi keskmise KMI ($26,6 \text{ kg/m}^2$), vanuse (46,9 aastat) ja kronotüübiga (MSFscn = 3,5, korrigeeritud une keskaeg on kell 03.30) isikutele. Joonistel on

95% usaldusintervallid. Tabeli osas on erinevate unegruppide ja normaalse unekestusega grupi vahelised šansside suhted (OR) haiguste esinemistele tingimusel, et võrreldakse teiste mudelis olevate parameetrite suhtes samade näitajatega indiviide.

Indiviidid, kes põevad metaboolset sündroomi, omavad suurenenud riski haigestuda II tüüpi diabeeti ja kardiovaskulaarhaigustesse. Riskide suhe võib olla kardiovaskulaarhaiguse kujunemisel 2,88 (\pm 0,9) ning II tüüpi diabeedi kujunemisel lausa 6,92 (\pm 2,5) (Wilson jt., 2005). II tüüpi diabeedi ja une kestuse vahel leidis antud magistritöö samuti olulisi seoseid. Samade parameetritega (vanus, KMI, kronotüüp) mehi ja naisi võrreldes on igas unegrupis tõenäosus, et mees on haige, suurem kui tõenäosus, et naine on haige (Joonis 16). Kõige suurem hinnatud tõenäosus II tüüpi diabeediks, on neil meestel ja naistel, kelle uni on pikem kui 9 tundi. Sellisel juhul on sama soo, vanuse, KMI ja kronotüübiga indiviidil šansside suhe võrreldes normaalse une pikkusega indiviidiga 1,57 (95% CI: 1,78–2,07).

Varasemalt avaldatud tööd on samuti leidnud, et üle 9 tunnine une kestus assotseerub II tüüpi diabeeti haigestumise riskiga ja glükoosi talumatusega, kuid need samad uuringud on leidnud seose ka lühikese une puhul (Yaggi jt., 2006, Gottlieb jt., 2005). Meie töö valim on küll suurem kui mainitud kahe uuringu valimid, kuid siiski ei ilmne seos lühikese une ja T2D-ga. Samas seostati Yaggi jt., artiklis meestel < 5 tundi und kaks korda suurema tõenäosusega haigestuda diabeeti ning > 9 tundi und rohkem kui kolm korda suurema tõenäosusega haigestuda (Yaggi jt., 2006). Uuem, soomlaste artikkel avaldas tulemuse, kus T2D seos unega tuvastati ainult üle 9 tunnise une kestuse korral (Merikanto jt., 2012). Kajastatud tulemuste põhjal võiks arvata, et T2D puhul omab pikk uni rohkem rolli kui lühike uni. Mainitud seosega ei ühti aga suurema arvu indiviidide peal läbiviidud pikaajalised uuringud (10 aastat), millest ühe puhul (N = 70 026 naist) kaob pärast kohandamist KMI suhtes seos une kestuse ja T2D vahel (Ayas jt., 2003), kuid teise puhul leitakse positiivne seos T2D tekke ja lühikese ning pika une vahel (Gangwisch jt., 2007). Seejuures on viimasena mainitud uuringus saadud šansside suhe (OR = 1,55) sarnane meie mudelis leitud šansside suhtega (OR = 1,57), mis peegeldab normaalse ja > 9 tunnise unega inimeste tõenäosust olla diabeedihaige.

Antud magistritöös loodud kardiometaboolsete haiguste mudeleid on raske kirjanduses kajastatud uuringutega võrrelda, sest enamik neist on olnud prospektiivsed. Uuritud on keskeltläbi 4–10 aasta jooksul algselt tervetel indiviidide šanssi haigestuda (Jackowska ja Steptoe, 2015, Gangwisch jt., 2007). Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu kohort peegeldab läbilõiget eestlaste populatsioonist. Olemasolevate andmete põhjal näeme ainult seda, kas indiviid on haige või mitte, seega saame hinnata, milliste tingimuste korral on haige olemise tõenäosus suurim. Üldiselt näeme siiki, et ka eestlaste seas on liiga pikk ja liiga lühike une

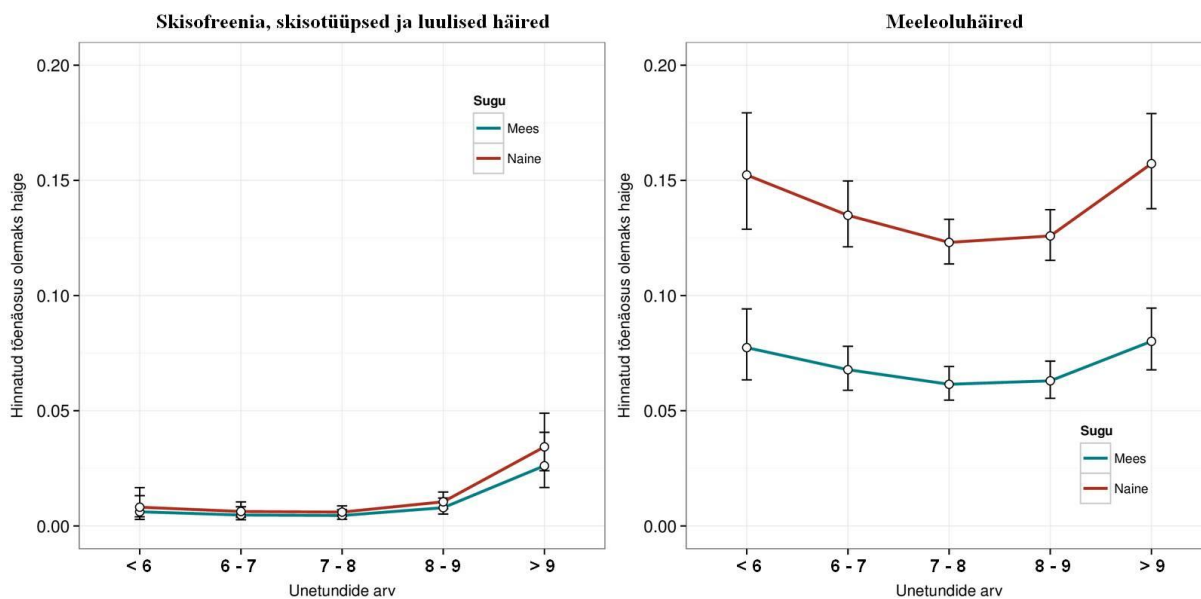
kestus kardiometaboolsete haiguste riskifaktoriks. See on kooskõlas ka 23 uuringut (aastatest 1979–2007) kokkuvõtva metaanalüüsi tulemusega, mille järelduseks on, et lühike uni (OR = 1,10; 95% CI: 1,06–1,15) ja pikk uni (OR = 1,23; 95% CI: 1,17–1,30) on mõlemad seotud üleüldise suremuse riski suurenemisega (Gallicchio ja Kalesan, 2009).

Uneprobleemide korral häirub organismis kortisooli ööpäevane rütm (Scheer jt., 2009). Kortisooli kontsentratsiooni tõus on aga seotud hüpotalamuse-hüpofüüsi-neerupealise telje (HPA-telg) aktivatsiooniga, mis omakorda osaleb organismi stressivastuse vahendamises ja mõjutab seega vaimset tervist (Watanuki ja Kim, 2005). Enamik uuringuid, mis lühikese une ja vaimse tervise vahelisi seoseid kajastavad, teevad seda eelkõige insomniat kontekstis. Näiteks leitakse, et kõrgem risk depressiooni väljakujunemisele on juhul, kui esinevad koos insomniat ja lühike une kestus (Fernandez-Mendoza jt., 2015, Vgontzas jt., 2012). Käesoleva magistritöö andmed ei võimalda indiviididel usaldusväärselt insomniat diagnoosida, küll aga saame siingi kasutada subjektiivset une kestust, et seostada vaimset tervist unega.

Skisofreenia, skisotüüpsete ja luululiste häirete (F20–F29) põdejaid oli 21 068 indiviidi (vanus 25–75) hulgas 149 ning meeleoluhäirete (F30–F39), eelkõige depressiooni põdejaid 1998. Mõlemaid haigusseisundeid kujutavates mudelites on kovariaatideks sugu, vanus ja vanusest võetud ruutväärtus. Skisofreeniliste haiguste korral on lisaks mainitud kovariaatidele mudelis ka nädala jooksul kogunenud une puudujääk ehk *social jetlag* (ΔMS) ning meeleoluhäirete korral on lisa kovariaadiks kronotüüp (MSFscn). Kronotüüp lisati mudelisse, kuna hilisemate kronotüüpidega indiviididel esineb tõepoolest depressiivsed sümptomeid rohkem kui varajase kronotüüpidega indiviididel (Randler jt., 2012, Kitamura jt., 2010).

Võrreldes teiste haiguste esinemiste tõenäosust kirjeldavate mudelitega, on meeleoluhäirete esinemise tõenäosust kirjeldava mudeli põhjal loodud graafik kõige selgemalt U- kujuline (Joonis 17). Lisaks on see ainuke selle töö raames loodud statistiliselt oluline mudel, kus sarnase vanuse ja kronotüübi korral on naistel võrreldes meestega tunduvalt suurem tõenäosus kannatada haigussümptomite käes (OR = 2,14; 95% CI: 1,91–2,41). Sugudevaheline erinevus on kooskõlas ka eelnevate uuringutega (Kitamura jt., 2010, Young ja Korszun, 2010). Erinevus võib tuleneda sellest, et östrogeenide taseme langus (nt menopausi järgselt) häirib HPA- teljes vallanduvate hormoonide regulatsiooni (Young ja Korszun, 2010). Kõige tõenäolisemalt on käesolevas uuringus meeleoluhäired inimestel, kes magavad üle 9 tunni. Naiste seas on sel juhul haige olemise tõenäosus 15,7% ja meeste seas 8%. Võrreldes samast soost, vanusest ja kronotüübigrupist indiviide on < 6 ja > 9 tunnise

unekestusega inimestel šanss olla haige suurem kui 7–8 tundi magavatel indiviididel (vastavalt OR = 1,28, 95% CI: 1,04–1,57 ja OR = 1,33; 95% CI: 1,13–1,56). Varasemates artiklites on kirjeldatud lühikese une ja depressiooni sümptomite assotsiatsiooni (Randler jt., 2012). Viidatud uuring kasutab keskmise une pikkuse arvutamisel samuti MCTQ küsimustikust saadud uneandmeid, mistõttu on huvitav, et ei leitud seost pika une kestuse ja depressiooni vahel. Selles aspektis võib olla meie analüüsi eeliseks suurem valim. Samas on ka artikleid, mis ei tuvasta üldse une kestuse ja depressiooni vahel statistiliselt olulisi seosed (Kitamura jt., 2010).



Skisofreeniad				Meeleoluhäired			
Une grupp (referents: 7-8 h)	OR	2,5%	97,7%	Une grupp (referents: 7-8 h)	OR	2,5%	97,5%
<6	1,36	0,58	2,81	<6	1,28	1,04	1,57
6-7	1,05	0,57	1,85	6-7	1,11	0,97	1,27
8-9	1,75	1,12	2,77	8-9	1,03	0,91	1,15
>9	5,89	3,75	9,35	>9	1,33	1,13	1,56

Joonis 17. Une kestuse ja psühhiaatriliste- ning meeleoluhäirete vahelised trendid. Joonis kirjeldab skisofreeniliste ja meeleoluhäirete esinemise tõenäosust Eesti Geenivaramu 21 068 indiviidiga valimis (vanus 25–75) sõltuvalt une pikkuse klassist. Skisofreeniliste haiguste tõenäosused on hinnatud logistilise regressiooni meetodil antud valimi keskmise ΔMS -i (0,97 ehk ~1 tunnine unevõlg) ja vanusega (46,9 aastat) isikutele. Meeleoluhäirete esinemise tõenäosused on hinnatud valimi keskmise kronotüübi (MSFscn = 3,5, korrigeeritud une keskaeg on kell 03.30) ja vanusega (46,9 aastat) isikutele. Tabeli osas on erinevate unegruppide ja normaalse unekestusega grupi vahelised šansside suhted (OR) haiguste esinemisele tingimusel, et võrreldakse teiste mudelis olevate parameetrite suhtes samade näitajatega indiviide.

Skisofreenia, skisotüüpsete ja luululiste häirete puhul jääb mudel une kestuse abil haiguse tõenäosuse ennustamise seiskukohalt küllaltki nõrgaks, olles 0% lähedal < 8 tunniste

une kestuse korral (Joonis 17). Samas on näha, et suurim risk psühhiaatrilist haigust põdeda, on indiviididel, kelle une pikkus on > 9 tunni (OR = 5,89; 95% CI: 3,75–9,35). Seda tingimusel, et sugu, vanus ja unevõlg on võrreldavatel isikute samad. Isegi sellisel juhul on tõenäosused haige olemiseks väikesed, naistel 3,4% ja meestel 2,6%. Tulemus on mõnevõrra oodatav, arvestades skisofreeniliste haiguste tekkimise multifaktoriaalset tagapõhja (Haller jt., 2014) ja tõendusi, kus haigusseisundi puhul nähakse pigem raskusi uinuda, häiritud und ning ebaregulaarseid unemustreid (Bromundt jt., 2011), mitte niivõrd ekstreemseid une kestusi.

Olgugi et molekulaarsel tasandil on kellasüsteemi regulatoorse funktsiooni ja meelelühäirete vahel leitud kattuvaid geene (Kripke jt., 2009, Soria jt., 2010), ei pruugi une ja meelelühäirete vaheline assotsatsioon lihtsakoeline olla. Tuleb arvestada ka võimalusega, et psühhiaatriliste- ning meelelühäirete puhul võib haigusseisund ise tingida une kestuse muutumist, kuid põhjuslikkust meie konstrueeritud mudelid leida ei võimalda.

KOKKUVÕTE

Endogeense tsirkadiaanse kellasüsteemi üheks põhiliseks eesmärgiks on metaboolsete protsesside toimumise ajaline määramine. Ööpäevased toidu tarbimise tsüklid mõjutavad aga otseselt perifeersete organite tsirkadiaanseid rütme. Tänu kahe protsessi molekulaarsele integratsioonile on tänapäeval aktuaalsed une- ja terviseprobleemid omavahel seotud. Ebakorrapärase une- ja toitumismustriga kaasnevad pikas perspektiivis kardiometaboolsed haigused, mis elukvaliteeti ilmselgelt langetavad.

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oligi uurida, kas TÜ Eesti Geenivaramu valimis (N = 21 068) on une kestuse lühenemine ja pikenemine seotud erinevate tervisehäirete esinemiste tõenäosuste kasvuga. Leidsime, et normaalkaalus olevatel keskealistel inimestel on suurim risk olla primaarse hüpertensiooni haige < 6 h une kestuse korral (OR = 1,05; CI: 0,87–1,25), südame isheemiatõve haige nii < 6 h (OR = 1,26; CI: 0,96–1,63) kui ka > 9 h (OR = 1,41; CI: 1,11–1,78) une kestuse korral ja II tüüpi diabeedi haige > 9 h une kestuse korral (OR = 1,57; CI: 1,78–2,07), võrreldes 7–8 tunnise une kestusega. Metaboolse sündroomi ja une kestuse vahel ei leitud statistiliselt olulist erinevust haiguse esinemise tõenäosuses, küll aga ilmsid assotsatsioonid une lühenemise ja KMI, vööümbermõõdu ning süstoolse- ja diastoolse vererõhu näitude suurenemistega. Lisaks leiti, et võrreldes 7–8 tundi magavate indiviididega, on > 9 h uni seotud skisofreeniliste häirete esinemise tõenäosuste suurenemisega (OR = 5,89; CI: 3,75–9,35) ning < 6 h uni (OR = 1,28; 1,04–1,57) ja > 9 h uni (OR = 1,33; CI: 1,13–1,56) meeleoluhäirete esinemise tõenäosuste suurenemisega keskealistel normaalkaalus olevatel eestlastel. Tuleb aga tõdeda, et loodud mudelid ei võimalda selgitada seost põhjuse ja tagajärje vahel. Ka ei ole võimalik vahet teha indiviididel, kellele piisabki väljapuhkamiseks vähemast arvust unetundidest ja nendel, kelle uni on lühike sotsiaalsete kohustuste tõttu. Kui suudaksime mainitud aspektist lähtuvalt doonoreid eristada, saaksime uurida, kas kardiometaboolsed ja vaimsed tervisehäädad ohustavad ka loomulikult lühikese unega indiviide. Teades, et keskkonnafaktorid mõjutavad une kestuse kujunemist enam kui geneetika (seletab ainult 1/3 varieeruvusest) võiks arvata, et lühike uni on alati terviseprobleemide kujunemise üheks riskifaktoriks. Samas aga ei ole une kestuse geneetilist aspekti veel täielikult ära kirjeldatud.

Magistritöö veel üheks eesmärgiks oli tuvastada genoomseid piirkondi, mis mõjutaksid keskmise une kestuse kujunemist. Viisime TÜ Eesti Geenivaramu kohordis läbi kolm individuaalset GWAS uuringut ning neid ühendava metaanalüüsi. Analüüsides ei replitseerunud küll varasemalt avaldatud leiud, kuid avastasime uusi statistiliselt olulisi ja vähem olulisi markereid. Parima assotsatsiooniga SNP rs7584248 ($p = 2,75 \times 10^{-8}$), mis jääb

transmembraanse proteiini geenist *Tmem17* 70 kb allvoolu, pärines HumanOmniEkspress kiibiga genotüpiseeritud indiviididega läbiviidud GWAS analüüsist (N = 3226). Rohkem huvipakkuv oli metaanalüüs (N = 6668) parima assotsatsiooniga ($p = 2,53 \times 10^{-7}$) SNP rs138952930, mis jääb 8. kromosoomis oleva sekreteeritava *frizzled* sarnase proteiini geeni *Sfrp1* intronisse. Polümorfismi efekt tunnusele on positiivne ($\beta = 0,35$). Efektalleeli omavate heterosügootide uni pikeneb ~20 minuti võrra. SFRP1 kuulub wnt signalisatsiooniraja valkude hulka ning selle puudust hiirtel on seostatud adipogeneesi häirete ning tumorigeensete protsessidega. Kindlasti vajaks meie leid replitseerimist eraldiseisvas kohordis, kuid loodetavasti võiks see olla järjekordseks tõestuseks, et lipiidide metabolismirada on tsirkadiaanse rütmi kontrolli all. Oletuse põhjal võiks järgnevalt, tsirkadiaanses aspektist lähtuvalt, uurida *Sfrp1* geeni mõju lipiidsete metaboliitide kontsentratsioonidele inimese vereplasmas.

**Genome-wide Association Study Identifying Genetics Behind Sleep Duration in
Estonian Genome Centre
Sleep Duration in Association with Health Outcomes**

SUMMARY

Jaanika Moro

One of the main purposes of the endogenous circadian system is to give distinct time windows for different metabolic processes. Circadian clocks in periphery organs are directly influenced by daily feeding–fasting cycles. Thanks to the intergation of the two main processes in our body, today`s sleep and health issues are related to each other. Irregular sleeping and feeding patterns will probably lead to the cardiometabolic diseases, which in turn will influence our life quality.

The purpose of this study was to see, if short and long sleep durations will increase the probability to suffer under different health problems. Based on the data from Estonain Genome Centre (N = 21 068) we found that middle-aged people with normal body mass index had higher odds of being a hypertonic, if they sleep less that 6 h per night (OR = 1,05; CI: 0,87–1,25) and higher odds of being an ischemic if they sleep less than 6 h (OR = 1,26; CI: 0,96–1,63) or more than 9 h (OR = 1,41; CI: 1,11–1,78) per night and finally higher odds of being a diabetic if they sleep more than 9 h (OR = 1,57; CI: 1,78–2,07) per night in relation to normal 7–8 sleep duration. We did not find significant associations between metabolic syndrome and sleep duration, but we saw that BMI, waist and both systolic and diastolic blood pressure were higher in people who sleep short. Next we found that mental health is also affected by sleep. The odds of having symptomes of schizophrenia were highest in people who sleep more than 9 h (OR = 5,89; CI: 3,75–9,35) per night and the odds of having symptomes of mood disorders are highest in people who sleep less than 6 h (OR = 1,28; 1,04–1,57) and more than 9 h (OR = 1,33; CI: 1,13–1,56) per night in relation to 7–8 sleep duration. We must remember that our models do not explain causativity behind the graphs. Moreover we do not know whether these people sleep short naturally or they do it because of the social aspects of our lives. If we could distinguish these two groups, we could see if the cardiometabolic outcomes will differ between those groups. As we know that environment plays a bigger role in sleep duration than genetics, we might see that short sleep is a risk factor for poor health despite the reasons behind it. Then again, we still do not know the whole genetic background of the sleep duration.

Another aim of this study was to identify genomic loci affecting average sleep duration. We conducted three separate GWAS studies and later one joint meta-analysis. We could not replicate already known loci, but we managed to find some new markers. SNP rs7584248 had the best and statistically significant ($p = 2.75 \times 10^{-8}$) association with sleep duration. This was the result of the GWAS done with HumanOmniExpress chip ($N = 3226$). This single nucleotide polymorphism locates 70 Kb downstream from the transmembrane protein gene *Tmem17*. More interesting was the best finding from meta-analysis ($N = 6668$), rs138952930 ($p = 2.53 \times 10^{-7}$). This intronic SNP locates in the *Sfrp1* gene, that is important in Wnt signalling pathway and has been related to the disturbed adipogenity and tumorigenesis in mouse models. The effect of the polymorphism is positive ($\beta = 0.35$). The increase of minor A allele lengthens the sleep duration. Although ours findings still need to be replicated, we could say that *Sfrp1* gene might be a new link between sleep duration and metabolism. In near future it would be interesting to investigate the associations between *Sfrp1* gene and metabolite concentrations in human plasma.

TÄNUSÕNAD

Sooviksin eelkõige tänada enda juhendajat, Maris Teder–Lavingut, kelle nõuanded ja kannatlikkus võimaldasid magistritööd teostada. Samuti tahaksin tänaga Silva Kaselat ja Evelin Mihailovit, kellest oli eksperimentaalosade valmimisel suur abi. Tänan ka professor A. Metspalu ja Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonoreid.

KIRJANDUSE LOETELU

- Aguilar-Arnal, L. & Sassone-Corsi, P. 2013. The circadian epigenome: how metabolism talks to chromatin remodeling. *Current Opinion in Cell Biology*, 25, 170-176.
- Aguilar-Arnal, L. & Sassone-Corsi, P. 2014. Chromatin landscape and circadian dynamics: Spatial and temporal organization of clock transcription. *PNAS*.
- Aho, V., Ollila, H. M., Rantanen, V., Kronholm, E., Surakka, I., van Leeuwen, W. M., Lehto, M., Matikainen, S., Ripatti, S., Härmä, M., Sallinen, M., Salomaa, V., Jauhiainen, M., Alenius, H., Paunio, T. & Porkka-Heiskanen, T. 2013. Partial sleep restriction activates immune response-related gene expression pathways: experimental and epidemiological studies in humans. *PLoS One*, 8, e77184.
- Ala-Korpela, M., Kangas, A. J. & Soininen, P. 2012. Quantitative high-throughput metabolomics: a new era in epidemiology and genetics. *Genome Medicine*, 4, 36.
- Alberti, K. G., Zimmet, P. & Shaw, J. 2006. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, 23, 469-480.
- Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S. & Lee, C. C. 2001. MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, 16, 100-104.
- Allebrandt, K. V., Amin, N., Müller-Myhsok, B., Esko, T., Teder-Laving, M., Azevedo, R. V., Hayward, C., van Mill, J., Vogelzangs, N., Green, E. W., Melville, S. A., Lichtner, P., Wichmann, H. E., Oostra, B. A., Janssens, A. C., Campbell, H., Wilson, J. F., Hicks, A. A., Pramstaller, P. P., Dogas, Z., Rudan, I., Merrow, M., Penninx, B., Kyriacou, C. P., Metspalu, A., van Duijn, C. M., Meitinger, T. & Roenneberg, T. 2013. A K(ATP) channel gene effect on sleep duration: from genome-wide association studies to function in *Drosophila*. *Molecular Psychiatry*, 18, 122-132.
- Allebrandt, K. V., Teder-Laving, M., Akyol, M., Pichler, I., Muller-Myhsok, B., Pramstaller, P., Merrow, M., Meitinger, T., Metspalu, A. & Roenneberg, T. 2010. CLOCK gene variants associate with sleep duration in two independent populations. *Biological Psychiatry*, 67, 1040-1047.
- Ang, J. E., Revell, V., Mann, A., Mantele, S., Otway, D. T., Johnston, J. D., Thumser, A. E., Skene, D. J. & Raynaud, F. 2012. Identification of human plasma metabolites exhibiting time-of-day variation using an untargeted liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic approach. *Chronobiology International*, 29, 868-881.
- Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H. & Turek, F. W. 2009. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 2100-2102.
- Arora, T. & Taheri, S. 2015. Associations among late chronotype, body mass index and dietary behaviors in young adolescents. *International Journal of Obesity (Lond)*, 39, 39-44.
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F. W. & Schibler, U. 2008. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*, 134, 317-328.
- Ayas, N. T., White, D. P., Al-Delaimy, W. K., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Speizer, F. E., Patel, S. & Hu, F. B. 2003. A prospective study of self-reported sleep duration and incident diabetes in women. *Diabetes Care*, 26, 380-384.
- Ball, R. D. 2013. Designing a GWAS: power, sample size, and data structure. *Methods in Molecular Biology*, 1019, 37-98.
- Baron, K. G. & Reid, K. J. 2014. Circadian misalignment and health. *International Review of Psychiatry*, 26, 139-154.
- Bell, L. N., Kilkus, J. M., Booth, J. N., 3rd, Bromley, L. E., Imperial, J. G. & Penev, P. D. 2013. Effects of sleep restriction on the human plasma metabolome. *Physiology and Behavior*, 122, 25-31.
- Bjorvatn, B., Sagen, I. M., Oyane, N., Waage, S., Fetveit, A., Pallesen, S. & Ursin, R. 2007. The association between sleep duration, body mass index and metabolic measures in the Hordaland Health Study. *Journal of Sleep Research*, 16, 66-76.
- Blakemore, A. I., Meyre, D., Delplanque, J., Vatin, V., Lecoecur, C., Marre, M., Tichet, J., Balkau, B., Froguel, P. & Walley, A. J. 2009. A rare variant in the visfatin gene (NAMPT/PBEF1) is associated with protection from obesity. *Obesity (Silver Spring)*, 17, 1549-1553.

- Bromundt, V., Koster, M., Georgiev-Kill, A., Opwis, K., Wirz-Justice, A., Stoppe, G. & Cajochen, C. 2011. Sleep-wake cycles and cognitive functioning in schizophrenia. *British Journal of Psychiatry*, 198, 269-276.
- Brown, S. A., Kowalska, E. & Dallmann, R. 2012. (Re)inventing the circadian feedback loop. *Developmental Cell*, 22, 477-487.
- Bugge, A., Feng, D., Everett, L. J., Briggs, E. R., Mullican, S. E., Wang, F., Jager, J. & Lazar, M. A. 2012. Rev-erbalpha and Rev-erbbeta coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes and Development*, 26, 657-667.
- Byrne, E. M., Gehrman, P. R., Medland, S. E., Nyholt, D. R., Heath, A. C., Madden, P. A., Hickie, I. B., Van Duijn, C. M., Henders, A. K., Montgomery, G. W., Martin, N. G. & Wray, N. R. 2013. A genome-wide association study of sleep habits and insomnia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 162B, 439-451.
- Calhoun, D. A. & Harding, S. M. 2010. Sleep and hypertension. *Chest*, 138, 434-443.
- Chang, H. C. & Guarente, L. 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25, 138-145.
- Chen, Y. Z., Liu, D., Zhao, Y. X., Wang, H. T., Gao, Y. & Chen, Y. 2014. Aberrant promoter methylation of the SFRP1 gene may contribute to colorectal carcinogenesis: a meta-analysis. *Tumour Biology*, 35, 9201-9210.
- Chih, B., Liu, P., Chinn, Y., Chalouni, C., Komuves, L. G., Hass, P. E., Sandoval, W. & Peterson, A. S. 2012. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nature Cell Biology*, 14, 61-72.
- Choi, J. E. & Mostoslavsky, R. 2014. Sirtuins, metabolism, and DNA repair. *Current Opinion in Genetics and Development*, 26, 24-32.
- Choi, K. M., Lee, J. S., Park, H. S., Baik, S. H., Choi, D. S. & Kim, S. M. 2008. Relationship between sleep duration and the metabolic syndrome: Korean National Health and Nutrition Survey 2001. *International Journal of Obesity (Lond)*, 32, 1091-1097.
- Chou, T. C., Scammell, T. E., Gooley, J. J., Gaus, S. E., Saper, C. B. & Lu, J. 2003. Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *The Journal of Neuroscience*, 23, 10691-10702.
- Chua, E. C., Shui, G., Lee, I. T., Lau, P., Tan, L. C., Yeo, S. C., Lam, B. D., Bulchand, S., Summers, S. A., Puvanendran, K., Rozen, S. G., Wenk, M. R. & Gooley, J. J. 2013. Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans. *PNAS*, 110, 14468-14473.
- Costa, M. J., So, A. Y., Kaasik, K., Krueger, K. C., Pillsbury, M. L., Fu, Y. H., Ptacek, L. J., Yamamoto, K. R. & Feldman, B. J. 2011. Circadian rhythm gene period 3 is an inhibitor of the adipocyte cell fate. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 9063-9070.
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdan, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D. & Low, M. J. 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411, 480-484.
- Cuellar-Partida, G., Renteria, M. E. & MacGregor, S. 2015. LocusTrack: Integrated visualization of GWAS results and genomic annotation. *Source Code for Biology and Medicine*, 10.
- Dallmann, R., DeBruyne, J. P. & Weaver, D. R. 2011. Photic resetting and entrainment in CLOCK-deficient mice. *Journal of Biological Rhythms*, 26, 390-401.
- Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C. & Brown, S. A. 2012. The human circadian metabolome. *PNAS*, 109, 2625-2629.
- Davies, S. K., Ang, J. E., Revell, V. L., Holmes, B., Mann, A., Robertson, F. P., Cui, N., Middleton, B., Ackermann, K., Kayser, M., Thumser, A. E., Raynaud, F. I. & Skene, D. J. 2014. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *PNAS*, 111, 10761-10766.
- DeBruyne, J. P., Weaver, D. R. & Reppert, S. M. 2007. CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neuroscience*, 10, 543-545.
- Delaneau, O., Zagury, J. F. & Marchini, J. 2013. Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nature Methods*, 10, 5-6.

- Delort, L., Rossary, A., Farges, M. C., Vasson, M. P. & Caldefie-Chezet, F. 2015. Leptin, adipocytes and breast cancer: Focus on inflammation and anti-tumor immunity. *Life Sciences*.
- Dermitzakis, E. T. 2012. Cellular genomics for complex traits. *Nature Reviews Genetics*, 13, 215-220.
- Dibner, C. & Schibler, U. 2015. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *Journal of Internal Medicine*, 277, 513-527.
- Dijk, D. J., Duffy, J. F., Silva, E. J., Shanahan, T. L., Boivin, D. B. & Czeisler, C. A. 2012. Amplitude reduction and phase shifts of melatonin, cortisol and other circadian rhythms after a gradual advance of sleep and light exposure in humans. *PLoS One*, 7, e30037.
- Doi, M., Hirayama, J. & Sassone-Corsi, P. 2006. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125, 497-508.
- Donga, E., van Dijk, M., van Dijk, J. G., Biermasz, N. R., Lammers, G. J., van Kralingen, K. W., Corssmit, E. P. & Romijn, J. A. 2010. A single night of partial sleep deprivation induces insulin resistance in multiple metabolic pathways in healthy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95, 2963-2968.
- Duez, H. & Staels, B. 2010. Nuclear receptors linking circadian rhythms and cardiometabolic control. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 30, 1529-1534.
- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A. U., Wheeler, E., Glazer, N. L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A. L., Lindgren, C. M., Magi, R., Morris, A. P., Randall, J., Johnson, T., Elliott, P., Rybin, D., Thorleifsson, G., Steinthorsdottir, V., Henneman, P., Grallert, H., Dehghan, A., Hottenga, J. J., Franklin, C. S., Navarro, P., Song, K., Goel, A., Perry, J. R., Egan, J. M., Lajunen, T., Grarup, N., Sparso, T., Doney, A., Voight, B. F., Stringham, H. M., Li, M., Kanoni, S., Shradler, P., Cavalcanti-Proenca, C., Kumari, M., Qi, L., Timpson, N. J., Gieger, C., Zabena, C., Rocheleau, G., Ingelsson, E., An, P., O'Connell, J., Luan, J., Elliott, A., McCarroll, S. A., Payne, F., Roccascaccia, R. M., Pattou, F., Sethupathy, P., Ardlie, K., Ariyurek, Y., Balkau, B., Barter, P., Beilby, J. P., Ben-Shlomo, Y., Benediktsson, R., Bennett, A. J., Bergmann, S., Bochud, M., Boerwinkle, E., Bonnefond, A., Bonnycastle, L. L., Borch-Johnsen, K., Bottcher, Y., Brunner, E., Bumpstead, S. J., Charpentier, G., Chen, Y. D., Chines, P., Clarke, R., Coin, L. J., Cooper, M. N., Cornelis, M., Crawford, G., Crisponi, L., Day, I. N., de Geus, E. J., Delplanque, J., Dina, C., Erdos, M. R., Fedson, A. C., Fischer-Rosinsky, A., Forouhi, N. G., Fox, C. S., Frants, R., Franzosi, M. G., Galan, P., Goodarzi, M. O., Graessler, J., Groves, C. J., Grundy, S., Gwilliam, R., Gyllenstein, U., Hadjadj, S., et al. 2010. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nature Genetics*, 42, 105-116.
- Eckel-Mahan, K. & Sassone-Corsi, P. 2013. Metabolism and the circadian clock converge. *Physiological Reviews*, 93, 107-135.
- Eckel-Mahan, K. L., Patel, V. R., Mohny, R. P., Vignola, K. S., Baldi, P. & Sassone-Corsi, P. 2012. Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *PNAS*, 109, 5541-5546.
- Edwards, S. L., Beesley, J., French, J. D. & Dunning, A. M. 2013. Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *American Journal of Human Genetics*, 93, 779-797.
- Etchegaray, J. P., Machida, K. K., Noton, E., Constance, C. M., Dallmann, R., Di Napoli, M. N., DeBruyne, J. P., Lambert, C. M., Yu, E. A., Reppert, S. M. & Weaver, D. R. 2009. Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 3853-3866.
- Evangelou, E. & Ioannidis, J. P. 2013. Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14, 379-389.
- Feldman, J. L., Baeza, J. & Denu, J. M. 2013. Activation of the protein deacetylase SIRT6 by long-chain fatty acids and widespread deacylation by mammalian sirtuins. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 31350-31356.
- Fernandez-Mendoza, J., Shea, S., Vgontzas, A. N., Calhoun, S. L., Liao, D. & Bixler, E. O. 2015. Insomnia and incident depression: role of objective sleep duration and natural history. *Journal of Sleep Research*, (article in press).

- Finch, P. W., He, X., Kelley, M. J., Uren, A., Schaudies, R. P., Popescu, N. C., Rudikoff, S., Aaronson, S. A., Varmus, H. E. & Rubin, J. S. 1997. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *PNAS*, 94, 6770-6775.
- Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A. & Nelson, R. J. 2010. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *PNAS*, 107, 18664-18669.
- Fontaine, C., Dubois, G., Duguay, Y., Helledie, T., Vu-Dac, N., Gervois, P., Soncin, F., Mandrup, S., Fruchart, J. C., Fruchart-Najib, J. & Staels, B. 2003. The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 37672-37680.
- Gallicchio, L. & Kalesan, B. 2009. Sleep duration and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Sleep Research*, 18, 148-158.
- Gangwisch, J. E., Heymsfield, S. B., Boden-Albala, B., Buijs, R. M., Kreier, F., Pickering, T. G., Rundle, A. G., Zammit, G. K. & Malaspina, D. 2006. Short sleep duration as a risk factor for hypertension: analyses of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Hypertension*, 47, 833-839.
- Gangwisch, J. E., Heymsfield, S. B., Boden-Albala, B., Buijs, R. M., Kreier, F., Pickering, T. G., Rundle, A. G., Zammit, G. K. & Malaspina, D. 2007. Sleep duration as a risk factor for diabetes incidence in a large U.S. sample. *Sleep*, 30, 1667-1673.
- Garaulet, M., Sanchez-Moreno, C., Smith, C. E., Lee, Y. C., Nicolas, F. & Ordovas, J. M. 2011. Ghrelin, sleep reduction and evening preference: relationships to CLOCK 3111 T/C SNP and weight loss. *PLoS One*, 6, e17435.
- Gauger, K. J., Bassa, L. M., Henchey, E. M., Wyman, J., Bentley, B., Brown, M., Shimono, A. & Schneider, S. S. 2013. Mice deficient in Sfrp1 exhibit increased adiposity, dysregulated glucose metabolism, and enhanced macrophage infiltration. *PLoS One*, 8, e78320.
- Gauger, K. J., Bassa, L. M., Henchey, E. M., Wyman, J., Ser-Dolansky, J., Shimono, A. & Schneider, S. S. 2014. The effects of diet induced obesity on breast cancer associated pathways in mice deficient in SFRP1. *Molecular Cancer*, 13, 117.
- Gooley, J. J. & Chua, E. C. 2014. Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics. *Journal of Genetics and Genomics*, 41, 231-250.
- Gottlieb, D. J., Hek, K., Chen, T. H., Watson, N. F., Eiriksdottir, G., Byrne, E. M., Cornelis, M., Warby, S. C., Bandinelli, S., Cherkas, L., Evans, D. S., Grabe, H. J., Lahti, J., Li, M., Lehtimäki, T., Lumley, T., Marciante, K. D., Perusse, L., Psaty, B. M., Robbins, J., Tranah, G. J., Vink, J. M., Wilk, J. B., Stafford, J. M., Bellis, C., Biffar, R., Bouchard, C., Cade, B., Curhan, G. C., Eriksson, J. G., Ewert, R., Ferrucci, L., Fülöp, T., Gehrman, P. R., Goodloe, R., Harris, T. B., Heath, A. C., Hernandez, D., Hofman, A., Hottenga, J. J., Hunter, D. J., Jensen, M. K., Johnson, A. D., Kähönen, M., Kao, L., Kraft, P., Larkin, E. K., Lauderdale, D. S., Luik, A. I., Medici, M., Montgomery, G. W., Palotie, A., Patel, S. R., Pistis, G., Porcu, E., Quaye, L., Raitakari, O., Redline, S., Rimm, E. B., Rotter, J. I., Smith, A. V., Spector, T. D., Teumer, A., Uitterlinden, A. G., Vohl, M. C., Widen, E., Willemssen, G., Young, T., Zhang, X., Liu, Y., Blangero, J., Boomsma, D. I., Gudnason, V., Hu, F., Mangino, M., Martin, N. G., O'Connor, G. T., Stone, K. L., Tanaka, T., Viikari, J., Gharib, S. A., Punjabi, N. M., Räikkönen, K., Völzke, H., Mignot, E. & Tiemeier, H. 2014. Novel loci associated with usual sleep duration: the CHARGE Consortium Genome-Wide Association Study. *Molecular Psychiatry*, 1-8.
- Gottlieb, D. J., O'Connor, G. T. & Wilk, J. B. 2007. Genome-wide association of sleep and circadian phenotypes. *BMC Medical Genetics*. England.
- Gottlieb, D. J., Punjabi, N. M., Newman, A. B., Resnick, H. E., Redline, S., Baldwin, C. M. & Nieto, F. J. 2005. Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Archives of Internal Medicine*, 165, 863-867.
- Grandner, M. A., Buxton, O. M., Jackson, N., Sands-Lincoln, M., Pandey, A. & Jean-Louis, G. 2013a. Extreme sleep durations and increased C-reactive protein: effects of sex and ethnracial group. *Sleep*, 36, 769-779E.

- Grandner, M. A., Chakravorty, S., Perlis, M. L., Oliver, L. & Gurubhagavatula, I. 2014. Habitual sleep duration associated with self-reported and objectively determined cardiometabolic risk factors. *Sleep Medicine*, 15, 42-50.
- Grandner, M. A., Sands-Lincoln, M. R., Pak, V. M. & Garland, S. N. 2013b. Sleep duration, cardiovascular disease, and proinflammatory biomarkers. *Nature and Science of Sleep*, 5, 93-107.
- Grimaldi, B., Bellet, M. M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R. H., Granneman, J. G., Piomelli, D., Leff, T. & Sassone-Corsi, P. 2010. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPARgamma. *Cell Metabolism*, 12, 509-520.
- Gutierrez-Repiso, C., Soriguer, F., Rubio-Martin, E., Esteve de Antonio, I., Ruiz de Adana, M. S., Almaraz, M. C., Oliveira-Fuster, G., Morcillo, S., Valdes, S., Lago-Sampedro, A. M., Garcia-Fuentes, E. & Rojo-Martinez, G. 2014. Night-time sleep duration and the incidence of obesity and type 2 diabetes. Findings from the prospective Pizarra study. *Sleep Medicine*, 15, 1398-1404.
- Hall, M. H., Muldoon, M. F., Jennings, J. R., Buysse, D. J., Flory, J. D. & Manuck, S. B. 2008. Self-reported sleep duration is associated with the metabolic syndrome in midlife adults. *Sleep*, 31, 635-643.
- Haller, C. S., Padmanabhan, J. L., Lizano, P., Torous, J. & Keshavan, M. 2014. Recent advances in understanding schizophrenia. *F1000Prime Reports*, 6, P6-57.
- Harding, H. P. & Lazar, M. A. 1993. The orphan receptor Rev-Erba alpha activates transcription via a novel response element. *Molecular and Cellular Biology*, 13, 3113-3121.
- Hastings, M. H., Maywood, E. S. & O'Neill, J. S. 2008. Cellular circadian pacemaking and the role of cytosolic rhythms. *Current Biology*, 18, R805-R815.
- Heath, A. C., Kendler, K. S., Eaves, L. J. & Martin, N. G. 1990. Evidence for genetic influences on sleep disturbance and sleep pattern in twins. *Sleep*, 13, 318-335.
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y. & Sassone-Corsi, P. 2007. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 450, 1086-1090.
- Hong, H.-K., Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheiva, B. & Bass, J. 2012. Clock Genes and Energy Metabolism. In: Shiromani, P., Horvath, T., Redline, S. & Van Cauter, E. (eds.) *Sleep Loss and Obesity*. SpringerSBM.
- Howie, B. N., Donnelly, P. & Marchini, J. 2009. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genetics*, 5, e1000529.
- Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheiva, B. & Bass, J. 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 121, 2133-2141.
- Hurley, S., Goldberg, D., Bernstein, L. & Reynolds, P. 2015. Sleep duration and cancer risk in women. *Cancer Causes Control*.
- Jackowska, M. & Steptoe, A. 2015. Sleep and future cardiovascular risk: prospective analysis from the English Longitudinal Study of Ageing. *Sleep Medicine*, (article in press).
- Jenkins, J. B., Omori, T., Guan, Z., Vgontzas, A. N., Bixler, E. O. & Fang, J. 2006. Sleep is increased in mice with obesity induced by high-fat food. *Physiology and Behavior*, 87, 255-262.
- Jordan, S. D. & Lamia, K. A. 2013. AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366, 163-169.
- Kalra, S. P., Ueno, N. & Kalra, P. S. 2005. Stimulation of appetite by ghrelin is regulated by leptin restraint: peripheral and central sites of action. *The Journal of Nutrition*, 135, 1331-1335.
- Kantermann, T., Juda, M., Mewes, M. & Roenneberg, T. 2007. The human circadian clock's seasonal adjustment is disrupted by daylight saving time. *Current Biology*, 17, 1996-2000.
- Kasukawa, T., Sugimoto, M., Hida, A., Minami, Y., Mori, M., Honma, S., Honma, K., Mishima, K., Soga, T. & Ueda, H. R. 2012. Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *PNAS*, 109, 15036-15041.
- Kitamura, S., Hida, A., Watanabe, M., Enomoto, M., Aritake-Okada, S., Moriguchi, Y., Kamei, Y. & Mishima, K. 2010. Evening preference is related to the incidence of depressive states independent of sleep-wake conditions. *Chronobiology International*, 27, 1797-1812.

- Knutson, K. L., Van Cauter, E., Rathouz, P. J., Yan, L. L., Hulley, S. B., Liu, K. & Lauderdale, D. S. 2009. Association between sleep and blood pressure in midlife: the CARDIA sleep study. *Archives of Internal Medicine*, 169, 1055-1061.
- Kobayashi, D., Takahashi, O., Deshpande, G. A., Shimbo, T. & Fukui, T. 2012. Association between weight gain, obesity, and sleep duration: a large-scale 3-year cohort study. *Sleep Breath*, 16, 829-833.
- Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., Joshu, C., Kobayashi, Y., Turek, F. W. & Bass, J. 2007. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metabolism*, 6, 414-421.
- Kompare, M. & Rizzo, W. B. 2008. Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation Disorders. 15, 140–149.
- Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V. & Antoch, M. P. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes and Development*, 20, 1868-1873.
- Kripke, D. F., Nievergelt, C. M., Joo, E., Shekhtman, T. & Kelsoe, J. R. 2009. Circadian polymorphisms associated with affective disorders. *Journal of Circadian Rhythms*, 7, 2.
- Lam, J. C. & Ip, M. S. 2010. Sleep & the metabolic syndrome. *Indian Journal of Medical Research*, 131, 206-216.
- Lamia, K. A., Storch, K. F. & Weitz, C. J. 2008. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *PNAS*, 105, 15172-15177.
- Laposky, A. D., Shelton, J., Bass, J., Dugovic, C., Perrino, N. & Turek, F. W. 2006. Altered sleep regulation in leptin-deficient mice. *AJP Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 290, R894-903.
- Lauderdale, D. S., Knutson, K. L., Rathouz, P. J., Yan, L. L., Hulley, S. B. & Liu, K. 2009. Cross-sectional and longitudinal associations between objectively measured sleep duration and body mass index: the CARDIA Sleep Study. *American Journal of Epidemiology*, 170, 805-813.
- Lazar, A. S., Santhi, N., Hasan, S., Lo, J. C., Johnston, J. D., Von Schantz, M., Archer, S. N. & Dijk, D. J. 2013. Circadian period and the timing of melatonin onset in men and women: predictors of sleep during the weekend and in the laboratory. *Journal of Sleep Research*, 22, 155-159.
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J. G., Krieger, M. & Guarente, L. 2007. SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Molecular Cell*, 28, 91-106.
- Liu, C., Li, S., Liu, T., Borjigin, J. & Lin, J. D. 2007. Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*, 447, 477-481.
- Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M. & Takahashi, J. S. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science*, 288, 483-492.
- Lu, J., Zhang, Y. H., Chou, T. C., Gaus, S. E., Elmquist, J. K., Shiromani, P. & Saper, C. B. 2001. Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *The Journal of Neuroscience*, 21, 4864-4874.
- Lu, X. Y., Shieh, K. R., Kabbaj, M., Barsh, G. S., Akil, H. & Watson, S. J. 2002. Diurnal rhythm of agouti-related protein and its relation to corticosterone and food intake. *Endocrinology*, 143, 3905-3915.
- Mamontova, A., Seguret-Mace, S., Esposito, B., Chanial, C., Bouly, M., Delhay-Bouchaud, N., Luc, G., Staels, B., Duverger, N., Mariani, J. & Tedgui, A. 1998. Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation*, 98, 2738-2743.
- Marcheva, B., Moynihan Ramsey, K., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M. H., Lopez, J. P., Philipson, L. H., Bradfield, C. A., Crosby, S. D., JeBailey, L., Wang, X., Takahashi, J. S. & Bass, J. 2010. Disruption of the Clock Components CLOCK and BMAL1 Leads to Hypoinsulinemia and Diabetes. *Nature*, 466, 627-631.
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Peek, C. B., Affinati, A., Maury, E. & Bass, J. 2013. Circadian clocks and metabolism. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 127-155.

- Masri, S. & Sassone-Corsi, P. 2010. Plasticity and specificity of the circadian epigenome. *Nature Neuroscience*, 13, 1324-1329.
- Masri, S. & Sassone-Corsi, P. 2014. Sirtuins and the circadian clock: bridging chromatin and metabolism. *Science Signaling*, 7, re6.
- McLoughlin, S. C. & FitzGerald, G. A. 2013. Between a rock and a hard place: how to align our circadian rhythms? *Circulation*, 127, 19-20.
- Meerlo, P., Sgoifo, A. & Suchecki, D. 2008. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Medicine Reviews*, 12, 197-210.
- Merikanto, I., Kronholm, E., Peltonen, M., Laatikainen, T., Lahti, T. & Partonen, T. 2012. Relation of chronotype to sleep complaints in the general Finnish population. *Chronobiology International*, 29, 311-317.
- Metrustry, S. J., Edwards, M. H., Medland, S. E., Holloway, J. W., Montgomery, G. W., Martin, N. G., Spector, T. D., Cooper, C. & Valdes, A. M. 2014. Variants close to NTRK2 gene are associated with birth weight in female twins. *Twin Research and Human Genetics*, 17, 254-261.
- Minami, Y., Kasukawa, T., Kakazu, Y., Iigo, M., Sugimoto, M., Ikeda, S., Yasui, A., van der Horst, G. T., Soga, T. & Ueda, H. R. 2009. Measurement of internal body time by blood metabolomics. *PNAS*, 106, 9890-9895.
- Monti, J. M. 2011. Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*, 15, 269-281.
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L. P. & Sassone-Corsi, P. 2008. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*, 134, 329-340.
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M. & Sassone-Corsi, P. 2009. Circadian control of the NAD⁺ salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science*, 324, 654-657.
- Ollila, H. M., Kettunen, J., Pietiläinen, O., Aho, V., Silander, K., Kronholm, E., Perola, M., Lahti, J., Rääkkönen, K., Widen, E., Palotie, A., Eriksson, J. G., Partonen, T., Kaprio, J., Salomaa, V., Raitakari, O., Lehtimäki, T., Sallinen, M., Härmä, M., Porkka-Heiskanen, T. & Paunio, T. 2014. Genome-wide association study of sleep duration in the Finnish population. *Journal of Sleep Research*, 23, 609-618.
- Ollila, H. M., Utge, S., Kronholm, E., Aho, V., Van Leeuwen, W., Silander, K., Partonen, T., Perola, M., Kaprio, J., Salomaa, V., Sallinen, M., Härmä, M., Porkka-Heiskanen, T. & Paunio, T. 2012. TRIB1 constitutes a molecular link between regulation of sleep and lipid metabolism in humans. *Translational Psychiatry*, 2, e97.
- Orth, D. N., Besser, G. M., King, P. H. & Nicholson, W. E. 1979. Free-running circadian plasma cortisol rhythm in a blind human subject. *Clinical Endocrinology*, 10, 603-617.
- Pan, W. & Kastin, A. J. 2014. Leptin: a biomarker for sleep disorders? *Sleep Medicine Reviews*, 18, 283-290.
- Pan, X., Jiang, X. C. & Hussain, M. M. 2013. Impaired Cholesterol Metabolism and Enhanced Atherosclerosis in Clock Mutant Mice. *Circulation*, 128, 1758-1769.
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S. & Hogenesch, J. B. 2002. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109, 307-320.
- Parsons, M. J., Lester, K. J., Barclay, N. L., Nolan, P. M., Eley, T. C. & Gregory, A. M. 2013. Replication of Genome-Wide Association Studies (GWAS) loci for sleep in the British G1219 cohort. *Am J Med Genet B Neuropsychiatric Genetics*, 162B, 431-438.
- Partinen, M., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Putkonen, P. & Langinvainio, H. 1983. Genetic and environmental determination of human sleep. *Sleep*, 6, 179-185.
- Paschos, G. K., Ibrahim, S., Song, W. L., Kunieda, T., Grant, G., Reyes, T. M., Bradfield, C. A., Vaughan, C. H., Eiden, M., Masoodi, M., Griffin, J. L., Wang, F., Lawson, J. A. & Fitzgerald, G. A. 2012. Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nature Medicine*, 18, 1768-1777.

- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P., Daly, M. & Sham, P. 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 559-575.
- Randler, C., Stadler, L., Vollmer, C. & Diaz-Morales, J. F. 2012. Relationship between depressive symptoms and sleep duration/chronotype in women. *Journal of Individual Differences*, 33, 186-191.
- Roenneberg, T., Allebrandt, K. V., Merrow, M. & Vetter, C. 2012. Social jetlag and obesity. *Current Biology*, 22, 939-943.
- Roenneberg, T., Keller, L. K., Fischer, D., Matera, J. L., Vetter, C. & Winnebeck, E. C. 2015. Human activity and rest in situ. *Methods in Enzymology*, 552, 257-283.
- Roenneberg, T., Kuehne, T., Pramstaller, P. P., Ricken, J., Havel, M., Guth, A. & Merrow, M. 2004. A marker for the end of adolescence. *Current Biology*, 14, R1038-1039.
- Roenneberg, T., Wirz-Justice, A. & Merrow, M. 2003. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, 18, 80-90.
- Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B. & Fitzgerald, G. A. 2004. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biology*, 2, e377.
- Rünkorg, K. 2011. Kehakaalu ja toitekätumise regulatsiooni füsioloogilised mehhanismid. *Eesti Arst*, 90, 75-83.
- Santhi, N., Thorne, H. C., van der Veen, D. R., Johnsen, S., Mills, S. L., Hommes, V., Schlangen, L. J., Archer, S. N. & Dijk, D. J. 2012. The spectral composition of evening light and individual differences in the suppression of melatonin and delay of sleep in humans. *Journal of Pineal Research*, 53, 47-59.
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., Naik, K. A., FitzGerald, G. A., Kay, S. A. & Hogenesch, J. B. 2004. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43, 527-537.
- Scheer, F. A. & Czeisler, C. A. 2005. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Medicine Reviews*, 9, 5-9.
- Scheer, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S. & Shea, S. A. 2009. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *PNAS*, 106, 4453-4458.
- Schibler, U. & Sassone-Corsi, P. 2002. A web of circadian pacemakers. *Cell*. United States.
- Schwer, B. & Verdin, E. 2008. Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell Metabolism*, 7, 104-112.
- Sepahvand, E., Jalali, R., Mirzaei, M. & Kargar Jahromi, M. 2015. Association between short sleep and body mass index, hypertension among acute coronary syndrome patients in coronary care unit. *Global Journal of Health Science*, 7, 40582.
- Shi, M. & Zheng, X. 2013. Interactions between the circadian clock and metabolism: there are good times and bad times. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 45, 61-69.
- Sklar, P., Ripke, S., Scott, L. J. & al., e. 2011. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature Genetics*, 43, 977-983.
- Sookoian, S., Gemma, C., Gianotti, T. F., Burgueno, A., Castano, G. & Pirola, C. J. 2008. Genetic variants of Clock transcription factor are associated with individual susceptibility to obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 1606-1615.
- Soria, V., Martínez-Amorós, È., Escaramís, G., Valero, J., Pérez-Egea, R., García, C., Gutiérrez-Zotes, A., Puigdemont, D., Bayés, M., Crespo, J. M., Martorell, L., Vilella, E., Labad, A., Vallejo, J., Pérez, V., Menchón, J. M., Estivill, X., Gratacòs, M. & Urretavizcaya, M. 2010. Differential Association of Circadian Genes with Mood Disorders: CRY1 and NPAS2 are Associated with Unipolar Major Depression and CLOCK and VIP with Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1279-1289.
- Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. 2001. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science*, 291, 490-493.
- Stranges, S., Dorn, J. M., Cappuccio, F. P., Donahue, R. P., Rafalson, L. B., Hovey, K. M., Freudenheim, J. L., Kandala, N. B., Miller, M. A. & Trevisan, M. 2010. A population-based study of reduced

- sleep duration and hypertension: the strongest association may be in premenopausal women. *Journal of Hypertens*, 28, 896-902.
- Sung, H. Y., Francis, S. E., Crossman, D. C. & Kiss-Toth, E. 2006. Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunology Letters*, 104, 171-177.
- Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T. & Mignot, E. 2004. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Medicine*, 1, e62.
- Thompson, J. R., Attia, J. & Minelli, C. 2011. The meta-analysis of genome-wide association studies. *Briefings in Bioinformatics*, 12, 259-269.
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S. & Bass, J. 2005. Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice. *Science*, 308, 1043-1045.
- Ueda, H. R., Chen, W., Minami, Y., Honma, S., Honma, K., Iino, M. & Hashimoto, S. 2004. Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles. *PNAS*, 101, 11227-11232.
- Van Cauter, E., Spiegel, K., Tasali, E. & Leproult, R. 2008. Metabolic consequences of sleep and sleep loss. *Sleep Medicine*, 9 Suppl 1, S23-28.
- van Leeuwen, W. M., Lehto, M., Karisola, P., Lindholm, H., Luukkonen, R., Sallinen, M., Härmä, M., Porkka-Heiskanen, T. & Alenius, H. 2009. Sleep restriction increases the risk of developing cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *PLoS One*, 4, e4589.
- Vgontzas, A. N., Fernandez-Mendoza, J., Bixler, E. O., Singareddy, R., Shaffer, M. L., Calhoun, S. L., Liao, D., Basta, M. & Chrousos, G. P. 2012. Persistent insomnia: the role of objective short sleep duration and mental health. *Sleep*, 35, 61-68.
- Vgontzas, A. N., Zoumakis, E., Bixler, E. O., Lin, H. M., Follett, H., Kales, A. & Chrousos, G. P. 2004. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89, 2119-2126.
- Watanuki, S. & Kim, Y. K. 2005. Physiological responses induced by pleasant stimuli. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*, 24, 135-138.
- Watson, N. F., Buchwald, D., Vitiello, M. V., Noonan, C. & Goldberg, J. 2010. A twin study of sleep duration and body mass index. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 6, 11-17.
- Wheler, G. H., Weller, J. L. & Klein, D. C. 1979. Taurine: stimulation of pineal N-acetyltransferase activity and melatonin production via a beta-adrenergic mechanism. *Brain Research*, 166, 65-74.
- Wilson, P. W., D'Agostino, R. B., Parise, H., Sullivan, L. & Meigs, J. B. 2005. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 112, 3066-3072.
- Witters, L. A., Gao, G., Kemp, B. E. & Quistorff, B. 1994. Hepatic 5'-AMP-activated protein kinase: zonal distribution and relationship to acetyl-CoA carboxylase activity in varying nutritional states. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308, 413-419.
- Woon, P. Y., Kaisaki, P. J., Braganca, J., Bihoreau, M. T., Levy, J. C., Farrall, M. & Gauguier, D. 2007. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *PNAS*, 104, 14412-14417.
- Yaggi, H. K., Araujo, A. B. & McKinlay, J. B. 2006. Sleep duration as a risk factor for the development of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 29, 657-661.
- Young, E. & Korszun, A. 2010. Sex, trauma, stress hormones and depression. *Molecular Psychiatry*, 15, 23-28.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<http://www.thefreedictionary.com/metabolomics>

<http://sleepfoundation.org/sites/default/files/2014-NSF-Sleep-in-America-poll-summary-of-findings---FINAL-Updated-3-26-14-.pdf>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/775>

<http://www.illumina.com/applications/genotyping/human-genotyping-arrays/omni-arrays.html>

<http://www.toomashaller.com/RELOUT.html>

<http://www.statcan.gc.ca/edu/power-pouvoir/ch3/imputation/5214784-eng.htm>

<http://www.1000genomes.org/announcements/initial-phase-3-variant-list-and-phased-genotypes-2014-06-24>

https://mathgen.stats.ox.ac.uk/genetics_software/snptest/snptest.html

<http://csg.sph.umich.edu/abecasis/Metal/>

<http://www.well.ox.ac.uk/~cfreeman/software/gwas/gtool.html>

<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/metabolic-syndrome/basics/tests-diagnosis/con-20027243>

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=2:62429584-62430584;v=rs7584248;vdb=variation;vf=5292061

https://mathgen.stats.ox.ac.uk/genetics_software/snptest/snptest.html#conditional_tests

<http://www.genome.gov/gwastudies/>

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000186889;r=2:62500221-62511894

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000186889-TMEM17/tissue>

http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=26623

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=8:41294902-41295902;v=rs138952930;vdb=variation;vf=30291402

<http://www.genome.gov/gwastudies/index.cfm?pageid=26525384#searchForm>

<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000104332-SFRP1/tissue>

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/SecondaryStructure?g=ENSG00000221402;r=10:120124132-120124226;t=ENST00000408475

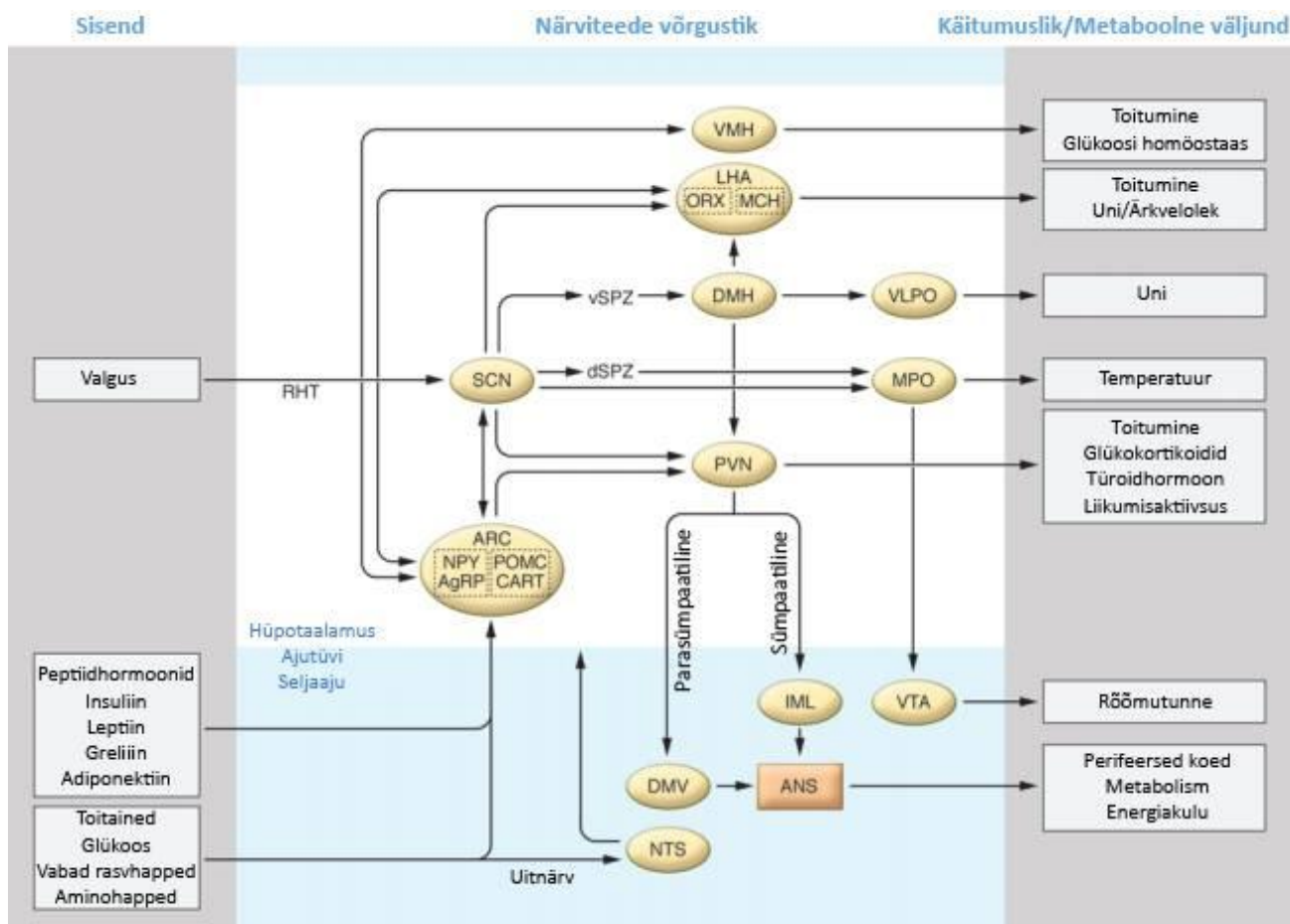
http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=10:120181773-120182773;v=rs149249098;vdb=variation;vf=3926492

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4915>

http://www.tymri.ut.ee/sites/default/files/www_ut/bak2013_jaanika_moro.pdf

LISAD

Lisa 1. T sirkadiaanse rütmi ja energiavahetuse kontrollis olulisust omavate närviteede skeem (Huang jt., 2011, kohandatud).



Kesknärvisüsteem saab valgus- ja metaboolseid signaale. Valgus jõuab SCN-ni läbi reetina ja hüpotalamuse vahelise närviühenduse (RHT), mis omakorda saadab närviimpulsi regioonidele hüpotalamuses ja ajutüves, mis on olulised energia homöostaasis ja unes: kaartuum (ARC), paraventrikulaarne tuum (PVN) ja ventrolateraalne preoptiline tuum (VLPO). Lisaks saab hüpotalamus ka metaboolseid signaale (peptiidhormoonid, toitainetest tulenevad metaboliidid jne), mis samuti mõjutavad info ülekannet. Eksogeensed signaalid (nt valgus) ja endogeensed signaalid (nt metabolism) integreeruvad kesknärvisüsteemi tasemel. Integratsiooni väljundiks on une- ja ärkveloleku ning erinevate metaboolsete protsesside tulemite (nt termogenees, toitekäitumine, hormoonide sekretsioon ja liikumisaktiivsus) rütmilisus. LHA- lateraalne hüpotalamus, ORX- oreksiin, MCH- melanotsüüte kontsentreeriv hormoon, DMH- dorsomedialne hüpotalamuse tuum, MPO- mediaalne preoptiline ala, dSPZ- dorsaalne subparaventrikulaartsoon, vSPZ- ventraalne subparaventrikulaartsoon, IML- intermediolateraalne tuum, VTA- ventraalne tegemnetaalne ala, DMV- dorsomedialne nucleus vagus, ANS- autonoomne närvisüsteem, NTS- nucleus tractus solitarius

Lisa 2. Geneetiliselt modifitseeritud tsirkadiaansed mutandid ning neile vastav tsirkadiaanne ja metaboolne fenotüüp (Gooley ja Chua, 2014, Eckel-Mahan ja Sassone-Corsi, 2013, kohandatud).

Geen	Koespetsiifiline KO	Tsirkadiaanne fenotüüp	Metaboolne fenotüüp	Viide
<i>Bmall</i>	Ei	Aktiivsuse rütmi kadumine DD tingimustes, muutunud vastus valgusele	Vähenenud aktiivsus LD tingimustes, kahanenud eluiga ja kiirenenud vananemine	(Lamia jt., 2008) (Kondratov jt., 2006) (Rudic jt., 2004)
<i>Bmall</i>	Jah, pankreas	-	Glükoosi talumatus, hüpoinsulineemia	(Marcheva jt., 2010)
<i>Bmall</i>	Jah, maks	-	Paastumise/päevase aja hüpoglükeemia, suurenenud insuliin-indutseeritud hüpoglükeemia	(Lamia jt., 2008)
<i>Bmall</i>	Jah, rasvkude	-	Rasvumine, ringlevate polüküllastamata rasvhapete tasemete langus	(Paschos jt., 2012)
<i>Clock</i>	Ei	Natuke pikem periood DD tingimustes, halvenenud rütmi hoidmine ja vastus valgusele LD tingimustes	Osaline <i>diabetes insipidus</i> , vähenenud vererõhk ja kergelt vähenenud eluiga	(Dallmann jt., 2011)
<i>Clock^{Δ19}</i>	Ei	Pikem periood DD tingimustes, hiljem rütmi kadu	Suurenenud seerumi TG, häiritud glükoosi sensitiivsus, rasvumine, kõrge kalorlusega dieedi korral madal TG tase maksas, vähenenud pankrease saarekeste suurus ja proliferatsioon	(Marcheva jt., 2010) (Turek jt., 2005)
<i>Clock/Npas2</i>	Ei	Rütmi puudumine DD tingimustes	-	(DeBruyne jt., 2007)
<i>Ck1ε</i> (tau mutatsioon)	Ei	Lühenenud periood DD tingimustes, kahjustunud rütmi hoidmine	-	(Lowrey jt., 2000)
<i>Ck1δ</i>	Ei	Embrüonaalselt letaalne	-	(Etchegaray jt., 2009)

<i>Cklδ</i>	Jah, maks	Lokaalne perioodi lühenemine	-	(Etchegaray jt., 2009)
<i>Cry1/Cry2</i>	Ei	Rütmi puudumine DD tingimustes, ülitundlikkus valgusele	Glükoosi talumatus, tõusnud ringlevate kortikosteronide hulk	(Lamia jt., 2008)
<i>Npas2</i>	Ei	Parem kohanemine valguse rütmile	Suurenenud öine jooksuratta kasutamise aktiivsus, hilinevad FFA aktiivsus	(DeBruyne jt., 2007)
<i>Per1</i>	Ei	Lühem periood DD tingimustes, halvenenud vastus valgusele	-	(Albrecht jt., 2001)
<i>Per2</i>	Ei	Lühem periood, millele järgneb arütmia DD tingimustes, halvenenud vastus valgusele	Kahjustunud lipiidide metabolism: vähenenud ringlevate TG ja FFA-de hulk, suurenenud adipogenees	(Grimaldi jt., 2010)
<i>Per3</i>	Ei	Kerge perioodi lühenemine DD tingimustes	Suurenenud rasvkoe mass ja glükoosi talumatus	(Costa jt., 2011)
<i>Per1/Per2</i>	Ei	Rütmi puudumine DD tingimustes	Glükoosi talumatus, suurenenud insuliin-indutseeritud hüperglükeemia	(Lamia jt., 2008)
<i>Pgc-1α</i>	Ei	Kerge perioodi pikenedamine DD tingimustes	Resistentne kõrgekalorlusega toidu indutseeritud rasvumisele, alanenud termogenees, defektne termogenees	(Liu jt., 2007)
<i>Rev-erba</i>	Ei	Kergelt lühem aktiivsusperiood DD tingimustes, halvenenud vastus valgusele	Muutunud TG tasemed maksas, Kõrge plasma LDL, madal sapphappe tootlikkus, maksa steatoos	(Bugge jt., 2012)
<i>Rev-erba/rev-erbβ</i>	Ei	Varajasema faasiga rütm, lühem periood DD tingimustes	Hüperglütseemia, hüperlipideemia, tõsine maksa steatoos	(Bugge jt., 2012)
<i>Rora</i>	Ei	Kerge perioodi lühenemine DD tingimustes	Suurenenud HDL ja maksa TG tasemed, kiirenenud ateroskleroosi teke	(Mamontova jt., 1998)

DD- konstantne pimedus 24 tundi (*dark dark*), LD- normaalne ööpäev 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust (*light dark*), KO- *knockout*, TG- triglütseriidid (*triglycerides*), FFA- vabad rasvhapped (*free fatty acids*), LDL- madala tihedusega lipoproteiin (*low density lipoprotein*), HDL- kõrge tihedusega lipoproteiin (*high density lipoprotein*).

Lisa 3. Kõikide individuaalsete genotüüpiseerimiskiipidega teostatud GWAS analüüside ning ühendava metaanalüüsi kohorte iseloomustav tabel.

Kohort	Valimi suurus	Vanus (keskmine)		Keskmine KMI ± SD		Keskmine AvSD ± SD		Keskmine MSFscn ± SD		DST
		Kokku (mehed)	Mehed	Naised	Mehed	Naised	Mehed	Naised	Mehed	
Individuaalsed GWAS-id										
HumanOmniExpress	3226 (1532)	18-75 (44,5)	18-75 (43,3)	26,2 ± 3,89	25,2 ± 4,44	7,8 ± 1,00	7,9 ± 1,06	3,6 ± 1,21	3,6 ± 1,02	1413
Human370CNV	1124 (536)	18-75 (35,7)	18-75 (37,5)	25,3 ± 3,92	24,1 ± 3,94	7,9 ± 1,00	8,0 ± 1,07	4,1 ± 1,56	4,1 ± 1,61	599
HumanCoreExome-12 v1.0	3082 (1039)	18-76 (31,4)	18-75 (34,4)	24,7 ± 4,16	23,5 ± 5,15	7,9 ± 0,99	8,0 ± 1,00	4,3 ± 1,25	4,0 ± 1,08	1635
Metaanalüüs										
HumanOmniExpress	3226 (1532)	18-75 (44,5)	18-75 (43,3)	26,2 ± 3,89	25,2 ± 4,44	7,8 ± 1,00	7,9 ± 1,06	3,6 ± 1,21	3,6 ± 1,02	1413
Human370CNV	1002 (473)	18-75 (35,9)	18-75 (37,6)	25,2 ± 3,89	24,1 ± 3,97	7,8 ± 0,99	8,0 ± 1,07	4,1 ± 1,58	4,1 ± 1,60	539
HumanCoreExome-12 v1.0	2440 (767)	18-76 (31,1)	18-75 (34,7)	24,8 ± 4,32	23,7 ± 5,24	7,9 ± 1,02	8,0 ± 0,99	4,3 ± 1,26	4,0 ± 1,07	1327
Metaanalüüsis kokku	6668 (2772)	18-76 (39,3)	18-75 (38,8)	25,7 ± 4,07	24,2 ± 4,80	7,8 ± 1,00	8,0 ± 1,04	3,9 ± 1,34	3,8 ± 1,16	3279

AvSD- nädala keskmine une pikkus, DST- andmed kogutud suveajal (*daylight saving time*), MSFscn- unevõla suhtes korrigeeritud une keskaeg puhkepäevadel, SD- standardhälve

Lisa 4.

A) Une kestuse ja haiguste vaheliste trendide kirjeldamise valimit iseloomustavad tabelid (N = 21 068 indiviidi, 6929 meest, suveajal kogutud andmeid 10 480).

Tunnus	Min	Max	Keskväärtus	Mediaan	SD
Vanus (aastad)	25	75	46,87	46	13,71
Keskmine une pikkus (AvSD, tunnid)	4,00	12,00	7,76	7,81	1,05
Une puudujääk (deltaMS, tunnid)	0,00	8,38	0,97	0,92	0,87
Kronotüüp (MSFscn, tunnid)	-0,99	9,38	3,46	3,42	1,04
Kehamassiindeks	13,34	64,17	26,61	25,83	5,19

Haigus	Skisofreenilised haigused (F20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29)	Meeleoluhäired (F30, 31, 32, 33, 34, 38, 39)	Unehäired (F47.0, 47.1, 47.2, 47.3, 47.4, 47.8, 47.9)	Epilepsia (G40)	Migreenid (G43.0, 43.1)	Peajuveresoonte haigused (I60, 61, 62, 63, 64, 65)
N	149	1998	152	262	165	229
Haigus	Primaarne hüpertensioon (I10)	Südamekahjustusega hüpertoonia-tõbi (I11)	Südame isheemiatõved (I20, 21, 22, 25)	T1D (E10)	T2D (E11)	Psoriaas (L40)
N	2596	1756	991	166	665	549

min- miinimum, max- maksimum, N- arvukus, SD- standardhälve

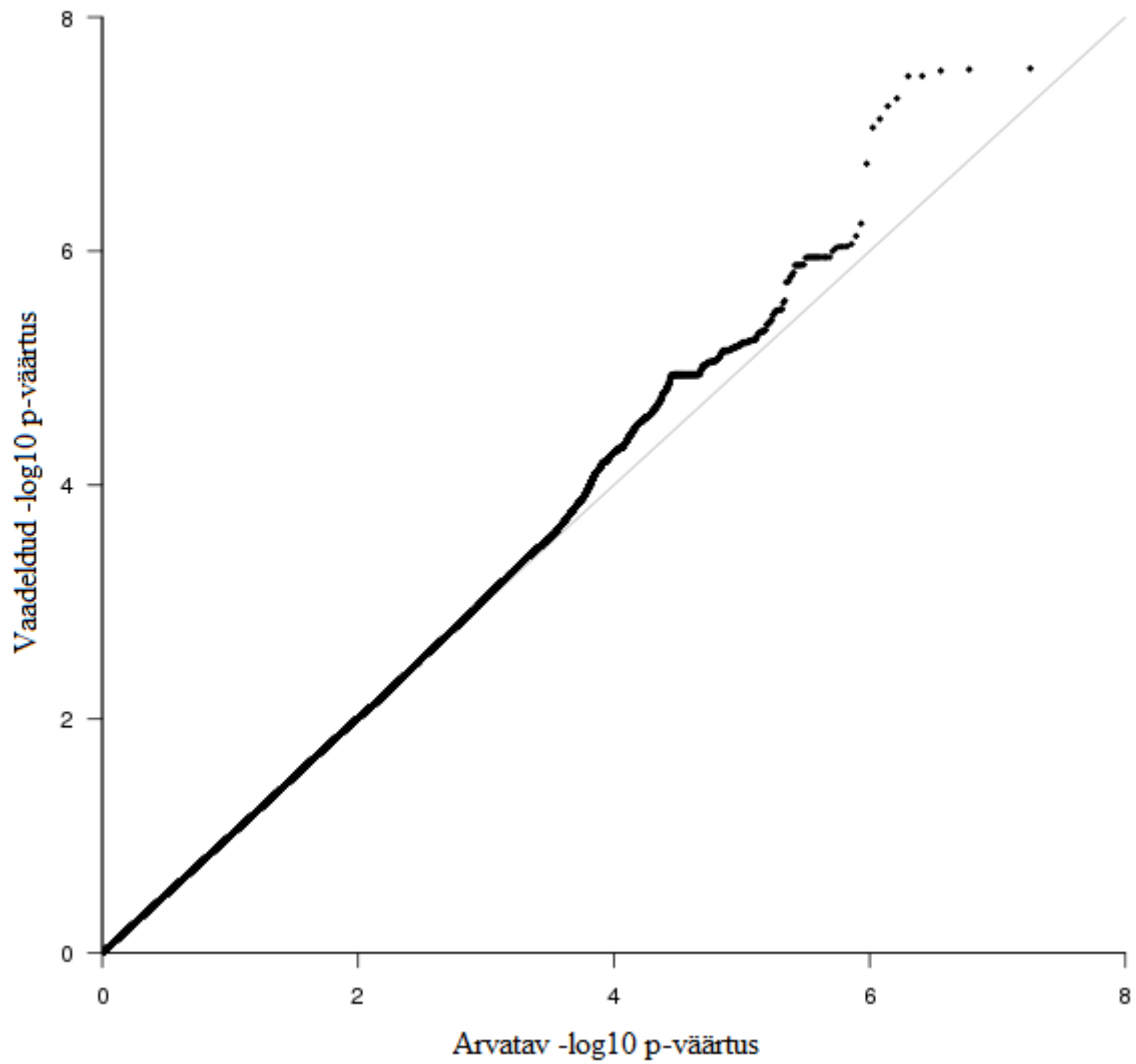
*Haigused on nimetatud RHK-10 koodi järgi (T1D- I tüüpi diabeet, T2D- II tüüpi diabeet)

B) Une kestuse ja metaboolse sündroomi vahelise trendi kirjeldamise valimit iseloomustav tabel (6375 indiviidi, 2411 meest, suveajal kogutud andmeid 2682, metaboolse sündroomiga indiviide 956).

Tunnus	Min	Max	Keskväärtus	Mediaan	SD
Vanus (aastad)	18	103	44,78	44	17,44
Keskmine une pikkus (AvSd, tunnid)	4,0	12,5	7,82	7,86	1,12
Une puudujääk (deltaMS, tunnid)	0	8,38	1,04	1,0	0,97
Kronotüüp (MSFscn, tunnid)	-0,99	9,58	3,55	3,43	1,20
Kehamassiindeks	14,79	56,92	26,04	25,06	5,27

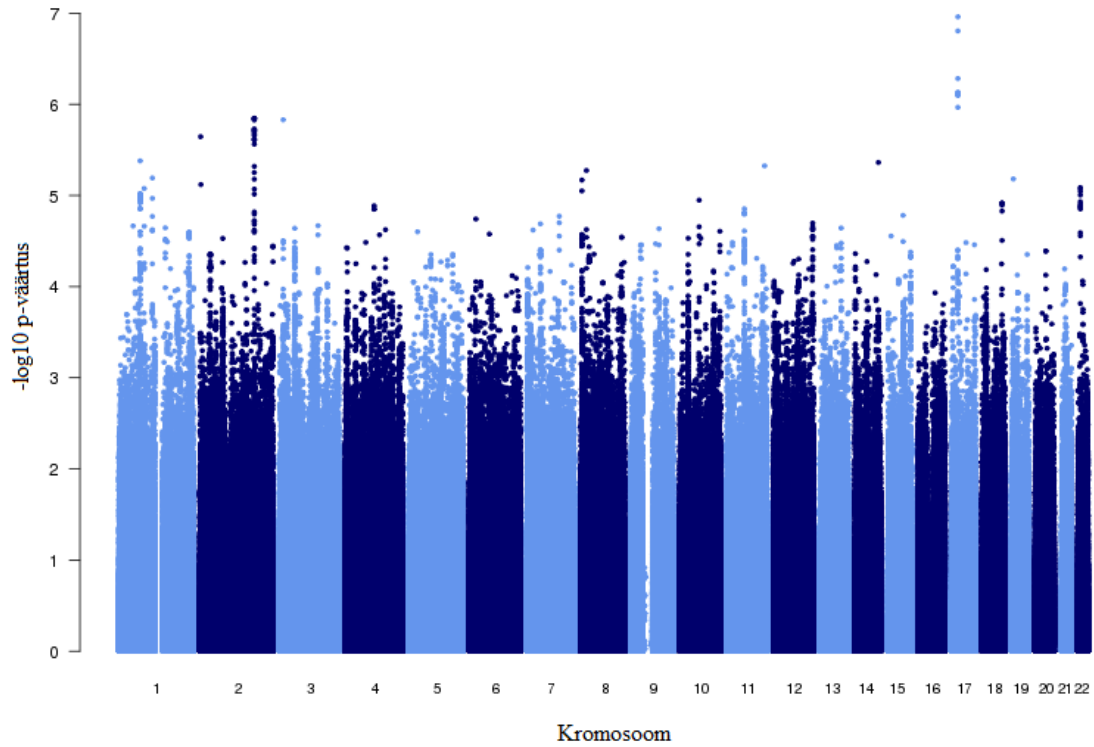
min- miinimum, max- maksimum, SD- standardhälve

Lisa 5. HumanOmniExpress genotüpiseerimiskiibiga läbi viidud GWAS uuringu *QQ plot* (3226 indiviidi). Populatsiooni stratifikatsiooni iseloomustav parameeter $\lambda = 1,011$.

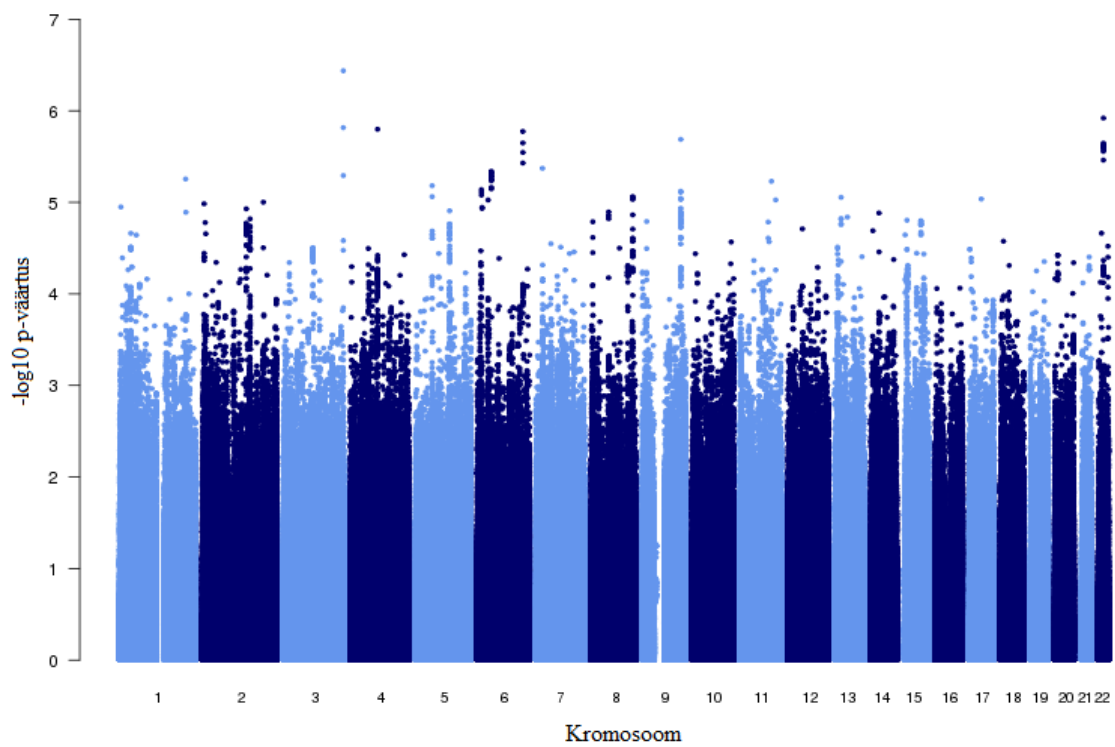


Lisa 6. Human370CNV (A joonis) ja HumanCoreExome-12 v1.0 (B joonis) genotüpiseerimiskiipidega läbiviidud GWAS analüüside tulemuste *Manhattan plot* joonised.

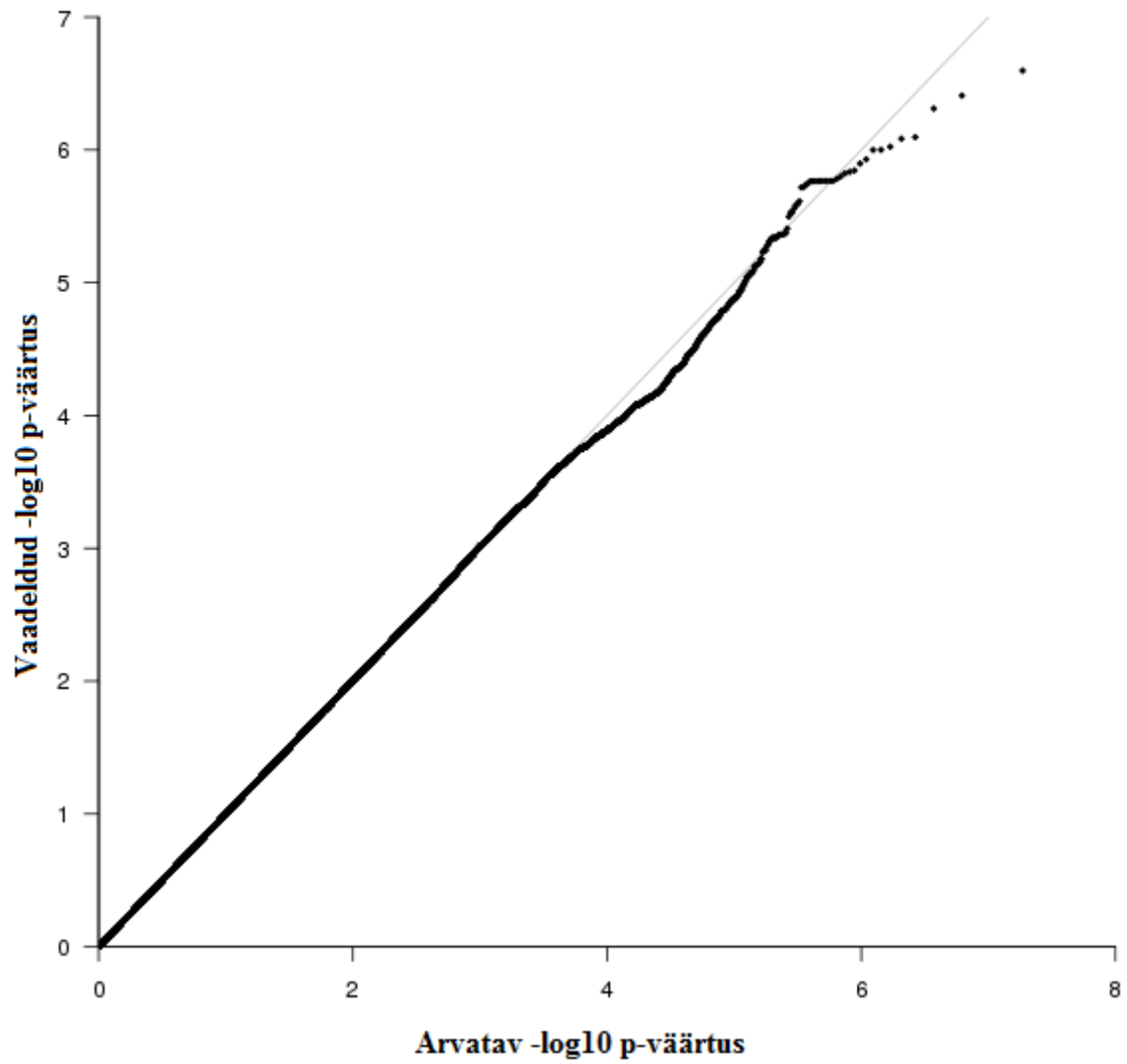
A)



B)



Lisa 7. Metaanalüüsi *QQ* plot (6668 indiviidi). Populatsiooni stratifikatsiooni iseloomustav parameeter λ jääbi kõigi kolme kohordi puhul vahemikku 1,001–1,011.



Lisa 8. Nädala keskmise une kestuse ja erinevate kardiometaboolsete ning psühhiaatriliste- ja meeleoluhäirete esinemiste vahelisi trende kirjeldavate mudelite väljundid. Statistilise olulisuse kood on järgmine: 0,001 ***, 0,01 ** ja 0,05 *.

Essentsiaalne primaarne hüpertensioon (I10)

```
glm(formula = I10 ~ factor(AvSDgrupid) + age + factor(gender) +
  BMI + age * factor(gender), family = binomial())
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.1921	-0.5470	-0.3766	-0.2268	3.1281

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-5.950817	0.199365	-29.849	< 2e-16 ***
factor(AvSDgrupid)6kuni7	-0.007835	0.097938	-0.080	0.93624
factor(AvSDgrupid)7kuni8	-0.048650	0.091848	-0.530	0.59633
factor(AvSDgrupid)8kuni9	-0.131446	0.095105	-1.382	0.16693
factor(AvSDgrupid)>9	-0.466326	0.120546	-3.868	0.00011 ***
age	0.028854	0.002619	11.017	< 2e-16 ***
factor(gender)2	-1.935148	0.192696	-10.042	< 2e-16 ***
BMI	0.100722	0.004064	24.785	< 2e-16 ***
age:factor(gender)2	0.031334	0.003506	8.937	< 2e-16 ***

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
 Null deviance: 15729 on 21067 degrees of freedom
 Residual deviance: 13736 on 21059 degrees of freedom. AIC: 13754

Skisofreenia, skisotüüpsed ja luululised häired (F20–F29)

```
glm(formula = F20_29 ~ factor(AvSDgrupid) + age + I(age^2) +
  factor(gender) + deltaMS, family = binomial())
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.3641	-0.1285	-0.0996	-0.0765	3.9617

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-1.028e+01	1.326e+00	-7.749	9.29e-15 ***
factor(AvSDgrupid)6kuni7	-2.612e-01	4.310e-01	-0.606	0.544495
factor(AvSDgrupid)7kuni8	-3.065e-01	3.966e-01	-0.773	0.439651
factor(AvSDgrupid)8kuni9	2.557e-01	3.894e-01	0.657	0.511494
factor(AvSDgrupid)>9	1.467e+00	3.890e-01	3.771	0.000163 ***
age	2.421e-01	5.258e-02	4.605	4.12e-06 ***
I(age^2)	-2.507e-03	5.344e-04	-4.691	2.71e-06 ***
factor(gender)2	2.820e-01	1.855e-01	1.520	0.128461
deltaMS	-6.735e-01	1.377e-01	-4.893	9.95e-07 ***

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
 Null deviance: 1772.5 on 21067 degrees of freedom
 Residual deviance: 1658.6 on 21059 degrees of freedom. AIC: 1676.6

Meeleoluhäired (F30–F39)

```
glm(formula = F30_39 ~ factor(AvSDgrupid) + age + I(age^2) +
  factor(gender) + MSFscn, family = binomial())
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.6812	-0.5010	-0.4420	-0.3404	2.6367

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-5.0648046	0.3621382	-13.986	< 2e-16 ***
factor(AvSDgrupid)6kuni7	-0.1425742	0.1121408	-1.271	0.2036
factor(AvSDgrupid)7kuni8	-0.2472441	0.1044447	-2.367	0.0179 *
factor(AvSDgrupid)8kuni9	-0.2215681	0.1065751	-2.079	0.0376 *
factor(AvSDgrupid)>9	0.0375850	0.1215525	0.309	0.7572
age	0.0910387	0.0136470	6.671	2.54e-11 ***
I(age^2)	-0.0009188	0.0001393	-6.593	4.30e-11 ***
factor(gender)2	0.7617436	0.0586922	12.979	< 2e-16 ***
MSFscn	0.0976752	0.0249933	3.908	9.30e-05 ***

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
 Null deviance: 13213 on 21067 degrees of freedom
 Residual deviance: 12949 on 21059 degrees of freedom. AIC: 12967

Südame isheemiatõved (I20–I25)

```
glm(formula = I20_25 ~ factor(AvSDgrupid) + age + factor(gender) +  
BMI + age * factor(gender), family = binomial())
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-1.1652	-0.3013	-0.1489	-0.0748	3.6436

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-8.723829	0.355689	-24.527	< 2e-16 ***
factor(AvSDgrupid)6kuni7	-0.167131	0.144123	-1.160	0.2462
factor(AvSDgrupid)7kuni8	-0.227699	0.135486	-1.681	0.0928 .
factor(AvSDgrupid)8kuni9	-0.260348	0.141050	-1.846	0.0649 .
factor(AvSDgrupid)>9	0.116436	0.160426	0.726	0.4680
age	0.096262	0.004530	21.251	< 2e-16 ***
factor(gender)2	-2.754056	0.447509	-6.154	7.55e-10 ***
BMI	0.040520	0.006537	6.199	5.69e-10 ***
age:factor(gender)2	0.029916	0.007065	4.234	2.29e-05 ***

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
Null deviance: 7993.2 on 21067 degrees of freedom
Residual deviance: 6171.0 on 21059 degrees of freedom. AIC: 6189

Teist tüüpi diabeet (E11)

```
glm(formula = E11 ~ factor(AvSDgrupid) + MSFscn + age + factor(gender) +  
BMI + BMI * factor(gender), family = binomial())
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.6305	-0.2441	-0.1318	-0.0729	3.6729

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-12.464472	0.533099	-23.381	< 2e-16 ***
factor(AvSDgrupid)6kuni7	0.394055	0.188180	2.094	0.03626 *
factor(AvSDgrupid)7kuni8	0.142890	0.182138	0.785	0.43274
factor(AvSDgrupid)8kuni9	0.248033	0.187100	1.326	0.18495
factor(AvSDgrupid)>9	0.593033	0.208681	2.842	0.00449 **
MSFscn	-0.134201	0.046200	-2.905	0.00367 **
age	0.079185	0.004053	19.537	< 2e-16 ***
factor(gender)2	0.510706	0.472193	1.082	0.27945
BMI	0.178165	0.012190	14.615	< 2e-16 ***
factor(gender)2:BMI	-0.036241	0.014913	-2.430	0.01509 *

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
Null deviance: 5904.9 on 21067 degrees of freedom
Residual deviance: 4587.2 on 21058 degrees of freedom. AIC: 4607.2

Metaboolne sündroom

```
glm(formula = Mets ~ factor(AvSDgrupid3) + age + factor(gender) +  
BMI + BMI * factor(gender), family = binomial())
```

Deviance Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3.7390	-0.3895	-0.1867	-0.0877	2.9886

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-18.150947	0.799344	-22.707	< 2e-16 ***
factor(AvSDgrupid3)7kuni8	-0.101767	0.118138	-0.861	0.389
factor(AvSDgrupid3)>8	-0.032080	0.119340	-0.269	0.788
age	0.046455	0.003039	15.284	< 2e-16 ***
factor(gender)2	6.468480	0.829861	7.795	6.46e-15 ***
BMI	0.492467	0.025119	19.605	< 2e-16 ***
factor(gender)2:BMI	-0.228601	0.027483	-8.318	< 2e-16 ***

(Dispersion parameter for binomial family taken to be 1)
Null deviance: 5388.7 on 6374 degrees of freedom
Residual deviance: 3156.8 on 6368 degrees of freedom. AIC: 3170.8

LIHTLITSENTS

Mina, Jaanika Moro

(sünnikuupäev: 31. 05. 1990)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Ülegenoomne assotsiatsiooniuuring une kestust määravate geneetiliste faktorite
identifitseerimiseks Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu andmetel

Une kestuse seos terviseseisunditega“,

mille juhendajad on Maris Teder–Laving ja Andres Metspalu,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26. 05. 2015