

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

Anette Kalnapenkis

Tsirkadiaansete geenide funktsiooni uurimine, kasutades nende ekspressiooni mõjutavate kvantitatiivsete tunnuste lookuste seost metaboliitidega

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Reedik Mägi, PhD

Eva Reinmaa, MSc

Maris Teder-Laving, MSc

TARTU 2015

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID	3
SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Bioloogilised rütmid	6
1.2. Tsirkadiaansed rütmid	6
1.3. <i>Zeitgeberi</i> signaalid	6
1.4. Tsirkadiaansete rütmide hindamine.....	7
1.5. Häired	8
1.6. Tsirkadiaanse kella ülesehitus	10
1.7. Tsirkadiaanse kella molekulaarne mehhanism	13
1.8. Ekspressiooni kvantitatiivsete tunnuste lookused	15
1.8.1. eQTL jaotus	16
1.8.1.1. <i>Cis</i> -eQTL	16
1.8.1.2. <i>Trans</i> -eQTL	17
1.9. Metaboliidid.....	18
2. EKSPERIMENTAALOSA	19
2.1. Töö eesmärk	19
2.2. Materjal ja meetodika	19
2.2.1. Geeniekspressiooni andmed	20
2.2.2. Genotüpiseerimisandmed.....	21
2.2.3. Metaboliitide andmed	21
2.2.4. Analüüsi plaan	22
2.3. Tulemused	23
2.4. Arutelu	27
KOKKUVÕTE.....	30
SUMMARY	31
TÄNUAVALDUSED	32
KIRJANDUSE LOETELU	33
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	38
LISA 1.	39
LIHTLITSENTS	43

KASUTATUD LÜHENDID JA TERMINID

<i>Bmal1</i>	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (Arntl)</i> , heeliks-ling-heeliks- PAS transkriptsioonifaktorit kodeeriv geen, mis mõjutab tsirkadiaanseid rütme
CCG	<i>Clock-controlled genes</i> , tsentraalsete kellageenide poolt kontrollitud geenid
CK1	<i>Casein kinase1</i> , kaseiini kinaas 1
<i>Clock</i>	<i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i> , heeliks-ling-heeliks-PAS transkriptsioonifaktorit kodeeriv geen, mis mõjutab tsirkadiaanseid rütme
CR	<i>Call rate</i> , edukalt genotüüpiseeritud markerite osakaal
CRE	<i>Cis-regulatory element</i> , cis-regulatoorne element, mittekodeeriva DNA piirkond, mis reguleerib läheduses asuvate geenide transkriptsiooni
EGCUT	<i>Estonian Genome Center, University of Tartu</i> , Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu
eQTL	<i>Expression quantitative trait loci</i> , ekspressiooni kvantitatiivse tunnuse lookused
FBXL3	<i>F-box/LRR-repeat protein 3</i> , valk, mida inimestel kodeerib <i>FBXL3</i> geen
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> , ülegenoomne assotsiatsiooniuring
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i> , Hardy-Weinbergi tasakaalustatus
KORA F4	<i>Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg</i> , Kooperatiivne Augsburgi Terviseuuring aastatel 2006-2007
MAF	<i>Minor allele frequency</i> , minoorse alleeli sagedus
Mb	<i>Megabase</i> , miljon aluspaari
MS	<i>Mass spectrometry</i> , massispektromeetria
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> , tuumamagnetresonants-spektroskoopia
<i>PCK2</i>	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2</i> , fosfoenoolpüruvaadi karboksükinaas 2 geen
<i>Per</i>	<i>Period gene</i> , period valku kodeeriv geen
PheWAS	<i>Phenome-wide association study</i> , üle-fenotüübiline assotsiatsiooniuring
REV-ERB α	Nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (<i>NR1D1</i>) ehk Nr1d1, valk, mida inimestel kodeerib <i>NR1D1</i> geen

ROR	<i>RAR-related orphan receptor</i> , rakusiseste transkriptsioonifaktorite tuumretseptorite perekonna liige
SCF	<i>Skp-Cullin-F-Box protein complex</i> , valkude kompleks ubikvitineeritava märklauuga interakteerumiseks
SCN	<i>Suprachiasmatic nucleus</i> , suprakiasmaatiline tuum
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , ühenukleotiidne polümorfism
β-TrCP	<i>F-box/WD repeat-containing protein 1A</i> (FBXW1A) ehk Fbxw1, valk, mida inimestel kodeerib BTRC (<i>beta-transducin repeat containing</i>) geen

SISSEJUHATUS

Bioloogilised rütmid sünkroniseerivad käitumuslikke, biokeemilisi ja füsioloogilisi protsesse keskkondlikele muutustele vastavalt. See võimaldab organismil kohaneda, oodata ja vastata efektiivsemalt väliskeskkonna muutustele. Paljud füsioloogilised protsessid ja parameetrid nagu kehatemperatuur, une- ja ärkveloleku tsüklid, toitumine ning mitmed teisedki on rütmilised. Rütmilisus ilmneb ühtlasi eelnevaid protsesse kontrollivate geenide transkriptsioonilises ekspressioonis (Sukumaran *et al.*, 2010).

Biotehnoloogia ja –informaatika kiire areng lähiminevikus on võimaldanud rakendada uusi meetodeid, mille abil on võimalik teostada suuremahulisi andmeanalüüse. Ekspressiooni kvantitatiivse tunnuse lookuste uuringu abil saab andmeanalüüsil ühendada genotüüpiseerimisandmed ning geeniekspressiooni andmed.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu doonorite andmete põhjal uurida tsirkadiaanse rütmiga geenide funktsioone, kasutades kirjandusallikaid, ning detekteerida ülegenoomselt paiknevaid markereid, mis avaldavad mõju nende ekspressioonitasemele ja uurida markerite seost metaboliitidega.

Märksõnad: eQTL, tsirkadiaansed geenid, metaboliidid, SNP

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Bioloogilised rütmid

Bioloogilised rütmid on üldlevinud fenomeniks kõikidel elusorganismidel, tsüanobakteritest kuni inimesteni. Rütme klassifitseeritakse nende ajalise kestvuse järgi ultradiaanseteks, infradiaanseteks ja tsirkadiaanseteks. Rütme, mis vältavad üle 24 tunni, nimetatakse ultradiaanseteks (Merica & Fortune, 2004). Alla 24 tunni kestvad rütmid on infradiaansed. Uni jaguneb mitmeteks lühemateks tsükliteks, olles sellest tulenevalt ka infradiaansete omadustega. Mitmed rakutasandil toimuvad protsessid on pidevad ning kestavad alla 24 tunni. Ligikaudu 24 tundi vältavad rütmid on tsirkadiaansed (*circa diem*, lad k) (Sukumaran, 2010).

1.2. Tsirkadiaansed rütmid

Tsirkadiaanseid rütme sünkroniseerib organism nii enda kui ka väliste keskkonnatingimuste järgi, millest olulisim on öö ja päeva vaheldumine. Pittendrighi ja Bruce'i „tsirkadiaanse resonantsi hüpoteesi“ kohaselt elusorganismid, kelle sisemine ajatunnetus ühtib väliskeskkonna ajatunnetusega, tulevad eluga „paremini“ toime (Pittendrigh, 1960). Väliseid faktoreid nimetatakse *zeitgeber*iteks (ajaandja, sks k), mis on ühtlasi vajalikud organismi sisemiste protsesside reguleerimiseks (Hofstra & de Weerd, 2008). Geeniekspressiooni kiipide uuringutes on selgunud, et igas koes ligikaudu 10% transkriptidest on tsirkadiaanse kontrolli all (Akhtar *et al.*, 2002; Duffield *et al.*, 2002; Panda *et al.*, 2002; Storch *et al.*, 2002).

1.3. *Zeitgeberi* signaalid

Tsirkadiaansete faaside täpseks reguleerimiseks 24-tunnisteks tsükliteks, peab tsirkadiaanset kella kohandama igapäevaselt. Kohandamine on võimalik *zeitgeber*itega, milleks on sealhulgas ajastatud uni, aktiivsus, temperatuur ning välised sotsiaalsed signaalid nagu kellaeg ja toidukorrad. Kõige tugevam *zeitgeber* on valgus, mille püüavad kinni spetsiaalsed fotoretseptorid reetinas asuvates ganglionirakkudes. Signaal liigub reetinast mööda neuroanatomilist rada, mida nimetatakse retinohüpotalaamiliseks traktiks, tsirkadiaanse kella peamisse regulatsioonikohta ajus, kus toimub kella kohandamine. Tsirkadiaanse kella seadistus sõltub valguse lainepikkusest, intensiivsusest, ajastusest, hulgast, mustri ja kestvusest (Hofstra & de Weerd, 2008). Valguse ajastus mõjutab tsirkadiaanset kella, kuid oodatava päevase valgusperioodi vältel seda ei ilmne. Valgusimpulss videviku ajal põhjustab faasi viivitust, kuid koidikul faasi edenemist. Sellest ilmneb, et tsirkadiaanne kell reguleerib enda tundlikkust välisele signaalile. Tundlikkus valgusele on iseloomulikuks tunnuseks kella funktsioonist erinevatel liikidel (Panda *et al.*, 2002).

Temperatuuri kompenseerimine on üks väljapaistvamaid tsirkadiaanse süsteemi tunnuseid. Väliskeskkonna temperatuuri mõõdukad variatsioonid ei mõjuta tsirkadiaanse ostsillatsiooni perioodi pikkust (Brown *et al.*, 2002).

Zeitgeberi puudumisel on tsirkadiaanne rütm „vabajooksuga“, perioodilisus erineb veidi tavapära 24-tunnistest tsüklitest. Manchesteri Ülikoolis viidi 1973. aastal läbi katse, mille korral seitse üksikut katsealust ning kaks neljast gruppi katsealuseid olid 5-13 päeva isolatsiooniruumis. Katsealused polnud teadlikud kellaajast ega öö ja päeva vaheldumisest. Tulemustest järeldus, et ainult kolm üksikut katsealust ning üks neljane grupp võtsid omaks 25-27-tunnise rütmi. Uuringus mõõdeti uriini koostisosasid (naatrium, kloriid, kaalium, kaltsium, fosfaat) ja kehatemperatuuri (Mills *et al.*, 1974). Lisaks toimus juba 1977. aastal esimene uuring tuvastamaks tsirkadiaansete häirete olemasolu pimedatel inimestel. Selleks mõõdeti subjekti kehatemperatuuri, üldist võimekust, kortisooli sekretsiooni ja urinaarsete elektrolüütide eritust. Uuringust selgus, et pimedal mehel, kellel puudus valguse tunnetamise võime, oli „vabajooksu“ tingimustes rütmide periood 24,9 tundi (Miles *et al.*, 1977).

Kella kontrollmehhanism koos perifeersete kelladega võimaldab ajaga seostatud homöostaasi, mis võib väliste tegurite (valgus, sotsiaalsed tegevused, toiduhulgad) mõjul korrapäratuks muutuda. Häireid esineb rütmides igapäevaselt (vööndivahetusväsimus, vahetustega töö), sealhulgas ka une- ja psühhiaatriliste häiretega on kõrvalekaldeid tavapära rütmidest (Schulz & Steimer, 2009). Kaheteistkümnetunnine nihe une ajastuses või ajavööndis avaldab mõju kuni kaks nädalat, kuid enamasti enne endise sünkronisatsiooni taastumist toimuvad uued nihked (Barnes *et al.*, 1998).

1.4. Tsirkadiaansete rütmide hindamine

Tsirkadiaanseid rütme otseselt hindavad markerid on kehatemperatuur, melatoniini ja kortisooli tootmine. Melatoniini sekreteeritakse käbikemas ja teistes kudedes pimedal perioodil, mistõttu selle tasemeid ei mõjuta aktiivsustsüklid. Melatoniin on osaliselt vastutav kogu organismi kellasüsteemi sünkroonse toimimise eest. Melatoniin toimib kui peamise kellasüsteemi tagasiside, melatoniini kuhjumisel on peamise kellasüsteemi tagasisidestus inhibeeritud (Richards & Gumz, 2012).

Melatoniini 24-tunnine rütmilisus on üks robustsemaid faasimarkereid, kuid melatoniini tootmishetke algust loetakse ühtlasi tsirkadiaanse faasi indikaatoriks. Melatoniini taset saab mõõta plasmas ja süljes, ühtlasi on melatoniini derivaate uriinis. Ekslike andmete vältimiseks

võetakse melatoniiniproove hämarates valgustingimustes, mida loetakse üheks usaldusväärsemaks mõjutajaks. Indiviidis varieerub melatoniini tase vähe, kuid laiemas valimis on inimeste melatoniini absoluutses produktsioonis suured erinevused. Melatoniini tasemel ja inimeste vanusel pole kindlat seotust. Teatud piirides võivad melatoniini taset mõjutada füüsiline aktiivsus, uni ja unepuudus, kofeiin ning mitmed ravimid, näiteks beetablokaatorid (Hosfstra & de Weerd, 2008). Mõju melatoniini tootmisele ja sekretsioonile on täheldatud ka madala sagedusega elektromagnetlainetel, mis kiirguvad elektriliinidelt ja elektriseadmetelt (Brainard *et al.*, 1999).

Kortisooli, mille sekretsioon on väga rütmiline, sünteesitakse neerupealiste kooses. Kortisooli tase kõigub päeva vältel. Järsk tõus leiab aset öö teisel poolel vastu hommikut ning langeb miinimumi õhtuti. Kortisooli tasemeid on võimalik määrata seerumis ja süljes. Mitmed faktorid mõjutavad kortisooli sekretsiooni, sealhulgas füüsiline ja psühholoogiline stress, mis tõstavad sekretoorset aktiivsust. Valguse mõjul hommikune kortisooli tase tõuseb märgatavalt, põhjustades nihkeid faasides. Vananedes kortisooli tsirkadiaanne amplituud väheneb (Hardeland *et al.*, 2012).

Tsirkadiaanseid rütme on võimalik hinnata nii otsesel kui ka kaudsel viisil. Inimese tsirkadiaansete rütmide uurimisel on peamiseks takistuseks keerukus ja rahalised kulutused. Tsirkadiaanseid kellid peab uurima ajutises isolatsioonis ning inimese tsirkadiaansete uuringute korral on rangeks nõudeks subjektide isoleerimine muutlikest keskkonnatingimustest pikendatud konstantse rutiiniga ajaperioodiks (Aschoff, 1965; Wyatt *et al.*, 1999). Varasemalt oli vähestel uurijatel olemas vajalikud ressursid ja vahendid teadusuuringute läbiviimiseks. Sellest tulenevalt tekkisid olulised asendusmeetodid inimese tsirkadiaansete rütmide hindamiseks. Nüüdseks on meetoditel kaks põhisuunda. Esimeseks lähenemisviisiks on katsealuse päevaste eelistuste ja kronotüübi määramine, kasutades küsimustikke, hormonaalseid markereid ja aktigraafiat, hinnatakse väliskeskkonna mõjus tsirkadiaansetele rütmidele igapäevaelus (Roenneberg *et al.*, 2003; Ancoli-Israel *et al.*, 2003; Horne & Ostberg, 1976; Sack *et al.*, 2007). Teine lähenemisviis on välja arendatud inimese tsirkadiaansete rütmide hindamiseks biopsiatest ja vereproovidest, kasutades rakukultuuridel põhinevaid ja molekulaarseid meetodeid (Brown *et al.*, 2005).

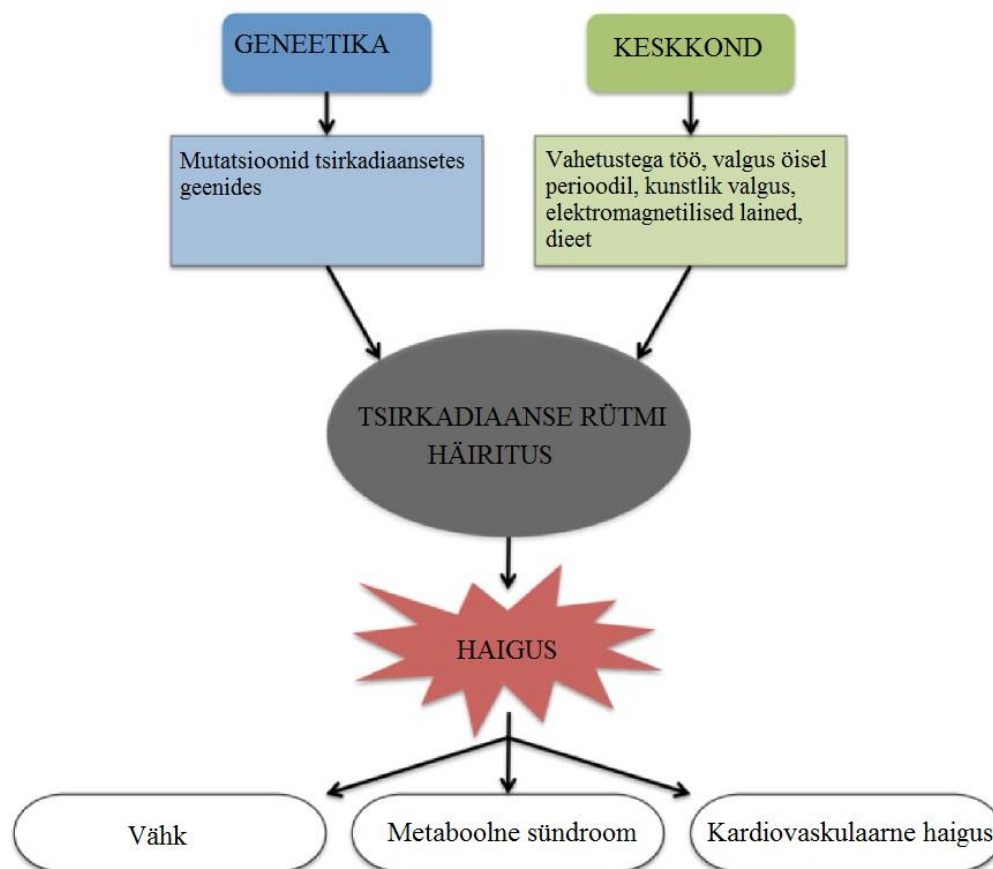
1.5. Häired

Tsirkadiaansete rütmide stabiilsus on vaimse ja füüsilise tervise aluseks. Ebakorrapärased rütmid võivad tekitada organismis suuremaid muutusi, olles haiguse tekke eelsoodumuseks (Joonis 1.). Depressioonis või psüühikahäiretega patsientidel on toimunud muutused

bioloogilistes rütmides tavapärasega võrreldes. Mittefarmakoloogilised (valgusteraapia, rütmiteraapia) ja farmakoloogilised (liitium, antidepressandid, agomelatiin) teraapiad haiguste ravil mõjutavad tsirkadiaanseid rütme, mis osutavad bioloogiliste kellade olulisusele nende haiguste patofüsioloogias. Depressiivsete episoodide vältel mitmed rütmid nihkuvad faasiga edasi, näiteks kortisooli sekretsioonis ja kehatemperatuuris. Rütmide amplituudi vähenemist esineb melatoniini sekreteerimisel (Schulz & Steimer, 2009).

Rütmide muutused võivad mõjutada haiguste puhkemist, selle põhjuseks on füsioloogiliste protsesside teatavad kindlad faasid. Rabandused ja müokardi infarkt toimuvad kõige sagedamini varastel hommikutundidel, olles korrelatsioonis ajaga, mil vererõhk tõuseb järsult. Tsirkadiaanse regulatsiooni olemasolu kardiovaskulaarses süsteemis on teada 1960.ndatest (Kaneko *et al.*, 1968). Samuti on täheldatud, et astmahaigetel on raskemad sümptomid tavaliselt varahommikuti (Lear & Allada, 2012).

Vahetustega töö ning vööndivahetusväsimusega kaasneb ebaühtsus tsirkadiaansetes rütmides, mis viib hormonaalsete tasemete kõikumiseni (Scheer *et al.*, 2009). Epidemioloogilised uuringud on näidanud, et naised, kes töötavad öövahetustes, omavad suurenenud riski rinnavähi tekkeks. Sellest võib järeldada, et tsirkadiaansete rütmide eest vastutavad geenid võivad mõjutada vastuvõtlikkust rinnavähile (Stevens & Rea, 2001; Hansen, 2001; Davis *et al.*, 2001; Schernhammer *et al.*, 2001). Üheks oluliseks faktoriks võib selle korral olla öine valgus ja sellest tulenev melatoniini taseme langus (Stevens, 2005). Sotsiaalsetel mõjutajatel on suur toime tsirkadiaansele käitumisele. Reisidel mitmeid ajatsoone läbides peab sisemine kell seadistuma keskkonnanaliste tsüklite nihetega. Kroonilise vööndivahetusväsimusega närilistest mudelorganismide eluiga on lühem (Lear & Allada, 2012). Lisaks reisimisega seotud vööndivahetusväsimusele eksisteerib sotsiaalne väsimus, mille korral sotsiaalsetest mõjutustest tulenevalt tekib krooniline unepuudus. Vähesese uneajaga seostatakse omakorda riski ülekaalulisusele, diabeedile ja hüpertooniale (Scheer *et al.*, 2009).



Joonis 1. Elementaarne tsirkadiaansete häirete mehhanism. Mitmed geneetilised ja keskkondlikud tegurid põhjustavad häireid tsirkadiaansetes rütmides. Häired võivad soodustada komplekshaiguste nagu vähk, metaboolne sündroom ja kardiovaskulaarsed haigused, kulgemist (Rüger & Scheer, 2009, kohandatud).

1.6. Tsirkadiaanse kella ülesehitus

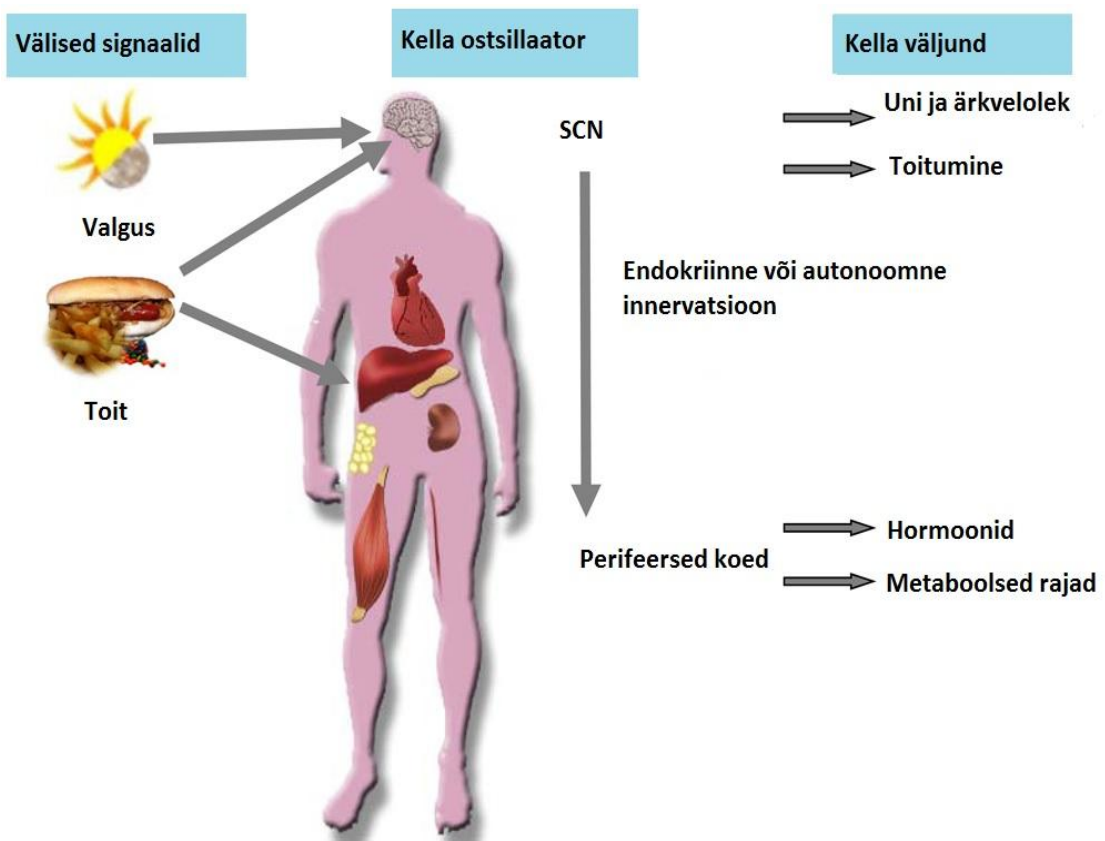
Imetajate bioloogiline kell koosneb ostsillaatorite hierarhiast, mida koordineerib ajus asuv tsentraalne kell (Hofstra & de Weerd, 2008). Tsentraalne kell asub hüpotaalamuse suprakiasmaatilises tuumas ehk SCN-s. SCN koosneb ligikaudu 20 000-st neuronist, mis moodustavad ühtse tsirkadiaanse võrgustiku. SCN on ainus aju piirkond, mis saab valgusandmeid silma võrkkestast, sünkroniseerides sisemise kella ajatunnetust välise ööpäevase perioodiga ning kannab infot edasi perifeersetele kelladele endokriinsete ja süsteemsete signaalide abil (Sahar & Sassone-Corsi, 2012).

Perifeersed kellad paiknevad organismi erinevates kudedes, toimides organkelladena. Need on autonoomsed ostsillaatorid, mis toimivad rakutasandil ning on võimelised toimima iseseisvalt isegi *in vitro* tingimustes (Leise *et al.*, 2012). Tsirkadiaanseid kelli on rakutasandil leitud peaaegu kõikidest imetajate rakkudest, sealhulgas kardiomyotsüütidest, fibroblastidest, vaskulaarsetest silelihasrakkudest ja endoteeli rakkudest (Balsalobre *et al.*, 1998; Durgan *et al.*, 2005; McNamara *et al.*, 2001; Nonaka *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2007). Perifeersetes

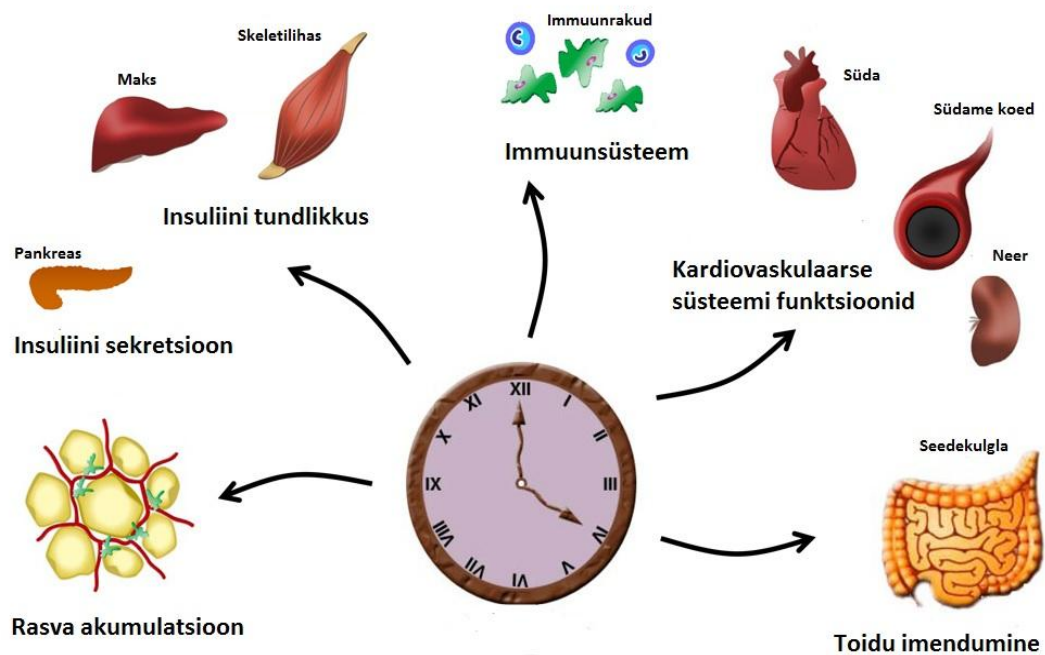
kudedes asuvad tsirkadiaansed kellad reguleerivad spetsiifiliste geenide ekspressiooni ja valkude sünteesi. Näiteks maksas asuvad perifeersed kellad kontrollivad mitmete metaboolsete geenide ekspressiooni, näiteks *PCK2*, mis kodeerib glükoneogeneetilist ensüümi ja mille aktiivsus on vähenenud maksavähis (Tsubouchi *et al.*, 1980). Olulised on ka tümidulaadi süntetaas, p21 ja Wee1, mis kontrollivad DNA sünteesi, raku jagunemistsükli ja proliferatsiooni, koordineerides füsioloogilisi protsesse tsirkadiaansel viisil (Lincoln *et al.*, 2000; Matsuo *et al.*, 2003; Gréchez-Cassiau *et al.*, 2008).

Molekulaarsetel kelladel, mis asuvad SCN-i neuronites ja perifeersetes kudedes, on sarnane molekulaarne ehitus ja võime, et toota stabiilseid tsirkadiaanseid rütme, kuid erinevuseks on signaalide ülekandmise viis (Joonis 2.) (Ko & Takahashi, 2006; Mohawk & Takahashi, 2011; Yoo *et al.*, 2004).

Tsentraalse ja perifeerse kella suhtluse selgitamiseks on kaks peamist võimalikku teooriat. „Ülema-alama“ mudeli kohaselt on sünkroniseerimisjõud ainult tsentraalse kella määratav. Selle mudeli kohaselt on perifeersed kellad sünkroniseeritud tsentraalse kella järgi ega ole kuidagi välimiste ega sisemiste stiimulitega mõjutatavad. Teiseks peamiseks mudeliks on „orkestri“ mudel, mille järgi on tsentraalne kell kui dirigent ning iga üksik perifeerne kell liige orkestrist. Iga perifeerne kell võib kohanduda enda välimistele ja sisemistele stiimulitele, kuid juhindub ühtlasi tsentraalse kella valguse ja pimedusega seotud infost, mis annab alust arvata, et tegu on stabiilse suhtega tsentraalse ja perifeersete kellade vahel (Richards & Gums, 2012). Haiguskolded SCN-is häirivad päevaseid rütme käitumises ja füsioloogias. Siirdamiskesperimentidest järeldub, et SCN suudab määrata tsirkadiaansete perioodide kestvust. SCN piirkonna siirdamisel ühelt hiirelt teisele ilmnes retsipientloomal doonorloomale omane käitumuslike rütmide perioodilisus. SCN kude suudab säilitada rütmilist neuronaalset aktiivsust ja molekulaarset ostsillatsiooni kultiveeritud rakkudes (Dibner *et al.*, 2010).



A



B

Joonis 2. Sisemiste bioloogiliste signaalide sünkroniseerimine väliste signaalidega ning perifeerse kella väljund.

A. Valgus on peamine välimine signaal, mida SCN vastu võtab. Valgussignaal liigub mööda retinohüpotalaamilist trakti. SCN säilitab tsirkadiaanse sünkroonsuse perifeersetes kellades, ülekandeprotsess toimub mööda otseseid ja kaudseid radu. Tsirkadiaanseid ostillaatoreid mõjutavad sealhulgas toit ja hormoonid. Tsirkadiaanne sünkroonsus ilmneb käitumuslike ja füsioloogiliste väljunditena.

B. Tsentraalne kell omab mõju perifeersetes kudedes. Geeniekspressioon on reguleeritud koospetsiifiliselt. Tsirkadiaansed häired kudedes võivad põhjustada organi väärtalitluse. Hiljutiste uuringute kohaselt muutused perifeersetes kellades on seotud kehakaalu tõusu, ebanormaalse glükoosi homöostaasi ja vererõhu regulatsiooni häirumisega, mis soodustab metaboolse sündroomi arengut (Maury *et al.*, 2010, kohandatud).

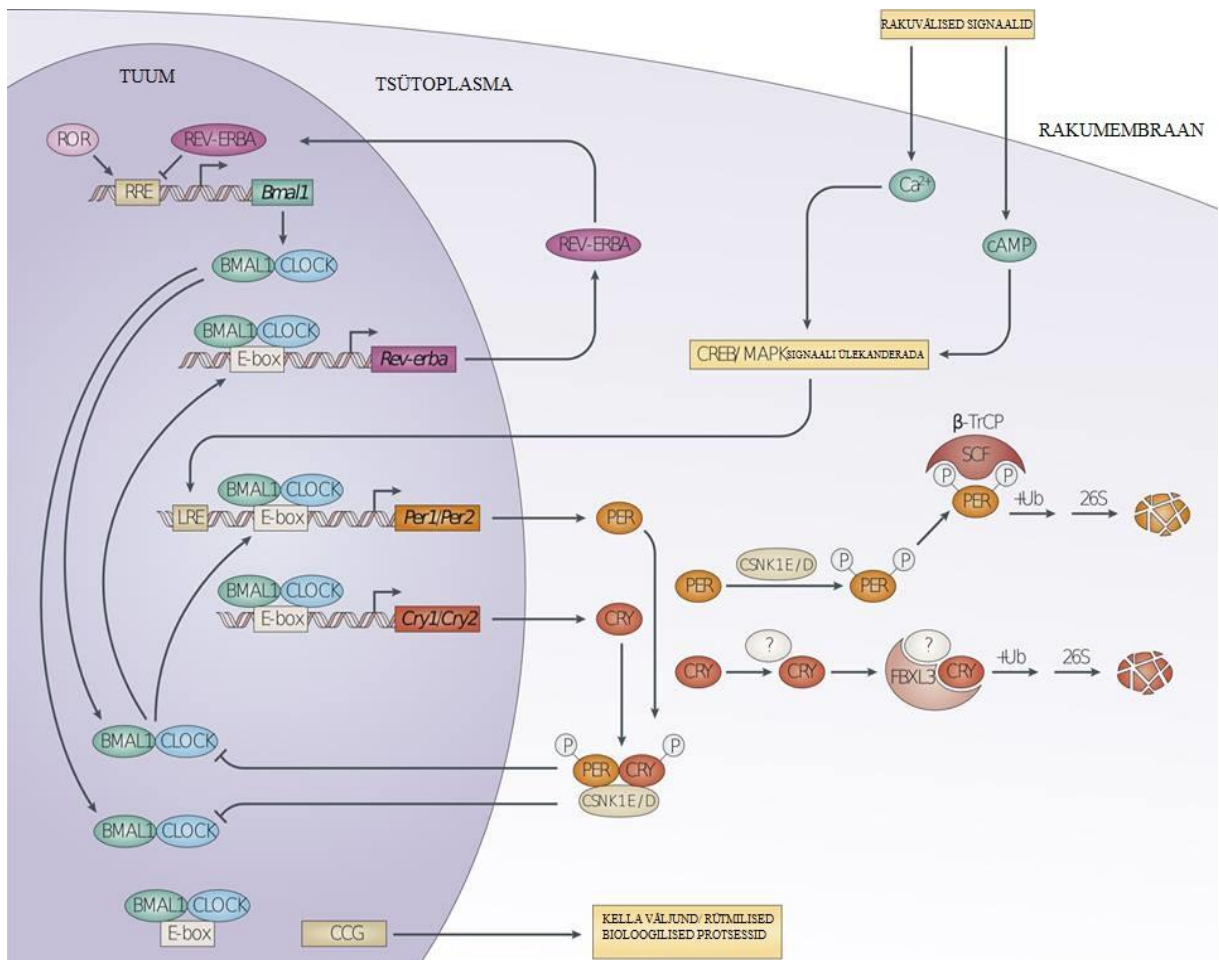
1.7. Tsirkadiaanse kella molekulaarne mehhanism

Imetajate molekulaarne kell sisaldab endas transkriptsiooni-translatsiooni tagasiside tsüklit väikese hulga peamiste tsirkadiaansete geenidega, mille rütmilisele tootmisele järgneb valgukomplekside lagundamine, mis omakorda negatiivse tagasisidestusega mõjutab tsirkadiaanseid põhigeene (Joonis 3.) (Young & Kay, 2001; Yu & Weaver, 2011). Kellasüsteemi tuumikus on transkriptsioonilised aktivaatorid CLOCK (ja selle paraloog NPAS2) ja BMAL1, mis positiivselt reguleerivad *Period* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) ja *Cryptochrome* (*Cry1*, *Cry2*) geenide ekspressiooni tsükli alguses, mis ühtib päevase perioodiga. CLOCK ja BMAL1 heterodimeriseeruvad läbi PAS-domääni ja indutseerivad kellageenide ekspressiooni, seostudes nende promootorite E-elementidega. *Per* ja *Cry* geenide produktid kuhjuvad, dimeriseeruvad ning moodustavad kompleksi, mis liigub tuuma, seostudes CLOCK ja BMAL1 valkudega, inhibeerides *Per* ja *Cry* transkriptsiooni. Öösel PER-CRY repressorkompleks lagundatakse ja CLOCK-BMAL1 võib aktiveerida uue transkriptsioonitsükli. Tagasiside süsteemi pikkus on ligikaudu 24 tundi. E3 ubikvitiini ligaasi kompleks reguleerib PER ja CRY valkude ümberlülitust (Gachon, 2007; Lowrey & Takahashi, 2004; Takahashi *et al.*, 2008). CLOCK omab histoon atsetültransferaasi (HAT) aktiivsust, mis on hädavajalik tsirkadiaanse kella poolt kontrollitavate geenide ekspressioonil (Doi *et al.*, 2006).

ROR α ja REV-ERB α , mis on kellageenide reguleeritavad, omakorda reguleerivad BMAL1. Mõlemad valgud on transkriptsioonifaktorid ning seostuvad *BMAL1* promootori ROR α ja REV-ERB α vastuselementidega. ROR α aktiveerib *BMAL1* transkriptsiooni, kuid REV-ERB α inhibeerib seda (Sato *et al.*, 2004).

CKI ϵ ja CKI δ fosforüleerivad *Per* valke, mis juhivad nende ubikvitiin-vahendatud lagundamiseni (Shirogane *et al.*, 2005). SCF-FBXL3 ubikvitiini ligaas reguleerib *Cry* valkude tasemeid (Siepka *et al.*, 2007).

CLOCK on üldlevinud, kuid NPAS2 ekspresseeritakse eelkõige eesajus (Reick *et al.*, 2001). Hiljutised uuringud vihjavad, et NPAS2 võib talituslikult kompenseerida CLOCK funktsiooni SCN-is, kuid mitte perifeersetes kudedes (DeBruyne *et al.*, 2007). See toetab arvamust, et CLOCK on asendamatu metaboolsetes kudedes (Turek *et al.*, 2005).



Joonis 3. Imetaja tsirkadiaanse kella transkriptsiooni-translatsiooni tagasiside võrgustik. Tsirkadiaanse kella mehhanism hõlmab transkriptsiooni-translatsiooni tagasiside linge, mis koosnevad peamistest kellageenidest. Imetajate tsirkadiaanne kell koosneb peamisest negatiivse tagasiside lingust, mis hõlmab *Clock* (selle paraloog *Npas2*), *Bmal1*, perioodi homolog 1 (*Per1*), *Per2*, krüptokroom 1 (*Cry1*) ja *Cry2*. CLOCK (või NPAS2) ja BMAL1 on heeliks-ling-heeliks PAS-domääni sisaldavad transkriptsioonifaktorid, mis aktiveerivad *Per* ja *Cry* geenide transkriptsiooni. PER ja CRY valgud heterodimeriseeruvad, liikudes tuuma ja seondues CLOCK–BMAL1 kompleksiga, et inhibeerida enda transkriptsiooni. Aja möödudes PER–CRY repressorkompleks laguneb ja CLOCK–BMAL1 võib seejärel aktiveerida uue transkriptsiooni tsükli. Sekundaarses isereguleerivas tagasiside süsteemis on *Rev-erba*, mis on otseseks sihtmärgiks CLOCK–BMAL1 transkriptsiooni aktivaatorikompleksile. REV–ERBA tagasisiseostub, et repressseerida *Bmal1* transkriptsiooni ja konkureerib ROR-iga, et seostuda ROR vastuselementidega (RRE) *Bmal1* promootoris. Lisaks transkriptsioonilistele aktivaatoritele ja repressoritele, on tsirkadiaansete rütmide korrapäraseks toimimiseks olulised post-translatsiooniline modifikatsioon ja tsirkadiaanse kella valkude lagundamised. PER ja CRY fosforüleerimisel on oluline kaseiini kinaas delta (CSNK1D) ja CSNK1E. Üheks kellavalkude fosforüleerimise rolliks on nende märkimine polüubikvitatsiooniks ja 26S proteosoomsel rajal lagundamiseks. β-TrCP1 ja FBXL3 E3 ubikvitiini ligaasi kompleksid on olulised PER ja CRY märkimisel lagundamiseks. CCG-kella poolt kontrollitavad geenid (Takahashi *et al.*, 2008; Ko & Takahashi, 2006, kohandatud).

Molekulaarse kella kontrolli all on rütmilised protsessid nagu söömine, hormoonide süntees ja sekreteerimine, trombolüüsi endogeenne regulatsioon, kehatemperatuuri püsivus ja metabolism (Oster *et al.*, 2006; Rudic *et al.*, 2004).

1.8. Ekspressiooni kvantitatiivsete tunnuste lookused

Ekspressiooni kvantitatiivsete tunnuste lookuste (*expression quantitative trait loci*, eQTL) uuringute eesmärgiks on identifitseerida geneetilisi variante, mis on seotud geeniekspressiooni reguleerimisega. eQTL uuringud lähtuvad kontseptsioonist, kui genotüüp kindlas lookuses on korrelatsioonis fenotüübiga (eQTL uuringu korral geeni ekspresseerumise tase), siis see regioon sisaldab potentsiaalselt sihtmärkgeeni ekspressiooniks kindlaid regulaatoreid (Rockman & Kruglyak, 2006). Inimese ja mudelorganismide uuringutest selgub, et geeni ekspressioonitasemete varieerumisel indiviidide vahel on geneetiline alus. Inimese mRNA tasemete hinnanguline päritavus varieerub antud geenis nullist üheni kokkuleppelises skaalas (keskmise 0,22). 41-71% transkriptide ekspressioonitasemest näitavad suurt päritavust ($>0,3$) (Price *et al.*, 2011). Oluline mõju geenide ekspressioonile on ka keskkonnafaktoritel (Gilad *et al.*, 2008).

eQTL uuring võimaldab kindla koe või rakutüübi ja kohordi kohta anda nimekirja geneetilistest variantidest, mis seostuvad antud geeni või transkripti ekspressioonitasemetega, assotsiatsiooni alleelse suundluse ja efekti ulatusega. Sellisel kujul nad võimaldavad annotatsiooni ja funktsionaalsete reguleerivate variatsioonide klassi iseloomustamist, kuid oluline on ära tunda, et assotsieerunud variandid on peaaegu kõikidel juhtudel tegelike funktsionaalsete variantide esindajad (Stranger *et al.*, 2012; Fairfax *et al.*, 2012).

Kui geeni mittekodeerivad piirkonnad on rikastatud erinevate tunnustega assotsieerunud variantidega, siis viitavad need geeni reguleerivale funktsioonile (Cookson *et al.*, 2009). Funktsionaalsete fenotüüpide, nagu näiteks metaboliitide, mis moodustavad ühenduse geneetilise järjestuse ja haiguse vahel, geneetika mõistmine, võimaldab osutada haiguse aluseks olevale bioloogilisele mehhanismile. Geeniekspressioon on vahepealseks lülis funktsionaalsele fenotüübile (Nica & Dermitzakis, 2013). Olukorras kui fenotüüp-seotud variandid ja eQTL-i variandid ko-lokaliseeruvad samas genoomses piirkonnas, püstitatakse testitav hüpotees, et antud geneetiline variant mõjutab tunnuse variantsust läbi antud geeni ekspressiooni efektide. See aitab identifitseerida tunnuse-seotud variantide põhjuslikke geneenivaesetes piirkondades või eristada mitmete potentsiaalselt põhjuslike geenide variante geenirikastes piirkondades. eQTL uuringud omavad juba olulist rolli inimeste

komplekshaiguste mehhanismide ja põhjuslike geenide selgitamisel (Emilsson *et al.*, 2008; Musunuru *et al.*, 2010).

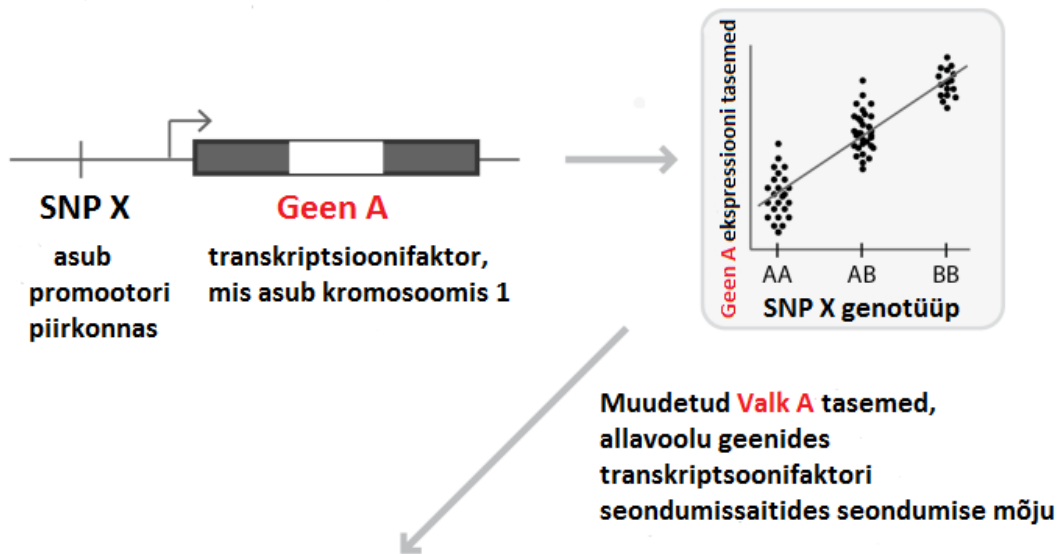
1.8.1. eQTL jaotus

eQTL võib jagada nendeks, mis omavad lokaalseid efekte (*cis*-eQTL), mille korral geneetiline variant asub mõjutatud geeni läheduses, olles 1 miljoni aluspaari ulatuses. Kauge efekti (*trans*-eQTL) korral geneetiline variant asub kaugel mõjutatud geenist, näiteks enam kui 5 miljoni aluspaari kaugusel või isegi teises kromosoomis (Joonis 4.) (Westra & Franke, 2014). Lokaalsed eQTL-id omavad statistiliselt suuremat tähtsust, tulenevalt nende mõjust signaali ülekandele, muutes transkriptsiooni kiirust või post-transkriptsioonilist regulatsiooni (Ronald *et al.*, 2005).

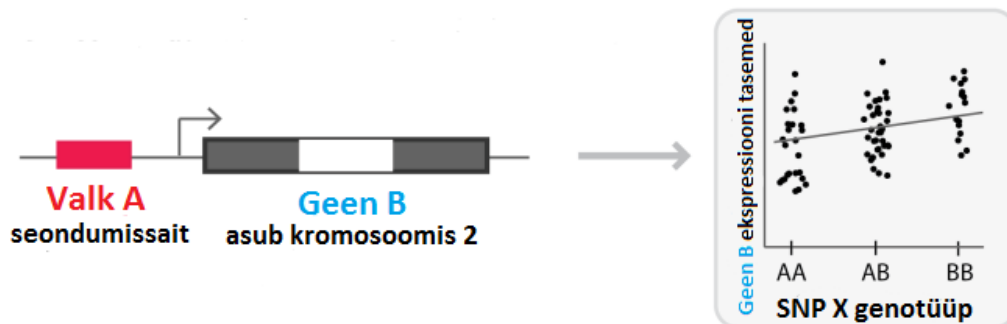
1.8.1.1. *Cis*-eQTL

Cis-eQTL-id omavad tihti suurt efekti geeniekspressioonile, millest tulenevalt väike hulk proove võimaldavad avastada *cis*-eQTL-e tuhandete geenide jaoks (Fehrmann *et al.*, 2011). *Cis*-eQTL SNP-id asuvad enamasti geenide transkriptsiooni alguskoha (*transcription starting site*, TSS) läheduses (Stranger *et al.*, 2012), kusjuures efekti suurus üldiselt kasvab TSS ja eQTL SNP-i vahelise kauguse vähenedes. *Cis*-eQTL SNP-id, mis asuvad TSS-i lähedal, võivad muuta transkriptsioonifaktorite seostumissaite või teisi *cis*-reguleeritavaid elemente (*cis-regulatory element*, CRE), mõjutades transkriptsiooni. Hüpooteesi tugevdab tähelepanek, et *cis*-eQTL SNP-id kalduvad olema ülekattes CRE-de, DNAas I hüpertundlike saitide ja transkriptsioonifaktorite seostumissaitidega (Brown *et al.*, 2013).

Cis-eQTL



Trans-eQTL



Joonis 4. eQTL-id võivad omada lokaalseid efekte (*cis*-eQTLid) või kaugemaid efekte (*trans*-eQTL-id). (Westra & Franke, 2014, kohandatud).

1.8.1.2. *Trans*-eQTL

Kontrastina *cis*-eQTL efektidele, *trans*-eQTL omab väikest mõju geeniekspressioonile (Grundberg *et al.*, 2012). Sellest tulenevalt on proovide suurused, mis on vajalikud efekti tuvastamiseks, suured ning raporteeritud *trans*-eQTL-ide arv on väike *cis*-eQTL-idega võrreldes (Grundberg *et al.*, 2012; Fehrmann *et al.*, 2011; Fairfax *et al.*, 2012). Esialgsed *trans*-eQTL uuringud on näidanud, et *trans*-eQTL analüüs võimaldab pilguheitu haiguse patogeneesi. Tuvastatud on mitmed *trans*-eQTL geenid, mida mõjutavad üksikud tüüp II diabeedi ja kõrge tihedusega lipoproteiinide tasemetega seotud SNP-id. Antud SNP-id ühtlasi omavad geneetilist seotust mitmete metaboolsete fenotüüpidega, mis viitavad, et *trans*-eQTL kaardistamine suudab tuvastada koherentseid geenivõrgustikke, mis on tõenäoliselt seotud haiguste patogeneesiga (Small *et al.*, 2011; Westra & Franke, 2014).

Trans-eQTL võivad mõjutada sihtmärkgeene paljudel viisidel. Kõige lihtsama mudeli järgi on transkriptsioonifaktor polümorfne DNA seondumisregioonis. Polümorfismist sõltuvalt on seondumise afiinsus erinev, muutes seeläbi sihtmärkgeenide ekspressiooni tasemeid. Polümorfismid võivad mõjutada transkriptsioonifaktorite aktiivsust teistel viisidel, muutes näiteks transkriptsioonifaktori enda ekspressiooni taset (Michaelson *et al.*, 2009).

1.9. Metaboliidid

Metaboliidid on organismi ainevahetuse vahelülid ja produktid. Eelkõige on metaboliidid väikese molekulmassiga orgaanilised ühendid. Metaboliidid on ühtlasi kui „esimese järgu“ fenotüübid, sest nende kaudu realiseeruvad (koos valkudega) kõik bioloogilised protsessid.

Kõige enim kasutatavad meetodid metaboliitide taseme mõõtmiseks on tuumamagnetresonants-spektroskoopia (NMR) ning mass-spektromeetria (MS). NMR-põhinevate meetodite korral spektri saamiseks rakendatakse tugevasse püsिमagnetvälja viidud aine aatomituumade ergastamist ja sellele järgneva kiirguse registreerimist. Nende meetodite eeliseks on, et sihtmärk ei pea olema eelnevalt teada ning protsessi käigus ühendid ei kahjustu (Soininen *et al.*, 2009). Mass-spektromeetria korral mõõdetakse osakeste massi ja elektrilaengu suhet. Sellest tulenevalt mass-spektromeeter registreerib ainult laetud osakesi (Verrastro *et al.*, 2015).

Metaboliidid on vabad erinevatest modifikatsioonidest, mistõttu need on ühtlasi sobivaks indikaatoriks organismi biokeemilisest aktiivsusest, olles mitmete biokeemiliste protsesside ning radade osaliseks. Sellest tulenevalt on metaboliidid vahelülis molekulaarsel tasemel toimuvate muutuste mõistmiseks. Metaboliitide profiilid ideaalis võimaldavad määrata, mil normaalne bioloogiline seisund muutub haiguslikuks, võimaldades uusi ennetavaid ravivahendeid. Sellest tulenevalt on metaboliitidel põhinev teadustegevus viimastel aastatel aktiivsemaks muutunud (Mäkinen *et al.*, 2008; Madsen *et al.*, 2010). Metaboliitide tase on sõltuvuses füsioloogilisest stiimulist või geneetilisest modifikatsioonist. Biokeemilisest aktiivsusest on võimalik leida seoseid konkreetse fenotüübiga (Hall *et al.*, 2002).

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärk

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on eelnevalt tuvastatud tsirkadiaanse rütmiga geenide funktsiooni uurimine, kasutades nii kirjandust kui ka Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu genotüpiseerimisandmeid, geeniekspressiooni andmeid ning NMR metaboliitide PheWAS andmeid. Töös viidi läbi eQTL analüüs, leidmaks SNP markereid, mis mõjutavad tsirkadiaanse rütmiga geenide ekspressiooni ja seejärel uuriti, kas leitud eQTL markerid on seotud ka metaboliitide tasemega vereplasmas. Selline seos võib viidata uuritava geeni ja metaboliidi omavahelisele seosele ja aidata leida konkreetse geeni funktsioone. Edaspidi on plaanis kõrvutada ka geeniekspressiooni ja metaboliitide andmeid.

2.2. Materjal ja meetodika

Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu on vabatahtlikest täisealistest koosnev populatsioonipõhine biobank, millega on liitunud ligi 52 000 inimest. See moodustab peaaegu 5% Eesti (≥ 18 aastased) täiskasvanud elanikkonnast, olles ühtlasi suurim epidemioloogiline kohort Balti riikides. Geenidoonorid on värvatud üle Eesti koostöös perearstide, haigla eriarstide ja medõdedega. Osalejad annetasid enamasti 30 ml veeniverd, mida kasutati DNA, valgete vererakkude ja vereplasma kogumiseks. Ühtlasi vastasid osalejad 16 moodulist koosnevale küsimustikule, mis hõlmasid teemasid: isiklikud ja geneoloogilised andmed, elustiil, kronotüüp ja kliinilised haigused (Leitsalu *et al.*, 2014).

16 000 geenidoonori genoomne DNA on genotüpiseeritud kogu genoomi katvate SNP kiipidega (Illumina SNP kiipide erinevad versioonid). Nende seast 2100 isikul on lisaks eraldatud veeniverest geeniekspressiooni uuringuteks RNA. 2000 geenidoonoril on analüüsitud vereseerumis ja plasmas üle 40 biomarkeri Tartu Ülikooli Kliinikumi ühendlaboris. Metaboliitide NMR (üle 120 markeri) ja MS-analüüsid viidi läbi 12 000 inimesel ENGAGE konsortsiumi raames¹.

¹ <http://www.geenivaramu.ee/et/teadlasele>

2.2.1. Geeniekspressiooni andmed

Uurimuse läbiviimiseks kasutati Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu kohordist juhuslikku valimit suurusega 962 indiviidi (480 meest ja 482 naist, keskmise vanusega 34,5 aastat). Indiviidide geeniekspressiooni andmed määrati kasutades kommertsiaalseid Illumina Human HT-12 v3 BeadChip kiipe ja RNA by Ambion TotalPrep RNA Amplification Kit-e². Katsed viidi läbi vastavalt tootja protokollile Eesti Biokeskuse Tuumiklabori Genotüpiseerimiskeskuses.

Andmed olid eelnevalt normaliseeritud, z-standardiseeritud ning kohandatud erinevatele geeniekspressiooni mõjutavatele faktoritele: vere võtmise kellaeg, vanus, sugu, suitsetamisharjumus, kehamassiindeks, vererakkude (erütrotsüüdid, lümfotsüüdid, monotsüüdid, granulotsüüdid, trombotsüüdid) absoluutväärtused, peakomponent analüüsi 50 esimest komponenti, RNA RIN-väärtus, hübriidiseerimispartii.

Tabel 1. Analüüsis kaasatud 19 geeni koos geeni sümboli ja nimetusega, kromosomaalse asupaigaga ning transkripti RefSeq number. *ZBTB16* on kahe transkriptina.

Geeni sümbol	Geeni nimetus	Kromosoom	Transkripti RefSeq number
<i>BCL6</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51) (BCL6), transcript variant 1</i>	3	NM_001706.2
<i>CCND3</i>	<i>cyclin D3</i>	6	NM_001760.2
<i>CD302</i>	<i>CD302 molecule</i>	2	NM_014880.3
<i>CEBPD</i>	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	8	NM_005195.3
<i>CRISPL D2</i>	<i>cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2</i>	16	NM_031476.2
<i>DDIT4</i>	<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	10	NM_019058.2
<i>ECHDC3</i>	<i>enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3</i>	10	NM_024693.2
<i>FKBP5</i>	<i>FK506 binding protein 5</i>	6	NM_004117.2
<i>FOXO1</i>	<i>forkhead box O1</i>	13	NM_002015.3
<i>GFOD1</i>	<i>glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1</i>	6	NM_018988.2
<i>GPER</i>	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>	7	NM_001039966.1
<i>GPR97</i>	<i>G protein-coupled receptor 97</i>	16	NM_170776.3
<i>IL18R1</i>	<i>interleukin 18 receptor 1</i>	2	NM_003855.2
<i>KLF9</i>	<i>Kruppel-like factor 9</i>	9	NM_001206.2
<i>SAP30</i>	<i>Sin3A-associated protein, 30kDa</i>	4	NM_003864.3
<i>SLC2A3</i>	<i>solute carrier family 2</i>	12	NM_006931.1
<i>SMAP2</i>	<i>stromal membrane-associated</i>	1	NM_022733.1
<i>ZBTB16</i>	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>	11	NM_001018011.1

²<http://www.illumina.com>

2.2.2. Genotüpiseerimisandmed

Indiviidide genotüpiseerimine oli viidud läbi Illumina Infinium II tehnoloogia abil, kasutades HumanCNV370-DUO BeadChip kiipe. Katsed olid teostatud vastavalt tootja protokollile². Antud kiipidega on võimalik genotüpiseerida inimese genoomist rohkem kui 370 000 markerit. Genotüpiseerimine oli teostatud Eesti Biokeskuse Tuumiklabori Genotüpiseerimiskeskuses.

Genotüpiseerimise järgselt oli uuritav valim läbinud kvaliteedikontrolli järgnevate parameetrite ja näitajate alusel:

- 1) edukalt genotüpiseeritud markerite protsentuaalne osakaal (*call rate* – CR) iga indiviidi ja SNP kohta
- 2) minoorse alleeli sagedus (*Minor allele frequency* – MAF)
- 3) Hardy-Weinbergi tasakaalustatus (*Hardy-Weinberg equilibrium* – HWE)

Edasisest analüüsist oli välja jäetud indiviidid, kelle CR oli alla 95%. Ühtlasi oli eemaldatud SNP-d, mis ei vastanud järgnevatele kriteeriumitele: CR <95%, MAF <1% ning HWE testi p-väärtus <10⁻⁶. Andmete kvaliteedikontrollil ja filtreerimisel oli kasutatud programmi PLINK (Purcell *et al.*, 2007).

Kvaliteedikontrolli läbinud andmed faasiti kasutades programmi ShapeIT v1 (Delaneau *et al.*, 2013) ja seejärel imputeeriti 1000 Genoomi Projekti raames sekveneeritud referentshaplotüüpide põhjal (1000 Genomes Phase I integrated variant set, March 2012), kasutades programmi Impute v2.2.2 (Howie *et al.*, 2009). Imputeerimiseelse kvaliteedi kontrolli läbis kokku 306 795 genotüpiseeritud markerit, millele lisandus 29 765 666 imputeeritud markerit. EQTL analüüsis kasutati kokku 7 261 109 imputeeritud ja 306 795 genotüpiseeritud markerit, mille MAF >1% ja imputeerimiskvaliteet (*proper_info*) > 0,8.

Andmete kvaliteedikontrolli ja imputeerimise viis läbi Evelin Mihailov.

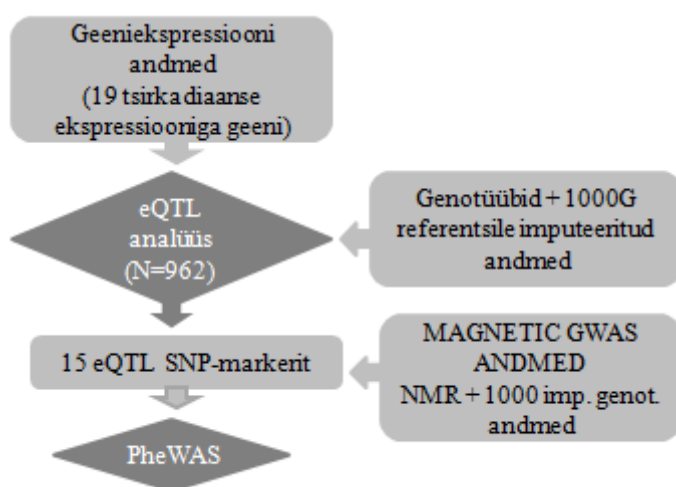
2.2.3. Metaboliitide andmed

Metaboliitide andmed saadi koostöös prof. Mika Ala-Korpela uurimisrühmaga Oulu Ülikoolist, vähemalt 350 µl vereplasmaprooviga on NMR spektroskoopia mõõtmised läbi viidud Pasi Soinineni Ida-Soome Ülikooli NMR metabooloomika laboris. Mõõdeti 140 metaboliidi taset, mis jagunevad kolme suuremasse rühma: albumiin, lipoproteiinide

alamklassid ja derivaadid (n=91); aminohapped ja teised madalmolekulaarsed metaboliidid (n=24); seerumi lipiidide ekstraktid (n=25). NMR metaboliitide analüüsid viidi läbi 12 000 inimesel. Protsessi on varasemalt kirjeldatud (Soininen *et al.*, 2009).

2.2.4. Analüüsi plaan

Leidmaks tsirkadiaanse ekspresiooniga metaboliite mõjutavat markerid, viidi läbi eQTL analüüs, mille tulemusena leiti 15 tsirkadiaanselt ekspresseeruvat eQTL SNP-markerit. Järgnevalt 15 eQTL SNP-markeriga viidi läbi PheWAS analüüs, leidmaks tsirkadiaanse ekspresiooniga markerite ja metaboliitide vahelisi seoseid (Joonis 5.). Arvutused viidi läbi Tartu Ülikooli teadusarvutuste keskus (http://www.hpc.ut.ee/).



Joonis 5. Analüüsi plaan. Heledalt on välja toodud analüüsiks kasutatud andmestikud ja tumedamaga on märgitud läbiviidud protsessid.

2.2.4.1 Geeniekspressiooni ja kellaegade vaheline seotus

Töös lähtuti eelnevast Geenivaramu uuringust, mille viis läbi Eva Reinmaa, kus otsiti tsirkadiaanselt ekspresioonitaset muutnud geene, võrreldes erinevatel kellaegadel kogutud proove (uuritav ajavahemik oli 9 tundi, mis katab 37% tsirkadiaansest tsüklist). Leitud 181 transkripti 156 unikaalsest geenist replitseeriti teises sõltumatus populatsioonipõhises valimis (KORA F4 andmestik Saksamaalt), kus uuritav ajavahemik oli 9-12. Antud töös keskenduti 20 geeni transkriptile (19 erinevat geeni)(Tabel 1.), mille ekspresioonitaseme muutused replitseerusid peale mitmese testimise korrektsiooni ($p < 0,05/181 = 0,00028$).

2.2.4.2 eQTL analüüs

Geneetiliste markerite ja fenotüübi vahelisel assotsiatsioonianalüüsiks kasutati lineaarse regressiooni mudelit programmiga SNPTEST v2 (Marchini & Howie, 2010). Kovariaate ei võetud arvesse, sest eelnevalt olid geeniekspressiooni andmeid kohandanud erinevate kovariaatide suhtes. Vältimaks mitmesest testimisest tulenevat viga, loeti ülegenoomselt statistiliselt oluliseks markereid, mille korral $p < 5 \times 10^{-8}$ (Pe'er *et al.*, 2008). Uurimuses leitud markerite seni teadaolevaid GWAS assotsiatsioone uuriti kasutades dbSNP andmebaasi³.

2.2.4.3 NMR metaboliitide GWAS analüüs

NMR metaboliitide andmetega viidi läbi GWAS analüüs, milles metaboliitide tase oli fenotüübiks. Analüüsist olid kõrvale jäetud rasedad ning isikud, kes kasutasid lipiide alandavaid ravimeid. Metaboliitide jaotus on korrigeeritud soo ja vanuse suhtes ning normaliseeritud. Paastunud indiviidide proovide korral on kasutatud lineaarse regressiooni mudelit. Mitte-paastunud indiviidide proovide korral on kasutatud üldistatud aditiivset mudelit. Mõlemad mudelid on kohandatud peakomponent analüüsi 10 esimesele komponendile. Markerid olid kromosoomidelt 1-22 ning X-kromosoomilt. NMR metaboliitide GWAS analüüsi teostas Toomas Haller.

2.2.4.4 PheWAS lookup

Leidmaks assotsiatsioone tsirkadiaanselt ekspresseeruvate geenide eQTL markerite ja NMR metaboliitide vahel, teostati *in silico* PheWAS analüüs, leides NMR GWAS tulemustest valitud eQTL SNP-markerite seosed kõigi NMR metaboliitidega. Selleks otsiti NMR metaboliitide GWAS analüüsides välja assotsiatsioonid eQTL markeritega ning leiti nende hulgast statistiliselt olulised seosed.

2.3. Tulemused

Geenidelt *BCL6*, *CEBPD*, *DDIT4*, *FKBP5*, *FOXO1*, *GFOD1*, *SMAP2* ning *ZBTB16* transkriptilt NM_006006.4 ei leitud ülegenoomselt statistiliselt olulisi markereid ($p < 5 \times 10^{-8}$) ja need jäid välja edasistest analüüsides. Statistiliselt olulisi markereid oli antud andmestikus 1328, mille seast on välja toodud madalaima p-väärtusega markerid 11 geeni lõikes (Tabel 2.). Geenil *CD302* oli 344 statistiliselt olulist markerit, ühtlasi kõige madalaima p-väärtusega marker rs5022975, vastav p-väärtus $1,0 \times 10^{-36}$. Enim oli statistiliselt olulisi eQTL-markereid geenile *IL18R1*, kokku oli olulisi markereid 524.

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

Tabel 2. Käesolevas töös tuvastatud kõige madalama p-väärtusega markerid 11 geeni lõikes. Olukorras, mil parim marker oli indel, on toodud lisaks välja sellele järgneva p-väärtusega eQTL-marker. MAF näitab minoorse alleeli sagedust antud uuringus. Tärniga on märgitud markerid, mis omasid geenile *trans*-efekti.

Transkript (Geen)	eQTL marker	Kromosoom	Minoorne/ kõige sagedasem alleel	MAF	P-väärtus
NM_001760.2 (<i>CCND3</i>)	rs16895130	6	G/A	0,28	4,4 x 10 ⁻⁸
NM_014880.3 (<i>CD302</i>)	rs6432561	2	T/C	0,41	1,0 x 10 ⁻¹²
NM_031476.2 (<i>CRISPLD2</i>)	rs5022975	16	T/A	0,18	1,0 x 10 ⁻³⁶
NM_024693.2 (<i>ECHDC3</i>)	chr10:11839678:D	10	A/AAAT	0,20	1,0 x 10 ⁻¹⁸
NM_024693.2 (<i>ECHDC3</i>)	rs12416604	10	T/C	0,20	1,0 x 10 ⁻¹⁷
NM_001039966.1 (<i>GPER</i>)	rs141231663	7	A/G	0,24	1,0 x 10 ⁻⁹
NM_170776.3 (<i>GPR97</i>)	rs12444859	16	T/C	0,35	1,3 x 10 ⁻¹²
NM_003855.2 (<i>IL18R1</i>)	chr2:103117747:I	2	AT/A	0,26	1,0 x 10 ⁻⁸
NM_003855.2 (<i>IL18R1</i>)	rs12712135	2	G/A	0,44	1,0 x 10 ⁻⁹
NM_003864.3 (<i>SAP30</i>)	rs372744	10	C/T	0,20	4,1 x 10 ⁻⁸
NM_006931.1 (<i>SLC2A3</i>)	rs11056779	12	G/A	0,38	1,1 x 10 ⁻⁸
NM_006931.1 (<i>SLC2A3</i>)	chr19:47925917:D*	19	C/CCTCT	0,01	3,0 x 10 ⁻¹¹
NM_006931.1 (<i>SLC2A3</i>)	rs151057685*	3	C/T	0,01	6,4 x 10 ⁻¹²
NM_001018011.1 (<i>ZBTB16</i>)	rs189584484	2	G/A	0,02	3,8 x 10 ⁻⁸
NM_001025238.1 (<i>TSPAN4</i>)	rs4963208	11	A/G	0,44	1,1 x 10 ⁻⁹

Uurimaks tsirkadiaanselt rütmiliste geenide seoseid metaboliitidega, vaadati järgnevalt leitud eQTL markerite seoseid NMR GWAS tulemustega (Tabel 3). Ükski leitud seos polnud statistiliselt oluline peale mitmese testimise korrektsiooni. Nominaalselt olulisi seoseid p-väärtusega alla 0,05 leiti 40. Kõige enam nominaalselt olulisi assotsiatsioone oli eQTL-markeril rs16895130, neid oli kokku 32. *CCND3* eQTL-markeri rs16895130 väikseima p-väärtusega assotsiatsioon oli valiiniga ning järgnev atsetaadiga. Kahel eQTL markeril, rs5022975 ja chr2:103117747:I, olid olulised assotsiatsioonid atsetaadi kui ka atsetoatsetaadiga. Lisaks rs16895130 omas seost atsetaadiga, mille p-väärtus oli 0,005. Viiel

eQTL-markeril polnud ühtegi assotsiatsiooni NMR metaboliitidega, mis oleks p-väärtusega alla 0,05. Viieteistkümnest eQTL-markerist neli asusid intronis. EQTL-markerite seast ainult *GPR97* rs12444859 asus eksonis, ja see marker põhjustas ka asenduse koodonkasutuses (*missense* variant). Ühenukleotiidilise polümorfismi tulemusena asendus leutsiin fenüülalaniiniga. Antud markeril puudusid olulised seosed NMR metaboliitidega.

Tabel 3. EQTL markerite seosed metaboliitidega. Paksus kirjas on välja toodud markerid, mille p-väärtus on alla 0,05. Markeritel, millel on palju seoseid p-väärtusega alla 0,05, on kõik leitud seosed välja toodud. Oluliste seoste puudumisel on näidatud iga markeri vähemalt kolme kõige olulisemat metaboliiti. Tärniga on märgitud markerid, mis omasid geenile *trans*-efekti. NMR metaboliitide lühendid on inglise keeles, täispikk nimekiri koos täisnimetusega on välja toodud (Lisa 1.).

Geen	eQTL marker	NMR metaboliit	Efekt (std. viga)	P-väärtus
<i>CCND3</i>	rs16895130 (intron)	Val	-0,08 (0,03)	0,004
		Ace	-0,08 (0,03)	0,005
		XL_HDL_TG	0,08 (0,03)	0,01
		Leu	-0,07 (0,03)	0,01
		M_VLDL_CE	0,07 (0,03)	0,01
		MobCH3	0,07 (0,03)	0,01
		MobCH	0,07 (0,03)	0,01
		MobCH2	0,07 (0,03)	0,01
		S_VLDL_C	0,07 (0,03)	0,01
		Gp	0,07 (0,03)	0,01
		IDL_TG	0,07(0,03)	0,01
		XS_VLDL_TG	0,07(0,03)	0,02
		S_VLDL_FC	0,07(0,03)	0,02
		S_VLDL_PL	0,07(0,03)	0,02
		VLDL_TG_eFR	0,07(0,03)	0,02
		M_VLDL_C	0,07(0,03)	0,02
		S_VLDL_L	0,07(0,03)	0,02
		ApoBtoApoA1	0,07(0,03)	0,02
		S_LDL_P	0,06(0,03)	0,02
		Serum_TG	0,06(0,03)	0,02
		Serum_C	0,06(0,03)	0,03
		S_VLDL_P	0,06(0,03)	0,03
		S_HDL_TG	0,06(0,03)	0,03
		ApoB	0,06(0,03)	0,03
		IDL_C_eFR	0,06(0,03)	0,03
		S_LDL_L	0,06(0,03)	0,03
		Tyr	-0,06(0,03)	0,04
		M_VLDL_FC	0,06(0,03)	0,04
M_VLDL_PL	0,06(0,03)	0,04		
S_VLDL_TG	0,06(0,03)	0,05		
M_LDL_P	0,06(0,03)	0,05		

		S_LDL_C	0,06(0,03)	0,05
CRISPLD2	rs5022975	Ace	0,10 (0,03)	0,003
		Ala	-0,08 (0,03)	0,01
		AcAce	0,07 (0,03)	0,04
		Tyr	-0,07 (0,03)	0,05
		bOHBut	0,07 (0,0,3)	0,05
GPER	rs141231663 (intron)	Urea	0,08 (0,03)	0,01
		IDL_TG	0,07 (0,03)	0,02
		IDL_P	0,06 (0,03)	0,02
		IDL_L	0,06 (0,03)	0,02
		XS_VLDL_PL	0,06 (0,03)	0,03
		IDL_FC	0,06 (0,03)	0,03
		XS_VLDL_L	0,06 (0,03)	0,03
		IDL_PL	0,06 (0,03)	0,03
		XS_VLDL_P	0,06 (0,03)	0,04
IL18R1	chr2:103117747:I	AcAce	0,09 (0,03)	0,003
		Crea	0,08 (0,03)	0,01
		Ace	0,07 (0,03)	0,02
		bOHBut	0,07 (0,03)	0,02
		Gln	0,06 (0,03)	0,03
ECHDC3	chr10:11839678:D	Glc	0,07(0,03)	0,02
		Phe	-0,04(0,03)	0,19
		Ace	0,04(0,03)	0,20
ECHDC3	rs12416604	Glc	0,07(0,03)	0,02
		Phe	-0,04(0,03)	0,20
		HDL_C	-0,04(0,03)	0,24
SLC2A3	rs11056779	Ala	0,07(0,03)	0,01
		VLDL_D	0,04(0,03)	0,10
		M_VLDL_TG	0,04(0,03)	0,12
TSPAN4	rs4963208 (intron)	Pyr	0,08(0,03)	0,004
		bOHBut	0,07(0,03)	0,01
		Urea	0,05(0,03)	0,08
IL18R1	rs12712135 (intron)	Gln	0,06(0,02)	0,02
		XXL_VLDL_P	-0,05(0,02)	0,05
		MobCH3	-0,04(0,02)	0,08
SLC2A3	rs151057685*	Lac	0,36(0,12)	0,003
		Alb	0,26(0,12)	0,03
		Glc	-0,23(0,12)	0,06
CD302	rs6432561 (intron)	His	0,04(0,03)	0,09
		S_LDL_C	-0,04(0,03)	0,14
		M_LDL_C	-0,04(0,03)	0,14
GPR97	rs12444859 (ekson) L[Leu] ⇒ F [Phe]	LDL_D	-0,04(0,03)	0,09
		XXL_VLDL_PL	0,04(0,03)	0,11
		XXL_VLDL_TG	0,04(0,03)	0,11
SAP30	rs372744	bOHBut	0,05(0,03)	0,10

		Phe	-0,05(0,03)	0,14
		Pyr	-0,04(0,03)	0,21
ZBTB16	rs189584484	Urea	0,32(0,18)	0,08
		LDL_D	-0,29(0,17)	0,09
		XS_VLDL_L	-0,24(0,17)	0,17
SLC2A3	chr19:47925917:D*	Lac	0,32(0,23)	0,16
		XL_HDL_TG	-0,31(0,23)	0,17
		Leu	0,26(0,23)	0,25

2.4. Arutelu

Antud andmestikus ei oldud kaasatud tsirkadiaanseid rütme juhtivaid peamisi kellageene, kuid mitmed geenid on perifeerse kellasüsteemi seisukohalt olulised. Päeva jooksul tsirkadiaanselt ekspresseerunud geenid omavad spetsiifilisi funktsioone rakutsükliis, koordineerides erinevaid üleminekuid etappide vahel, immuunsüsteemis ning metabolismis transporterina.

Kuigi teadaolevalt on tsirkadiaanse rütmiga umbes kolmandik inimese geenidest, kasutasime antud uuringus neist ainult 19 geeni. Leitud väike geenide arv, võib tuleneda sellest, et geenide ekspressiooni on uuritud päevasel perioodil, mis hõlmab lühikest ajavahemikku ööpäevast (kaetud ajavahemik 37% ööpäevast EGCUT andmetes ja 10% KORA andmetes). Sellest tulenevalt on madala amplituudiga tsirkadiaansete geenide ekspressiooni keeruline hinnata. Ühtlasi avaldasid mõju inimeste individuaalsed omadused, sealhulgas toitumine ja tervislik seisund, mis mõjutavad geeniekspressiooni profiili vereproovis. Lisaks oli valim suhteliselt väike ja uuritav kude oli täisveri, mis koosneb paljudest eri rakutüüpidest, millel võib olla erinev rütm.

Kuivõrd uuritavaks koeks oli täisveri, võis eeldada, et mitmete geenide ekspressioon on oluline immuunsüsteemi normaalseks toimimiseks. Andmestikus olevate geenide seast *BCL6*, *CD302*, *CEBPD*, *CRISPLD2*, *IL18R1*, *ZBTB16* omavad funktsiooni organismi immuunsüsteemis. *BCL6* on transkriptsiooni repressor, vastutades omandatud kui ka humoraalse immuunvastuse toimimise eest, olles vahelülis B-lümfotsüütide diferentseerumise protsessis. Ühtlasi omab *BCL6* mitmeid spetsiifilisi funktsioone rakkude arengu käigus, näiteks rakutsükli kontrollivate geenide ekspressiooni repressioon, apoptoosi läbiviimine ja DNA kahjustuste parandamine (Phan & Dalla-Favera, 2004; Hatzi & Melnick, 2014; Ranuncolo *et al.*, 2008). *CRISPLD2* on lipopolüsahhariide siduv valk, mida ekspresseeritakse mitmetes kudedes ning leukotsüütides. Inimese perifeerses veres granuloosüüdid ja mononukleaarse rakud, sealhulgas monotsüüdid, NK-rakud (*NK-natural*

killer) ja T-lümfotsüüdid spontaanselt vabastavad CRISPLD2. Lipopolüsahhariide siduvast omadusest tingitult omab CRISPLD2 potentsiaali gramnegatiivsete bakterite, millel on lipopolüsahhariidne kiht, sidumiseks, et välistada nende poolt põhjustatud võimalikku põletikku (Wang *et al.*, 2009).

Tsirkadiaanset ekspressiooni omavad geenid *CCND3*, *DDIT4*, *KLF9*, *SAP30* ja *TSPAN4*, mis on vajalikud rakutsükli läbimiseks ja rakkude normaalseks regulatsiooniks. *CCND3* kodeerib kõrgelt konserveerunud tsükliinide perekonda kuuluvat valku, mille liikmetele on iseloomulik järsk perioodilisus rakutsükli vältel. Tsükliinid toimivad tsükliinsõltuvate kinaaside regulaatoritena, omades igaüks iseloomulikku ekspresseerumis- ja degradeerumismustrit, mis on vajalikud mitootiliste sündmuste koordineerimiseks rakutsükliks. *CCND3* aktiivsus on vajalik rakutsükli G1/S üleminekul (Wang *et al.*, 1996).

Mitmed geenid toimivad eelkõige retseptorina, vahendades infot signaalradades. *GPR97* on G-valgu poolt vahendatav retseptor, mis edastab rakuväliste protsesside info edasi rakusisestele retseptoritele. Inimesel ekspresseeritakse *GPR97* granulotsüütides ja endoteeli rakkudes (Hamann *et al.*, 2015). *GPR97* eQTL-markeril rs12444859 puudusid statistiliselt olulised seosed NMR metaboliitidega, mis selgitaks antud geeni funktsiooni. Kõrge ekspressioonitase täisveres viitab võimalikule immunoloogilisele funktsioonile.

Tsirkadiaanse ekspressiooniga geenide seast *GFOD1*, *FOXO1*, *SLC2A3* ja *ECHDC3* on varasemast teadaolev seotus metabolismiga. Glükoosi homöostaas saavutatakse endogeense glükoosi tootmise kohandamise ning glükoosi omastamisega perifeersete kudede poolt, vastusena insuliinile. Paastumisseisundis maks vastutab glükoositaseme säilitamise eest. *FOXO1* edendab glükoneogeneensete ensüümide ekspressiooni (Matsumoto *et al.*, 2007). Söömisele järgnevalt pankrease beeta-rakud sekreteerivad insuliini, mis on vajalik perifeersete kudede glükoosi omastamiseks, nende hulgas skeletilihased ja rasvkude. Lisaks metabolismi otsesele reguleerimisele on *FOXO1* oluline rasvkude ja skeletilihaste moodustumisel, mis on tähtsad energia homöostaasi säilitamisel (de Lange *et al.*, 2007; Kuriyama *et al.*, 2002). Antud analüüsis ei leitud *FOXO1* statistiliselt olulisi eQTL-markereid, mistõttu ei uuritud ka selle seost seotust NMR metaboliitidega. EQTL-markerite analüüs metaboliitidega kinnitas ka mitokondri geeni *ECHDC3* osalust metaboolsetes protsessides.⁴ *ECHDC3* eQTL-markerid chr10:11839678:D ja rs12416604 omasid statistiliselt olulisi seoseid glükoosiga, mis on metabolismis keskse tähtsusega. Mõlemad seosed olid p-väärtusega 0,02.

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79746>

Erinevalt *FOXO1*, oli *SLC2A3* geenil statistiliselt olulisi eQTL-markereid, mis omakorda omasid ka NMR metaboliitidega seost, nominaalse p-väärtusega alla 0,05. *SLC2A3* on glükoositransporter valk, mida ekspresseeritakse neuronites, vahendades glükoosi vereringest ajju. Lisaks on see laialdaselt levinud teistes kudedes, sealhulgas maksas, neerudes ja platsentas (Kayano *et al.*, 1988). Laktaat on glükoosi metabolismi glükolüütiline produkt, mida transporditakse neuronaaletest rakkudest sisse-välja (Pellerin & Magistretti, 1994). *SLC2A3* eQTL-markeril rs151057685 ja NMR metaboliitide vahelises analüüsis ilmnes seotus metabolismiga. Marker omas kõige tugevamat statistiliselt olulist seost laktaadiga, mille transporti valk vahendab. Hapniku puudumisel toimub glükoosi anaeroobne glükolüüs. Selle käigus tekib glükoosist laktaat. Lihased ei suuda laktaadist uuesti glükoosi moodustada, mistõttu seda tehakse maksas. Laktaat kantakse verega maksa, kus glükoneogeneesi käigus sünteesitakse laktaadist glükoos, mis viiakse teistesse hapnikurikastesse kudedesse (Berg *et al.*, 2002).

Tsirkadiaanse ekspressiooniga statistiliselt oluliste eQTL-markerite analüüs metaboliitidega kinnitas mitmete andmestikus olnud geenide tähtsust metabolismis. Samas suure osa geenide puhul seoseid NMR metaboliitidega ei leitud ja seeläbi ei suudetud selgitada nende geenide rolli immuunsüsteemis ja rakutsükklis. Leitud geenide täpse funktsiooni ja seoste selgitamiseks tuleks läbi viia täiendavaid uuringuid suurema valimiga.

KOKKUVÕTE

Tsirkadiaansed rütmid on iseloomulikud enamikele elusorganismidele, koordineerides protsesse, mis leiavad aset molekulaarsel tasemel. Häired tsirkadiaansetes rütmides põhjustavad inimestele palju terviseprobleeme, mõjutades nende vaimset ja füüsilist tervist. Väliste signaalide puudumisel sisemine tsirkadiaanne ajasüsteem siiski säilitab bioloogilised rütmid, mis vältavad ligikaudu 24 tundi.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks oli leida tsirkadiaansete geenide funktsioone, kasutades kirjandusallikaid kui ka Tartu Ülikooli Eesti Geenivaramu genotüpiseerimisandmeid, geeniekspressiooni andmeid ning NMR metaboliitide PheWAS andmeid. Selleks viidi läbi eQTL analüüs, mille käigus leiti 15 tsirkadiaanselt ekspresseeruvat eQTL SNP-markerit. Järgnevalt uuriti seosed 15 statistiliselt olulise eQTL-markeri ja vereplasma NMR metaboliitide vahel.

Mitmetel tsirkadiaanse ekspressiooniga geenidel, *FOXO1*, *SLC2A3* ja *ECHDC3*, oli varasem teadaolev seotus metabolismiga. Töös leiti *SLC2A3* ja *ECHDC3* eQTL-markerite ja NMR metaboliitide vahel olid statistiliselt olulised seosed, nominaalse p-väärtusega alla 0,05. Leitud statistiliselt olulised seosed olid eelkõige laktaadi ja glükoosiga, mis kinnitasid antud geenide funktsiooni metabolismis. Lisaks mitmed valimis olnud geenid omasid funktsiooni rakutsükklis, immuunsüsteemis ning erinevate retseptoritena.

Studying the functions of genes with circadian rhythm using their eQTL marker associations with NMR metabolites

SUMMARY

Anette Kalnapenkis

Circadian rhythms are present in most living organisms. Circadian rhythms are basis for synchronization between processes, that take place in molecular level. Disruptions in human circadian rhythms could cause wide variety of problems, affecting their mental and physical health. In the absence of external cues, internal circadian timing system still maintains biological rhythms, that are about 24 hours.

Main goal of this thesis was to study functions of genes with circadian rhythm, while using literature and genotyped, gene expression and NMR metabolite PheWAS data from Estonian Genome Center. In order to do that, eQTL analysis was performed, during which 15 eQTL SNP-markers with circadian gene expression were found. Subsequently associations between 15 statistically significant eQTL-markers and plasma NMR metabolites were studied.

Several genes with circadian gene expression, *FOXO1*, *SLC2A3* and *ECHDC3* had previously known associations with metabolism. During the study statistically significant associations were found between *SLC2A3* and *ECHDC3* eQTL-markers and NMR metabolites, that had nominal p-value below 0,05. Found statistically significant associations were foremost with lactate and glucose, that proved the function of those genes in metabolism. In addition, several genes in selection had known function in cell cycle, immune system and as receptor.

TÄNUAVALDUSED

Kõige enam sooviksin tänada enda juhendajat Reedik Mägi hindamatu abi ning õpetussõnade eest. Suured tänusõnad kaasjuhendajatele, Eva Reinmaale ja Maris Teder-Lavingule, selgitavate kommentaaride ja suunamise eest. Samuti tänan Toomas Hallerit abi eest metaboliitide analüüsis. Lisaks soovin tänada ka enda perekonda ja lähedasi toetuse eest töö valmimisel.

KIRJANDUSE LOETELU

A) Ajakiri

Akhtar, R. A., Reddy, A. B., Maywood, E. S., Clayton, J. D., King, V. M., Smith, A. G., *et al.* (2002). Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus. *Current Biology : CB*, 12(7), 540-550.

Ancoli-Israel, S., Cole, R., Alessi, C., Chambers, M., Moorcroft, W., & Pollak, C. P. (2003). The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*, 26(3), 342-392.

Aschoff, J. (1965). Circadian rhythms in man. *Science (New York, N.Y.)*, 148(3676), 1427-1432.

Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6), 929-937.

Barnes, R. G., Forbes, M. J., & Arendt, J. (1998). Shift type and season affect adaptation of the 6-sulphatoxymelatonin rhythm in offshore oil rig workers. *Neuroscience Letters*, 252(3), 179-182.

Brainard, G. C., Kavet, R., & Kheifets, L. I. (1999). The relationship between electromagnetic field and light exposures to melatonin and breast cancer risk: A review of the relevant literature. *Journal of Pineal Research*, 26(2), 65-100.

Brown, C. D., Mangravite, L. M., & Engelhardt, B. E. (2013). Integrative modeling of eQTLs and cis-regulatory elements suggests mechanisms underlying cell type specificity of eQTLs. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003649.

Brown, S. A., Fleury-Olela, F., Nagoshi, E., Hauser, C., Juge, C., Meier, C. A., *et al.* (2005). The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biology*, 3(10), e338.

Brown, S. A., Zimbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., & Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Current Biology : CB*, 12(18), 1574-1583.

Cookson, W., Liang, L., Abecasis, G., Moffatt, M., & Lathrop, M. (2009). Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nature Reviews.Genetics*, 10(3), 184-194.

Davis, S., Mirick, D. K., & Stevens, R. G. (2001). Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1557-1562.

DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (2007). Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Current Biology : CB*, 17(14), R538-9.

Delaneau, O., Zagury, J. F., & Marchini, J. (2013). Improved whole-chromosome phasing for disease and population genetic studies. *Nature Methods*, 10(1), 5-6.

De Lange, P., Moreno, M., Silvestri, E., Lombardi, A., Goglia, F., Lanni, A., (2007). Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. *FASEB journal*, 21(13), 3431-3441.

Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, 72, 517-549.

Doi, M., Hirayama, J., & Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*, 125(3), 497-508.

Duffield, G. E., Best, J. D., Meurers, B. H., Bittner, A., Loros, J. J., & Dunlap, J. C. (2002). Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Current Biology : CB*, 12(7), 551-557.

Durgan, D. J., Hotze, M. A., Tomlin, T. M., Egbejimi, O., Graveleau, C., Abel, E. D., *et al.* (2005). The intrinsic circadian clock within the cardiomyocyte. *American Journal of Physiology.Heart and Circulatory Physiology*, 289(4), H1530-41.

- Emilsson, V., Thorleifsson, G., Zhang, B., Leonardson, A. S., Zink, F., Zhu, J., et al.** (2008). Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature*, 452(7186), 423-428.
- Fairfax, B. P., Makino, S. F., Radhakrishnan, J. F., Plant, K. F., Leslie, S. F., Dilthey, A. F., et al.** (2012). Genetics of gene expression in primary immune cells identifies cell type-specific master regulators and roles of HLA alleles. *Nature Genetics*, 44(5), 502-510.
- Fehrmann, R. S., Jansen, R. C., Veldink, J. H., Westra, H. J., Arends, D., Bonder, M. J., et al.** (2011). Trans-eQTLs reveal that independent genetic variants associated with a complex phenotype converge on intermediate genes, with a major role for the HLA. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002197.
- Gachon, F.** (2007). Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors. *Annals of Medicine*, 39(8), 562-571.
- Gilad, Y., Rifkin, S.A., & Pritchard, J. K.** (2008). Revealing the architecture of gene regulation: The promise of eQTL studies. *Trends in genetics: TIG*, 24(8), 408-415.
- Grechez-Cassiau, A., Rayet, B., Guillaumond, F., Teboul, M., & Delaunay, F.** (2008). The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4535-4542.
- Grundberg, E., Small, K. S., Hedman, A. K., Nica, A. C., Buil, A., Keildson, S., et al.** (2012). Mapping cis- and trans-regulatory effects across multiple tissues in twins. *Nature Genetics*, 44(10), 1084-1089.
- Hall, R., Beale, M., Fiehn, O., Hardy, N., Sumner, L., Bino, R.** (2002). Plant metabolomics: the missing link in functional genomics strategies. *Plant Cell*, 14(7), 1437-1440.
- Hamann, J., Aust, G., Arac, D., et al.,** (2015). International Union of Basic and Clinical Pharmacology.XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacological reviews*, 67(2), 338-367.
- Hansen, J.** (2001). Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 12(1), 74-77.
- Hardeland, R.** (2012). Melatonin in Aging and Disease – Multiple Consequences of Reduced Secretion, Options and Limits of Treatment. *Aging and Disease*, 3(2), 194-225.
- Hatzi, K., Melnick, A.** (2014). Breaking bad in the germinal center: how deregulation of BCL6 contributes to lymphomagenesis. *Trends in molecular medicine.*, 20(6), 343-352.
- Hofstra, W. A., & de Weerd, A. W.** (2008). How to assess circadian rhythm in humans: A review of literature. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 13(3), 438-444.
- Horne, J.A., Ostberg, O.** (1976). A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *International journal of chronobiology*, 4(2), 97-110.
- 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(6), e1000529.
- Kaneko, M., Zechman, F. W., & Smith, R. E.** (1968). Circadian variation in human peripheral blood flow levels and exercise responses. *Journal of Applied Physiology*, 25(2), 109-114.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B., Bell, G.I.** (1988). Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *The Journal of biological chemistry*, 263(30), 15245-15248.
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S.** (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human molecular genetics*, 15(2), 271-277.
- Kuriyama, H., Shimomura, I., Kishida, K., Kondo, H., Furuyama, N., Nishizawa, H. et al.,** (2002). Coordinated regulation of fat-specific and liver-specific glycerol channels, aquaporin adipose and aquaporin 9. *Diabetes*, 51: 2915-2921.
- Lear, B. C., & Allada, R.** (2012). *Circadian rhythms*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

- Leise**, T.L., Wang, C.W., Gitis, P.J., & Welsh, D.K. (2012). Persistent Cell-Autonomous Circadian Oscillations in Fibroblasts Revealed by Six-Week Single-Cell Imaging of PER::LUC Bioluminescence. *PLoS ONE*, 7(3): e33334.
- Leitsalu**, L., Haller, T., Esko, T., Tammesoo, M.L., Alavere, H., Snieder, H., Perola, M., Ng, P.C., Mägi, R., Milani, L., Fischer, K. & Metspalu, A. (2014). Cohort Profile: Estonian Biobank of the Estonian Genome Center, University of Tartu. *International journal of epidemiology*. doi: 10.1093/ije/dyt268.
- Lincoln**, D. W., 2nd, Hrushesky, W. J., & Wood, P. A. (2000). Circadian organization of thymidylate synthase activity in normal tissues: A possible basis for 5-fluorouracil chronotherapeutic advantage. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 88(3), 479-485.
- Lowrey**, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: Elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 5, 407-441.
- Madsen**, R., Lundstedt, T., Trygg, J. (2010). Chemometrics in metabolomics – a review in human disease diagnosis. *Analytica chimica acta*, 659(1-2): 23-33.
- Marchini**, J., & Howie, B. (2010). Genotype imputation for genome-wide association studies. *Nature Reviews. Genetics*, 11(7), 499-511.
- Matsumoto**, M., Pocai, A., Rossetti, L., Depinho, R.A., Accili, D. (2007). Impaired regulation of hepatic glucose production in mice lacking the forkhead transcription factor Foxo1 in liver. *Cell metabolism*, 6(3), 208-216.
- Matsuo**, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5643), 255-259.
- Maurly**, E., Ramsey, K. M., & Bass, J. (2010). Circadian rhythms and metabolic syndrome: From experimental genetics to human disease. *Circulation Research*, 106(3), 447-462.
- McNamara**, P., Seo, S. B., Rudic, R. D., Sehgal, A., Chakravarti, D., & FitzGerald, G. A. (2001). Regulation of CLOCK and MOP4 by nuclear hormone receptors in the vasculature: A humoral mechanism to reset a peripheral clock. *Cell*, 105(7), 877-889.
- Merica**, H., & Fortune, R. D. (2004). State transitions between wake and sleep, and within the ultradian cycle, with focus on the link to neuronal activity. *Sleep Medicine Reviews*, 8(6), 473-485.
- Michaelson**, J. J., Loguercio, S., & Beyer, A. (2009). Detection and interpretation of expression quantitative trait loci (eQTL). *Methods (San Diego, Calif.)*, 48(3), 265-276.
- Miles**, L. E., Raynal, D. M., & Wilson, M. A. (1977). Blind man living in normal society has circadian rhythms of 24.9 hours. *Science (New York, N.Y.)*, 198(4315), 421-423.
- Mills**, J., Minors, D., & Waterhouse, J. M. (1974). The circadian rhythms of human subjects without timepieces or indication of the alternation of day and night. *The Journal of Physiology*, 240(3), 567-594.
- Mitler**, M. M., Carskadon, M. A., Czeisler, C. A., Dement, W. C., Dinges, D. F., & Graeber, R. C. (1988). Catastrophes, sleep, and public policy: Consensus report. *Sleep*, 11(1), 100-109.
- Mohawk**, J. A., & Takahashi, J. S. (2011). Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in Neurosciences*, 34(7), 349-358.
- Musunuru**, K., Lettre, G., Young, T., Farlow, D. N., Pirruccello, J. P., Ejebe, K. G., *et al.* (2010). Candidate gene association resource (CARE): Design, methods, and proof of concept. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 3(3), 267-275.
- Mäkinen**, V.P., Soininen, P., Forsblom, C., Parkkonen, M., *et al.* (2008). 1H NMR metabolomics approach to the disease continuum of diabetic complications and premature death. *Molecular systems biology*, 4:167.
- Nica**, A. C., & Dermitzakis, E. T. (2013). Expression quantitative trait loci: Present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 368(1620), 20120362.

- Nonaka**, H., Emoto, N., Ikeda, K., Fukuya, H., Rohman, M. S., Raharjo, S. B., *et al.* (2001). Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation*, *104*(15), 1746-1748.
- Oster**, H., Damerow, S., Hut, R. A., & Eichele, G. (2006). Transcriptional profiling in the adrenal gland reveals circadian regulation of hormone biosynthesis genes and nucleosome assembly genes. *Journal of Biological Rhythms*, *21*(5), 350-361.
- Panda**, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., *et al.* (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, *109*(3), 307-320.
- Pe'er**, I., Yelensky, R., Altshuler, D., & Daly, M. J. (2008). Estimation of the multiple testing burden for genomewide association studies of nearly all common variants. *Genetic Epidemiology*, *32*(4), 381-385.
- Pellerin**, L., Magistretti, P.J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(22), 10625-10629.
- Phan**, R.T., Dalla-Favera, R. (2004). The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, *432*(7017), 635-639.
- Pittendrigh**, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *25*, 159-184.
- Price**, A. L., Helgason, A. F., Thorleifsson G FAU - McCarroll, Steven,A., FAU, M. S., Kong, A. F., & Stefansson, K. (2011). Single-tissue and cross-tissue heritability of gene expression via identity-by-descent in related or unrelated individuals. *PloS Genetics*, *7*(2): e1001317.
- Purcell**, S., Neale, B. F., Todd-Brown, K. F., Thomas L FAU - Ferreira, Manuel,A.R., FAU, F. M., Bender, D. F., *et al.* (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*, *81*(3), 559-575.
- Ranuncolo**, S.M., Wang, L., Polo, J.M. *et al.*, (2008). BCL6-mediated attenuation of DNA damage sensing triggers growth arrest and senescence through a p53-dependent pathway in a cell context-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*, *283*(33): 22565-22572.
- Reick**, M., Garcia, J. A., Dudley, C., & McKnight, S. L. (2001). NPAS2: An analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5529), 506-509.
- Richards**, J., & Gumz, M. L. (2012). Advances in understanding the peripheral circadian clocks. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(9), 3602-3613.
- Rockman**, M. V., & Kruglyak, L. (2006). Genetics of global gene expression. *Nature Reviews Genetics*, *7*(11), 862-872.
- Roenneberg**, T., Wirz-Justice, A., & Mrosovsky, M. (2003). Life between clocks: Daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*, *18*(1), 80-90.
- Ronald**, J., Brem, R. B., Whittle, J., & Kruglyak, L. (2005). Local regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, *1*(2), e25.
- Rudic**, R. D., McNamara, P., Curtis, A. M., Boston, R. C., Panda, S., Hogenesch, J. B., *et al.* (2004). BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biology*, *2*(11), e377.
- Rüger**, M., & Scheer, F. A. (2009). Effects of circadian disruption on the cardiometabolic system. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *10*(4), 245-260.
- Sack**, R. L., Auckley, D., Auger, R. R., Carskadon, M. A., Wright, K. P., Jr, Vitiello, M. V., *et al.* (2007). Circadian rhythm sleep disorders: Part II, advanced sleep phase disorder, delayed sleep phase disorder, free-running disorder, and irregular sleep-wake rhythm. an american academy of sleep medicine review. *Sleep*, *30*(11), 1484-1501.
- Sahar**, S., & Sassone-Corsi, P. (2012). Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *23*(1), 1-8.

- Sato**, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., *et al.* (2004). A functional genomics strategy reveals *rora* as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527-537.
- Scheer**, F. A., Hilton, M. F., Mantzoros, C. S., & Shea, S. A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4453-4458.
- Schernhammer**, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I., *et al.* (2001). Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(20), 1563-1568.
- Schulz**, P., & Steimer, T. (2009). Neurobiology of circadian systems. *CNS Drugs*, 23 Suppl 2, 3-13.
- Shirogane**, T., Jin, J., Ang, X. L., & Harper, J. W. (2005). SCFbeta-TRCP controls clock-dependent transcription via casein kinase 1-dependent degradation of the mammalian period-1 (Per1) protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 26863-26872.
- Siepkka**, S. M., Yoo, S. H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., *et al.* (2007). Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*, 129(5), 1011-1023.
- Small**, K. S., Hedman, A. K., Grundberg, E., Nica, A. C., Thorleifsson, G., Kong, A., *et al.* (2011). Identification of an imprinted master trans regulator at the KLF14 locus related to multiple metabolic phenotypes. *Nature Genetics*, 43(6), 561-564.
- Soininen**, P., Kangas, A.J., Würtz, P., Tukiainen, T., *et al.* (2009). High-throughput serum NMR metabonomics for cost-effective holistic studies on systemic metabolism. *The Analyst*, 134(9), 1781-1785.
- Stevens**, R. G. (2005). Artificial lighting in the industrialized world: Circadian disruption and breast cancer. *Cancer Causes & Control : CCC*, 17(4), 501-507.
- Stevens**, R. G., & Rea, M. S. (2001). Light in the built environment: Potential role of circadian disruption in endocrine disruption and breast cancer. *Cancer Causes & Control : CCC*, 12(3), 279-287.
- Storch**, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., *et al.* (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417(6884), 78-83.
- Stranger**, B. E., Montgomery, S. B., Dimas, A. S., Parts, L., Stegle, O., Ingle, C. E., *et al.* (2012). Patterns of cis regulatory variation in diverse human populations. *PLoS Genetics*, 8(4), e1002639.
- Sukumaran**, S., Almon, R. R., DuBois, D. C., & Jusko, W. J. (2010). Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(9-10), 904-917.
- Takahashi**, J. S., Hong, H. K., Ko, C. H., & McDearmon, E. L. (2008). The genetics of mammalian circadian order and disorder: Implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics*, 9(10), 764-775.
- Takeda**, N., Maemura, K., Horie, S., Oishi, K., Imai, Y., Harada, T., *et al.* (2007). Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32561-32567.
- Tsubouchi**, H., Kamibeppu, A., Fujisaki, K., Nagahama, J., & Hashimoto, S. (1980). Hepatic gluconeogenic key enzymes in patients with hepatic cancer. *Gastroenterologia Japonica*, 15(6), 564-569.
- Turek**, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., *et al.* (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5724), 1043-1045.
- Verrastro**, I., Pasha, S., Jensen, K.T., Pitt, A.R., Spickett, C.M. (2015). Mass Spectrometry-Based Methods for identifying Oxidized Proteins in Disease: Advances and Challenges. *Biomolecules*, 5(2), 378-411.

- Wang, Z.**, Sicinski, P., Weinberg, R.A., Zhang, Y., Ravid, K. (1996). Characterization of the mouse cyclin D3 gene: exon/intron organization and promoter activity. *Genomics*, 35(1), 156-163.
- Wang, Z.Q.**, Xing, W.M., Fan, H.H *et al.*, (2009). The novel lipopolysaccharide-binding protein CRISPLD2 is a critical serum protein to regulate endotoxin function. *Journal of immunology*, 183(10): 6646-6656.
- Westra, H. J.**, & Franke, L. (2014). From genome to function by studying eQTLs. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1842(10), 1896-1902.
- Wyatt, J. K.**, Ritz-De Cecco, A., Czeisler, C. A., & Dijk, D. J. (1999). Circadian temperature and melatonin rhythms, sleep, and neurobehavioral function in humans living on a 20-h day. *The American Journal of Physiology*, 277(4 Pt 2), R1152-63.
- Yoo, S. H.**, Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., *et al.* (2004). PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(15), 5339-5346.
- Young, M. W.**, & Kay, S. A. (2001). Time zones: A comparative genetics of circadian clocks. *Nature Reviews.Genetics*, 2(9), 702-715.
- Yu, E. A.**, & Weaver, D. R. (2011). Disrupting the circadian clock: Gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. *Aging*, 3(5), 479-493.

B) Raamat

Berg, JM., Tymoczko JL., Stryer, L. 2002. Biochemistry 5th edition. New York: Freeman.

KASUTATUD VEEBIAADDRESSID

<http://www.geenivaramu.ee/et/teadlasele>

<http://www.illumina.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79746>

LISA 1.

Nimekiri NMR abil mõõdetud metaboliitide lühenditest, täisnimetusest ja mõõtühikutest. Albumiin, lipoproteiinide alamklassid ja derivaadid

Lühend	Täisnimetus	Ühik
Alb	Albumin	signal area
XXL-VLDL-PL	Phospholipids in chylomicrons and extremely large VLDL	mmol/l
XXL-VLDL-L	Total lipids in chylomicrons and extremely large VLDL	mmol/l
XXL-VLDL-P	Concentration of chylomicrons and extremely large VLDL particles	mol/l
XL-VLDL-PL	Phospholipids in very large VLDL	mmol/l
XL-VLDL-TG	Triglycerides in very large VLDL	mmol/l
XL-VLDL-L	Total lipids in very large VLDL	mmol/l
XL-VLDL-P	Concentration of very large VLDL particles	mol/l
L-VLDL-C	Total cholesterol in large VLDL	mmol/l
L-VLDL-FC	Free cholesterol in large VLDL	mmol/l
L-VLDL-PL	Phospholipids in large VLDL	mmol/l
L-VLDL-TG	Triglycerides in large VLDL	mmol/l
L-VLDL-CE	Cholesterol esters in large VLDL	mmol/l
L-VLDL-L	Total lipids in large VLDL	mmol/l
L-VLDL-P	Concentration of large VLDL particles	mol/l
M-VLDL-C	Total cholesterol in medium VLDL	mmol/l
M-VLDL-FC	Free cholesterol in medium VLDL	mmol/l
M-VLDL-PL	Phospholipids in medium VLDL	mmol/l
M-VLDL-TG	Triglycerides in medium VLDL	mmol/l
M-VLDL-CE	Cholesterol esters in medium VLDL	mmol/l
M-VLDL-L	Total lipids in medium VLDL	mmol/l
M-VLDL-P	Concentration of medium VLDL particles	mol/l
S-VLDL-C	Total cholesterol in small VLDL	mmol/l
S-VLDL-FC	Free cholesterol in small VLDL	mmol/l
S-VLDL-PL	Phospholipids in small VLDL	mmol/l
S-VLDL-TG	Triglycerides in small VLDL	mmol/l
S-VLDL-L	Total lipids in small VLDL	mmol/l
S-VLDL-P	Concentration of small VLDL particles	mol/l
XS-VLDL-PL	Phospholipids in very small VLDL	mmol/l
XS-VLDL-TG	Triglycerides in very small VLDL	mmol/l
XS-VLDL-L	Total lipids in very small VLDL	mmol/l
XS-VLDL-P	Concentration of very small VLDL particles	mol/l
IDL-FC	Free cholesterol in IDL	mmol/l
IDL-PL	Phospholipids in IDL	mmol/l
IDL-L	Total lipids in IDL	mmol/l
IDL-P	Concentration of IDL particles	mol/l
L-LDL-C	Total cholesterol in large LDL	mmol/l
L-LDL-FC	Free cholesterol in large LDL	mmol/l
L-LDL-PL	Phospholipids in large LDL	mmol/l

L--LDL--CE	Cholesterol esters in large LDL	mmol/l
L--LDL--L	Total lipids in large LDL	mmol/l
L--LDL--P	Concentration of large LDL particles	mol/l
M--LDL--C	Total cholesterol in medium LDL	mmol/l
M--LDL--PL	Phospholipids in medium LDL	mmol/l
M--LDL--CE	Cholesterol esters in medium LDL	mmol/l
M--LDL--L	Total lipids in medium LDL	mmol/l
M--LDL--P	Concentration of medium LDL particles	mol/l
S--LDL--C	Total cholesterol in small LDL	mmol/l
S--LDL--L	Total lipids in small LDL	mmol/l
S--LDL--P	Concentration of small LDL particles	mol/l
XL--HDL--C	Total cholesterol in very large HDL	mmol/l
XL--HDL--FC	Free cholesterol in very large HDL	mmol/l
XL--HDL--PL	Phospholipids in very large HDL	mmol/l
XL--HDL--TG	Triglycerides in very large HDL	mmol/l
XL--HDL--CE	Cholesterol esters in very large HDL	mmol/l
XL--HDL--L	Total lipids in very large HDL	mmol/l
XL--HDL--P	Concentration of very large HDL particles	mol/l
L--HDL--C	Total cholesterol in large HDL	mmol/l
L--HDL--FC	Free cholesterol in large HDL	mmol/l
L--HDL--PL	Phospholipids in large HDL	mmol/l
L--HDL--CE	Cholesterol esters in large HDL	mmol/l
L--HDL--L	Total lipids in large HDL	mmol/l
L--HDL--P	Concentration of large HDL particles	mol/l
M--HDL--C	Total cholesterol in medium HDL	mmol/l
M--HDL--FC	Free cholesterol in medium HDL	mmol/l
M--HDL--PL	Phospholipids in medium HDL	mmol/l
M--HDL--CE	Cholesterol esters in medium HDL	mmol/l
M--HDL--L	Total lipids in medium HDL	mmol/l
M--HDL--P	Concentration of medium HDL particles	mol/l
S--HDL--TG	Triglycerides in small HDL	mmol/l
S--HDL--L	Total lipids in small HDL	mmol/l
S--HDL--P	Concentration of small HDL particles	mol/l
XXL--VLDL--TG	Triglycerides in chylomicrons and extremely large VLDL	mmol/l
VLDL--TG	Triglycerides in VLDL	mmol/l
IDL--TG	Triglycerides in IDL	mmol/l
IDL--C	Total cholesterol in IDL	mmol/l
LDL--C	Total cholesterol in LDL	mmol/l

HDL--C	Total cholesterol in HDL	mmol/l
Serum--TG	Serum total triglycerides	mmol/l
Serum--C	Serum total cholesterol	mmol/l
VLDL--D	Mean diameter for VLDL particles	nm
LDL--D	Mean diameter for LDL particles	nm
HDL--D	Mean diameter for HDL particles	nm
IDL--C--eFR	Total cholesterol in IDL *	mmol/l
LDL--C--eFR	Total cholesterol in LDL *	mmol/l
HDL2--C	Total cholesterol in HDL2 *	mmol/l
ApoA1	Apolipoprotein A--I *	g/l
ApoB	Apolipoprotein B *	g/l
ApoBtoApoA1	Apolipoprotein B by apolipoprotein A--I *	
HDL3--C	Total cholesterol in HDL3 *	mmol/l

*Values estimated with the Extended Friedewald method.

Aminohapped ja teised madalmolekulaarsed metaboliidid

Lühend	Täisnimetus	Ühik
bOHBut	3-hydroxybutyrate	mmol/l
Ace	Acetate	mmol/l
AcAce	Acetoacetate	mmol/l
Ala	Alanine	mmol/l
MobCH2	CH2 groups of mobile lipids	mmol/l
MobCH3	CH3 groups of mobile lipids	mmol/l
Cit	Citrate	mmol/l
Crea	Creatinine	mmol/l
MobCH	Double bond protons of mobile lipids	mmol/l
Glc	Glucose	mmol/l
Gln	Glutamine	mmol/l
Glo1	Glycerol	mmol/l
Gly	Glycine	mmol/l
Gp	Glycoprotein acetyls, mainly a1-acid glycoprotein	mmol/l
His	Histidine	mmol/l
Ile	Isoleucine	mmol/l
Lac	Lactate	mmol/l
Leu	Leucine	mmol/l
Phe	Phenylalanine	mmol/l
Pyr	Pyruvate	mmol/l
Tyr	Tyrosine	mmol/l
Urea	Urea	mmol/l
Val	Valine	mmol/l

Seerumi lipiidide ekstraktid

Lühend	Täisnimetus	Ühik
EstC	Esterified cholesterol	mmol/l
FreeC	Free cholesterol	mmol/l
FAw3	Omega--3 fatty acids	mmol/l
FAw6	Omega--6 fatty acids	mmol/l
FAw79S	Omega--7, omega--9 and saturated fatty acids	mmol/l
TotFA	Total fatty acids	mmol/l
LA	18:2, linoleic acid	mmol/l
otPufa	Other polyunsaturated fatty acids than 18:2	**
DHA	22:6, docosahexaenoic acid	mmol/l
MUFA	Monounsaturated fatty acids; 16:1, 18:1	mmol/l
TotPG	Total phosphoglycerides	mmol/l
PC	Phosphatidylcholine and other cholines	mmol/l
SM	Sphingomyelins	mmol/l
FAw3toFA	Ratio of omega--3 fatty acids to total fatty acids	%
FAw6toFA	Ratio of omega--6 fatty acids to total fatty acids	%
FAw79StoFA	Ratio of omega--7, omega--9 and saturated fatty acids to total fatty acids	%
CH2inFA	Average number of methylene groups in a fatty acid chain	
TgtoPG	Ratio of triglycerides to phosphoglycerides	
CH2toDB	Average number of methylene groups per a double bond	
DbinFA	Average number of double bonds in a fatty acid chain	
BIStoDB	Ratio of bisallylic groups to double bonds	
BIStoFA	Ratio of bisallylic groups to total fatty acids	
FALen	Description of average fatty acid chain length, not actual carbon number	

LIHTLITSENTS

Mina, Anette Kalnapenkis

(autori nimi)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Tsirkadiaansete geenide funktsiooni uurimine, kasutades nende ekspressiooni mõjutavate kvantitatiivsete tunnuste lookuste seost metaboliitidega“
(lõputöö pealkiri)

mille juhendajad on Reedik Mägi, Eva Reinmaa, Maris Teder-Laving

(juhendaja nimi)

- 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 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **25.05.2015**