

Aus dem Institut für Endokrinologie und Diabetes
der Universität zu Lübeck

Direktoren:

Prof. Dr. med. Sebastian M. Meyhöfer

Prof. Dr. rer. nat. Jens Mittag

**Der Einfluss kurzfristigen Schlafentzugs auf zirkadiane Rhythmen
stoffwechselassoziierter Gene im subkutanen Fettgewebe**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

~ Aus der Sektion Medizin ~

vorgelegt von

Elena Maria Leineweber

aus Münster

Lübeck 2021

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Sebastian M. Meyhöfer

2. Berichtstatterin/Berichtstatter: Prof. Dr. med. Martha Kirstein

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.06.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Sonderzeichen	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung von Schlaf für den Organismus.....	2
1.2 Schlafphysiologie.....	3
1.3 Zirkadiane Rhythmik	5
1.4 Schlaf und Stoffwechsel	7
1.5 Physiologie des Fettgewebes	10
1.6 Ziele und Fragestellung.....	12
2. Methoden.....	14
2.1 Probanden	14
2.2 Studiendesign und Versuchsanordnung.....	15
2.3 Adipozytenaspiration, RNA-Isolation, -Sequenzierung und -Analyse	17
2.4 Schlafstadienauswertung.....	19
2.5 Analyse metabolisch relevanter Blutparameter	19
2.6 Statistische Auswertung.....	20
2.7 Beschreibung der Eigenleistung und Leistung anderer bei der Durchführung der Experimente und Analysen	20
3. Ergebnisse	22
3.1 Schlafstadien.....	22
3.2 Genexpressionsmuster vor Intervention.....	23
3.3 Zirkadiane Expressionsrhythmen der Uhrgene	27

3.4	Zirkadiane Expressionsrhythmen metabolischer Gene	30
4.	Diskussion	36
4.1	Einfluss gestörten Schlafs auf zirkadiane Expressionsrhythmen des subkutanen Fettgewebes im Menschen	36
4.2	Mechanismen der Dysruption metabolischer Gene	38
4.3	Auswirkungen kurzfristiger Schlafenszeitverkürzung auf metabolisch relevante Blutparameter im Kontext der Veränderungen auf Ebene der Genexpression	42
4.4	Einfluss der Schlafdauer auf die metabolischen Effekte	43
4.5	Methodische Einschränkungen	44
4.6	Ausblick	46
5.	Zusammenfassung.....	47
6.	Literaturverzeichnis.....	48
7.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	64
7.1	Abbildungen.....	64
7.2	Tabellen	68
8.	Danksagung	69
9.	Eigenständigkeitserklärung.....	70
10.	Publikation aus dem Journal of Endocrinology und Metabolism (JCEM) ..	71
11.	Lebenslauf.....	81

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Varianzanalyse
APL	Apelin
ARNTL	Aryl-hydrocarbon-receptor-nuclear-translocator-like-protein
BE	Blutentnahme
BMAL1	Brain-and-Muscle-ARNT-like-1
BMI	Body-Mass-Index
C	Celsius
CCG	Clock-Controlled-Genes
CHPT1	Cholin Phosphotransferase 1
CLOCK	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
cm	Centimeter
CON	Kontrolle
CRY	Cryptochrome-Gen
DBP	D-site-albumin-promoter-binding-protein
DGAT2	Diacylglycerol O-Acetyltransferase 2
EDE-Q	Eating Disorder Examination-Questionnaire
EEG	Elektroenzephalogramm
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulogramm
FFA	Freie Fettsäuren
GO	Gen Ontologie
HOMAB	Homeostasis Model Assessment Index
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment Insulinresistenz
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
Hz	Hertz = 1/s
CVinter	Interassaykoeffizient
CVintra	Intraassaykoeffizient
IL8	Interleukin 8
ipRGC	intrinsisch photosensitive retinale Ganglienzelle
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KG	Körpergewicht

m	Meter
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NaCl-Lösung	Natrium-Chlorid-Lösung
Non-REM	Non-Rapid-Eye-Movement
NFIL3/E4BP4	Nuclear-factor-interleukin-3-regulated-protein
NPAS2	Neurales PAS Domänenprotein 2
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PER	Period-Gen
PFS	Power of Food Scale
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
qPCR	quantitative PCR
RARRES2	Retinsäure-Rezeptor-Responder-Protein 2
RBP4	Retinol-Bindungsprotein 4
REM	Rapid-Eye-Movement
REV-ERBA/NR1D1	Reverse-erythro-blastic-leukemia- α
RNA	Ribonukleinsäure
RNAseq	RNA-Sequenzierung
ROR α	Retinoid-acid-receptor-related-orphan-receptor- α
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SD	Schlafdeprivation
SI	Système International
SR	Schlafrestriktion
SRS	Symptomliste
SWS	Slow-Wave-Sleep
TG	Triglyceride
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt

VAS

Visuelle Analogskala

Sonderzeichen

>	größer als
<	kleiner als
-	Minus
±	Plus / Minus
°	Grad
x	Mal
α	Alpha
β	Beta
μ	Mikro
%	Prozent

1. Einleitung

In der heutigen Zeit sind aus wirtschaftlichen Gründen flexible Arbeitszeiten und wechselnde Arbeitsschichten in beinahe allen Erwerbssektoren zum Standard geworden. Die Anzahl an Erwerbstätigen in Schichtsystemen hat sich in den letzten 20 Jahren nahezu verdoppelt. Während in Deutschland im Jahr 1994 nur 10,4% der Erwerbstätigen außerhalb der gewöhnlichen Arbeitszeiten tätig waren, waren es im Jahr 2014 bereits 17,7%, mit steigender Tendenz (Angerer und Petru 2010; Kivimäki, Batty, und Hublin 2011). Zudem besteht in der Leistungsgesellschaft der westlichen Welt der Trend zu einer kontinuierlich kürzer werdenden Schlafdauer. In den letzten Jahrzehnten sank die durchschnittliche Schlafzeit von 9 Stunden pro Nacht auf unter 7 Stunden pro Nacht. Im Jahr 2001 gaben 38% der Teilnehmer einer amerikanischen Umfrage an, mindestens 8 Stunden pro Nacht zu schlafen. 2005 waren es nur noch 26% (National Sleep Foundation, 2005). Die Anzahl an Erwachsenen, die weniger als 6 Stunden pro Nacht schlafen stieg sogar auf über 30% an (Ford, Cunningham, und Croft 2015). Außerdem gehören Schlafstörungen, ob infolge gestörter zirkadianer Rhythmik durch Schichtarbeit oder anderer Genese, zu den häufigsten Gründen einer Arztkonsultation (Schlack et al. 2013). Zur gleichen Zeit sind in den letzten Jahrzehnten der drastische Anstieg von Adipositas und den damit assoziierten Erkrankungen zu einem der größten gesundheitlichen Probleme weltweit geworden (Williams et al. 2015). In einer Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland waren 23,3% der Männer und 23,9% der Frauen adipös. Auffällig war insbesondere der Anstieg der Adipositasprävalenz in der jungen Bevölkerung (Mensink et al. 2013). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen gestörter zirkadianer Rhythmik, verkürzter Schlafdauer oder reduzierter Schlafqualität und dem metabolischen Syndrom konnte in zahlreichen Studien beobachtet werden (Hallschmid et al. 2015; Huang et al. 2011; Hall et al. 2008). Vor dem Hintergrund, dass der Schlaf-Wach-Rhythmus auf Zellebene durch transkriptionelle Rückkopplungsschleifen gesteuert wird, welche ihrerseits die tageszeitabhängige Expression verschiedenster Gene regulieren, deuten jüngere, tierexperimentelle Studien auf einen pathophysiologischen Zusammenhang von Schlaf und Adipositas auf Ebene der Genexpression hin (Xie et al. 2013; Paschos et al. 2012). Bis heute existieren jedoch nur wenige Daten zu potenziellen Veränderungen der Regulation der Genexpression in humanen Adipozyten.

Die hier vorliegende Arbeit untersucht daher die Auswirkungen von kurzfristiger Schlafdauerrestriktion sowie totalem Schlafentzug auf die tageszeitlichen

Transkriptionsmuster im subkutanen Fettgewebe junger gesunder Männer im Alter von 18-30 Jahren. Dazu wurden Adipozytenaspirationen an subkutanem, abdominellem Fettgewebe vor und nach verschiedenen Schlafinterventionen durchgeführt und mit den Daten von Proben aus einer Kontrollbedingung mit regulärem Schlaf verglichen. Zu gleichen Zeitpunkten wurden Blutproben gewonnen, um Parameter des Fett- und Glukosestoffwechsels und zirkulierende Fettgewebshormone, die sogenannten Adipokine, zu bestimmen.

Zunächst wird im Folgenden ein Überblick über wichtige physiologische Aspekte von Schlaf und Stoffwechsel und der Physiologie des Fettgewebes gegeben. Anschließend erfolgt die ausführliche Darstellung des Studiendesigns und der Methodik. Danach werden die Auswertung der EEG-Daten und die Ergebnisse der Analyse der Adipozytenaspirationen sowie metabolisch relevanter Stoffwechselfparameter dargestellt. Zum Schluss erfolgt die Diskussion der Ergebnisse.

1.1 Die Bedeutung von Schlaf für den Organismus

Die Geschichte der modernen Schlafforschung begann erst im Jahre 1928 mit der Entdeckung des Elektroenzephalogramms (EEG) durch den deutschen Psychiater Hans Berger. Seitdem ist es möglich die Aktivität des Gehirns zu erfassen und zwischen Bewusstseinszuständen zu unterscheiden.

Trotzdem konnten bisher viele Fragen zur Bedeutung und Funktion des Schlafs nur in Ansätzen beantwortet werden (Weeß und Landwehr 2009; Becker, Langberg, und Byars 2015). Die Entstehung von Ruhe- und Aktivitätszyklen aller Organismen ergab sich vermutlich ursprünglich aus der Anpassung an tageszeitliche Licht- und Temperaturverhältnisse. Unabhängig davon, ob es sich um tag- oder nachtaktive Lebewesen handelt, tritt der Schlaf in einer bestimmten zirkadianen Phase auf. Beim Menschen hat sich die innere Uhr den äußeren Verhältnissen so angepasst, dass der Zeitraum der Ruhe in der Nacht liegt, da während den nächtlichen, äußeren Bedingungen wie Dunkelheit und Temperaturabfall ein Aktivitätszustand ineffektiv wäre. Restitutionsvorgänge, die auf körperliche Inaktivität angewiesen sind, finden dementsprechend in der Nacht statt (Weeß und Landwehr 2009; Zully 2007). Zu Beginn der Evolution haben bereits durchsichtige Organismen die Ribonukleinsäure (RNA)-Replikationsphase ihres Zellzyklus in die Nacht gelegt, um sich vor mutagener UV-Exposition zu schützen. Auch heute noch finden beim

Menschen Zellteilungen vermehrt nachts statt (Oster 2014). Dabei spielen besonders die Non-Rapid-Eye-Movement (Non-REM) Schlafphasen, auch als Slow-Wave-Sleep (SWS) bezeichnete Schlafphasen, bei Wachstums- und Regenerationsprozessen der Organsysteme, wie zum Beispiel dem Immunsystem, eine bedeutsame Rolle (Besedovsky, Lange, und Born 2011; Weeß und Landwehr 2009). Außerdem kommt es während des SWS zur Abnahme von Blutdruck und Herzfrequenz. Die Aktivität des sympathischen Nervensystems und die zerebrale Glukoseverwertung werden im Vergleich zum Wachzustand gedämpft (Van Cauter et al. 2008). Andere Literatur schreibt dem SWS zusätzlich eine bedeutende Rolle bei der Gedächtnisbildung zu (Cairney et al. 2015, Rasch und Born 2013).

Dagegen finden während des Rapid-Eye-Movement (REM)-Schlafs Lernprozesse statt und Gedächtnisinhalte werden gefestigt. Der REM-Schlaf hat außerdem erheblichen Einfluss auf das emotionale Befinden. Nicht-depressive Menschen mit Schlafstörungen haben ein doppelt so hohes Risiko an einer Depression zu erkranken wie Menschen ohne Schlafstörungen (Baglioni et al. 2011). Es ist bekannt, dass Ein- und Durchschlafstörungen zu den häufigsten Begleitsymptomen der Depression gehören.

Im EEG depressiver Menschen zeigt sich eine verlängerte REM-Latenz und -Dauer (Göder, Nissen, und Rasch 2014). Des Weiteren hat Schlaf eine bedeutende neuroendokrine Funktion. Die tageszeitabhängige Ausschüttung der gegensätzlich regulierten Hormone Kortisol und Wachstumshormon sowie die den Appetit regulierenden Hormone Leptin und Ghrelin wird maßgeblich durch Schlafenszeit und Schlafdauer beeinflusst. Während des SWS erreicht die Ausschüttung von Wachstumshormonen ihr Maximum, zeitgleich wird die Freisetzung von Kortisol inhibiert (Leproult und Van Cauter 2009). Demzufolge sind viele Stoffwechselprozesse vom Schlafverhalten abhängig. Der Einfluss von Schlaf auf den Stoffwechsel wird besonders deutlich, wenn man die Konsequenzen gestörten Schlafs betrachtet (siehe 1.4). Vorab soll aber die physiologische Architektur einer Nacht regulären Schlafs detaillierter beschrieben werden.

1.2 Schlafphysiologie

Der Schlaf ist gekennzeichnet als ein zeitlich begrenzter Zustand relativer motorischer Ruhe und scheinbar fehlender sensorischer Reaktivität bei ständiger Erweckbarkeit. Im Schlaf selber besteht eine ausgesprochene Dynamik mit wechselndem Auftreten von verschiedenen Phasen oder Stadien (Koella 1988). Diese Stadien werden nach den Kriterien der American

Academy of Sleep Medicine (American Academy of Sleep Medicine 2008) in die Schlafstadien Non-REM 1-3 (N 1-3), REM und Wach eingeteilt. Dabei werden die Stadien durch folgende Merkmale im EEG gekennzeichnet:

- Stadium Wach: α -Rhythmus (8-13 Hz)
- Stadium N 1: niedrigamplitudige Aktivität (4-7 Hz), Vertexwellen, langsame Augenbewegungen
- Stadium N 2: ein oder mehrere K-Komplexe oder Schlafspindeln (12-14 Hz)
- Stadium N 3: langsame Wellenaktivität (3,5-2 Hz) und einer Spitze-Spitze-Amplitude $>75\mu\text{V}$
- Stadium REM: Schnelle Augenbewegungen, geringer Elektromyogramm (EMG)-Tonus am Kinn, Sägezahnwellen (2-6 Hz), transiente Muskelaktivität

In diesen seit 2007 bestehenden Kriterien zum Scoring von Schlaf und Schlafstörungen der American Academy of Sleep repräsentiert das Stadium N3 den Tiefschlaf und ersetzt damit die Schlafstadien 3 und 4 der Nomenklatur nach Rechtschaffen und Kales (American Academy of Sleep Medicine 2008; Rechtschaffen und Kales 1968). Ein weiterer wesentlicher Unterschied der neuen Nomenklatur der American Academy of Sleep besteht darin, dass sie altersunabhängig anwendbar ist und auch klinische Aspekte wie Schlaf assoziierte Phänomene einbezieht (Moser et al. 2009). Während einer Nacht wiederholen sich die oben beschriebenen Schlafstadien zyklisch und bilden Schlafperioden, welche auch als Unterperioden bezeichnet werden. Eine Periode setzt sich zu Beginn des Schlafs aus einem längeren Tiefschlafanteil, dem SWS bzw. den Non-REM-Stadien und einem kürzeren REM-Schlafanteil zusammen. Die Zusammensetzung der Perioden verschiebt sich im Laufe der Nacht zu Gunsten des REM-Schlafs. Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass die erste Nachthälfte durch SWS-Schlaf dominiert wird und die zweite Nachthälfte durch das vorrangige Auftreten von REM-Schlafphasen charakterisiert ist (Koella 1988).

Die folgende Abbildung soll die beschriebene Schlafarchitektur im Verlauf einer Nacht veranschaulichen (Abb. 1).

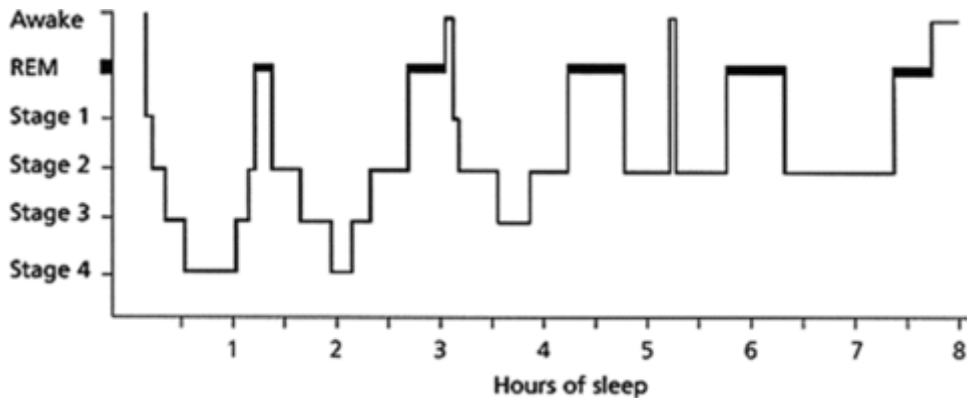


Abb. 1: Physiologisches Hypnogramm eines gesunden Erwachsenen (Lucassen, Rother, und Cizza 2012).

Im Laufe des Lebens ändern sich Schlafarchitektur und Schlafbedürfnis. Die Schlafdauer nimmt ab, der SWS-Schlaf hingegen nimmt zu. Der Anteil an REM-Schlaf beträgt bei einem Erwachsenen etwa 25% der Gesamtschlafzeit. Beim Neugeborenen dagegen nimmt der REM-Schlaf einen Anteil von 50% ein. Im Allgemeinen hängt die Gesamtschlafdauer von der Größe des Lebewesens ab. Elefanten brauchen nur drei Stunden Schlaf, wohingegen Ratten oder Katzen bis zu 18 Stunden am Tag schlafend verbringen können. Diese Unterschiede entstehen durch eine differente Stoffwechselaktivität der Lebewesen (Sharma und Kavuru 2010). Zusätzlich besteht auch innerhalb unserer Spezies eine breite physiologische Varianz. Neben den „Mittelschläfern“, die zwischen sechs und acht Stunden Schlaf pro Nacht brauchen, werden „Kurz- und Langschläfer“ unterschieden, deren Gesamtschlafzeit um mehr als drei Stunden variiert (Koella 1988). Von Kurzschlaf spricht man bei einer Schlafdauer von weniger als sechs Stunden Schlaf pro Nacht. In Deutschland ist der Anteil an Kurzschläfern mit 12,3% relativ hoch. Zum Vergleich liegt der Anteil an Kurzschläfern in Japan bei 4% (Schlack et al. 2013).

1.3 Zirkadiane Rhythmik

In der medizinischen Literatur werden mit zirkadianen Rhythmen Zyklen bezeichnet, die etwa einen Tag, also 24 Stunden andauern (vom Lateinischen „circa diem“ = „etwa ein Tag“) (Huang et al. 2011; Bünning 1977). Diese Rhythmen werden durch körpereigene Uhren gesteuert. In den meisten Lebewesen adaptieren sie Verhalten und Zellphysiologie an den Tag- und Nachtrhythmus. Man geht inzwischen davon aus, dass die Zellen der meisten Gewebe ihre eigenen „Uhren“ beherbergen. Die kleinste Untereinheit dieser „Uhren“ besteht

auf molekularer Ebene aus den sogenannten Uhrengenen, die transkriptionell-translatorische Rückkopplungsschleifen bilden. Dabei aktivieren die Transkriptionsfaktoren Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK), Brain-and-Muscle-ARNT-Like-1 (BMAL1) und das neuronale PAS Domänenprotein 2 (NPAS2) im Verlauf des Tages die Synthese der drei Period- (PER 1-3) und zwei Cryptochrome-Gene (CRY 1/2).

Gegen Abend liegen große Mengen der Gene PER und CRY in der Zelle vor. Dieser Anstieg induziert ihre Translokation in den Zellkern, wo sie ihre eigene Synthese inhibieren. Im Verlauf der Nacht kommt es somit zu einem kontinuierlichen Abfall von PER- und CRY-Konzentrationen, welcher letztlich das Sistieren der Inhibition bedingt. Dieser zirkadiane Zyklus wird zusätzlich durch weitere sogenannte akzessorische Rückkopplungsmechanismen stabilisiert. Dabei regulieren die CLOCK/BMAL1-kontrollierten Orphan-Kernrezeptoren Retinoid-acid-receptor-related-orphan-receptor- α (ROR α) und Reverse-erythro-blastic-leukemia- α (REV-ERBA oder NR1D1) die rhythmische Transkription von BMAL1. In weiteren Kopplungsmechanismen beteiligte Transkriptionsfaktoren sind beispielsweise D-site-albumin-promoter-binding-protein (DBP) und Nuclear-factor-interleukin-3-regulated-protein (NFIL3 oder E4BP4). Die Gesamtheit dieser Kopplungsmechanismen aktiviert tageszeitabhängig uhrenkontrollierte Gene, die sogenannten Clock-Controlled-Genes (CCGs). Die CCGs regulieren ihrerseits gewebespezifisch wichtige Stoffwechselprozesse, wie zum Beispiel die diurnale Expression des Glukose-Transporters 2 in der Leber (Oster 2014; Landgraf, Shostak, und Oster 2012). Zentraler Taktgeber dieser peripheren Uhren ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) im Hypothalamus. Der SCN fungiert als Dirigent und kann unter dem Einfluss von äußeren Zeitgebern die Gesamtheit der inneren Uhren synchronisieren (Reppert und Weaver 2002). Als wichtigster äußerer Zeitgeber des SCN gilt das Licht (Oster 2014; Lowrey und Takahashi 2004; Bünning 1977). Lichtsensitive Rezeptorzellen in der inneren Retina, die sogenannten intrinsisch photosensitiven retinalen Ganglienzellen (ipRGCs) reagieren auf tageszeitabhängige Unterschiede der Lichtintensität. Sie verfügen über ein spezielles Pigment, das Melanopsin. Entsprechend der Lichtintensität wird dieses aktiviert und stößt einen G-Protein-gekoppelten Prozess an, der seinerseits eine Depolarisation der Zellen auslöst. Die Reizweiterleitung erfolgt dann direkt über den Retino-hypothalamischen Trakt in den SCN (Oster 2014; Reppert und Weaver 2002). Weitere äußere Zeitgeber sind

Temperaturrhythmen (Buhr, Yoo, und Takahashi 2010) und der Essensrhythmus (Zvonic et al. 2006).

Vor allem die peripheren Uhren metabolisch aktiver Gewebe scheinen sich durch den Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme maßgeblich beeinflussen zu lassen (Barclay et al. 2012; Oster 2014). Zur Kommunikation mit der Peripherie nutzt der SCN die Aktivierung des autonomen Nervensystems sowie humorale Signalwege wie die Hormone Kortisol und Melatonin, welches typischer Weise nur während Dunkelheit ausgeschüttet wird (Oster 2014; Arendt 2010). Interessanterweise können die peripheren Uhren aber auch autonom, das heißt ohne den koordinierenden Einfluss des SCN arbeiten. In Zellkulturen blieb beispielsweise die tageszeitliche Rhythmik von Fibroblasten über einen gewissen Zeitraum erhalten (Dibner, Schibler, und Albrecht 2010).

1.4 Schlaf und Stoffwechsel

Eine Reihe von epidemiologischen Studien deutet darauf hin, dass die Manipulation der inneren Uhr einen negativen Einfluss auf zahlreiche metabolische Prozesse hat. Querschnittsstudien in Spanien, Japan und den USA konnten einen signifikanten Zusammenhang von Schlafdauerverkürzung und Adipositas aufzeigen (Hallschmid et al. 2015, Peplonska, Bukowska, und Sobala 2015, Biggi et al. 2008, Knutson et al. 2007). In darauffolgenden Studien wurde außerdem ein Anstieg der Prävalenz des metabolischen Syndroms infolge verkürzter Schlafdauer beobachtet (Chaput, Bouchard, und Tremblay 2014; Cappuccio et al. 2008; Hall et al. 2008). Paradoxerweise führte auch eine abnorme Verlängerung der Schlafdauer zur Gewichtszunahme. Folglich besteht ein U-förmiger Zusammenhang von Schlafdauer und Gewichtszunahme. Eine mittlere Schlafdauer von sieben bis acht Stunden pro Nacht scheint am Ehesten zum Erhalt physiologischer Stoffwechselprozesse beizutragen (Chaput et al. 2013; Sharma und Kavuru 2010). Die Tätigkeit in Schichtsystemen hat ebenfalls negativen Einfluss auf den Stoffwechsel (Wang et al. 2014; Puttonen, Viitasalo, und Härmä 2012). Man geht davon aus, dass die Auswirkungen nicht allein durch die Veränderung der Schlafdauer, sondern viel mehr über eine fundamentale Störung des zirkadianen Uhrensystems vermittelt werden können.

In den letzten Jahren wurde der beobachtete Zusammenhang von gestörtem Schlaf und metabolischen Erkrankungen anhand zahlreicher klinisch-experimenteller Studien genauer

untersucht (Gil-Lozano et al. 2016; Spaeth, Dinges, und Goel 2013; Herzog et al. 2013; Schmid et al. 2007). Die Gesamtheit dieser Studien deutet auf eine multifaktorielle Pathogenese hin. Mehrere Mechanismen scheinen über eine Gewichtszunahme zu einer diabetischen Stoffwechsellage zu führen (Knutson et al. 2007). Erstens führt eine Verkürzung der Schlafdauer zu gesteigertem Appetit und konsekutiv zur vermehrten Nahrungsaufnahme (Abb. 2). Grundsätzlich sind dabei die Stoffwechselhormone Leptin und Ghrelin maßgeblich für die Regulation des Hungergefühls verantwortlich. Leptin induziert das Sättigungsgefühl. Ghrelin wird durch Zellen in der Magenwand ausgeschüttet und gilt als Hungerhormon. Physiologischerweise kommt es durch Nahrungsaufnahme zur Dehnung der Magenwand, die umgehend zum Sistieren der Ghrelinausschüttung führt (Schmid et al. 2007; Taheri et al. 2004). In einer klinisch-experimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass eine einzige Nacht Schlafdeprivation unmittelbar erhöhte Ghrelinkonzentrationen und ein gesteigertes Hungergefühl am Morgen zufolge hat (Schmid et al. 2008). Zweitens führt gestörter Schlaf zu deutlichen Veränderungen im Glukosestoffwechsel. Bereits 1999 konnte gezeigt werden, dass es durch eine Schlafrestriktion auf vier Stunden pro Nacht über sechs Nächte zu einer deutlichen Reduktion der peripheren Insulinsensivität kommt (Spiegel, Leproult, und Van Cauter 1999). In anderen Studien konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden (Lucassen, Rother, und Cizza 2012; Schmid et al. 2011). In einer weiteren Studie zeigten sich nach Schlafrestriktion reduzierte Glucagonkonzentrationen am Morgen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Verkürzung der Schlafdauer neben einer Hemmung von β -Zellen des Pancreas auch zur Störung der α -Zellfunktion und Interaktion der Langerhanschen Zellen untereinander führt (Schmid et al. 2007). Darüber hinaus scheinen nicht nur Dauer und Zeitpunkt des Schlafens, sondern auch dessen Qualität den Glukosestoffwechsel zu beeinflussen (Stamatakis und Punjabi 2010). Drittens scheint eine Verkürzung der Schlafdauer mit reduzierter körperlicher Aktivität und vermehrt sitzender Tätigkeit am Folgetag einherzugehen (Booth et al. 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine Nacht Schlafrestriktion zur verminderten spontanen Bewegung führt (Schmid et al. 2008). Dieser Effekt bedingt einen reduzierten Energieverbrauch und begünstigt somit zusätzlich die Entstehung metabolischer Erkrankungen (Lucassen, Rother, und Cizza 2012).

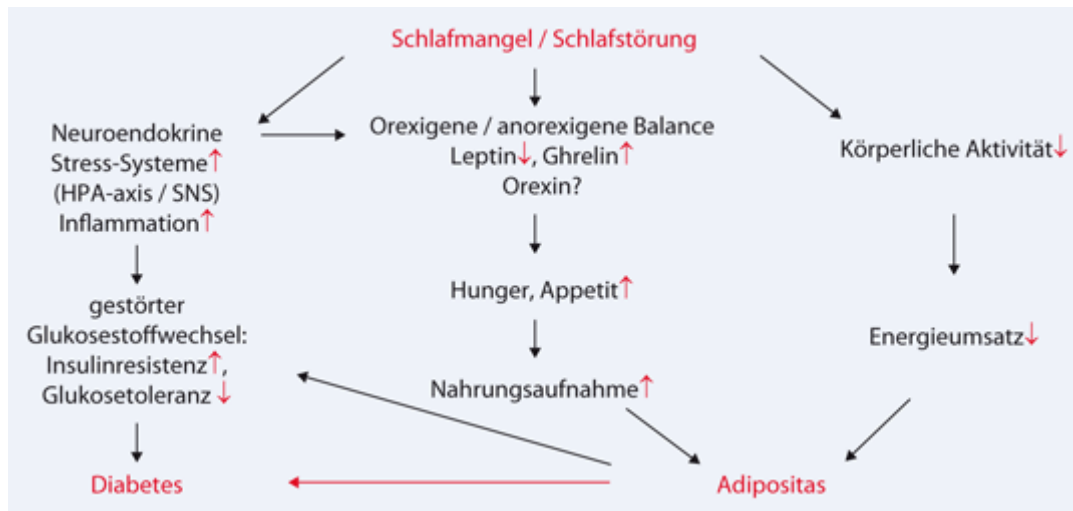


Abb. 2: Potenzielle Pathomechanismen der Entwicklung von Diabetes und Adipositas infolge gestörten Schlafs (Schmid und Schultes 2011).

Auf welche Weise diese metabolischen Effekte vermittelt werden, ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Einerseits geht man davon aus, dass eine erhöhte Aktivität endogener Stresssysteme, wie die des sympathischen Nervensystems oder der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HPA)- Achse eine Rolle spielen (Abb. 2). Dabei führt Schlafverkürzung zur gesteigerten sympathovagalen Balance, einem veränderten Muster der Kortisolausschüttung und zur Reduktion der zirkulierenden Schilddrüsenhormone. Die Rolle von Wachstumshormon ist an dieser Stelle noch nicht eindeutig geklärt (Lucassen, Rother, und Cizza 2012; Schmid und Schultes 2011). Andererseits scheint Schlafverkürzung bzw. gestörter Schlaf einen inflammatorischen Zustand zu begünstigen, der seinerseits eine Insulinresistenz provozieren kann.

Beispielsweise führte eine moderate, einwöchige Schlafrestriktion von acht Stunden pro Nacht auf sechs Stunden pro Nacht zu einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine im Plasma junger gesunder Probanden (Vgontzas et al. 2004).

Die Zusammenschau der Ergebnisse verschiedener molekulargenetischer Studien deutet auf einen fundamentalen Zusammenhang von Schlaf und Stoffwechsel auf Ebene der Genexpression hin (Xie et al. 2013). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Mutation im zentralen Uhrgenen CLOCK zur Gewichtszunahme und zum metabolischen Syndrom führt (Turek et al. 2005). Im Weiteren konnten periphere Uhrgene und von diesen kontrollierte CCGs in murinem Fettgewebe nachgewiesen werden (Zvonic et al. 2006). Eine

spezifische Deletion vom Uhrengen Aryl-hydrocarbon-receptor-nuclear-translocator-like-protein (ARNTL) in murinen Adipozyten führte ebenfalls zu Übergewicht und veränderter Nahrungsaufnahme. In anderen Geweben konnte dieser Effekt bisher nicht nachgewiesen werden (Paschos et al. 2012). Eine weitere Studie deutet darauf hin, dass es durch Veränderungen der Schlafenszeit zu veränderten Expressionsmustern der rhythmischen Gene kommt. Dabei hat man in einem Mausmodell ein zweiwöchiges Schlafrestriktionsschema, wie es beispielsweise während Schichtarbeit vorkommt, angewandt. Die Analyse des Lebertranskriptoms der Mäuse ergab einen direkten Zusammenhang von Schlafdauer und Expressionsmustern der Uhrengene sowie der CCGs, die im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel eine Rolle spielen (Barclay et al. 2012). In der Vergangenheit konnten ähnliche Effekte in humanen Studien aufgezeigt werden. Ein Polymorphismus im zentralen Uhrengen CLOCK war auch beim Menschen mit dem metabolischen Syndrom assoziiert (Scott, Carter, und Grant 2007). Des Weiteren konnte die Existenz rhythmischer Gene in humanen Fettzellen nachgewiesen werden. Dabei hing deren Expression eng mit dem Body-Mass-Index (BMI) der Probanden zusammen (Wu et al. 2009). In einer Studie der Arbeitsgruppe Vieira stellte sich heraus, dass die Gene CRY2 und REV-ERBA in einer Gruppe übergewichtiger Probanden im Vergleich zu normgewichtigen Probanden in einem 24-Stunden Rhythmus vermehrt exprimiert wurden (Vieira et al. 2014). In einem anderen Studienmodell zeigte sich zudem, dass eine Schlafrestriktion über vier Nächte auf viereinhalb Stunden pro Nacht mit einer gestörten Insulinsensitivität der menschlichen Fettzellen einherging (J. L. Broussard et al. 2012).

Demzufolge scheint der Verlust oder eine veränderte Expression der Uhrengene eine Schlüsselrolle in der Entstehung metabolischer Erkrankungen beim Menschen einzunehmen. Weitere Studien sind nötig, um die Zusammenhänge im Detail zu verstehen.

1.5 Physiologie des Fettgewebes

Das menschliche Fettgewebe kann als eigenes Organ angesehen werden. Im Vergleich zu anderen Organen kommt es nahezu überall im Körper vor. Es lässt sich nach Lokalisation oder Funktion verschiedenen Subtypen zuordnen. Braunes Fettgewebe spielt eine wichtige Rolle bei der Thermogenese und Thermoregulation. Es kommt insbesondere beim Neugeborenen vor und erst im Jahr 2009 wurde braunes Fettgewebe bei Erwachsenen entdeckt (Virtanen KA et al. 2009, Cypess AM et al. 2009).

Beim Erwachsenen dominiert weißes Fettgewebe. Es besteht aus vielen einzelnen Fettzellen, den Adipozyten. Diese können sich nahezu endlos duplizieren. Bei einem krankhaft übergewichtigen Menschen kann mehr als die Hälfte des Körpergewichts aus Fettgewebe bestehen (Gimble und Floyd 2009). Weißes Fettgewebe stellt die größte Energiereserve im Säugetier dar. Nach einer Mahlzeit induziert Insulin die Aufnahme von Glukose und freien Fettsäuren aus dem Blut in die Adipozyten. Dort werden sie als Triglyzeride gespeichert und können bei Bedarf, während des Schlafs oder zwischen den Mahlzeiten durch Lipolyse wieder freigesetzt werden (J. Broussard und Brady 2010). Außerdem spielt weißes Fettgewebe eine herausragende Rolle als endokrines Organ.

Die Adipozyten produzieren eine Reihe von Zytokinen wie beispielsweise Interleukin 8 (IL8), Proteine und Peptidhormone, die sog. Adipokine. Zu ihnen gehören beispielsweise Leptin, Resistin oder Retinol-Bindungsprotein 4 (RBP4). Das Fettgewebe kann anhand dieser Botenstoffe mit anderen Geweben über seinen Funktionszustand kommunizieren, indem es auto- und parakrine oder systemische Signale sendet und metabolische Prozesse in der Leber, den β -Zellen des Pancreas, den Muskeln oder dem Gehirn reguliert (Abb. 3). Zusätzlich nehmen die Adipokine auch direkt und indirekt Einfluss auf den Glukosestoffwechsel. Insbesondere RBP4 und Resistin scheinen durch vermehrte Expression im viszeralen Fettgewebe mit einer Insulinresistenz assoziiert zu sein. Analog dazu korreliert die Konzentration von Adipokinen häufig mit Fettmasse, Fettverteilung und Insulinsensitivität (Blüher 2014; Machleidt, Ott, und Lehnert 2013 ; Cherneva et al. 2013). Bei einer gestörten Fettgewebefunktion, die sich histologisch häufig durch das vermehrte Auftreten von Immunzellen im Fettgewebe bemerkbar macht, zeigt sich ein diabetogenes, atherogenes und proinflammatorisches Adipokinmuster im Blut (Blüher 2014). Das Fettgewebe selbst ist also maßgeblich an der Regulation seines eigenen Stoffwechsels beteiligt.

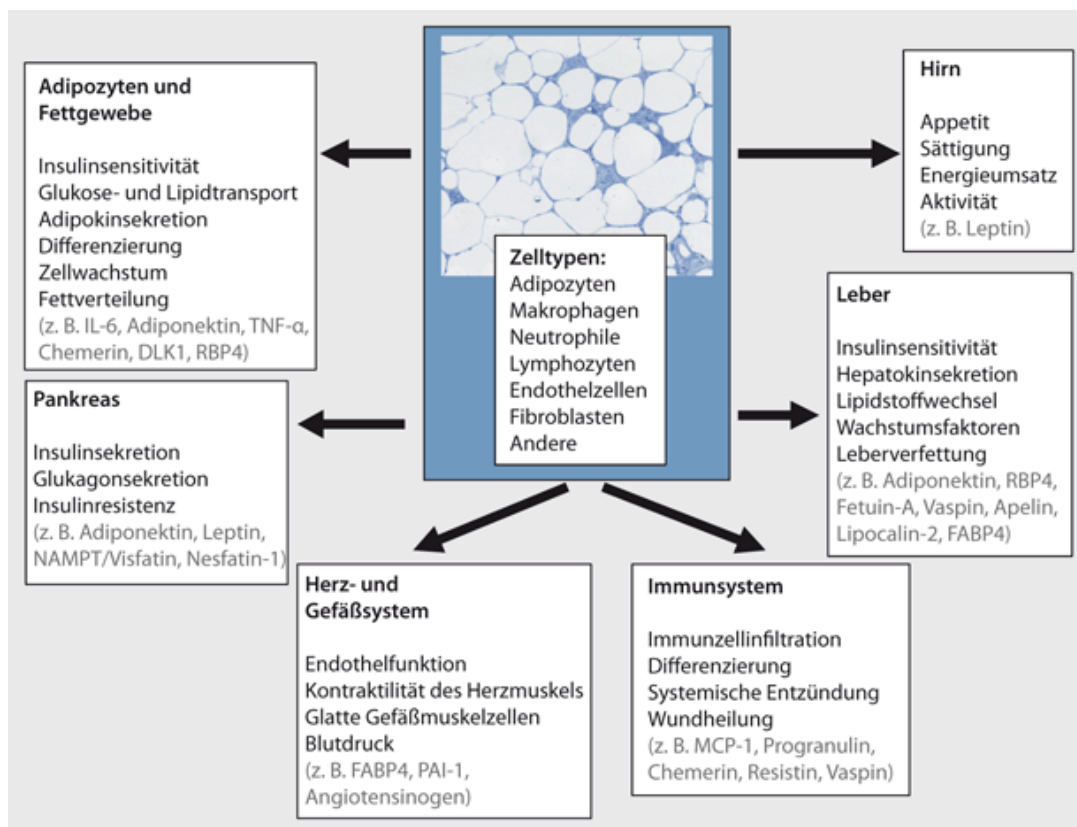


Abb. 3: Die Organisation weißen Fettgewebes und seine Funktion als endokrines Organ (Blüher 2014).

1.6 Ziele und Fragestellung

Die zuvor dargestellte Studienlage deutet darauf hin, dass eine Schlafdauerverkürzung zur Alteration rhythmischer Genexpressionsmuster in peripheren Geweben führt. Dabei spielt insbesondere weißes Fettgewebe mit seiner Funktion als endokrines Organ eine bedeutende Rolle im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Gleichzeitig scheinen Veränderungen der endogenen Rhythmik mit metabolischen Erkrankungen wie Adipositas oder dem metabolischen Syndrom einherzugehen.

Vor diesem Hintergrund untersucht die hier vorliegende Arbeit den Effekt einer kurzfristigen Schlafdauerverkürzung auf die Expressionsmuster des Transkriptomts weißer Fettzellen am darauffolgenden Morgen im Vergleich zum Abend zuvor.

Einerseits soll dabei der Einfluss einer einzelnen Nacht Schlafrestriktion auf die peripheren Uhren der Adipozyten dargestellt werden. Andererseits soll untersucht werden, ob eine potenzielle Änderung der Genexpression auch anhand entsprechend veränderter

Konzentrationen peripher zirkulierender Adipokine und der Glukosestoffwechselfparameter dargestellt werden kann.

Dafür wurde insgesamt 17 männlichen, gesunden Probanden jeweils vor und nach partieller oder totaler Schlafrestriktion eine subkutane Adipozytenprobe des abdominellen Fettgewebes entnommen. Die Transkriptionsmuster der Adipozyten-RNA wurden analysiert und mit denen einer Kontrollbedingung verglichen. Zusätzlich wurden relevante Parameter des Glukose- und Fettstoffwechsels, spezifische Adipokine und das Zytokin IL8 bestimmt. Dazu wurden Blutproben parallel zu den Zeitpunkten der Adipozytenaspirationen entnommen.

Es wurde die folgende Hypothese geprüft:

Eine Schlafdauerrestriktion führt nach bereits einer Nacht verkürzten Schlags zu einer Alteration der morgendlichen Transkriptionsrhythmen - d.h. nach Schlafverkürzung - im Vergleich zu den abendlichen Transkriptionsrhythmen in weißem Fettgewebe beim Menschen.

Die potenzielle Veränderung auf Ebene der Transkription beeinflusst unmittelbar die endokrine Aktivität der Adipozyten. Dabei ist der Effekt umso ausgeprägter, je länger die Dauer des Schlafentzugs ist.

2. Methoden

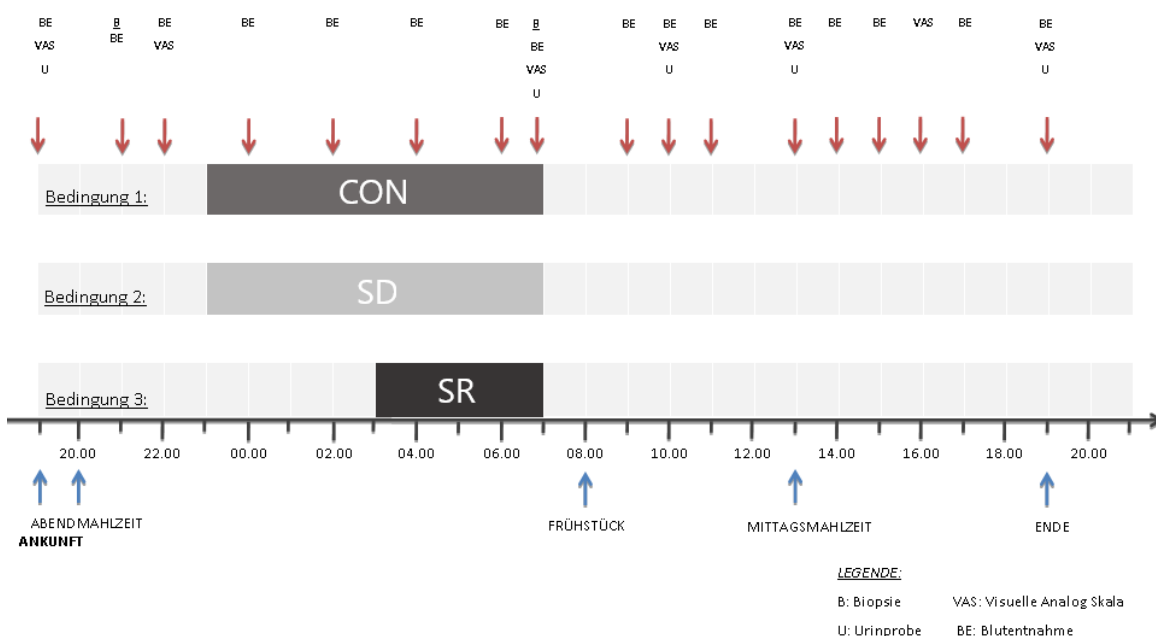
2.1 Probanden

Siebzehn gesunde Probanden wurden an drei Versuchsterminen über jeweils 24 Stunden untersucht. Die Probanden wurden über Aushänge am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und über einen bestehenden Pool ehemaliger Probanden des Instituts für Neuroendokrinologie rekrutiert. Zwei der 17 Probanden haben nicht alle der drei Versuchstermine wahrgenommen und wurden demzufolge von der Analyse ausgeschlossen. Bei den Probanden handelte es sich um gesunde, normalgewichtige Männer im Alter von 18 – 30 Jahren (Mittelwert \pm Standardfehler, MW \pm SEM: 24,0 \pm 0,9 Jahre) mit einem BMI von 18,6 kg/m² - 24,9 kg/m² (MW \pm SEM: 22,9 \pm 0,4 kg/m²). Vor Beginn der Versuche wurden Informationen zu Vorerkrankungen, Familienanamnese und Sozialanamnese der Probanden mittels eines standardisierten Fragebogens innerhalb eines Anamnesegesprächs und einer klinischen Untersuchung erfasst. Ausschlusskriterien für die Studie waren Vorerkrankungen sowie chronische Erkrankungen, eine regelmäßige Medikamenteneinnahme, Störungen im Schlaf-Wach-Rhythmus oder eine Anstellung im Schichtdienst, erhöhter Alkoholkonsum (>50g/Tag) oder Koffeinkonsum (>300 mg/Tag). Alle Probanden waren Nichtraucher. Außerdem sind bei allen Probanden eine körperliche Untersuchung und eine Blutentnahme durchgeführt worden, wobei ein kleines Blutbild, Nierenretentionswerte, Leberwerte, Blutfettwerte und Elektrolyte bestimmt worden sind. Die Blutwerte und Untersuchungsergebnisse aller Probanden lagen in den jeweiligen Referenzbereichen. Die Probanden wurden vor Beginn der Studie, mündlich als auch schriftlich, über den Hintergrund und Nutzen, über den detaillierten Ablauf der Versuche und die möglichen Risiken umfassend aufgeklärt. Alle Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und gaben ihr mündliches und schriftliches Einverständnis zur Durchführung der Versuche ab. Während der Studie waren die Probanden angehalten, weder Blut zu spenden noch an weiteren Studien teilzunehmen. Als Aufwandsentschädigung erhielt jeder Proband 240€. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck begutachtet und genehmigt (AZ 12-027).

2.2 Studiendesign und Versuchsanordnung

Die Studie umfasste für jeden Probanden drei unterschiedliche Bedingungen an drei Versuchsterminen (Abb. 4). Ein Versuchstermin dauerte 24 Stunden. Die Versuche starteten immer um 19.00 Uhr und endeten am darauffolgenden Tag um 19.00 Uhr. Zwischen den einzelnen Versuchsterminen lagen mindestens zwei, maximal 10 Wochen. Die Bedingungen „Schlafdeprivation“ (SD) mit komplettem Schlafentzug, „Schlafrestriktion“ (SR) mit Schlafentzug in der ersten Nachthälfte (3.00 bis 7.00 Uhr) und „Kontrolle“ (CON) mit regulärem Schlaf (23.00 bis 7.00 Uhr) wurden balanciert randomisiert durchgeführt.

Abb. 4: Organigramm des Studienablaufs.



Die Studienteilnehmer erschienen an den Versuchstagen um 18.45 Uhr am Schlaflabor der Station 41c, Haus 50 des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck. Vor Beginn des Versuchs wurden neben der Befindlichkeit der Studienteilnehmer nochmals die Versuchsvoraussetzungen abgefragt. Nur wenn die Probanden an den Tagen zuvor einen regulären Schlaf-Wach-Rhythmus eingehalten hatten und an Versuchstagen keinen Alkohol, Koffein oder Mahlzeiten nach 14.00 Uhr zu sich genommen haben, konnte mit dem Versuch

begonnen werden. Zusätzlich wurde an jedem Termin das aktuelle Körpergewicht der Probanden gemessen. Mit Vorbereitung des Versuchs wurde die ActiWatch (Philips Respironics, Herrsching, Germany) an den dominanten Arm und ein Venenverweilkatheter (18 G Braunüle) an den nicht-dominanten Arm des Probanden angelegt. Darüber konnten während des Versuchs in regelmäßigen Abständen, Blutproben gewonnen werden. Die ActiWatch zeichnete während der Versuchszeit und am Folgetag spontane Bewegungsaktivität der Probanden auf. Zu Versuchsbeginn um 19.00 Uhr wurde mit der ersten Blutentnahme (BE) und der Gewinnung einer Urinprobe begonnen. Die Blutproben wurden unter kontinuierlicher Kühlung nach spätestens 20 Minuten bei $-4,0^{\circ}\text{C}$ und 4.000 Umdrehungen (3.112g) zentrifugiert (Laborzentrifuge 400R, Heraeus Instruments), in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert und vorerst bei $-20,0^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach spätestens zwei Wochen wurden die Proben auf $-80,0^{\circ}\text{C}$ umgelagert. Des Weiteren wurden die Probanden in regelmäßigen Abständen gebeten sowohl Symptomlisten (SRS) als auch visuelle Analogskalen (VAS) zur Evaluation von Hunger, Durst, Gestimmtheit und Wohlbefinden auszufüllen. Im weiteren Verlauf führten die Probanden vor der standardisierten Abendmahlzeit um 20.00 Uhr sowie vor der standardisierten Morgenmahlzeit digitale Tests für die explizite und implizite Verarbeitung von Essensreizen durch. Während der ersten Versuchssitzung wurde zusätzlich das habituelle Essverhalten mittels standardisierter Fragebögen ermittelt („Eating Disorder Examination-Questionnaire“ (EDE-Q) von Fairburn und Beglin (1994) und „Power of Food Scale“ (PFS)).

Um 21.00 Uhr erfolgte nach einer weiteren BE die erste der beiden Adipozytenaspirationen eines Versuchs. Während CON wurde direkt im Anschluss an die Adipozytenaspiration mit dem Anlegen der Elektroden zur Vorbereitung der polysomnographischen Schlafdokumentation begonnen. Dabei wurden Elektroden auf die Kopfhaut (Elektroenzephalogramm (EEG)), an das Kinn (Elektromyogramm (EMG)) und horizontal sowie einseitig vertikal um die Augen (Elektrookulogramm (EOG)) geklebt und im zweiten Schritt mit einem Verstärker verbunden. Dieser leitete die Signale zu einem Aufnahmegerät (EEG-Serie 4400, Nihon Kohden GmbH, Rosbach, Germany) im Nebenraum. Ab 22.30 Uhr wurde das Licht ausgeschaltet und die Probanden sollten schlafen. Während SR erfolgte dasselbe Prozedere vier Stunden später, in der Bedingung mit totalem Schlafentzug wurde dementsprechend darauf verzichtet. Unabhängig von der Versuchsbedingung erfolgten die Blutentnahmen in zweistündigen Abständen. Nach den Mahlzeiten wurden über bis zu drei

Stunden stündliche BEs durchgeführt. Die besondere Konstruktion des Schlaflabors erlaubte es während der Durchführung der BE die Probanden nicht zu wecken. Dabei konnte die Venenverweilkanüle des Probanden im Schlaflabor durch eine kleine Wandöffnung unter Benutzung eines 2 m langen, 1×2 mm dünnen Kunststoffinfusionsschlauchs (Combidyn Druckschlauch, Pressure Monitoring Tubing PE 1×2 mm, 200 cm, transparent, B. Braun Melsungen AG, Germany) mit einer Infusion (NaCl 500 ml, B. Braun Melsungen AG, Germany) im benachbarten Arbeitsraum verbunden werden. Dabei diente ein Dreiwegehahn zwischen Kunststoffinfusionsschlauch und Infusionsflasche der BE.

Über den Zeitraum des Schlafens wurde eine Infusion (NaCl-Lösung 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Germany) angeschlossen, um ein Offenhalten des Venenverweilkatheters zu gewährleisten. In CON und SR wurden die Studienteilnehmer um 07.00 Uhr geweckt. Danach wurden Elektroden und Infusion entfernt. Nach einer weiteren BE und U wurde um 07.30 Uhr die zweite Adipozytenaspiration durchgeführt (s. 2.3 Adipozytenaspiration). Eine halbe Stunde später haben die Probanden ein standardisiertes Frühstück bekommen. Ansonsten konnten die Probanden während des Versuchs lesen, standardisierte Filme schauen oder sich mit der Betreuungsperson unterhalten. Körperliche Betätigung, der Verzehr von zusätzlichen Mahlzeiten oder Getränken außer Wasser war nicht gestattet. Als Mittagessen haben die Probanden um 13.00 Uhr eine weitere standardisierte, warme Mahlzeit bekommen. Im Anschluss folgten bis 19.00 Uhr weitere Blutentnahmen, die Evaluation von Befindlichkeit durch SRS und VAS sowie weitere Urinproben um 13.00 Uhr und um 19.00 Uhr. Nach 19.00 Uhr wurde der Venenverweilkatheter entfernt und die Studienteilnehmer durften nach Hause gehen.

2.3 Adipozytenaspiration, RNA-Isolation, -Sequenzierung und -Analyse

Unabhängig von der Versuchsbedingung wurde bei den Studienteilnehmern um 21.00 Uhr und um 07.30 Uhr unter Lokalanästhesie eine Probe des Bauchfettgewebes entnommen. Um die Bauchdecke zu entspannen, wurden die Probanden in 45,0°-Oberkörperhochlagerung gebracht und die Beine angewinkelt. Kaudal und lateral des Bauchnabels wurde die Haut mehrfach, großflächig mit Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, Germany) desinfiziert. Im Anschluss wurde einseitig ein Areal von ca. 2x4 cm im Bereich des sogenannten „Sherren-Dreiecks“, eine dreieckige Fläche auf der ventralen Seite der Bauchdecke, die medial von der Symphyse und dem Bauchnabel und lateral von der Spina iliaca anterior

superior begrenzt wird, betäubt. Als Lokalanästhetikum wurde Lidocain (AstraZeneca, Wedel, Germany) verwendet. Nach Wirkeintritt der Lokalanästhesie wurde mit der Adipozytenaspiration begonnen. Mithilfe einer 16-G-Nadel konnte die Haut inzidiert und durch eine fächerförmige Bewegung etwa 5 ml subkutanes Fettgewebe in eine 20 ml-Spritze gesaugt werden. Im Anschluss wurde das entnommene Gewebe umgehend mit Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung 0,9%, B.Braun Melsungen A.G., Germany) gewaschen und zur Konservierung in ein auf 4,0°C gekühltes Reagenzglas mit 10 ml RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) gelegt. Dieses wurde zuerst 24 Stunden bei -20,0°C und anschließend bei -80,0°C gelagert. Den Studienteilnehmern wurde für 30 Minuten ein Kompressionsverband angelegt, um die Blutstillung zu unterstützen.

Bei der morgendlichen Probenentnahme wurde immer kontralateral der am Vorabend verwendeten Seite des Abdomens Adipozyten aspiriert, um lokale Hämatome oder Entzündungsreaktionen und deren potentiellen Einfluss auf die Probenqualität zu minimieren.

Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerempfehlungen mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Mittels BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA) konnte die Qualität der RNA überprüft werden. Die RNA-Sequenzierung (RNAseq) wurde nach dem standardisierten Protokoll des Transkriptom-Analyse Labors der Universität Göttingen durchgeführt. Dabei wurde mit dem Illumina HiSeq 2000-Sequenzierer (Illumina, San Diego, CA) gearbeitet.

Die Demultiplexierung der Rohdaten „raw reads“ erfolgte mithilfe von bcl2fastq v2.17.1.14 (Dodt et al. 2012). Anschließend wurden die Sequenzen mithilfe von Bowtie v2.1.0 mit der USCSC-hg19-cDNA-Datenbank abgeglichen. Die Umwandlung, Sortierung und Quantifizierung der Transkripte erfolgte durch Samtools v0.1.19 und HtSeq v0.5.4p3. Die Ergebnisse wurden anschließend wie folgt mithilfe der Bioconductor-Suite unter R aufbereitet und analysiert (Gentleman et al. 2004). Alle Gene mit weniger als 20 Reads in mindestens fünf Proben wurden ausgeschlossen. Die verbliebenen Werte wurden TMM-normalisiert und das Streuungsmaß geschätzt. Unterschiedlich exprimierte Gene wurden anhand Likelihood-ratio-test-binominal-data-distribution mithilfe von EdgeR bestimmt (McCarthy et al. 2012). Tageszeitabhängig regulierte Gene wurden durch einen gepaarten Test mit SAM v4.01 analysiert (Tusher et al. 2001). Dabei diente ein p-Wert von <0,05 nach False-Discovery Rate Korrektur für mehrfaches Testen als Einschlusskriterium. Die Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Signalweg Überrepräsentations-Analyse

wurde mithilfe von WebGestalt ausgeführt (Matthews et al. 1985). Die funktionellen Gen-Klassifikationen wurden mithilfe der Gen Ontologie (GO)-Datenbank bestimmt (Takahashi et al. 2008).

2.4 Schlafstadienauswertung

Die polysomnographische Aufzeichnung des Schlafes (siehe Kap. 2.2; Abb. 4) wurde nach den Leitlinien der American Academy of Sleep (American Academy of Sleep Medicine, 2008) ausgewertet. Es werden folgende Stadien unterschieden: Wachstadium (W), Schlafstadien N1 (NREM 1):S1, N2 (NREM 2):S2, N3 (NREM 3):S3 und REM (R).

Aufgrund technischer Schwierigkeiten fehlt die polysomnografische Aufzeichnung jeweils eines Probanden in SR und CON.

Die Aufzeichnungen wurden durch eine weitere, versuchsblinde Person ausgewertet, um eine mögliche fehlerhafte Zuordnung der Schlafstadien zu minimieren.

2.5 Analyse metabolisch relevanter Blutparameter

Um die Ergebnisse der Genexpression weiter verifizieren zu können, wurden auf peripherer Ebene die Konzentrationen von Hormonen des Glukose- und Fettstoffwechsels gemessen. Zur Bestimmung dieser peripheren Stoffwechselfparameter wurden engmaschige Blutentnahmen durchgeführt (siehe Kap. 2.2; Abb. 4). Die Proben wurden, wie zuvor detailliert erläutert, nach Entnahme direkt weiterverarbeitet und bei $-80,0^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die Analyse relevanter Glukosestoffwechselfparameter erfolgte anhand Glukose, Insulin und C-Peptid. Um die β -Zellfunktion darzustellen, wurde der Homeostasis Model Assessment Index (HOMA β) und um die Insulinresistenz darzustellen, der Homeostasis Model Assessment Insulinresistenztest (HOMA-IR) berechnet (Matthews et al. 1985). Die Lipidstoffwechselfunktion wurde anhand von Triglyceriden (TG) und freien Fettsäuren (FFA) gemessen. Zur Datenerhebung wurden die 19.00 Uhr und 7.00 Uhr Proben herangezogen. Unter Berücksichtigung der beobachteten diurnalen Veränderungen, wurden die Serumkonzentrationen der Adipokine RBP4, Resistin und des Zytokins IL8 für die Zeitpunkte 22.00 Uhr und 7.00 Uhr bestimmt.

Glukose (Intraassaykoeffizient (CV_{intra}): 0,7%; Interassaykoeffizient (CV_{inter}): 1,3%), TG (CV_{intra}: 0,7%, CV_{inter}: 1,0%), und FFA (CV_{intra}: 2,3%) wurden mittels Photometrie bestimmt, Insulin und C-Peptid (CV_{intra}: 1,9% und 1,6%; CV_{inter}: 2,6% und 2,4%) anhand

ECLIA. Die Bestimmung von Resistin, RBP4 und IL8 erfolgte durch Immunoassays (CVintra: 4,7%, 6,9 und 5,8%; CVinter: 8,8%, 7,2% und 7,7%).

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 22.0 für Mac (SPSS Inc., Chicago, IL) und Prism v 5 (GraphPad, La Jolla, CA) durchgeführt.

Für paarweise Vergleiche wurde der T-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Multiple Vergleiche wurden mittels ein- und zweifaktoriellen Varianzanalysen (ANOVA) ausgewertet und Unterschiede zwischen einzelnen Messpaaren mithilfe eines Bonferroni Posttests bestimmt. Die Daten für Körpergewicht, EGG und Blutparameter wurden ebenfalls anhand ANOVAs in Abhängigkeit der Versuchsbedingung (CON vs. SR vs. SD) und der Probezeitpunkte (der wiederholten Messungen während des Versuchs) ausgewertet. Dabei wurde der Helmert Kontrast Test zum Vergleich der Mittelwerte der CON vs. SR- bzw. SD herangezogen.

Alle Ergebnisse werden, soweit nicht anders beschrieben, in Einheiten des Système international (SI) als $MW \pm SEM$ angegeben. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Bei der Transkriptom-Analyse wurde ebenfalls ein FDR-korrigierter p-Wert von 5% als Grenze festgelegt.

2.7 Beschreibung der Eigenleistung und Leistung anderer bei der Durchführung der Experimente und Analysen

Die Probandenrekrutierung und -betreuung während der Versuche, die Blutentnahmen und die Anlage der EEGs erfolgte ausschließlich durch mich (s. 2.1, 2.2.). Die Adipozytenaspirationen (s. 2.3) wurden unter Aufsicht von Herrn Dr. med. Felix Machleidt, Herrn Dr. Matthias Bernd, Herrn PD Dr. Alex Iwen und Herrn Prof. Dr. med. Sebastian Meyhöfer ebenfalls durch mich durchgeführt. Bei der sich umgehend anschließenden Verarbeitung und -vorbereitung der Blut- und Adipozytenproben wurde ich teils durch Herrn Dr. rer. nat. Rodrigo Chomorro unterstützt (s. 2.2, 2.3). Im Anschluss erfolgte die Analyse der Blutparameter durch Heidi Ruf und Martina Grohs (s. 2.4). Die Adipozytenproben wurden zur RNA-Isolation und -Sequenzierung an das Transkriptomanalyselabor der Universität Göttingen versendet. Die Transkriptombestimmung erfolgte dort in wissenschaftlicher Kooperation mit Frau Dr. rer. nat. Claudia Pommerenke und Dr. rer. nat.

Gabriela Salinas-Riester. Die Analyse der Transkriptomdaten und deren klinisch - physiologische Interpretation erfolgte unter Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster durch mich (s. 2.3). Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte durch PD Dr. oec. troph. Britta Wilms (s. 2.6). Die EEG-Daten wurden durch mich unter Supervision von Dr. -Ing. Matthias Mölle ausgewertet (s. 2.4). Nach Zusammenschau aller Daten erfolgte deren Interpretation durch mich unter Supervision von Prof. Dr. med. Sebastian Meyhöfer, Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster und PD Dr. oec. troph. Britta Wilms.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse unserer Studie genau dargestellt. Dabei wird zuerst auf die Auswertung der EEG-Daten eingegangen. Im Anschluss werden die Ergebnisse der Analyse der Adipozytenaspirationen dargestellt. Neben den Genexpressionsmustern des Adipozytentranskriptoms vor und nach Schlafintervention, werden anschließend auch die zirkadianen Genexpressionsmuster relevanter metabolischer Gene und Uhrgene gezeigt. Zum Schluss gehen wir auf die Daten der Analyse metabolisch relevanter Stoffwechselfparameter ein.

Die anhand der ActiWatch aufgezeichneten Daten, die Daten des EDE-Q, PFS, SRS, VAS und die Daten der BE zwischen 9.00 und 19.00 Uhr waren nicht Teil der Analyse und Auswertung der hier vorliegenden Arbeit.

3.1 Schlafstadien

Das Körpergewicht der Probanden blieb während der gesamten Studie konstant ($p=0,934$ für ANOVA Haupteffekt „Zeit“).

Die Probanden schliefen in CON im Mittel $468,4 \pm 5,5$ Min, während SR $253,8 \pm 10,0$ Min ($p < 0,001$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“). In SR zeigte sich im Vergleich zu CON eine signifikante Reduktion der absoluten Schlafdauer in den Schlafstadien REM, S1 und S2 (alle $p \leq 0,01$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“). Die absolute Dauer an S3-Schlaf wurde nicht signifikant verändert ($p=0,194$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“).

Unter Schlafrestriktion blieb der relative Anteil an REM-Schlaf unverändert ($12,7 \pm 0,9$ vs. $12,3 \pm 2,1$ %; $p=0,878$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“), wohingegen sich die Zusammensetzung des Tiefschlafs veränderte. Dabei erhöhte sich der relative Anteil an tieferen S3-Stadien während des SWS-Schlafs (CON vs. SR: $9,6 \pm 1,4$ vs. $3,3 \pm 20,6$ % für S1; $22,1 \pm 2,2$ vs. $36,4 \pm 3,6$ % für S3; beide $p \leq 0,001$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“).

Die hier beschriebenen Ergebnisse der EEG werden in Tabelle 1 zusammengefasst. Sie entsprechen einer dem Alter physiologischen Schlafstadienkomposition (Koella 1988).

Tabelle 1: Schlafstadienkomposition während SR und CON.

Bedingung	CON	SR	SD
Wach (min)	11,7 ± 3,1	2,0 ± 1,5*	480 ± 0
REM (min)	61,0 ± 4,5	30,1 ± 4,7**	nicht erhoben
S1 (min)	45,8 ± 6,8	8,6 ± 1,7***	nicht erhoben
S2 (min)	256,0 ± 14,4	120,5 ± 9,9 ***	nicht erhoben
S3 (min)	105,8 ± 10,1	94,7 ± 10,5	nicht erhoben
SWS Latenz (min)◇	16,3 ± 2,1	8,3 ± 1,5**	nicht erhoben
REM Latenz (min)◇	134,3 ± 18,1	127,8 ± 5,5	nicht erhoben

◇ verstrichene Zeit zwischen Beginn der versuchsabhängigen Schlafenszeit und Beginn des Auftretens des jeweiligen Schlafstadiums der Episode. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“. Diese Tabelle wurde angefertigt in Anlehnung an Table 1 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

3.2 Genexpressionsmuster vor Intervention

Um eine Vergleichbarkeit der Ausgangssituationen in den verschiedenen Schlafbedingungen zu verifizieren, wurden die Expressionsstärken aus den RNA-Sequenzierungen zwischen den Adipozytenaspirationen um 21.00 Uhr verglichen. Abb. 5 stellt die Genexpressionsaktivität während SR und SD gegenüber CON dar.

Dabei fällt auf, dass während SR vier Gene (KIAA1797, SOWAHA, DZANK1, TAF15) und während SD zwei Gene (EIF2D, UQCRFS1) signifikant in ihrem Expressionsniveau von CON abweichen. Damit ist die Ausgangssituation der Expressionsaktivität über das gesamte Transkriptom weitestgehend unabhängig von der Schlafbedingung. Der Expressionsunterschied der sechs differenziell exprimierten Gene liegt zudem durchgehend unter einem Faktor von 1,5. Dies spricht dafür, dass die experimentellen Bedingungen während der Versuche und somit die abendliche Ausgangssituation als vergleichbar angenommen werden kann.

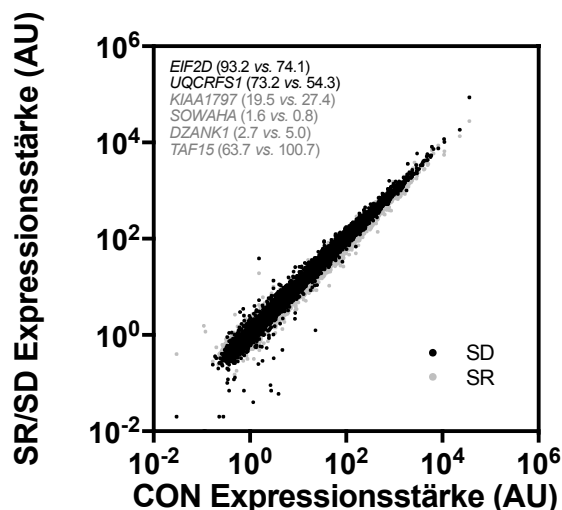


Abb. 5: Vergleich der Genexpressionsstärke in der abendlichen Adipozytenaspiration zwischen den Schlafinterventionen; Schwarze Punkte = Vergleich SD vs. CON; graue Punkte = Vergleich SR vs. CON. Die zu den Zeitpunkten unterschiedlich exprimierten Gene (Falscherkennungsrate, korrigierter p-Wert < 0,05; n=15 für SD und SR; n = 14 für CON) finden sich im Bereich rechts unten und werden mit demselben Farbcode dargestellt. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 1B der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Bei Betrachtung der tageszeitabhängigen Transkriptionsregulation innerhalb der unterschiedlichen Bedingungen wird deutlich, dass sich die Expressionsaktivität von 1.186 Genen abends (21.00 Uhr) zu morgens (7.30 Uhr) unter CON signifikant unterscheidet (Abb. 6). Darunter wurden 907 Gene (76%) morgens vermehrt exprimiert (Abb. 6, rechts).

Unter SR sank die Anzahl der tageszeitabhängig regulierten Gene auf nur 71, von denen ebenfalls 77% morgens vermehrt exprimiert wurden.

Während SD wurden noch 42 Gene tageszeitabhängig reguliert. Hier war bei lediglich einem Gen die Expression abends erhöht.

Beim Vergleich der Expressionsmuster dieser zirkadian regulierten Gene in Abhängigkeit von den Schlafinterventionen sieht man, dass zwölf Gene in allen drei Bedingungen eine schlafunabhängige, tageszeitabhängige Expression zeigen (Schnittmenge aller drei Bedingungen). 42 Gene blieben in mindestens zwei der drei Bedingungen rhythmisch reguliert und waren damit moderat schlafabhängig.

Die große Mehrzahl der tageszeitabhängig regulierten Gene ($n=1.179$) waren nur während einer Schlafbedingung rhythmisch und somit stark schlafabhängig.

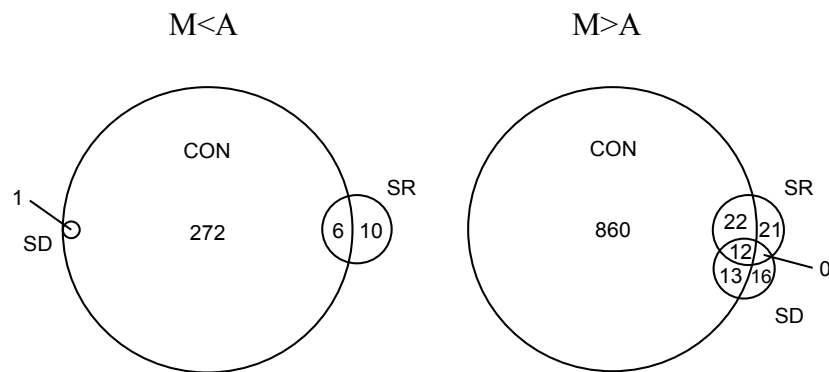


Abb. 6: Vergleich tageszeitabhängig regulierter Genexpression zu den zwei Adipozytenaspirations-Zeitpunkten während der unterschiedlichen Schlafbedingungen: links: Gene mit gesteigerter Expression am Abend (A) gegenüber Morgen (M) zum Zeitpunkt der ersten Adipozytenaspiration; rechts: Gene mit gesteigerter Expression am Morgen ($M>A$) zum Zeitpunkt der zweiten Adipozytenaspiration. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 2A der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Der Verlust der Expressionsrhythmik unter veränderten Schlafbedingungen zeigt sich zudem, wenn man die Verteilung der Expressionsunterschiede zwischen den beiden Tageszeitpunkten für die verschiedenen Schlafbedingungen isoliert aufträgt (Abb. 7). Während unter der CON-Bedingung eine relativ gleichmäßige Verteilung von am Morgen aktiven ($M/A\text{-Ratio}>1$) und am Abend aktiven Genen ($M/A\text{-Ratio}<1$) vorlag, nahm diese bimodale Verteilung mit zunehmender Schlafintervention immer mehr ab und verschob sich zunehmend zu morgens aktiven Genen hin (Abb. 7, rechts).

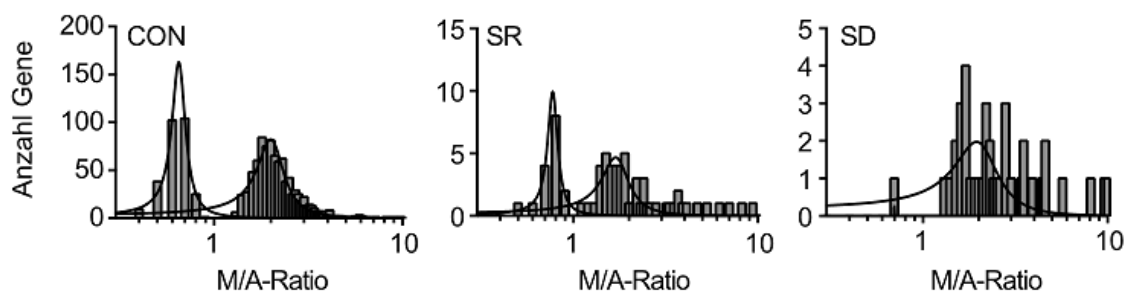


Abb. 7: Verhältnis von morgendlicher zu abendlicher Genexpression (M/A-Ratio) in den drei Bedingungen CON (links), SR (mittig) und SD (rechts): Die Balken stellen die Anzahl der Gene dar; die Lorenzkurve zeigt die Verteilung der M/A-Ratio in den verschiedenen Bedingungen. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 2B der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Je nachdem wie stabil die zirkadianen Expressionsmuster der rhythmischen Gene gegenüber den Interventionen waren, lassen sich die Gene in drei Gruppen ordnen (Abb. 8). Die erste Gruppe wird durch schlafunabhängige Gene (Tageszeit-reguliert / Schlaf-unabhängig) gebildet. Das heißt, die Expression dieser Gene war unabhängig von der Schlafdauer tageszeitabhängig reguliert. (Moderat) schlaf-sensitive Gene (Tageszeit-reguliert / Schlaf-sensitiv) formen eine zweite Gruppe. Sie wurden während zwei von drei Versuchsbedingungen tagesrhythmisch exprimiert. Die dritte Gruppe wird durch die hoch schlaf-sensitiven Gene (Tageszeit-reguliert / hoch Schlaf-sensitiv) dargestellt. Ihre Expressionsrhythmik blieb nur unter einer Schlafbedingung erhalten.

Die KEGG Signalweg Überrepräsentations-Analyse zeigt, dass es sich bei fünf von zwölf schlafunabhängigen Genen um Uhrengene handelt. Weitere Signalwege sind in der schlafunabhängigen Gruppe nicht überrepräsentiert.

In der Gruppe der schlaf-sensitiven Gene finden sich ebenfalls zwei von insgesamt 22 mit zirkadianen rhythmusassoziierten Genen ($p=0,0006$). Weiterhin sind die Signalwege „Tight junction“ (zwei Gene) und metabolische Signalwege (drei Gene) überrepräsentiert.

Ein bedeutender Teil der hoch schlaf-sensitiven Gene ist relevant für physiologische Stoffwechselprozesse der Fettgewebszellen. Dabei sind 69 Gene ($p=2,58 \cdot 10^{-8}$) in metabolische Prozesse involviert, 18 Gene ($p=9,73 \cdot 10^{-7}$) in die oxidative Phosphorylierung, und 15 Gene ($p=0,0001$) in die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse.

Tabelle 2: Einteilung der Tageszeit-regulierten Gene in Abhängigkeit von Schlaf nach KEGG Signalweg Überrepräsentations-Analyse.

Tageszeit-reguliert/Schlaf-unabhängig		
Rang	KEGG-Signalweg	Gene (gesamt)
1	Zirkadianer Rhythmus - Säuger	5 (22)
Tageszeit-reguliert/Schlaf-sensitiv		
Rang	KEGG-Signalweg	Gene (gesamt)
1	Zirkadianer Rhythmus - Säuger	2 (22)
2	Tight Junction	2 (132)
3	Metabolische Signalwege	3 (1.130)
Tageszeit-reguliert/hoch Schlaf-sensitiv		
1	Metabolische Signalwege	69 (1.130)
2	Chorea Huntington	23 (183)
3	Oxidative Phosphorylierung	18 (132)
4	Morbus Alzheimer	19 (167)
5	Morbus Parkinson	15 (130)
6	Ubiquitin-vermittelte Proteolyse	15 (135)
7	TGF-beta- Signalweg	11 (84)
8	Tight Junction	14 (132)
9	Endozytose	17 (201)
10	Tumor-Signalwege	23 (326)

Genlisten werden in einer ergänzenden Tabelle dargestellt; s. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen. Diese Tabelle wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 2C der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

3.3 Zirkadiane Expressionsrhythmen der Uhrengene

Wie oben bereits beschrieben, wurden viele der Uhrengene tageszeitabhängig rhythmisch exprimiert. Dabei wurden in der RNAseq nur zwei in ihrer Rhythmik durch Schlafentzug beeinflusst. Um die Ergebnisse aus der RNAseq zu validieren, wurden die RNA-Proben ein

weiteres Mal per quantitativer PCR (qPCR) auf die Expression der Uhrgene hin analysiert. In Abb. 8 wird die (M/A-Ratio) für acht Uhrgene zwischen RNAseq und qPCR dargestellt. Mit Ausnahme von CLOCK (A) zeigen alle untersuchten Uhrgene (B-H) tageszeitabhängige Expressionsmuster während der CON. Für CRY1 verliert sich diese Rhythmik unter SR und SD (C). Für BMAL1 (B) ($p=0,045$; CON vs. SD) und PER1 (E) ($P=0,033$; CON vs. SD) zeigt sich unter SD eine gedämpfte Rhythmik, d.h. die M/A-Ratio strebt gegen 1. Für PER2 (F) und REV-ERBA (H) zeigt sich ein vergleichbarer, aber nicht signifikanter Trend ($p>0,05$). Außerdem zeigt BMAL1 im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Uhrgenen eine vermehrte Expression am Abend (M/A-Ratio <1). Festzuhalten ist, dass sich die abendliche und morgendliche Expressionsaktivität der Uhrgene durch Verkürzung der Schlafenszeit einander angeglichen hat. Das bedeutet, dass sich die M/A-Ratio einem Wert von 1 annähert und dabei in den meisten Fällen weiterhin signifikant rhythmisch bleibt.

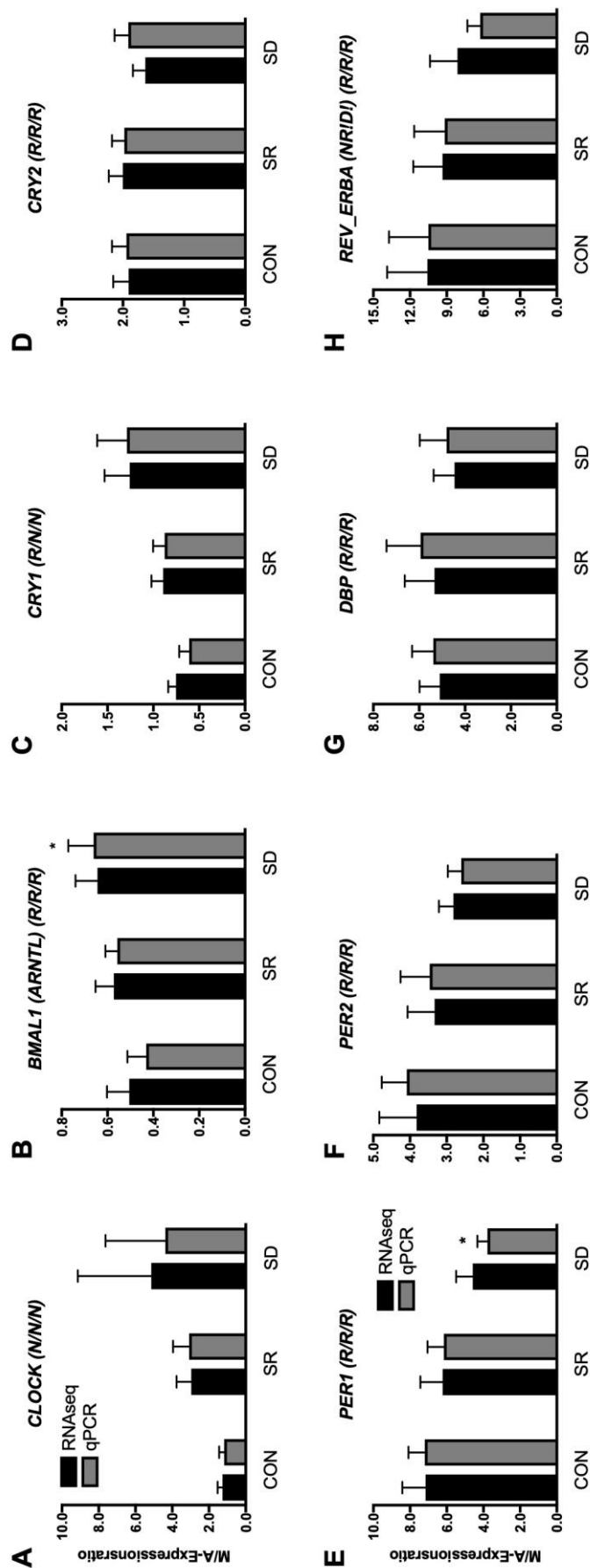


Abb. 8: M/A- Expression ratios für die Uhr gene CLOCK (A), BMAL1 (B), CRY1 (C), CRY2 (D), PER1 (E), PER2 (F), DBP (G) und REV-ERBA (H) während der verschiedenen Schlafbedingungen. Schwarze Balken stellen die Daten der RNAseq dar. Hellgraue Balken zeigen die Validierung per qPCR der gleichen Proben. Die Buchstaben in Klammern stehen für die statistische Auswertung der M/A Regulation. R= signifikante Regulation; N= nicht-reguliert; CON (links), SR (mittig) und SD (rechts). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$ gegen CON, 2-fach ANOVA mit Bonferroni Post- Test ($n=15$ für SD, SR; $n=14$ für CON). Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 3 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

3.4 Zirkadiane Expressionsrhythmen metabolischer Gene

Gene, die in zentralen Stoffwechselprozessen der Fettzellen eine Rolle spielen, wurden mithilfe der GO-Klassifikation zugeordnet (Abb. 9). Die Mehrheit dieser Gene zeigte keine tageszeitabhängige Expressionsregulation. Nur ein Teil wurde zu den beiden Entnahmezeitpunkten unterschiedlich, also tageszeitabhängig, exprimiert. 4-7% der Gene, die mit Glykolyse, β -Oxidation, Lipolyse oder Glycerolipogenese assoziiert sind, zeigten ein tageszeit- und zusätzlich schlafabhängiges Expressionsmuster. Bei Genen des Krebszyklus und der oxidativen Phosphorylierung waren es sogar 14% und 19%.

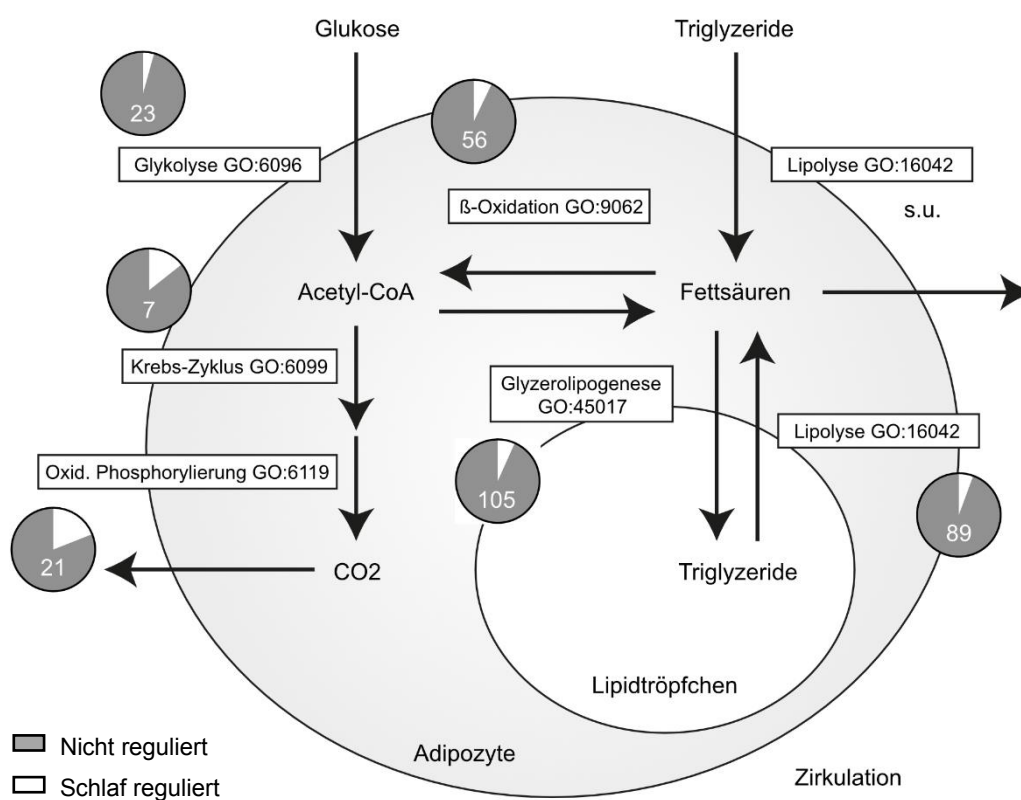


Abb. 9: Schematische Darstellung der anhand GO-Klassifikation identifizierten schlaf-regulierten Gene in Haupt-Signalwegen der Adipozyten. Die weißen Kästen zeigen GO-Identifikationen und nennen den Signalweg. Die Kuchendiagramme zeigen den Anteil der Gene, deren Expression durch Schlafverkürzung beeinflusst wird. Die beistehende Zahl zeigt die eigentliche Anzahl an schlaf-regulierten Genen an. Genlisten werden in einer ergänzenden Tabelle dargestellt: s. Verzeichnis für Abbildungen und Tabellen. Diese

Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 4 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Die Abb. 10 stellt die M/A-Expressionsratio einiger ausgewählter Gene während der verschiedenen Versuchsbedingungen dar. Das zirkadiane Expressionsmuster, der mit Lipogenese assoziierten Gene, wurde durch SR und SD signifikant beeinflusst. Cholin Phosphotransferase 1 (CHPT1), Diacylglycerol O-Acetyltransferase 2 (DGAT2) und PIGY (= Phosphatidylinositol-glycan-anchor-biosynthesis) zeigten unter SR bzw. SD eine gedämpfte Expressionsrhythmik mit am Morgen erhöhten Werten (alle $p < 0,05$). Dagegen zeigten LPIN3 (= Lipin 3), OCRL (= Oculocerebrorenal-Syndrome-of-Lowe) und PIGL (= Phosphatidylinositol-glycan-anchor-biosynthesis) eine ebenfalls gedämpfte Rhythmik mit einer am Abend relativ erhöhten Expression unter SR ($p < 0,01$ im Vergleich zu CON von LPIN3; $p < 0,05$ im Vergleich zu CON von OCRL und PIGL) und zum Teil unter SD ($p < 0,05$ für LPIN3 im Vergleich zu CON). Die Expressionsrhythmik, für die mit Lipolyse und β -Oxidation assoziierten Gene, wurde durch Schlafintervention, mit Ausnahme von ACAA1, welches unter SR eine gedämpfte Rhythmik mit stärkerer Expression am Morgen zeigte, nicht verändert (B). Für Gene des Glukosestoffwechsels zeigte sich dagegen ein uniformes Bild mit Rhythmusdämpfung unter SR und SD und erhöhter Expression am Morgen (C) (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ im Vergleich zu CON).

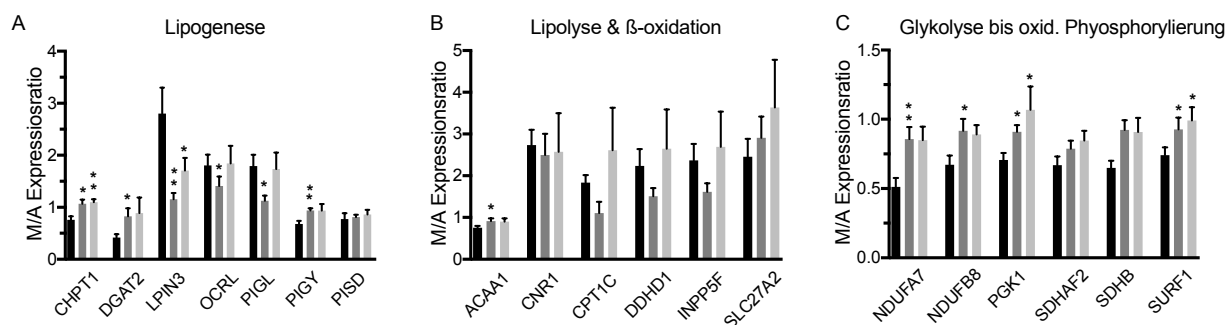


Abb. 10: M/A-Expressionsratio metabolischer Gene während unterschiedlicher Versuchsbedingungen: CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). (A-C) = M/A Expressionsratios von Genen assoziiert mit Lipogenese (A), Lipolyse und β -Oxidation (B), und Glukolyse bis oxid. Phosphorylierung (C) während

der unterschiedlichen Versuchsbedingungen (schwarze Balken = CON; dunkelgraue Balken = SR; hellgraue Balken = SD). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ gegen CON, 2-fach ANOVA mit Bonferroni Post-Test ($n=15$ für SD, SR; $n=14$ für CON). CHPT1 = Cholin Phosphotransferase 1; DGAT2 = Diacylglycerol O-Acetyltransferase 2; LPIN3 = Lipin 3; OCRL = Oculocerebrorenal-Syndrome-of-Lowe; PIGL = Phosphatidylinositol-glycan-anchor-biosynthesis, class L; PIGY = Phosphatidylinositol-glycan-anchor-biosynthesis, class Y; PISD = Phosphatidylserin Decarboxylase; ACAA1 = Acetyl-CoA Acyltransferase 1; CNR1 = Cannabinoid Rezeptor 1; CPT1C = Carnitine Palmitoyltransferase 1C; DDHD1 = DDHD-Domain-Containing 1; INPP5F = Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F; SLC27A2 = Solute-Carrier-Family-27 (Fettsäuretransporter), Member 2; NDUFA7 = NADH-Dehydrogenase(ubiquinone)-1-alpha-Subcomplex, 7, 14,5kDa; NDUFB8 = NADH-Dehydrogenase(ubiquinone)-1-beta-Subcomplex, 8, 19kDa; PGK1 = Phosphoglycerat Kinase 1; SDHAF2 = Succinate-Dehydrogenase-Complex-Assembly-Factor-2; SDHB = Succinate-Dehydrogenase-Complex (Subunit B, iron suffer (lp)); SURF1 = Surfeit 1. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 5 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Die Genexpressionratio relevanter Adipokine werden in Abb. 11 dargestellt. Die M/A Ratio von RBP4, Retinsäure-Rezeptor-Responder-Protein 2 (RARRES2) und Apelin (APL) waren durch SR und SD erhöht (alle $p < 0,05$). Die abendliche Expressionstärke der untersuchten Gene war während der unterschiedlichen Bedingungen vergleichbar (alle $p \geq 0,0193$).

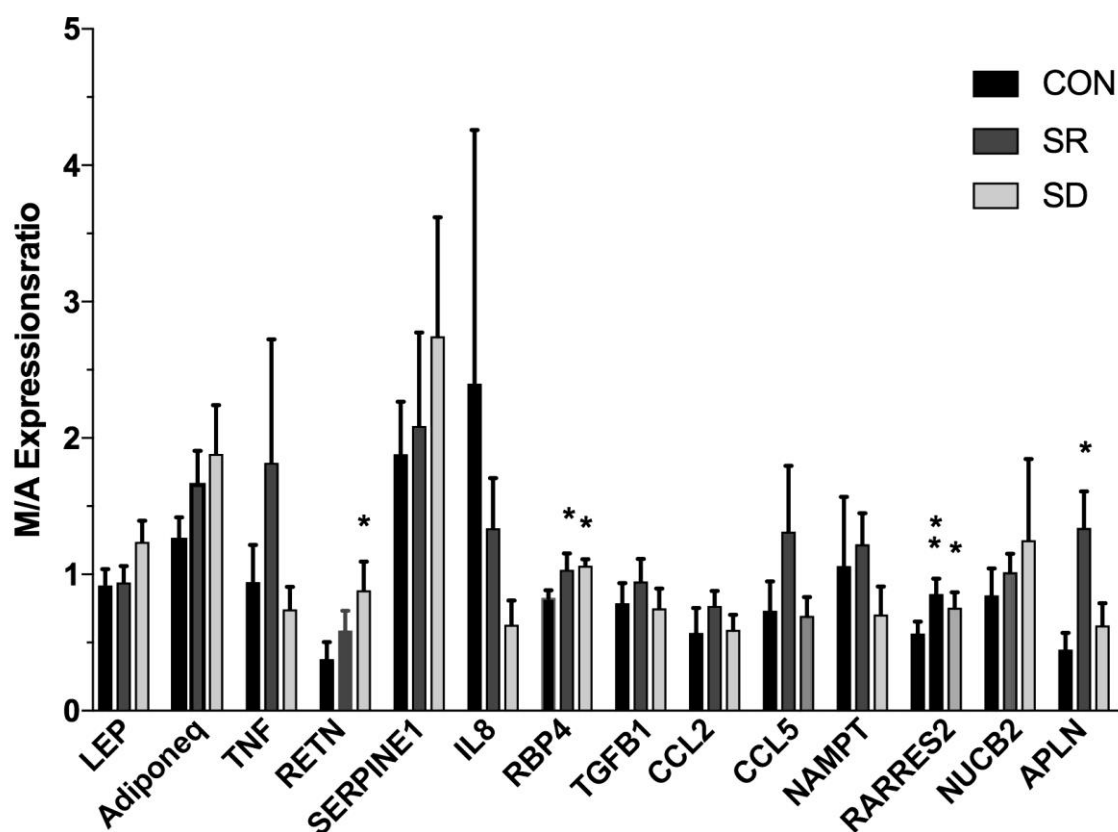


Abb. 11: M/A- Expressionsratios der Adipokine während der unterschiedlichen Versuchsbedingungen: CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ gegen CON, 1-fach ANOVA mit Bonferroni Post-Test ($n=15$ für SD, SR; $n=14$ für CON). LEP = Leptin; Adiponeq = Adiponectin, (C1Q-and-collagen-domain-containing); TNF = Tumornekrosefaktor; RETN = Resistin; SERPINE1 = Serpin-Peptidase-Inhibitor, clade E; IL8 = Interleukin 8; RBP4 = Retinol-Bindungsprotein 4; TGFB1 = Transforming-Growth-Factor, beta1; CCL2 = Chemokin (C-C motif) Ligand 2; CCL5 = Chemokin (C-C motif) Ligand 5; NAMPT = Nicotinamid Phosphoribosyltransferase; RARRES2 = Retinsäure-Rezeptor-Responder-Protein 2; NUCB2 = Nucleobindin 2; APLN = Apelin. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 6 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Bei der Messung von Serumkonzentrationen des Glukose- und Fettstoffwechsels zeigten die nüchtern Glukosewerte zwischen den drei Schlafinterventionen ($p \geq 0,131$ für ANOVA Haupteffekt "Bedingung") keinen Unterschied. Die Konzentrationen von Insulin und C-Peptid waren nach CON jedoch signifikant höher als nach SR und SD ($p=0,002$ und $p=0,055$ für ANOVA Haupteffekt "Bedingung"). Dementsprechend ergab sich für CON der höchste HOMA- β -Quotient ($p=0,043$ für ANOVA Haupteffekt "Bedingung"), während sich HOMA-IR nicht zwischen den Bedingungen unterschied ($p=0,066$ für den ANOVA Haupteffekt „Bedingung“).

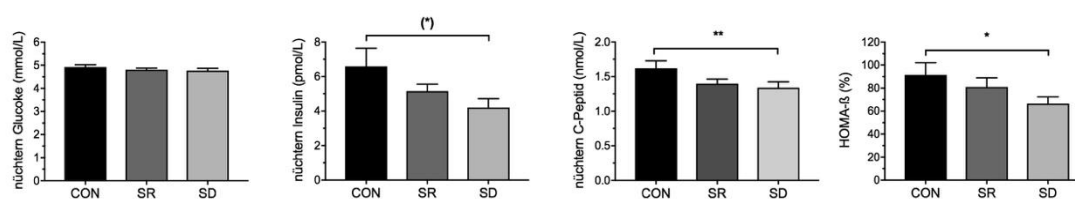


Abb. 12: Nüchtern Serumkonzentrationen der Glukosestoffwechselfparameter während CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“, **: $p < 0,01$ (für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“); (*): $p < 0,055$ (für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“; $n=14$). Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 7 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

TG und FFA (beide $p=0,133$ für ANOVA Haupteffekt "Bedingung") wurden durch die Schlafinterventionen nicht beeinflusst (Abb. 13).

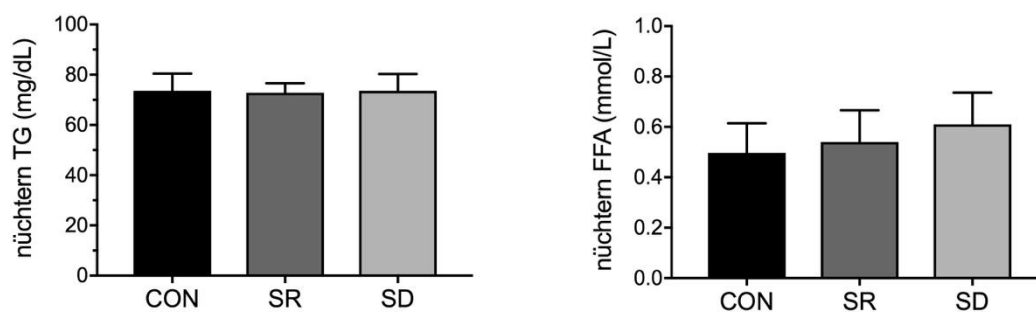


Abb. 13: Serumkonzentrationen von TG (links) und FFA (rechts) während CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken).

Zirkulierendes RBP4 stieg infolge von SR tendenziell an ($p=0,070$ für ANOVA Haupteffekt "Bedingung"), insbesondere unter SD ($p=0,013$ für gepaarten t-Test CON vs. SD). Resistin und IL8 wurden durch die Schlafintervention nicht beeinflusst (beide $p \geq 0,490$ für ANOVA Haupteffekt "Bedingung"; Abb. 14).

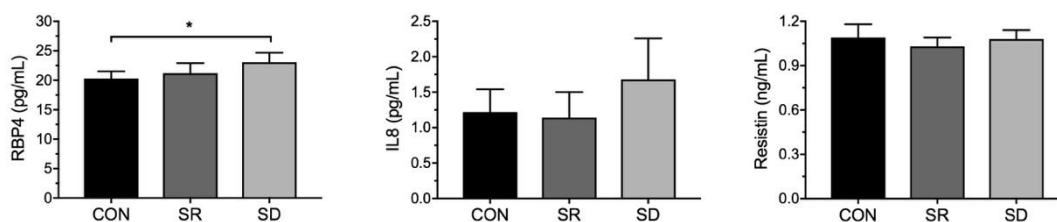


Abb. 14: Serumkonzentrationen von RBP4 (links), IL8 (mittig) und Resistin (rechts) während CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$ (für den paarweisen Vergleich CON vs. SD; $n=14$). Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 7 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

4. Diskussion

Die hier vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von kurzfristigem totalen bzw. partiellen Schlafentzug auf morgendliche und abendliche Expressionsmuster des Adipozytentranskriptoms und die zur gleichen Zeit vorliegenden Serumkonzentrationen verschiedener zentraler Stoffwechselformone bei jungen, gesunden Männern. Dabei wurden die Ergebnisse einer SD-Bedingung mit totalem Schlafentzug und einer SR-Bedingung mit vier Stunden Schlaf pro Nacht mit den Daten einer CON-Bedingung mit acht Stunden Nachtschlaf verglichen. Ausgehend von der Hypothese, dass eine kurzfristige Verkürzung der Schlafdauer zu Veränderungen der rhythmischen Transkriptionsmuster und zur Alteration der endokrinen Aktivität weißer Fettgewebszellen führt, konnte gezeigt werden, dass bereits eine einzelne Nacht Schlafverkürzung weitreichende Effekte auf die tageszeitabhängigen metabolischen Prozesse im subkutanem, abdominellem Fettgewebe beim Menschen hat. Während die Expressionsmuster einiger klassischer Uhrengene am Morgen und am Abend auch nach Schlafintervention weitestgehend rhythmisch blieben, wurde die Rhythmik vieler stoffwechselfassoziierter Gene gestört. Die Störung dieser Gene auf Ebene der Transkription könnte einen ersten Schritt in der Pathogenese metabolischer Erkrankungen infolge gestörten Schlafs darstellen.

Um diese Veränderungen der Expressionsmuster auf die klinisch relevante hormonelle Ebene zu übertragen, haben wir zeitgleich mit den Adipozytenaspirationen, die Serumkonzentrationen einiger zentraler Glukosestoffwechselformone und Adipokine bestimmt. Die Resultate erscheinen kongruent zu den molekularen Daten und zeigen auch peripher eine metabolisch ungünstige Stoffwechselsituation nach Schlafenszeitverkürzung an.

4.1 Einfluss gestörten Schlafs auf zirkadiane Expressionsrhythmen des subkutanen Fettgewebes im Menschen

Bei den meisten Lebewesen werden Verhalten und Zellphysiologie durch körpereigene innere Uhren dem 24-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus angepasst. Auf Zellebene wird dieser zirkadiane Rhythmus durch transkriptionell- translatorische Rückkopplungsschleifen der sogenannten Uhrengene reguliert (Mohawk, Green, und Takahashi 2012; Landgraf, Shostak, und Oster 2012; Oster 2014).

Entsprechend vorheriger Studien (Vieira et al. 2014; Otway et al. 2011; Loboda et al. 2009; Zvonic et al. 2006) konnte in der aktuellen Arbeit die Existenz peripherer Uhrgene sowie weiterer rhythmisch exprimierter Gene im subkutanen, abdominellen Fettgewebe bestätigt werden. Dabei war die Expressionsaktivität der Gene vor Schlafintervention unabhängig von den Versuchsbedingungen über das gesamte Transkriptom weitestgehend stabil (Abb. 5). Der Expressionsunterschied von vier Genen vor der Schlafrestriktion und nur zwei Genen vor der Schlafdeprivation kann bei einer so großen Anzahl untersuchter Gene als natürliche Abweichung gewertet werden (Abb. 5). Folglich erlaubt die abendliche Ausgangssituation der Expressionsmuster den Vergleich mit den Daten der morgendlichen Adipozytenaspiration sowie den Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Bedingungen untereinander.

In einer Studie am Mausmodell kam es nach zweiwöchiger Schlafrestriktion zur globalen Disruption der Transkriptionsregulation hepatischer Zellen (Barclay et al. 2012). Während einer weiteren Studie an murinen Adipozyten wurde das Expressionsmuster von 25% der Gene durch eine Schlafdauerverkürzung über sechs Tage signifikant verändert. Dieser Effekt blieb sogar mindestens bis eine Woche nach Ende der Intervention nachweisbar (Husse et al. 2012). Hier zeigen die Daten der aktuellen Studie analoge Ergebnisse in humanen Adipozyten. Die Anzahl der tageszeitabhängig regulierten Gene sank mit zunehmender Schlafverkürzung von 1.186 auf 71 während SR und auf 42 während SD (Abb. 6). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Arbeiten ist hervorzuheben, dass wir in unserer Arbeit diesen drastischen Effekt nach nur einer einzelnen Nacht Schlafintervention darstellen konnten.

Beim Vergleich der Expressionsmuster der tageszeitabhängig regulierten Gene zwischen den Schlafinterventionen wird deutlich, dass die große Mehrzahl der Gene ($n = 1.179$) in nur einer Schlafbedingung rhythmisch war. 42 Gene blieben in zwei Bedingungen rhythmisch. Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass ein Großteil der Gene extrem schlafabhängig war (Abb. 6).

In einem weiteren Schritt wurde die Transkriptionsregulation innerhalb der Versuchsbedingungen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied von abendlicher zu morgendlicher Expressionsaktivität besteht. Unabhängig der Bedingung änderte sich der relative Anteil an Genen, die morgens vermehrt exprimiert wurden, nicht. Mindestens dreiviertel der tageszeitabhängig regulierten Gene zeigten höhere

Expressionsaktivität zu Beginn des Tages (Abb. 7). Dieser Effekt ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die Stoffwechselaktivität von Adipozyten am Morgen erhöht ist. Evolutionsbedingt ist eine morgendlich hohe transkriptionelle Antwort zu Beginn der Aktivitätsphase beim Menschen von Vorteil (Bray und Young 2011).

Die Interventionen führen nicht nur zur generellen Reduktion rhythmischer Gene, sondern auch zur Änderung der morgendlichen und abendlichen Genexpressionsaktivität. In CON bestand eine relativ gleichmäßige Verteilung von am Morgen aktiven und am Abend aktiven Genen. Diese bimodale Verteilung der Expressionsaktivität verschwand während SD vollständig. Mit abnehmender Schlafdauer verschob sich das Verhältnis von morgendlicher zu abendlicher Expressionsaktivität zunehmend zu morgens aktiven Genen. Diese Desynchronisierung wurde ebenfalls durch die Studien am Mausmodell der Arbeitsgruppe Husse (Husse et al. 2017; Barclay et al. 2012), als auch an humanen Blutzellen durch die Arbeitsgruppe Möller-Levet und Archer beschrieben (Archer und Oster 2015) und scheint somit auch für weitere periphere Gewebe zu gelten.

Als mögliche Erklärung könnte an dieser Stelle eine physiologische Anpassungsreaktion der Expressionsrhythmik peripherer Gewebe auf prolongierte Wachheit und eine dadurch induzierte Phasenverschiebung mit folgender Desynchronisierung diskutiert werden. In der Vergangenheit wurde auf peripherer Ebene eine entsprechende Reaktion anhand veränderter Kortisoltagesprofile dargestellt. Dabei wurde das diurnale Profil der Speichelkortisolkonzentration durch Schlafentzug um einige Stunden verschoben, so dass sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte Kortisolkonzentration am Morgen mit folgendem Konzentrationspeak am Nachmittag zeigte (Guyon et al. 2014, Omisade, Buxton, und Rusak 2010). Möglicherweise haben diese Effekte einen direkten Zusammenhang. Es ist durchaus denkbar, dass die Expressionsaktivität rhythmischer Gene in peripheren Geweben durch Glucocorticoide moduliert wird (Mongrain et al. 2010). Auf diesen Aspekt soll jedoch im folgenden Abschnitt nochmals genauer eingegangen werden.

4.2 Mechanismen der Dysruption metabolischer Gene

Zentrale Uhrgene steuern unter physiologischen Bedingungen Schlafdauer, Schlafens- und Erwachenszeit sowie Ruhe- und Aktivitätszeiten (Franken 2013). Die unphysiologische Störung dieser zirkadianen Rhythmik ist zweifellos mit der Entwicklung von Adipositas und metabolischen Erkrankungen vergesellschaftet (Turek et al. 2005; Xie et al. 2013). Eine

isolierte Alteration der Uhrgene scheint ebenso mit metabolischen Veränderungen einherzugehen. Im Tierversuch führte die Deletion des Uhrgens *BMAL1* zur Adipositas (Paschos et al. 2012). Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Uhrgenen im Fettgewebe übergewichtiger und adipöser Probanden verändert ist (Vieira et al. 2014). Welchen Stellenwert die Dysruption diurnaler Expressionsrhythmen in peripheren Geweben beim Menschen in der Pathogenese metabolischer Erkrankungen einnimmt und inwiefern diese Prozesse vermittelt werden, ist bis heute weitgehend unklar. Vor einigen Jahren hat die Arbeitsgruppe Archer und Möller-Levet das Transkriptom humaner Blutzellen nach einwöchiger Schlafrestriktion auf unter sechs Stunden pro Nacht analysiert und mit den Daten aus einer Kontrollbedingung verglichen. Nach verkürzter Schlafdauer reduzierte sich die Expression rhythmischer Gene von 1.855 auf 1.481. Dazu gehörten Uhrgene wie *PER*, *CRY* und *CLOCK* oder mit dem Stoffwechsel assoziierte Gene wie *SLC2A3*, *SLC2A5*, *GHRL* und *ABCA1* (Archer et al. 2014, Möller-Levet et al. 2013). In unserer Arbeit konnten wir ähnliche Effekte im subkutanen, abdominellen Fettgewebe darstellen. Entsprechend ihrer Stabilität gegenüber den Schlafinterventionen haben wir die tageszeitlich regulierten Gene einer schlafunabhängigen, schlafsensitiven und einer hoch schlafsensitiven Gruppe zugeordnet (Tabelle 2). Interessanterweise zeigte die KEGG-Signalweg Analyse, entsprechend einer früheren Studie (Barclay et al. 2012), dass vor allem metabolische Gene der hoch schlafsensitiven Gruppe zugeordnet werden konnten. Wohingegen in der schlafunabhängigen Gruppe vor allem Gene zirkadianer Signalwege überrepräsentiert waren. Eine darauffolgende qPCR ergab, dass die Schlafintervention der aktuellen Studie zu keinem signifikanten Verlust der Rhythmik klassischer Uhrgene im subkutanen Fettgewebe führte (Abb. 8). Im Gegensatz zu den Uhrgenen *CLOCK*, *CRY1*, *CRY2*, *PER1*, *PER2*, *DBP* und *REV-ERBA* zeigen unsere Daten für *BMAL1* eine erhöhte M/A-Ratio nach SD (Abb. 8). An dieser Stelle sind unsere Daten widersprüchlich zu denen einer früheren Studie aus Schweden. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die schwedische Arbeitsgruppe ihre Daten an Skelettmuskelzellen und nicht an Fettgewebszellen erhoben hat (Cedernaes et al. 2015).

Die Expressionsaktivität von Genen, die in zentrale Stoffwechselprozesse der Fettzelle involviert sind, war zum Teil tageszeit- und schlafreguliert (Abb. 9). Dabei wurde die Expressionsrhythmik einiger zirkadian transkribierter metabolischer Gene durch die kurzfristige Schlafintervention drastisch gedämpft (Abb. 10). Während vorherige Studien

davon ausgingen, dass diese Dysruption möglicherweise durch zellspezifische Uhrengene induziert werden könnte (Husse et al. 2012; Barclay et al. 2012; Marcheva et al. 2010), sprechen unsere Daten gegen einen von Uhrengenen vermittelten Mechanismus.

Vielmehr ist an dieser Stelle von einer Uhren-unabhängigen Signalvermittlung durch systemische Signale oder einer Modulation durch externe Einflüsse auszugehen (Husse et al. 2017). In früheren Studien führte Schlafentzug zu einer gesteigerten HPA-Achsen-Aktivität (Guyon et al. 2014; Minkel et al. 2014). Es wurde postuliert, dass Glucocorticoide die Rhythmik der peripheren Uhren unabhängig vom SCN beeinflussen und eine Phasenverschiebungen dieser induzieren können (Balsalobre et al. 2000; Zhang B, Kirov S, Snoddy J 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass externe Einflüsse wie Licht, Körpertemperatur, Nahrungsaufnahme und der Schlaf-Wach-Rhythmus per se die peripheren Uhren unabhängig vom SCN beeinflussen. Dabei reagieren periphere Uhren je nach Gewebe vermutlich unterschiedlich sensitiv auf die verschiedenen externen Stimuli (Mohawk, Green, und Takahashi 2012; Dibner, Schibler, und Albrecht 2010; Buhr, Yoo, und Takahashi 2010; Zhang B, Kirov S, Snoddy J 2005; Damiola et al. 2000). Studien am Tiermodell haben zeigen können, dass eine regulierte Nahrungsaufnahme die peripheren Uhren der Leber beeinflussen kann. Eine dem zirkadianen Rhythmus entsprechende Nahrungszufuhr scheint die Rhythmik peripherer Uhren zu stabilisieren (Barclay et al. 2012; Zhang B, Kirov S, Snoddy J 2005; Damiola et al. 2000). Unsere Probanden haben während der Versuchsperiode ihr Körpergewicht stabil gehalten und wurden angehalten keine Änderungen ihrer Ernährungsgewohnheiten vorzunehmen. An den Versuchstagen haben sie in allen Bedingungen zu gleichen Zeitpunkten eine identische, standardisierte Mahlzeit erhalten. Eine nächtliche Nahrungsaufnahme war ausgeschlossen. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass diese kontrollierte Nahrungsaufnahme zur Stabilität der Uhrengene während unserer Studie beigetragen hat. Zusätzlich stellt unsere Arbeit auch ausschließlich die Effekte nach einer kurzfristigen Schlafintervention dar. Es ist davon auszugehen, dass die Effekte unter realen Bedingungen, beispielsweise während einer Nachtschicht mit nächtlicher Nahrungsaufnahme und einem prolongierten Studienregime wesentlich ausgeprägter ausfallen. Voraussichtlich können Uhrengene als auch der SCN während einer so kurzfristigen zirkadianen Störung ihren Expressionsrhythmus beibehalten und reagieren erst auf eine mehrtägige, längerfristige zirkadiane Dysruption arrhythmisch (Archer und Oster 2015; Möller-Levet et al. 2013; Barclay et al. 2012; Salgado-Delgado et al. 2010).

Die Beobachtung, dass trotz stabiler Uhrengene bei regulierter Nahrungsaufnahme und kurzer Schlafintervention die Rhythmik einiger metabolischer Gene und Adipokine drastisch gestört wurde (Abb. 10 und Abb. 11), muss demzufolge auf anderem Weg systemisch vermittelt worden sein. Grundsätzlich könnten die Genexpression betreffenden Veränderungen auch durch neuronale Signalwege induziert sein. Schlafstörung per se als auch chronische Schlafverkürzung gehen mit erhöhten Katecholaminkonzentrationen einher (Takase et al. 2004; Irwin et al. 1999). Es gibt nur wenig Arbeiten, die sich mit der autonomen Regulation metabolischer Prozesse in peripheren Geweben beschäftigen (Yi et al. 2010). Nichtsdestotrotz deuten Studien der Arbeitsgruppe Ryu auf eine vagale Innervation von Adipozyten hin (Ryu et al. 2015).

Wie schon zuvor angedeutet, wurde in der aktuellen Arbeit nur ein Teil der Gene zentraler metabolischer Signalwege tageszeitabhängig exprimiert. Diejenigen, die ein diurnales Expressionsmuster besitzen, waren zugleich sehr vulnerabel gegenüber den Schlafinterventionen (Abb. 9). Dabei wiesen insbesondere mit der Glyzerolipogenese assoziierte Gene, wie beispielsweise die DGAT2 oder auch Schlüsselgene des Glukosestoffwechsels wie die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1), eine unter SR bzw. SD signifikant gedämpfte Expressionsrhythmik (Abb. 10) auf. Insgesamt spricht dies für einen beschleunigten Glukoseabbau bei gleichzeitig gesteigerter Lipogenese infolge kurzfristiger Schlafstörung. Verschiedene Studien lassen vermuten, dass diese veränderte Stoffwechselaktivität dazu beitragen soll, den erhöhten Energieverbrauch infolge der Schlafenszeitverkürzung zu kompensieren (Markwald RR et al. 2013, Shechter A et al. 2013, Jung CM et al. 2010). Unsere Daten an humanen Adipozyten sind an dieser Stelle äquivalent zu denen am Mausmodell der Arbeitsgruppe Husse (Husse et al. 2012; Husse et al. 2017). Dort zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Expression von DGAT2 und weiteren mit der Lipogenese assoziierten Genen sowie eine Aktivierung von Genen der Glykolyse. Dieser Effekt blieb sogar für eine weitere Woche nachweisbar und deutet somit eine prolongierte Beeinträchtigung infolge kurzweiliger Schlafstörung an. Welchen Einfluss die frühen Veränderungen auf molekularer Ebene auf das Essverhalten haben und welche Rolle sie in der Pathogenese von Diabetes und Adipositas einnehmen, wie sie sich in unterschiedlichen peripheren Geweben unterscheiden und durch welche Mechanismen sie im Einzelnen vermittelt werden, müssen Folgestudien belegen.

4.3 Auswirkungen kurzfristiger Schlafenszeitverkürzung auf metabolisch relevante Blutparameter im Kontext der Veränderungen auf Ebene der Genexpression

Zahlreiche Studien belegen lokal anhand molekularer Veränderungen im Adipozyten (J. L. Broussard et al. 2012; Kashiwagi et al. 1983) und peripher anhand spezifischer Blutparameter (Schmid et al. 2011; Leproult und Van Cauter 2009; Spiegel, Leproult, und Van Cauter 1999) einen negativen Einfluss von gestörtem Schlaf auf den Glukosestoffwechsel, sowie einen Zusammenhang zur Entwicklung von Insulinresistenz wie beim Diabetes mellitus Typ 2.

In unserer Studie konnten wir nach einer kurzfristigen Schlafenszeitverkürzung deutliche Expressionsveränderungen, explizit an Genen des Glukosestoffwechsels und der Lipogenese, darstellen. Es ist davon auszugehen, dass diese Effekte auf Ebene der Genexpression einen ersten Schritt in der Pathogenese metabolischer Erkrankungen im Adipozytentranskriptom darstellen, denn zur gleichen Zeit ließen sich entsprechende Veränderungen peripherer Marker im Serum der Probanden nachweisen. Die Glukosestoffwechsellparameter wurden infolge der Schlafenszeitverkürzung maßgeblich beeinflusst. Daraus ergaben sich erhöhte HOMA β -Quotienten (Abb. 12). Diese Daten deuten auf eine reduzierte Betazellkapazität hin und beschreiben somit einen bedeutenden Pathomechanismus in der Entstehung gestörter Insulinsensitivität (Matthews et al. 1985; J. L. Broussard et al. 2012).

Auf Zellebene konnte infolge einer kurzfristigen Schlafenszeitverkürzung von 4,5 Stunden pro Nacht eine zunehmende Insulinresistenz der Adipozyten nachgewiesen werden (J. L. Broussard et al. 2012). In Übereinstimmung damit, konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass sich die Insulinsensitivität von weißem Fettgewebe tageszeitabhängig ändert. Die Insulinsensitivität subkutaner Adipozyten zeigt einen eigenen zirkadianen Rhythmus. Die Amplitude dieses zirkadianen Rhythmus scheint mit der Schlafdauer zu korrelieren (Carrasco-Benso MP 2016). Diese zytologischen Veränderungen stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen unserer Studie.

Ergänzend zu veränderten M/A- Expressionsratios relevanter Adipokine wie RBP4, RARRES2 und APL auf Ebene der Genexpression (Abb. 11), konnten wir entsprechend veränderte Serumkonzentration von RBP4 infolge von SR und SD nachweisen (Abb. 14). Dabei war RBP4 insbesondere nach SD erhöht. Wir gehen davon aus, dass sich dieser Effekt proportional zur Dauer der Schlafenszeitverkürzung verhält. Es zeigt uns wiederholt den

metabolisch ungünstigen Effekt von jeglicher Schlafdisruption auf. Es ist bekannt, dass das Fettgewebe eine Reihe pro- und anti-entzündlicher Faktoren sezerniert. Bei der durch Übergewicht und Adipositas induzierten Insulinresistenz zeigen sich chronisch inflammatorische Prozesse im Adipozyten. Daraus resultieren veränderte Sekretionsmuster von Adipokinen und Zytokinen (Fantuzzi 2005). Bei Patienten mit Adipositas und Typ-2-Diabetes können erhöhte Serumkonzentrationen von RBP4 nachgewiesen werden (Chang et al. 2016; Broch et al. 2007; Yang et al. 2005). Schlafentzug bedingt ebenfalls eine vermehrte Ausschüttung dieser Faktoren (Vgontzas et al. 2004). Deswegen ist davon auszugehen, dass gestörter Schlaf zu einem chronisch sub-inflammatorischen Zustand führt, der seinerseits an der Entstehung von metabolischen Störungen beteiligt ist (Shechter A et al. 2013, Padilha et al. 2011). Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass in Zukunft etwaige Parameter als Marker einer frühen diabetischen Stoffwechsellage herangezogen werden könnten.

Die Ergebnisse der aktuellen Studie sprechen insgesamt für eine gestörte Glukosetoleranz nach kurzfristiger Schlafenszeitverkürzung. Nichtsdestotrotz wurden nicht alle Parameter durch die Schlafinterventionen beeinflusst. Resistin und IL8 blieben unverändert (Abb. 14). Trotz einer gesteigerten Expression der mit Lipogenese assoziierten Gene, waren die Fettstoffwechselfparameter TG und FFA nicht entsprechend verändert (Abb. 13). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die Sekretion von Adipokinen und Zytokinen unterschiedlich auf eine Schlafenszeitverkürzung reagiert und zusätzlich von deren Dauer abhängt. In anderen Studien konnten nach einer längerfristigen Schlafrestriktion reduzierte Serumkonzentrationen freier Fettsäuren dargestellt werden (J. L. Broussard et al. 2015; Boden 2011).

4.4 Einfluss der Schlafdauer auf die metabolischen Effekte

Die physiologische Schlafarchitektur junger gesunder Menschen zeigt in der ersten Nachthälfte vermehrt Tiefschlafphasen (SWS), während in der zweiten Nachthälfte vor allem REM-Schlafphasen und leichte Schlafstadien dominieren (Koella 1988). Dementsprechend wurde bei unseren Probanden während Schlafrestriktion auf vier Stunden Schlaf pro Nacht die absolute Dauer an S3-Schlaf nicht signifikant verändert, wobei der absolute Anteil an S1, S2 und REM-Schlaf jedoch signifikant reduziert wurde (Tabelle 1). Das entspricht einer physiologischen Schlafstadienkomposition bei verkürzter Schlafdauer (Koella 1988).

In der aktuellen Arbeit führte die Schlafintervention, wie zuvor im Detail beschrieben, zu deutlichen Veränderungen im Transkriptom weißer Fettzellen. Es ist besonders eindrucksvoll, dass diese Ergebnisse unmittelbar auf Transkriptionsebene erfasst werden konnten. Derartig akute Effekte auf das Adipozytentranskriptom wurden auch in einer schwedischen Arbeit der Kollegen Cedernaes et al. dargestellt. Dabei führte eine einzelne Nacht Schlafentzug zu vermehrten Methylierungen in Transkription-regulierenden Sequenzen der Uhrengene PER1 und CRY1 in Zellen subkutanen Fettgewebes (Cedernaes et al. 2015).

Zusätzlich konnten wir auch kurzfristige Veränderungen in Serumkonzentrationen zentraler Stoffwechselhormone darstellen. Rasche Veränderungen der Serumkonzentration von Hormonen des Fett- und Glukosestoffwechsels infolge Schlafdauerverkürzung wurden bereits mehrfach in früheren Studien beschrieben (Schmid et al. 2011, 2008, 2007). Eine Studie einer anderen Arbeitsgruppe der Universität Lübeck zeigte außerdem, dass bereits eine kurzfristige Störung des SWS mit einer gestörten Glukosetoleranz am darauffolgenden Morgen einhergeht. Bei einer isolierten Unterbrechung des REM-Schlafs konnte derselbe Effekt nicht dargestellt werden (Herzog et al. 2013). Anhand unserer Daten ist eine derartige Differenzierung nicht möglich, jedoch keinesfalls widersprüchlich. Zudem wurde in der aktuellen Studie der Zeitpunkt der Schlafverkürzung vernachlässigt. Während SR wurde der Schlaf der ersten Nachthälfte entzogen. Andere Studien weisen zusätzlich auf Effekte bezüglich des Timings der Schlafenszeit hin (Wilms und Chamorro et al. 2019, Dijk und von Schantz 2005). Diese Aspekte könnten in folgenden Studien berücksichtigt werden.

Insgesamt stellten sich unsere Daten der Blutparameter proportional zur Dauer der Schlafverkürzung dar. Entgegen unserer Hypothese zeigte sich jedoch kein proportionaler Zusammenhang von Dauer des Schlafentzugs und Anzahl gestörter Gene im Adipozytentranskriptom. Die Dysruption der Expressionsrhythmik war nach SD nicht signifikant deutlicher ausgeprägt als nach SR. Möglicherweise ist auf Ebene der Genexpression weniger die Dauer der Schlafverkürzung, sondern vielmehr die zirkadiane Störung als solches für die Dysruption der Expressionsrhythmik verantwortlich.

4.5 Methodische Einschränkungen

An dieser Stelle sollen die methodischen Einschränkungen der hier vorliegenden Arbeit genannt werden. Während eines Versuchstages wurden in unserer Studie nur zu zwei

Zeitpunkten die Expressionsaktivität des subkutanen Fettgewebes verglichen. Dabei wurde der jeweils erste Zeitpunkt der Adipozytenaspiration als ein Ausgangswert herangezogen. Der zweite Zeitpunkt der Adipozytenaspiration war unmittelbar nach der Intervention terminiert (Abb. 4). Die hier vorliegende Arbeit kann somit weder eine Aussage über die Veränderungen im gesamten Tagesverlauf machen, noch kann eine Aussage über die potenziellen Veränderungen in der Expressionsaktivität des Adipozytentranskriptoms infolge prolongierter Wachheit gemacht werden. Weiterführend wäre eine weitere Adipozytenaspiration zu einem späteren Zeitpunkt oder zum Ende der Versuchseinheit gewesen. Jedoch musste die Gesamtanzahl an Adipozytenaspirationen pro Proband limitiert werden. Derartige Studien am Mausmodell zeigen, dass sich durch hochfrequentierte Probeentnahmen weitere rhythmische Gene identifizieren lassen (Zhang et al. 2014). Nichtsdestotrotz konnten wir in dieser Studie bereits mehr als 1000 tageszeitabhängig regulierte Gene unter Kontrollbedingungen darstellen, deren Expressionsrhythmik unmittelbar durch kurzfristigen Schlafentzug beeinflusst wurde.

In unserer Arbeit wurden Adipozytenaspirationen am subkutanen, abdominellen Fettgewebe durchgeführt. Zur Beurteilung diabetogener Erkrankungen sind vor allem Volumen und Veränderungen des viszeralen Fettgewebes von klinischer Relevanz (Peirce, Carobbio, und Vidal-Puig 2014). Aufgrund dessen stellt sich die Frage, inwieweit sich unsere Ergebnisse auf das viszerale Fettgewebe übertragen lassen. Grundsätzlich zählen subkutane als auch viszerale Fettdepots zum weißen Fettgewebe und der Metabolismus unterscheidet sich vor allem von braunem zu weißem Fettgewebe (Saely, Geiger, und Drexel 2012). Vor diesem Hintergrund ist davon auszugehen, dass die Ergebnisse durchaus auf viszerales Fettgewebe transferiert werden können.

Eine weitere Einschränkung der Ergebnisse resultiert daraus, dass der Zeitraum der Schlafintervention in dieser Studie auf eine Nacht beschränkt war. Unabhängig, ob infolge von Schichtarbeit oder anderen Schlafstörungen, handelt es sich in der Realität zumeist um chronische Schlafdefizite. Die Auswirkungen längerfristiger Schlafrestriktion konnten wir in dieser Arbeit nicht erfassen. Dennoch lassen unsere Ergebnisse die Schlussfolgerung zu, dass bereits eine einzelne Nacht gestörten Schlafs ungünstige Veränderungen im Metabolismus von Fettgewebszellen und essentieller metabolischer Hormonsysteme zur Folge hat.

Zuletzt sollte nochmals erwähnt werden, dass in dieser Studie Adipositas oder eine Anstellung in Schichtarbeit zum Studienausschluss führte. Die Ergebnisse lassen sich somit nicht einfach auf eine diverse Population transferieren.

4.6 Ausblick

Die umfassende Datenlage lässt keinen Zweifel an einem Zusammenhang von gestörtem Schlaf und Adipositas (Peplonska, Bukowska, und Sobala 2015; Lucassen, Rother, und Cizza 2012; Biggi et al. 2008). Zahlreiche Studien beschreiben einen unmittelbaren Effekt von Schlafdisruption auf basale Sekretionsmuster endokriner Hormone zur Regulation des Glukose- und Fettstoffwechsels (Schmid et al. 2011; Leproult und Van Cauter 2009; Schmid et al. 2007).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte parallel zu den bereits bekannten Veränderungen hormoneller Sekretionsmuster eine Alteration der entsprechenden Expressionrhythmik im subkutanem, abdominellem Fettgewebe beim Menschen dargestellt werden. Diese Reaktion auf Ebene der Genexpression in einem metabolisch äußerst relevanten Gewebe beschreibt höchstwahrscheinlich einen frühen Schritt in der Pathogenese metabolischer Erkrankungen infolge gestörten Schlafs. Aufgrunddessen könnte in Zukunft anhand spezifischer Biomarker die Entwicklung einer diabetogen oder präadipösen Stoffwechsellage bereits in einer sehr frühen Krankheitsphase detektiert werden. Nichtsdestotrotz sind vorab zahlreiche weitere Studien nötig, um die Auswirkungen chronischer Schlafenszeitverkürzung auf die Genexpressionsmuster peripherer Gewebe zu erfassen und um die Vermittlung der pathophysiologischen Mechanismen besser zu verstehen. Darüberhinaus müssen Langzeitstudien zeigen inwieweit frühe messbare Modifikationen der Genexpression mit manifesten chronischen, metabolischen Veränderungen einhergehen.

Festzuhalten bleibt, dass physiologisches Schlafverhalten neben ausreichender Bewegung und adäquater Kalorienzufuhr einen weiteren bedeutenden Aspekt in der nachhaltigen Gewichtsreduktion und Gewichtskontrolle einnimmt. Während nicht zu vermeidenden zirkadianen Störungen wie Schichtarbeit oder Flügen zwischen verschiedenen Zeitzonen, könnte eine dem zirkadianen Rhythmus entsprechend kontrollierte Nahrungsaufnahme zumindest einen stabilisierenden Faktor einnehmen (Barclay et al. 2012; Damiola et al. 2000).

5. Zusammenfassung

Eine zunehmende Anzahl an Studien deutet darauf hin, dass eine Verkürzung der Schlafdauer zur Alteration rhythmischer Genexpressionsmuster in peripheren Geweben führt, die konsekutiv Veränderungen peripherer Botenstoffe und Stoffwechselfparameter induziert, die ihrerseits mit der Pathogenese metabolischer Erkrankungen assoziiert sind. In der hier vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen kurzfristigen Schlafentzugs auf zirkadiane Rhythmen stoffwechselfassoziierter Gene in Adipozyten sowie auf die zur gleichen Zeit vorliegenden Serumkonzentrationen relevanter metabolischer Botenstoffe und Stoffwechselfparameter untersucht.

Bei 15 männlichen, gesunden Probanden konnten jeweils vor und nach partiellem oder totalem Schlafentzug und einer Nacht regulärem Schlaf, Adipozyten des subkutanen, abdominellen Fettgewebes aspiriert und die Transkriptionsmuster der RNA analysiert werden. Gleichzeitig wurden relevante Parameter des Glukose- und Fettstoffwechsels, spezifische Adipokine und das Zytokin IL8 anhand der Serumkonzentration bestimmt.

Während die Expressionsmuster adipozytärer Uhrengene weitestgehend rhythmisch blieben, wurde die Rhythmik vieler stoffwechselfassoziierter Gene durch die Schlafintervention eindrücklich beeinflusst. Die Serumkonzentrationen zentraler Glukosestoffwechselformone und Adipokine verhielten sich unterschiedlich infolge der Schlafenszeitverkürzung, wobei insgesamt ein proportionaler Zusammenhang zur Dauer der Schlafenszeit nachzuweisen war. Entgegen unserer Hypothese zeigte sich dieser zeitliche Zusammenhang nicht bei der Anzahl gestörter Gene im Adipozytentranskriptom.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine kurzfristige Schlafenszeitverkürzung zur akuten Änderung zirkadianer Expressionsmuster stoffwechselfassoziierter Gene im Adipozyten führt. Gleichzeitig wird die Sekretion relevanter metabolischer Parameter im Serum teilweise ebenso signifikant beeinflusst. Die Veränderungen der Genexpression deuten auf einen frühen Schritt in der Pathogenese von Adipositas und Diabetes infolge gestörten Schlafs hin.

Da die Transkriptionsmuster lokaler Uhrengene während der kurzfristigen Schlafinterventionen stabil blieben, ist davon auszugehen, dass die Veränderungen im Adipozytentranskriptom durch externe Stimuli oder systemisch vermittelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- American Academy of Sleep Medicine. 2008. Das AASM-Manual zum Scoring vom Schlaf und assoziierten Ereignissen. 1. Aufl. Steinkopff.
- Angerer, PD Dr P., und R. Petru. 2010. „Schichtarbeit in der modernen Industriegesellschaft und gesundheitliche Folgen“. *Somnologie - Schlafforschung und Schlafmedizin* 14 (2): 88–97.
- Archer, Simon N., Emma E. Laing, Carla S. Möller-Levet, Daan R. van der Veen, Giselda Bucca, Alpar S. Lazar, Nayantara Santhi, et al. 2014. „Mistimed Sleep Disrupts Circadian Regulation of the Human Transcriptome“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6): E682–91.
- Archer, Simon N., und Henrik Oster. 2015. „How Sleep and Wakefulness Influence Circadian Rhythmicity: Effects of Insufficient and Mistimed Sleep on the Animal and Human Transcriptome“. *Journal of Sleep Research* 24 (5): 476–93.
- Arendt, Josephine. 2010. „Shift Work: Coping with the Biological Clock“. *Occupational Medicine* 60 (1): 10–20.
- Baglioni, Chiara, Gemma Battagliese, Bernd Feige, Kai Spiegelhalder, Christoph Nissen, Ulrich Voderholzer, Caterina Lombardo, und Dieter Riemann. 2011. „Insomnia as a predictor of depression: A meta-analytic evaluation of longitudinal epidemiological studies“. *Journal of Affective Disorders* 135 (1–3): 10–19.
- Balsalobre, Aurélio, Steven A. Brown, Lysiane Marcacci, François Tronche, Christoph Kellendonk, Holger M. Reichardt, Günther Schütz, und Ueli Schibler. 2000. „Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling“. *Science* 289 (5488): 2344–47.
- Barclay, Johanna L., Jana Husse, Brid Bode, Nadine Naujokat, Judit Meyer-Kovac, Sebastian M. Schmid, Hendrik Lehnert, und Henrik Oster. 2012. „Circadian

- Desynchrony Promotes Metabolic Disruption in a Mouse Model of Shiftwork“. PLoS ONE 7 (5).
- Becker, Stephen P., Joshua M. Langberg, und Kelly C. Byars. 2015. „Advancing a Biopsychosocial and Contextual Model of Sleep in Adolescence: A Review and Introduction to the Special Issue“. *Journal of Youth and Adolescence* 44 (2): 239–70.
- Besedovsky, Luciana, Tanja Lange, und Jan Born. 2011. „Sleep and Immune Function“. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 463 (1): 121–37.
- Biggi Nicoletta, Dario Consonni, Valeria Galluzzo, Marco Sogliani & Prof. Giovanni Costa. 2008. Metabolic Syndrome in Permanent Night Workers, *Chronobiology International*, 25:2-3, 443-454.
- Blüher, Prof Dr M. 2014. „Das Fettgewebe – ein endokrines Organ“. *Der Internist* 55 (6): 687–98.
- Boden, Guenther. 2011. „Obesity, Insulin Resistance and Free Fatty Acids“: Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity 18 (2): 139–43.
- Booth, John N., Lindsay E. Bromley, Amy P. Darukhanavala, Harry R. Whitmore, Jacqueline G. Imperial, und Pamen D. Penev. 2012. „Reduced Physical Activity in Adults at Risk for Type 2 Diabetes Who Curtail Their Sleep“. *Obesity* 20 (2): 278–84.
- Bray, Molly S., und Martin E. Young. 2011. „Regulation of Fatty Acid Metabolism by Cell Autonomous Circadian Clocks: Time to Fatten up on Information?“ *Journal of Biological Chemistry* 286 (14): 11883–89.
- Broch, Montserrat, Joan Vendrell, Wifredo Ricart, Cristóbal Richart, und José-Manuel Fernández-Real. 2007. „Circulating Retinol-Binding Protein-4, Insulin Sensitivity,

- Insulin Secretion, and Insulin Disposition Index in Obese and Nonobese Subjects“. *Diabetes Care* 30 (7): 1802–6.
- Broussard, Josiane, und Matthew J. Brady. 2010. „The impact of sleep disturbances on Adipocyte Function and Lipid Metabolism“. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 24 (5): 763–73.
- Broussard, Josiane L., Florian Chapotot, Varghese Abraham, Andrew Day, Fanny Delebecque, Harry R. Whitmore, und Esra Tasali. 2015. „Sleep Restriction Increases Free Fatty Acids in Healthy Men“. *Diabetologia* 58 (4): 791–98.
- Broussard, Josiane L., David A. Ehrmann, Eve Van Cauter, Esra Tasali, und Matthew J. Brady. 2012. „Impaired Insulin Signaling in Human Adipocytes After Experimental Sleep RestrictionA Randomized, Crossover Study“. *Annals of Internal Medicine* 157 (8): 549–57.
- Buhr, Ethan D., Seung-Hee Yoo, und Joseph S. Takahashi. 2010. „Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators“. *Science* 330.
- Bünning, Erwin. 1977. *Die physiologische Uhr : circadiane Rhythmik u. Biochronometrie*. 3., gründl. überarb. Aufl. Berlin ua: Springer.
- Cairney, Scott A., Simon J. Durrant, Rebecca Power, und Penelope A. Lewis. 2015. „Complementary Roles of Slow-Wave Sleep and Rapid Eye Movement Sleep in Emotional Memory Consolidation“. *Cerebral Cortex* 25 (6): 1565–75.
- Cappuccio, Francesco P., Frances M. Taggart, Ngianga-Bakwin Kandala, Andrew Currie, Ed Peile, Saverio Stranges, und Michelle A. Miller. 2008. „Meta-Analysis of Short Sleep Duration and Obesity in Children and Adults“. *Sleep* 31 (5): 619–26.
- Carrasco-Benso MP, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustin O, Scheer FAJL, Garaulet M. Human

- adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *Faseb J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2016;30(9):3117-3123.
- Cedernaes, Jonathan, Megan E. Osler, Sarah Voisin, Jan-Erik Broman, Heike Vogel, Suzanne L. Dickson, Juleen R. Zierath, Helgi B. Schiöth, und Christian Benedict. 2015. „Acute Sleep Loss Induces Tissue-Specific Epigenetic and Transcriptional Alterations to Circadian Clock Genes in Men“. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (9): E1255–61.
- Chang, Shwu-Shin, Dan Eisenberg, Lei Zhao, Christopher Adams, Ryan Leib, John Morser, und Lawrence Leung. 2016. „Chemerin Activation in Human Obesity“. *Obesity; Silver Spring* 24 (7): 1522–29.
- Chaput, Jean-Philippe, Claude Bouchard, und Angelo Tremblay. 2014. „Change in Sleep Duration and Visceral Fat Accumulation Over 6 Years in Adults“. *Obesity* 22 (5): E9–12.
- Chaput, Jean-Philippe, Jessica McNeil, Jean-Pierre Després, Claude Bouchard, und Angelo Tremblay. 2013. „Seven to Eight Hours of Sleep a Night Is Associated with a Lower Prevalence of the Metabolic Syndrome and Reduced Overall Cardiometabolic Risk in Adults“. *PLoS ONE* 8 (9).
- Cherneva, Radostina Vlaeva, Ognian Borisov Georgiev, Daniela Stoichkova Petrova, Tsanko Lilianov Mondeshki, Sylvia Rumenova Ruseva, Adelina Dimitrova Cakova, und Vanio Ivanov Mitev. 2013. „Resistin - the link between adipose tissue dysfunction and insulin resistance in patients with obstructive sleep apnea“. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* 12 (Januar): 5.
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med.* 2009 Apr 9;360(15):1509–17.

- Damiola, Francesca, Nguyet Le Minh, Nicolas Preitner, Benoît Kornmann, Fabienne Fleury-Olela, und Ueli Schibler. 2000. „Restricted Feeding Uncouples Circadian Oscillators in Peripheral Tissues from the Central Pacemaker in the Suprachiasmatic Nucleus“. *Genes & Development* 14 (23): 2950–61.
- Dibner, Charna, Ueli Schibler, und Urs Albrecht. 2010. „The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks“. *Annual Review of Physiology* 72 (1): 517–49.
- „Die OECD in Zahlen und Fakten 2011-2012: Wirtschaft, Umwelt, Gesellschaft“. o. J. Text. Tag des Zugriffs: 11. Februar 2016. http://www.oecd-ilibrary.org/sites/9789264125476-de/12/02/03/12-02-03-g1.html?itemId=/content/chapter/9789264125469-109-de&_csp_=98aa34a9031ecfeb70fc91faa1608310.
- Dijk, Derk-Jan, und Malcolm von Schantz. 2005. „Timing and Consolidation of Human Sleep, Wakefulness, and Performance by a Symphony of Oscillators“. *Journal of Biological Rhythms* 20 (4): 279–90.
- Dotz M, Roehr JT, Ahmed R, Dieterich C. FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology*. 2012;1(3): 895-905.
- Fantuzzi, Giamila. 2005. „Adipose tissue, adipokines, and inflammation“. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (5): 911–19.
- Ford, Earl S., Timothy J. Cunningham, und Janet B. Croft. 2015. „Trends in Self-Reported Sleep Duration among US Adults from 1985 to 2012“. *Sleep* 38 (5): 829–32.
- Franken, Paul. 2013. „A role for clock genes in sleep homeostasis“. *Current Opinion in Neurobiology, Circadian rhythm and sleep*, 23 (5): 864–72.

- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10): R80.
- Gil-Lozano, Manuel, Paola M. Hunter, Lucy-Ann Behan, Bojana Gladanac, Robert F. Casper, und Patricia L. Brubaker. 2016. „Short-Term Sleep Deprivation with Nocturnal Light Exposure Alters Time-Dependent Glucagon-like Peptide-1 and Insulin Secretion in Male Volunteers“. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 310 (1): E41–50.
- Gimble, Jeffrey M., und Z. Elizabeth Floyd. 2009. „Fat Circadian Biology“. *Journal of Applied Physiology* 107 (5): 1629–37.
- Göder, PD Dr R., C. Nissen, und B. Rasch. 2014. „Schlaf, Lernen und Gedächtnis: Relevanz für Psychiatrie und Psychotherapie“. *Der Nervenarzt* 85 (1): 50–56.
- Guyon, A., M. Balbo, L. L. Morselli, E. Tasali, R. Leproult, M. L’Hermite-Balériaux, E. Van Cauter, und K. Spiegel. 2014. „Adverse Effects of Two Nights of Sleep Restriction on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Healthy Men“. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99 (8): 2861–68.
- Hall, Martica H., Matthew F. Muldoon, J. Richard Jennings, Daniel J. Buysse, Janine D. Flory, und Stephen B. Manuck. 2008. „Self-Reported Sleep Duration is Associated with the Metabolic Syndrome in Midlife Adults“. *Sleep* 31 (5): 635–43.
- Hallschmid, Manfred, Henrik Oster, Bernd Schultes, und Sebastian M. Schmid. 2015. „Kurzer, gestörter und unregelmäßiger Schlaf: Die schädlichen Auswirkungen auf den menschlichen Stoffwechsel“. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 140 (17): 1278–83.

- Herzog, Nina, Kamila Jauch-Chara, Franziska Hyzy, Annekatrin Richter, Alexia Friedrich, Christian Benedict, und Kerstin M. Oltmanns. 2013. „Selective slow wave sleep but not rapid eye movement sleep suppression impairs morning glucose tolerance in healthy men“. *Psychoneuroendocrinology* 38 (10): 2075–82.
- Huang, Wenyu, Kathryn Moynihan Ramsey, Biliانا Marcheва, und Joseph Bass. 2011. „Circadian Rhythms, Sleep, and Metabolism“. *Journal of Clinical Investigation* 121 (6): 2133–41.
- Husse, Jana, Sophie Charlotte Hintze, Gregor Eichele, Hendrik Lehnert, und Henrik Oster. 2012. „Circadian Clock Genes *Per1* and *Per2* Regulate the Response of Metabolism-Associated Transcripts to Sleep Disruption“. *PLoS ONE* 7 (12).
- Husse, Jana, Jana-Thabea Kiehn, Johanna L. Barclay, Nadine Naujokat, Judit Meyer-Kovac, Hendrik Lehnert, und Henrik Oster. 2017. „Tissue-Specific Dissociation of Diurnal Transcriptome Rhythms During Sleep Restriction in Mice“. *Sleep* 40 (6).
- Irwin, Michael, John Thompson, Claudine Miller, J. Christian Gillin, und Michael Ziegler. 1999. „Effects of Sleep and Sleep Deprivation on Catecholamine And Interleukin-2 Levels in Humans: Clinical Implications“. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84 (6): 1979–85.
- Jung CM, Melanson EL, Frydendall EJ, Perreault L, Eckel RH, Wright KP. Energy expenditure during sleep, sleep deprivation and sleep following sleep deprivation in adult humans. *J Physiol.*2010;589(1):235-244.
- Kashiwagi, A, M A Verso, J Andrews, B Vasquez, G Reaven, und J E Foley. 1983. „In vitro insulin resistance of human adipocytes isolated from subjects with noninsulin-dependent diabetes mellitus“. *Journal of Clinical Investigation* 72 (4): 1246–54.

- Kivimäki, Mika, G. David Batty, und Christer Hublin. 2011. „Shift Work as a Risk Factor for Future Type 2 Diabetes: Evidence, Mechanisms, Implications, and Future Research Directions“. *PLoS Medicine* 8 (12): e1001138.
- Knutson, Kristen L., Karine Spiegel, Plamen Penev, und Eve Van Cauter. 2007. „The metabolic consequences of sleep deprivation“. *Sleep Medicine Reviews* 11 (3).
- Koella, Werner P. 1988. *Die Physiologie des Schlafes: eine Einführung; 11 Tabellen*. Stuttgart ua: Fischer.
- Landgraf, Dominic, Anton Shostak, und Henrik Oster. 2012. „Clock Genes and Sleep“. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 463 (1): 3–14.
- Leproult, R., und E. Van Cauter. 2009. *Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism*. Bd. 17. Karger Publishers.
- Loboda, Andrey, Walter K. Kraft, Bernard Fine, Jeffrey Joseph, Michael Nebozhyn, Chunsheng Zhang, Yudong He, et al. 2009. „Diurnal variation of the human adipose transcriptome and the link to metabolic disease“. *BMC Medical Genomics* 2: 7.
- Lowrey, Phillip L., und Joseph S. Takahashi. 2004. „Mammalian Circadian Biology: Elucidating Genome-Wide Levels of Temporal Organization“. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 5 (1): 407–41.
- Lucassen, Eliane A., Kristina I. Rother, und Giovanni Cizza. 2012. „Interacting Epidemics? Sleep Curtailment, Insulin Resistance, and Obesity“. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1264 (1): 110–34.
- Machleidt, F., V. Ott, und H. Lehnert. 2013. „Wechselwirkungen zwischen Fettzellen und Gehirn“. *Der Diabetologe* 9 (6): 449–54.

- Marcheva, Biliiana, Kathryn Moynihan Ramsey, Ethan D. Buhr, Yumiko Kobayashi, Hong Su, Caroline H. Ko, Ganka Ivanova, et al. 2010. „Disruption of the Clock Components CLOCK and BMAL1 Leads to Hypoinsulinaemia and Diabetes“. *Nature* 466 (7306): 627–31.
- Markwald RR, Melanson EL, Smith MR, Higgins J, Perreault L, Eckel RH, Wright KP Jr. Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(14):5695-5700.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, und R. C. Turner. 1985. „Homeostasis Model Assessment: Insulin Resistance and β -Cell Function from Fasting Plasma Glucose and Insulin Concentrations in Man“. *Diabetologia* 28 (7): 412–19.
- McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(10):4288-4297.
- Mensink, G.B.M., A. Schienkiewitz, M. Haftenberger, T. Lampert, T. Ziese, und C. Scheidt-Nave. 2013. „Übergewicht und Adipositas in Deutschland“. 27. Mai 2013.
- Minkel, Jared, Marisa Moreta, Julianne Muto, Oo Htaik, Christopher Jones, Mathias Basner, und David Dinges. 2014. „Sleep Deprivation Potentiates HPA Axis Stress Reactivity in Healthy Adults“. *Health Psychology* 33 (11): 1430–34.
- Mohawk, Jennifer A., Carla B. Green, und Joseph S. Takahashi. 2012. „Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals“. *Annual Review of Neuroscience* 35 (1): 445–62.
- Möller-Levet, Carla S., Simon N. Archer, Giselda Bucca, Emma E. Laing, Ana Slak, Renata Kabiljo, June C. Y. Lo, et al. 2013. „Effects of Insufficient Sleep on Circadian

- Rhythmicity and Expression Amplitude of the Human Blood Transcriptome“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (12): E1132–41.
- Mongrain, Valérie, Susana A. Hernandez, Sylvain Pradervand, Stéphane Dorsaz, Thomas Curie, Grace Hagiwara, Phung Gip, H. Craig Heller, und Paul Franken. 2010. „Separating the Contribution of Glucocorticoids and Wakefulness to the Molecular and Electrophysiological Correlates of Sleep Homeostasis“. *Sleep* 33 (9): 1147–57.
- Moser, Doris, Peter Anderer, Georg Gruber, Silvia Parapatics, Erna Loretz, Marion Boeck, Gerhard Kloesch, et al. 2009. „Sleep Classification According to AASM and Rechtschaffen & Kales: Effects on Sleep Scoring Parameters“. *Sleep* 32 (2): 139–49.
- Omisade, Antonina, Orfeu M. Buxton, und Benjamin Rusak. 2010. „Impact of acute sleep restriction on cortisol and leptin levels in young women“. *Physiology & Behavior* 99 (5): 651–56.
- Oster, Henrik. 2014. „Circadiane Uhren und Energiemetabolismus“. *Biologie in unserer Zeit* 44 (2): 100–106.
- Otway, Daniella T., Simone Mäntele, Silvia Bretschneider, John Wright, Paul Trayhurn, Debra J. Skene, M. Denise Robertson, und Jonathan D. Johnston. 2011. „Rhythmic Diurnal Gene Expression in Human Adipose Tissue From Individuals Who Are Lean, Overweight, and Type 2 Diabetic“. *Diabetes* 60 (5): 1577–81.
- Padilha, H. G., C. A. Crispim, I. Z. Zimberg, D. A. De-Souza, J. Waterhouse, S. Tufik, und M. T. de-Mello. 2011. „A link between sleep loss, glucose metabolism and adipokines“. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44 (10): 992–99.
- Pan, An, Eva S. Schernhammer, Qi Sun, und Frank B. Hu. 2011. „Rotating Night Shift Work and Risk of Type 2 Diabetes: Two Prospective Cohort Studies in Women“. *PLoS Medicine* 8 (12): e1001141.

- Paschos, Georgios K., Salam Ibrahim, Wen-Liang Song, Takeshige Kunieda, Gregory Grant, Teresa M. Reyes, Christopher A. Bradfield, et al. 2012. „Obesity in Mice with Adipocyte-Specific Deletion of Clock Component Arntl“. *Nature Medicine* 18 (12): 1768–77.
- Peirce, Vivian, Stefania Carobbio, und Antonio Vidal-Puig. 2014. „The Different Shades of Fat“. *Nature* 510 (7503): 76–83.
- Peplonska B, Bukowska A, Sobala W . 2015. Association of Rotating Night Shift Work with BMI and Abdominal Obesity among Nurses and Midwives. *PLoS ONE* 10(7): e0133761.
- Puttonen, Sampsa, Katriina Viitasalo, und Mikko Härmä. 2012. „The relationship between current and former shift work and the metabolic syndrome“. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 38 (4): 343–48.
- Rasch, Björn, und Jan Born. 2013. „About Sleep’s Role in Memory“. *Physiological Reviews* 93 (2): 681–766.
- Rechtschaffen, Allan, und Anthony Kales. 1968. *A Manual of standardized terminology, techniques and scoring system for sleep stages of human subjects*. Bethesda/Md: USDepartment of Health ua.
- Reppert, Steven M., und David R. Weaver. 2002. „Coordination of Circadian Timing in Mammals“. *Nature* 418 (6901): 935–41.
- Ryu, Vitaly, John T. Garretson, Yang Liu, Cheryl H. Vaughan, und Timothy J. Bartness. 2015. „Brown Adipose Tissue Has Sympathetic-Sensory Feedback Circuits“. *Journal of Neuroscience* 35 (5): 2181–90.
- Saely, Christoph H., Kathrin Geiger, und Heinz Drexel. 2012. „Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review“. *Gerontology* 58 (1): 15–23.

- Salgado-Delgado, Roberto, Manuel Angeles-Castellanos, Nadia Saderi, Ruud M. Buijs, und Carolina Escobar. 2010. „Food Intake during the Normal Activity Phase Prevents Obesity and Circadian Desynchrony in a Rat Model of Night Work“. *Endocrinology* 151 (3): 1019–29.
- Schlack, R, U Hapke, U Maske, MA Busch, und S Cohrs. 2013. „Häufigkeit und Verteilung von Schlafproblemen und Insomnie in der deutschen Erwachsenenbevölkerung“. 2013.
- Schmid, S. M., und B. Schultes. 2011. „Schlechter Schlaf als Risikofaktor für das metabolische Syndrom“. *Der Internist* 52 (4): 383–88.
- Schmid, Sebastian M., Manfred Hallschmid, Kamila Jauch-Chara, Nadine Bandorf, Jan Born, und Bernd Schultes. 2007. „Sleep Loss Alters Basal Metabolic Hormone Secretion and Modulates the Dynamic Counterregulatory Response to Hypoglycemia“. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92 (8): 3044–51.
- Schmid, Sebastian M., Manfred Hallschmid, Kamila Jauch-Chara, Jan Born, und Bernd Schultes. 2008. „A Single Night of Sleep Deprivation Increases Ghrelin Levels and Feelings of Hunger in Normal-Weight Healthy Men“. *Journal of Sleep Research* 17 (3): 331–34.
- Schmid, Sebastian M., Manfred Hallschmid, Kamila Jauch-Chara, Britta Wilms, Hendrik Lehnert, Jan Born, und Bernd Schultes. 2011. „Disturbed Glucoregulatory Response to Food Intake After Moderate Sleep Restriction“. *Sleep* 34 (3): 371–77.
- Scott, E. M., A. M. Carter, und P. J. Grant. 2007. „Association between Polymorphisms in the Clock Gene, Obesity and the Metabolic Syndrome in Man“. *International Journal of Obesity* 32 (4): 658–62.

- Sharma, Sunil, und Mani Kavuru. 2010. „Sleep and Metabolism: An Overview“. *International Journal of Endocrinology* 2010.
- Shechter A, Rising R, Albu JB, St-Onge M-P. Experimental sleep curtailment causes wake-dependent increases in 24-h energy expenditure as measured by whole-room indirect calorimetry. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(6):1433-1493.
- Spaeth, Andrea M., David F. Dinges, und Namni Goel. 2013. „Effects of Experimental Sleep Restriction on Weight Gain, Caloric Intake, and Meal Timing in Healthy Adults“. *Sleep* 36 (7): 981–90.
- Spiegel, Karine, Rachel Leproult, und Eve Van Cauter. 1999. „Impact of sleep debt on metabolic and endocrine function“. *The Lancet* 354 (9188): 1435–39.
- Stamatakis, Katherine A., und Naresh M. Punjabi. 2010. „Effects of sleep fragmentation on glucose metabolism in normal subjects“. *Chest* 137 (1): 95–101.
- Taheri, Shahrad, Ling Lin, Diane Austin, Terry Young, und Emmanuel Mignot. 2004. „Short Sleep Duration Is Associated with Reduced Leptin, Elevated Ghrelin, and Increased Body Mass Index“. *PLoS Medicine* 1 (3).
- Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 2008;9(10):764-775.
- Takase, Bonpei, Takashi Akima, Kimio Satomura, Fumitaka, Ohsuzu, Takemi Mastui, Masayuki Ishihara, und Akira Kurita. 2004. „Effects of chronic sleep deprivation on autonomic activity by examining heart rate variability, plasma catecholamine, and intracellular magnesium levels“. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 4th International Symposium Workshop on Circadian Rhythms and Clinical Chronotherapy*, 58, Supplement 1 (Oktober): S35–39.

- Turek, Fred W., Corinne Joshu, Akira Kohsaka, Emily Lin, Ganka Ivanova, Erin McDearmon, Aaron Laposky, et al. 2005. „Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian Clock Mutant Mice“. *Science* 308 (5724): 1043–45.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5116-5121.
- Van Cauter, Eve, Karine Spiegel, Esra Tasali, und Rachel Leproult. 2008. „Metabolic consequences of sleep and sleep loss“. *Sleep Medicine, The Art of Good Sleep Proceedings from the 5th International Sleep Disorders Forum: Novel Outcome Measures of Sleep, Sleep Loss and Insomnia*, 9, Supplement 1 (September): S23–28.
- Vgontzas, Zoumakis, Bixler, Lin, Follett, Kales, Chrousos. 2004. Adverse Effects of Modest sleep restriction in Sleepiness, Performance, and Inflammatory Cytokines. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 89, Issue 5, 1 May 2004, S 2119–2126.
- Vieira, Elaine, Elena G. Ruano, Ana LuciaC Figueroa, Gloria Aranda, Dulce Momblan, Francesc Carmona, Ramon Gomis, Josep Vidal, und Felicia A. Hanzu. 2014. „Altered Clock Gene Expression in Obese Visceral Adipose Tissue Is Associated with Metabolic Syndrome: E111678“. *PLoS One* 9 (11): e111678.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1518-25.
- Wang, Feng, Liuzhuo Zhang, Yanfang Zhang, Bo Zhang, Yonghua He, Shaohua Xie, Mengjie Li, et al. 2014. „0147 Meta-Analysis on Night Shift Work and Risk of Metabolic Syndrome“. *Occupational and Environmental Medicine* 71 (Suppl 1): A78–A78.
- Weeß, Hans-Günter, und Ralf Landwehr. 2009. „Phänomenologie, Funktion und Physiologie des Schlafes“. *PiD - Psychotherapie im Dialog* 10 (02): 101–6.

- Williams, Ellen P., Marie Mesidor, Karen Winters, Patricia M. Dubbert, und Sharon B. Wyatt. 2015. „Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem“. *Current Obesity Reports* 4 (3): 363–70.
- Wilms, Britta, Elena M Leineweber, Matthias Mölle, Rodrigo Chamorro, Claudia Pommerenke, Gabriela Salinas-Riester, Christian Sina, Hendrik Lehnert, Henrik Oster, Sebastian M Schmid. 2019. „Sleep Loss Disrupts Morning-to-Evening Differences in Human White Adipose Tissue Transcriptome“. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 May. 1;104(5):1687-1696.
- Wilms, Britta, Rodrigo Chamorro, Manfred Hallschmid, Denisa Trost, Nelli Forck, Bernd Schultes, Matthias Mölle, Friedhelm Sayk, Hendrik Lehnert, und Sebastian M Schmid. 2019. „Timing Modulates the Effect of Sleep Loss on Glucose Homeostasis“. *J Clin Endocrinol Metab* Jul 1;104(7):2801-2808.
- Wu, Xiyang, Hui Xie, Gang Yu, Teddi Hebert, Brian C. Goh, Steven R. Smith, und Jeffrey M. Gimble. 2009. „Expression Profile of mRNAs Encoding Core Circadian Regulatory Proteins in Human Subcutaneous Adipose Tissue: Correlation with Age and Body Mass Index“. *International journal of obesity (2005)* 33 (9): 971–77.
- Xie, Xiaoping, Shuhong Yang, Yan Zou, Shuting Cheng, Yuhui Wang, Zhou Jiang, Jing Xiao, Zhengrong Wang, und Yanyou Liu. 2013. „Influence of the core circadian gene “Clock” on obesity and leptin resistance in mice“. *Brain Research* 1491 (Januar): 147–55.
- Yang, Qin, Timothy E. Graham, Nimesh Mody, Frederic Preitner, Odile D. Peroni, Janice M. Zabolotny, Ko Kotani, Loredana Quadro, und Barbara B. Kahn. 2005. „Serum Retinol Binding Protein 4 Contributes to Insulin Resistance in Obesity and Type 2 Diabetes“. *Nature* 436 (7049): 356–62.
- Yi, Chun-Xia, Susanne E. la Fleur, Eric Fliers, und Andries Kalsbeek. 2010. „The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism“.

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1802 (4): 416–31.
- Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue): W741-748.
- Zhang, Ray, Nicholas F. Lahens, Heather I. Ballance, Michael E. Hughes, und John B. Hogenesch. 2014. „A Circadian Gene Expression Atlas in Mammals: Implications for Biology and Medicine“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (45): 16219–24.
- Zulley, Jürgen. 2007. „Physiologie Des Schlafes: Ein Prozess Aktiver Erholung“. *Pharmazie in Unserer Zeit* 36 (3): 176–79.
- Zvonic, Sanjin, Andrey A. Ptitsyn, Steven A. Conrad, L. Keith Scott, Z. Elizabeth Floyd, Gail Kilroy, Xiying Wu, Brian C. Goh, Randall L. Mynatt, und Jeffrey M. Gimble. 2006. „Characterization of Peripheral Circadian Clocks in Adipose Tissues“. *Diabetes* 55 (4): 962–70.

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

7.1 Abbildungen

- Abb. 1: Physiologisches Hypnogramm eines gesunden Erwachsenen (Lucassen, Rother, und Cizza 2012).
- Abb. 2: Potenzielle Pathomechanismen der Entwicklung von Diabetes und Adipositas infolge gestörten Schlafs (Schmid und Schultes 2011).
- Abb. 3: Die Organisation weißen Fettgewebes und seine Funktion als endokrines Organ (Blüher 2014).
- Abb. 4: Organigramm des Studienablaufs.
- Abb. 5: Vergleich der Genexpressionsstärke in der abendlichen Adipozytenaspiration zwischen den Schlafinterventionen; Schwarze Punkte = Vergleich SD vs. CON; graue Punkte = Vergleich SR vs. CON. Die zu den Zeitpunkten unterschiedlich exprimierten Gene (Falscherkennungsrate, korrigierter p-Wert < 0,05; n=15 für SD und SR; n=14 für CON) finden sich im Bereich rechts unten und werden mit demselben Farbcode dargestellt. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 1B der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).
- Abb. 6: Vergleich tageszeitabhängig regulierter Genexpression zu den zwei Adipozytenaspirations-Zeitpunkten während der unterschiedlichen Schlafbedingungen: links: Gene mit gesteigerter Expression am Abend (A) gegenüber Morgen (M) zum Zeitpunkt der ersten Adipozytenaspiration; rechts: Gene mit gesteigerter Expression am Morgen (M>A) zum Zeitpunkt der zweiten Adipozytenaspiration. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 2A der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

- Abb. 7: Verhältnis von morgendlicher zu abendlicher Genexpression (M/A-Ratio) in den drei Bedingungen CON (links), SR (mittig) und SD (rechts): Die Balken stellen die Anzahl der Gene dar; die Lorenzkurve zeigt die Verteilung der M/A-Ratio in den verschiedenen Bedingungen. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 2B der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).
- Abb. 8: M/A- Expressionsratios für die Uhrgene CLOCK (A), BMAL1 (B), CRY1 (C), CRY2 (D), PER1 (E), PER2 (F), DBP (G) und REV-ERBA (H) während der verschiedenen Schlafbedingungen. Schwarze Balken stellen die Daten der RNAseq dar. Hellgraue Balken zeigen die Validierung per qPCR der gleichen Proben. Die Buchstaben in Klammern stehen für die statistische Auswertung der M/A Regulation. R= signifikante Regulation; N= nicht-reguliert; CON (links), SR (mittig) und SD (rechts). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$ gegen CON, 2-fach ANOVA mit Bonferroni Post- Test ($n=15$ für SD, SR; $n=14$ für CON). Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 3 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).
- Abb. 9: Schematische Darstellung der anhand GO-Klassifikation identifizierten Schlaf-regulierten Gene in Haupt-Signalwegen der Adipozyten. Die weißen Kästen zeigen GO-Identifikationen und nennen den Signalweg. Die Kuchendiagramme zeigen den Anteil der Gene, deren Expression durch Schlafverkürzung beeinflusst wird. Die beistehende Zahl zeigt die eigentliche Anzahl an Schlaf-regulierten Genen an. Genlisten werden in einer ergänzenden Tabelle dargestellt: s. Verzeichnis für Abbildungen und Tabellen. Genlisten werden in einer ergänzenden Tabelle unter <https://data.mendeley.com/datasets/g2xmf3cpy2/draft?a=2f083974-bd8b-4143-bde0-9bc1a1762c2b> online dargestellt. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 4 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Abb. 10: M/A-Expressionsratio metabolischer Gene während unterschiedlicher Versuchsbedingungen: CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). (A-C) = M/A Expressionsratios von Genen assoziiert mit Lipogenese (A), Lipolyse und β -Oxidation (B), und Gluconolyse bis oxid. Phosphorylierung (C) während der unterschiedlichen Versuchsbedingungen (schwarze Balken = CON; dunkelgraue Balken = SR; hellgraue Balken = SD). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ gegen CON, 2-fach ANOVA mit Bonferroni Post-Test ($n=15$ für SD, SR; $n=14$ für CON). CHPT1 = Cholin Phosphotransferase 1; DGAT2 = Diacylglycerol O-Acetyltransferase 2; LPIN3 = Lipin 3; OCRL = Oculocerebrorenal-Syndrome-of-Lowe; PIGL = Phosphatidylinositol-glycan-anchor-biosynthesis, class L; PIGY = Phosphatidylinositol-glycan-anchor-biosynthesis, class Y; PISD = Phosphatidylserin Decarboxylase; ACAA1 = Acetyl-CoA Acyltransferase 1; CNR1 = Cannabinoid Rezeptor 1; CPT1C = Carnitine Palmitoyltransferase 1C; DDHD1 = DDHD-Domain-Containing 1; INPP5F = Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase F; SLC27A2 = Solute-Carrier-Family-27 (Fettsäuretransporter), Member 2; NDUFA7 = NADH-Dehydrogenase(Ubiquinone)-1-alpha-Subcomplex, 7, 14,5kDa; NDUFB8 = NADH-Dehydrogenase(Ubiquinone)-1-beta-Subcomplex, 8, 19kDa; PGK1 = Phosphoglycerat Kinase 1; SDHAF2 = Succinate-Dehydrogenase-Complex-Assembly-Factor-2; SDHB = Succinate-Dehydrogenase-Complex (Subunit B, Iron-Suffer (lp)); SURF1 = Surfert 1. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 5 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Abb. 11: M/A- Expressionsratios der Adipokine während der unterschiedlichen Versuchsbedingungen: CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ gegen CON, 1-fach ANOVA mit Bonferroni Post-Test ($n=15$ für SD, SR; $n=14$ für CON). LEP = Leptin, Adiponeq = Adiponectin, ("C1Q and collagen domain containing");

TNF = Tumornekrosefaktor; RETN = Resistin; SERPINE1 = Serpin-Peptidase-Inhibitor, clade E; IL8 = Interleukin 8; RBP4 = Retinol binding protein 4; TGFB1 = Transforming-Growth-Factor, beta1; CCL2 = Chemokin (C-C motif) Ligand 2; CCL5 = Chemokin (C-C motif) Ligand 5; NAMPT = Nicotinamid Phosphoribosyltransferase; RARRES2 = Retinsäure-Rezeptor-Responder-Protein 2; NUCB2 = Nucleobindin 2; APLN = Apelin. Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 6 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Abb. 12: Nüchtern Serumkonzentrationen der Glukosestoffwechselfparameter während CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$ für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“, **: $p < 0,01$ (für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“); (*): $p < 0,055$ (für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“; $n=14$). Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 7 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Abb. 13: Serumkonzentrationen von TG (links) und FFA (rechts) während CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken).

Abb. 14: Serumkonzentrationen von RBP4 (links), IL8 (mittig) und Resistin (rechts) während CON (schwarze Balken), SR (dunkelgraue Balken) und SD (hellgraue Balken). Daten als Mittelwert dargestellt \pm SEM. *: $p < 0,05$ (für den paarweisen Vergleich CON vs. SD; $n=14$). Diese Abbildung wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 7 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

7.2 Tabellen

Tabelle 1: Schlafstadienkomposition während verkürztem (SR) und regelrechtem Schlaf (CON); \diamond verstrichene Zeit zwischen Beginn der versuchsabhängigen Schlafenszeit und Beginn des Auftretens des jeweiligen Schlafstadiums der Episode. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ (für ANOVA Haupteffekt „Bedingung“). Diese Tabelle wurde angefertigt in Anlehnung an Table 1 der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

Tabelle 2: Einteilung der Tageszeit-regulierten Gene in Abhängigkeit von Schlaf nach KEGG Signalweg Überrepräsentations-Analyse. Genlisten werden in einer ergänzenden Tabelle unter <https://data.mendeley.com/datasets/g2xmf3cpy2/draft?a=2f083974-bd8b-4143-bde0-9bc1a1762c2b> online dargestellt. Diese Tabelle wurde angefertigt in Anlehnung an Figure 2C der Publikation (Wilms und Leineweber et al. 2019).

8. Danksagung

Zuallererst möchte ich meinen größten Dank meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. Sebastian Meyhöfer** aussprechen. Er hat mich in alle Aspekte des wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt und mich zu jedem Zeitpunkt gefördert. Zusätzlich war er immer für Fragen bereit und unterstützte mich nicht nur fachlich, sondern auch zu vielen Zeitpunkten mental.

Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei **PD Dr. oec. troph. Britta Wilms** und **Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster** bedanken. Sie waren ständige Ansprechpartner beim Auswerten der Daten und standen mir bis zuletzt bei allen fachlichen und formellen Fragen dieser Arbeit geduldig zur Seite.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich **Dr. med. Felix Machleidt**, **Dr. med. Matthias Bernd** und **PD Dr. med. Alex Iwen** aussprechen, die mich zusätzlich zu ihrer regulären Arbeit im Klinikdienst bei der Gewinnung der Adipozyten unterstützt und supervidiert haben.

Außerdem möchte ich auch **Dr. rer. nat. Rodrigo Chomorro** ganz herzlich danken. Er hat mich insbesondere während der Probengewinnung und –Verarbeitung hervorragend unterstützt. Ebenso bedanke ich mich auch bei **Dr. -Ing. Matthias Mölle** für seine geduldige Hilfestellung bei der Auswertung der EEG-Daten.

Christiane Otten und **Ann-Kristin-Panknin** gilt mein Dank für ihre Hilfe bei organisatorischen Fragen vor und während der Studienphase. Bei **Heidi Ruf** und **Martina Grohs** bedanke ich mich herzlich für die Bestimmung der Blutparameter.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet und wo sie nur konnten, unterstützt haben.

9. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Elena Maria Leineweber, dass ich die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss kurzfristigen Schlafentzugs auf zirkadiane Rhythmen stoffwechselassoziierter Gene im subkutanen Fettgewebe" eigenständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Literaturquellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bielefeld, den 22.02.2022



.....

(Unterschrift)

Sleep Loss Disrupts Morning-to-Evening Differences in Human White Adipose Tissue Transcriptome

Britta Wilms,^{1,2*} Elena M. Leineweber,^{1*} Matthias Mölle,³ Rodrigo Chamorro,^{1,4} Claudia Pommerenke,⁵ Gabriela Salinas-Riester,⁵ Christian Sina,^{1,6} Hendrik Lehnert,^{1,2,3} Henrik Oster,^{7*} and Sebastian M. Schmid^{1,2,3*}

¹Department of Internal Medicine I, University of Lübeck, 23538 Lübeck, Germany; ²German Center for Diabetes Research, 85764 Neuherberg, Germany; ³Center of Brain, Behavior and Metabolism, University of Lübeck, 23562 Lübeck, Germany; ⁴Department of Nutrition, University of Chile, 8380453 Santiago, Chile; ⁵Transcriptome Analysis Laboratory, University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany; ⁶Institute of Nutritional Medicine, University of Lübeck, 23538 Lübeck, Germany; and ⁷Institute of Neurobiology, University of Lübeck, 23562 Lübeck, Germany

ORCID numbers: 0000-0003-3178-0567 (B. Wilms).

Context: Chronodisruption, as caused by such conditions as perturbations of 24-hour rhythms of physiology and behavior, may promote the development of metabolic diseases.

Objective: To assess the acute effects of sleep curtailment on circadian regulation (*i.e.*, morning-to-evening differences) of white adipose tissue (WAT) transcriptome in normal-weight men.

Design: Fifteen healthy men aged 18 to 30 years (mean \pm SEM, 24.0 \pm 0.9 years) were studied. In randomized, balanced order they underwent three separate nights with regular sleep duration (8 hours of sleep between 11:00 PM and 7:00 AM), sleep restriction (4 hours of sleep between 3:00 AM and 7:00 AM), and sleep deprivation (no sleep at all). Sleep was polysomnographically evaluated. WAT biopsy samples were taken twice at 9:00 PM and 7:00 AM to assess morning-to-evening differences. WAT transcriptome profile was assessed by RNA sequencing, and expression of relevant circadian core clock genes were analyzed. Glucose homeostasis, lipid profile, and adipokines were assessed.

Results: Sleep restriction dramatically blunted morning-to-evening transcriptome variations with further dampening after sleep deprivation. Although most core clock genes remained stably rhythmic, morning-to-evening regulated pathways of carbohydrate and lipid metabolism were highly sensitive to sleep loss. In particular, genes associated with carbohydrate breakdown lost rhythmicity after sleep deprivation, with an overall trend toward an upregulation in the morning. In line with specific transcriptional changes in WAT, retinol-binding-protein 4 was increased and β -cell secretory capacity was diminished.

Conclusions: Acute sleep loss induces a profound restructuring of morning-to-evening WAT transcriptome with uncoupling from the local clock machinery, resulting in increased WAT carbohydrate turnover and impaired glucose homeostasis. Our data support an optimization of sleep duration and timing to prevent metabolic disorders such as obesity and type 2 diabetes. (*J Clin Endocrinol Metab* 104: 1687–1696, 2019)

The average sleep duration in modern 24-hour societies has decreased during the last decades, with up to 30% of adults in the United States reporting <6 hours of sleep per night (1). In addition, shiftwork resulting in short and irregular sleep became more and more common, with up to 20% of employees in Western countries working on rotating shifts or overnight duties (2). In parallel to these changes in circadian rhythms, metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes, have become epidemic (3). Epidemiological data suggest a clear link between chronodisruption (*i.e.* mistimed sleep), impaired sleep quality and shift work, and adverse metabolic traits (4, 5).

Endogenous circadian clocks located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the hypothalamus and many peripheral tissues align physiology and behavior with the 24-hour day-night cycle. Recently, insufficient and mistimed sleep in rodents has been shown to impair the rhythmic transcriptome of central and peripheral tissues, such as white adipose tissue (WAT), thereby suggesting a potential molecular link between sleep and metabolism (6). A dramatic deterioration of transcriptional circadian regulation, especially at the level of the liver, has been reported in chronically sleep restricted mice (7). In humans, 1 week of sleep restriction leads to moderate but widespread alterations in transcription patterns in blood (8) (*i.e.*, affected genes are known to be associated with circadian rhythm, oxidative stress, and metabolism). Another study reported marked disruptions of circadian blood transcriptome under mistimed sleep conditions (9). Although the impact of impaired sleep on the molecular traits of circadian rhythmicity is beyond controversy, causality relating to metabolic consequences in humans is less clear. A recent study observed a correlation of peripheral clock gene expression, as assessed in peripheral blood mononuclear cells, with visceral obesity (10). However, data on the impact of changes in sleep on rhythmic transcriptome of metabolically active tissues and human energy homeostasis are scarce.

This study therefore aimed at characterizing the effect of acute sleep curtailment on the morning WAT transcriptome regulation, on differences from the evening WAT transcriptome, and its metabolic consequences. We hypothesized that a sleep curtailment of 4 hours alters the temporal regulation of WAT transcripts and that total sleep deprivation aggravates these effects. We further hypothesized that impaired WAT transcriptome regulation will be mirrored by circulating levels of relevant hormones and adipokines.

Material and Methods

Participants

Seventeen healthy, normal-weight men aged 18 to 30 years (mean \pm SEM, 24.0 ± 0.9 years) with a body mass index between 21.3 and 24.9 kg/m² (22.9 ± 0.4 kg/m²) were initially enrolled in this study. Fifteen men completed experiments; two participants withdrew consent and were thus excluded from analysis. Exclusion criteria were history of any chronic medical condition or acute metabolic, cardiovascular, or neuropsychiatric illness; shift work; travel across time zones during the 4 weeks before enrollment; short habitual sleep (<6 hours per day); use of prescription drugs; smoking; elevated alcohol (>50 g per day) or caffeine (>300 mg per day) consumption; and abnormal findings on physical examination or routine laboratory testing (complete blood counts, comprehensive metabolic panel, thyroid function, lipid composition, and hemoglobin A1c).

On each in-laboratory visit, physical activity, sleep behavior, nutrition, and subjective feelings during the day before experimental visits were assessed by structured interview to ensure participants adhered to the above-mentioned criteria. Before experimental procedures, all participants spent one adaptation night at the sleep laboratory with overnight polysomnography to exclude sleep disorders and to familiarize them with experimental environment.

Per the Declaration of Helsinki, the ethical committee of the University of Lübeck approved the study protocol, and each participant provided written informed consent before the experiment.

Experimental protocol

After study inclusion, participants underwent three separate nights in the sleep laboratory with regular sleep duration (CON; 8 hours of sleep between 11:00 PM and 7:00 AM), sleep restriction (SR; 4 hours of sleep between 3:00 AM and 7:00 AM), and sleep deprivation (SD; no sleep at all) in randomized, balanced order (Fig. 1A). All experimental nights were spaced at least 2 weeks apart. In the week preceding the experimental nights, participants were asked to maintain a regular sleep schedule with a minimum of 7 hours of sleep per night.

On respective experimental nights, participants arrived at the research unit at 7:00 PM. An intravenous catheter was inserted into a vein of the participant's nondominant distal forearm to allow the drawing of blood samples. The first subcutaneous WAT biopsy specimen was taken at 9:00 PM (Fig. 1A); participants went to bed and had the light turned off at 10:30 PM during CON and at 2:30 AM during SR, respectively. In these both conditions, sleep was recorded by polysomnography (Nihon Kohden, Rosbach, Germany) each night. During the SD condition, participants were allowed to read and watch nonarousing movies in a sitting position, but brisk physical activities and food intake were not allowed. Participants were monitored by the investigator throughout the night. Light intensity in the laboratory was 300 lux. Recordings were scored offline in 30-second epochs by two independent researchers using standard criteria (11). In the morning (7:00 AM), a second subcutaneous WAT biopsy specimen was taken. During the experiment, caloric intake was strictly controlled, with one meal in the evening (8:00 PM; 820 kcal). Participants had to finish the whole meal within 20 minutes. Caffeinated beverages were not allowed. The dinner of 820 kcal at the

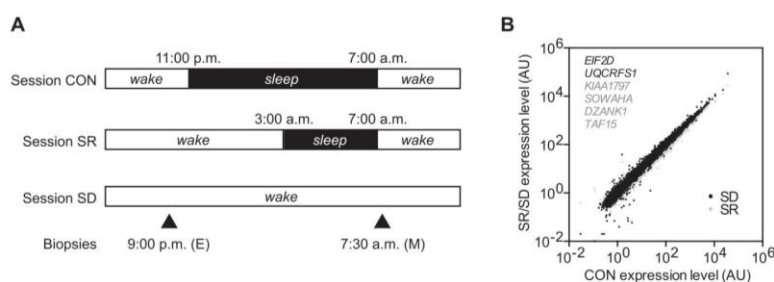


Figure 1. Study design and baseline transcriptome comparison. (A) Overview of the study design. Each volunteer participated in all three sessions (CON, SR, and SD). WAT biopsy sampling times are indicated by black triangles. (B) Comparison of subcutaneous WAT transcriptome expression levels in the evening sample between sleep conditions (black dots: SD vs CON comparison; gray dots: SR vs CON comparison). Differentially expressed genes (false discovery rate–corrected $P < 0.05$; $n = 15$ for SD and SR; $n = 14$ for CON) are listed in the lower right corner (same color code as for level comparisons). E, evening sample; M, morning sample.

beginning of each experimental visit should fulfill the daily energy requirement and, at the same time, ensured satiety at a similar level between conditions.

For technical reasons, data were not available in one participant for blood parameters/WAT parameters (only during CON) and in three participants for polysomnography.

Abdominal subcutaneous WAT biopsy

WAT biopsy specimens were taken within a 10-cm radius around the umbilicus. Each participant underwent two biopsies during each of the three experimental conditions, with alternating order of site/area to avoid potential effects of local inflammation. The area was wiped with povidone-iodine solution (Bode Chemie, Hamburg, Germany), disinfected with isopropyl alcohol, and anesthetized with lidocaine (AstraZeneca, Wedel, Germany). A 16-G needle was adapted to a 20-mL syringe and the piston compressed. One third of the needle was inserted into the subcutaneous fat, and the piston was maximally released. The needle was then rotated throughout the tissue in an up-down motion. Once the tissue was aspirated by the syringe, the needle was withdrawn and the piston removed. Biopsy samples were briefly washed with 0.9% NaCl, placed in RNAlater (Qiagen, Hilden, Germany) at 4°C and within 4 hours stored at -80°C until further use.

RNA isolation and sequencing

Fat tissue samples were briefly spun down and the supernatant removed. Total RNA was isolated by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. RNA quality was confirmed by BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, CA).

RNA-seq libraries and sequencing were performed at the Transcriptome and Genome Analysis Core Unit, University Medical Center Göttingen. Libraries were done by using the TruSeq RNA Library Preparation Kit, version 2, set A (48 samples, 12 indexes), RS-1222001 protocol from Illumina, starting with 200 ng of total RNA. Quality and integrity of RNA were assessed with the Fragment Analyzer (Advanced Analytical) by using the standard sensitivity RNA Analysis Kit (DNF-471). All samples selected for sequencing exhibited an RNA integrity number >8 . We optimized the ligation step by diluting the adapter concentration to increase ligation efficiency ($>94\%$), and we reduced the number of PCR cycles to avoid PCR duplication artifacts, as well as primer dimers in the final

library product. For accurate quantitation of cDNA libraries, a fluorometric-based system (QuantiFluor dsDNA System, Promega, Madison, WI) was used. The size of final cDNA libraries was determined by using the dsDNA 905 Reagent Kit (Fragment Analyzer, Advanced Bioanalytical, Ankeny, IA) exhibiting a sizing of 300 bp in average. Libraries were pooled and sequenced on a HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) generating 50-bp single-end reads (25 Mio reads/sample).

RNA-seq quality check and analysis

Sequence images were transformed with Illumina software (BaseCaller, Illumina, San Diego, CA) to BCL files (binary base call), which were demultiplexed to fastq files with bcl2fastq, version 2.17.1.14 (12). The quality check was done by using FastQC, version 0.11.5 (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK). Sequence alignments were performed using USCSC (University of California, Santa Cruz, CA) hg19 and Bowtie, version 2.1.0, followed by conversion and sorting (Samtools v0.1.19) and read counting (Htseq v0.5.4p3), and data were preprocessed and analyzed in the R/Bioconductor environment (13). After filtering the genes exceeding >20 counts for at least five samples, TMM (Trimmed Mean of M-values) normalization, estimation of dispersion, and testing for differentially expressed genes based on likelihood ratio test binominal data distribution were computed via EdgeR (14). Genes showing differential expression (false discovery rate–corrected $P < 0.05$) between morning and evening samples in the same sleep condition, were determined by paired testing using SAM (Significance Analysis of Microarrays), version 4.01 (15). Kyoto Encyclopedia of Genes & Genomes pathway analysis was performed using WebGestalt (16). Gene Ontology classifications were taken from the Gene Ontology database (17). In addition, expression profiles of relevant circadian core clock genes were analyzed by real-time quantitative PCR, and data were used to validate findings of RNA sequencing.

Glucose homeostasis, lipid profile, and adipokines

Glucose homeostasis was characterized by measurements of glucose, insulin, and C-peptide; homeostasis model assessments was calculated to assess β -cell function and insulin resistance (16). Triglycerides (TGs) and free fatty acids (FFAs) were measured as parameters of the lipid profile. With respect to observed transcriptional changes and available blood samplings, the following adipokines and cytokines were assessed:

resistin, retinol-binding protein (RBP4), and interleukin-8 (IL-8). Parameters of glucose homeostasis were assessed at 7:00 PM in the evening and under fasting conditions (7:00 AM) the following morning, whereas adipokines and cytokines were measured at 10:00 PM and 7:00 AM. Blood glucose [intra-assay coefficient of variation (Cvintra), 0.7%; interassay coefficient of variation (Cvinter), 1.3%], TG (CVintra, 0.7%; CVinter, 1.0%), and FFA (CVintra, 2.3%) were determined by photometry. Insulin and C-peptide concentrations were analyzed by electrochemiluminescence method (CVintra, 1.9% and 1.6%; CVinter, 2.6% and 2.4%). Resistin, RBP4, and IL-8 were assessed by immunoassay technique (CVintra, 4.7%, 6.9%, and 5.8%; Cvinter, 8.8%, 7.2%, and 7.7%)

Statistics

Analyses were performed with SPSS software, version 22.0 for Mac (IBM Inc., Chicago, IL) and Prism software, version 5 (GraphPad, La Jolla, CA). Data were analyzed by paired *t* tests for two-group comparisons and one- and two-way ANOVAs, respectively, followed by Bonferroni correction for multiple comparisons using Prism software. Analyses of body weight, polysomnography, and hormonal data were based on ANOVA, including the factors "condition" (for CON vs SR vs SD) and "time" (for repeated measurements during the experiment). A Helmert contrast test was used to explore a first-level vs subsequent levels (for CON vs SR + SD). A *P* value < 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. For transcriptome analyses, *P* values were adjusted for multiple testing using a false-discovery rate cutoff of 5%.

Results

Body weight and sleep

Body weight did not change significantly during the study (*P* = 0.934 for ANOVA main effect "time"). Data on sleep characteristics are summarized in Table 1. Total sleep duration was 468.4 ± 5.5 minutes under CON and 253.8 ± 10.0 minutes under SR (*P* < 0.001 for ANOVA

Table 1. Sleep Parameters

Variable	CON	SR	SD
Participants, n	12	12	12
Wake, min	11.7 ± 3.1	2.0 ± 1.5 ^a	480 ± 0
REM, min	61.0 ± 4.5	30.1 ± 4.7 ^b	—
N1, min	45.8 ± 6.8	8.6 ± 1.7 ^c	—
N2, min	256.0 ± 14.4	120.5 ± 9.9 ^c	—
N3, min	105.8 ± 10.1	94.7 ± 10.5	—
SWS latency, min ^d	16.3 ± 2.1	8.3 ± 1.5 ^b	—
REM latency, min ^d	134.3 ± 18.1	127.8 ± 5.5	—

All data are means ± SEM. N1–N3 = non-REM sleep stages 1 to 3; SWS = slow wave sleep.

^a*P* < 0.05 (for ANOVA main effect "condition").

^b*P* < 0.01 (for ANOVA main effect "condition").

^c*P* < 0.001 (for ANOVA main effect "condition").

^dTime elapsed between sleep onset and the time appearance of the first episode of corresponding sleep stage.

main effect "condition"). Except for sleep stage N3 (*P* = 0.194 for ANOVA main effect "condition"), absolute sleep times (rapid eye movement, N1, N2) were significantly reduced during SR (all *P* ≤ 0.01 for ANOVA main effect "condition"). After adjustment for total sleep time, REM sleep was similar between SR and CON (12.7% ± 0.9% vs 12.3% ± 2.1%; *P* = 0.878 for ANOVA main effect "condition"). However, during SR, non-REM sleep stages were shifted from N1 to deeper N3 stages (CON vs SR: 9.6% ± 1.4% vs 3.3% ± 20.6% for N1; 22.1% ± 2.2% vs 36.4% ± 3.6% for N3; both *P* ≤ 0.001 for ANOVA main effect "condition").

WAT Transcriptome regulation

To validate baseline comparability of respective conditions, WAT transcriptome profiles were compared for the evening samples (9:00 PM) between conditions (Fig. 1B). Overall, expression was highly conserved. Only four (SR) and two (SD) genes were found differentially expressed at baseline. Fold-change was below 1.5 for all these transcripts, indicating that experimental conditions were mostly similar across laboratory sessions at baseline.

We next compared time-of-day-dependent gene regulation between conditions. Under CON, 1186 transcripts were differentially expressed in the evening (9:00 PM) and in the morning (7:30 AM), with 76% of these genes upregulated in the morning (Fig. 2A). This number was dramatically reduced to only 71 under SR, with again ~77% upregulated in the morning. Even more pronounced, under SD only 42 genes showed time-of-day-dependent expression, of which only one gene was upregulated in the evening. Twelve transcripts showed stable and consistent morning-to-evening regulation across all conditions, whereas 42 transcripts showed time-of-day-dependent activation under at least two of the three conditions. Blunted morning-to-evening transcript regulation after sleep loss was mirrored by morning-to-evening expression ratios across sleep conditions. Under CON, two distinct peaks referring to evening (0.65 ± 0.001) and morning (2.00 ± 0.01) upregulated genes were detected in the morning-to-evening ratio (Fig. 2B). Under SR, both peaks were retained, but peaks appeared closer to one (0.77 ± 0.001 and 1.69 ± 0.03), indicating a general dampening, whereas more genes showed marked upregulation during the morning (*i.e.*, high morning-to-evening ratios). This trend was further pronounced under SD, where the evening peak of the distribution had completely vanished while the morning peak (1.95 ± 0.09) appeared broadened, indicating a general shift toward morning gene activation.

According to their stability in morning-evening regulation under different sleep conditions, we classified genes into three distinct classes (Fig. 2C).

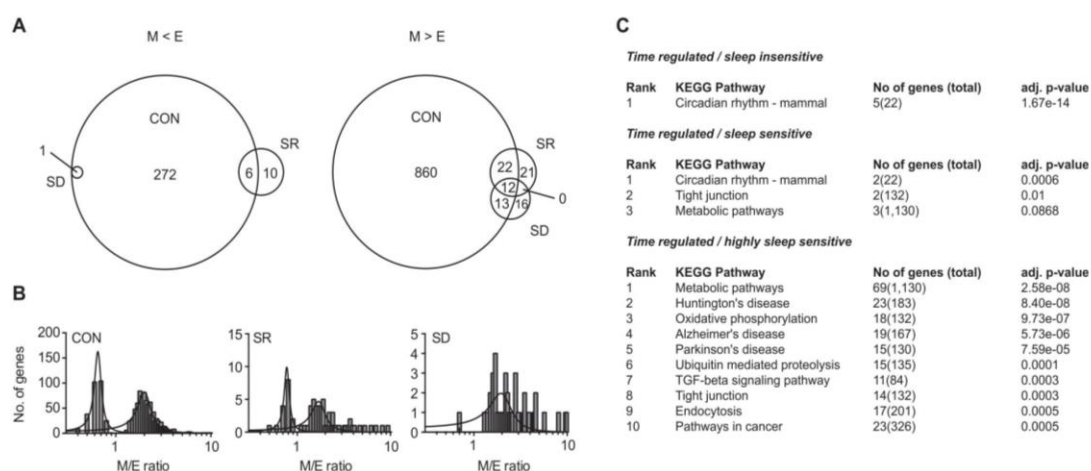


Figure 2. Global disruption of subcutaneous WAT diurnal transcriptome regulation after SR and SD, respectively. (A) Comparison of diurnally regulated genes [*i.e.*, genes showing differential expression at the two sampling time points, evening (E) and morning (M)] between the three sleep conditions. The left Venn diagram depicts numbers of genes with evening-elevated expression (*i.e.*, $M < E$), whereas the right shows numbers of genes with higher expression in the morning (*i.e.*, $M > E$). (B) Distribution of M/E expression ratios under different sleep conditions. Columns depict gene numbers; lines show Lorentzian curve fits for morning (M/E ratio > 1) and evening upregulated genes (M/E ratio < 1). (C) Kyoto Encyclopedia of Genes & Genomes (KEGG) pathway overrepresentation analysis of time-of-day- and sleep-regulated genes. Gene lists are provided in an online repository (17).

Time-regulated/sleep-insensitive genes were expressed as dependent of time of day but not the respective sleep condition. Time-regulated/sleep-sensitive genes were time of day dependently expressed only during conditions with at least some sleep (CON and SR), whereas time-regulated/highly sleep-sensitive genes were time of day dependently expressed only under conditions of regular sleep (CON). Analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes & Genomes pathway overrepresentation revealed that 5 of 12 sleep-insensitive genes were part of the central circadian clock machinery ($P = 1.7 \times 10^{-14}$). No other overrepresented pathway was found in this group. Two more clock genes ($P = 0.0006$) were listed in the sleep-sensitive group (overall, 42 genes), whereas other highly represented pathways included tight junction genes ($P = 0.01$) and genes involved in metabolic pathways ($P = 0.09$). In the highly sleep-sensitive group among the most overrepresented pathways, we found several genes of distinct relevance for adipose tissue physiology, such as metabolism (70 genes; $P = 2.6 \times 10^{-8}$), oxidative phosphorylation (18 genes; $P = 9.7 \times 10^{-7}$), and ubiquitin-mediated proteolysis (15 genes; $P = 0.0001$), suggesting a strong effect of sleep on the regulation of energy metabolism.

Clock genes regulation

All analyzed clock genes except *CLOCK* (Fig. 3A) showed morning-to-evening regulation under CON (Fig. 3B–3H). Whereas *BMAL1* was consistently upregulated in the evening (morning-to-evening ratio < 1 ; Fig. 3B), most other transcripts were higher expressed in the morning (morning-to-evening ratio > 1 ; Fig. 3C–3H).

Like *BMAL1*, *CRY1* expression was higher in the evening under CON conditions. Overall, a dampening of morning-to-evening regulation (*i.e.* morning-to-evening ratios tending toward 1) was observed for *BMAL1* ($P = 0.045$; CON *vs.* SD) and *PER1* ($P = 0.033$; CON *vs.* SD). Morning-to-evening regulation of *CRY1* was lost under SR and SD (Fig. 3C).

Regulation of adipose metabolism genes

To obtain an insight into how sleep restriction affects the morning-to-evening regulation of genes involved in adipose tissue energy metabolism, we analyzed sleep condition-dependent morning-to-evening regulation of genes associated with Gene Ontology classifications of major adipose tissue metabolic pathways (Fig. 4). Most genes associated with adipocyte metabolism did not show a morning-to-evening rhythm under all sleep conditions. However, up to 7% of genes associated with glycolysis, β -oxidation, lipolysis, and lipogenesis were both morning-to-evening and sleep regulated, indicating that the breakdown of energy equivalents for ATP production in adipose tissue is in parts sleep sensitive. Even more, up to 19% genes relevant for Krebs cycle and oxidative phosphorylation were regulated by time-of-day and sleep.

More detailed, morning-to-evening regulation of lipogenesis-associated genes was only preserved under CON and distinctly dampened under SR and SD (Fig. 5A). No consistent directional regulation was observed under CON and SR, while most transcripts during SD were upregulated toward the morning. Morning-to-evening regulated genes involved in lipolysis and

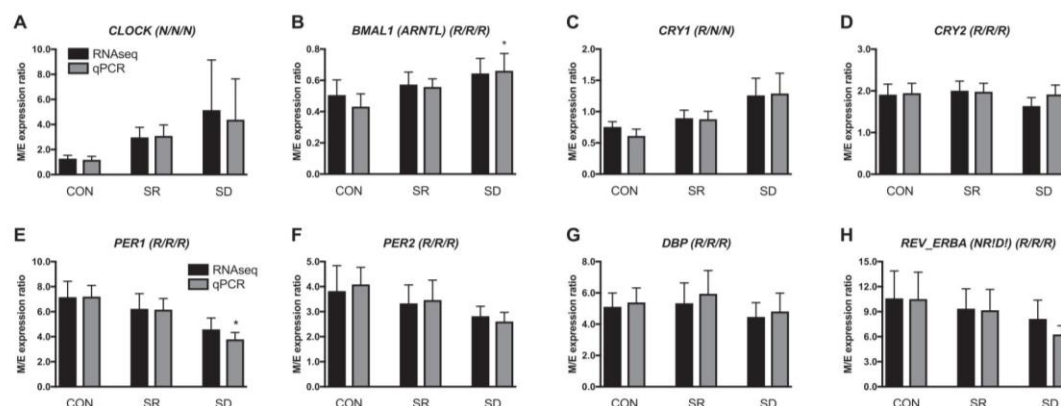


Figure 3. Clock gene expression and data validation. (A–H) Morning-to-evening (M/E) expression ratios for the core circadian clock genes *CLOCK* (A), *BMAL1* (B), *CRY1* (C), *CRY2* (D), *PER1* (E), *PER2* (F), *DBP* (G), and *REV-ERBA* (H) under different sleep conditions. Black bars depict RNA sequencing data. White bars show respective quantitative PCR (qPCR) validation on the same samples. Letters in parentheses depict statistical evaluation of morning-to-evening regulation: R, significant regulation; N, nonregulated. Data are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ compared with CON, two-way ANOVA with Bonferroni post-test ($n = 15$ for SD and SR; $n = 14$ for CON).

β -oxidation were largely unaffected by sleep curtailment (Fig. 5B). In contrast, genes involved in glucose catabolism showed consistent dampening of morning-to-evening regulation upon both sleep interventions (SR and SD, respectively). However, relative expression of these genes was increased during the morning implicating enhanced carbohydrate breakdown after a night of reduced or absent sleep (Fig. 5C).

With regard to gene expression of adipokines (Fig. 6), M/E-ratios were elevated under SR and SD for *RBP4* (*RBP4*), *RARRES2* (retinoic acid receptor responder 2, chemerin), and apelin (*APL*), respectively

(all $P < 0.05$). Further analysis revealed that the evening expression values of analyzed genes were comparable between the three conditions (all $P \geq 0.193$).

Glucose homeostasis, lipid profile, and adipokine and cytokine levels

Fasting C-peptide was reduced in the morning after sleep loss ($P = 0.002$ for ANOVA main effect “condition”), but this significant reduction was not seen for insulin ($P = 0.055$ for ANOVA main effect “condition”). Glucose did not differ between conditions ($P \geq 0.131$ for ANOVA main effect “condition”). This pattern indicates a reduced β -cell secretion capacity, as further confirmed by lower HOMA- $\% \beta$ ($P = 0.043$ for ANOVA main effect “condition”; Fig. 7A). HOMA-IR did not differ between conditions ($P = 0.066$ for ANOVA main effect “condition”). TGs and FFAs (both $P \geq 0.133$ for ANOVA main effect “condition”) were largely unaffected by sleep loss. *RBP4* tended to be elevated after sleep loss ($P = 0.070$ for ANOVA main effect “condition”) and in particular after SD ($P = 0.013$ for pairwise comparison CON vs SD). IL-8 and resistin remained unchanged (both $P \geq 0.490$ for ANOVA main effect “condition”; Fig. 7B).

Discussion

Here, we show that a single night of acute sleep reduction has profound effects on the morning-to-evening regulation of the WAT transcriptome in humans. Although circadian clock gene expression in WAT appears rather robust under sleep restriction conditions, the regulation of many transcripts involved in adipose energy metabolism

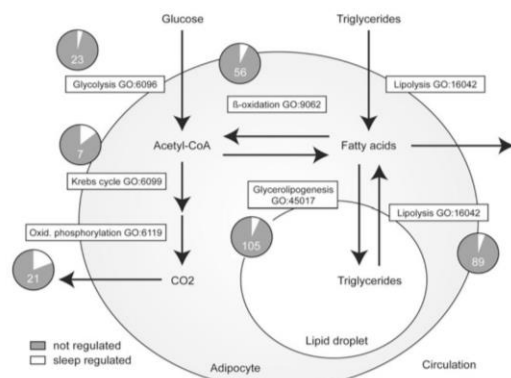


Figure 4. Different fractions of sleep sensitive genes involved in WAT energy metabolism pathways. Gene Ontology (GO) pathway analysis for sleep-regulated genes associated with major WAT energy metabolism pathways. GO pathway descriptions and IDs are provided in the white boxes. Pie charts depict fraction of GO pathway genes whose morning-to-evening expression is altered by sleep loss. Numbers depict actual sleep-regulated genes. Gene lists and a list of overlapping genes are provided in an online repository (17).

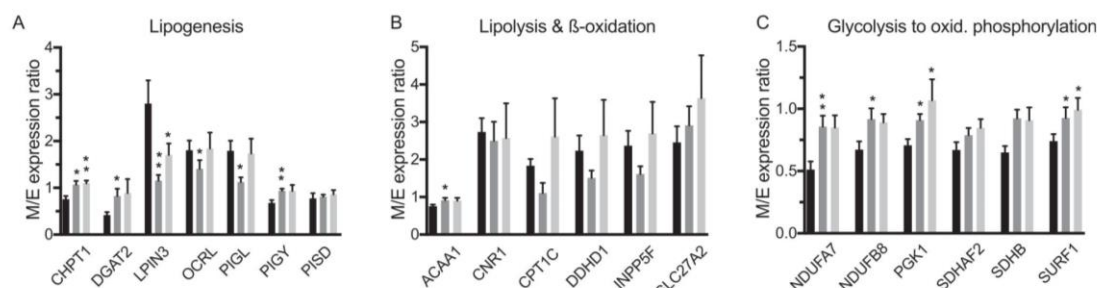


Figure 5. Sleep alters morning-to-evening regulation of WAT metabolism genes. (A–C) Morning-to-evening (M/E) expression ratios of genes associated with lipogenesis (A), lipolysis and β -oxidation (B), and glucose breakdown (C) under different sleep conditions (black columns, CON; dark gray columns, SR; light gray columns, SD). Data are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with CON, one-way ANOVA with Bonferroni post-test ($n = 15$ for SD and SR; $n = 14$ for CON). *ACAA1*, acetyl-CoA acyltransferase 1; *CHPT1*, choline phosphotransferase 1; *CNR1*, cannabinoid receptor 1 (brain); *CPT1C*, carnitine palmitoyltransferase 1C; *DDHD1*, DDHD domain containing 1; *DGAT2*, diacylglycerol *O*-acyltransferase 2. *INPP5F*, inositol polyphosphate-5-phosphatase F; *LPIN3*, lipin 3; *NDUFA7*, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex, 7, 14.5kDa; *NDUFB8*, NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 β subcomplex, 8, 19kDa; *OCR1L*, oculocerebrorenal syndrome of Lowe; *PGK1*, phosphoglycerate kinase 1; *PIGL*, phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y; *PIGY*, phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y; *PISD*, phosphatidylserine decarboxylase; *SLC27A2*, solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2; *SDHAF2*, succinate dehydrogenase complex assembly factor 2; *SDHB*, succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp); *SURF1*, surfactant protein 1.

becomes disrupted. This global transcriptional perturbation may represent a first step in the well-documented obesogenic effects of chronic sleep perturbation (4).

The circadian timing system coordinates 24-hour rhythms of physiology and behavior. At the molecular level, it is based on transcriptional-translational feedback loops of a set of clock genes/proteins that drive tissue-specific expression of transcriptional programs to control physiological rhythms (18, 19). Although

central circadian clocks determine the timing of sleep, little is known about how sleep disruption feeds back on cellular molecular oscillators (20, 21). In animal studies, perturbations of sleep phase disrupt peripheral clock function (7, 22) and data in humans suggest that this is conserved for human blood (8, 9). Here we show in humans that even short sleep interventions can profoundly disrupt the morning-to-evening regulation of gene expression in tissues of high metabolic relevance, such as WAT. Interestingly, this morning-to-evening disruption—as induced by short-term sleep restriction or sleep deprivation—was not mirrored at the level of clock genes, suggesting no profound role of local clocks in this process but a systemic mediation of sleep effects on the regulation of metabolism-associated transcription. However, we cannot completely rule out an influence of sleep on the SCN clock, especially of longer-lasting sleep deprivation regimens or even chronic sleep deprivation.

Our data show a higher *BMAL1* ratio under SD than CON. Under CON conditions, *BMAL1* shows an anti-phasic pattern compared with other clock genes characterized by the nadir in the early morning hours and high levels in the evening hours (23). Our findings of increased *BMAL1* morning-to-evening ratio contradict—at least in part—previous data in humans showing decreased *BMAL1* expression in the muscle after total sleep deprivation. However, we assessed gene expression in WAT, whereas Cedernes *et al.* (24) reported on morning expression profiles in skeletal muscle.

Animal studies have pointed at systemic signals, such as glucocorticoids or food intake, as potential mediators of sleep effects in peripheral tissues (19, 25). However,

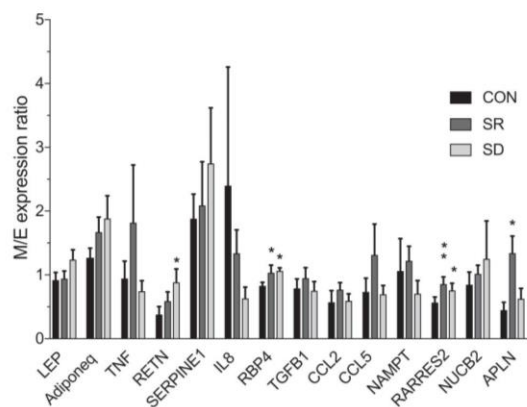


Figure 6. Regulation of adipokine gene expression. Data are represented as mean \pm SEM. Black columns, CON; dark gray columns, SR; light gray columns, SD. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with CON, one-way ANOVA with Bonferroni post-test ($n = 15$ for SD and SR; $n = 14$ for CON). *Adiponeq*, adiponectin, *C1Q*, and collagen domain containing; *APLN*, apelinCCL2, chemokine (C-C motif) ligand 2; *CCL5*, chemokine (C-C motif) ligand 5; *LEP*, leptin; *NAMPT*, nicotinamide phosphoribosyltransferase; *NUCB2*, nucleobindin 2; *RARRES2*, retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2; *RETN*, resistin; *SERPINE1*, serpin peptidase inhibitor, clade E.

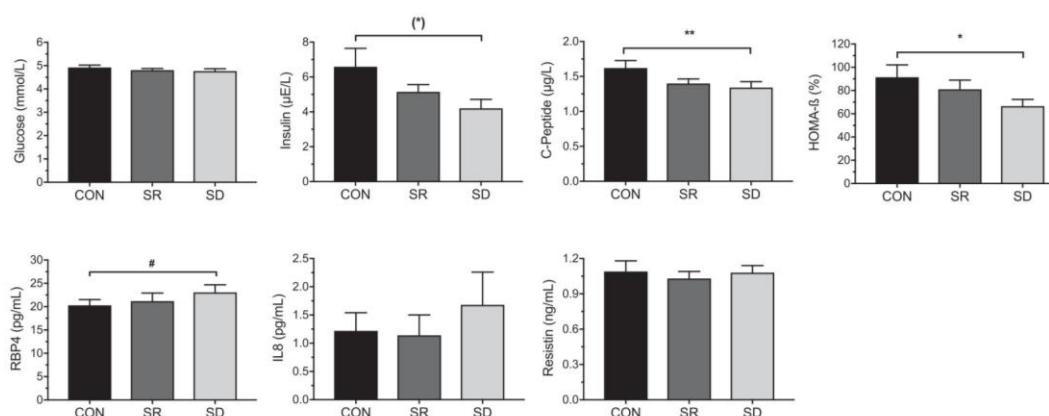


Figure 7. Sleep loss impairs glucose homeostasis and increases blood levels of RBP4, but not IL-8 and resistin. Data are represented as mean \pm SEM. Black columns, CON; dark gray columns, SR; light gray columns, SD. * $P < 0.05$ (for ANOVA main effect “condition”); ** $P < 0.01$ (for ANOVA main effect “condition”); # $P < 0.055$ (for ANOVA main effect “condition”; $n = 14$); * $P < 0.05$ (for pairwise comparison CON vs. SD; $n = 14$).

these factors are difficult to control in animal sleep experiments because animals must be forced by human intervention or enforced activity to stay awake; this, in turn, inevitably leads to some stress axis activation. Time-restricted feeding restores transcriptome rhythms in the liver of sleep-restricted rodents (7). There is evidence that time-restricted feeding induces differential changes in gene expression. Although rhythms of clock gene expression on a peripheral level were affected, the phase of cyclic gene expression in the SCN remained unaffected (25). In our study, participants remained absolutely weight stable across visits and participants were asked not to change their dietary habits across the study period. Clock gene expression was only moderately altered by the acute sleep curtailment, whereas metabolic pathways were changed. It tempting to speculate that sleep—like feeding—could also be able to induce differential changes on rhythms even after a short-term intervention.

Up to 19% of genes associated with energy turnover in WAT were morning-to-evening and sleep regulated. Among these genes were key regulators of lipogenesis, such as diacylglycerol *O*-acyltransferase 2 (*DGAT2*), and glucose catabolism, such as phosphoglycerate kinase 1 (*PGK1*). Together, our data suggest enhanced glucose breakdown and lipogenesis in the morning after a night with short or no sleep, respectively. Although it has to be shown to which extent this translates into an obesogenic effect under conditions of chronic sleep restriction, such molecular changes may represent the first symptoms precluding the physiological and appetite effects observed in several human sleep studies (4, 26).

Our data show effects of sleep loss on metabolic pathways, such as oxidative phosphorylation and carbohydrate metabolism. So far, no consistent data support the notion that sleep restriction shifts substrate use to

higher carbohydrate or less fat oxidation (27). On a physiological level, sleep deprivation as well as sleep restriction increases energy expenditure (27–29) in healthy humans. It is tempting to postulate a link between altered metabolic pathways enabling or compensating for increased energy expenditure.

We here show that on a physiological level, glucose homeostasis was disturbed, as characterized by reduced secretory β -cell capacity, one step in the development of type 2 diabetes mellitus—even after one night of shortened or no sleep. In line with the current study, it has been previously shown that two nights of sleep restriction with only 4 hours of sleep induce an insulin-resistant state in the human adipocyte together with a reduction of total body insulin sensitivity (30). Insulin sensitivity varies across the day, with lowest sensitivity in the evening and the night. WAT exhibits a robust circadian rhythm in insulin signaling, with maximum values at noon. This WAT inherent circadian rhythm may provide a mechanistic link for the diurnal rhythm of systemic insulin sensitivity. Moreover, the amplitude of these rhythm is associated with self-reported sleep duration (31).

Furthermore, the increased mRNA expression of RBP4 in white adipose tissue after sleep loss was mirrored by its elevated blood levels, and in particular in the absence of sleep. Because RBP4 is linked to inflammation and metabolic syndrome (27), this finding underpins the adverse effects (4) of sleep loss. However, the detrimental effect of one night of short sleep might not be strong enough to induce a significant increase in RBP4, as seen after SD. On the other hand, resistin, IL-8 and lipid profile parameters (FFA and TG) remained unchanged after sleep loss, indicating that glucose homeostasis, adipokines, and lipid profile respond differently to one night of sleep loss under experimental conditions.

The regulation of clock genes (*CRY1*) and adipose metabolism genes was partly affected by both SR and SD but was more pronounced after SD. We also found a consistent change in gene expression of adipokines—as indicated by elevated morning-to-evening ratios—for *RBP4*, *RARRES2*, and *apelin* after both SR and SD. On a physiological level, however, circulating RBP4 was elevated only after SD, not after SR. In total, we assume a dose-dependent effect of sleep curtailment, even after one night.

Because of the limited total number of biopsy specimens obtainable from each participant (two adipose biopsy specimens per condition), the current study design does not permit the assessment of diurnal or time-of-day rhythms. We cannot exclude that clock gene expression could be perturbed at other times of day (e.g., in the afternoon). We also cannot clearly distinguish between sleep and circadian influence on the WAT transcriptome because this would require a forced desynchronization protocol (32). Although we identified >1000 diurnally expressed genes with this setup, circadian transcriptome studies in mice suggest that even more rhythmic genes might be found under more frequent sampling conditions (33). In human studies, however, frequent WAT biopsy sampling is difficult and modeling approaches may help to overcome some of these limitations (34).

As discussed before, participants of our study were not allowed to follow a diet or to change their dietary habits between visits. Given the stable body weight displayed across visits, altered nutrient intake as confounding factor for the observed alterations in transcriptome rhythms remains unlikely. However, we cannot completely exclude an influence of nutrition on our outcomes. Our study has several further limitations. This study was in young, normal-weight healthy men. Therefore, findings cannot be transferred to a more diverse population, such as obese participants or shift workers.

The findings of our study implicate several future experiments in healthy individuals, as well as in patients with sleep disorders, including assessment of direct effects of sleep loss on diurnal metabolic regulation and long-term transcriptional effects of sleep curtailment. Further analysis of diurnal gene expression may help to identify molecular biomarkers of sleep disruption and might allow risk prediction for metabolic disease, such as diabetes and obesity, at a very early stage. In the long run, the encouragement and optimization of sleep duration and timing might be an important and affordable prevention strategy against metabolic disorders.

Acknowledgments

Financial Support: This work was supported by grants of the German Research Foundation to H.L., H.O., and S.M.S. (GRK

1957, TR-SFB 134 & TR-SFB 654). H.O. is a Lichtenberg Fellow of the Volkswagen Foundation. R.C. received support from the Chilean National Commission for Scientific and Technological Research (BECASCHILE 74170072).

Author Contributions: H.L., H.O., and S.M.S. conceived the study design. E.M.L. and R.C. collected the data. B.W., E.M.L., M.M., R.C., C.P., G.S.R., and H.O., analyzed the data. B.W., H.L., H.O., and S.M.S. interpreted the data. B.W. and E.M.L. performed the literature review. All authors were involved in writing and reviewing the paper and had final approval of the submitted and published versions. H.O. and S.M.S. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. **Correspondence and Reprint Requests:** Britta Wilms, PhD, Department of Internal Medicine I, University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, 23538 Lübeck, Germany. E-mail: britta.wilms@uni-luebeck.de.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Ford ES, Cunningham TJ, Croft JB. Trends in self-reported sleep duration among US adults from 1985 to 2012. *Sleep (Basel)*. 2015; 38(5):829–832.
2. Kivimäki M, Batty GD, Hublin C. Shift work as a risk factor for future type 2 diabetes: evidence, mechanisms, implications, and future research directions. *PLoS Med*. 2011;8(12):e1001138.
3. Williams EP, Mesidor M, Winters K, Dubbert PM, Wyatt SB. Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Curr Obes Rep*. 2015;4(3):363–370.
4. Schmid SM, Hallschmid M, Schultes B. The metabolic burden of sleep loss. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(1):52–62.
5. Gangwisch JE. Epidemiological evidence for the links between sleep, circadian rhythms and metabolism. *Obes Rev*. 2009;10 (Suppl 2):37–45.
6. Archer SN, Oster H. How sleep and wakefulness influence circadian rhythmicity: effects of insufficient and mistimed sleep on the animal and human transcriptome. *J Sleep Res*. 2015;24(5):476–493.
7. Barclay JL, Husse J, Bode B, Naujokat N, Meyer-Kovac J, Schmid SM, Lehnert H, Oster H. Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37150.
8. Möller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, Lo JCY, Santhi N, von Schantz M, Smith CP, Dijk D-J. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(12):E1132–E1141.
9. Archer SN, Laing EE, Möller-Levet CS, van der Veen DR, Bucca G, Lazar AS, Santhi N, Slak A, Kabiljo R, von Schantz M, Smith CP, Dijk D-J. Mistimed sleep disrupts circadian regulation of the human transcriptome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(6):E682–E691.
10. Kim S, Lee H-S, Park H-K, Linton JA, Lee J-W, Lee H. Visceral adiposity and expression of clock genes in peripheral blood mononuclear cells: A pilot study. *Chronobiol Int*. 2017;34(8): 1057–1066.
11. Ancoli-Israel S, Chesson A, Quan S. *The AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Rules, Terminology, and Technical Specifications*. Westchester, IL: American Academy of Sleep Medicine; 2007.
12. Dodt M, Roehr JT, Ahmed R, Dieterich C. FLEXBAR-flexible barcode and adapter processing for next-generation sequencing platforms. *Biology (Basel)*. 2012;1(3):895–905.

13. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JYH, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
14. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(10):4288–4297.
15. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98(9):5116–5121.
16. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–419.
17. Wilms B, Leineweber EM, Mölle M, Chamorro R, Pommerenke C, Salinas-Riester G, Sina C, Lehnert H, Oster H, Schmid SM. Data from: Sleep loss disrupts morning-to-evening differences in human white adipose tissue transcriptome. Mendeley 2018. Deposited 11 July 2018. <https://data.mendeley.com/datasets/g2xmf3cpy2/draft? a=2f083974-bd8b-4143-bde0-9bc1a1762c2b>.
18. Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet.* 2008;9(10):764–775.
19. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci.* 2012;35(1):445–462.
20. Landgraf D, Shostak A, Oster H. Clock genes and sleep. *Pflugers Arch.* 2012;463(1):3–14.
21. Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature.* 2005;437(7063):1257–1263.
22. Salgado-Delgado RC, Saderi N, Basualdo M del C, Guerrero-Vargas NN, Escobar C, Buijs RM. Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *PLoS One.* 2013;8(4):e60052.
23. Otway DT, Mantele S, Bretschneider S, Wright J, Trayhurn P, Skene DJ, Robertson MD, Johnston JD. Rhythmic diurnal gene expression in human adipose tissue from individuals who are lean, overweight, and type 2 diabetic. *Diabetes.* 2011;60(5):1577–1581.
24. Cedernaes J, Osler ME, Voisin S, Broman J-E, Vogel H, Dickson SL, Zierath JR, Schiöth HB, Benedict C. Acute sleep loss induces tissue-specific epigenetic and transcriptional alterations to circadian clock genes in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(9):E1255–E1261.
25. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Web Server issue):W741–748.
26. Cedernaes J, Schiöth HB, Benedict C. Determinants of shortened, disrupted, and mistimed sleep and associated metabolic health consequences in healthy humans. *Diabetes.* 2015;64(4):1073–1080.
27. Shechter A, Rising R, Albu JB, St-Onge M-P. Experimental sleep curtailment causes wake-dependent increases in 24-h energy expenditure as measured by whole-room indirect calorimetry. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(6):1433–1439.
28. Jung CM, Melanson EL, Frydendall EJ, Perreault L, Eckel RH, Wright KP. Energy expenditure during sleep, sleep deprivation and sleep following sleep deprivation in adult humans. *J Physiol.* 2011;589(Pt 1):235–244.
29. Markwald RR, Melanson EL, Smith MR, Higgins J, Perreault L, Eckel RH, Wright KP Jr. Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(14):5695–5700.
30. Broussard JL, Ehrmann DA, Van Cauter E, Tasali E, Brady MJ. Impaired insulin signaling in human adipocytes after experimental sleep restriction: a randomized, crossover study. *Ann Intern Med.* 2012;157(8):549–557.
31. Carrasco-Benso MP, Rivero-Gutierrez B, Lopez-Minguez J, Anzola A, Diez-Noguera A, Madrid JA, Lujan JA, Martínez-Augustín O, Scheer FAJL, Garaulet M. Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *FASEB J.* 2016;30(9):3117–3123.
32. Casiraghi LP, Oda GA, Chiesa JJ, Friesen WO, Golombek DA. Forced desynchronization of activity rhythms in a model of chronic jet lag in mice. *J Biol Rhythms.* 2012;27(1):59–69.
33. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(45):16219–16224.
34. Pivovarov O, Jürchott K, Rudovich N, Hornemann S, Ye L, Möckel S, Murahovschi V, Kessler K, Seltmann A-C, Maser-Gluth C, Mazuch J, Kruse M, Busjahn A, Kramer A, Pfeiffer AFH. Changes of dietary fat and carbohydrate content alter central and peripheral clock in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(6):2291–2302.

11. Lebenslauf



Daten

Name	Elena Maria Leineweber
Geburtsdatum	14.12.1988
Geburtsort	Münster

Ausbildung

Seit 08/2021	Fachärztin in Schwerpunktweiterbildung für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin am Hormon – und Kinderwunschzentrum der Uniklinik Bonn unter Leitung von Prof. Dr. N. Sänger und
Seit 05/2021	in der Praxis Dres. Leineweber, Lippstadt
05/2021	Prüfung und Ernennung zur Fachärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe
07/2019 - 04/2021	Assistenzärztin im Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe in der Praxis Dres. Leineweber, Lippstadt und
01/2018 - 04/2021	in der Frauenklinik des Marienkrankenhauses Hamburg
04/2016 - 12/2017	Assistenzärztin im Fachbereich Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik des Elisabeth Krankenhauses Essen
12/2015	Approbation als Ärztin
11/2015	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
11/2014 - 10/2015	Praktisches Jahr am Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf
10/2014	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Universität zu Lübeck
10/2009 - 09/2014	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
08/2008 - 08/2009	Ausbildung zur Rettungssanitäterin mit folgender Anstellung, ASB JUH DRK GmbH Bielefeld
2008	Allgemeine Hochschulreife, Gymnasium Marienschule, Lippstadt

Wissenschaftliche Arbeit

- 06/2017 Kongressvortrag: "Disruption of Circadian White Adipose Tissue Transcriptome and Metabolic Consequences after Experimental Sleep Restriction in Humans" und Reisestipendium, American Diabetes Association 77th Scientific Sessions, San Diego, CA, United States of America
- 03/2017 Posterpreis: "Disruption of Circadian White Adipose Tissue Transcriptome and Metabolic Consequences after Experimental Sleep Restriction in Humans", Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Würzburg
- 11/2016 Kurzvortrag: „Kurzfristiger Schlafentzug moduliert zirkadiane Rhythmen stoffwechselassoziierter Gene im subkutanen Fettgewebe“, Jahrestagung der Sektion Neuroendokrinologie der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Lübeck
- 04/2014 Poster: „Glukosetoleranz und Sättigungspotenzial einer Standardmahlzeit in Abhängigkeit der Tageszeit“, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, Wiesbaden
- Seit 2013 Klinisch- Experimentelle Schlafstudie zur Dissertation, Thema: „Der Einfluss kurzfristigen Schlafentzugs auf zirkadiane Rhythmen stoffwechselassoziierter Gene im subkutanen Fettgewebe“, Institut für Endokrinologie der Universität Lübeck

Mitgliedschaften

- Seit 03/2021 Deutsche Gesellschaft für Ultraschall in der Medizin (DEGUM)
- Seit 2012 Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (DGE)
- 10/2012 - 10/2015 Vorstandsmitglied Young Active Research in Endocrinology (YARE)
- 03/2011 - 10/2014 Teilnahme am Präventionsprojekt „Mit Sicherheit Verliebt“, (Ein bundesweites Präventionsprojekt der Bundesvertretung der Medizinstudenten in Deutschland)

Auslandsaufenthalte

- 09 - 10/2013 Famulatur in der Abteilung für Endokrinologie, Addenbrooke's University Hospital, Cambridge, United Kingdom
- 2005 - 2006 Queen Ethelburga's College, York, United Kingdom