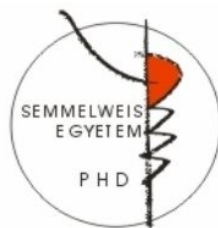


# A cirkadián óra szerepe humán neutrofil granulociták működésének szabályozásában

Doktori tézisek

**Ella Krisztina**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Káldi Krisztina, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy András Dávid, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Cervenak László, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buday László, az MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sármay Gabriella, az MTA doktora, egyetemi tanár

Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2016



## BEVEZETÉS

A cirkadián ritmus a különböző környezeti tényezők ciklusos változásához igazítja az életműködéseket, így segíti a szervezet környezethez való alkalmazkodását. A közelítőleg 24 órás periódushosszt diktáló biológiai időmérő rendszer egy transzkripciós-transzlációs visszacsatoláson alapuló endogén oszcillátor, melyet cirkadián órának nevezünk. A központi óra a suprachiasmaticus magban található, amely szinkronizálni képes a perifériás sejtekben működő órákat. Az emlős oszcillátor negatív komponensei a CRYPTOCHROM (CRY) és a PERIOD (PER) fehérjék. Génjeik átíródását a pozitív faktor szerepét betöltő CLOCK és BMAL1 fehérjékből álló transzkripciós faktor komplex serkenti. Amennyiben a PER és CRY alkotta komplex kellően magas koncentrációt ér el a magban, gátolja a CLOCK-BMAL1 aktivitását. A megszintetizálódott PER és CRY egy érési folyamaton megy keresztül, aminek nyomán a mennyiségük folyamatosan csökken. Ezt követően a CLOCK-BMAL1-komplex felszabadul a gátlás alól és egy újabb ciklus veszi kezdetét. Emellett több másik szabályozó visszacsatolás is működik az oszcillátorban: a pozitív faktor komplex serkenti különböző magreceptorok, mint a REV-ERB (REV-ERB $\alpha/\beta$ ) vagy ROR

(retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor, ROR $\alpha/\beta/\gamma$ ) fehérjék kifejeződését. Ezek közvetlenül hatnak vissza a *Bmal1* expresszióra: a REV-ERB gátló, a ROR serkentő módon. A BMAL1-CLOCK transzkripciós faktor komplex ilyen módon létrejövő 24 órás oszcilláló aktivitása közvetetten vagy közvetve számos gén ritmikus kifejeződését vezérli, ezek az úgynevezett óra által kontrollált gének. Microarray adatok alapján az egyes szövetekben körülbelül a gének 10%-ának expresszióját irányítja a cirkadián órarendszer.

Az óraféhrjék poszttranszlációs módosulásai a fehérjék stabilitását és sejten belüli lokalizációját alapvetően befolyásoló tényezők, így a ritmus amplitúdójára és periódushosszára egyaránt hatással vannak. Emiatt a különböző kinázok (pl. kazein kináz (CK)  $\delta/\epsilon$ , glikogén szintáz kináz (GSK)  $3\beta$ ) és foszfatázok (pl. protein foszfatáz 1 és 5) is fontos komponensei a molekuláris órának.

Számos adat támasztja alá a cirkadián szabályozás és az immunrendszer működése közötti kapcsolatot. Amellett, hogy az óra részt vesz a leukocita *trafficking* (irányított vándorlás) szabályozásában, befolyással van a különböző gyulladásoz folyamatokra, és szerepe van az immunsejtek (pl. B-sejtek, T<sub>h</sub>17 sejtek) érésében is. Emellett több hemopoetikus eredetű

sejtben (pl. makrofágok, eozinofil granulociták, T- és B-limfociták, dendritikus sejtek, NK sejtek és monociták) működő molekuláris oszcillátor jelenlétét bizonyították, mely a sejtfunkciók széles skáláját befolyásolhatja, bár ezekről eddig igen hiányosak az ismereteink.

A neutrofil granulociták a vérben legnagyobb arányban található leukociták, szerepük a bakteriális és gombás fertőzésekkel szembeni védekezésben esszenciális. Sejtfelszíni receptoraik segítségével felismerik és megkötik a kórokozókat és bekebelezik azokat. Az így képződött fagoszómákban különböző lítikus enzimek és reaktív oxigén intermedierek segítségével megindul a mikróbák lebontása. A neutrofil granulociták csökkent működése súlyos fertőzésekhez vezet, míg túlzott aktivitásuk különböző autoimmun és gyulladásos betegségek kialakulásához járulhat hozzá. Bár a neutrofil granulociták válaszkészségében több tanulmány szerint is napi ritmus mutatkozik, az ennek háttérében álló mechanizmusokról keveset tudunk. A sejtek ritmikus működésének megértése alapvető fontosságú a különböző gyulladásos folyamatok patomechanizmusának megismeréséhez és megfelelő kronoterápia tervezéséhez.

## CÉLKITŰZÉS

Kísérleteink során humán neutrofil granulociták cirkadián óra általi szabályozásának vizsgálatát tűztük ki célul. Donoraink kiválasztásánál alapvető szempont volt, hogy napi ritmusuk szerint egységes populációt képezzenek, ezért a vizsgálatok megkezdése előtt a donorok kronotípusának (alvási középido szabandapokon) meghatározására is megfelelő módszert kellett találnunk. Ezek alapján munkánk kezdetekor a következő célkitűzéseket tettük:

1. A kronotípus meghatározására alkalmas kérdőívet (Munich Chronotype Questionnaire, MCTQ) magyarra fordítjuk és validáljuk.
2. Meghatározzuk humán neutrofil granulociták óragén expressziós profilját és összehasonlítjuk azt a mononukleáris sejtekével.
3. Vizsgáljuk a neutrofil sejtekben az órakomponensek kifejeződését fehérje szinten.
4. Megvizsgáljuk, hogy a neutrofil granulociták szisztémás szintű szabályozásának van-e szerepe a sejtműködés napi ritmusának regulációjában.
5. Különböző napszakokban összehasonlítjuk a neutrofil sejtek válaszkészségét (szuperoxid termelés, fagocitózis készség).

## MÓDSZEREK

### **A Munich Chronotype Questionnaire magyar változatának validálása**

Vizsgálatainkhoz a donorok kronotipizálását az MCTQ kérdőív segítségével végeztük. Az eredeti angol nyelvű kérdőívet magyarra fordítottuk, majd a validálás részeként angolra fordítottuk vissza egy szakfordítóval. Ezután a Semmelweis Egyetem Általános Orvos, Fogorvos és Gyógyszerésztudományi karán élettant tanuló 780 egyetemi hallgató bevonásával teszteltük a kérdőívet. A kísérletsorozatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (etikai engedélyek száma: 87/2010 és 154/2011).

### **A donorok kiválasztása és a kísérletek menete a leukociták óraműködésének vizsgálatához**

A kísérletek során vénás vért vettünk egészséges, önkéntes donoroktól (20-35 éves férfiak és nők). A donorok szabályos munkabeosztással és alvás-ébrenléti mintázattal rendelkeztek. Kizáró tényező volt, ha a jelentkező extrém kronotípusú volt, krónikus vagy akut betegségben szenvedett, váltott műszakban dolgozott vagy jetlag-nek volt kitéve a

kísérletet megelőző egy hónapban, illetve rendszeresen szedett gyógyszert. A vérmintákat 10, 13, 16, 19, 22, 1, 4 és 7 órakor vettük. Az esti vérvételek (22 óra után) alacsony fényintenzitás mellett zajlottak, a donorok lehetséges legminimálisabb zavarásával. A kísérletsorozatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (etikai engedélyek száma: #10895-0/2011-EKU és 1563/2015).

### **Leukociták izolálása vénás vérből**

A vérmintákat Na-citrátot tartalmazó Vacutainer® CPT™ csövekbe (Beckton-Dickinson) vettük. A mononukleáris és neutrofil sejtfrakciókat ficoll grádiens segítségével különítettük el. A sejtek izolálása után a mintákban lévő vörösvérsejteket ozmotikus lízis révén elimináltuk. A minták tisztaságát metilénkéssel való magfestéssel ellenőriztük, a minták tisztasága  $\geq 97\%$  volt.

### **A plazma kortizol koncentráció mérése**

A plazma kortizol koncentráció meghatározását elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche) segítségével végezték a Semmelweis Egyetem Izotóp laborjának munkatársai, a gyártó által javasolt protokoll szerint.



## **Génexpresszió vizsgálata valós idejű PCR segítségével**

A sejteket Tripure® reagens (Roche) segítségével lizáltuk, majd totál RNS-t preparáltunk. A minták DNáz kezelése után a cDNS szintézist a QuantiTect® reverz transzkripció kit (Quiagen), illetve a RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) használatával végeztük. A *Bmal*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Itgb2*, *Gp91<sup>phox</sup>*, *Cxcr4* és *β-aktin* gének relatív expresszióját a LightCycler® 480 rendszer (Roche) használatával mértük TaqMan hidrolízis próbák alkalmazásával, *Gapdh* expresszióhoz viszonyítva. Az adatok értékeléséhez a „második derivált maximuma” módszert alkalmaztuk, az analízist a LightCycler® Relative Quantification Software (Roche) használatával végeztük.

## **PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányba történő differenciálása**

A PLB-985 sejteket  $2 \times 10^5$  sejt/ml kiindulási sejt­sűrűség mellett 1,25% DMSO-val kezeltük RPMI 1640 médiumban, amely tartalmazott még L-glutamint (0,3 g/l), 10% hőinaktivált borjú szérumot (FBS), 50 unit/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint. A sejteket 4 napon keresztül tartottuk kultúrában 37°C-on 5% CO<sub>2</sub> jelenléte mellett.

## **Western blot analízis**

A neutrofil granulociták izolálását követően az intakt sejteket előmelegített (95°C) 2x-es redukáló Laemmli mintapufferben szuszpendáltuk, majd 95°C-on 10 percig inkubáltuk. A PLB-985 sejtekből teljes sejt lizátumot készítettünk, melyet 2x-es redukáló Laemmli puffer hozzáadása után 5 percig 95 °C-on inkubáltunk. A defoszforiláció vizsgálatához a mononukleáris sejtekből készült teljes sejt lizátumot CIP (Calf Intestinal Phosphatase) alkalikus foszfatázzal (New England Biolabs) kezeltük. A fehérjéket 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk. Az immundetektáláshoz anti-BMAL1 poliklonális ellenanyagot (1:500 arányú hígításban 5% tejpport tartalmazó TBS oldatban), anti-PER2 poliklonális ellenanyagot (1:200 arányú hígításban 5% tejpport tartalmazó TBS pufferben), illetve anti- $\beta$ -AKTIN monoklonális ellenanyagot (Sigma-Aldrich) (1:10000 arányú hígításban 5% tejpport tartalmazó TBS pufferben) használtunk.

## **Leukociták immunfluoreszcens festése**

A sejteket fedőlemezre centrifugáltuk, majd 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk. A mintákat permeabilizálás után 30 percig blokkoló oldatban tartottuk szobahőmérsékleten, majd anti-BMAL1 poliklonális antitesttel

(1:100 arányú hígításban blokkoló oldatban), illetve izotípus kontroll antitesttel (nyúl IgG 1:100 arányú hígításban blokkoló oldatban) inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. A mintákat ToPro®-3 Jodid (Life Technologies) magfestékkel (1:1000 arányú hígításban) is jelöltük. A festődést Zeiss LSM710 lézer-scanning mikroszkóppal vizsgáltuk 63×/1.40 oil DIC M27 immerziós objektív használatával (Plan-Apochromat, Zeiss). A képeket a ZEN 2011 SP2 black edition (Zeiss) szoftver használatával készítettük. A fluoreszcencia intenzitások méréséhez az ImageJ 1.48v szoftvert (NIH, USA) használtuk.

### **Neutrofil granulociták kezelése kortizollal**

Az izolált neutrofil granulocitákat 50 unit/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint tartalmazó szérummentes RPMI 1640 médiumban inkubáltuk. 60 percen keresztül 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében. Ezután 300 ng/ml kortizolt (Sigma-Aldrich) vagy vehikulumot adtunk a sejtekhez és 60 percig inkubáltuk őket.

### **A neutrofil granulociták oldalirányú fényszórásának (SSC) mérése**

A sejteket 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk és 4°C-on tároltuk. Az oldalirányú fényszórást Beckman Coulter Cell Lab

Quanta SC áramlási citométerrel mértük. Az adatokat WinMDI 2.9 szoftverrel (Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette) analizáltuk.

### **Perifériás vérminták hisztológiai festése**

Ujjbegyből vett vérből kenetet készítettünk, majd May-Grünwald/Giemsa (Sigma-Aldrich) festést végeztünk. Mintánként 100 sejtet számoltunk meg Meander-vonal mentén és a sejtmag szegmentáltsága alapján megállapítottuk, hogy milyen a fejlődési alakok százalékos megoszlása.

### **A plazma CXCL12 koncentrációjának meghatározása**

A CXCL12 koncentráció meghatározását a Human SDF-1 alpha ELISA Immunoassay (R&D Systems) segítségével végeztük, a gyártó által javasolt protokoll szerint.

### **Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének mérése**

A neutrofil granulociták szuperoxid termelésének követésére kemilumineszcens módszert alkalmaztunk. A szuperoxid termelést kevert humán savóval opsonizált zimozán hozzáadásával stimuláltuk. A lumineszcencia intenzitását 37 °C-on 30 percig követtük Mithras LB 940 Multilabel Reader (Berthold Technologies) készülékben.

## **Neutrofil granulociták fagocitózis készségének meghatározása**

A neutrofil granulociták fagocitózis készségének mérésekor kevert humán savóval opsonizált GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus*-t használtunk. A sejteket és a baktériumokat 1:100 arányban kevertük össze, majd fedőlemezre centrifugáltuk őket. Ez után 37°C-on 10 percig inkubáltuk a lemezeket 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében. A mintákat fixálás után Zeiss LSM710 lézer-scanning mikroszkóppal 63×/1.40 oil DIC M27 immerziós objektívet használva vizsgáltuk (Plan-Apochromat, Zeiss). A képeket a ZEN 2011 SP2 black edition (Zeiss) szoftver segítségével készítettük.

## **Statisztikai analízis**

A statisztikai analízishez a SigmaPlot 11.0 szoftvert használtuk. Az értékeket t-próbával és varianciaanalízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze. A post hoc összehasonlítások során a Tukey-tesztet, valamint a Bonferroni-próbát alkalmaztuk. A 24 órás adatsorok ritmus analíziséhez a Time Series Analysis – Single Cosinor v6.2 Software-t (Expert Soft Technologie) használtuk, és 24 órás periódushosszú cosinus görbét illesztettünk az adatsorokra. A különbségeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## EREDMÉNYEK

### **A Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) magyarra fordítása és validálása**

A fény az egyik legfontosabb szabályozó a cirkadián ritmus szempontjából, így nem meglepő, hogy a kronotípus szoros korrelációt mutat a napfelkelte időpontjával és a földrajzi szélességgel. Roenneberg és munkatársai által 2007-ben publikált adatokat felhasználva a közép-európai időzónában mérhető kronotípus-földrajzi szélesség összefüggésről megvizsgáltuk, hogy az általunk mért alvási középido értékek illeszkednek-e a bemutatott összefüggés egyenesére. Mivel adataink illeszkednek az egyenesre, és az MCTQ magyar változatával az irodalmi adatok reprodukálhatóak, a kérdőívet validálnak tekintettük.

### **Neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek óragén expressziójának összehasonlítása**

Vizsgálataink során különböző óragén expressziós mintázatot találtunk mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban. A mononukleáris sejtek esetében a *Per1*, a *Per2*, a *Per3* és a *Dbp* expresszió az irodalomban korábban leírtaknak megfelelő fázisban és amplitúdóval oszcillált. Ezzel

szemben a neutrofil granulocitáknál a *Per1*, a *Dbp* és a *Reverba* esetében tapasztaltunk alacsony amplitúdójú oszcillációt. Az órakomponensek *Bmal1* expresszióhoz viszonyított arányának vizsgálatokor a *Per1* expresszió nagyon hasonló volt a két sejtfrakcióban, azonban a *Per2*, a *Per3*, a *Dbp* és a *Reverba* aránya alacsonyabb volt a neutrofil granulocitákban.

### **Neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek PER2 és BMAL1 fehérje expressziójának összehasonlítása**

Az órafahérjék kifejeződésének vizsgálatokor a mononukleáris sejtekben minden vizsgált időpontban detektálható volt a PER2 fehérje, a neutrofil mintákban azonban nem volt kimutatható. A mononukleáris sejtekben a BMAL1 expressziója emelkedett a nap folyamán, ezzel szemben a neutrofil granulocitákban nem volt napi ingadozás a fehérje kifejeződésében. Továbbá, míg a mononukleáris frakcióban két különböző elektroforetikus mobilitású fehérje forma jelent meg, a neutrofil granulocitáknál csak a magasabb elektroforetikus mobilitású BMAL1 frakció volt detektálható. A mononukleáris sejtekből készült teljes sejt lizátum alkalikus foszfatázzal történő kezelésekor csak a fehérje nagyobb elektroforetikus mobilitású formája volt kimutatható, ami arra utal, hogy a különböző BMAL1 formák a foszforiláltsági

állapotukban különböznek, és a neutrofil sejtekben a fehérje hipofoszforilált formája van jelen.

A BMAL1 foszforiláltsági állapota pozitívan korrelál a sejtmagban való felhalmozódásával. A sejteken végzett immunfestés során a neutrofil granulociták sejtmagjában alacsonyabb volt a BMAL1 fehérje szint, mind a limfocitákhoz, mind a monocitákhoz képest. Emellett, míg a monociták esetében a fehérje egyenlő eloszlást mutatott a sejtmag és a citoplazma között, és a limfocitákban túlnyomórészt a sejtmagban volt detektálható, a neutrofil sejtekben a citoplazmában volt magasabb a fehérje szintje.

### **Az órakomponensek expressziójának vizsgálata PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációja során**

Mivel a mononukleáris sejtek és a neutrofil granulociták fejlődése már a csontvelőben szétválik, feltételeztük, hogy a molekuláris oszcillátor működésében tapasztalt különbségek a sejtek fejlődésére és differenciációjára vezethetők vissza. Vizsgálati modellként a PLB-985 humán akut mieloid leukémia sejtvonalat választottuk, mely DMSO kezeléssel neutrofil granulocita irányba differenciáltatható. Az óragének kifejeződését a *Bmal1* expresszióhoz viszonyítva a differenciálódási időszak alatt lecsökkent a sejtekben a *Per1* és



a *Per2* expresszió, valamint a PER2 fehérje szintje egyaránt.

Ez arra utal, hogy a molekuláris óra működése megváltozik a neutrofil granulocita irányú differenciáció alatt.

### **Kortizol hatásának vizsgálata neutrofil granulociták óragén expressziójára**

Eredményeink alapján a neutrofil granulocitákban az óraműködés nem robusztus. Ezért alternatív lehetőségként felmerül, hogy az óragének oszcillációjáért és a sejtek válaszreakciójának napi ingadozásáért szisztémás hatások felelősek. Mivel neutrofil granulocitákban ritmusos *Per1* expressziót detektáltunk, melynek maximuma – a plazma kortizol koncentrációhoz hasonlóan - a délelőtti órákban van, megvizsgáltuk, hogy az óragének kifejeződése érzékeny-e kortizol kezelésre. A kezelés hatására a *Per1* expresszió több mint ötszörösére növekedett a sejtekben. Ez arra utal, hogy a *Per1* expressziója glukokortikoid befolyás alatt áll, valamint hogy a *Per1* kifejeződésének napi ingadozásáért a neutrofil sejtekben a plazma kortizol koncentráció ritmusa lehet felelős.

### **A perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlásának vizsgálata**

Mivel a patogének elleni válaszkészség változhat a

sejtek érése során, a sejtpopuláción belüli koreloszlás változása hozzájárulhat az effektor reakciók hatékonyságának ritmikus változásához. Megvizsgáltuk, hogy hogyan alakul a nap folyamán a perifériás neutrofil granulocita populációban az érési marker *Cxcr4* kemokin receptor expressziója. A receptor kifejeződése szignifikáns oszcillációt mutatott, melynek maximuma az esti órákban volt mérhető (20 óra 1 perc). A kor szerinti megoszlás napi ingadozását támasztja alá az is, hogy az áramlási citométerrel mérhető oldalirányú fényszórás (SSC), mely korrelál a sejtek granuláltságával és így a sejtek korával is, szintén napi oszcillációt mutatott, a maximum pedig a reggeli órákra esett (7 óra 50 perc). Mindezek arra utalnak, hogy a perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlása változik a nap folyamán: az idős sejtek aránya magasabb az esti/éjszakai időszakban, mint a reggeli/nappali időszakban. Ennek további vizsgálatára ujjbegyből vett vérből keneteket készítettünk és magmorfológia alapján értékeltük a sejtek érettségi állapotát. Míg az esti minták esetében szignifikánsan magasabb volt az idős sejtek aránya, a reggeli mintákban nem volt különbség a fiatal/idős sejtek számában. Emellett az abszolút neutrofil granulocita számot is vizsgáltuk, és az irodalmi adatokkal egyezően oszcillációt tapasztaltunk, az esti órákban megfigyelhető maximummal (23 óra 36 perc).

Vizsgálataink során a CXCR4 receptor ligandjának, a CXCL12 kemokinnek is napi ingadozást mutatott a plazma koncentrációja, a sejtekben mérhető *Cxcr4* expresszióval parallel módon. Mivel a CXCL12 fő forrása a csontvelő, ez arra utal, hogy a neutrofil sejtek időfüggő eliminációjában és kor szerinti eloszlásának ingadozásában a csontvelői működés napi ingadozása meghatározó lehet.

### **Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének és fagocitózis készségének vizsgálata**

A neutrofil sejtek érésével párhuzamosan a sejtek *Gp91<sup>phox</sup>* expressziójának növekedése is megfigyelhető, maximuma a késő esti időszakban mérhető (23 óra 41 perc), amikor az idős sejtek aránya is magasabb. Az oxidáz alegység expressziójának ingadozása korrelál a sejtek szuperoxid termelő képességével, délután 13 és éjjel 1 órakor izolált sejteket opszonizált zimoszánnal stimulálva magasabb volt a sejtek szuperoxid termelése az éjjeli minták esetében, mely arra utal, hogy a sejtek válaszkészsége az éjszakai időszakban jobb.

Ehhez hasonlóan az éjszaka izolált sejtek opszonizált *Staphylococcus aureus*-ra adott fagocitózis válasza is jóval erősebb, mint a napközben izolált sejteké, mely alátámasztja, hogy az idősebb sejtek hatékonyabbak az immunválasz során.

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. Az általunk magyarra fordított MCTQ kérdőív validálása sikeres, a kérdőív további vizsgálatokban felhasználható.
2. A neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek óragén expressziós mintázata különbözik.
3. A neutrofil granulocitákban a PER2 és a BMAL1 kifejeződése alacsonyabb, mint mononukleáris sejtekben. A neutrofil sejtekben a BMAL1 hipofoszforilált formája van jelen, és a fehérje alacsonyabb sejtmagi megjelenést mutat, mint limfocitákban vagy monocitákban.
4. A molekuláris óra működése megváltozik PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciálódása alatt.
5. Neutrofil granulociták *Per1* expressziója kortizollal való kezeléssel *in vitro* indukálható. *In vivo* a *Per1* RNS a plazma kortizol koncentráció napi ritmusával parallel ingadozik.
6. A perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti összetétele oszcillál a nap folyamán: az esti/éjszakai időszakban magasabb az idősebb sejtek aránya.
7. A neutrofil sejtek opszonizált zimozán stimulusra bekövetkező szuperoxid termelése, és opszonizált *S. aureus* fagocitózisa is hatékonyabb, amikor az érettebb sejtek aránya nagyobb a keringésben.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### **Az értekezés alapját képző publikációk:**

Haraszi RA, **Ella K**, Gyongyosi N, Roenneberg T, Kaldi K. (2014) Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiol Int*, 31: 603-612.

\*megosztott első szerzős közlemény

**Ella K**, Csepanyi-Komi R, Kaldi K. (2016) Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain Behav Immun*, 57: 209-221.

### **Egyéb publikációk:**

Gyongyosi N, Nagy D, Makara K, **Ella K**, Kaldi K. (2013) Reactive oxygen species can modulate circadian phase and period in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med*, 58: 134-143.