

# A cirkadián óra szerepe humán neutrofil granulociták működésének szabályozásában

Doktori értekezés

**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

**1. Tartalomjegyzék**

<b>1. Tartalomjegyzék .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>3</b>
<b>3. Bevezetés.....</b>	<b>8</b>
3.1. A cirkadián ritmus jellemzői .....	8
3.2. A molekuláris óra általános szerkezete .....	11
3.3. Az emlős molekuláris oszcillátor működése.....	12
3.4. A cirkadián óraműködés hierarchikus szerveződése.....	15
3.5. A cirkadián óraműködés humánélettani jelentősége és patológiai vonatkozásai .....	19
3.6. Az immunrendszer cirkadián szabályozása .....	23
3.6.1. <i>Az cirkadián óra szerepe gyulladáscsökkentő folyamatok szabályozásában.....</i>	<i>26</i>
3.7. Humán neutrofil granulociták.....	28
3.7.1. <i>Humán neutrofil granulociták érése .....</i>	<i>28</i>
3.7.2. <i>Humán neutrofil granulociták effektor funkciói .....</i>	<i>30</i>
<b>4. Célkitűzések .....</b>	<b>35</b>
<b>5. Módszerek .....</b>	<b>36</b>
5.1. A Munich Chronotype Questionnaire magyar változatának validálása .....	36
5.2. A donorok kiválasztása és a kísérletek menete a leukociták óraműködésének vizsgálatához.....	39
5.3. Leukociták izolálása vénás vérből .....	39
5.4. A plazma kortizol koncentráció mérése .....	40
5.5. Génexpresszió vizsgálata valós idejű PCR segítségével .....	40
5.6. PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányba történő differenciáltatása.....	41
5.7. Western blot analízis.....	43
5.8. Leukociták immunfluoreszcens festése .....	44
5.9. Neutrofil granulociták kezelése kortizollal.....	45
5.10. A neutrofil granulociták oldalirányú fényszórásának (SSC) mérése .....	45
5.11. Perifériás vérminták hisztológiai festése .....	46
5.12. A plazma CXCL12 koncentrációjának meghatározása.....	46
5.13. Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének mérése.....	46
5.14. Neutrofil granulociták fagocitózis készségének meghatározása .....	47

5.15. Statisztikai analízis .....	47
<b>6. Eredmények .....</b>	<b>48</b>
6.1. A Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) magyarra fordítása és validálása .....	48
6.2. Neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek óragén expressziójának összehasonlítása .....	51
6.3. Neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek PER2 és BMAL1 fehérje expressziójának összehasonlítása .....	56
6.4. Az órakomponensek expressziójának vizsgálata PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációja során .....	60
6.5. Kortizol hatásának vizsgálata neutrofil granulociták óragén expressziójára	64
6.6. A perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlásának vizsgálata .....	65
6.7. Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének és fagocitózis készségének vizsgálata .....	69
<b>7. Megbeszélés .....</b>	<b>72</b>
<b>8. Következtetések .....</b>	<b>80</b>
<b>9. Összefoglalás .....</b>	<b>81</b>
<b>10. Summary .....</b>	<b>82</b>
<b>11. Irodalomjegyzék .....</b>	<b>83</b>
<b>12. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>110</b>
<b>Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>111</b>

## 2. Rövidítések jegyzéke

ACTH	adrenocorticotrop hormon
ANOVA	analysis of variance (varianciaanalízis)
ARC	nucleus arcuatus
ARNTL	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
bHLH	basic helix-loop-helix
BMAL1	brain and muscle arnt-like protein-1
BSA	bovine serum albumin
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CAR	CXCL12-abundant reticular
ccg	clock controlled gene (óra által kontrollált gén)
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CCND1	cyclin D1
Cdk	ciklin-dependens kináz
cDNS	komplementer dezoxi-ribonukleinsav
CGD	chronic granulomatous disease (krónikus granulomatózus betegség)
CIP	calf intestinal phosphatase
CIRP	cold inducible RNA-binding protein
CK	casein kinase
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CMP	common myeloid progenitor
CR	complement receptor
CRE	clock responsive elements (óra-reszponzív elemek)
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	corticotropin releasing hormon
CRY	CRYPTOCHROM
CT	circadian time (cirkadián idő)
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DBP	D site of albumin promoter binding protein
DEC	differentiated embryo chondrocyte protein
DMH	dorsomedialis hipotalamus

DMSO	dimetil-szulfoxid
DNáz	dezoxi-ribonukleáz
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
dNTP	dezoxi-ribonukleotid trifoszfát
dSPZ	dorsalis subparaventricularis zóna
E-box	Enhancer-box
ECL	enhanced chemiluminescence (magnövelt kemilumineszcencia)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
Fab	fragment antigen binding (antitest antigén-kötő régiója)
FASPS	familiar advanced sleep phase syndrome
FBS	fetal bovin serum (magzati borjúsérum)
Fc	fragment constant (antitest konstans régiója)
FcR	Fc receptor
fMLP	N-formil-metionin-leucin-fenilalanin
FRP	free running period (szabadon futó ritmus)
GAPDH	glicerín-aldehid-foszfát dehidrogenáz
G-CFU	granulocyte colony forming unit
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GFP	green fluorescent protein
GH	growth hormon
GMP	granulocyte-monocyte progenitor
GRE	glucocorticoid responsive element
GSK	glycogen synthase kinase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	(2-hidroxietil) piperazin-1-etánszulfonsav
HLF	hepatic leukemia factor
HRP	horseradish peroxidase (tormaperoxidáz)
HSC	hematopoietic stem cell
HSF1	heat shock factor 1
HSP	heat shock protein
Ig	immunglobulin
IL	interleukin

Itga6	Integrin alpha-6
I $\kappa$ B	inhibitor $\kappa$ B
KO	knockout
LFA	Lymphocyte function-associated antigen
LHA	lateralis hipothalamus
LHx2	LIM/homeobox protein 2
LPS	lipopoliszacharid
LTB4	Leukotriene B4
MCH	melaninkoncentráló hormon
MCP-1/JE	monocyte chemoattractant protein-1
MCTQ	Munich Chronotype Questionnaire
Mdm2	mouse double minute 2 homolog
MEQ	Morningness Eveningness Questionnaire
MOP3	morphine preference 3
MOPS	3-N-morforlin-propánszulfonsav
MPO	mieloperoxidáz
MPOR	medialis praeopticus régió
mRNS	messenger RNS
MSF	middle-sleep on free days (alvási középídő szabadnapokon)
MT	melatonin receptor
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF- $\kappa$ B	nukleáris faktor-kappaB
NO	nitrogén monoxid
NOD	nucleotid-binding oligomerization domain
NPAS2	neuronal PAS domain protein 2
NREM	non rapid eye movement
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PAS	Period-Arnt-Single-minded
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

PER	PERIOD
PKA	protein kinase A
PMN	polymorphonuclear neutrophil
PMSF	fenilmetánszulfonil-fluorid
PRL	prolaktin
PRR	pattern recognition receptor
PVHd	dorsalis parvicellularis paraventricularis mag
PVHm	medialis parvicellularis paraventricularis mag
Q10	hőmérsékleti együttható
RA	rheumatoid arthritis
rcf	relative centrifugal force
REM	rapid eye movement
RHT	retinohypothalamic tract
RNS	ribonukleinsav
ROI	region of interest
ROR	retionic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor
RORE	retionic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor responsive element
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute (fordulat/perc)
RQ	relative quantification
rRNS	ribosomális RNS
RT	reverz-transzkriptáz
SCN	nucleus suprachiasmaticus
SD	standard deviáció
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
SEM	standard error of mean
SIM	single minded
SJL	szociális jetlag
SLex	sialyl Lewis X
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SR	scavenger receptor

SSC	side scattering
TBS	Tris-buffered saline
Tcf4	Transcription factor 4
TCR	T-cell receptor (T-sejt receptor)
TEMED	tetrametil-etilén-diamin
TF	teljes fehérjemennyiség
TLR	toll-like receptor
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TRH	TSH releasing hormon
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
VLA-4	Very Late Antigen-4
VLPO	ventrolateralis praeopticus mag
VMH	ventromedialis mag
vSPZ	ventralis subparaventricularis zóna
WT	wild type (vad típus)
ZT	Zeitgeber time



### 3. Bevezetés

A Föld tengely körüli forgásának eredménye az egyes környezeti tényezők 24 órás ciklusokban jelentkező váltakozása. Az evolúció során számos olyan adaptációs mechanizmus alakult ki, mely a szervezet külső környezethez való alkalmazkodását segíti elő. A cirkadián óraműködés egy belső időmérő rendszer, mely lehetővé teszi a szervezet számára, hogy előre felkészüljön a napi ingadozást mutató környezeti tényezők változására, ezáltal segíti az adaptációt. Ez az adaptációs képesség már a törzsfajlás korai szakaszában megjelent: a cirkadián óra működését cianobaktériumokban [1-3], algákban [4], gombákban [5, 6], növényekben [7, 8], rovarokban [9, 10] és emlősökben [11, 12] is leírták.

#### 3.1. A cirkadián ritmus jellemzői

Számos életfolyamatra jellemző, hogy ritmikus működést mutat. Azonban a biológiai ritmusok periódushosszuk és szabályozásuk szempontjából is sokfélék lehetnek. A cirkadián (circa diem = körülbelül egy nap) ritmusok periódushossza megközelítőleg 24 óra. Ha egy ritmikus folyamat periódushossza ennél rövidebb, ultradián (ultra diem = egy napnál kevesebb) ritmusról beszélünk. Ilyen például az alvás REM és NREM fázisainak váltakozása [13, 14], a különböző hormonok pulzatil jellegű szekréciója [15, 16], vagy a légzési ritmus és a szívritmus. Infradián (infra diem = több mint egy nap) ritmus esetében a periódus hosszabb, mint 24 óra. Jellemző példa a főemlősök menstruációs ciklusa. Ezek mellett lényegesen hosszabb periódushosszú ritmusokat is találunk az élővilágban: ezek az úgynevezett cirkannuális (circa anno = körülbelül egy év) ritmusok, melyek évente ismétlődnek, mint például a növények virágzási ciklusa vagy az állatok párzási és vándorlási időszaka.

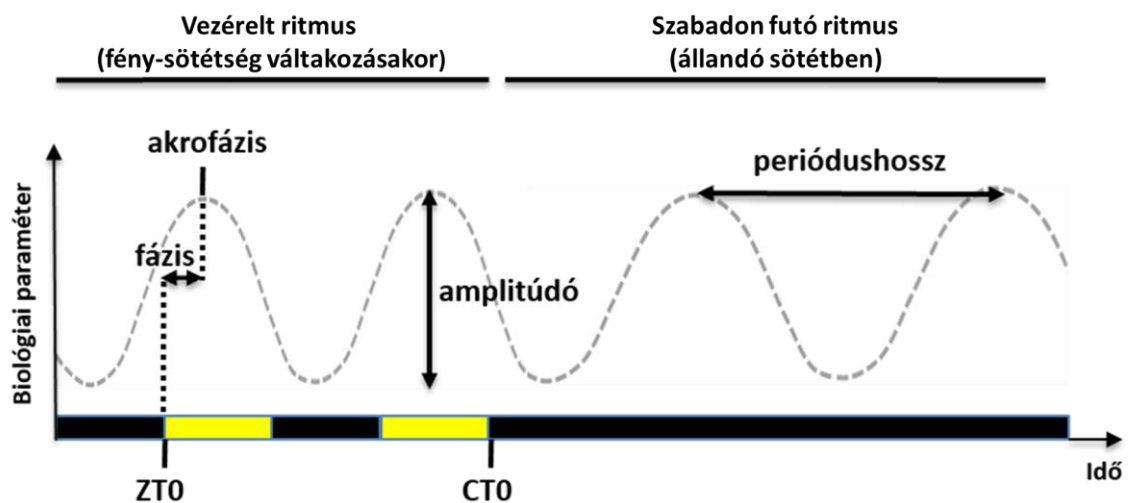
A továbbiakban a cirkadián ritmus legfontosabb jellemzőit tárgyalom.

A 24 órához közeli periódushossz mellett további kritériumok teljesülése is szükséges, hogy egy ritmusos működést cirkadiánnak nevezhessünk:

1. Lényeges, hogy a cirkadián ritmus állandó körülmények között, környezeti hatások (pl. fény-sötétség váltakozás, külső hőmérséklet ingadozás) nélkül is fennmarad. Ebben az esetben szabadon futó ritmusról beszélünk, ahol a periódushossz kis mértékben eltérhet a 24 órától (free running period = FRP). Például állandó fényviszonyok között a legtöbb ember aktivitásának ritmusa körülbelül 25 órás periódushosszú [17]. Elsősorban ez a tulajdonság különbözteti meg a cirkadián ritmust a többi 24 órás periódushosszú (nappal aktív életmód esetén diurnális, éjszaka aktív életmód esetén nokturnális) ritmustól, melyeknél az oszcillációt a fény- és hőmérsékletváltozások hozzák létre, és ezen hatások megszűnése a ritmusos működés megszűnését vonja maga után.
2. Jellemző továbbá, hogy a cirkadián ritmusok működését különböző külső környezeti stimulusok (úgynevezett *Zeitgeber*ek), mint például a fény, a hőmérséklet, vagy a tápanyagellátás átállíthatják. A beállítás során a ritmus időzítése szinkronba kerül a környezettel, ezt a folyamatot nevezzük *entrainment*-nek. Az emlősöknél a ritmus fő *Zeitgebere* a fény.
3. A cirkadián ritmusokat emellett hőmérséklet-kompenzáció jellemzi. Ez azt jelenti, hogy míg más biokémiai folyamatok sebessége megnő a hőmérséklet emelkedésekor, jellemzően 10°C-onként 2-3-szorosára (Q10 érték ~2,5), a ritmus periódushossza széles hőmérséklettartományban változatlan marad, azaz Q10 értéke alacsony, jellemzően 0,8-1,2 közötti [18]. A ritmus hőmérséklet kompenzáltága természetesen az emlősök esetében is fontos. Bár a folyamatok többsége stabil, néhány tized Celsius-foknyi ingadozást mutató körülmények között zajlik, például a végtagok és különösen a bőr esetében nagyobb ingadozások is tapasztalhatóak.

A ritmus jellemző paramétereit (1. ábra) a következőképpen definiálhatjuk:

1. Periódushossz: a ritmusos paraméter két egymást követő maximum vagy minimum értékének időbeli távolsága, jele:  $\tau$ .
2. Amplitúdó: a ritmusos paraméter minimum és maximum értéke közötti különbség.
3. Fázis: a ritmus perióduson belüli aktuális lefutása, jele  $\phi$ . Általában a ritmusos paraméter egy jellegzetes pontjához (például maximumához=akrofázis) tartozó időponttal jellemezzük.
4. Zeitgeber time (ZT): az utolsó *Zeitgeber* megjelenése óta eltelt idő. Mivel emlősök esetében a legfőbb *Zeitgeber* a fény, ezért ZT0-val a fényszakasz kezdetét szokás jelölni.
5. Circadian time (CT): a szabadon futó ritmus esetében CT0-val jelöljük az állandó körülmények kezdetét.



1. ábra

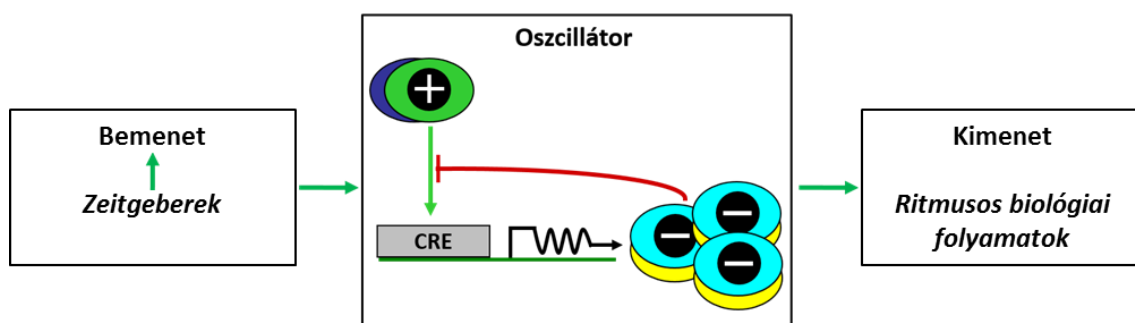
A ritmust jellemző paraméterek.

([19] alapján) A definíciókat lásd a szövegben.

### 3.2. A molekuláris óra általános szerkezete

Az alapvető időmérő folyamat minden élőlényben hasonló elv szerint működik, alapja egy transzkripció/transzláció negatív visszacsatolási hurok, a molekuláris oszcillátor (2. ábra) [20]. Egy pozitív faktor, mint transzkripció faktor, indukálja a negatív faktor kifejeződését, mely, ha kellően magas koncentrációban van jelen a sejtmagban, gátolja a pozitív faktor további működését, ezáltal pedig saját maga kifejeződését. A negatív faktorok érése és lebomlása után a pozitív faktor felszabadul a gátlás alól és egy újabb ciklus veszi kezdetét. Ennek eredményeként az órakomponensek kifejeződése ritmikus. A körülbelül 24 óra alatt zajló ciklus létrejöttének fontos feltételei a folyamatsorba beépített késleltetési mechanizmusok. Ilyenek például a transzkripció és a transzláció közötti időkülönbség, vagy az órakomponensek poszttranszlációs módosulásai, melyek befolyásolják az óra elemeinek sejten belüli elhelyezkedését, aktivitását és lebomlását egyaránt.

Az óra bemeneti oldala minden olyan struktúra (pl. sejt, transzmitter, receptor), ami a különböző *Zeitgeber* hatását közvetíti a molekuláris oszcillátor felé. Tehát ha ezen struktúrák működése nem megfelelő, a *Zeitgeber* nem tudja a molekuláris oszcillátor működését befolyásolni. Az óra kimeneti oldalához az oszcillátor által befolyásolt, így ritmikus működést mutató különböző biokémiai és élettani folyamatok tartoznak (2. ábra).



2. ábra

#### A molekuláris óra elemei és vázlatos szerkezete

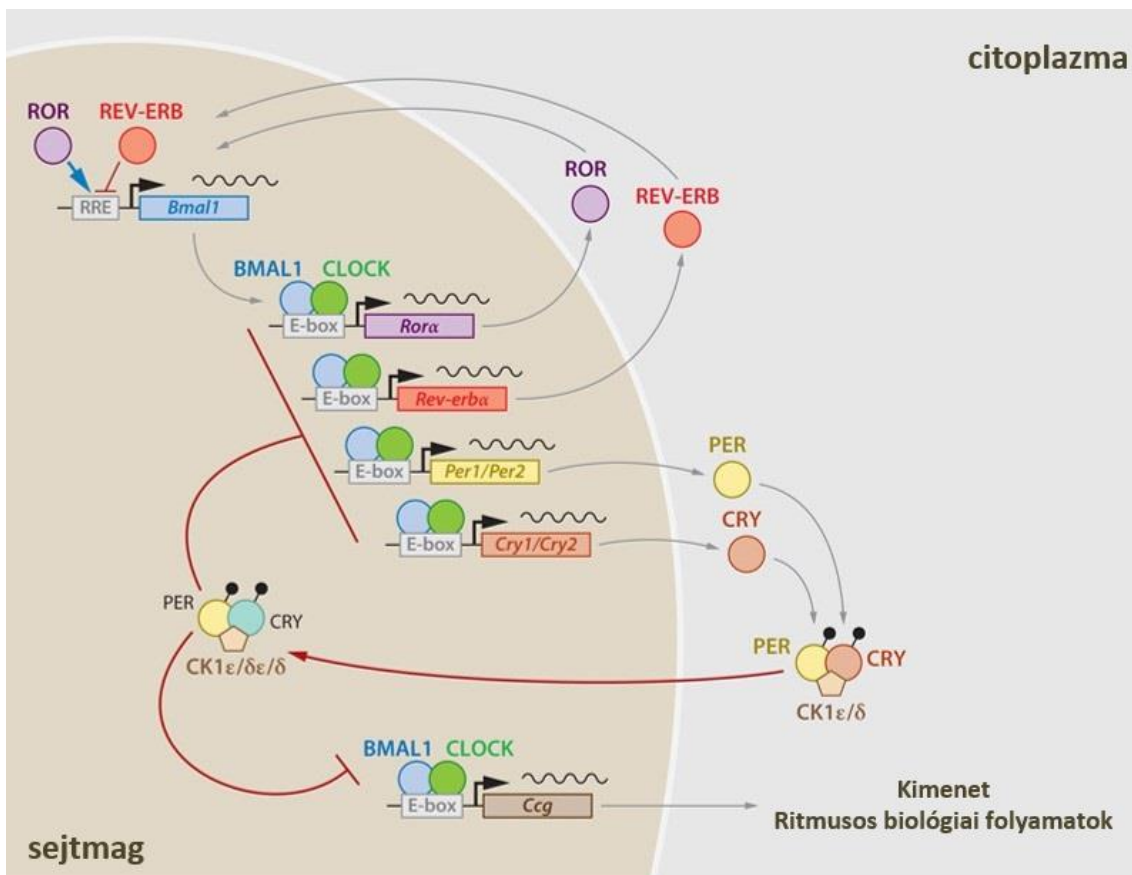
A bemeneti elemek közvetítik a *Zeitgeber* hatását a molekuláris oszcillátor felé, míg a kimeneti komponensek az oszcillátor által létrehozott biokémiai és élettani folyamatok (CRE=Clock Responsive Element) (ábra: [20] alapján). A bővebb magyarázatot lásd a szövegben.

### 3.3. Az emlős molekuláris oszcillátor működése

Az emlős molekuláris óra működésében a pozitív faktor szerepét a CLOCK és BMAL1 (ARNTL1, MOP3) transzkripciós faktorok alkotta komplex tölti be, míg az oszcillátor működésének negatív szabályozói a CRYPTOCHROME (CRY1, CRY2) és PERIOD (PER1, PER2, PER3) fehérjékből álló heterodimerek [21, 22]. Bizonyos szövetekben a CLOCK fehérje funkcióját a NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2) helyettesítheti [23-25]. A BMAL1 és CLOCK/NPAS2 fehérjék a bázikus hélix-hurok-hélix (bHLH)-PER-ARNT-SIM (PAS) domént tartalmazó transzkripciós faktorok családjába tartoznak. Ezek a transzkripciós faktorok szerkezetükből adódóan csak dimer formában képesek DNS-t kötni. Működésük során a célgének promóterének E-box (Enhancer-box) motívumához (leggyakrabban 3'-CACGTG-5') kötődnek, így aktiválva az óragének transzkripcióját. A transzkripciót és a fehérjeszintézist követően a PER és a CRY a citoplazmában heterodimert képeznek, majd a magba jutva közvetlen kölcsönhatás révén gátolják a BMAL1-CLOCK/NPAS2 komplex DNS-hez kötődését, ezáltal saját transzkripciójukat. Emellett több másik szabályozó visszacsatolás is működik: 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 a ROR/REV-ERB kötő RORE (retinoic acid-related orphan receptor responsive element) motívumokon keresztül közvetlenül hatnak vissza a *Bmal1* expresszióra, a REV-ERB gátló [26], a ROR serkentő [27-29] módon. Ennek következtében a BMAL1 fehérje szintje antifázisban ingadozik a PER fehérjékhez képest [26, 30]. A BMAL1-CLOCK transzkripciós faktor komplex ilyen módon létrejövő oszcilláló aktivitása közvetetten vagy közvetve számos gén ritmikus kifejeződését is vezérli, ezek az úgynevezett *ccg*-k (clock controlled genes=óra által kontrollált gének) (3. ábra). Microarray adatok alapján az egyes szövetekben körülbelül a gének 10%-ának expresszióját irányítja a cirkadián órarendszer [31, 32]. Az idáig bemutatott faktorok az eddig vizsgált sejttípusok esetében esszenciálisnak bizonyultak az óraműködés szempontjából.

Ugyanakkor a molekuláris oszcillátor működésének finomhangolásában további visszacsatolások mechanizmusok is szerepet kapnak, melyek jelentőségét elsősorban fibroblaszt sejtekben, a suprachiasmaticus magban és/vagy hepatocitákban vizsgálták.

Ilyen folyamatban vesz részt például a DBP (albumin D-site-binding protein) transzkripció faktor, mely a *Per1* transzkripció aktiválásán keresztül alapvető a periódushossz beállításában [33, 34]. Emellett a HLF (hepatic leukemia factor), a DEC1 (differentiated embryo chondrocyte protein) és a DEC2 fehérjék aktivitása is visszahat az óraműködésre, egyrészt a BMAL1 direkt gátlásával, másrészt a kompetitív E-box kötésükön keresztül [35-41].



3. ábra

#### Az emlős molekuláris oszcillátor működése.

A CLOCK és BMAL1 fehérjék komplexe a célgének promóterének E-box motívumához kötődik, így aktiválva az óragének és különböző *cgc*-k transzkripcióját. Az oszcillátor negatív komponensei a PER és a CRY fehérjék. Amennyiben a PER-CRY heterodimer kellően magas koncentrációt ér el a magban, gátolja a CLOCK-BMAL1 aktivitását. Az órakomponensek szabályozásában a kazein kinázok (CK $\delta/\epsilon$ ) szerepe is esszenciális, befolyásolják az órakomponensek sejten belüli lokalizációját és lebomlását is. A CLOCK-BMAL1 serkenti egyes magreceptorok, a REV-ERB és a ROR kifejeződését is, amelyek viszont a BMAL1 expresszióra hatnak vissza: a REV-ERB gátló, a ROR serkentő módon (ábra: [42] a szerző által módosítva). A részletesebb magyarázatot lásd a szövegben.

Az óraféhrjék poszttranszlációs módosulásai a fehérjék stabilitását és sejten belüli lokalizációját alapvetően befolyásoló tényezők, így a ritmus amplitúdójára és periódushosszára egyaránt hatással vannak. Emiatt különböző kinázok (pl. kazein kináz (CK)  $\delta/\epsilon$ , glikogén szintáz kináz (GSK)  $3\beta$ ) [43-45] és foszfatázok (pl. protein foszfatáz 1 és 5) [46, 47] is fontos komponensei a molekuláris órának. A legtöbbet a PER fehérjék foszforilációjának szerepéről tudunk: a CK1 $\delta$  és  $\epsilon$  működése központi szerepet tölt be a cirkadián ritmus periódushosszának és fázisának beállításában. A foszforiláció szabályozza a fehérje sejtmagba történő transzportját, a többi óraféhrjével való kölcsönhatását, illetve a fehérje stabilitását és lebomlásának sebességét egyaránt [48-51]. A BMAL1 aktivitásának és sejten belüli lokalizációjának fontos szabályozója a CK2 $\alpha$  és GSK3 $\beta$  általi foszforiláció [45, 52, 53]. A kinázokon és foszfatázokon kívül más enzimek is részt vesznek az óraműködés szabályozásában, például a fehérjék acetilációján és sumoilációján keresztül [44, 54-56]. Emellett az E3 ubiquitin-ligáz komplexek szerepe is esszenciális, mivel működésük szintén meghatározó az óraféhrjék stabilitásának és lebontásának időzítése szempontjából [57-61].

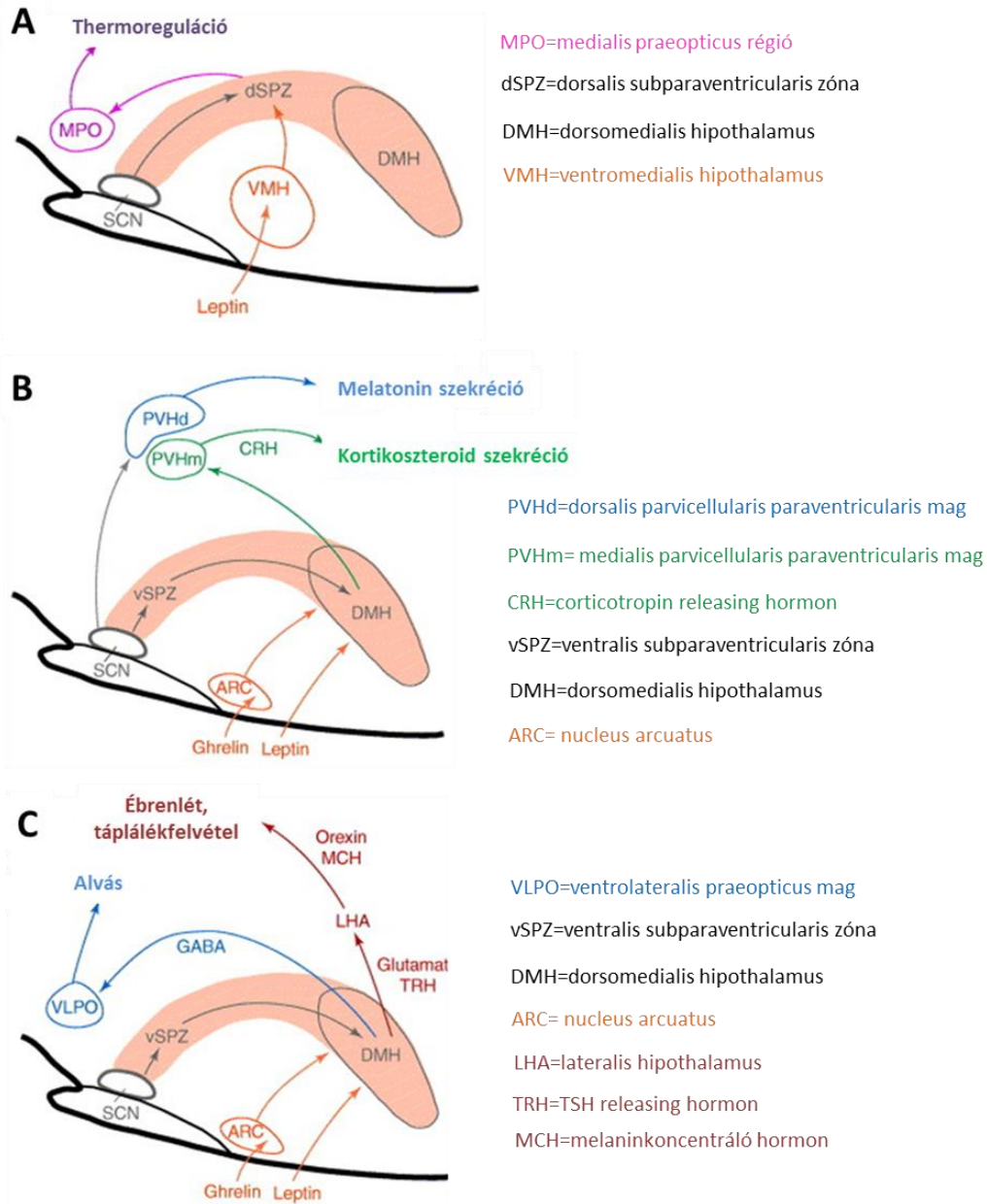
A molekuláris óra működésében egyre nyilvánvalóbb a mikroRNS-ek moduláló hatása [62]. Szerepüket már leírták többek között a *Bmal1* [63-65], a *Per1/2* [66-68], valamint a *Clock* [69] expresszió gátlásában is. A mikroRNS-ek szövetspecifikus óraműködést befolyásoló hatására utal, hogy SCN specifikus *Dicer* hiányos egérben a cirkadián periódushossz  $\sim 2$  órával csökkent [66], míg hepatocitákban a *Dicer* hiánya nem okoz periódushossz változást [67]. Emellett az óra maga is hat mikroRNS-ek kifejeződésére, és így a transzláció szabályozásán keresztül is befolyásolhatja egyes fehérjék expresszióját [70, 71].

A fent ismertetett folyamatok eredményeként az egyes sejtekben zajló biokémiai és génexpressziós folyamatok jelentős része napi ingadozást mutat, ami szervezeti szinten különböző élettani folyamatok ritmikus működését eredményezi.

### 3.4. A cirkadián óraműködés hierarchikus szerveződése

Az emlősök minden eddig vizsgált magvas sejtjében expresszálódnak óragének [39, 72], valamint a cirkadián vizsgálatokban mára már elterjedt riporter rendszereket használva a különböző szervekben és szövetekben is kimutatható volt a molekuláris óra működése [73]. Az 1970-es években patkányokon végzett kísérletek világítottak rá először a ventralis hypothalamusban található nucleus suprachiasmaticus (SCN) szerepének fontosságára a cirkadián ritmus létrehozásában. Az SCN roncsolása számos ritmusos élettani működés (pl. alvás/ébrenlét, kortikoszteron szekréció) oszcillációjának megszűnéséhez vezet [74-78]. Az SCN-ben működő oszcillátort nevezzük központi órának („master clock”). A központi óra sejtjei bár egyenként is képesek a ritmusgenerálásra [79], fiziológias körülmények mellett az SCN funkcionális egységként működik. A sejtek óraműködésének összehangolásában mind idegi, mind parakrin faktorok (pl. VIP, PACAP) fontos szerepet játszanak [80-82]. Az emlősök esetében a legfontosabb *Zeitgeber* a fény. A retina speciális melanopszint tartalmazó ganglionsejtjei az általános megvilágításra érzékenyek. Az ezekből a ganglionokból érkező jel a vizuális ingereket továbbító idegpályáktól függetlenül működő [83] tractus retinohypothalamicus-on (RHT) keresztül éri el az SCN-t. A jelátvitel glutamáterg útvonalon történik, és a posztzinaptikus SCN neuronban CREB (cAMP response element-binding) fehérje aktivációján keresztül növekszik a *Per1* és a *Per2* gének expressziója. Ez a mechanizmusa a molekuláris óra fény hatására történő fázisváltozásának [84, 85]. Emellett a jelátvitel szabályozásában, a glutamát felszabadulás modulálásán keresztül, a substance P-nek és a PACAP-nak (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) is szerepe van [86, 87]. Az SCN által generált ritmus állandó környezeti körülmények között (állandó sötétben) 24 órától kis mértékben eltérő. A fényen keresztüli *entrainment* nap mint nap szinkronba hozza a sejtben működő oszcillátort a geofizikai idővel. A SCN összeköttetéseit és főbb élettani hatásait a 4. ábra szemlélteti.





4. ábra

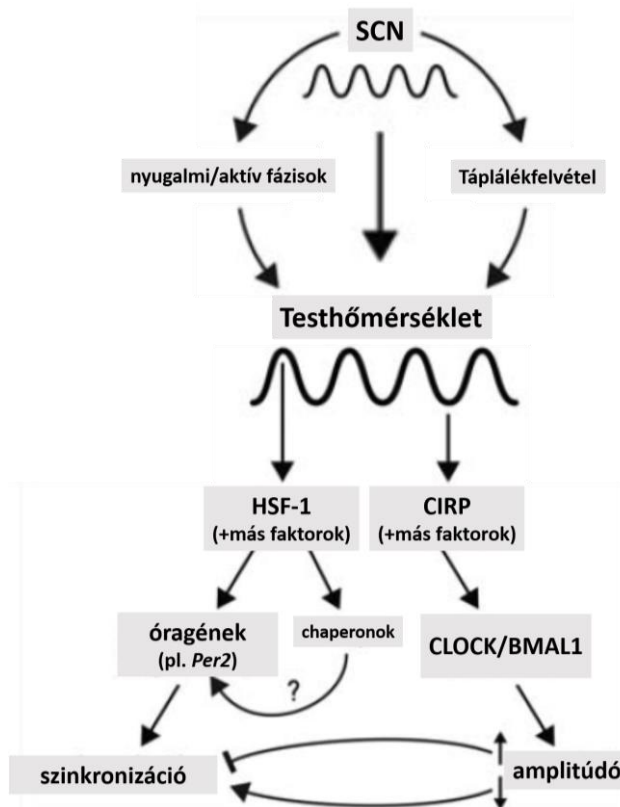
**A nucleus suprachiasmaticus összeköttetései.**

A) a hőszabályozás szempontjából fontos összeköttetések, B) a melatonin és kortizolszekréció szabályozása, C) az alvás/ébrenlét és táplálékfelvétel szabályozásában részt vevő összeköttetések (ábra: [88] a szerző által módosítva).

Egereken tett megfigyelések tanúsága szerint különböző perifériás szövetek (pl. máj, vázizom) *Per* expressziójának fázisa néhány óras késést mutat az SCN-ben detektálthoz képest [89]. Ez is azt a feltevést támasztja alá, miszerint a perifériás sejteket az SCN működése hozza azonos fázisba. Ma már egyértelmű, hogy az SCN képes a perifériás sejtekben és szövetekben működő molekuláris órákat direkt (pl. egy másik központi idegrendszeri struktúrához közvetlenül kapcsolódva), vagy indirekt módon szinkronizálni [73, 90-96]. Az indirekt hatásra több példa is ismert, megvalósulhat például különböző hormonok (pl. kortizol, melatonin) közvetítésével, a táplálékfelvétel, vagy akár a testhőmérséklet napi ingadozásának szabályozásán keresztül [97, 98]. Bár a molekuláris oszcillátor felépítése gyakorlatilag megegyező a központi és a perifériás órák esetében, mégis számos adat fontos különbségekre utal a működés szempontjából [98]. Például az SCN-ben a CLOCK fehérje szerepét az NPAS2 teljes egészében helyettesíteni képes [23, 24, 99], emellett a ROR $\beta$  specifikusan csak neuronokban fejeződik ki [100]. A BMAL1 központi faktor génjének kiütése a központi órában a *Per1* és a *Per2* gének konstans, és rendkívül alacsony mértékű expresszióját vonja maga után [101]. Ezzel szemben például hepatocitákban a BMAL1 hiányában mindkét negatív faktor kifejeződése ritmusos marad [23, 94, 102]. Ez felveti a lehetőséget, hogy a hepatocitákban az oszcilláció létrejöttéért más, szisztémás hatások által vezérelt transzkripciós faktorok lehetnek felelősek. Fontos különbség a központi és a perifériás órák működése között a szinkronizálhatóságuk. A központi óra beállításában egyértelműen a fény-sötétség ciklusok a meghatározóak [98]. A központi óra irányítja a corpus pineale-ban termelődő melatonin szekrécióját, a melatonin pedig moduláló hatással van az SCN működésére az MT1 és az MT2 receptorokon keresztül, ami fiziológias viszonyok mellett egy pozitív visszacsatolást eredményez. A melatoninnak ezt a szinkronizáló hatását használják ki az orvosi gyakorlatban például olyan esetben, amikor a fény nem képes szinkronizálni a központi órát (pl. vakság esetén) [103].

A perifériás oszcillátoroknál a táplálkozási ciklusok, a testhőmérséklet ingadozása, valamint a glukokortikoid szignalizáció szinkronizáló hatása is megfigyelhető. Ez utóbbiakat direkt vagy indirekt módon befolyásolja az SCN, viszont az SCN maga nem érzékeny ezen órabeállító hatásokra [90, 104-106]. A glukokortikoidok hatásukat elsősorban a *Per1* gén kifejeződésének indukcióján keresztül fejtik ki, melynek promótere GRE (glucocorticoid responsive element)

kötőhelyet tartalmaz [104]. Ezen kívül ismert a glukokortikoidok szerepe a *Per2* expresszió szabályozásában is bizonyos sejtekben [107]. Mára már a testhőmérséklet ingadozásának szinkronizáló hatásában részt vevő több faktort is azonosítottak (5. ábra). Ezek elsősorban hősokk fehérjék (HSP), valamint CIRP (cold inducible RNA-binding proteins) fehérjék. Például a HSF-1 (heat shock factor 1) transzkripciós faktor citoplazma és sejtmag közötti vándorlása a testhőmérséklet ingadozásával azonos fázisban oszcillál [108], ez pedig az óragének ritmusos kifejeződését eredményezi. A CIRP fehérjéknek az óra amplitúdójának modulálása az egyik fő szerepük: hiányukban az óra oszcillációja ellaposodik, melynek oka lehet, hogy a *Clock* mRNS sejtmagból történő exportja a citoplazmába kevésbé hatékony [109].



5. ábra

**A nucleus suprachiasmaticus szinkronizáló szerepe a testhőmérséklet szabályozásán keresztül.**

A SCN egyrészt közvetlenül, másrészt az aktivitási és táplálkozási ciklusok szabályozásán keresztül közvetve vesz részt a testhőmérséklet napi ritmusának irányításában. A hőmérséklet ingadozása hősokkfehérjék (pl. HSF-1), valamint hideg által-indukálható RNS-kötő fehérjék (CIRP) működését szabályozza, melyek így módon a ritmus fázisát és amplitúdóját is befolyásolják (ábra: [98] a szerző által módosítva).

### 3.5. A cirkadián óraműködés humánéletteni jelentősége és patológiai vonatkozásai

A cirkadián óra számos élettani paraméter és folyamat napi ingadozását szabályozza. Ezek közül a legrégebben ismert a különböző hormonok koncentrációjának napi ingadozása. Ilyen például a melatonin szekréció ritmusa, amely esetében a maximális koncentráció a késő esti, kora hajnali órákban mérhető [110]. A CRH (corticotropin releasing hormon) és ACTH (adrenocorticotrop hormon) szintjében jelentkező napszaki ingadozások is közismertek, melyek a mellékvesekéregben ritmikus kortizol szekréciót hoznak létre. A kortizol szintje éjjeltől emelkedik, maximumát a reggeli órákban éri el, majd koncentrációja a nap további időszakában csökken [111]. A testhőmérséklet is napi oszcillációt mutat, mely a hajnali órákban a legalacsonyabb, és az esti időszakban éri el a maximumát [112]. Emellett ritmikus a pajzsmirigy hormonok, a tesztoszteron, a növekedési hormon (GH), a prolaktin (PRL), az adrenalin és az inzulinszekréció is [113, 114]. Mindezen folyamatokat az SCN szabályozza (4. ábra), tehát a központi óraműködés elengedhetetlen a szempontjukból. A ritmikus hormonszekréció mellett számos más élettani szempontból lényeges paraméter mutat jellegzetes napszaki ingadozást. Ilyen például a pulzus és vérnyomás ritmicitása, melyek esetében a hajnali órákban tapasztalható emelkedés, a maximumukat pedig a délutáni órákban érik el [115]. Az idegrendszer cirkadián regulációjára utal, hogy bizonyos kognitív funkciók esetében egyértelmű napi ingadozás mérhető [116].

Az embereket az alvás/ébredés mintázatuk alapján különböző kronotípusokba sorolhatjuk. A kronotípus tulajdonképpen megadja az egyéni *entrainment* fázisát, melyet a szabadnapokon mért alvási középidej (MSF - middle sleep on free days) jellemez. A társadalmon belül az extrém korai („pacsirta”) és az extrém késői („bagoly”) típusok között folyamatos az átmenet, és az intermedier típusok a leggyakoribbak [117]. A kronotípust befolyásolják az óragének genetikai polimorfizmusai [118], az életkor [119], valamint a környezet is [120].

Az egyik legvitatottabb kérdés a cirkadián vizsgálatok területén, hogy mi lehet az élettani jelentősége az óraműködésnek. Könnyen belátható, hogy a különböző élettani folyamatok intenzitásának időzítése, és az ezáltal felkészülés a periodikusan bekövetkező környezeti változásokra hatékonyabb működést tesz lehetővé, és így adaptációs előnyt jelent. Egy elmélet szerint a szervezet energiafelhasználásának

optimalizálása is a cirkadián óra fő feladata, mert akkorra időzíti a különböző folyamatok (emésztőenzimek szekréciója, különböző immunfunkciók) hatékonyságának maximumát, amikor a szervezetnek ténylegesen szüksége van rá [22]. Bár a kérdés nem eldöntött, a cirkadián óra élettani jelentőségét támasztja alá, hogy a ritmus meghibásodása különböző kórképek kialakulásának valószínűségét jelentősen növeli. A cirkadián óra működése és a betegségek patomechanizmusa között többértű kapcsolat lehet. Több primer cirkadián megbetegedést is ismerünk, melyek lehetnek endogén vagy exogén eredetűek. Emellett számos olyan kórfolyamat is ismert, melynek a tüneteiben tapasztalható cirkadián ingadozás.

Az egyik legjobban karakterizált genetikai eredetű cirkadián ritmuszavar a familiáris előretolt alvásfázis szindróma (FASPS). Jellemző rá az autoszómális domináns öröklésű és a körülbelül 4 órával rövidebb (~20 órás) periódushossz. A betegség kialakulásának hátterében a PER2 vagy CKI $\delta$  mutációi állnak. A PER2 mutációja esetében a CK kötőhely módosul [121], míg a CKI $\delta$  mutációja egy missense mutáció [122]. Mindkét eltérés a PER2 foszforiláltsági állapotát befolyásolja, mely így gyorsabb visszacsatolásra képes az oszcillátorban, így a fázis nagyjából 4 órával tolódik előre ciklusonként, így lerövidítve az alvás/ébrenlét, a melatonin- és testhőmérséklet ritmusok periódushosszát állandó körülmények között [123]. Ez a példa is bizonyítja a poszttranszlációs módosítások esszenciális szerepét a molekuláris oszcillátor működésében.

A cirkadián ritmus egyik leggyakoribb szisztémás szintű zavara a *jetlag*, mely több időzónát átlépő repülőutak következményeként alakul ki. Ilyenkor a cirkadián óraműködés és a környezet közötti szinkron felborul, és az SCN nem képes kellő gyorsasággal átállítani a ritmus fázisát. Jellemző tünetei az étvágytalanság, a hányinger, a fejfájás, az ingerlékenység és a kimerültség [124]. A *jetlag*-hez a szervezet néhány napon belül alkalmazkodni képes, mert az SCN fázisátállító képessége nagyjából 1 óra naponta. Ezzel szemben a váltott műszakban történő munkavégzés (*shift work*) egyfajta krónikus *jetlag*-et eredményez. Ez pedig számos megbetegedés kialakulásában lehet rizikófaktor. Ilyenek például a metabolikus szindróma, az obesitas, a diabetes mellitus, a trombózis, különböző cardiovascularis betegségek és szexuális diszfunkciók kialakulása [125-129]. Emellett váltott műszakban dolgozóknál gyakrabban alakulnak ki mentális betegségek is [130].

A sejtciklus és a cirkadián ritmus működése szorosan kapcsolt, az óraműködés számos, a sejtciklus szabályozásában meghatározó faktor expresszióját irányítja [131]. Ilyenek például a G1 fázisban a p21 [132], vagy a G2/M átmenetnél a WEE1 kináz kifejeződése [133]. Emellett különböző onkogének (pl. *c-Myc*, *Mdm2*,  *$\beta$ -catenin*), ciklinek (CCND1, B, A), sejtciklus szabályozók (pl. *Cdk4*, *Itga6*, *Wnt3*, *LHx2*, *Tcf4*, *Sox9*, *Smad7*) és a tumor szuppresszor p53 kifejeződését is direkt módon befolyásolja a molekuláris óra [131, 134]. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a ritmus felborulása esetén gyakrabban alakulnak ki daganatos megbetegedések. Több tanulmány a váltott műszakban dolgozó nők esetében emelkedett emlőrák kockázatról számol be [135-137]. Ugyanakkor a colorectális és endometriális karcinóma megjelenése is gyakoribb *shift work* esetén [138, 139]. Emiatt 2007 óta a World Health Organization (WHO) is rizikófaktorként tartja számon a váltott műszakban történő munkavégzést.

Számos megbetegedés mutat összefüggést a kronotípussal is, ilyenek például a depresszió [140], a különböző daganatos megbetegedések [141-143] és alvásproblémák [144]. Az utóbbi évtizedben kezdték vizsgálni a szociális berendezkedésünkből adódó időbeosztás hatását a különböző kronotípusokra. A szociális *jetlag* (SJL) a munkanapokon és szabadnapokon mért alvási középido különbsége [145]. Az általános munkarend és a reggeli munkakezdés a korai kronotípusoknak kedvez. A késői típusoknál viszont ez a szociális kényszer nagyobb eltolódást eredményez a munkanapok és szabadnapok alvófázisai között, így ők nagyobb SJL-lel rendelkeznek. Nem meglepő tehát, hogy a SJL is korrelációt mutat a késői kronotípusoknál gyakoribb megbetegedésekkel, így szintén fontos rizikófaktor. Több tanulmány mutatja a depresszióval [146], elhízással [147], vagy a szívfrekvencia növekedésével való összefüggését [148, 149], de a tanulmányi teljesítményre gyakorolt negatív hatása is ismert [150].

Számos kórfolyamat tünetei mutatnak napszaki ingadozást. Jellemző példa az inzulinérzékenység változása diabetes mellitus esetén [151, 152], vagy a különböző kardiovaszkuláris rendszert érintő problémák (akut miokardiális infarktus, a stroke, egyes aritmiák) gyakoribb reggeli előfordulása [153, 154]. A fájdalomküszöb is jellegzetes cirkadián ingadozást mutat, nappal magasabb, éjszaka alacsonyabb [155, 156]. Emellett számos immunfolyamat és gyulladáscsökkentő betegség tünete mutat napi ingadozást. Az immunrendszer cirkadián szabályozását a következő fejezetben

tárgyalom részletesebben.

A bemutatott ritmusos folyamatok is alátámasztják a diagnosztikus eljárások megfelelő időzítésének fontosságát, valamint a kronoterápia elterjedésének szükségességét. A máj detoxifikáló hatékonysága jellegzetes napszaki ingadozást mutat. A kezelések és a gyógyszeradagolás megfelelő időzítése hatékonyabbá teheti a terápiát, valamint csökkentheti a szükséges gyógyszer dózist [157].

### 3.6. Az immunrendszer cirkadián szabályozása

Az 1960-70-es években több egéren végzett kísérlet eredménye is arra utalt, hogy a szervezet bakteriális fertőzésre adott válasza napi ritmust követ [158]. Ma már számos klinikai és kísérletes adat is bizonyítja, hogy az immunrendszer a cirkadián óra szabályozása alatt áll [159-163]. Amellett, hogy részt vesz a leukocita *trafficking* (irányított vándorlás) szabályozásában [159], befolyással van a különböző gyulladási folyamatokra [164], és szerepe van az immunsejtek (pl. B-sejtek, T<sub>H</sub>17 sejtek) érésében is [165, 166]. Emellett a hemopoetikus eredetű sejtekben, mint a makrofágok, eozinofil granulociták, T- és B-limfociták, dendritikus sejtek, NK sejtek és monociták, működő molekuláris oszcillátor jelenlétét bizonyították [167-175], mely a sejtfunkciók széles skáláját befolyásolhatja, bár ezekről eddig igen hiányosak az ismereteink.

Függetlenül attól, hogy egy élőlény nokturnális (rágcsálók) vagy diurnális (ember), a vérben a leukociták száma, valamint különböző immunmodulátor molekulák (egyes citokinek és kemokinek) szintje is napi ingadozást mutat (1. táblázat) [162, 176]. Rágcsálókban a leukocita szám a világos fázisban éri el a maximumát, míg emberben a sötét fázis alatt a legmagasabb a sejtszám, tehát mindkét esetben az inaktív időszakra esik a maximum.

A leukocita *trafficking* cirkadián óra általi kontrolljának már több mechanizmusát is ismerjük [159, 177]. Az egyik ilyen mechanizmus a hemopoetikus őssejt (HSC) *niche* szabályozása a csontvelőben. A *niche* jellemzően arteriolákkal van körülvéve, valamint számos sejtípus és egyéb komponens alkotja. Ilyenek például a hemopoetikus őssejtek (HSC), az oszteoblasztok, endotélsejtek, CAR (CXCL12-abundant reticular) sejtek, különböző Nestin<sup>+</sup> és leptin receptort expresszáló sejtek, de szimpatikus idegvégződéseket és nem mielinizált Schwann-sejteket is találunk ebben a specifikus mikrokörnyezetben [178]. A HSC-ből differenciálódó összes sejt innen lép ki a keringésbe, ez pedig több ponton is szabályozott. A HSC-k csontvelőből a keringésbe történő kilépése napi ritmust követ, a sejtek mobilizációja pedig az inaktív fázis kezdetén jelentős. Ennek köszönhetően egéren a világos fázis elején (ZT5) megnő a vérben a HSC szám. Ennek szabályozója a CXCL12 kemokin ritmikus termelődése a csontvelői mikrokörnyezetben [179]. A kemokint főleg a Nestin<sup>+</sup>, valamint a CAR sejtek termelik. Amennyiben a CXCL12 szintje alacsony, a sejtek ki tudnak lépni a keringésbe. A szimpatikus idegrendszer szerepére utal, hogy egereken végzett kísérletek



során a szimpatektómia a Nestin+ sejtek proliferációját váltotta ki. Valamint a Nestin+ sejtek  $\beta_3$ -adrenerg receptorának aktiválása drasztikusan csökkenti a CXCL12 kifejeződést. A CAR sejtek száma és a progenitor sejtek proliferációja is oszcillál a nap folyamán. Emellett a CXCL12 receptora, a CXCR4 is ritmikus expressziót mutat, ugyanabban a fázisban változik a kifejeződése, mint a CXCL12 koncentrációja a csontvelői mikrokörnyezetben [179].

A vérben oszcilláló leukocita szám nem csak a csontvelőből történő ritmikus sejtkiáramlás következménye. A sejtek csontvelőbe történő visszatérése és különböző szövetekbe történő kilépése is ritmusan szabályozott. A csontvelő esetében ennek meghatározó faktorai az endotélsejtek felszínén ritmusan expresszálódó adhéziós molekulák, mint például a P-szelektin, az E-szelektin vagy a VCAM-1. Ezek kifejeződése egéren végzett kísérletek tanúsága szerint az éjszakai (aktív) időszakban volt maximális, hasonlóan a CXCL12 koncentrációhoz, ami szintén a sejtek *homing*-ját segíti. A vázizom esetében a sejtek adhézióját és extravazációját befolyásoló ICAM-1 és CCL2 kifejeződése mutat napi ingadozást [177]. A szimpatikus idegrendszer folyamatban betöltött szabályozó szerepét támasztja alá, hogy  $\beta_2$ - vagy  $\beta_3$ -adrenerg receptor deficiens egerekben sem a csontvelőbe, sem a vázizomba történő migráció nem ritmikus [159, 177].

**1. táblázat**

A vérben mérhető ritmicitást mutató immunológiai paraméterek ([163] alapján) (IL- interleukin, TNF $\alpha$ - tumor necrosis factor  $\alpha$ , ZT: Zeitgeber time)

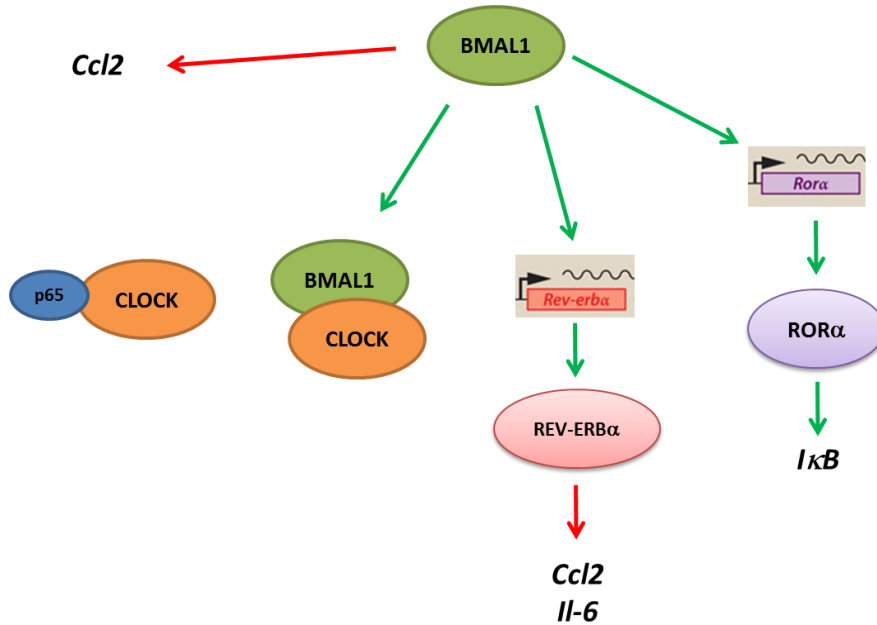
<b>Faj</b>	<b>Oscilláló paraméter</b>	<b>Akrofázis</b>	<b>Referencia</b>
<b>Humán</b>	Neutrofil granulocita szám	20:00	[160]
	CD4+ és CD8+ T-sejtek száma	2:00	[180]
	HSC szám	20:00	[181]
	TNF $\alpha$	07:30-13:30	[182]
	IL-2	12:00	[182]
	IL-10	07:30-19:30	[182]
	GM-CSF	13:30-19:30	[182]
<b>Egér</b>	Neutrofil granulocita szám	ZT5	[177]
	Monocita szám	ZT5	[177]
	Limfocita szám	ZT5	[177]
	Eozinofil granulocita szám	ZT5	[177]
	HSC szám	ZT5	[183]

### 3.6.1. Az cirkadián óra szerepe gyulladási folyamatok szabályozásában

Különböző gyulladási betegségek tüneteinek napszaki ingadozása régóta ismert. Például az allergiás kórképek tüneteinek reggel kifejezettebbek [184], az asthma bronchiale esetében pedig hajnalban alakulnak ki leggyakrabban a rohamok [185]. A rheumatoid arthritis (RA) jellegzetes tüneteinek, mint a reggeli időszakban kifejezett ízületi merevség, a duzzanat és a fájdalom [186] régóta a betegség differenciáldiagnosztikai elemei. A tünetek napi ingadozásának egyik oka lehet, hogy kora reggel magasabb koncentrációban vannak jelen az IL-6 és a TNF $\alpha$  gyulladási citokinek [187, 188]. Vizsgálták az óra hatását a RA állatkísérletes modelljében is. A kollagén-indukált arthritisnek jelentősen kifejezettebb klinikai jelei voltak megfigyelhetők a CRY génihiányos egerekben mint a vad típusú (WT) állatokban. Emellett a szérumban jelentősebb mértékben emelkedett a TNF $\alpha$ , az IL-1 $\beta$ , IL-6, a Wee-1 és a mátrix metalloproteináz-3 szintje is [189]. A CRY antiinflammatorikus hatását támasztja alá az is, hogy CRY1/2 génihiányos egerekben a cAMP szint és a PKA aktivitása megnő, emiatt pedig az NF $\kappa$ B útvonal konstitutívan aktív, így a gyulladási citokinek szintje többszörösére emelkedik [190]. Mindez arra utal, hogy az óraműködés vagy az egyes órakomponensek alapvető szabályozói az autoimmun eredetű gyulladási folyamatnak.

A CRY mellett más óraféhrjék szerepe is nyilvánvaló a gyulladási folyamatok és az NF $\kappa$ B útvonal szabályozásában (6. ábra) [191], ezen mechanizmusokat főként makrofágokban és fibroblaszt sejtekben vizsgálták. Például a BMAL1 közvetlenül gátolja a CCL2 kifejeződését [192]. Ez a kemokin fontos szabályozója a monociták szövetbe való vándorlásának gyulladási körülmények között, amennyiben koncentrációja csökken, kevesebb sejt jelenik meg a gyulladás területén. Ugyanakkor a CLOCK fehérrjéről ismert, hogy acetilálja és aktiválja a p65-öt, melynek eredményeként az NF- $\kappa$ B útvonal aktivitása megnő, több gyulladási mediátor keletkezik [193]. A BMAL1 a CLOCK kötésén keresztül gátolja ezt a mechanizmust. A BMAL1 a Rev-erb $\alpha$  kifejeződésének serkentésén keresztül is antiinflammatorikus hatású, ugyanis a REV-ERB $\alpha$  gátolja az *Il-6* és *Ccl-2* expressziót [194, 195]. Emellett a ROR $\alpha$  I $\kappa$ B (inhibitor  $\kappa$ B) kifejeződésére gyakorolt serkentő hatása is ismert [196]. Ez a faktor a fő negatív szabályozója az NF $\kappa$ B útvonalnak. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a legtöbb órakomponens hiánya proinflammatorikus hatású [164].

A bemutatott néhány példán kívül természetesen jóval több adat áll rendelkezésünkre a cirkadián óra és az immunrendszer kapcsolatáról [159, 163, 164, 191]. Ezek részletes ismertetése azonban túllépne ezen dolgozat keretein.



6. ábra

Az órafehérjék szerepe *Ccl2* expresszió és az NFκB útvonal szabályozásában.

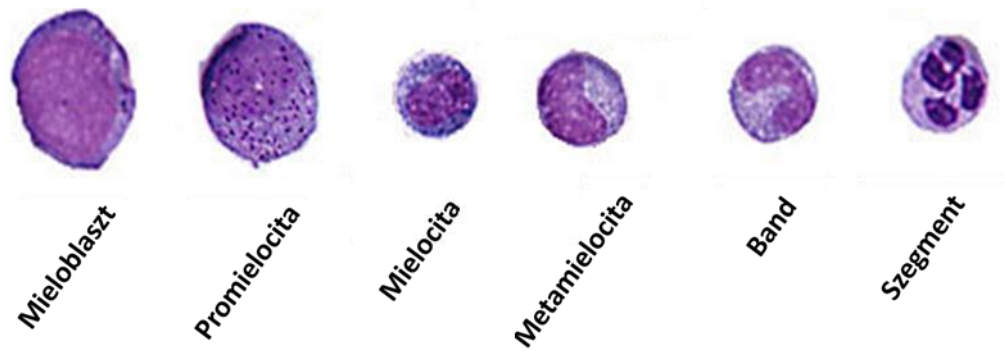
(ábra: [191] alapján) A bővebb magyarázatot lásd a szövegben.

### 3.7. Humán neutrofil granulociták

A neutrofil granulociták vagy polimorfonukleáris (PMN) sejtek a természetes immunitás sejtjei, nevüket a citoplazmájukban található neutrofil festődést mutató granulumokról, illetve szegmentált sejtmagjukról kapták. Elsődleges funkciójuk a kórokozók bekebelezése, ezért hivatásos fagocitáknak is nevezzük őket. Ezek a sejtek a legnagyobb arányban (~50-70%) jelen lévő leukociták a keringésben, azonban életidejük a periférián igen rövid, mindössze néhány óra [197-199]. Ebből adódóan a perifériás neutrofil granulocita populáció a nap folyamán megújul, naponta átlagosan  $10^{11}$  új sejt keletkezik [197].

#### 3.7.1. Humán neutrofil granulociták érése

A neutrofil granulociták a csontvelői hemopoetikus őssejtből (HSC) fejlődnek a közös mieloid progenitor (CMP) és granulocita-makrofág progenitor (GMP) útvonalon. A granulociták fejlődése során az első jól azonosítható alak a mieloblaszt vagy G-CFU (granulocyte colony forming unit). A sejtek proliferációjának szabályozója a G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), melynek hiányában neutropenia alakul ki. A sejtek csontvelői fejlődésük során jellegzetes morfológiai változásokon mennek keresztül (7. ábra). Az ovális magvú, primer azurofil granulumokat tartalmazó promielocitákból mielociták fejlődnek, melyekben már szekunder neutrofil granulumokat is találunk. Ez a fejlődési alak az utolsó az érés során, mely még osztódásra képes. A további fejlődési alakok már egészséges körülmények mellett is kikerülnek a perifériára: legkisebb arányban (0-2%) a metamielociták (jugend) vannak jelen a keringésben, a stab (band) forma aránya 0-4%, míg az érett szegment/polimorfonukleáris granulociták a perifériás leukocita populáció 50-70%-át alkotják. A promielocita stádium kivételével jellemző, hogy az érés során a sejtek mérete csökken. Emellett a citoplazma/sejtmag arány – a mag szegmentálódásának következtében – megnő a fejlődés során. A csontvelőben kétféle sejtpopulációt különböztethetünk meg. A mitotikus készlet az épp fejlődő és érő sejtekből, míg a posztmitotikus készlet az érett sejtekből áll.



7. ábra

**A sejtek fejlődési alakjai neutrofil granulocita irányú differenciáció során**

A magyarázatot lásd a szövegben (ábra: [200] alapján).

Az érés után a sejtek kikerülnek a keringésbe. Gyulladás során, amikor a sejtek gyors mobilizációja szükséges, a kemoattraktáns leukotriének (LTB<sub>4</sub>), a komplement fehérje C5a, a CXCL2, valamint a CXCL8 a folyamat szabályozói [201-204]. Ugyanakkor nem gyulladásos körülmények között a sejtek perifériára lépésének szabályozásában több faktor is részt vesz. A G-CSF gátolja a CXCL12 termelést, valamint a CXCR4 kifejeződését is, tehát ily módon lehetővé teszi a sejtek perifériára történő kilépését [205]. Emellett indukálja az endotélsejteken olyan faktorok megjelenését, melyek a neutrofil sejtek CXCR2 receptorának ligandumai. Ezek a folyamatok mind a neutrofil granulociták mobilizációját segítik elő, így a G-CSF az egyik meghatározó faktor a folyamat szabályozásában [206].

A neutrofilek a keringésben is folyamatos érésen mennek keresztül, majd preapoptotikus sejtekként térnek vissza a csontvelőbe, ahol makrofágok bontják le őket. A sejtek öregedése során csökken a sejtekben a CXCR2 kifejeződése, és párhuzamosan megnövekszik a *homing* szempontjából esszenciális CXCR4 receptor expressziója [206].

### 3.7.2. Humán neutrofil granulociták effektor funkciói

A neutrofil sejtek elsősorban a bakteriális és gombás fertőzések elleni védekezésben vesznek részt [207]. A patogének szervezetbe jutásakor különböző gyulladáscitokinek termelődnek, mint például az IL-1 $\beta$ , az IL-6 vagy a TNF $\alpha$  melyek hatására az érfal endotél sejtjei aktivált állapotba kerülnek. Ennek következménye, hogy különböző adhéziós molekulák jelennek meg az endotél felszínén, illetve az érfal a sejtek számára könnyebben átjárhatóvá válik, segítve a neutrofil granulociták transzendenteliális migrációját [208, 209]. A sejtek vándorlásuk során először gyenge kölcsönhatásba lépnek az érfallal, a sejt felszínén megjelenő mucinok és az endotélen megjelenő szelektinek összekapcsolódásán keresztül (elsősorban SLeX és E-szelektinek). Így a sejtek lelassulnak, majd az endotél felszínén gördülni kezdenek (*rolling*). Ezt követően a nagy affinitású integrin-ICAM kapcsolat kialakulása (LFA-1-ICAM-1) a sejtek letapadását eredményezi. Az endotélen megjelenő kemokinek (IL-8) és a sejtek felszínén lévő kemokinreceptorok (CXCR1) mindeközben fontos szerepet játszanak a neutrofil sejtek aktivációjában. A sejtek érfalon való átjutása (*diapedezis* vagy *extravazáció*) történhet két endotélsejt között, de transzcellulárisan is átjuthatnak a sejtek. A folyamatot az extracelluláris mátrix felszínén jelen lévő kemokinek is segítik. A sejteket a szövetek közé lépés után különböző kemoattraktánsok vonzzák a fertőzés helyszínére, melyek lehetnek bakteriális anyagok, mint például az fMLP (N-formil-metionin-leucin-fenilalanin), a komplement kaskád aktivációjakor keletkező kemoattraktánsok (pl. C3a, C5a), vagy más leukociták által termelt kemokinek (pl. IL-8) is. A kórokozók elpusztításakor a fagocitózis, a degranuláció, a reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelése, valamint a Neutrophil Extracellular Trap (NET) képzés [210] a neutrofil sejtek fő effektor funkciói. Emellett a sejtek különböző extracelluláris vezikulákat is termelnek, melyek például más immunsejtek citokinszekrécióját szabályozzák [211, 212], részt vesznek a trombocita aktiválásban [213, 214], de antibakteriális hatásukat is kimutatták [215].

A fagocitózis folyamatának első lépéseként a kórokozó megkötődik a neutrofil granulocita felszínén. Ez alapvetően három különböző receptortípus közreműködésével valósulhat meg, melyek vagy a kórokozó felszíni molekuláit, vagy a különböző opsoninek által fedett felszínét ismerik fel. A patogének felszínén jelen lévő konzervált

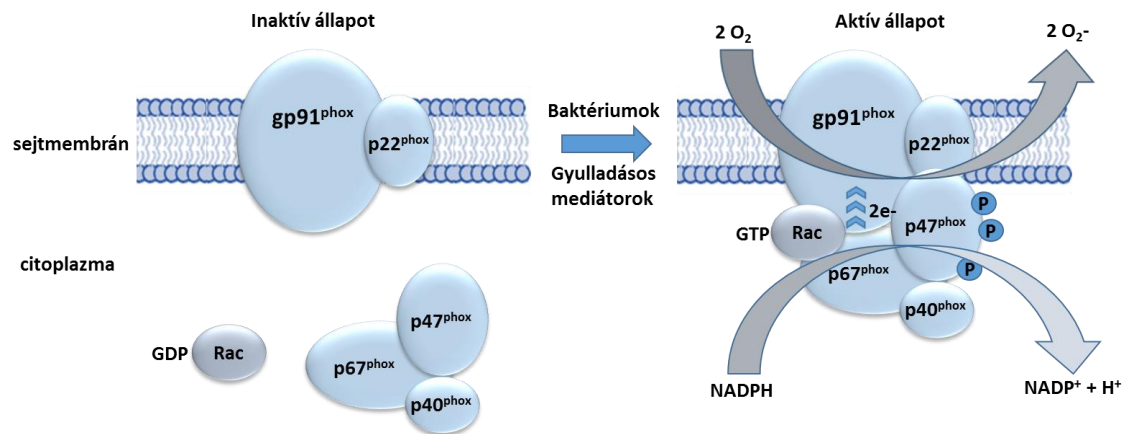
struktúrákat, a patogén asszociált molekuláris mintázatot (pathogen associated molecular pattern=PAMP) a sejtek a mintázatfelismerő receptoraik (Pattern Recognition Receptor=PRR) segítségével kötik meg. A PRR-k közül a Toll-like receptorok (TLR) a legismertebbek, melyek számos bakteriális és virális struktúrát ismernek fel, ilyenek például a bakteriális lipopeptidek (TLR1/2), a peptidoglikán (TLR2), a lipoteikosav (TLR2/6), az LPS (TLR4), a flagellin (TLR5), a virális RNS (TLR3, TLR7, TLR 8) illetve a bakteriális CpG DNS (TLR 9) [216]. A TLR aktiválódása az NF- $\kappa$ B útvonal közvetítésével citokinek, kemokinek és antivirális fehérjék képződéséhez vezet [217]. A PRR-k közül közvetlenül részt vesznek a bekebelezés megindításában a c-típusú lektin receptorok (Mannóz receptor és Dectin-1), illetve a scavenger receptorok (SR), melyek szénhidrátfelismerő doménekkal rendelkeznek. Ahhoz azonban, hogy a fagocitózis hatékonysága lényegesen nagyobb legyen, szükség van a kórokozó felszínének opszoninekkal (immunglobulinok, komplement komponensek) történő fedésére. A komplement fehérjékkel (C1q, C3b, iC3b, C3d, C4b) fedett idegen struktúrákat a komplement receptorok (CR), az ellenanyagokkal opszonizált részecskéket az immunglobulinok konstans doménjét felismerő Fc-receptorok (FcR) kötik meg. A komplement receptorok közül neutrofileken a CR1, CR3 (CD11b/CD18 vagy MAC-1) és CR4 (CD11c/CD18) expresszálódik. Az IgG-t felismerő Fc $\gamma$ R-k közül a Fc $\gamma$ RI-t, Fc $\gamma$ RIIa-t, Fc $\gamma$ RIIb-t valamint az Fc $\gamma$ RIIIb-t találjuk a sejteken, melyek közül az Fc $\gamma$ RIIa a legfontosabb a fagocitózis folyamatában. A patogén kötődése megindítja a patogén membránba süllyedését (CR aktiváció esetén), illetve az állábképződést (Fc $\gamma$ R aktiváció esetén), az aktin citoskeleton átrendeződik, majd lefűződik a fagoszóma. Ezután a fagoszóma a lizoszómával fuzionál, kialakul a fagolizoszóma, melyben az enzimek lebontják a bekebelezett kórokozót [218].

A neutrofil sejtek granuluma proteolitikus enzimeket és különböző baktericid anyagokat tartalmaznak, mint például katepszin-G, defenzinek, laktoferrin, lizozim, alkalikus foszfátáz, kollagenáz, zselatináz, valamint membránjukban számos receptor raktározódik (pl. CR1, CR3, CD14, CD16). A granulumok négy félek lehetnek: primer (azurofil), szekunder, terciér (zselatináz) granulumok vagy szekretoros vezikulák. A granulumok ürülése történhet az extracelluláris térbe, vagy a kórokozó bekebelezése során a fagoszómába is [219-221].



A NET képzés során a sejtmag membránja lebomlik, majd a DNS, a hiszton fehérjék és bizonyos granulum komponensek (pl. elasztáz, mieloperoxidáz, laktoferrin) az extracelluláris térbe kerülnek, melyek kialakítják az antibakteriális hatású hálózatot, a NET-et. A NET megkötí a kórokozókat, ezáltal fejt ki az antimikrobiális hatást [222-224].

A patogének elpusztításához elengedhetetlenek a reaktív oxigén származékok. A neutrofil granulociták szuperoxid termelésére képesek, mely a NADPH-oxidáz (NOX2, Phox) enzimkomplex működésével valósul meg. Ez az enzim öt alegységből épül fel: a plazmamembránban található komponensei a gp91<sup>phox</sup> és a p22<sup>phox</sup> fehérjék, míg a citoplazmában a p40<sup>phox</sup>, a p47<sup>phox</sup> és a p67<sup>phox</sup> alegységek találhatóak. Emellett a komplex működésében a Rac kis G-fehérje is részt vesz. A sejtek aktiválódása során a p47<sup>phox</sup> foszforilálódik, mely lehetővé teszi a citoplazmatikus komponensek membránhoz történő transzlokációját és a komplex összeépülését [225-227]. Az oxidáz működése során NADPH-ból NADP képződik és a felszabadult elektron szuperoxid anionná (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) redukálja a molekuláris oxigént (8. ábra). A szuperoxid anionból pedig további toxikus oxigénmetabolitok keletkezhetnek. A szuperoxid-dizmutáz (SOD) hidrogén-peroxidot (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) képez belőle, mely mieloperoxidáz (MPO) hatására először hipoklórossavvá, majd a későbbiekben klóraminokká és hidroxilgyökökké alakul, melyek toxikusak a baktériumokra és így részt vesznek a *killig* folyamatában. Emellett a keletkezett szuperoxid anion nitrogén-monoxiddal (NO) peroxinitritté (ONOO<sup>-</sup>) alakulhat, mely fehérjéket inaktiválhat nitrozilálásukon keresztül [228-231].



8. ábra

### A fagocita NADPH-oxidáz alegységei és aktiválódása.

A sejtek aktiválódása során a p47<sup>phox</sup> foszforilálódik, ami lehetővé teszi a citoplazmatikus komponensek membránhoz történő transzlokációját és a komplex összeépülését. Az enzim működése során NADPH-ből NADP képződik és a felszabadult elektron szuperoxid anionná (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) redukálja a molekuláris oxigént (ábra: [232] a szerző által módosítva).

A neutrofil granulociták működésének jelentőségét támasztják alá azok a betegségek, melyekben a sejtek valamilyen szempontból csökkent működést mutatnak [233-236]. A NADPH oxidáz működése bizonyos patogének hatékony *killig*-je szempontjából esszenciális, a ROS képzés pedig a NET-képződés előfeltétele [210]. Így az enzim defektusa miatt kialakuló krónikus granulomatózus betegségben (CGD) szenvedő betegek visszatérő fertőzésekkel küzdenek, mint például a légúti gyulladások vagy a csontvelőgyulladás. A krónikussá váló gyulladások következménye az immunsejtek burjánzása és a granulómák kialakulása a bőrben, a nyálkahártyában, a nyirokcsomókban és belső szervekben, csontokban és ízületekben [235, 237-239]. Ugyanakkor a neutrofil sejtek túlzott aktivitása is káros a szervezet számára, mert különböző autoimmun [240, 241] és gyulladásos betegségek [242] kialakulásához járulhat hozzá.

A neutrofil granulociták cirkadián óra általi szabályozottságáról keveset tudunk, azonban néhány kísérletes adat arra utal, hogy a sejtek válaszkészsége napi ritmust követ.

Szövetkárosodás, vagy endotoxin hatására a neutrofil sejtek szövetek közé vándorlása napi oszcillációt mutat, és ez összhangban van az endotélsejteken megjelenő

adhéziós molekulák kifejeződésének ritmusával [177]. Egér kísérletek során tett megfigyelések arra utalnak, hogy az epitelsejtek óra által vezérelt CXCL5 expressziója irányítja a neutrofil granulociták ritmusos vándorlását a gyulladáshoz vezető szövetbe [243]. Emellett régóta ismert, hogy a sejtek felszínén megjelenő adhéziós molekulák kifejeződése [244], a sejtek fagocitózis készsége [245] és szuperoxid termelése [246] is napi ingadozást mutat. A neutrofil granulociták száma oszcillál a vérben a nap folyamán [247, 248], valamint Casanova-Acebes és munkatársai egér modellben ritmikus neutrofil granulocita vándorlást figyeltek meg a csontvelő és a keringés között, melynek oka az előző fejezetben bemutatott CXCR4-CXCL12 interakció napi ingadozása [179]. Ezen eredmények mind arra utalnak, hogy a sejtek migrációs képességét és effektor reakcióit a cirkadián óra szabályozhatja.

Bár arra vonatkozóan ismerünk adatot, hogy a neutrofil granulocitákban és mononukleáris sejtekben (monociták, limfociták) azonos fázisban oszcillál a *Per1* kifejeződése [249], valamint a sejtek óragén expressziója megváltozik endotoxin kezelés hatására [250], a molekuláris oszcillátor működését még nem jellemezték részletesen ezekben a sejtekben.

#### 4. Célkitűzések

Számos adat támasztja alá a cirkadián ritmus és az immunrendszer kapcsolatát, azonban a molekuláris oszcillátor működéséről a különböző immunsejtekben keveset tudunk. A neutrofil granulociták a keringésben legnagyobb arányban található leukociták, szerepük pedig esszenciális a bakteriális és gombás fertőzésekkel szembeni védekezésben. Csökkent működésük 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 [246, 251-253], az ennek háttérében álló mechanizmusokról keveset tudunk. A sejtek ritmikus működésének megértése alapvető fontosságú a különböző gyulladásos folyamatok patomechanizmusának megismeréséhez és megfelelő kronoterápia tervezéséhez. Kísérleteink során azt tűztük ki célul, hogy humán neutrofil granulociták cirkadián óra általi szabályozását vizsgáljuk. Mivel donoraink kiválasztásánál alapvető szempont volt, hogy napi ritmusuk szerint nagyjából egységes populációt képezzenek, a sejtszintű vizsgálatok megkezdése előtt a donorok kronotípusának 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, validáljuk, és ennek eredménye alapján meghatározzuk a donorok lehetséges csoportját.
2. Meghatározzuk humán neutrofil granulociták óragén expressziós profilját RNS szinten 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 granulociták válaszkészségét (szuperoxid termelés, fagocitózis készség).

## 5. Módszerek

### 5.1. A Munich Chronotype Questionnaire magyar változatának validálása

Vizsgálatainkhoz a donorok kronotipizálását a Till Roenneberg és Martha Merrow által kidolgozott [117] Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) segítségével végeztük. Az angol nyelvű kérdőívet magunk fordítottuk magyarra (lásd eredmények 9. ábra), majd a validálás részeként a kérdőívet magyar nyelvről angolra fordítottuk vissza egy szakfordítóval. A visszafordított változat teljes egészében megfelelt az eredeti angol változatnak, igazolva az általunk készített magyar nyelvű kérdőív nyelvi és tartalmi helyességét. A Semmelweis Egyetem Általános Orvos, Fogorvos és Gyógyszerésztudományi karán élettant tanuló 780 egyetemi hallgató töltötte ki a kérdőívet 2009 és 2012 között. Erre minden esetben a téli időszámítási időszakban, az őszi szemeszter folyamán került sor. A kérdőívet eredetileg kitöltő 780 hallgató adatai közül végül 753-t használtunk fel az adatelemzésnél. Kizáró tényező volt az adatsor hiányos kitöltése, illetve ha a résztvevőnek a szabadnapokon kötött reggeli programja volt. A kérdőívet kitöltők átlagos életkora  $21,23 \pm 3,12$  év volt (18 és 35 év között), 97%-uk életkora 19 és 24 év közé esett, így a populációt kor szerint homogénnek tekintettük. A résztvevők 68%-a volt nő és 32%-a férfi, ez a nemek szerinti megoszlás más európai orvosi egyetemeken jellemző arányokhoz hasonló [254].

A kitöltött kérdőívek feldolgozásakor az adatokat a kérdőív eredeti internetes adatbázisába vittük be. Ennek előnye, hogy ezután egy automatizált rendszer számolja ki az 2. táblázatban bemutatott alvási paramétereket, melyek ezután letölthetőek. (A [https://www.bioinfo.mpg.de/mctq/core\\_work\\_life/core/core.jsp?language=eng](https://www.bioinfo.mpg.de/mctq/core_work_life/core/core.jsp?language=eng) honlapon elérhető az eredeti kérdőív.)

A kísérletsorozatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (etikai engedélyek száma: 87/2010 és 154/2011).

**2. táblázat**

Az MCTQ kérdőív segítségével meghatározható paraméterek

Az irodalomban elterjedt rövidítés		
BT <sub>w</sub>	bed time on work days	a lefekvés időpontja munkanapokon
SleepPrep <sub>w</sub>	time the participant turns the lights off on work days	a lámpaoltás időpontja munkanapokon
SL <sub>w</sub>	sleep latency on work days	a lefekvés és az elalvás között eltelt idő munkanapokon
SO <sub>w</sub>	sleep onset on work days	az elalvás időpontja munkanapokon
SE <sub>w</sub>	sleep end on work days	az ébredés időpontja munkanapokon
SI <sub>w</sub>	sleep inertia on work days (time after wake-up to getting out of bed)	az ébredés és a felkelés között eltelt idő munkanapokon
SD <sub>w</sub>	sleep duration on work days	alváshossz munkanapokon
SD <sub>w_corr</sub>	SD <sub>w</sub> corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	alváshossz munkanapokon korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
MSW	mid-sleep on work days	alvási középideő munkanapokon
AL <sub>w</sub>	use alarm or not on work days	ébresztőóra használata munkanapokon
BT <sub>f</sub>	bed time on free days	a lefekvés időpontja szabadnapokon
SleepPrep <sub>f</sub>	time the participant turns the lights off on free days	a lámpaoltás időpontja szabadnapokon
SL <sub>f</sub>	sleep latency on free days	a lefekvés és az elalvás között eltelt idő szabadnapokon
SO <sub>f</sub>	sleep onset on free days	az elalvás időpontja szabadnapokon
SE <sub>f</sub>	sleep end on free days	az ébredés időpontja szabadnapokon
SI <sub>f</sub>	sleep inertia on free days (time after wake-up to getting out of bed)	az ébredés és a felkelés között eltelt idő szabadnapokon
SD <sub>f</sub>	sleep duration on free days	alváshossz szabadnapokon

$SD_{f\_corr}$	$SD_f$ corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	alvászórási szabadnapokon korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
MSF	mid-sleep on free days	alvási középidő szabadnapokon
$AL_f$	use alarm or not on free days	ébredtőóra használata szabadnapokon
$LE_w$	light exposure (h) on work days	természetes fény mellett töltött idő munkanapokon
$LE_f$	light exposure (h) on free days	természetes fény mellett töltött idő szabadnapokon
$\emptyset LE$	average weekly light exposure (h)	heti átlagos természetes fény mellett töltött idő
$\emptyset SD$	average weekly sleep duration	heti átlagos alvászórási
$\emptyset SD_{corr}$	$\emptyset SD$ corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	heti átlagos alvászórási korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
$MSF_{sc}$	$MSF$ corrected for over-sleep on free days	az $MSF$ szabadnapokon mérhető megnövekedett alvászórási korrigált értéke
$MSF_{sasc}$	$MSF_{sc}$ corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	$MSF_{sc}$ korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
SJL	social jetlag ( $abs(MSW-MSF)$ )	szociális jetlag ( $MSW-MSF$ abszolút értéke)
$SJL_{corr}$	SJL corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	szociális jetlag korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
$SJL_w$	weekly SJL	heti szociális jetlag
$SJL_{w\_corr}$	$SJL_w$ corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	heti szociális jetlag korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
SDepr/week	accumulated sleep deprivation per week. Calculated by multiplying the difference between $\emptyset SD$ and $SD_w$ times Workdays/week	heti alváshiány a $\emptyset SD$ és $SD_w$ különbségéből számolva
$SDepr_{corr}/week$	SDepr/week corrected for age and sex according to the distribution in the entire database	SDepr/week korra és nemre korrigálva a teljes adatbázis alapján
Workdays/week	number of days participant goes to work per week	munkanapok száma hetente

## 5.2. A donorok kiválasztása és a kísérletek menete a leukociták óraműködésének vizsgálatához

A kísérletek során vénás vért vettünk egészséges, önkéntes donoroktól. A résztvevők (férfiak és nők egyaránt) életkora 20-35 év közötti volt. A kísérlet megkezdése előtt minden résztvevő aláírta az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága által jóváhagyott kísérleti beleegyező nyilatkozatot, valamint kitöltötte az MCTQ magyar nyelvű változatát [145, 147, 150]. A donorok szabályos munkabeosztással, valamint alvás-ébrenléti mintázattal rendelkeztek, az átlagos alváshossz munkanapokon  $7 \pm 0,9$  óra, szabadnapokon  $9 \pm 0,95$  óra volt. A donorok kiválasztásakor kizáró tényező volt, ha a jelentkező extrém kronotípusú volt (a hétközbenei alváshiánnyal korrigált alvási középido szabadnapokon ( $MSF_{sc}$ )  $<3$  óra vagy  $>7$  óra), krónikus vagy akut betegségben szenvedett, váltott műszakban dolgozott vagy *jetlag*-nek volt kitéve a kísérletet megelőző egy hónapban, illetve amennyiben rendszeresen szedett gyógyszert.

A 24 órás kísérletek esetében a résztvevők reggel 9 órára érkeztek a laboratóriumba. A vérmintákat 10, 13, 16, 19, 22, 1, 4 és 7 órakor vettük. A vérvételek között a donorok napja a saját szokásaiknak megfelelően telt (elhagyhatták az intézetet), de éjszaka a laboratóriumban tartózkodtak. Az alvást szabadon időzíthették este 22 és reggel 7 óra között. Minden résztvevő számára három alkalommal biztosítottunk étkezést: reggel 7 óra, dél és este 7 óra körül. Az esti vérvételek (22 óra után) alacsony fényintenzitás mellett zajlottak, a donorok lehetséges legminimálisabb zavarása mellett.

A kísérletsorozatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (etikai engedélyek száma: #10895-0/2011-EKU és 1563/2015).

## 5.3. Leukociták izolálása vénás vérből

A vérmintákat Vacutainer® CPT™ csövekbe (Beckton-Dickinson) (2x4 ml/ vérvétel) vettük, melyek Na-citrátot tartalmaztak antikoagulánsként. A mononukleáris és neutrofil sejtfракciókat ficoll gradiens segítségével különítettük el (centrifugálás szobahőmérsékleten, kilendülő rotorban 20 percig 1800 g-vel). A plazma mintákat



későbbi felhasználás céljából – 80 °C-on tároltuk. A mononukleáris sejteket a plazma alatti sejtgúyúrból, míg a neutrofil granulocitákat a vörösvérsejtek feletti frakcióból izoláltuk. A sejtek izolálása után a mintákban lévő vörösvérsejteket ozmotikus lízis révén, steril ACK oldatban (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,4) történő inkubálással elimináltuk. A minták tisztaságát metilénkékekkel való magfestéssel ellenőriztük. A mintákat csak abban az esetben használtuk a kísérletekhez, ha annak tisztasága legalább 97% volt. A preparálást követően a sejteket nem tároltuk, hanem azonnal elvégeztük a szükséges kísérleteket, illetve elkészítettük a preparátumokat.

#### 5.4. A plazma kortizol koncentráció mérése

A -80 °C-on tárolt plazma mintákban a kortizol koncentráció meghatározását elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche) segítségével végezték a Semmelweis Egyetem Izotóp laborjának munkatársai, a gyártó által javasolt protokoll szerint. A mért adatokat minden esetben az adott donor összes mintájában meghatározott koncentráció értékek átlagára normalizáltuk.

#### 5.5. Génexpresszió vizsgálata valós idejű PCR segítségével

Közvetlenül az izolálást követően a sejteket Tripure® reagens (Roche) segítségével lizáltuk. A sejtekből totál RNS-t preparáltunk a gyártó ajánlása szerint. Az izolált RNS minták minőségét (a 28S és 18S riboszomális RNS megfelelő elkülönülését) 1%-os agaróz gélen (1% agaróz, 1,75% formalin, MOPS pufferben) való futtatással ellenőriztük.

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 gyártó használati utasítása szerint. A *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Dbp*, *Rev-erba*, *Itgb2*, *Gp91<sup>phox</sup>*, *Cxcr4* és *β-aktin* gének relatív expresszióját a Light Cycler® 480 rendszer (Roche) használatával mértük, TaqMan hidrolízis próbák alkalmazásával. Referenciaként a *Gapdh* expresszióját

alkalmaztuk. A primerek és a TaqMan hidrolízis próbák szekvenciáit a 3. táblázat mutatja.

Annak érdekében, hogy kizárjuk az egyéni expresszióbeli különbségeket, és az expresszió mintázatát és amplitúdóját össze tudjuk hasonlítani, a 24 órás kísérletek esetében az eredményeket az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk és ábráztuk. Az adatok értékeléséhez a „második derivált maximuma” módszert alkalmaztuk, az analízist a LightCycler® Relative Quantification Software (Roche) használatával végeztük.

### **5.6. PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányba történő differenciáltatása**

A PLB-985 humán mieloid leukémia sejt vonal sejtjei DMSO kezeléssel neutrofil granulocita irányba differenciálthatóak [255-257]. A 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-os inkubátorban 5% CO<sub>2</sub> jelenléte mellett. A differenciáció ellenőrzése céljából vizsgáltuk a sejtekben a *Cxcr4* kemokin receptor, az *Itgb2* (CD18) és a NADPH oxidáz *Gp91<sup>phox</sup>* alegységének expresszióbeli változásait [258-260].

## 3. táblázat

A géneexpressziós vizsgálatok során használt primerek és Taqman hidrolízis próbák szekvenciái (F: forward primer, R: reverse primer).

Gén	Szekvencia
<i>Gapdh</i>	F 5'-ACATCGCTCAGACACCATG-3' R 5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3' próba 5'-FAM-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTC-TAMRA-3'
<i>Bmal1</i>	F 5'-TCCACTGACTACCAAGAAAGC-3' R 5'-CTGTTCATTTTATCCCGACGC-3' próba 5'-FAM-ATCTGACTGTGAGCTTCCCTTGCATT-TAMRA-3'
<i>Per1</i>	F 5'-CTAACCCCGTATGTGACCAAG-3' R 5'-CGCGTAGTGAAAATCCTCTTG-3' próba 5'-FAM-TACGAAGCTCCCCGGATACCCC-TAMRA-3'
<i>Per2</i>	F 5'-TGTTCCACAGTTTACCTCC-3' R 5'-TGGTAGCGGATTCATTCTCG-3' próba 5'-FAM-TGCTCCACTGCACATGCTCCA-TAMRA-3'
<i>Per3</i>	F 5'-ATCGTTCTCTGATGGTTGCC-3' R 5'-AGGGATTCACAAAGCTGGAC-3' próba 5'-FAM-ATCGAATGGGAGAATGTTCAAAGGGAGG-TAMRA-3'
<i>Dbp</i>	F 5'-TGCCCTATCAAGCATTCTG-3' R 5'-CCGGCTCCAGTATTTCTCATC-3' próba 5'-FAM-ACCTTTGACCCTCGAAGACATCGC-TAMRA-3'
<i>Rev-erba</i>	F 5'-ACCAAGTCACCCTGCTTAAG-3' R 5'-CATCACTGTCTGGTCCTTCAC-3' próba 5'-FAM-TGATGGTGCGCTTTGCTTCGTTG-TAMRA-3'
<i>Gp91<sup>phox</sup></i>	F 5'-AGGAGTTTCAAGATGCGTGG-3' R 5'-TTGAGAATGGATGCGAAGGG-3' próba 5'-FAM-TGGTGATGTTAGTGGGAGCAGGG-3'
<i>Cxcr4</i>	F 5'-TATGACTCCATGAAGGAACCCTGT-3' R 5'-AGCCTGTACTTGTCCGTCATGC-3' próba 5'-FAM-TCCTGCCACCATCTACTCCATCATC-TAMRA-3'
<i>Itgb2</i>	F 5'-TGTTGAGTGTAGTGGTCGTG-3' R 5'-TTCGAACTTCAGGCACTCG-3' próba 5'-FAM-CACCCTGTGGCAAGTACATCTCCT-TAMRA-3'
<i>β-aktin</i>	F 5' -ACCTTCTACAATGAGCTGCG-3' R 5' -CCTGGATAGCAACGTACATGG-3' próba 5' -FAM-ATCTGGGTCATCTTCTCGCGTTG-TAMRA-3'

## 5.7. Western blot analízis

A neutrofil granulocitákban igen magas a proteáz és foszfatáz aktivitás, ezért a fehérje degradáció és defoszforiláció minimalizálása érdekében a sejtizolálást követően az intakt sejteket előmelegített (95°C) 2x-es redukáló SDS-PAGE Laemlli mintapufferben (126 mM Tris-HCl, 20% glicerin, 4% nátrium-dodecil-szulfát, 0,02% brómfenolkék, + $\beta$ -merkaptoetanol, pH 6,8) szuszpendáltuk, majd 95°C-on 10 percig inkubáltuk.

A PLB-985 sejtekből teljes sejt lizátumot készítettünk. Minden minta esetében  $10^7$  sejtet 100  $\mu$ l lízis pufferben (30 mM Na-HEPES, 100 mM NaCl, 2% Triton-X-100, 20 mM NaF, 1 mM Na-EDTA, 1 mM Na-EGTA, 100 mM benzamidin, 0,02% diizopropil-fluorofoszfát, 1 % aprotinin, 1% proteáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich), 1% foszfatáz inhibitor koktél (Sigma-Aldrich), 1% fenil-metil-szulfonilfluorid, pH 7,5) vettük fel és 10 percig jégen inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 12 percig 14000 rpm-mel, 4°C-on centrifugáltuk, majd a felülúszót 2x-es redukáló Laemlli puffer hozzáadása után 5 percig 95 °C-on inkubáltuk.

A defoszforiláció vizsgálatához a mononukleáris sejtekből készült teljes sejt lizátumot (lásd PLB-985 sejt lizátum készítése) puffercsere után (Micro Bio-Spin®, Bio-Rad) CIP (Calf Intestinal Phosphatase) alkalikus foszfatázzal (New England Biolabs) kezeltük a gyártó ajánlása szerint.

A fehérjéket 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélen szeparáltuk, majd félszáraz blot technikával nitrocellulóz membránra vittük át őket. A teljes fehérje mennyiséget Ponceau S festéssel detektáltuk. A membránokat az antitesttel való fedést megelőzően TBS pufferrel (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5) mostuk, majd 5% tejport tartalmazó TBS pufferrel blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten billegtetve. Ezután anti-BMAL1 poliklonális ellenanyaggal (1:500 arányú hígításban 5% tejport tartalmazó TBS oldatban), anti-PER2 poliklonális ellenanyaggal (1:200 arányú hígításban 5% tejport tartalmazó TBS pufferben) (Michael Brunner laboratóriumából [261, 262]), illetve anti- $\beta$ -AKTIN monoklonális ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) (1:10000 arányú hígításban 5% tejport tartalmazó TBS pufferben) inkubáltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül billegtetve. Másodlagos ellenanyagként a BMAL1 és PER2 detekció esetében tormaperoxidázzal (HRP) konjugált nyúl Ig ellenes antitestet (Bio-

Rad), a  $\beta$ -AKTIN detektálás esetében HRP-vel konjugált egér Ig ellenes antitestet (Bio-Rad) alkalmaztunk 1:5000 arányú hígításban 5% tejport tartalmazó TBS pufferben. Az első és második antitestekkel történő inkubálások után a membránokat háromszor 10 percig mostuk TBS-sel. Az előhívás során a membránra ECL (enhanced chemiluminescence) oldatot (1,25 mM luminol, 0,2 mM kumarinsav, 0,01%  $H_2O_2$ , 100 mM Tris, pH: 8,5) pipettáztunk, az enzimreakció során keletkezett kemilumineszcens jelet pedig FUJI Super RX filmekken rögzítettük.

Az ábrákon a Western blot kísérletek töltéskontrolljaként a  $\beta$ -AKTIN szintek bemutatása mellett a membránok Ponceau S festése utáni képét is bemutatom, melyeknél a membrán azon része látható, ahol a specifikus antitestekkel detektálható jeleket is látjuk.

## 5.8. Leukociták immunfluoreszcens festése

A sejtizolálást követően a mononukleáris sejtek és a neutrofil granulociták ( $10^6$  sejt/ml HBSS) preparátumának 1-1 ml-ét egymással elegyítettük, majd e keverék sejtjeit fedőlemezre centrifugáltuk (300 rpm, 5 perc). A sejteket 20 percig 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk, majd PBS-sel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 2 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7,4) mostuk. Száradás után a lemezeket a további feldolgozásig  $-80^\circ C$ -on tároltuk. Feldolgozáskor a mintákat 15 percig permeabilizáló oldatban (0,5% BSA, 0,1% Tween20, 0,1% saponin PBS-ben oldva) inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd két mosási lépést követően 30 percig blokkoló oldatban (0,5% BSA HBSS-ben) tartottuk szintén szobahőmérsékleten. A mintákat affinitás-tisztított anti-BMAL1 poliklonális antitesttel (1:100 arányú hígításban blokkoló oldatban), illetve izotípus kontroll antitesttel (nyúl IgG 1:100 arányú hígításban blokkoló oldatban) inkubáltuk  $4^\circ C$ -on egy éjszakán keresztül. Két mosási lépés után (PBS) a mintákat ToPro®-3 Jodid (Life Technologies) magfestékkel (1:1000 arányú hígításban), illetve számrban termeltetett Alexa-488 konjugált nyúl Ig ellenes  $F(ab')_2$  másodlagos antitesttel (Life Technologies) (1:1000 arányú hígításban PBS-ben) inkubáltuk 30 percig  $4^\circ C$ -on. Ezután a lemezeket kétszer mostuk PBS-sel, majd Zeiss LSM710 lézer-scanning mikroszkóppal vizsgáltuk a festődést  $63\times/1.40$  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 és a képek értékeléséhez az ImageJ 1.48v szoftvert (NIH, USA) használtuk. A leukocita típusokat magfestődés alapján azonosítottuk. A kiértékelésnél a BMAL1 intenzitást egy sejten belül 2 megkülönböztetett ROI (Region of Interests) segítségével mértük: az egyik ROI a sejtmag, a másik a citoplazma volt. A ROI-k kijelölését a magfestés alapján, valamint az sejthatár alapján végeztük, ezután a ROI-kban az átlagos intenzitást mértük. Kontrollként az izotípus kontroll antitesttel festett mintákat használtuk. Az adatokat az azonos fedőlemezen lévő monocitákban mérhető átlagos sejtmagi intenzitásra normalizáltuk.

### **5.9. 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. A sejtsűrűséget előzetesen 3x10<sup>5</sup> sejt/ml-re állítottuk be. Ezután 300 ng/ml kortizolt (Sigma-Aldrich) vagy vehikulumot adtunk a sejtekhez és újabb 60 percig inkubáltuk őket.

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

A sejtizolálást követően a neutrofil granulocitákat 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. A mért értékeket az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk.

### **5.11. Perifériás vérminták hisztológiai festése**

A neutrofil granulociták érési stádiumainak elkülönítése céljából, ujjbegyből vett vérből tárgylemezre kenetet készítettünk. A kenetek száradása után May-Grünwald/Giemsa oldattal (Sigma-Aldrich) festést végeztünk a gyártó által javasolt protokoll szerint. Meander-vonal mentén haladva mintánként 100 sejtet számoltunk meg és a sejtmag szegmentáltsága alapján megállapítottuk, hogy milyen a fejlődési alakok százalékos megoszlása.

### **5.12. A plazma CXCL12 koncentrációjának meghatározása**

A CXCL12 koncentráció meghatározását a Human SDF-1 alpha ELISA Immunoassay kit (R&D Systems) segítségével végeztük, a gyártó által javasolt protokoll szerint. A mért adatokat minden esetben az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk.

### **5.13. Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének mérése**

A neutrofil granulociták szuperoxid termelésének követésére kemilumineszcens módszert alkalmaztunk, mellyel az extracelluláris tér felé és a fagoszómában történő szuperoxid termelés egyaránt követhető. Ennek során a sejteket HBSS-ben szuszpendáltuk fel, a sejtsűrűséget  $4 \times 10^6$ /ml-re állítottuk be. Ebből a szuszpenzióból 180  $\mu$ l-es mennyiségeket mértünk 96 lyukú fehér lemez mintatartóiba. A kísérlethez használt HBSS oldat 0,1  $\mu$ M DMSO-ban oldott lucigenint (Sigma-Aldrich) tartalmazott. A szuperoxid termelést 20  $\mu$ l opszonizált zimozán hozzáadásával indítottuk. Az opszonizáláshoz 15 mg zimozánt (Sigma-Alrich) 350  $\mu$ l kevert humán savóban (3 egészséges férfi donor szérumának egyenlő arányú keveréke) vettünk fel, majd a szuszpenziót 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A sejtek stimulálását követően a lumineszcencia intenzitását 37 °C-on 30 percig követtük Mithras LB 940 Multilabel Reader (Berthold Technologies) készülékben. Az eredmények értékeléséhez a lumineszcencia kinetikai görbék felszálló szárának meredekségét határoztuk meg.

#### 5.14. Neutrofil granulociták fagocitózis készségének meghatározása

A neutrofil granulociták fagocitózis készségének mérésekor opsonizált GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus*-t [263] használtunk. A baktériumok opsonizációjához  $9 \times 10^8$  baktériumot szuszpendáltunk 900  $\mu$ l HBSS+ oldatban (HBSS oldat, amely tartalmaz 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -t, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ -t, 0,1% glukózt, 10 mM HEPES-t és 0,25% BSA-t, pH 7,4), majd 100  $\mu$ l kevert humán savót adtunk hozzá és 37°C-on 20 percig inkubáltuk. Ezután PBS pufferben mostuk a baktériumokat, majd  $5 \times 10^6$  baktériumot és  $5 \times 10^4$  neutrofil sejtet kevertünk össze és 12 mm átmérőjű üveg fedőlemezre centrifugáltuk őket (5 perc, 300 rpm). Ez után 37°C-on 10 percig inkubáltuk a lemezeket 5%  $\text{CO}_2$  jelenlétében. Egy mosási lépést követően a mintákat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd Zeiss LSM710 lézer-scanning mikroszkóppal vizsgáltuk őket 63 $\times$ /1.40 oil DIC M27 immerziós objektívet használva (Plan-Apochromat, Zeiss). A képeket a ZEN 2011 SP2 black edition (Zeiss) szoftver segítségével készítettük. A minták értékelésekor 100 neutrofil granulocitát számoltunk meg és meghatároztuk a sejtek fagocitózis indexét (bekebelezett baktériumok száma/100 neutrofil sejt).

#### 5.15. 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 módszert 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. Az akrofázisok azt az időpontot jelentik, amikor a vizsgált paraméter maximuma esik a statisztikai analízis szerint.

Az ábrákon az adatokat minden esetben átlag  $\pm$  standard hibaként (S.E.M.) ábrázoltuk. A különbségeket  $p < 0,05$  esetén tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.



## 6. Eredmények

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

Az ember cirkadián ritmusának meghatározásához alkalmazható legkönnyebb és legelterjedtebb módszer az alvás/ébredés ritmus vizsgálata. Az alvás/ébredési ciklusok kialakításában homeosztatis és szociális faktorok, valamint a cirkadián óra is részt vesznek. Az alvás/ébredés időzítése nagy egyéni variabilitást mutat, mintázatát kérdőívek segítségével [117, 264] és aktigráfias mérésekkel [265] is követhetjük. A leggyakrabban használt kérdőívek egyike a Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) [264, 266-268], mely az egyén alvási időzítését és fizikai aktivitását preferencia alapú kérdésekkel méri fel, és a válaszok alapján kapott pontszám jellemzi az egyén ritmusának korai vagy késői jellegét. Ez a pontszám jó összefüggést mutat a ritmust jellemző számos élettani paraméter fázisával, ilyenek a testhőmérséklet ingadozása [269, 270], a kortizol- [271, 272], valamint a melatonin koncentráció napi ingadozása [273-275]. Ezzel szemben az általunk használt Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) [117] pontos időpontok felvételével külön méri fel a hétköznapi és hétvégi alvási mintázatot, így lehetőséget ad az alvófázis megállapítására. Ennek jellemzője a munkanapokon (MSW) és a szabadnapokon (MSF) mért alvási középido. Ezen paraméterek különbsége pedig a szociális jetlag (SJL). Az MSF szabadnapokon mérhető megnövekedett alvashosszra korrigált értéke a kronotípust számszerűen jellemző  $MSF_{sc}$ . Nagy előnye az MCTQ-nak, hogy a kérdőív 2002-es kidolgozása óta a világ sok országából már nagy számú adat ( $n > 150000$ ) gyűlt össze, valamint összehasonlítva a preferencia alapú kérdőívekkel, a szabadnapokon mérhető alvási paraméterek jobb korrelációt mutatnak a melatonin kezdeti emelkedésével [276], így jobb indikátorai az egyén ritmusának. A fenti előnyök mellett azért is esett a választásunk e kérdőívre, mert egy, a dolgozatban nem tárgyalt, de a felméréshez szorosan kapcsolódó tanulmányhoz szükségünk volt a SJL meghatározására. A kérdőív segítségével a 2. táblázatban bemutatott paraméterek felvételére nyílik lehetőség. Az angol nyelvű kérdőív magyarra fordítása után (9. ábra) szükség volt a kérdőív validálására. Ehhez egyrészt a kérdőívet magyar nyelvről angolra fordítottuk vissza, a nyelvi és tartalmi helyesség

ellenőrzésének céljából, valamint 2009 és 2012 között a Semmelweis Egyetem 753 hallgatójának bevonásával teszteltük.

A 4. táblázatban a teljes mintában (n=753), valamint a nők és férfiak esetében külön külön mért MSF, MSW, MSF<sub>sc</sub>, valamint SJL értékeket tüntettük fel. Korábbi irodalmi adatokkal megegyezően [117, 119] az általunk felvett adatok esetében az átlagos MSF<sub>sc</sub> 4 óra 04 perc, az átlagos szociális jetlag 1 óra 24 perc. Emellett a férfiaknál szignifikánsabban későbbi kronotípus (MSF<sub>sc</sub>) volt mérhető, mint nők esetében.

#### 4. táblázat

MSF, MSW, MSF<sub>sc</sub> és SJL értékek a teljes mintára, illetve a nők és férfiak esetében mért értékek összehasonlítása. Az adatokat átlag ± S.E.M.-ként ábrázoltuk (t-próba, n=753).

	Összes	Férfiak	Nők	p
MSF (helyi idő, óra:perc)	4:50 ± 0:02	5:03 ± 0:05	4:45 ± 0:03	0,001
MSW (helyi idő, óra:perc)	3:27 ± 0:02	3:36 ± 0:04	3:23 ± 0:02	0,001
MSF <sub>sc</sub> (helyi idő, óra:perc)	4:04 ± 0:02	4:18 ± 0:04	3:57 ± 0:02	<0,001
SJL (óra:perc)	1:24 ± 0:02	1:28 ± 0:04	1:22 ± 0:02	0,23

A fény az egyik legfontosabb *Zeitgeber* a cirkadián ritmus szempontjából, így nem meglepő, hogy a kronotípus szoros korrelációt mutat a napfelkelte időpontjával, illetve a földrajzi szélességgel. Bár egy időzónán belül a „szociális idő” azonos, a napfelkelte időpontjában akár 1 órás eltérés is lehet. Roenneberg és munkatársai 2007-ben publikált adatait felhasználva a közép-európai időzónában mérhető kronotípus-földrajzi szélesség összefüggésről [277] megvizsgáltuk, hogy az általunk mért alvási középideő adatok illeszkednek-e a bemutatott összefüggés egyenesére. A korábban publikált adatokkal együtt a pontok Németország nyugati határától egészen Budapestig nyugat-keleti irányban lefedik a teljes időzónát. Az adatokból látható (10. ábra), hogy az időzónán belül is szoros az összefüggés a földrajzi elhelyezkedés és a kronotípus között, valamint, hogy a budapesti adatok jól illeszkednek az egyenesre.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az MCTQ kérdőív magyar nyelvű változatával az irodalmi adatok reprodukálhatóak, így a kérdőívet validálnak, illetve a további kísérletekben felhasználhatónak tekintettük.

**München-kronotípus kérdőív (Roenneberg és mtsi)**

Az alábbi kérdőív alvási szokásaival kapcsolatban tartalmaz kérdéseket.

Kérjük, töltsse ki az Önre jelenleg legjellemzőbb adatokkal! Fontos, hogy valamennyi kérdésre adjon választ, mert csak ebben az esetben tudjuk a kérdőívet értékelni.

**SZEMÉLYI ADATOK**

KÓD: \_\_\_\_\_ Kor: \_\_\_\_\_ év

Nem: Férfi Nő (karikázza bel)

Magasság: \_\_\_\_\_ cm

Testsúly: \_\_\_\_\_ kg

Lakóhely: \_\_\_\_\_ (csak a helység neve és irányítószáma szükséges, ahol hétközben lakik, pl. 1094 Budapest)

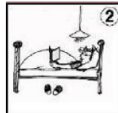
Munkanapjaimnak (ide értendő az is, ha pl. háziasszonyként otthon dolgozik vagy iskolába, egyetemre jár) szabályos a napirendje (karikázza be a megfelelőt!):

igen nem

Amennyiben igen, a hét hány napját tölti e napirend szerint? \_\_\_\_\_

**MUNKANAPOK**

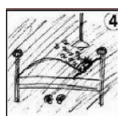
\_\_\_ óra \_\_\_ perckor fekszem le.



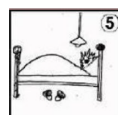
Vegye figyelembe, hogy van, aki egy darabig még ébren van lefekvés után!



Általában \_\_\_ óra \_\_\_ perctől készülődöm elaludni (pl. lámpaoltás időpontja).



\_\_\_ percre van szükségem, hogy elaludjam.

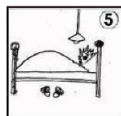


\_\_\_ óra \_\_\_ perckor ébredek.

Ébresztőóra Ébresztőóra nélkül (A megfelelőt karikázza bel)



\_\_\_ perc múlva kelek fel az ágyból.



\_\_\_ óra \_\_\_ perckor ébredek.

Ébresztőóra Ébresztőóra nélkül (A megfelelőt karikázza bel)

**SZABADNAPOK**

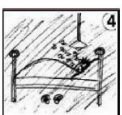
\_\_\_ óra \_\_\_ perckor fekszem le.



Vegye figyelembe, hogy van, aki egy darabig még ébren van lefekvés után!



Általában \_\_\_ óra \_\_\_ perctől készülődöm elaludni (pl. lámpaoltás időpontja).



\_\_\_ percre van szükségem, hogy elaludjam.



\_\_\_ perc múlva kelek fel az ágyból.

Kérjük, írjon egy 1-2 szavas megjegyzést, amennyiben pillanatnyilag NINCS arra lehetősége, hogy szabadon határozza meg, mennyit alszik a szabadnapokon (pl. gyermekek, háziállatok, edzés stb. miatt):

**Természetes fény mellett töltött idő**

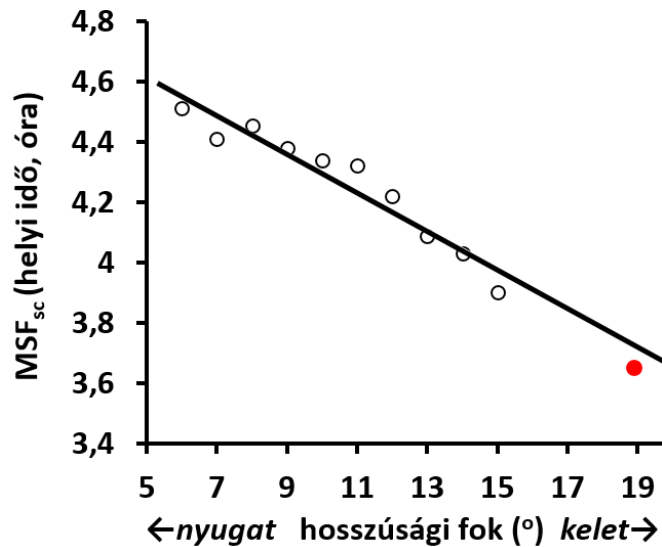
Átlagosan mennyi időt tölt naponta a szabad ég alatt, utcán, kertben, stb.?

Munkanapokon \_\_\_ órát \_\_\_ percet.

Szabadnapokon \_\_\_ órát \_\_\_ percet.

**9. ábra**

**A Munich Chronotype Questionnaire általunk használt részének magyar nyelvű változata**



10. ábra

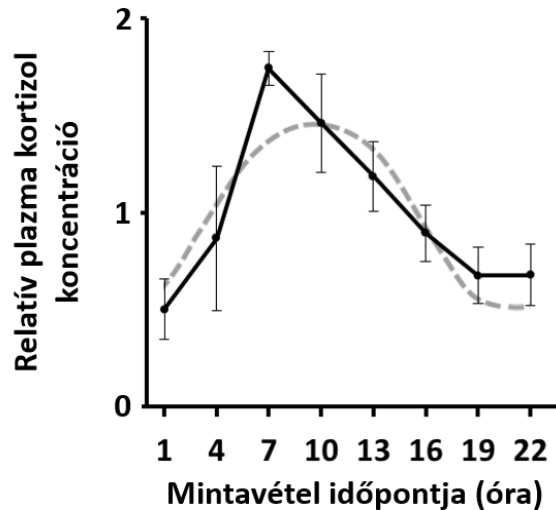
**A kronotípus (MSF<sub>sc</sub>) átlagának változása földrajzi elhelyezkedés (hosszúsági fok) szerint.**

A kronotípust (MSF<sub>sc</sub>) korra és nemre korrigáltuk és helyi idő szerint ábráztuk. üres szimbólumok: korábban publikált adatok ( $r=0,96$ ,  $p<0,001$ , [277]), piros szimbólum: Semmelweis Egyetem, Budapest (keleti hosszúság: 19.04°) ( $n=753$ ).

## 6.2. Neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek óragén expressziójának összehasonlítása

Számos adat utal arra, hogy a különböző hemopoetikus eredetű sejtekben, mint a makrofágok, eozinofil granulociták, T- és B-limfociták, dendritikus sejtek, NK sejtek és monociták, működik a molekuláris óra [167-175]. Bár korábban kimutatták, hogy óragének a neutrofil granulocitákban is expresszálódnak [249, 250], egyértelmű bizonyíték nem állt rendelkezésünkre arról, hogy működik-e a molekuláris oszcillátor ezekben a sejtekben. Munkánk során először azt szeretnénk volna megvizsgálni, hogy milyen a fő órakomponensek expressziójának napi mintázata humán neutrofil granulocitákban. A kísérletekhez az általunk magyarra fordított és validált MCTQ kérdőívet kitöltők közül 6 egészséges, átlagos kronotípusú (3 óra  $<MSF_{sc}< 7$  óra) önkéntes donort választottunk. A kísérlet során délelőtt 10 órától másnap reggel 7 óráig 3 órás időközönként vettünk vénás vért a donoroktól. A kísérletek során minden időpontban meghatároztuk a plazma kortizol koncentrációt is. A kortizol koncentráció napi ingadozásának ellenőrzésével a donorok napi ritmusának intakságát igazolhatjuk,

másrészt a túlzottan magas kortizol koncentráció utalhatna a mintavételezés alatti akut stresszre [278]. A vártnak megfelelően a plazma kortizol koncentráció napi ritmust mutatott, melynek maximuma a délelőtti órákban volt mérhető (akrofázis: 9 óra 33 perc) (11. ábra), valamint az értékek minden donor esetében a normál tartományon belül (<25 µg/dl) maradtak.



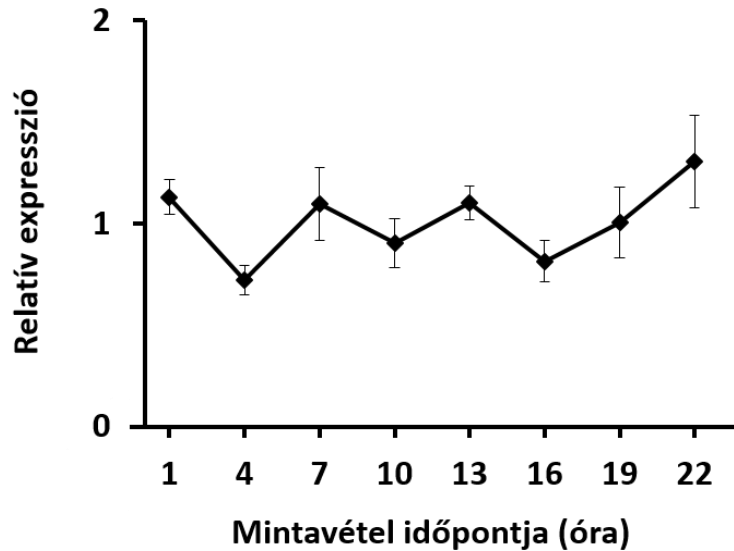
11. ábra

#### A plazma kortizol koncentráció napi ingadozása

A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk (n=4, átlag ± S.E.M.). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (\*p<0,05, cosinor analízis, akrofázis: 9 óra 33 perc).

A sejtek kipreparálása után az RNS izolálást és cDNS szintézist követően valós-idejű PCR-rel vizsgáltuk a molekuláris óra fő komponenseinek kifejeződését. A kísérleteknél kontrollként ugyanazon vérmintákból a mononukleáris sejteket is szeparáltuk és vizsgáltuk, mivel irodalmi adatok alapján [169, 173, 279] ezekben a sejtekben biztosan működik a molekuláris óra, azaz jó összehasonlítási alapnak szolgálhatnak a neutrofilek óraműködésének vizsgálatokor. A mononukleáris sejtek és a neutrofil granulociták óragén expressziós mintázatának összehasonlításakor a *Bmal1*, a *Per1*, a *Per2*, a *Per3*, a *Dbp* és a *Rev-erba* órakomponensek expresszióját vizsgáltuk. Referenciaként a *Gapdh* háztartási gént használtuk, mivel ezt a referenciát korábban már több leukocita típus ritmusának vizsgálatokor is sikerrel alkalmazták [168, 280-282]. Tekintve, hogy a leukociták ritmusának vizsgálatokor szintén gyakran használt

referencia gén a  $\beta$ -aktin [171, 173, 279, 283], a *Gapdh* expressziót  $\beta$ -aktin expresszióra normalizálva ellenőriztük, hogy a neutrofil granulocita sejtekben a *Gapdh* kifejeződése mutat-e esetleg napi ritmust. Az irodalomban bemutatott sejtípusokhoz hasonlóan a neutrofil granulocitákban sem ritmusos a kifejeződése (12. ábra).

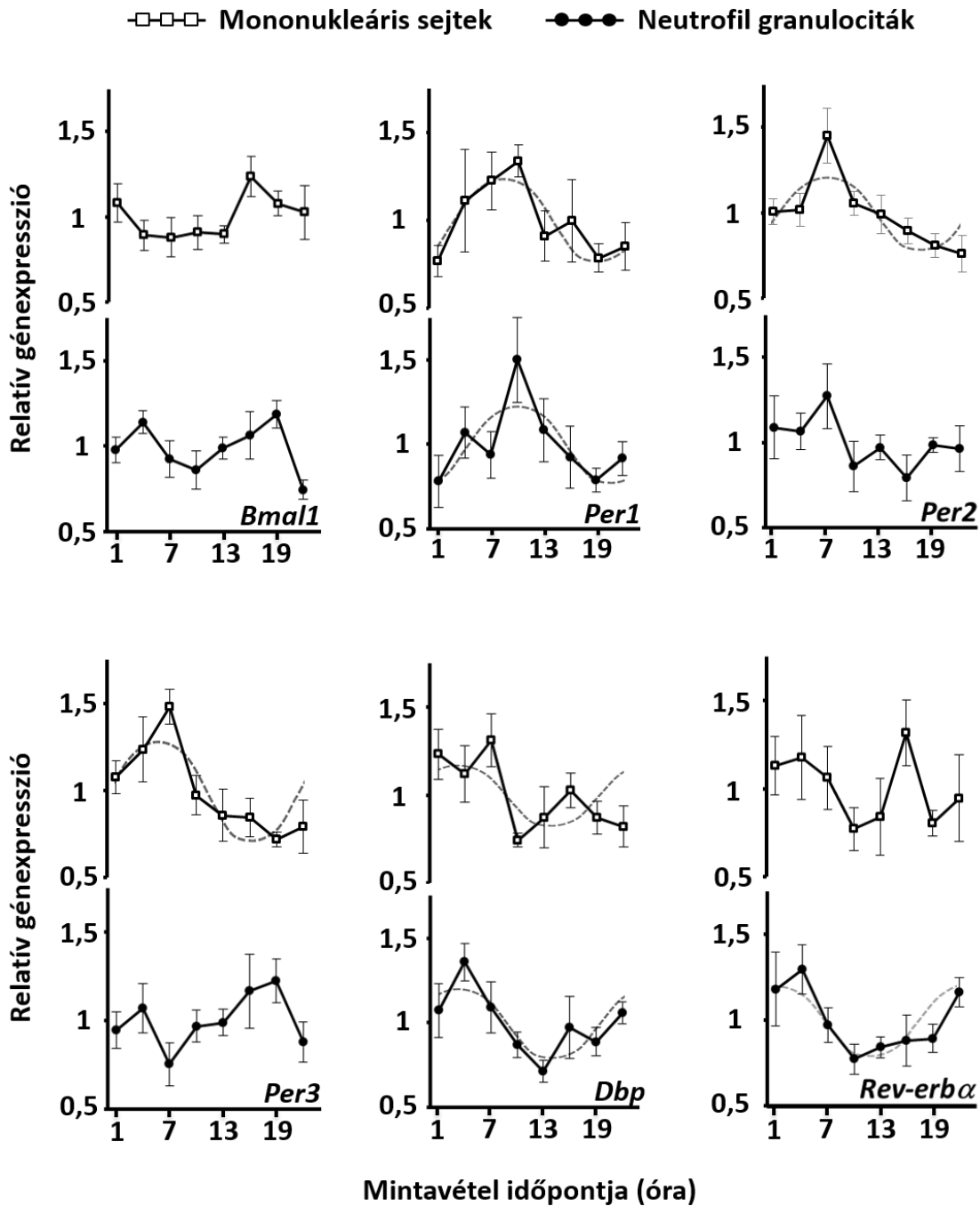


12. ábra

**A neutrofil granulocitákban mérhető *Gapdh* expresszió a nap folyamán.**

A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Referenciaként  $\beta$ -aktint alkalmaztunk. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk (n=6, átlag  $\pm$  S.E.M., p=0,418, cosinor analízis).

A mononukleáris sejtek esetében a *Per1*, a *Per2*, a *Per3* és a *Dbp* expresszió az irodalomban korábban leírtaknak megfelelő fázisban és amplitúdóval oszcillált [169, 173, 279]. A *Bmall* expressziója tendenciózus ingadozást mutatott (p=0.055), a *Rev-erba* expresszió pedig egyáltalán nem mutatott 24 órás ritmust (13. ábra, 5. táblázat). Ezzel szemben a neutrofil granulociták esetében csak a *Per1*, a *Dbp* és a *Rev-erba* esetében tapasztaltunk alacsony amplitúdójú de szignifikáns oszcillációt, míg a *Per2*, a *Per3* és a *Bmall* kifejeződése nem volt ritmusos (13. ábra, 5. táblázat). Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a két sejtpopuláció óragén expressziós mintázata alapvetően különbözik.



13. ábra

**Az óragének expressziós mintázatának összehasonlítása mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban.**

A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Referenciaként *Gapdh*-t alkalmaztunk. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk (n=6, átlag ± S.E.M.). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (\*p<0,05, cosinor analízis, az akrofázisokat az 5. táblázat mutatja).

## 5. táblázat

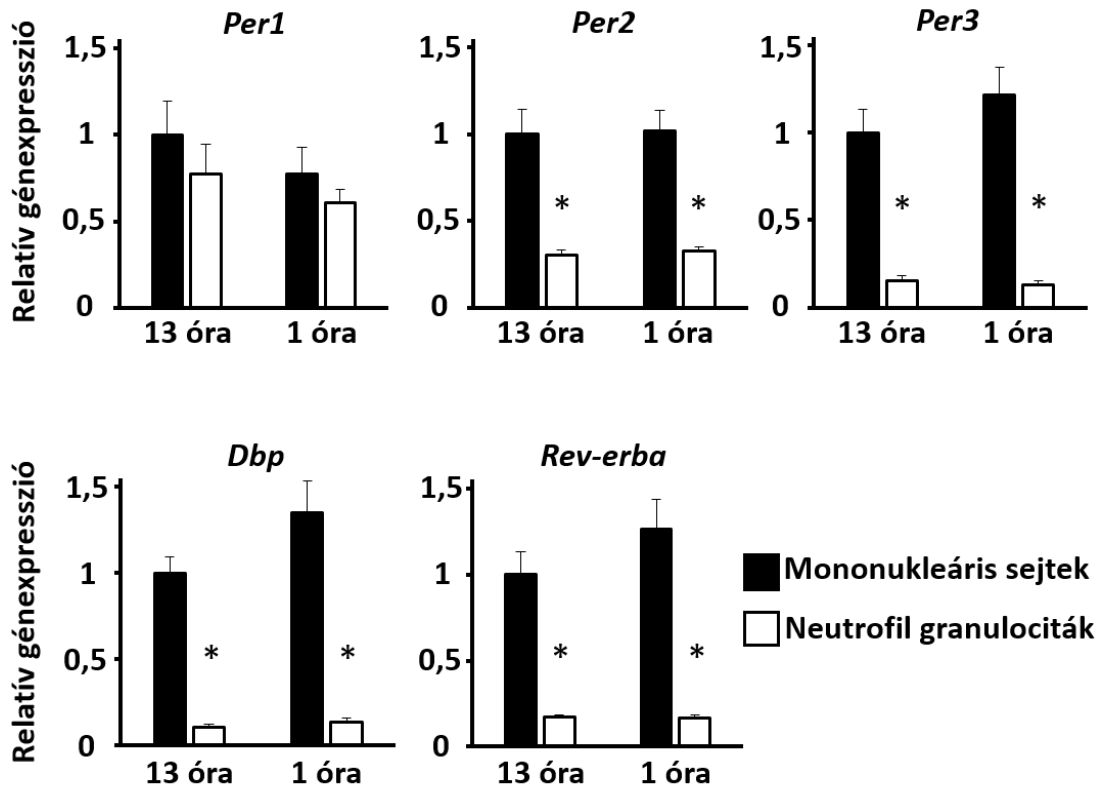
Az óragének expressziójának akrofázisai mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban.

Sejttípus	Óragén	Akrofázis (óra:perc)	p
Mononukleáris sejtek	<i>Per1</i>	8 : 26	0,0128
	<i>Per2</i>	7 : 15	0,0002
	<i>Per3</i>	5 : 46	0,0001
	<i>Dbp</i>	3 : 44	0,0400
Neutrofil granulociták	<i>Per1</i>	9 : 51	0,0308
	<i>Dbp</i>	2 : 40	0,0024
	<i>Rev-erba</i>	1 : 24	0,0022

Mivel előfordulhat, hogy a háztartási gének, így a *Gapdh* expressziója is különbözik a két sejttípus között, a következő összehasonlításban a *Bmall* expressziót használtuk referenciaként, mint az óraműködés belső kontrollja. Feltételeztük, hogy ha két különböző sejtben a molekuláris óra hasonlóan és szinkronban működik, egy adott időpontban az óragének kifejeződésének aránya is hasonló kell, hogy legyen. Az elemszám növelése érdekében ehhez a kísérlethez további donorokat is bevontunk a vizsgálatba és meghatároztuk az óragének *Bmall* expresszióhoz viszonyított kifejeződését délután 13 és éjjel 1 órakor, ugyanis ezekben az időpontokban mindkét sejttípus esetén átlaghoz közeli volt az óragének expressziója (lásd 13. ábra), így ezen kiértékelést alkalmazva az esetleges amplitúdóbeli különbségek nem befolyásolják az összehasonlítást. Bár a *Per1* expresszió nagyon hasonlóan bizonyult a kétféle sejtben, a *Per2*, a *Per3*, a *Dbp* és a *Rev-erba* aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a neutrofil granulocitákban (14. ábra).

Ezen eredményeink is megerősítik, hogy a molekuláris óra másképpen működik a neutrofil granulocitákban, mint a mononukleáris sejtekben.





14. ábra

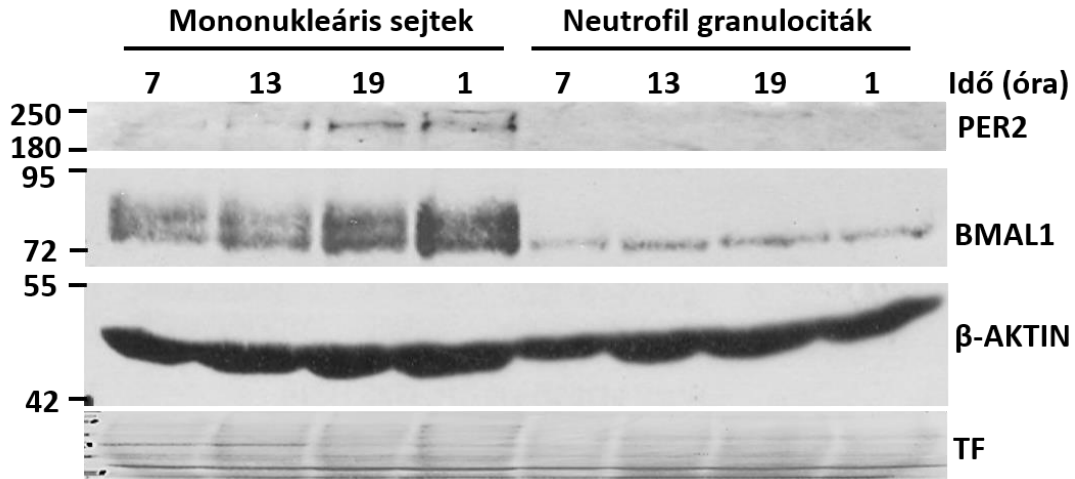
Az órakomponensek aránya mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban.

A vérmintákat délután 13 órakor és éjjel 1 órakor vettük. Referenciaként *Bmal1*-et alkalmaztunk. Az adatokat mindig az adott donor 13 órás mintájában mért értékre normalizáltuk (n=10-12, átlag + S.E.M., \*p<0,05, ANOVA, Bonferroni módszer).

### 6.3. Neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek PER2 és BMAL1 fehérje expressziójának összehasonlítása

A következő kísérlet során összehasonlítottuk a mononukleáris és a neutrofil frakciókban a PER2 és BMAL1 fehérjék expresszióját. A sejteket 7, 13, 19 és éjjel 1 órakor izoláltuk, majd a fehérjék kifejeződését Western blottal vizsgáltuk. Míg a mononukleáris sejtek esetében minden vizsgált időpontban gyenge intenzitással, de detektálható volt a PER2 fehérje, a neutrofil mintákban nem volt kimutatható (15. ábra). A mononukleáris sejtekben a BMAL1 expressziója, hasonlóan az RNS expresszióhoz (lásd 13. ábra), emelkedett a nap folyamán. Ezzel szemben a neutrofil granulocitákban nem volt napi ingadozás a fehérje kifejeződésében. Továbbá, míg a mononukleáris frakcióban két különböző elektroforetikus mobilitással rendelkező fehérje forma jelent

meg, a neutrofil granulocitáknál csak a magasabb elektroforetikus mobilitású BMAL1 frakció volt detektálható (15. ábra).

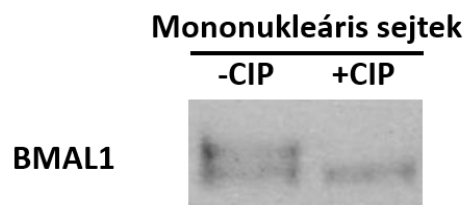


15. ábra

**PER2 és BMAL1 expresszió összehasonlítása mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban Western blot analízissel.**

A sejteket a feltüntetett időpontokban izoláltuk. A bal oldalon található számok a molekulásúly markert (kDa) jelölik. Töltéskontrollként a teljes fehérjemennyiséget (TF) és a  $\beta$ -AKTIN expressziót alkalmaztuk.

A BMAL1 fehérje számos oldalláncon foszforilálódhat, ez a foszforiláció pedig fontos szabályozója a fehérje aktivitásának [45, 52, 53]. A következő kísérletben mononukleáris sejtekből készült teljes sejt lizátumot kezeltünk alkalikus foszfátazzal. Ennek következtében a BMAL1-nek csak a nagyobb elektroforetikus mobilitású formája volt detektálható a Western bloton (16. ábra), ami arra utal, hogy a különböző BMAL1 formák a foszforiláltsági állapotukban térnek el egymástól.



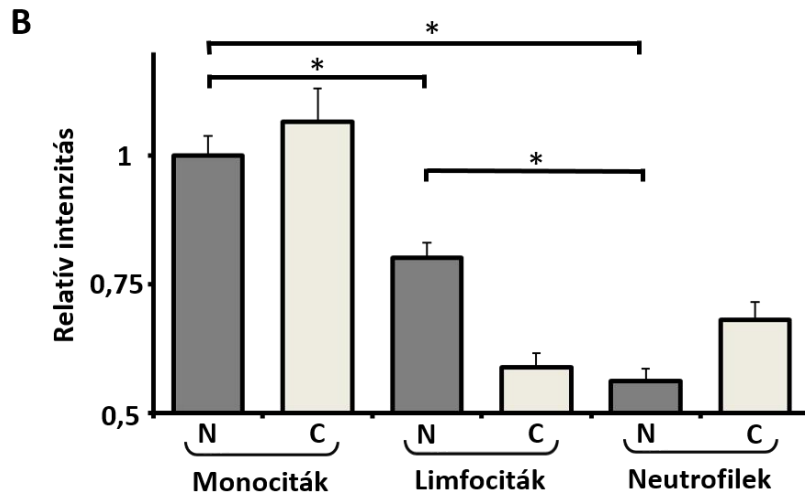
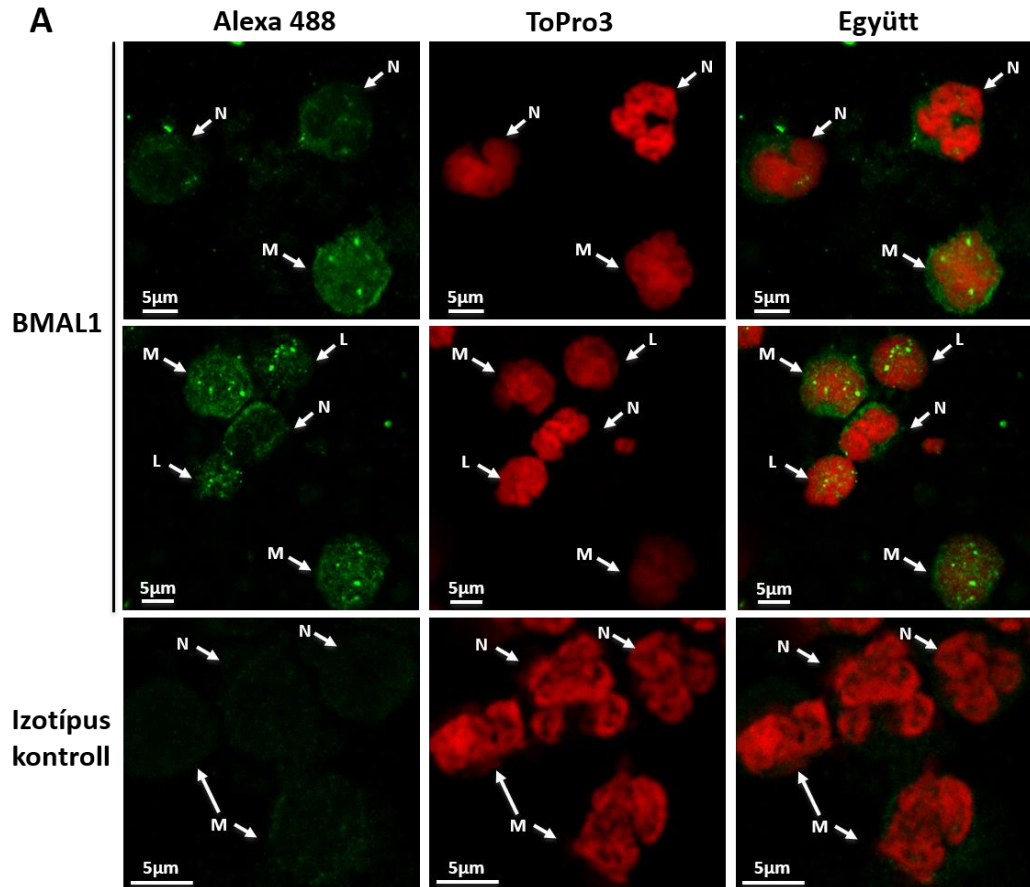
16. ábra

**Mononukleáris sejtekből készült sejt lizátum kezelése alkalikus foszfátazzal.**

Kontroll (-CIP) és alkalikus foszfátáz kezelés (+CIP). Az immundetektálást anti-BMAL1 antitesttel végeztük.

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a BMAL1 foszforiláltsági állapota pozitívan korrelál a sejtmagban való felhalmozódásával [52]. Ezért a következő kísérlet során arra kerestük a választ, hogy milyen a fehérje sejten belüli lokalizációja. A preparált leukocitákat fixáltuk, majd immunfestést végeztünk. A festést követően a sejteket magmorfológia alapján azonosítottuk. A neutrofil granulociták sejtmagjában szignifikánsan alacsonyabb volt a BMAL1 fehérje szint, mind a limfocitákhoz, mind a monocitákhoz képest (17. ábra A, B). 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 granulocitákban a citoplazmában volt magasabb a fehérje szintje (17. ábra A, B). Az izotípus kontroll antitesttel való jelölés esetében minden sejttípusnál hasonló volt a citoplazma/sejtmag festődés aránya (18. ábra), ami arra utal, hogy a BMAL1 valóban eltérő sejten belüli lokalizációt mutat a sejtekben.

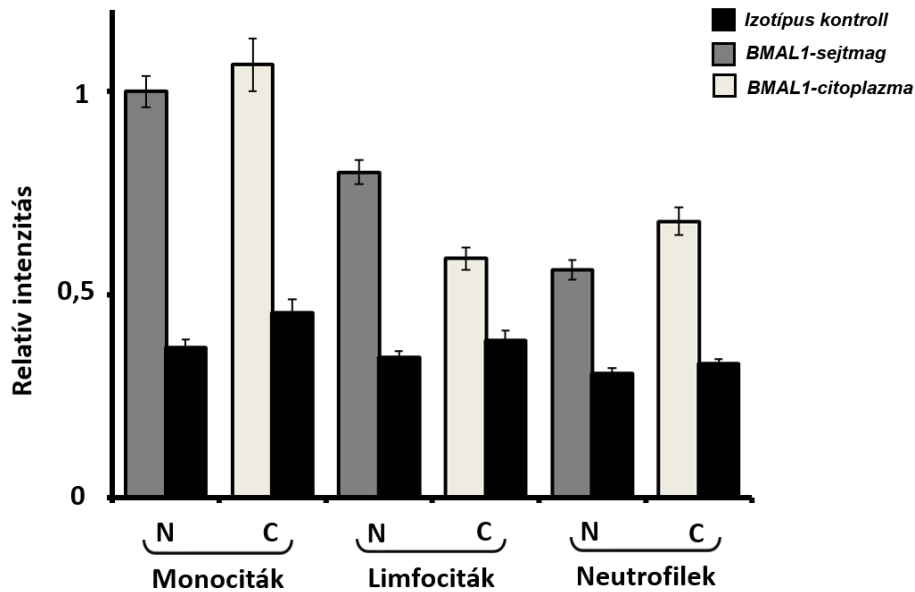
Összefoglalva elmondható, hogy a PER2 és BMAL1 fehérjék expressziója alacsonyabb neutrofil granulocitákban, mint a mononukleáris frakcióban. Ez is, és a BMAL1 fehérje foszforiláltsági állapota és sejten belüli elhelyezkedése is arra utal, hogy a neutrofil granulociták óraműködése különbözik a többi leukocitáétól. Ennek alapján felmerül a kérdés, hogy az alacsony expressziót mutató és döntően citoszolikus BMAL1 fehérje képes lehet-e robusztus óraműködés generálására.



17. ábra

#### A BMAL1 fehérje sejten belüli lokalizációja leukocitákban.

(A) Mononukleáris sejtek és neutrofil granulociták immunfestése. A leukocitákat 13 órákor preparáltuk. Piros: sejtmag jelölés (ToPro3); zöld: BMAL1/izotípus kontroll antitesttel történő jelölés (Alexa488). (N: neutrofil granulocita, M: monocita, L: limfocita) (B) A BMAL1-specifikus jelölés statisztikai értékelése. Az adatokat az azonos fedőlemezen lévő monocitákon mért átlagos sejtmagi intenzitásra normalizáltuk. (n=28-41, átlag + S.E.M., \*p<0,05, ANOVA, Bonferroni módszer). (N: sejtmagi intenzitás, C: citoplazmatikus intenzitás).



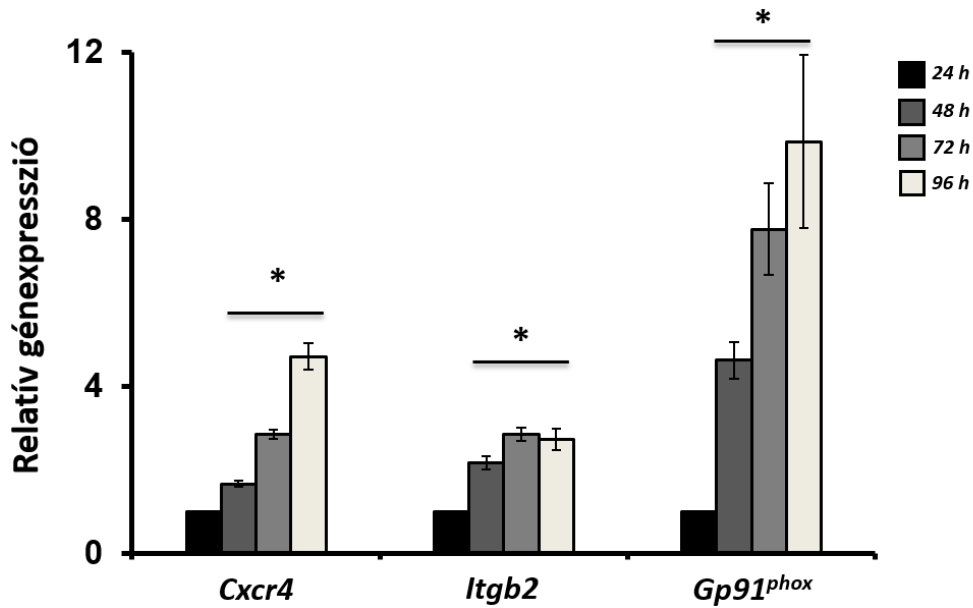
18. ábra

#### A BMAL1 és izotípus kontroll antitesttel való jelölődés összehasonlítása.

A leukocitákat 13 órákor preparáltuk. A BMAL1-specifikus és izotípus kontroll citoplazmatikus és sejtmagi jelölődést hasonlítottuk össze. Az adatokat az azonos fedőlemezen lévő monocitákon mért átlagos sejtmagi intenzitásra normalizáluk (N: sejtmagi intenzitás, C: citoplazmatikus intenzitás). Az adatokat átlag + S.E.M.-ként ábrázoltuk (n=13-41, \*p<0,05, ANOVA, Bonferroni módszer).

#### 6.4. 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, így feltételeztük, hogy a molekuláris oszcillátor működésében tapasztalt különbségek esetleg a sejtek fejlődésére és differenciációjára vezethetők vissza. Mivel ezen vizsgálat humán primer sejteken csak nagyon nehezen lenne kivitelezhető, vizsgálati modellként a PLB-985 humán akut mieloid leukémia sejtvonalat választottuk, mely DMSO kezeléssel neutrofil granulocita irányba differenciálható [255-257]. Megvizsgáltuk, hogy hogyan változik az órakomponensek expressziója a sejtek differenciálódása során. A differenciáció kontrolljaként különböző érési markerek kifejeződését követtük: vizsgáltuk a sejtek *Cxcr4* kemokin receptorának, *Itgb2* integrinjének (CD18) és a NADPH oxidáz *Gp91<sup>phox</sup>* alegységének expresszióbeli változását [258-260]. A kezelést követő 4 napos differenciálódási időszak alatt az összes érési marker expressziója szignifikánsan megnövekedett (19. ábra).

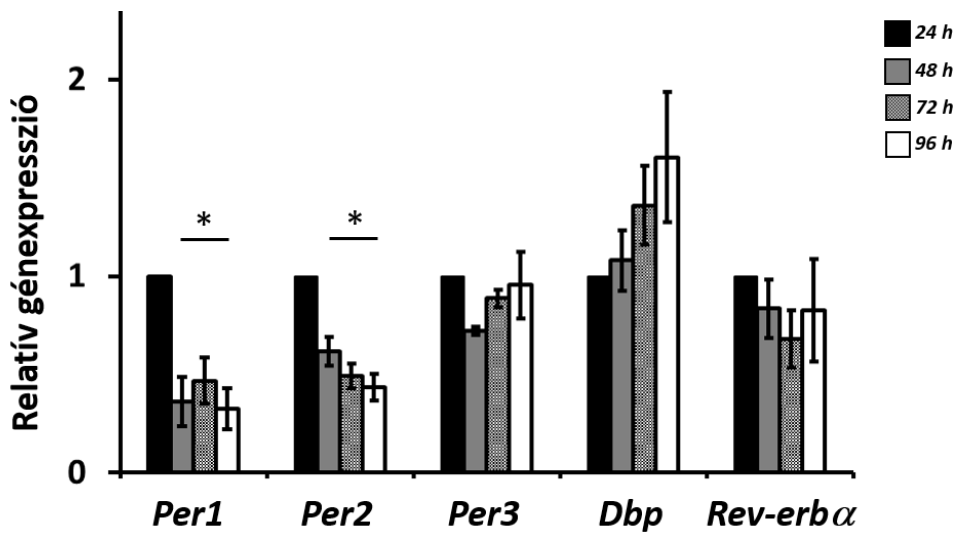


19. ábra

Érésí markerek expressziójának változása PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációja során.

A mérésekhez belső kontrollként *Gapdh*-t alkalmaztunk. Az adatokat a differenciáció kezdete után 24 órával vizsgált mintákban mért expresszióra normalizáltuk (n=4, átlag + S.E.M., \*p<0,05, egyszempontos ANOVA, Tukey-teszt).

A különböző óragének kifejeződését a *Bmal1* expresszióhoz viszonyítva vizsgáltuk (20. ábra). Ezen belső kontroll segítségével nyomon követhetők a molekuláris oszcillátor működésében történő változások. A négy napos differenciálódási időszak alatt szignifikánsan csökkent a sejtekben a *Per1* és a *Per2* expresszió, azonban a *Per3*, a *Dbp* és a *Rev-erb $\alpha$*  kifejeződése nem változott (20. ábra).

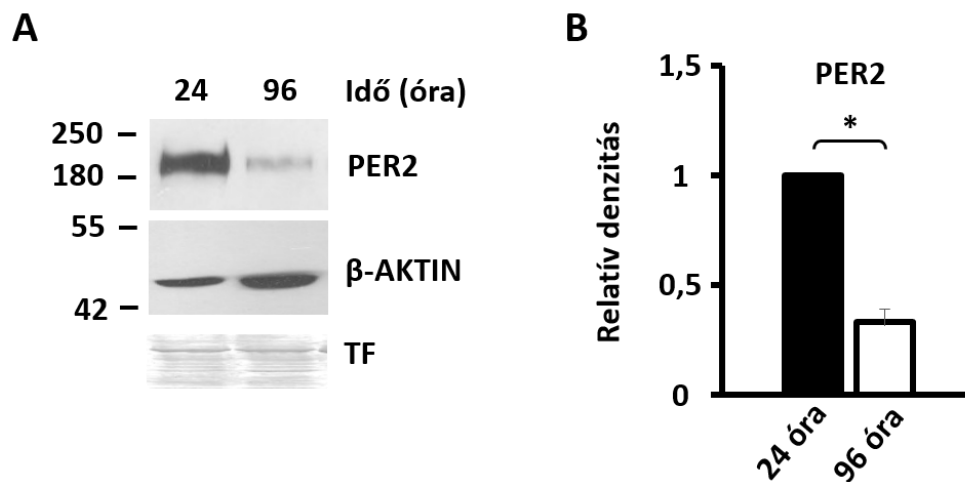


20. ábra

Az óragének expressziójának változása PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációja során.

A mérésekhez belső kontrollként *Bmal1*-et alkalmaztunk. Az adatokat a differenciáció kezdete után 24 órával vizsgált mintákban mért expresszióra normalizáltuk (n=4, átlag+S.E.M., \*p<0,05, egyszempontos ANOVA, Tukey-teszt).

A génexpresszió változásaiból kiindulva, a PER2 fehérje szinteket is összehasonlítottuk a differenciáltatást követő 24. és 96. órában, mely a Western blot alapján csökken a differenciáció alatt (21. ábra A, B). Irodalmi adatokkal egybehangzóan [259] eközben megnövekedett a sejtekben a  $\beta$ -AKTIN mennyisége (21. ábra A).

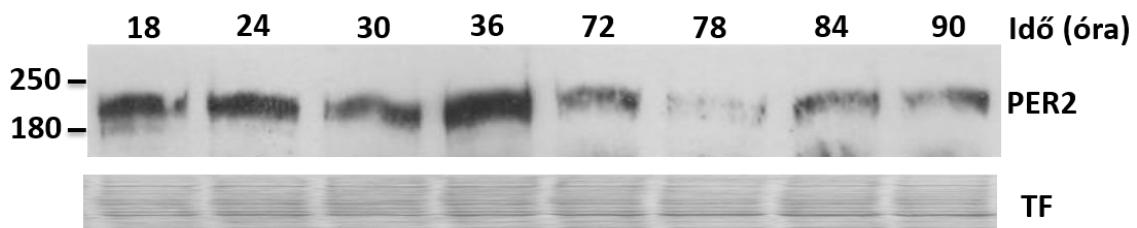


21. ábra

**A PER2 fehérje expresszió változása PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációjában a kezelést követő 24. és 96. órában.**

(A) PER2 és  $\beta$ -AKTIN expresszió Western blot analízise 24 és 96 órával a differenciáltatás kezdete (DMSO hozzáadása) után. A bal oldalon található számok a molekulásúly markert (kDa) jelölik. (B) A PER2 denzitometriás analízise a 24 és 96 órás mintákban. Az adatokat a 24 órás mintákban mért értékekre normalizáltuk (n=4, átlag+S.E.M., \*p<0,05, egymintás t-próba). Töltéskontrollként a teljes fehérjemennyiséget (TF) alkalmaztuk.

Annak bizonyítására, hogy a PER2 fehérje kifejeződésének csökkenését nem egy esetleges fázis eltolódás miatt látjuk, a differenciáltatást követő 18-36. órában, valamint 72-90. órában 6 óránkénti mintavételezéssel szintén megvizsgáltuk a fehérje expressziót. Bár a PER2 szintek ingadoztak, a 4. nap minden időpontjában alacsonyabb volt a fehérje kifejeződése, mint bármely differenciáltatás eleji időpontban (22. ábra).



22. ábra

**A PER2 fehérje expresszió változása PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciációjában.**

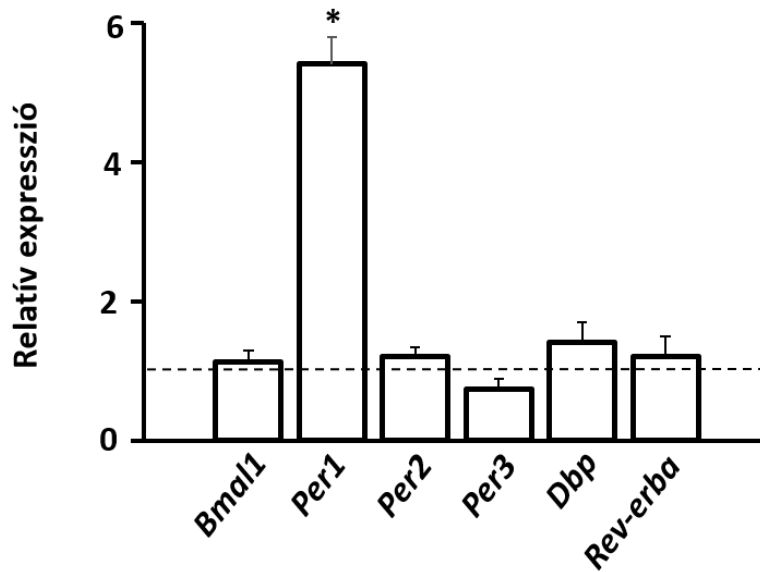
Western blot analízis a differenciáltatás kezdete (DMSO hozzáadása) utáni első (18-36. óra) és utolsó (72-90. óra) napon. A bal oldalon található számok a molekulásúly markert (kDa) jelölik. Töltéskontrollként a teljes fehérjemennyiséget (TF) alkalmaztuk.



Ezen kísérletek alapján elmondható, hogy a molekuláris oszcillátor működése megváltozik PLB-985 sejtekben a neutrofil granulocita irányú differenciáció alatt.

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

Mivel eredményeink arra utalnak, hogy neutrofil granulocitákban az óraműködés nem olyan robusztus, mint más leukocitákban, felvetődött a kérdés, hogy a sejtek perifériás órájának működése szükséges-e a sejtek válaszkészségének napi ingadozásához. Alternatív lehetőségként felmerül, hogy az óragének oszcillációjáért és a sejtek válaszreakciójának napi ingadozásáért szisztémás hatások felelősek. Mononukleáris sejtekben *in vivo* és *in vitro* is megemelkedik a *Per1* expresszió glukokortikoidok hatására [284, 285]. Mivel eredményeink alapján neutrofil granulocitákban is ritmikus a *Per1* expresszió (13. ábra), és a maximuma a délelőtti órákban van (akrofázis: 9 óra 51 perc), amikor a kortizol koncentráció emelkedett a plazmában (11. ábra), megvizsgáltuk, hogy izolált sejtek óragénjeinek kifejeződése érzékeny-e kortizol kezelésre. A vérmintákat délután 15 órakor vettük, amikor a kortizol koncentrációja már csökkenő szakaszban van a plazmában. Az izolált sejteket ezután fiziológias szempontból releváns mennyiségű (300 ng/ml) kortizollal kezeltük és 60 perc elteltével vizsgáltuk az óragének expresszióját. Míg a *Per1* expresszió ez idő alatt több mint ötszörösére növekedett, más óragének szintje nem változott (23. ábra). Ezen eredmények alapján arra következtetünk, hogy a *Per1* gén expressziója humán neutrofil granulocitákban is glukokortikoid befolyás alatt áll, valamint, hogy a *Per1* kifejeződésének napi ingadozásában szerepe lehet a plazma kortizol koncentráció ritmikus oszcillációjának.



23. ábra

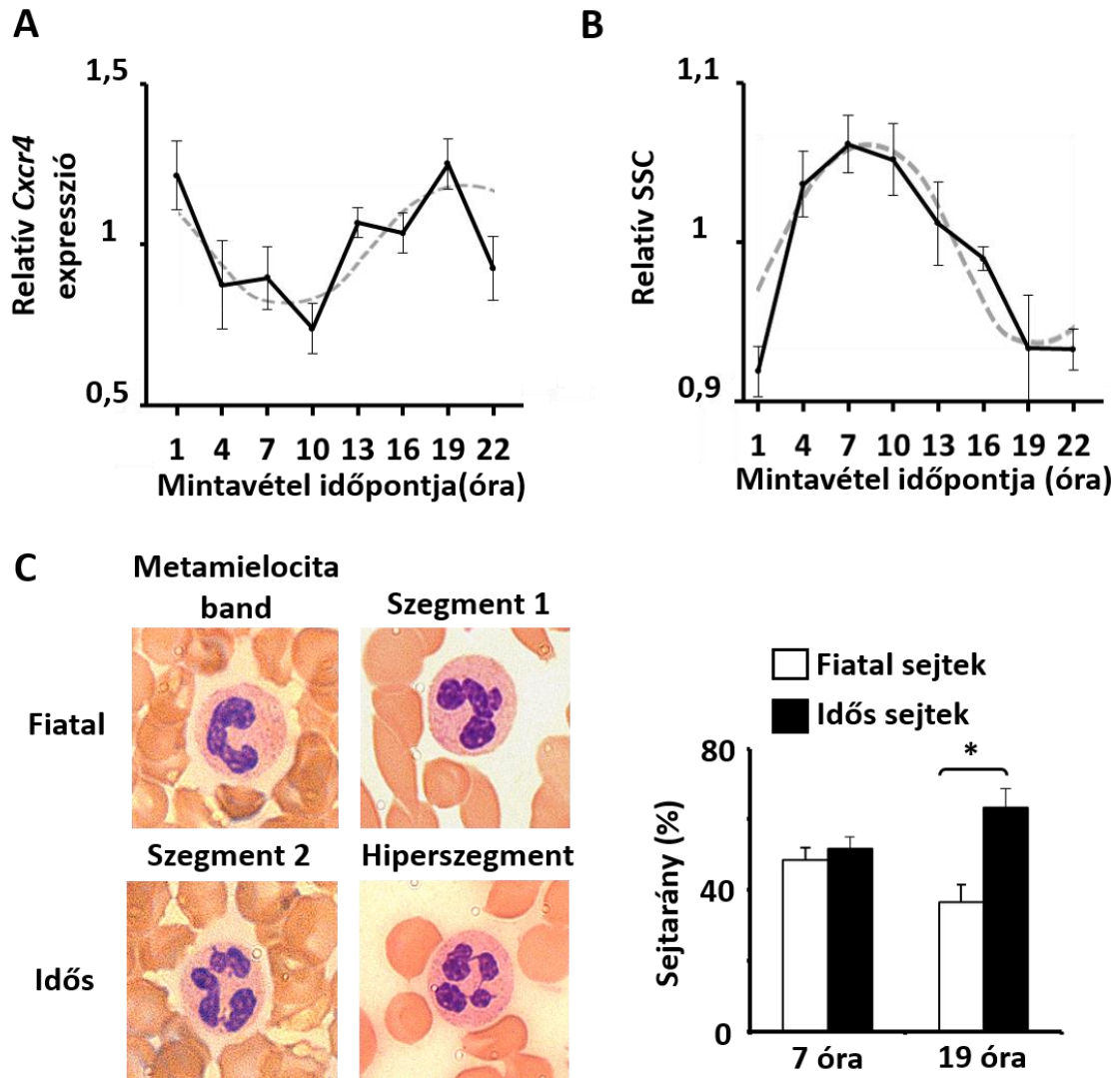
#### A kortizol hatása az óragének expressziójára neutrofil granulocitákban.

15 órakor vett vérmintákból izoláltuk a sejteket, majd a kortizol kezelést követően 60 perccel vizsgáltuk az óragének expresszióját. Az értékeket a kontroll mintákban mért expressziós szintekre normalizáltuk (szaggatott vonal) (n=4, \*p<0,001, egymintás t-próba).

### 6.6. A perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlásának vizsgálata

Casanova-Acebes és kollégái egéren végzett kísérleteik során kimutatták, hogy az idős neutrofil sejtek keringésből való eliminációja, valamint ezzel párhuzamosan a perifériás vérben található neutrofil granulocita populáció korbéli összetétele napi ingadozást mutat [179]. Mivel a sejtek patogének elleni válaszkészsége változhat a neutrofil granulociták érése során, a sejtpopuláción belüli koreloszlás változása szintén hozzájárulhat az effektor reakciók hatékonyságának ritmikus változásához. A CXCR4 kemokin receptor expressziója egér neutrofil granulociták érése és öregedése során növekszik [179, 286], így annak eldöntésére, hogy humán neutrofil granulociták esetében is megvan-e ez a kor szerinti eloszlás változás, következő kísérletünkben megvizsgáltuk, hogy hogyan alakul a perifériás neutrofil granulocita populációban a *Cxcr4* expresszió a nap folyamán. A 24. ábra A részén látható, hogy a receptor kifejeződése szignifikáns oszcillációt mutatott, melynek maximuma az esti órákban volt mérhető (akrofázis: 20 óra 1 perc). A neutrofil granulociták granuláltsága változik az

érésük során [287]. Mivel a sejtek granuláltságával jól korrelál az áramlási citométerrel mérhető oldalirányú fény szórási (SSC) [179], a következő kísérletben az SSC napi ingadozását vizsgáltuk. Ebben a paraméterben is napi ritmust tapasztaltunk (24. ábra B), a maximum a reggeli órákra esett (akrofázis: 7 óra 50 perc). Mindezen eredmények arra utalnak, hogy a kor szerinti eloszlás 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 reggel 7 és este 19 órakor és magmorfológia alapján értékeltük a sejtek érettségi állapotát. Eszerint 4 kategóriába soroltuk a sejteket, érési sorrendben: metamielocita/band, szegment1, szegment 2 és hiperszegment (24. ábra C, bal oldal). Amennyiben a metamielocita/band és szegment1 sejteket fiatalnak, a szegment 2 és hiperszegment sejteket pedig idősnek tekintettük, napszaki különbség volt kimutatható a két csoport arányában. Míg az esti minták esetében szignifikánsan magasabb volt az idős sejtek aránya, a reggeli mintákban nem volt különbség a fiatal/idős sejtek számában (24. ábra C, jobb oldal). Ez megerősíti az eddigi eredményeinket, miszerint a neutrofil granulocita populációban változik a sejtek kor szerinti megoszlása.

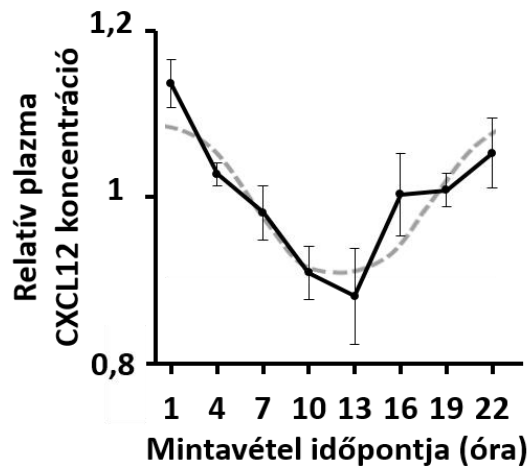


24. ábra

#### Neutrofil granulociták kor szerinti eloszlásának vizsgálata perifériás vérben.

(A) *Cxcr4* expresszió neutrofil granulocitákban az idő függvényében. A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Referenciaként *Gapdh*-t alkalmaztunk. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk ( $n=6$ , átlag  $\pm$  S.E.M.). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (\* $p<0,05$ , cosinor analízis, akrofázis: 20 óra 01 perc) (B) Neutrofil granulociták esetében mért oldalirányú fényszórás (SSC) az idő függvényében ( $n=4$ , átlag  $\pm$  S.E.M., a mintavétel és normalizálás egyezik az A ábrarészénél leírttal). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (\* $p<0,05$ , cosinor analízis, akrofázis: 7 óra 50 perc) (C) Neutrofil granulociták fejlődési stádiumainak vizsgálata magmorfológia alapján. A keneteket reggel 7 és este 19 órakor készítettük. Minden minta esetében 100 sejtet számoltunk meg és megállapítottuk, hogy milyen a bal panelen látható fejlődési alakok százalékos megoszlása a mintában ( $n=5$ , átlag  $\pm$  S.E.M., \* $p<0,05$ , kétszemponos ANOVA, Tukey-teszt).

Mivel a neutrofil granulociták csontvelőből való kiáramlásának, *homing*-jának és eliminációjának fontos szabályozói a különböző csontvelői citokinek és kemokinek, feltételeztük, hogy a populáció koreloszlásában mérhető ingadozásokat is befolyásolhatják. A CXCR4 receptor liganduma a CXCL12 kemokin, mely legnagyobb mértékben a csontvelőben expresszálódik [288], így a plazmában mérhető koncentrációjának esetleges ingadozása a csontvelő ritmikus működésének indikátora lehet. Ahogy a 25. ábrán is látható a CXCL12 plazma koncentrációja ingadozik a nap folyamán, hasonló fázisban (akrofázis: 23 óra 55 perc), mint a sejtekben mérhető *Cxcr4* expresszió (24. ábra A).



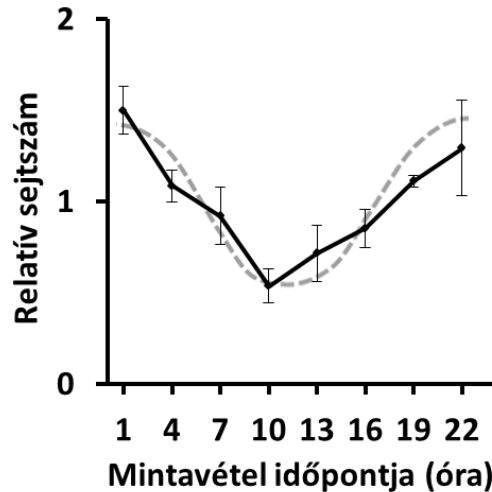
25. ábra

#### A plazma CXCL12 koncentrációjának napi ingadozása.

A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk (n=4, átlag ± S.E.M.). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (\*p<0,05, cosinor analízis, akrofázis: 23 óra 55 perc).

Ezen eredményeink megerősítik azt a feltevést, miszerint a neutrofil granulociták időfüggő eliminációjában és kor szerinti eloszlásának ingadozásában szerepe lehet a csontvelői működés napi ingadozásának.

Számos adat támasztja alá, hogy a neutrofil granulociták száma is ingadozik a nap folyamán, a maximum pedig este 8 és éjjel 2 között mérhető [160, 247, 248]. A sejtek preparálásakor megvizsgáltuk a mintákban mérhető abszolút neutrofil granulocita sejtszámot, és az irodalommal egyezően szignifikáns oszcillációt tapasztaltunk (26. ábra), a késő esti órákban megfigyelhető maximummal (akrofázis: 23 óra 36 perc).



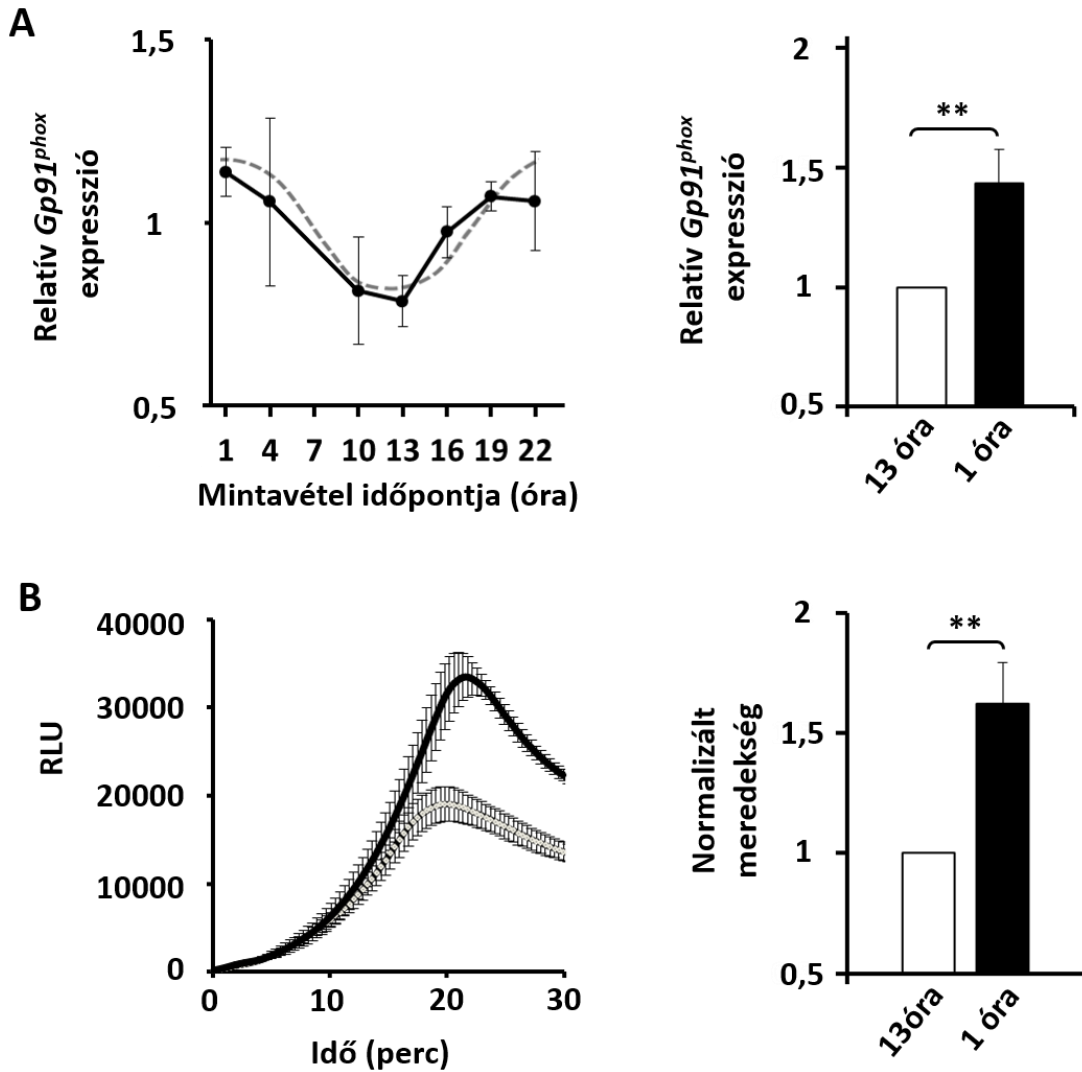
26. ábra

#### A neutrofil granulocita sejtszám napi ingadozása.

A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk ( $n=4$ , átlag  $\pm$  S.E.M.). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli ( $*p<0,0001$ , cosinor analízis, akrofázis: 23 óra 36 perc).

### 6.7. Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének és fagocitózis készségének vizsgálata

A neutrofil sejtek érése során a *Gp91<sup>phox</sup>* expressziójának növekedése figyelhető meg (19. ábra, [258]), így a neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlásának ingadozása felveti a lehetőségét, hogy a *Gp91<sup>phox</sup>* expresszió is napi ingadozást mutat. Ahogy a 27. ábra A részén látható, az expresszió oszcillál, maximuma pedig a késő esti időszakban mérhető (akrofázis: 23 óra 41 perc), tehát akkor, amikor az idős sejtek aránya magasabb. Annak eldöntésére, hogy az oxidáz alegység expressziójának ingadozása korrelál-e a sejtek szuperoxid termelő képességével, újabb kísérletet végeztünk. Délután 13 és éjjel 1 órakor izolált sejteket kevert humán savóval opszonizált zimoszánnal stimuláltunk, és összehasonlítottuk a szuperoxid termelő képességüket. Szignifikánsan magasabb volt a sejtek szuperoxid termelése az éjjel 1 órás minták esetében (27. ábra B), mely arra utal, hogy a neutrofil sejtek válaszkészsége az éjszakai időszakban jobb.



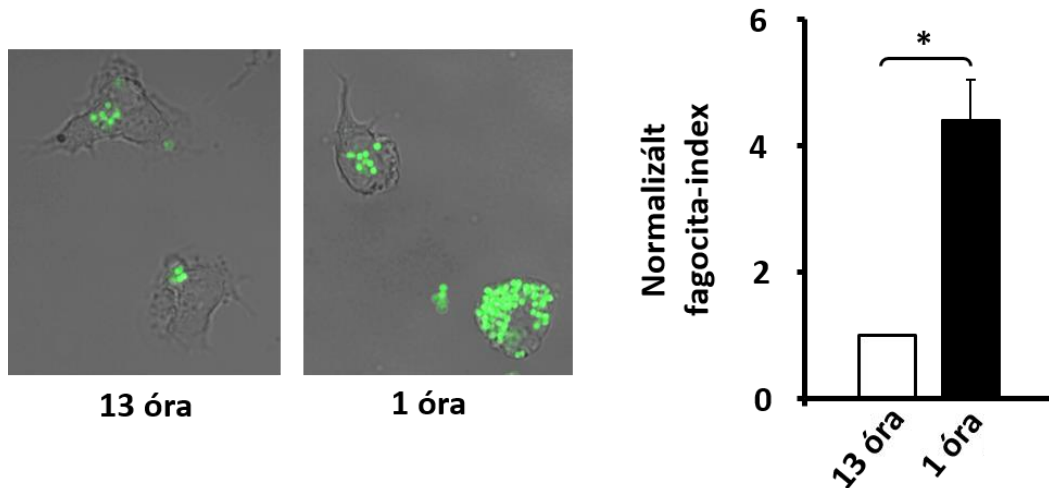
27. ábra

**A neutrofil granulociták *Gp91<sup>phox</sup>* expressziójának napi mintázata, és szuperoxid termelő képessége.**

(A) Bal panel: A *Gp91<sup>phox</sup>* expresszió napi ingadozást mutat. A vérmintákat 3 órás időközönként vettük délelőtt 10 és másnap reggel 7 óra között. Referenciaként *Gapdh*-t alkalmaztunk. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk (n=6, átlag ± S.E.M.). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú cosinus görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (\*p<0,05, cosinor analízis, akrofázis: 23 óra 41 perc). Jobb panel: A *Gp91<sup>phox</sup>* expresszió statisztikai összehasonlítása 13 órakor és 1 órakor izolált neutrofil granulocitákban (n=14, átlag ± S.E.M., \*\*p<0,01, egymintás t-próba).

(B) A neutrofil granulociták szuperoxid termelő képessége magasabb éjszaka, mint nappal. A sejteket 13 órakor (fehér vonal) és 1 órakor (fekete vonal) izoláltuk, majd kevert humán savóval opszonizált zimoszánnal stimuláltuk a szuperoxid termelést. Bal panel: Szuperoxid termelés a stimulust követően az idő függvényében (n=4). Jobb panel: Statisztikai összehasonlítás, ahol az értékeket az adott donor 13 órási értékeire normalizáltuk (n=4, átlag ± S.E.M., \*\*p<0,01, egymintás t-próba).

A következőkben mértük a sejtek fagocitózis kapacitását is. Kevert human savóval opsonizált, GFP-t expresszáló *S. aureus*-t fagocitáltattunk a sejtekkel és megmértük a fagocita indexet. Ez alapján is azt tapasztaltuk, hogy a sejtek több baktériumot képesek bekebelezni az éjszakai időpontban (28. ábra), ami szintén alátámasztja, hogy az idősebb sejtek hatékonyabbak az immunválasz során.



28. ábra

#### Neutrofil granulociták fagocita aktivitásának időfüggése.

A sejteket 13 órakor és éjjel 1 órakor izoláltuk, majd kevert human savóval opsonizált, GFP-t expresszáló *S. aureus*-szal inkubáltuk együtt őket. Bal panel: Reprezentatív felvételek. Jobb panel: A fagocita-index statisztikai összehasonlítása. Minden minta esetében megszámláltuk, hogy 100 darab neutrofil granulocita összesen hány darab baktériumot kebelez be, az értékeket az adott donor 13 órás értékeire normalizáltuk (n=3, átlag  $\pm$  S.E.M., \*p<0,05, egymintás t-próba).

#### 6. táblázat

A plazma CXCL12 szint, a neutrofil granulocita szám, valamint a különböző érési markerek esetében mért akrofázisok.

Paraméter	Akrofázis (óra:perc)	p
<i>Cxcr4</i> expresszió	20 : 01	0,0131
SSC	7 : 50	0,0003
Plazma CXCL12 szint	23 : 55	0,0001
Neutrofil granulocita szám	23 : 36	<0,0001
<i>Gp91<sup>phox</sup></i> expresszió	23 : 41	0,0242



## 7. Megbeszélés

Ma már egyértelműen bizonyított, hogy a cirkadián ritmus zavara növeli a szervezet sebezhetőségét [289], csökkenti a stressztűrő képességét, és nagy mértékben növeli egyes kóros állapotok kialakulásának kockázatát [290]. Ilyen betegségek például a diabétesz [291], az obezitás [147], az emlőrák [292], a kardiovaszkuláris rendszer egyes elváltozásai [293], illetve különböző pszichés zavarok [130]. Feltételezhető, hogy ezek kialakulását a szervezeten belüli ritmusos működések nem összehangolt volta, azaz az egyes szövetek időbeli működésének deszinkronizációja is elősegíti. A CLOCK/BMAL1 komplex számos óra által kontrollált gén kifejeződését szabályozza, ami az egyes sejtek szintjén a működés számos aspektusának ritmusosságát eredményezi [262, 294, 295]. Azonban az a kérdés, hogy az általánosan leírt negatív és pozitív visszacsatolásokon alapuló óramodell, aminek a működését már az SCN-ben és egyes perifériás szövetekben is leírták, érvényes-e a többi sejtípus esetében is, továbbá, hogy az egyes perifériás szövetek hogyan szinkronizálódnak, még vizsgálatra szorul.

Számos adat támasztja alá a cirkadián szabályozás és az immunrendszer működése közötti kapcsolatot [159, 163, 189, 296], azonban az immunsejtekben jelen lévő molekuláris oszcillátorok működéséről keveset tudunk. A neutrofil granulociták a vérben legnagyobb arányban található leukociták, szerepük a bakteriális és gombás fertőzésekkel szembeni védekezésben esszenciális. Sejt felszíni receptoraik segítségével felismerik és megkötik a kórokozókat és bekebelezik azokat. Az így képződött fagoszómákban különböző lítikus enzimek és reaktív oxigén intermedierek segítségével megindul a mikrobák lebontása. A neutrofil granulociták csökkent működése súlyos fertőzésekhez vezet [236], míg túlzott aktivitásuk különböző autoimmun [240, 241] és gyulladásszerű betegségek [242] kialakulásához járulhat hozzá. Bár a neutrofil granulociták válaszkészségében több tanulmány szerint is napi ritmus mutatkozik [246, 251-253], az ennek hátterében álló mechanizmusokról keveset tudunk. Kísérleteink célja volt, hogy humán neutrofil granulociták cirkadián óra általi szabályozását vizsgáljuk.

A neutrofil granulociták életideje a periférián igen rövid, mindössze néhány óra [197-199, 297]. Ebből adódóan a sejt készlet a nap folyamán megújul. Ennek ellenére, ha az egyes sejtekben szinkron módon működik a molekuláris óra, akkor az

órákomponensek kifejeződésének ritmusosnak kell lenniük a teljes neutrofil granulocita populáció szintjén is. Kísérleteink első fázisában a humán perifériás keringő neutrofil granulocita populáció cirkadián oszcillátorának vizsgálatát tűztük ki célul.

Mivel az extrém korai és késői kronotípusú emberekben az óragének expressziójának fázisa különböző [298], a donoraink kiválasztásánál alapvető szempont volt, hogy napi ritmusuk szerint nagyjából egységes populációt képezzenek, ehhez pedig szükség volt a kronotípus meghatározására. Ehhez az általunk magyarra fordított és validált Munich Chronotype Questionnaire-t használtuk. Összehasonlítottuk a molekuláris óra fő komponenseinek kifejeződését ugyanazon vérmintákból szeparált mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban. Megállapítottuk, hogy a két sejtpopuláció óragén expressziós mintázata alapvetően különbözik. A mononukleáris sejtekben mindhárom *Per* mRNS-e ritmusosnak bizonyult, míg a neutrofil granulocitákban csak a *Per1* szintje mutatott oszcillációt. Kimutattuk, hogy a neutrofil granulociták *Per1* expresszióját *in vitro* kortizol kezeléssel indukálni lehet, ugyanakkor ez a kezelés az általunk vizsgált többi óragén kifejeződését nem befolyásolta. Amikor a két sejtfrakcióban az óragének kifejeződésének *Bmal1* expresszióhoz viszonyított arányát hasonlítottuk össze, csak a *Per1* mutatott hasonló mértékű kifejeződést a neutrofil granulocitákban és a mononukleáris sejtekben, a többi komponens aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a neutrofil populációban. Mivel ezen komponensek kifejeződését maga a BMAL1 szabályozza, ez arra utalhat, hogy a neutrofil sejtekben nem olyan robusztus az óraműködés, mint a mononukleáris sejtek esetében. Emellett a *Per1* napi ritmusa követi a plazmában mérhető kortizol koncentráció időbeli alakulását, így valószínűnek tűnik, hogy a neutrofil granulocita populációban a *Per1* mRNS expressziójának ingadozását a kortizol szabályozza. Irodalmi adatok alapján a *Dbp* és a *Rev-erba* kifejeződése is glukokortikoid érzékeny hepatocitákban [299, 300]. Ez a két órákomponens pedig a neutrofil granulociták vizsgálatakor is ritmusosnak bizonyult. Bár kísérleteink során a sejtek kortizollal történő *in vitro* kezelése nem változtatta meg szignifikáns mértékben ezen két mRNS mennyiségét, elképzelhető, hogy hosszabb időtartamú kezelés hatására változna az expressziójuk, valamint, hogy *in vivo* indirekt módon a glukokortikoidok befolyásolják a kifejeződésüket.

Az mRNS szintekben tapasztalható különbségeken kívül, a neutrofil granulocitákban alacsonyabb volt a PER2 és a BMAL1 fehérjék megjelenése is a

mononukleáris sejtekhez viszonyítva. Emellett csak a hipofoszforilált BMAL1 forma volt kimutatható a neutrofil populációban, de ennek a szintjében sem tapasztaltunk napi ritmust. Immuncitokémiai vizsgálataink eredménye szerint a fehérje szignifikánsan alacsonyabb mennyiségben van jelen a neutrofil granulociták sejtmagjában, mint a többi leukocita esetében. Mivel a BMAL1 transzkripció faktor aktivitásához elengedhetetlen a sejtmagba történő áthelyeződése és foszforilációja [52, 53], ezek az eredményeink is arra utalnak, hogy a molekuláris oszcillátor nem működik hatékonyan a perifériás vér keringő neutrofil sejteiben. Az, hogy a neutrofil sejtekben miért marad el a BMAL1 foszforilációja, egyelőre nem ismert. A BMAL1-et foszforiláló GSK3 $\beta$  kifejeződik a sejtekben [301], azonban azt nem tudjuk, hogy a többi sejthez képest milyen mértékű ez az expresszió. Ugyanakkor microarray adatok arra utalnak, hogy mind a CK2 $\alpha$ , mind a GSK3 $\beta$  expressziója jelentősen alacsonyabb neutrofil granulocitákban, mint monocitákban. Így elképzelhető, hogy az enzimek csökkent kifejeződése és/vagy aktivitása vezet a BMAL1 fehérje csökkent foszforilációjához ezekben a sejtekben.

Mivel más hemopoetikus eredetű sejtekben, mint a makrofágok, eozinofil granulociták, T- és B-limfociták, dendritikus sejtek, NK sejtek és monociták, igazoltan működik a molekuláris óra [167-175], feltételeztük, hogy a mononukleáris sejtekkel való összehasonlításakor tapasztalt különbségek a molekuláris oszcillátor működésében abból adódnak, hogy a neutrofil sejtek fejlődése és differenciációja során az óraműködés downregulálódik. Így a következő kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy a PLB-985 akut mieloid leukémia sejtek neutrofil granulocita-szerű sejté váló differenciációja alatt hogyan változik az egyes órakomponensek kifejeződése. Eredményeink szerint a molekuláris oszcillátor módosuláson megy keresztül a sejtek differenciálódása során, a negatív faktor *Per1* és *Per2* expresszió aránya lecsökken a pozitív faktor *Bmal1*-hez képest. A PER2 mennyiségének csökkenését fehérje szinten is kimutattuk. Ennek alapján elképzelhető, hogy a perifériás neutrofil granulocitákban detektált alacsony *Per/Bmal1* arányért a sejtek differenciációja alatt a molekuláris óra működésében bekövetkezett változások tehetőek felelőssé. Bár a cirkadián működés hiányát egér testis és thymus vizsgálata kapcsán már más differenciálódó szövetben is megfigyelték [302, 303], előfordulhat, hogy differenciálódó sejtekben a molekuláris oszcillátor működése felfüggesztett. A neutrofil granulociták is gyors átalakuláson mennek keresztül a periférián miközben a metamielocita alakból hiperszegmentált

magvú preapoptotikus sejtekké alakulnak. Hogy e folyamat közben, vagy még a csontvelői érés során következik-e be a robusztus molekuláris oszcilláció megszűnése, ezt egyelőre nem tudjuk. Érdekes kérdés az is, hogy mi lehet az expresszálódó órakomponensek szerepe ezekben a sejtekben, melyekből a klasszikus működésű molekuláris oszcillátor hiányzik, vagy működése felfüggesztett. Természetesen a sejtvonalon történő vizsgálatoknak vannak limitációi. Mivel az óraműködés és a sejtciklus működése szorosan kapcsolt, előfordulhat, hogy az órakomponensek kifejeződése különböző a primer sejtekben mérhetőhöz képest. Mi kísérleteink során az óragének- és fehérjék arányát hasonlítottuk össze a sejtek neutrofil irányú differenciációja kezdetén és végén, így eredményeink a sejtvonal használatának limitációitól függetlenül arra utalnak, hogy a differenciáció maga megváltoztatja a sejtekben az óraműködést.

A molekuláris oszcillátorra vonatkozó eredményeink alapján feltételeztük, hogy inkább szisztémás hatások lehetnek felelősek a neutrofil granulociták működésében korábban leírt ritmikus változásokért, nem pedig a sejtekben működő cirkadián óra. Hasonlóan a Casanova-Acebes és munkatársai által egér modellen leírt eredményekhez [179], a humán perifériás neutrofil granulocita populációban is megfigyelhető a sejtek kor szerinti eloszlásának napi ingadozása. Mivel a sejtek válaszkészségét befolyásoló komponensek kifejeződése erősen függ a sejtek érettségi stádiumától [258, 260], a fiatal és idős sejtek arányának változása is hozzájárulhat a neutrofil granulociták ritmikus működéséhez. Ilyen komponensek lehetnek a patogének felismeréséhez szükséges receptorok, vagy a migrációs folyamatban részt vevő adhézios molekulák, illetve olyan faktorok is, melyek a citoszkeleton átrendezéséhez szükségesek a patogének bekebelezése során. Eredményeink szerint a neutrofil sejtek érésének egyik markere [179, 286], a kemokin receptor *Cxcr4* szintje ritmikus ingadozást mutat a perifériás neutrofil granulocita populációban. Ez a receptor amellett, hogy a neutrofil granulociták *trafficking*-jének szabályozója a csontvelő és a keringés között, szerepet játszik a sejtek szövetek közé vándorlásában is gyulladás során [304, 305]. Így expressziójának napi ingadozása szintén hozzájárulhat a neutrofil sejtek válaszkészségének ritmusához. Egér neutrofil granulociták esetében a progenitor sejtek csontvelőből történő kiáramlása és az érett sejtek *homing*-ja is ritmikus, és ezzel szinkron módon ingadozik a csontvelői mikro környezetben a CXCR4 ligandumának, a CXCL12-nek a koncentrációja [179]. Mi

munkánk során kimutattuk, hogy a CXCL12 koncentrációja a vérplazmában napi ritmust követ. Mivel ez a kemokin az egyik fő szabályozója a neutrofilek csontvelőből való kiáramlásának és alapvető forrását a csontvelői sztrómasejtek jelentik [288], ez a napi ingadozás ritmikus csontvelői működésre utal, mely így emberben is szabályozója lehet a neutrofil granulociták ritmusos közlekedésének a csontvelő és a keringés között. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy vizsgálati eredményeink és az irodalmi adatok egyaránt arra utalnak, hogy a csontvelő ritmikus működése alapvetően meghatározó a humán perifériás neutrofil granulocita készlet összetételének szabályozásában.

Emellett más óra által kontrollált szisztémás hatások is hozzájárulhatnak a neutrofil sejtek ritmusos vándorlásához. Ilyenek lehetnek például az adrenerg receptorokon keresztül ható szignálok. Ezek egyrészt napszakfüggő leukocita migrációt idéznek elő azáltal, hogy a csontvelői és izom kiserekben adhéziós molekulák ritmikus kifejeződését irányítják [177]. Másrészt az adrenerg receptorok szerepét már a neutrofil granulociták funkcióinak szabályozásában is kimutatták. A sejtek mind  $\alpha$  mind  $\beta$ -adrenerg receptorokat kifejeznek. Egy nemrég megjelent tanulmány szerint pedig *in vitro* a sejtek fMLP indukált migrációs készségét, CD11b/CD18 expresszióját és ROS termelését is csökkenti a sejtek adrenalin, noradrenalin és isoprenalin történő kezelése. Emellett az adrenalin az fMLP stimulusra várható sejt-morfológiai változások kialakulását is gátolja [306]. Ezek alapján elképzelhető, hogy a szimpatikus idegrendszer aktivitása, és annak napi ingadozása *in vivo* direkt módon is befolyásolja a neutrofil granulociták működését és migrációját, ebben pedig szerepe lehet akár a kortizol adrenerg receptorokra kifejtett permisszív hatásának is.

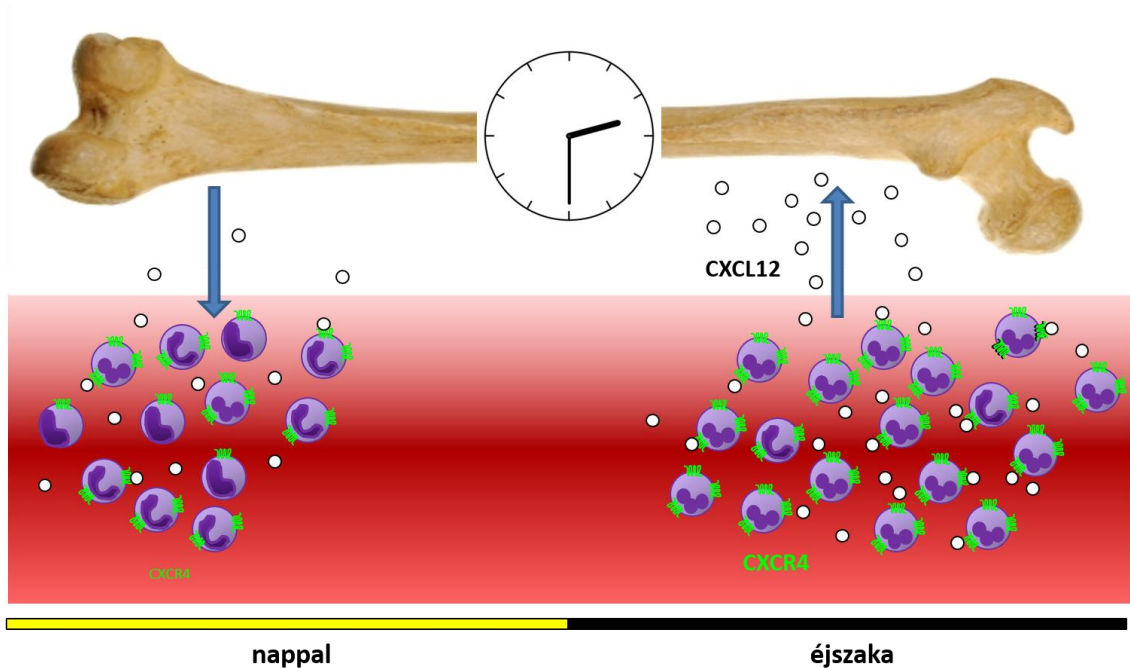
A sejtek ritmusos migrációjával párhuzamosan a neutrofil granulociták száma is napi ingadozást mutat a vérben, melynek maximuma az esti/éjszakai időszakra esik (26. ábra, [160, 247, 248]). Fontos hangsúlyozni, hogy kísérleteink során a keringő neutrofil granulocita populációt vizsgáltuk. Emiatt előfordulhat, hogy az endotélhez kitapadt sejtek, illetve a különböző szervekben található marginációs neutrofil populáció arányának napi ingadozása is hozzájárul a sejtszám napi oszcillációjához. Azt, hogy a leukocita szám ingadozásának mi lehet az élettani jelentősége, egyelőre nem tudjuk. Ismert azonban, hogy az érett sejtek visszavándorlása a csontvelőbe jelként szolgál a fiatal sejtek keringésbe történő kilépéséhez, így a keringő sejt készlet megújításához. Ezzel párhuzamosan a sejtek kilépése a szövetek közé (ami egerek esetében az aktív

fázisra tehető), a szövetekben rezidens sejtek cseréjét szolgálhatja, mely az aktív fázisban előnyösebb lehet. Ugyanakkor a leukocita szám maximuma mellett számos egyéb immunológiai paraméter napszaki ingadozása is az inaktív fázisban mutat magasabb értékeket. Ilyenek például a különböző gyulladós citokinek (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) és receptoraik szintje. Ezzel összhangban az antiinflammatorikus IL-4 és IL-10 maximuma az aktív fázisra tehető. Elképzelhető, hogy mindez azért előnyös, mert így az aktív időszakban a gyulladós folyamatok és az ezzel kapcsolt szöveti sérülések minimalizálhatóak, ez pedig kevésbé zavarja az élőlény aktivitását. Az immunrendszer és a központi idegrendszer működése közötti visszacsatolás is ezt támaszthatja alá, ugyanis a gyulladós citokinek visszahatnak az alvasközpontra, „altató” hatásúak.

Korábbi ismert [251-253], hogy a neutrofil granulociták szuperoxid termelő képessége napi ingadozást mutat. Vizsgálataink során megmutattuk, hogy a NADPH oxidáz *Gp91<sup>phox</sup>* alegységének expressziója ritmusos a humán perifériás neutrofil sejtpopulációban, valamint, hogy ezzel összhangban a sejtek szuperoxid termelő képessége is változik. Mivel a *Gp91<sup>phox</sup>* transzkripciója a neutrofil granulociták differenciálódása és érése során növekszik (19. ábra, [258]), az éjszakai magas és a napközbeni alacsonyabb *Gp91<sup>phox</sup>* kifejeződés szintén összefügghet a sejtészlet kor szerinti eloszlásának változásával. A szuperoxid termelő képesség változása mellett a sejtek fagocitózis kapacitásában is jelentős növekedést tapasztaltunk az éjszakai időszakban. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy élesztő sejtek bekebelezésekor humán neutrofil granulociták fagocitózis hatékonysága alacsony amplitúdójú napi ingadozást mutat, melynek maximuma az éjszakai időszakban mérhető [246]. Kísérleteinkben *Staphylococcus aureus*-t használva több mint ötszörös különbséget tapasztaltunk a nappali és éjszakai fagocitózis készség összehasonlításakor. Ez a különbség arra utal, hogy az óra fagocitózis készségre gyakorolt hatása erősen függhet a mikroorganizmus típusától. A humán neutrofil granulociták számában és a sejtek válaszkészségében tapasztalható napi ingadozások alapján azt feltételezhetjük, hogy szervezeti szinten a neutrofil granulocita populáció leghatékonyabb működése inkább az esti/éjszakai időszakban várható.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy humán perifériás neutrofil granulociták molekuláris órája nem működik robusztusan. Vizsgálataink arra utalnak, hogy a perifériás keringő neutrofil granulocita populáció funkcióinak hatékonyságában

bekövetkező ingadozások a sejtészlet kor szerinti megoszlásában tapasztalható oszcilláció következményei lehetnek. Eredményeink alapján a következő modellt állítottuk fel a perifériás neutrofil granulocita populáció cirkadián szabályozásáról (29. ábra). A reggeli, illetve a nap első felében mérhető alacsony CXCL12 szekréció a fiatal neutrofil granulocita alakok mobilizációját idézi elő a csontvelőből. A keringésben a sejtek éreken mennek keresztül, aminek során növekszik a *Cxcr4* és további érési markerek (pl. *Gp91<sup>phox</sup>*) kifejeződése. Feltételezhetően a *Cxcr4* RNS expressziójának maximumát 1-2 órással követi a fehérje szintjének maximuma, bár mi ezt kísérleteink során nem vizsgáltuk. Így valószínűleg a CXCR4, a CXCL12 és a sejtszám egymással párhuzamosan változik. Azaz az éjszaka második felében tapasztalható CXCR4 szint csökkenés az idős sejtek csontvelőbe áramlását jelezheti, amivel párhuzamosan csökken a perifériás sejtszám is. Az, hogy a CXCL12 szekréció napi ingadozása a csontvelői sztrómasejtek óraműködésének következménye és/vagy szisztémás mechanizmusok (pl. adrenerg hatások) hozzák létre, még vizsgálatra szorul. Casanova-Acebes és munkatársai egéren végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy a csontvelőbe visszavándorolt érett neutrofil sejteket bekebelező makrofágok olyan szignálokat generálnak, melyek gátolják a retikuláris sejtek CXCL12 szekrécióját, ez pedig elősegíti a progenitor sejtek kilépését a perifériára [179]. A CXCL12-vel ellentétes hatású a csontvelői endotélsejtek és megakariociták által termelt CXCL2, mely a neutrofilek keringésbe történő kilépését serkenti [307, 308]. Érdemes lenne azt is vizsgálni, hogy a CXCL2 és receptorának a CXCR2-nek a kölcsönhatása is hozzájárul-e a perifériás neutrofil granulocita populáció korbéli összetételének szabályozásához. Pena és munkatársai patkányon végzett kísérleteik során kimutatták, hogy a melatonin serkenti a neutrofil sejtek kemotaxisát [309]. Ennek alapján elképzelhető, hogy az éjszaka megnövekedett melatonin szint szintén hozzájárulhat a fiatal neutrofil alakok csontvelőből történő mobilizációjához. Ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a lép és a máj szintén fontos szerepet töltenek be a neutrofil sejtek eliminációjában, így ezen szervek ritmikus működése is befolyásolhatja a perifériás neutrofil granulocita populáció korbéli eloszlásának ingadozását.



29. ábra

**A humán perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti ingadozása a nap folyamán.**

A nap első felében mérhető alacsony csontvelői CXCL12 szekréció a fiatal neutrofil granulocita alakok mobilizációját idézi elő a csontvelőből, ebben az időszakban a *Cxcr4* expresszió alacsony a sejtekben. A keringésben a neutrofil granulociták érésen mennek keresztül, aminek során növekszik a *Cxcr4* kifejeződése. Az érett sejtek arányának növekedését a sejtek keringésből történő intenzív eliminációja követi, melyben az ebben az időszakban a megnövekedett csontvelői CXCL12 szekréció lehet meghatározó. Ily módon a ritmusos csontvelői működés a perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti összetételének egyik fő szabályozója lehet.



## 8. Következtetések

Dolgozatomban a humán neutrofil granulociták cirkadián óra általi szabályozottságával kapcsolatos eredményeinket ismertettem. Vizsgálataink alapján az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1. Az általunk magyarra fordított MCTQ kérdőív validálása sikeres volt így a kérdőív további vizsgálatokban is felhasználható.
2. A neutrofil granulociták és mononukleáris sejtek óragén expressziós mintázata alapvető módon különbözik.
3. Neutrofil granulocitákban a *Bmal1* expresszióhoz viszonyított *Per2*, *Per3*, *Dbp* és *Rev-erba* szintek alacsonyabbak, mint mononukleáris sejtekben.
4. A neutrofil granulocitákban a PER2, valamint a BMAL1 fehérjék kifejeződése is alacsonyabb, mint mononukleáris sejtekben.
5. Neutrofil granulocitákban a BMAL1 kifejeződése nem ritmusos, a fehérje hipofoszforilált formában van jelen és alacsonyabb sejtmagi megjelenést mutat, mint limfocitákban vagy monocitákban.
6. PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányú differenciálódása alatt a molekuláris oszcillátor működése megváltozik, a negatív faktor PER2 kifejeződése csökken.
7. Neutrofil granulociták *Per1* expressziója a sejtek kortizollal való kezelésével *in vitro* indukálható. *In vivo* a *Per1* RNS szintek a plazma kortizol koncentráció napi ingadozásával szinkron oszcillációt mutatnak.
8. A perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti összetétele ingadozik a nap folyamán: az esti/éjszakai időszakban magasabb az idősebb sejtek aránya.
9. Neutrofil granulociták két effektor reakciója, az opszonizált zimoszán stimulusra bekövetkező szuperoxid termelő képesség, valamint az opszonizált *Staphylococcus aureus* fagocitózis is hatékonyabb abban az időszakban, amikor az érettebb sejtek aránya nagyobb a keringésben.

## 9. Összefoglalás

A cirkadián ritmus a környezeti tényezők ciklusos napi változásaihoz igazítja az élelműködéseket, így segíti a szervezet környezethez való alkalmazkodását. A ritmust a sejtekben működő molekuláris oszcillátorok hozzák létre, melyek működési alapja egy transzkripció/transzláció visszacsatolási rendszer. Számos adat utal az immunrendszer cirkadián óra általi szabályozottságára. Bár a neutrofil granulociták a legnagyobb arányban jelen lévő leukociták a keringésben, és számos neutrofil sejtekhez köthető immunválasznak írták már le napi ingadozását, az ennek létrehozásáért felelős mechanizmust még nem ismerjük. A sejtek ritmusos működésének megértése alapvető fontosságú a különböző gyulladásos folyamatok patomechanizmusának megismeréséhez és megfelelő kronoterápia tervezéséhez.

Vizsgálataink során különböző óragén expressziós mintázatot találtunk mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban. Neutrofil sejtekben jelentősen alacsonyabb az órakomponensek kifejeződése és a BMAL1 fehérje sejtmagi megjelenése, mint más leukocitákban. Mindez arra utal, hogy a molekuláris óra működése nem robusztus ezekben a sejtekben. A *Per1* expresszió neutrofil granulocitákban kortizollal indukálható *in vitro*, *in vivo* pedig szinkron fluktuációt mutat a plazma kortizol koncentráció napi ingadozásával. A PLB-985 sejtek neutrofil granulocita irányba történő differenciálódása alatt a molekuláris oszcillátor működése megváltozik, a negatív faktor PER2 kifejeződése csökken. Megfigyeltük, hogy a perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlása napi ingadozást mutat. A sejtekben ritmusos a kemokin receptor és egyben érési marker *Cxcr4* kifejeződése. A CXCR4 ligandumának, a CXCL12-nek, mely a csontvelőből történő sejtmobilizáció egyik fő szabályozója, a plazmában mérhető koncentrációja a receptor expressziójával szinkron változik. A neutrofil populációban ritmusos a NADPH oxidáz *Gp91<sup>phox</sup>* alegységének kifejeződése, és ezzel összhangban éjszaka magasabb a sejtek opszonizált zimoszánnal kiváltható szuperoxid termelése. Ehhez hasonlóan az éjszaka izolált sejtek opszonizált *Staphylococcus aureus*-ra adott fagocitózis válasza is jóval erősebb, mint a napközben izolált sejteké.

Eredményeink arra utalnak, hogy nem a sejtek saját órájának működése, hanem a perifériás neutrofil granulocita populáció korbéli összetételének oszcillációja a meghatározó a sejtek ritmusos válaszkészségének létrejöttében.

## 10. Summary

The circadian time-keeping system enables the organism to anticipate rhythmic environmental changes and therefore is a crucial factor of adaptation. The endogenous rhythm is generated at the cellular level by a mechanism based on the action of interconnected transcription/translation feedback loops. Significant interconnections between circadian regulation and the immune system are underscored by both experimental and clinical data. Although neutrophils are the most abundant leukocytes in human blood, and several immune responses linked to neutrophil functions have been described to be rhythmic, relatively few data are available about the impact of the circadian clock on the regulation of neutrophil functions. Characterization of the time-of-day-specific control of neutrophil responsiveness could help to better understand the pathomechanism of inflammatory responses and design effective chronotherapy.

We found that the expression pattern and ratio of core clock components in human neutrophils characteristically differs from that in mononuclear cells. Both the low expression and the reduced nuclear accumulation of the essential clock protein BMAL1 suggest that the molecular oscillator is down-regulated in neutrophils. Our data show that *Per1* expression in the cells is affected by cortisol *in vitro*, and the phase of *Per1* oscillation is in synchrony with *in vivo* changes of the plasma cortisol levels. In addition, during differentiation of PLB-985 cells into neutrophil-like cells, the molecular oscillator undergoes a significant modification, and the level of the negative factor PER2 decrease. We found that the distribution of young and aged cells within the peripheral neutrophil pool displays a daily rhythm. The expression of the maturation marker *Cxcr4* and morphological attributes showed clear daily oscillation. In addition, in the plasma level of the CXCR4 ligand CXCL12, an important regulator of cell trafficking within the bone marrow, synchronous fluctuations were detected. Expression of another maturation marker, the *Gp91<sup>phox</sup>* subunit of the superoxide generating NADPH oxidase, and parallelly, the superoxide producing capacity of neutrophils were also dependent on the time of the day. In line with this, number of opsonized *Staphylococcus aureus* engulfed by neutrophils was also higher at night, when more aged cells are available in the circulation.

We suggest that changes in age composition of the neutrophil pool rather than the oscillator of the cells are involved in the daily regulation of neutrophil functions.

## 11. Irodalomjegyzék

1. Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE, Muller JE, Mittleman MA. (1997) Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol*, 79: 1512-1516.
2. Iwasaki H, Kondo T. (2004) Circadian timing mechanism in the prokaryotic clock system of cyanobacteria. *J Biol Rhythms*, 19: 436-444.
3. Woelfle MA, Johnson CH. (2006) No promoter left behind: global circadian gene expression in cyanobacteria. *J Biol Rhythms*, 21: 419-431.
4. Noordally ZB, Millar AJ. (2015) Clocks in algae. *Biochemistry*, 54: 171-183.
5. Crosthwaite SK, Dunlap JC, Loros JJ. (1997) *Neurospora* *wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. *Science*, 276: 763-769.
6. Heintzen C, Liu Y. (2007) The *Neurospora crassa* circadian clock. *Adv Genet*, 58: 25-66.
7. Gardner MJ, Hubbard KE, Hotta CT, Dodd AN, Webb AA. (2006) How plants tell the time. *Biochem J*, 397: 15-24.
8. Hsu PY, Harmer SL. (2014) Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends Plant Sci*, 19: 240-249.
9. Ozkaya O, Rosato E. (2012) The circadian clock of the fly: a neurogenetics journey through time. *Adv Genet*, 77: 79-123.
10. Yu W, Hardin PE. (2006) Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J Cell Sci*, 119: 4793-4795.
11. Ko CH, Takahashi JS. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2: R271-277.
12. Stratmann M, Schibler U. (2006) Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *J Biol Rhythms*, 21: 494-506.
13. Hobson JA, Pace-Schott EF. (2002) The cognitive neuroscience of sleep: neuronal systems, consciousness and learning. *Nat Rev Neurosci*, 3: 679-693.
14. Kishi A, Yasuda H, Matsumoto T, Inami Y, Horiguchi J, Tamaki M, Struzik ZR, Yamamoto Y. (2011) NREM sleep stage transitions control ultradian REM sleep rhythm. *Sleep*, 34: 1423-1432.

15. Tannenbaum GS, Martin JB. (1976) Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, 98: 562-570.
16. Tannenbaum GS, Martin JB, Colle E. (1976) Ultradian growth hormone rhythm in the rat: effects of feeding, hyperglycemia, and insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology*, 99: 720-727.
17. Kennaway DJ, Van Dorp CF. (1991) Free-running rhythms of melatonin, cortisol, electrolytes, and sleep in humans in Antarctica. *Am J Physiol*, 260: R1137-1144.
18. Reyes BA, Pendergast JS, Yamazaki S. (2008) Mammalian peripheral circadian oscillators are temperature compensated. *J Biol Rhythms*, 23: 95-98.
19. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, Zoran MJ. (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*, 6: 544-556.
20. Dunlap JC. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96: 271-290.
21. Reppert SM, Weaver DR. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 63: 647-676.
22. Schibler U. (2007) The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues Clin Neurosci*, 9: 257-272.
23. Debruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM. (2006) A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50: 465-477.
24. DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci*, 10: 543-545.
25. Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK. (2016) NPAS2 Compensates for Loss of CLOCK in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet*, 12: e1005882.
26. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110: 251-260.
27. Akashi M, Takumi T. (2005) The orphan nuclear receptor ROR $\alpha$  regulates

- circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol*, 12: 441-448.
28. Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *J Biol Rhythms*, 20: 391-403.
  29. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43: 527-537.
  30. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. (2002) A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*, 418: 534-539.
  31. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB. (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*, 109: 307-320.
  32. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*, 417: 78-83.
  33. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. (2000) Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*, 20: 4773-4781.
  34. Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, Takayasu S, Nakata O, Hashimoto S. (2011) Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Lett*, 585: 2217-2222.
  35. Gachon F. (2007) Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors. *Ann Med*, 39: 562-571.
  36. Hamaguchi H, Fujimoto K, Kawamoto T, Noshiro M, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Furukawa M, Honma S, Honma K, Kurihara H, Kato Y. (2004) Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J*, 382: 43-50.
  37. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y,

- Honma K. (2002) Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*, 419: 841-844.
38. Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, Iwata T, Fujimoto K, Furukawa M, Miyazaki K, Honma S, Honma K, Kato Y. (2004) A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 313: 117-124.
39. Lowrey PL, Takahashi JS. (2004) Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 5: 407-441.
40. Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Honda KK, Honma S, Honma K, Kato Y. (2004) Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem*, 271: 4409-4419.
41. Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL. (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*, 9: 764-775.
42. Buhr ED, Takahashi JS. (2013) Molecular components of the Mammalian circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, 3-27.
43. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, Vielhaber EL, Giovanni A, Virshup DM. (2005) Control of mammalian circadian rhythm by CKIepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol*, 25: 2795-2807.
44. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. (2001) Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107: 855-867.
45. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P. (2010) Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. *PLoS One*, 5: e8561.
46. Partch CL, Shields KF, Thompson CL, Selby CP, Sancar A. (2006) Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 10467-10472.
47. Schmutz I, Wendt S, Schnell A, Kramer A, Mansuy IM, Albrecht U. (2011)

- Protein phosphatase 1 (PP1) is a post-translational regulator of the mammalian circadian clock. *PLoS One*, 6: e21325.
48. Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E. (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*, 22: 1693-1703.
  49. Keesler GA, Camacho F, Guo Y, Virshup D, Mondadori C, Yao Z. (2000) Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase I epsilon. *Neuroreport*, 11: 951-955.
  50. Lee HM, Chen R, Kim H, Etchegaray JP, Weaver DR, Lee C. (2011) The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16451-16456.
  51. Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM. (2000) Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*, 20: 4888-4899.
  52. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, Sassone-Corsi P. (2009) CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol*, 16: 446-448.
  53. Tamaru T, Isojima Y, van der Horst GT, Takei K, Nagai K, Takamatsu K. (2003) Nucleocytoplasmic shuttling and phosphorylation of BMAL1 are regulated by circadian clock in cultured fibroblasts. *Genes Cells*, 8: 973-983.
  54. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P. (2005) Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science*, 309: 1390-1394.
  55. Lee J, Lee Y, Lee MJ, Park E, Kang SH, Chung CH, Lee KH, Kim K. (2008) Dual modification of BMAL1 by SUMO2/3 and ubiquitin promotes circadian activation of the CLOCK/BMAL1 complex. *Mol Cell Biol*, 28: 6056-6065.
  56. Sehgal A. (2008) Ac-ing the clock. *Neuron*, 57: 8-10.
  57. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan PM, Godinho SI, Draetta GF, Pagano M. (2007) SCFFbx13 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science*, 316: 900-904.
  58. Gallego M, Virshup DM. (2007) Post-translational modifications regulate the



- ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 139-148.
59. Meng QJ, Logunova L, Maywood ES, Gallego M, Lebiecki J, Brown TM, Sladek M, Semikhodskii AS, Glossop NR, Piggins HD, Chesham JE, Bechtold DA, Yoo SH, Takahashi JS, Virshup DM, Boot-Handford RP, Hastings MH, Loudon AS. (2008) Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*, 58: 78-88.
  60. Siepka SM, Yoo SH, Park J, Song W, Kumar V, Hu Y, Lee C, Takahashi JS. (2007) Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*, 129: 1011-1023.
  61. Yoo SH, Mohawk JA, Siepka SM, Shan Y, Huh SK, Hong HK, Kornblum I, Kumar V, Koike N, Xu M, Nussbaum J, Liu X, Chen Z, Chen ZJ, Green CB, Takahashi JS. (2013) Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell*, 152: 1091-1105.
  62. Wang X, Tian G, Li Z, Zheng L. (2015) The crosstalk between miRNA and mammalian circadian clock. *Curr Med Chem*, 22: 1582-1588.
  63. Shende VR, Goldrick MM, Ramani S, Earnest DJ. (2011) Expression and rhythmic modulation of circulating microRNAs targeting the clock gene *Bmal1* in mice. *PLoS One*, 6: e22586.
  64. Shende VR, Neuendorff N, Earnest DJ. (2013) Role of miR-142-3p in the post-transcriptional regulation of the clock gene *Bmal1* in the mouse SCN. *PLoS One*, 8: e65300.
  65. Tan X, Zhang P, Zhou L, Yin B, Pan H, Peng X. (2012) Clock-controlled mir-142-3p can target its activator, *Bmal1*. *BMC Mol Biol*, 13: 27.
  66. Chen R, D'Alessandro M, Lee C. (2013) miRNAs are required for generating a time delay critical for the circadian oscillator. *Curr Biol*, 23: 1959-1968.
  67. Du NH, Arpat AB, De Matos M, Gatfield D. (2014) MicroRNAs shape circadian hepatic gene expression on a transcriptome-wide scale. *Elife*, 3: e02510.
  68. Nagel R, Clijsters L, Agami R. (2009) The miRNA-192/194 cluster regulates the Period gene family and the circadian clock. *FEBS J*, 276: 5447-5455.
  69. McCarthy JJ. (2008) MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR.

- Biochim Biophys Acta, 1779: 682-691.
70. Gatfield D, Le Martelot G, Vejnar CE, Gerlach D, Schaad O, Fleury-Olela F, Ruskeepaa AL, Oresic M, Esau CC, Zdobnov EM, Schibler U. (2009) Integration of microRNA miR-122 in hepatic circadian gene expression. *Genes Dev*, 23: 1313-1326.
  71. Strange K, Yin VP. (2012) Rhythmic Ca<sup>2+</sup>(+) signaling: keeping time with microRNAs. *Curr Biol*, 22: R1000-1001.
  72. Schibler U. (2006) Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. *Prog Brain Res*, 153: 271-282.
  73. Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Siepkas SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS. (2004) PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 5339-5346.
  74. Ibuka N, Kawamura H. (1975) Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Res*, 96: 76-81.
  75. Kawamura H, Ibuka N. (1978) The search for circadian rhythm pacemakers in the light of lesion experiments. *Chronobiologia*, 5: 69-88.
  76. Moore RY, Eichler VB. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, 42: 201-206.
  77. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247: 975-978.
  78. Stephan FK, Zucker I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69: 1583-1586.
  79. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*, 14: 697-706.
  80. Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, Sheward WJ, Morrison CF, Dorin JR, Piggins HD, Reubi JC, Kelly JS, Maywood ES, Hastings MH. (2002) The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 109: 497-508.

81. Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, Harmor AJ, Okamura H, Hastings MH. (2006) Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol*, 16: 599-605.
82. van den Pol AN, Dudek FE. (1993) Cellular communication in the circadian clock, the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 56: 793-811.
83. Moore RY, Speh JC, Card JP. (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*, 352: 351-366.
84. Meijer JH, Schwartz WJ. (2003) In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, 18: 235-249.
85. Ramkisoensing A, Meijer JH. (2015) Synchronization of Biological Clock Neurons by Light and Peripheral Feedback Systems Promotes Circadian Rhythms and Health. *Front Neurol*, 6: 128.
86. Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J, Gillette MU. (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 13468-13473.
87. Hamada T, Yamanouchi S, Watanabe A, Shibata S, Watanabe S. (1999) Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythm in vitro. *Brain Res*, 836: 190-193.
88. Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. (2005) The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci*, 28: 152-157.
89. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. (1998) Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron*, 20: 1103-1110.
90. Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. (2010) Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science*, 330: 379-385.
91. Hong HK, Chong JL, Song W, Song EJ, Jyawook AA, Schook AC, Ko CH, Takahashi JS. (2007) Inducible and reversible Clock gene expression in brain using the tTA system for the study of circadian behavior. *PLoS Genet*, 3: e33.

92. Hughes ME, Hong HK, Chong JL, Indacochea AA, Lee SS, Han M, Takahashi JS, Hogenesch JB. (2012) Brain-specific rescue of Clock reveals system-driven transcriptional rhythms in peripheral tissue. *PLoS Genet*, 8: e1002835.
93. Izumo M, Pejchal M, Schook AC, Lange RP, Walisser JA, Sato TR, Wang X, Bradfield CA, Takahashi JS. (2014) Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain *Bmal1* mutant. *Elife*, 3:
94. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U. (2007) System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol*, 5: e34.
95. Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U. (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell*, 119: 693-705.
96. Welsh DK, Yoo SH, Liu AC, Takahashi JS, Kay SA. (2004) Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Curr Biol*, 14: 2289-2295.
97. Saini C, Suter DM, Liani A, Gos P, Schibler U. (2011) The mammalian circadian timing system: synchronization of peripheral clocks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 76: 39-47.
98. Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, Sinturel F, Gosselin P, Gerber A, Fleury-Olela F, Rando G, Demarque M, Franken P. (2015) Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 80: 223-232.
99. DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. (2007) Peripheral circadian oscillators require CLOCK. *Curr Biol*, 17: R538-539.
100. Schaeren-Wiemers N, Andre E, Kapfhammer JP, Becker-Andre M. (1997) The expression pattern of the orphan nuclear receptor RORbeta in the developing and adult rat nervous system suggests a role in the processing of sensory information and in circadian rhythm. *Eur J Neurosci*, 9: 2687-2701.
101. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA. (2000) *Mop3* is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103: 1009-1017.

102. Kornmann B, Schaad O, Reinke H, Saini C, Schibler U. (2007) Regulation of circadian gene expression in liver by systemic signals and hepatocyte oscillators. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 72: 319-330.
103. Skene DJ, Arendt J. (2007) Circadian rhythm sleep disorders in the blind and their treatment with melatonin. *Sleep Med*, 8: 651-655.
104. Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, Schutz G, Schibler U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science*, 289: 2344-2347.
105. Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U. (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev*, 14: 2950-2961.
106. Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Levine S, De Kloet ER. (1988) Ontogeny of the type 2 glucocorticoid receptor in discrete rat brain regions: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 470: 119-127.
107. Cheon S, Park N, Cho S, Kim K. (2013) Glucocorticoid-mediated Period2 induction delays the phase of circadian rhythm. *Nucleic Acids Res*, 41: 6161-74.
108. Reinke H, Saini C, Fleury-Olela F, Dibner C, Benjamin IJ, Schibler U. (2008) Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev*, 22: 331-345.
109. Morf J, Rey G, Schneider K, Stratmann M, Fujita J, Naef F, Schibler U. (2012) Cold-inducible RNA-binding protein modulates circadian gene expression posttranscriptionally. *Science*, 338: 379-383.
110. Gamsby JJ, Loros JJ, Dunlap JC. (2009) A phylogenetically conserved DNA damage response resets the circadian clock. *J Biol Rhythms*, 24: 193-202.
111. Krieger DT. (1975) Rhythms of ACTH and corticosteroid secretion in health and disease, and their experimental modification. *J Steroid Biochem*, 6: 785-791.
112. Refinetti R, Menaker M. (1992) The circadian rhythm of body temperature. *Physiol Behav*, 51: 613-637.
113. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. (1996) Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol*, 271: E246-252.
114. Klerman EB. (2005) Clinical aspects of human circadian rhythms. *J Biol*

- Rhythms, 20: 375-386.
115. Degaute JP, van de Borne P, Linkowski P, Van Cauter E. (1991) Quantitative analysis of the 24-hour blood pressure and heart rate patterns in young men. *Hypertension*, 18: 199-210.
  116. Johnson MP, Duffy JF, Dijk DJ, Ronda JM, Dyal CM, Czeisler CA. (1992) Short-term memory, alertness and performance: a reappraisal of their relationship to body temperature. *J Sleep Res*, 1: 24-29.
  117. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mellow M. (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *J Biol Rhythms*, 18: 80-90.
  118. Hsu PK, Ptacek LJ, Fu YH. (2015) Genetics of human sleep behavioral phenotypes. *Methods Enzymol*, 552: 309-324.
  119. Roenneberg T, Kuehnle T, Pramstaller PP, Ricken J, Havel M, Guth A, Mellow M. (2004) A marker for the end of adolescence. *Curr Biol*, 14: R1038-1039.
  120. Roenneberg T, Kantermann T, Juda M, Vetter C, Allebrandt KV. (2013) Light and the human circadian clock. *Handb Exp Pharmacol*, 311-331.
  121. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH. (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291: 1040-1043.
  122. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptacek LJ, Fu YH. (2005) Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 434: 640-644.
  123. Jones CR, Campbell SS, Zone SE, Cooper F, DeSano A, Murphy PJ, Jones B, Czajkowski L, Ptacek LJ. (1999) Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med*, 5: 1062-1065.
  124. Winget CM, DeRoshia CW, Markley CL, Holley DC. (1984) A review of human physiological and performance changes associated with desynchronization of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med*, 55: 1085-1096.
  125. Barclay JL, Husse J, Bode B, Naujokat N, Meyer-Kovac J, Schmid SM, Lehnert H, Oster H. (2012) Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. *PLoS One*, 7: e37150.
  126. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. (2001) Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study

- of 27,485 people. *Occup Environ Med*, 58: 747-752.
127. Rajaratnam SM, Arendt J. (2001) Health in a 24-h society. *Lancet*, 358: 999-1005.
  128. Tenkanen L, Sjoblom T, Harma M. (1998) Joint effect of shift work and adverse life-style factors on the risk of coronary heart disease. *Scand J Work Environ Health*, 24: 351-357.
  129. Willyard C. (2008) Hungry for sleep. *Nat Med*, 14: 477-480.
  130. Akerstedt T. (1990) Psychological and psychophysiological effects of shift work. *Scand J Work Environ Health*, 16 Suppl 1: 67-73.
  131. Feillet C, van der Horst GT, Levi F, Rand DA, Delaunay F. (2015) Coupling between the Circadian Clock and Cell Cycle Oscillators: Implication for Healthy Cells and Malignant Growth. *Front Neurol*, 6: 96.
  132. Grechez-Cassiau A, Rayet B, Guillaumond F, Teboul M, Delaunay F. (2008) The circadian clock component BMAL1 is a critical regulator of p21WAF1/CIP1 expression and hepatocyte proliferation. *J Biol Chem*, 283: 4535-4542.
  133. Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. (2003) Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302: 255-259.
  134. Fu L, Kettner NM. (2013) The circadian clock in cancer development and therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 119: 221-282.
  135. Akerstedt T, Knutsson A, Narusyte J, Svedberg P, Kecklund G, Alexanderson K. (2015) Night work and breast cancer in women: a Swedish cohort study. *BMJ Open*, 5: e008127.
  136. Fenga C. (2016) Occupational exposure and risk of breast cancer. *Biomed Rep*, 4: 282-292.
  137. Schernhammer ES, Kroenke CH, Laden F, Hankinson SE. (2006) Night work and risk of breast cancer. *Epidemiology*, 17: 108-111.
  138. Abendroth A, Klein R, Schlaak J, Metz KA, Dobos GJ, Langhorst J. (2009) [Impressive picture of a melanosis coli after chronic anthraquinone laxative use- is there an increased risk for colorectal cancer?]. *Z Gastroenterol*, 47: 579-582.
  139. Bhatti P, Cushing-Haugen KL, Wicklund KG, Doherty JA, Rossing MA. (2013) Nightshift work and risk of ovarian cancer. *Occup Environ Med*, 70: 231-237.

140. Hidalgo MP, Caumo W, Posser M, Coccaro SB, Camozzato AL, Chaves ML. (2009) Relationship between depressive mood and chronotype in healthy subjects. *Psychiatry Clin Neurosci*, 63: 283-290.
141. Hansen J. (2001) Increased breast cancer risk among women who work predominantly at night. *Epidemiology*, 12: 74-77.
142. Hoffman AE, Zheng T, Stevens RG, Ba Y, Zhang Y, Leaderer D, Yi C, Holford TR, Zhu Y. (2009) Clock-cancer connection in non-Hodgkin's lymphoma: a genetic association study and pathway analysis of the circadian gene cryptochrome 2. *Cancer Res*, 69: 3605-3613.
143. Schernhammer ES, Razavi P, Li TY, Qureshi AA, Han J. (2011) Rotating night shifts and risk of skin cancer in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst*, 103: 602-606.
144. Juda M, Vetter C, Roenneberg T. (2013) Chronotype modulates sleep duration, sleep quality, and social jet lag in shift-workers. *J Biol Rhythms*, 28: 141-151.
145. Wittmann M, Dinich J, Merrow M, Roenneberg T. (2006) Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int*, 23: 497-509.
146. Levandovski R, Dantas G, Fernandes LC, Caumo W, Torres I, Roenneberg T, Hidalgo MP, Allebrandt KV. (2011) Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiol Int*, 28: 771-778.
147. Roenneberg T, Allebrandt KV, Merrow M, Vetter C. (2012) Social jetlag and obesity. *Curr Biol*, 22: 939-943.
148. Kantermann T, Duboutay F, Haubruge D, Kerkhofs M, Schmidt-Trucksass A, Skene DJ. (2013) Atherosclerotic risk and social jetlag in rotating shift-workers: first evidence from a pilot study. *Work*, 46: 273-282.
149. Wong PM, Hasler BP, Kamarck TW, Muldoon MF, Manuck SB. (2015) Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. *J Clin Endocrinol Metab*, 100: 4612-4620.
150. Haraszti RA, Ella K, Gyongyosi N, Roenneberg T, Kaldi K. (2014) Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiol Int*, 31: 603-612.
151. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, Fitzgerald GA. (2004) BMAL1 and CLOCK, two essential components of the



- circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*, 2: e377.
152. Schulz B, Ratzmann KP, Albrecht G, Bibergeil H. (1983) Diurnal rhythm of insulin sensitivity in subjects with normal and impaired glucose tolerance. *Exp Clin Endocrinol*, 81: 263-272.
  153. Fox KM, Mulcahy DA. (1991) Circadian rhythms in cardiovascular function. *Postgrad Med J*, 67 Suppl 3: S33-36.
  154. Grote L. (2004) [Influence of circadian rhythms on cardiovascular function]. *Internist (Berl)*, 45: 994-1005.
  155. Gagnon B, Lawlor PG, Mancini IL, Pereira JL, Hanson J, Bruera ED. (2001) The impact of delirium on the circadian distribution of breakthrough analgesia in advanced cancer patients. *J Pain Symptom Manage*, 22: 826-833.
  156. Pollmann L, Harris PH. (1978) Rhythmic changes in pain sensitivity in teeth. *Int J Chronobiol*, 5: 459-464.
  157. Hrushesky WJ. (2001) Tumor chronobiology. *J Control Release*, 74: 27-30.
  158. Halberg F, Johnson EA, Brown BW, Bittner JJ. (1960) Susceptibility rhythm to *E. coli* endotoxin and bioassay. *Proc Soc Exp Biol Med*, 103: 142-144.
  159. Druzd D, de Juan A, Scheiermann C. (2014) Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol*, 36: 149-162.
  160. Haus E, Smolensky MH. (1999) Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int*, 16: 581-622.
  161. Mavroudis PD, Scheff JD, Calvano SE, Androulakis IP. (2013) Systems biology of circadian-immune interactions. *J Innate Immun*, 5: 153-162.
  162. Petrovsky N, Harrison LC. (1998) The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol*, 16: 635-649.
  163. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. (2013) Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 13: 190-198.
  164. Carter SJ, Durrington HJ, Gibbs JE, Blaikley J, Loudon AS, Ray DW, Sabroe I. (2016) A matter of time: study of circadian clocks and their role in inflammation. *J Leukoc Biol*, 99: 549-560.
  165. Sun Y, Yang Z, Niu Z, Peng J, Li Q, Xiong W, Langnas AN, Ma MY, Zhao Y. (2006) MOP3, a component of the molecular clock, regulates the development of B cells. *Immunology*, 119: 451-460.

166. Yu X, Rollins D, Ruhn KA, Stubblefield JJ, Green CB, Kashiwada M, Rothman PB, Takahashi JS, Hooper LV. (2013) TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science*, 342: 727-730.
167. Arjona A, Sarkar DK. (2006) Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. *Brain Behav Immun*, 20: 469-476.
168. Baumann A, Gonnenswein S, Bischoff SC, Sherman H, Chapnik N, Froy O, Lorentz A. (2013) The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells. *Immunology*, 140: 465-474.
169. Boivin DB, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H, Sun ZS. (2003) Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 102: 4143-4145.
170. Bollinger T, Leutz A, Leliavski A, Skrum L, Kovac J, Bonacina L, Benedict C, Lange T, Westermann J, Oster H, Solbach W. (2011) Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells. *PLoS One*, 6: e29801.
171. Hayashi M, Shimba S, Tezuka M. (2007) Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull*, 30: 621-626.
172. James FO, Boivin DB, Charbonneau S, Belanger V, Cermakian N. (2007) Expression of clock genes in human peripheral blood mononuclear cells throughout the sleep/wake and circadian cycles. *Chronobiol Int*, 24: 1009-1034.
173. Kusanagi H, Hida A, Satoh K, Echizenya M, Shimizu T, Pendergast JS, Yamazaki S, Mishima K. (2008) Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Neurosci Res*, 61: 136-142.
174. Silver AC, Arjona A, Hughes ME, Nitabach MN, Fikrig E. (2012) Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain Behav Immun*, 26: 407-413.
175. Teboul M, Barrat-Petit MA, Li XM, Claustrat B, Formento JL, Milano G, Levi F, Delaunay F. (2007) [Circadian clock gene expression in human peripheral blood mononuclear cells]. *Pathol Biol (Paris)*, 55: 208-210.
176. Scheff JD, Calvano SE, Lowry SF, Androulakis IP. (2010) Modeling the influence of circadian rhythms on the acute inflammatory response. *J Theor Biol*, 264: 1068-1076.
177. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D, Hashimoto

- D, Merad M, Frenette PS. (2012) Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 37: 290-301.
178. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, Mizoguchi T, Wei Q, Lucas D, Ito K, Mar JC, Bergman A, Frenette PS. (2013) Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, 502: 637-643.
179. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, N AG, Kunisaki Y, Zhang D, van Rooijen N, Silberstein LE, Weber C, Nagasawa T, Frenette PS, Castrillo A, Hidalgo A. (2013) Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*, 153: 1025-1035.
180. Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, Westermann J, Born J, Lange T. (2009) Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood*, 113: 5134-5143.
181. Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. (2008) Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell*, 3: 364-366.
182. Young MR, Matthews JP, Kanabrocki EL, Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Scheving LE. (1995) Circadian rhythmometry of serum interleukin-2, interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in men. *Chronobiol Int*, 12: 19-27.
183. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. (2008) Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, 452: 442-447.
184. Reinberg A, Gervais P, Levi F, Smolensky M, Del Cerro L, Ugolini C. (1988) Circadian and circannual rhythms of allergic rhinitis: an epidemiologic study involving chronobiologic methods. *J Allergy Clin Immunol*, 81: 51-62.
185. Sutherland ER. (2005) Nocturnal asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 116: 1179-1186; quiz 1187.
186. Straub RH, Cutolo M. (2007) Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management. *Arthritis Rheum*, 56: 399-408.
187. Arvidson NG, Gudbjornsson B, Elfman L, Ryden AC, Totterman TH, Hallgren R. (1994) Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 53: 521-524.

188. Perry MG, Kirwan JR, Jessop DS, Hunt LP. (2009) Overnight variations in cortisol, interleukin 6, tumour necrosis factor alpha and other cytokines in people with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 68: 63-68.
189. Hashiramoto A, Yamane T, Tsumiyama K, Yoshida K, Komai K, Yamada H, Yamazaki F, Doi M, Okamura H, Shiozawa S. (2010) Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha. *J Immunol*, 184: 1560-1565.
190. Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. (2012) Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 12662-12667.
191. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. (2014) Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*, 40: 178-186.
192. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. (2013) Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science*, 341: 1483-1488.
193. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, Gasparian AV, Fedtsova N, Gleiberman AS, Gitlin, II, Artemicheva NM, Deluca KA, Gudkov AV, Antoch MP. (2012) Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF-kappaB-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: E2457-2465.
194. Lam MT, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-Oishi Y, Benner C, Kaikkonen MU, Kim AS, Kosaka M, Lee CY, Watt A, Grossman TR, Rosenfeld MG, Evans RM, Glass CK. (2013) Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature*, 498: 511-515.
195. Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Takahashi M, Izawa T, Imaizumi K, Taniguchi N, Ohno H, Kizaki T. (2014) A circadian clock gene, *Rev-erbalpha*, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of *Ccl2* expression. *J Immunol*, 192: 407-417.
196. Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, Fruchart JC, Staels B. (2001) The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. *EMBO Rep*, 2: 42-48.
197. Borregaard N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33: 657-670.

198. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. (1976) Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest*, 58: 705-715.
199. Lahoz-Beneytez J, Elemans M, Zhang Y, Ahmed R, Salam A, Block M, Niederalt C, Asquith B, Macallan D. (2016) Human neutrophil kinetics: modeling of stable isotope labeling data supports short blood neutrophil half-lives. *Blood*, 127(26): 3431-3438.
200. [www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb/blood/myeloid.htm](http://www.kumc.edu/instruction/medicine/anatomy/histoweb/blood/myeloid.htm) (2016)
201. Jagels MA, Chambers JD, Arfors KE, Hugli TE. (1995) C5a- and tumor necrosis factor-alpha-induced leukocytosis occurs independently of beta 2 integrins and L-selectin: differential effects on neutrophil adhesion molecule expression in vivo. *Blood*, 85: 2900-2909.
202. Jagels MA, Hugli TE. (1992) Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis. A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J Immunol*, 148: 1119-1128.
203. Terashima T, English D, Hogg JC, van Eeden SF. (1998) Release of polymorphonuclear leukocytes from the bone marrow by interleukin-8. *Blood*, 92: 1062-1069.
204. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. (2008) The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood*, 111: 42-49.
205. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. (2002) G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 17: 413-423.
206. Furze RC, Rankin SM. (2008) Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, 125: 281-288.
207. Nathan C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6: 173-182.
208. Kolaczkowska E, Kubes P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13: 159-175.
209. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. (2007) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*,

- 101: 234-247.
210. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 176: 231-241.
  211. Dalli J, Serhan CN. (2012) Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*, 120: e60-72.
  212. Duarte TA, Noronha-Dutra AA, Nery JS, Ribeiro SB, Pitanga TN, Lapa ESJR, Arruda S, Boechat N. (2012) Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. *Tuberculosis (Edinb)*, 92: 218-225.
  213. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, Plow EF. (2008) Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood*, 112: 2327-2335.
  214. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, Zimmerman GA, McIntyre TM. (2003) Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem*, 278: 33161-33168.
  215. Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, Ivanyi Z, Kittel A, Powell DW, McLeish KR, Ligeti E. (2013) Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*, 121: 510-518.
  216. Zarembek KA, Godowski PJ. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*, 168: 554-561.
  217. Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. (2016) Signaling via the NFkappaB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 8: 227-241.
  218. May RC, Machesky LM. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 114: 1061-1077.
  219. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. (2007) Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol*, 28: 340-345.
  220. Pham CT. (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of

- inflammation. *Nat Rev Immunol*, 6: 541-550.
221. Soehnlein O. (2009) Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins. *J Mol Med (Berl)*, 87: 1157-1164.
  222. Khatua B, Bhattacharya K, Mandal C. (2012) Sialoglycoproteins adsorbed by *Pseudomonas aeruginosa* facilitate their survival by impeding neutrophil extracellular trap through siglec-9. *J Leukoc Biol*, 91: 641-655.
  223. Menten-Dedoyart C, Faccinetto C, Golovchenko M, Dupiereux I, Van Lerberghe PB, Dubois S, Desmet C, Elmoualij B, Baron F, Rudenko N, Oury C, Heinen E, Couvreur B. (2012) Neutrophil extracellular traps entrap and kill *Borrelia burgdorferi* sensu stricto spirochetes and are not affected by *Ixodes ricinus* tick saliva. *J Immunol*, 189: 5393-5401.
  224. Young RL, Malcolm KC, Kret JE, Caceres SM, Poch KR, Nichols DP, Taylor-Cousar JL, Saavedra MT, Randell SH, Vasil ML, Burns JL, Moskowitz SM, Nick JA. (2011) Neutrophil extracellular trap (NET)-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of acquired resistance within the CF airway, independent of CFTR. *PLoS One*, 6: e23637.
  225. Babior BM. (1999) NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93: 1464-1476.
  226. DeLeo FR, Quinn MT. (1996) Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J Leukoc Biol*, 60: 677-691.
  227. Quinn MT, Gauss KA. (2004) Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol*, 76: 760-781.
  228. Harrison RE, Touret N, Grinstein S. (2002) Microbial killing: oxidants, proteases and ions. *Curr Biol*, 12: R357-359.
  229. Rada B, Leto TL. (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol*, 15: 164-187.
  230. Rada BK, Geiszt M, Kaldi K, Timar C, Ligeti E. (2004) Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. *Blood*, 104: 2947-2953.
  231. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. (2002) Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature*, 416: 291-297.
  232. [www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=NADPH+Oxidase&lang=1#](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=NADPH+Oxidase&lang=1#)

- (2016)
233. Bunting M, Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. (2002) Leukocyte adhesion deficiency syndromes: adhesion and tethering defects involving beta 2 integrins and selectin ligands. *Curr Opin Hematol*, 9: 30-35.
  234. Introne W, Boissy RE, Gahl WA. (1999) Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol Genet Metab*, 68: 283-303.
  235. Lekstrom-Himes JA, Gallin JI. (2000) Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. *N Engl J Med*, 343: 1703-1714.
  236. Ottonello L, Dapino P, Pastorino G, Dallegri F, Sacchetti C. (1995) Neutrophil dysfunction and increased susceptibility to infection. *Eur J Clin Invest*, 25: 687-692.
  237. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., Krause KH. (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142: w13659.
  238. Goldblatt D. (2014) Recent advances in chronic granulomatous disease. *J Infect*, 69 Suppl 1: S32-35.
  239. Goldblatt D, Thrasher AJ. (2000) Chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*, 122: 1-9.
  240. Nemeth T, Mocsai A. (2012) The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett*, 143: 9-19.
  241. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. (2014) The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 10: 593-601.
  242. Alavi A, Sajic D, Cerci FB, Ghazarian D, Rosenbach M, Jorizzo J. (2014) Neutrophilic dermatoses: an update. *Am J Clin Dermatol*, 15: 413-423.
  243. Gibbs J, Ince L, Matthews L, Mei J, Bell T, Yang N, Saer B, Begley N, Poolman T, Pariollaud M, Farrow S, DeMayo F, Hussell T, Worthen GS, Ray D, Loudon A. (2014) An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med*, 20: 919-926.
  244. Niehaus GD, Ervin E, Patel A, Khanna K, Vanek VW, Fagan DL. (2002) Circadian variation in cell-adhesion molecule expression by normal human leukocytes. *Can J Physiol Pharmacol*, 80: 935-940.
  245. Hriscu ML. (2005) Modulatory factors of circadian phagocytic activity. *Ann N Y Acad Sci*, 1057: 403-430.



246. Melchart D, Martin P, Hallek M, Holzmann M, Jurcic X, Wagner H. (1992) Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults. *Chronobiol Int*, 9: 35-45.
247. Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Eichler HG, Bauer P, Wagner OF. (1999) Circadian variation of granulocyte colony stimulating factor levels in man. *Br J Haematol*, 106: 368-370.
248. Sennels HP, Jorgensen HL, Hansen AL, Goetze JP, Fahrenkrug J. (2011) Diurnal variation of hematology parameters in healthy young males: the Bispebjerg study of diurnal variations. *Scand J Clin Lab Invest*, 71: 532-541.
249. Kusanagi H, Mishima K, Satoh K, Echizenya M, Katoh T, Shimizu T. (2004) Similar profiles in human period1 gene expression in peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Neurosci Lett*, 365: 124-127.
250. Haimovich B, Calvano J, Haimovich AD, Calvano SE, Coyle SM, Lowry SF. (2010) In vivo endotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes. *Crit Care Med*, 38: 751-758.
251. Muniain MA, Rodriguez MD, Mata R, Pozuelo F, Gimenez MJ, Romero A. (1989) [Circadian variations in the production of superoxide and liberation of lysosomal enzymes of neutrophils in peripheral blood]. *Rev Clin Esp*, 184: 20-23.
252. Muniain MA, Rodriguez MD, Romero A, Mata R, Vargas C, Naranjo A. (1991) Circadian variations in the superoxide production, enzyme release and neutrophil aggregation in patients with rheumatoid arthritis and controls. *Br J Rheumatol*, 30: 138-140.
253. Shiraishi M, Suzuki K, Abe T, Kikuchi T, Satoh H, Nakaji S, Sugawara K. (1996) Diurnal variation in neutrophil function. *Environ Health Prev Med*, 1: 65-70.
254. Genzel L, Ahrberg K, Roselli C, Niedermaier S, Steiger A, Dresler M, Roenneberg T. (2013) Sleep timing is more important than sleep length or quality for medical school performance. *Chronobiol Int*, 30: 766-771.
255. Pessach I, Levy R. (2000) The NADPH oxidase diaphorase activity in permeabilized human neutrophils and granulocytic like PLB-985 cells. *Adv Exp*

- Med Biol, 479: 107-114.
256. Pivot-Pajot C, Chouinard FC, El Azreq MA, Harbour D, Bourgoin SG. (2010) Characterisation of degranulation and phagocytic capacity of a human neutrophilic cellular model, PLB-985 cells. *Immunobiology*, 215: 38-52.
  257. Ratthe C, Girard D. (2008) Investigation of the interleukin (IL)-4/IL-4 receptor system in promyelocytic leukaemia PLB-985 cells during differentiation toward neutrophil-like phenotype: mechanism involved in IL-4-induced SOCS3 protein expression. *Br J Haematol*, 140: 59-70.
  258. Hua J, Hasebe T, Someya A, Nakamura S, Sugimoto K, Nagaoka I. (2000) Evaluation of the expression of NADPH oxidase components during maturation of HL-60 cells to neutrophil lineage. *J Leukoc Biol*, 68: 216-224.
  259. Meyer WH, Howard TH. (1983) Changes in actin content during induced myeloid maturation of human promyelocytes. *Blood*, 62: 308-314.
  260. Rosmarin AG, Weil SC, Rosner GL, Griffin JD, Arnaout MA, Tenen DG. (1989) Differential expression of CD11b/CD18 (Mo1) and myeloperoxidase genes during myeloid differentiation. *Blood*, 73: 131-136.
  261. Hoffmann J, Symul L, Shostak A, Fischer T, Naef F, Brunner M. (2014) Non-circadian expression masking clock-driven weak transcription rhythms in U2OS cells. *PLoS One*, 9: e102238.
  262. Rey G, Cesbron F, Rougemont J, Reinke H, Brunner M, Naef F. (2011) Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biol*, 9: e1000595.
  263. Schwartz J, Leidal KG, Femling JK, Weiss JP, Nauseef WM. (2009) Neutrophil bleaching of GFP-expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria. *J Immunol*, 183: 2632-2641.
  264. Horne JA, Ostberg O. (1976) A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms. *Int J Chronobiol*, 4: 97-110.
  265. Kantermann T, Juda M, Merrow M, Roenneberg T. (2007) The human circadian clock's seasonal adjustment is disrupted by daylight saving time. *Curr Biol*, 17: 1996-2000.
  266. Folkard S, Monk TH, Lobban MC. (1979) Towards a predictive test of

- adjustment to shift work. *Ergonomics*, 22: 79-91.
267. Smith CS, Reilly C, Midkiff K. (1989) Evaluation of three circadian rhythm questionnaires with suggestions for an improved measure of morningness. *J Appl Psychol*, 74: 728-738.
  268. Torsvall L, Akerstedt T. (1980) A diurnal type scale. Construction, consistency and validation in shift work. *Scand J Work Environ Health*, 6: 283-290.
  269. Baehr EK, Revelle W, Eastman CI. (2000) Individual differences in the phase and amplitude of the human circadian temperature rhythm: with an emphasis on morningness-eveningness. *J Sleep Res*, 9: 117-127.
  270. Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF, Czeisler CA. (1999) Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med*, 47: 141-150.
  271. Kudielka BM, Federenko IS, Hellhammer DH, Wust S. (2006) Morningness and eveningness: the free cortisol rise after awakening in "early birds" and "night owls". *Biol Psychol*, 72: 141-146.
  272. Randler C, Schaal S. (2010) Morningness-eveningness, habitual sleep-wake variables and cortisol level. *Biol Psychol*, 85: 14-18.
  273. Laberge L, Carrier J, Lesperance P, Lambert C, Vitaro F, Tremblay RE, Montplaisi J. (2000) Sleep and circadian phase characteristics of adolescent and young adult males in a naturalistic summertime condition. *Chronobiol Int*, 17: 489-501.
  274. Martin SK, Eastman CI. (2002) Sleep logs of young adults with self-selected sleep times predict the dim light melatonin onset. *Chronobiol Int*, 19: 695-707.
  275. Terman JS, Terman M, Lo ES, Cooper TB. (2001) Circadian time of morning light administration and therapeutic response in winter depression. *Arch Gen Psychiatry*, 58: 69-75.
  276. Burgess HJ, Eastman CI. (2005) The dim light melatonin onset following fixed and free sleep schedules. *J Sleep Res*, 14: 229-237.
  277. Roenneberg T, Kumar CJ, Meroow M. (2007) The human circadian clock entrains to sun time. *Curr Biol*, 17: R44-45.
  278. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. (1984) Physiological functions of

- glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev*, 5: 25-44.
279. Hida A, Kusanagi H, Satoh K, Kato T, Matsumoto Y, Echizenya M, Shimizu T, Higuchi S, Mishima K. (2009) Expression profiles of PERIOD1, 2, and 3 in peripheral blood mononuclear cells from older subjects. *Life Sci*, 84: 33-37.
280. Archer SN, Viola AU, Kyriakopoulou V, von Schantz M, Dijk DJ. (2008) Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. *Sleep*, 31: 608-617.
281. Ebisawa T, Numazawa K, Shimada H, Izutsu H, Sasaki T, Kato N, Tokunaga K, Mori A, Honma K, Honma S, Shibata S. (2010) Self-sustained circadian rhythm in cultured human mononuclear cells isolated from peripheral blood. *Neurosci Res*, 66: 223-227.
282. Fukuya H, Emoto N, Nonaka H, Yagita K, Okamura H, Yokoyama M. (2007) Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 354: 924-928.
283. Fonken LK, Frank MG, Kitt MM, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF. (2015) Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun*, 45: 171-179.
284. Burioka N, Takata M, Okano Y, Ohdo S, Fukuoka Y, Miyata M, Takane H, Endo M, Suyama H, Shimizu E. (2005) Dexamethasone influences human clock gene expression in bronchial epithelium and peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Chronobiol Int*, 22: 585-590.
285. Fukuoka Y, Burioka N, Takata M, Ohdo S, Miyata M, Endo M, Shimizu E. (2005) Glucocorticoid administration increases hPer1 mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells in vitro or in vivo. *J Biol Rhythms*, 20: 550-553.
286. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. (2003) Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 19: 583-593.
287. Borregaard N, Cowland JB. (1997) Granules of the human neutrophilic

- polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89: 3503-3521.
288. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. (1994) Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 2305-2309.
289. McEwen BS, Karatsoreos IN. (2015) Sleep Deprivation and Circadian Disruption: Stress, Allostasis, and Allostatic Load. *Sleep Med Clin*, 10: 1-10.
290. Roenneberg T, Merrow M. (2016) The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol*, 26: R432-443.
291. Kalsbeek A, la Fleur S, Fliers E. (2014) Circadian control of glucose metabolism. *Mol Metab*, 3: 372-383.
292. Haus EL, Smolensky MH. (2013) Shift work and cancer risk: potential mechanistic roles of circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. *Sleep Med Rev*, 17: 273-284.
293. Ha M, Park J. (2005) Shiftwork and metabolic risk factors of cardiovascular disease. *J Occup Health*, 47: 89-95.
294. Hatanaka F, Matsubara C, Myung J, Yoritaka T, Kamimura N, Tsutsumi S, Kanai A, Suzuki Y, Sassone-Corsi P, Aburatani H, Sugano S, Takumi T. (2010) Genome-wide profiling of the core clock protein BMAL1 targets reveals a strict relationship with metabolism. *Mol Cell Biol*, 30: 5636-5648.
295. Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. (2012) Transcriptional architecture and chromatin landscape of the core circadian clock in mammals. *Science*, 338: 349-354.
296. Fortier EE, Rooney J, Dardente H, Hardy MP, Labrecque N, Cermakian N. (2011) Circadian variation of the response of T cells to antigen. *J Immunol*, 187: 6291-6300.
297. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L. (2013) What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *J Leukoc Biol*, 94: 595-601.
298. Ferrante A, Gellerman D, Ay A, Woods KP, Filipowicz AM, Jain K, Bearden N, Ingram KK. (2015) Diurnal Preference Predicts Phase Differences in Expression of Human Peripheral Circadian Clock Genes. *J Circadian Rhythms*, 13: 4.
299. Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart JC, Kosykh V,

- Staels B. (2000) Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb $\alpha$  expression in liver. *Endocrinology*, 141: 3799-3806.
300. Wuarin J, Schibler U. (1990) Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell*, 63: 1257-1266.
301. Giambelluca MS, Cloutier N, Rollet-Labelle E, Boilard E, Pouliot M. (2013) Expression and regulation of glycogen synthase kinase 3 in human neutrophils. *Int J Biochem Cell Biol*, 45: 2660-2665.
302. Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A. (2003) Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod*, 69: 81-91.
303. Alvarez JD, Sehgal A. (2005) The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *J Biol Rhythms*, 20: 111-121.
304. Gorlino CV, Ranocchia RP, Harman MF, Garcia IA, Crespo MI, Moron G, Maletto BA, Pistoresi-Palencia MC. (2014) Neutrophils exhibit differential requirements for homing molecules in their lymphatic and blood trafficking into draining lymph nodes. *J Immunol*, 193: 1966-1974.
305. Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, Jones CC, Cosgrove GP, Cool CD, Rai PR, Brown KK, Weiss DJ, Poynter ME, Suratt BT. (2007) Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol*, 178: 8148-8157.
306. Scanzano A, Schembri L, Rasini E, Luini A, Dallatorre J, Legnaro M, Bombelli R, Congiu T, Cosentino M, Marino F. (2015) Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Inflamm Res*, 64: 127-135.
307. Burdon PC, Martin C, Rankin SM. (2005) The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner. *Blood*, 105: 2543-2548.
308. Day RB, Link DC. (2012) Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci*, 69: 1415-1423.
309. Pena C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. (2007) Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res*, 43: 263-269.

## 12. Saját publikációk jegyzéke

### *Az értekezés alapját képező publikációk:*

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

### *Egyéb publikációk:*

3. 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: 134-643.

## **Köszönetnyilvánítás**

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Káldi Krisztinának, aki az évek során odaadó segítségével, tanácsaival, ötleteivel és kritikáival segítette a szakmai fejlődésemet és a laborban végzett munkámat. Segítőkészsége és szakmaszeretete példa értékű számomra.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet vezetőjének, Prof. Hunyady Lászlónak, hogy az intézetben végzett munkámat mindvégig támogatta. Hálával tartozom Prof. Ligeti Erzsébetnek, aki Programvezetőként segítette munkámat.

Köszönöm a volt és a jelenlegi TDK hallgatóimnak: Dr. Haraszti Rékának, Dr. Vajda Dorottyának, Kalocsai Rékának, Dr. Herczeg Rékának, Soós Péternek, Simon Patriknak és Kovács Adriennek a rengeteg segítséget, a lelkesedésüket és a sok vidám pillanatot.

Külön köszönöm a laborunk volt és jelenlegi munkatársainak: Makara Krisztinának, hogy mindig számíthattam rá. Dr. Gyöngyösi Norbertnek, hogy hasznos szakmai tanácsaival segítette a munkámat. Óriási hálával tartozom Südy Ágnesnek és Szőke Anitának, akik nem sajnálták idejüket az értekezésem figyelmes és kritikus átnézésétől.

Külön szeretném megköszönni Dr. Csépanyi-Kömi Rolandnak az évek során nyújtott rengeteg segítségét és szakmai tanácsait.

Hálás vagyok Dr. Fülöp Lászlónak, Dr. Lázár Enikőnek és Dr. Kerényi Áronnak a 24 órás kísérletek során nyújtott segítségükért.

Emellett köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében dolgozó összes munkatársamnak a rengeteg tanácsért és a jó hangulatért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni mindazt a támogatást és türelmet, amit doktori munkám során családomtól és barátaimtól kaptam.