

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A cirkadián ritmus sejt- és szervezetszintű vizsgálata



Dr. Káldi Krisztina

Semmelweis Egyetem
Általános Orvostudományi Kar
Élettani Intézet

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Irodalmi áttekintés.....	6
1.1. Bevezetés	6
1.2. A cirkadián ritmus definíciója és főbb jellemzői.....	7
1.3. A molekuláris órák működése	9
1.3.1. A <i>Neurospora crassa</i> molekuláris órája.....	9
1.3.2. Az emlős sejtekben működő molekuláris óra.....	13
1.4. A cirkadián ritmus szervezeti szintű regulációja emlősökben.....	16
1.5. A cirkadián ritmus főbb humánélettani vonatkozásai.....	17
1.6. A cirkadián ritmus orvosi vonatkozásai.....	18
2. Célkitűzések.....	21
3. Módszerek.....	23
4. Eredmények és megbeszélés.....	29
4.1. A molekuláris óraműködés vizsgálata <i>Neurospora crassa</i> modellorganizmusban	29
4.1.1. A foszforiláció szerepe a molekuláris óra pozitív komponensének szabályozásában	29
4.1.1.1. A FRQ és a WCC közötti molekuláris és funkcionális kölcsönhatás vizsgálata.....	29
4.1.1.2. A WCC foszforilációja és aktivitása párhuzamosan változik.....	32
4.1.1.3. A PP2A szerepének vizsgálata a WCC foszforilációjának és aktivitásának szempontjából	35
4.1.1.4. Következtetések	37
4.1.2. A WC-1 expresszió szabályozásának elemzése	38
4.1.2.1. A wc-1 gén kifejeződését több promóter szabályozza.....	39
4.1.2.2. A wc-1 promóterek regulációjának vizsgálata.....	43
4.1.2.3. Következtetések és továbbvezető megfigyelések	47
4.1.3. A <i>Neurospora crassa</i> óra fényválaszának molekuláris elemzése	50
4.1.3.1. A VVD fényválaszt befolyásoló szerepének és celluláris lokalizációjának vizsgálata.....	51
4.1.3.2. A VVD gátló hatása a WCC dimerizációjára	54
4.1.3.3. A nap folyamán szintetizálódó VVD elnyomhatja az éjszakai fényjelek ritmust zavaró hatását	57
4.1.3.4. Összefoglalás és következtetések	59
4.1.4. A reaktív oxigén származékok (ROS) hatása a molekuláris óra működésére.....	61
4.1.4.1. A ROS szintek hatása a cirkadián óra fázisára	62
4.1.4.2. A ROS szerepe a konidizációs fázis hőmérsékletfüggésének szabályozásában.....	66
4.1.4.3. A ROS szintek változása befolyásolja a molekuláris óra működését.....	68
4.1.4.4. Összefoglalás és továbbvezető gondolatok.....	73
4.1.5. A RAS2 monomer G fehérje szerepe az óraműködés metabolikus kompenzációjában	75
4.1.5.1. A RAS2 mutáció hatása a cirkadián ritmusra <i>Neurospora crassa</i> -ban	76
4.1.5.2. A RAS2 és a molekuláris óra közötti kölcsönhatás vizsgálata.....	78

4.1.5.3. A molekuláris óra glükózra adott válaszát befolyásolja a RAS2.....	83
4.1.5.4. A cirkadián óra és a RAS2 közötti lehetséges szignalizációs utak vizsgálata	84
4.1.5.5. Következtetések	86
4.2. A humán óraműködés és annak zavarával összefüggő állapotok vizsgálata	87
4.2.1. Neutrofil granulociták ritmikus működésének vizsgálata.....	87
4.2.1.1. Neutrofil granulocitákban és a mononukleáris sejtekben különbözik az óragének expressziója és poszttranszlációs módosulása	88
4.2.1.2. PLB-985 sejtek differenciálódása folyamán változik a PER2 expressziója	93
4.2.1.3. Kortizol hatása a neutrofil granulociták óragén expressziójára.....	94
4.2.1.4. A perifériás neutrofil granulocita populáció korszerinti összetételének napszaki változásai	95
4.2.1.5. A neutrofil granulociták válaszkészségének ritmikus változása	97
4.2.1.6. Az eredmények értelmezése, következtetések.....	98
4.2.2. Az alvás időzítése és az egyetemi tanulmányi teljesítmény közötti összefüggések.....	101
4.2.2.1. A vizsgált minta alapvető jellemzői, valamint az időzónán belüli elhelyezkedés és a kronotípus összefüggései	102
4.2.2.2. Az SJL és a tanulmányi teljesítmény közötti összefüggés	103
4.2.2.3. Összefoglalás, következtetések, limitációk	107
4.2.3. A szociális jetlag összefüggése az alvásminőséggel és a szív működés szabályozásával ..	108
4.2.3.1. A vizsgálatban résztvevők alapvető jellemzői, napi ritmusuk és alvásidőzítésük jellegzetességei	109
4.2.3.2. A HRV időtartományban történő elemzése	112
4.2.3.3. A HRV frekvencia tartományban történő elemzése	115
4.2.3.4. Az SJL és a szubjektív alvásminőség összefüggése	116
4.2.3.5. Az eredmények összefoglalása, limitáló tényezők, továbbvezető gondolatok	117
5. Az eredmények összefoglalása	120
6. Köszönetnyilvánítás	122
7. Irodalomjegyzék.....	123
8. Közleményjegyzék.....	146
8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények.....	146
8.2. A PhD dolgozat elkészítését követően született további közlemények	148
8.3. A PhD dolgozat elkészültét megelőzően megjelent közlemények	149

Rövidítések jegyzéke

ACTH	Adrenokortikotrop hormon
<i>bd</i>	A <i>band</i> törzs jelölése
BMAL1	Brain and muscle ARNT-like protein-1
CAMK-1	Calcium/calmodulin dependens kináz 1
CAT	Kataláz
C-box	Clock-box
<i>cgc</i>	Óra által kontrollált gén
cDNS	Komplementer DNS
CHX	Cikloheximid
CK	Kazein kináz
CLOCK	Circadian locomotor output cycles kaput
CREB	cAMP response element-binding protein
CRH	Corticotrop releasing hormon
CRY	Chrytochrome
CSP-1	Conidial separation 1
CT	Cirkadián idő
DBP	Albumin D-site-binding protein
DD	Állandó sötét
DEC	Differentiated embryo chondrocyte protein
EMSA	Elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálat
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FASPS	Familiáris előretolt alvásfázis szindróma
FF	FRQ-FRH interakcióért felelős szakasz
FLO	FRQ-less oscillator (FRQ-nélküli oszcillátor)
FRH	FRQ-interacting RNA helicase (FRQ-kel kölcsönható RNS-helikáz)
FRQ	Frequency
FWO	Frequency-White-Collar-based oscillator
Gapdh	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
GFP	Zöld fluorszcens protein
HF	Nagy frekvencia (0,15-0,4 Hz)
HLF	Hepatic leukemia factor
HRV	Szívfrekvencia variabilitás
IBI	Ütések közötti intervallum
IPTG	Izopropil-1-tio- β -galaktopiranozid
LD	Fény-sötétség

LF	Alacsony frekvencia (0,04-0,15 Hz)
LL	Állandó világos
LOV	Light-oxygen-voltage (fény-oxigén-feszültség érzékelő domén)
LRE	Light response element (a fényválaszért felelős régió)
MAK	Mitogén által aktivált kináz
MAPK	Mitogén által aktivált protein kináz
MCTQ	Munich ChronoType Questionnaire
MEN	Menadion
MSF	Mid-sleep phase on free day (szabadnap alvási középítő)
MSFsasc	Nem, életkor és hétköznapi alvásihiány figyelembevételével korrigált MSF
MSW	Mid-sleep phase on workday (munkanapi alvási középítő)
NAC	N-acetilcisztein
NAG	N-acetilglicin
NET	Neutrophil extracellular trap
NOR	NADPH-oxidáz regulátor
NOX	NADPH-oxidáz
NPAS2	Neuronal PAS domain protein 2
ORF	Open reading frame (nyitott leolvasási keret)
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PAS	PER-ARNT-SIM (domén)
PER	Period fehérje emlős sejtekben
PEST	Pro/Glu/Ser/Thr-gazdag rész a fehérjében
PKA	Protein kináz A
PKC	Protein kináz C
pNN50	az 50 ms-nál nagyobb szomszédos RR-intervallum különbségek százalékos előfordulása
PP	Protein foszfatáz
PRD	Period (Neurospora-ban)
PSD	Spektrális teljesítmény-sűrűség (power spectral density)
qa	Kínasav
RAS	Rat sarcoma
REV-ERB	Reverse erythroblastosis virus
RGB-1	B-family regulatory subunit 1 (a PP2A regulátoros alegysége)
RIP	Repeat-induced point mutation
RLM-RACE	RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends
RMSSD	Egymás utáni RR-intervallum különbségek négyzetes középértéke

ROR	Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor
ROS	Reaktív oxigén származék
SCN	Suprachiasmatikus mag
SDNN	Standard deviation of the normal to normal intervals (RR távolságok szórása)
SIRT	Sirtuin
SJL	Szociális jetlag
SOD	Szuperoxid dizmutáz
TEF	Thyrotroph embryonic factor
TTFL	Transcription-translation feedback loop, transzkripció-transzláció visszacsatolási hurok
UTR	Transzlációra nem kerülő régió
VLF	Nagyon alacsony frekvencia (0,0033-0,04 Hz)
VVD	Vivid
WC	White Collar
WCC	White Collar Complex
ZT	Zeitgeber idő

1. Irodalmi áttekintés

1.1. Bevezetés

A Föld tengely körüli forgásának következményeként az élő szervezetek a nap folyamán állandóan változó környezeti tényezőknek vannak kitéve. A cirkadián ritmus egy olyan, a törzsfajlás szintje valamennyi szintjén megjelenő biológiai szabályozó mechanizmus, amely segíti a szervezet alkalmazkodását a környezeti viszonyok napszakonkénti változásaihoz. A ritmus létrejöttének feltétele egy endogén időmérő rendszer működése. Ez a rendszer az ún. cirkadián óra, amely a fiziológiai folyamatok jellegét és intenzitását időben szabályozni képes. Az óra így egyrészt felkészíti a szervezetet a periodikusan bekövetkező környezeti változásokra, és ezáltal hatékonyabbá teszi az alkalmazkodást, optimalizálja az energiafelhasználást, másrészt segíti az antagonisztikus (pl. katabolikus és anabolikus) folyamatok időbeli elkülönülését.

A belső időmérés sejt szinten szerveződik molekuláris oszcillátorok működése révén. Többsejtes szervezetben az egyes sejtek molekuláris óráit különböző hírvivő mechanizmusok szinkronizálják. Magasabb rendű szervezetekben általában egyes szöveti órák domináns szerephez jutnak, aminek alapján központi és perifériás órákat különítünk el.

A cirkadián ritmus zavaráról beszélünk, ha a belső időmérő rendszer és a környezet ritmikus változásai nincsenek összhangban. Emberben az ilyen állapotot rizikófaktorak tekintjük olyan, tömegeket érintő betegségek kialakulása szempontjából, mint a diabetes mellitus, a magas vérnyomás és más szív- és érrendszeri megbetegedések, a rosszindulatú daganatok egyes formái, illetve bizonyos pszichiátriai megbetegedések. Ezek az adatok egyértelműen alátámasztják a cirkadián szabályozás kutatásának népegészségügyi jelentőségét. A kronobiológiai vizsgálatok fontosságára hívják fel a figyelmet a kronoterápiában rejlő lehetőségek is. Kronoterápia alkalmazásakor a cél a gyógyszeradagolás és a terápiás eljárások időbeli illesztése a szervek, szövetek működésének napi ritmusához úgy, hogy a hatás/mellékhatás tekintetében optimális eredményt érhesünk el.

Tekintettel a cirkadián ritmus, illetve az azt szabályozó folyamatok nagymértékű konzerváltságára, a kísérletes vizsgálatokhoz számos modellorganizmust alkalmaz a kronobiológia. A molekuláris óra működési mechanizmusainak megismeréséhez nagymértékben hozzájárultak az ecetmuslicán és a *Neurospora crassa* nevű fonalas gombán tett alapvető genetikai és sejtbiológiai megfigyelések, míg a szervezeti szintű óraműködés megismerésében a vezérszerep természetesen az egérmodelleké és a humán vizsgálatoké.

1.2. A cirkadián ritmus definíciója és főbb jellemzői

Biológiai ritmusról beszélünk, ha az élő szervezetben lejátszódó valamely folyamat jellegzetesen ismétlődik, periodicitást mutat. Mind megjelenésükben, mind periódushosszuk tekintetében igen sokfélék lehetnek a biológiai ritmusok, amiket gyakran a cirkadián ritmushoz hasonlítva csoportosítunk. Aszerint, hogy a periódushossz 24 óránál rövidebb vagy hosszabb, megkülönböztetünk ultradián és infradián ritmusokat. Az ultradián ritmusok körébe tartoznak például a szív- és a légzési ritmusok vagy egyes hormonok pulzatil jellegű szekréciói (1, 2). Infradián ritmust mutat többek között a menstruációs ciklus, de ide tartoznak az állat- és növényvilágban jellegzetes szezonális működésváltozások is.

Egy biológiai ritmust akkor tekintünk cirkadián ritmusnak, ha az alábbi kritériumok teljesülnek:

1. A ritmus nagyjából 24 órás periódushosszal rendelkezik.
2. A periodikus változás állandó környezeti körülmények mellett is fennmarad. Ez a kritérium különbözteti meg a cirkadián ritmust a többi 24 órás periódushosszú ritmustól, amelyeknél a ritmusos működés feltétele a környezeti ingerek (pl. fény- és hőmérséklet) ciklikus változása. Állandó körülmények mellett úgynevezett „free run” (szabadon futó) ritmusról beszélünk, aminek a periódushossza kis mértékben eltérhet a 24 órától, erre utal a cirkadián (circa diem = körülbelül egy nap) elnevezés. Jó példa erre az emberre jellemző, átlagosan 25 órás aktivitási ritmus, amit izolált körülmények között, úgynevezett "bunker kísérletek" során lehetett tapasztalni (3).
3. Működését különböző külső környezeti stimulusok, "beállító" jelek vagy *Zeitgeber*-ek, mint például a fény, a hőmérséklet, vagy a tápanyagellátás átállíthatják. Az élőlények többségében a ritmus legmeghatározóbb *Zeitgebere* a fény. A beállítás során a ritmus időzítése szinkronba kerül a környezeti változásokkal, ezt a folyamatot nevezi a szakirodalom *entrainment*-nek.
4. A ritmusra hőmérséklet-kompenzáció jellemző, ami azt jelenti, hogy a periódushosszt minimális mértékben befolyásolja a környezeti hőmérséklet megváltozása. Míg általában a biokémia folyamatok sebességét egy 10 °C-os hőmérsékletemelkedés 2-3-szorosra (Q10 érték ~2,5) növeli, addig a cirkadián ritmus periódushossza széles hőmérséklettartományban változatlan marad, a Q10 értéke jellemzően 0,8-1,2 közötti (4).

A ritmus jellemzésére a következő alapvető paramétereket használjuk (1. ábra) (5, 6):

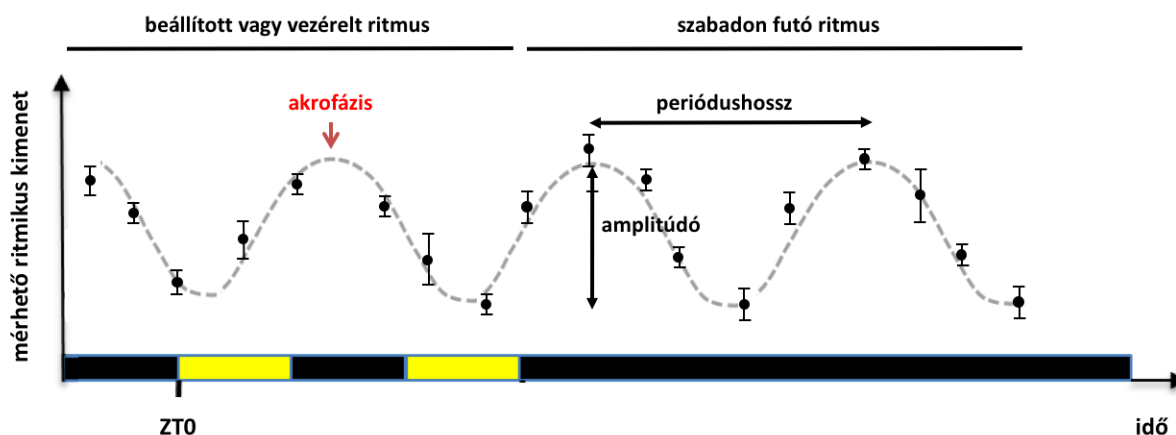
Periódushossz: a ritmusosan változó paraméter egymást követő maximum vagy minimum értékeinek átlagos időbeli távolsága, jele: τ .

Amplitúdó: a ritmusos paraméter minimum és maximum értéke közötti különbség.

Zeitgeber time (ZT): a ritmust beállító utolsó környezeti szignál (*Zeitgeber*) óta eltelt idő. Mivel az élőlények többsége esetében a fény a legfőbb *Zeitgeber*, ZT0-val általában a világos időszak kezdetét szoktuk jelölni.

Cirkadián idő (Circadian Time, CT): szabadon futó ritmus esetében használjuk a perióduson belül az időpontok jelölésére. Ugyanúgy 0-tól 24 óráig terjed a skála, mint a ZT esetében, de ilyenkor 1 órának az endogén periódus 24-ed része felel meg. CT0 a szubjektív nappal, míg CT12 a szubjektív éjszaka kezdetét jelöli.

Fázis: a perióduson belüli kitüntetett időpont, jele: ϕ . Általában a ritmusos paraméter egy jellegzetes értékéhez rendeljük a fázist. Így például a paraméter maximum értékéhez tartozó időpontot akrofázisnak hívjuk. Fény/sötétség ciklusok esetén a ZT0, azaz a legutóbbi világos szakasz kezdete óta eltelt idő jelenti a fázist.



1. ábra : A ritmust jellemző paraméterek(7).

Részletes magyarázat a szövegben.

1.3. A molekuláris órák működése

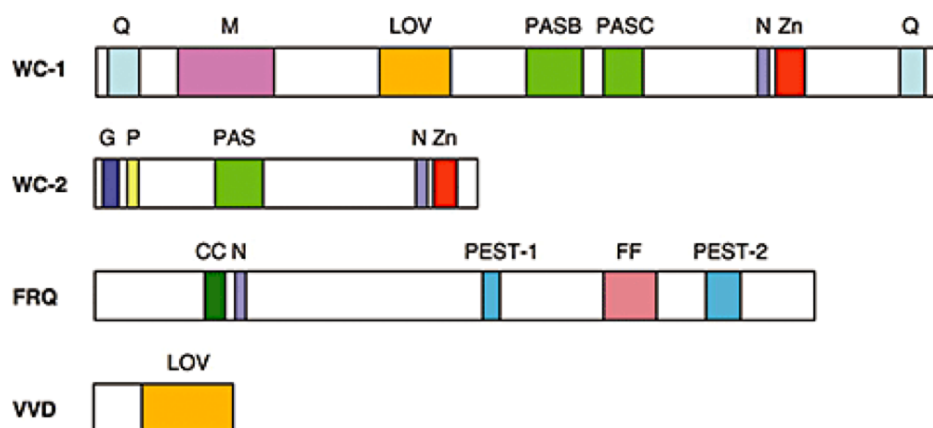
A molekuláris időméréssel kapcsolatos kezdeti kutatások azokra a genetikai megfigyelésekre épültek, amelyek szerint ecetmuslicában a viselkedési ritmus különböző jellegű megváltozásai egyetlen gén mutációival voltak magyarázhatók (8). A 2017-ben Michael Young-gal közösen Nobel-díjat kapó Michael Rosbash és Jeffrey Hall 1988-ban tette közzé azt a szemléletváltó hipotézist, mely szerint a ritmus generálásának alapja, hogy egy, a nap folyamán felhalmozódó fehérje valamilyen módon gátlólag visszahat saját átíródására és ezáltal további felhalmozódására a sejtben (9, 10). Az azóta transzkripció-transzlációs visszacsatolási hurokként (transcription-translation feedback loop = TTFL) emlegetett mechanizmus az időmérés alappillére valamennyi eddig vizsgált magvas sejtben. A gátló hatású fehérjét vagy fehérjekomplexet az óra negatív faktorának, míg a kifejeződését serkentő transzkripciós faktorokat az óra pozitív komponenseinek nevezzük.

Az ecetmuslica mellett a *Neurospora crassa* nevű fonalas gomba a molekuláris óraműködés megismerése céljából legtöbbet tanulmányozott modellorganizmus. Mind folyékony, mind szilárd táptalajon könnyen és viszonylag olcsón fenntartható, gyorsan növekszik, genomja 2003 óta ismert, genetikai módosítása viszonylag egyszerű és számos természetes variánsa, illetve mutánsa, valamint genetikailag módosított törzse könnyen beszerezhető (Fungal Genetics Stock Center). További, kronobiológiai szempontból fontos tulajdonsága e gombának, hogy speciális táptalajon, illetve egy bizonyos genetikai háttér mellett (*bd*) cirkadián spóraképzési ritmust mutat, aminek segítségével hatékonyan tanulmányozható a cirkadián óra kimeneti ritmusa.

Az értekezés következő alfejezeteiben a *Neurospora crassa* és az emlős molekuláris óra működését mutatom be részletesebben, tekintettel arra, hogy a disszertációban bemutatásra kerülő eredmények ezen szervezeteken végzett vizsgálatokból születtek.

1.3.1. A *Neurospora crassa* molekuláris órája

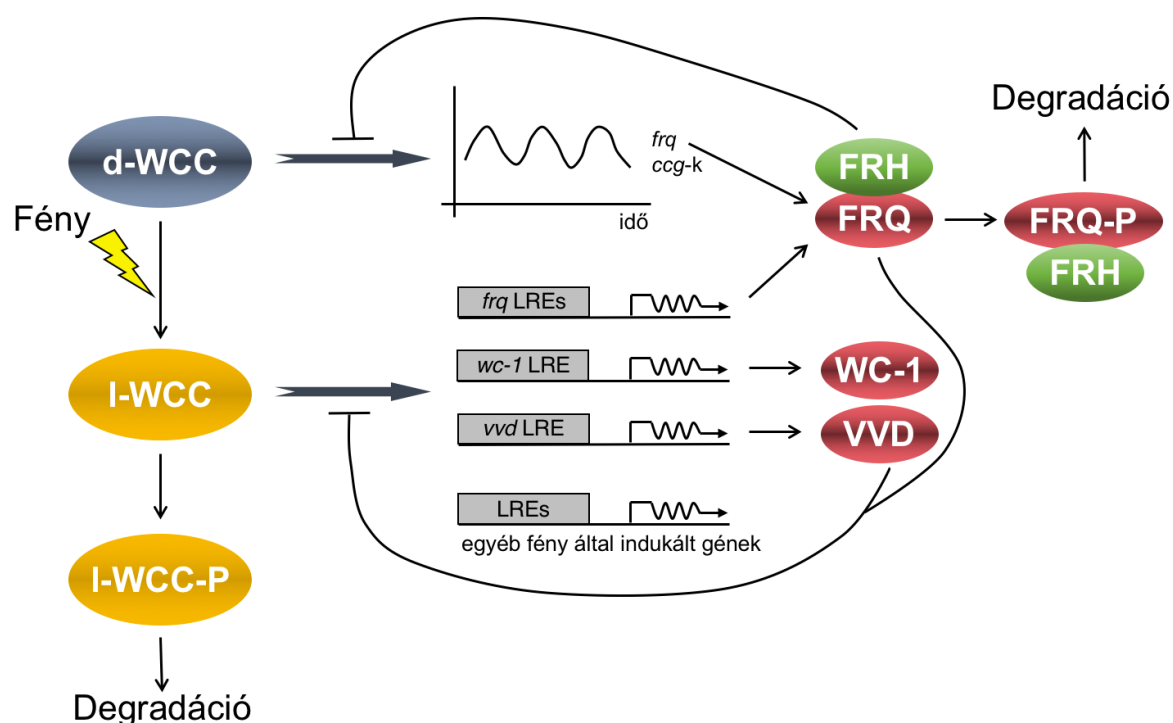
A *Neurospora crassa* cirkadián óraművének négy alapvető elemét ismerjük: ezek a Frequency (FRQ), a FRQ-vel kölcsönhatásba lépő RNS-helikáz (FRQ-interacting RNA helicase, FRH), valamint két GATA-típusú, cink-ujj domént tartalmazó transzkripciós faktor, a White Collar 1 (WC-1) és a White Collar 2 (WC-2) fehérjék (2. ábra). A WC-1 döntően csak a „főlöslégben” jelenlévő WC-2-vel alkotott komplexben stabil (White Collar Complex, WCC), és minden eddig megismert működését e komplex formájában fejt ki.



2. ábra: A *Neurospora crassa* órákomponenseinek doménszerkezete

Q: glutaminban gazdag régió (aktivációs domén), M: metioninban gazdag szakasz, LOV: fény-, oxigén- és feszültségérzékeny régió, PAS: PER-ARNT-SIM domén, N: nukleáris lokalizációs szignál, Zn: cink-ujj domén, G: Thr/Gly, Met/Gly és Ser/Gly ismétlődéseket tartalmazó szakasz, P: prolinban gazdag szakasz, CC: szuperhélix szerkezetű domén, PEST: Pro/Glu/Ser/Thr-gazdag rész, FF: FRQ-FRH interakcióért felelős szakasz (4. közlemény ábrája).

A WCC a molekuláris óra pozitív komponense, amely döntően a magban detektálható, és kötődve a *frq* promóter Clock-box (C-box) részéhez a szubjektív éjszaka vége felé egyre erősödő intenzitással serkenti a *frq* átíródását (11, 12) (3. ábra). A FRQ fehérje felhalmozódása 4-6 órás késéssel követi az RNS szintjének emelkedését (13). A FRQ kötődik az FRH-hoz és az így kialakuló stabil FRQ-FRH-komplex egy része a citoszolból belép a sejtmagba (14). A magban felhalmozódó FRQ kölcsönhatásba lép a WCC-szel és gátolja annak transzkripciót serkentő aktivitását, azaz a saját RNS-ének további átíródását (15). A nap folyamán felgyülemelő FRQ fokozatosan foszforilálódik, és a hiperfoszforilált fehérje, részben a proteoszóma útvonalon keresztül, lebomlik (16). Amennyiben a FRQ mennyisége egy bizonyos szint alá csökken, a WCC felszabadul a gátlás alól, a *frq* RNS újra átíródik, és egy új cirkadián periódus veszi kezdetét. A ma elfogadott molekuláris modell szerint mind a FRQ transzkripció és transzláció közötti késés, mind a poszttranszlációs módosulások és sejtkompartmentek közötti fehérjemozgás időigényes mechanizmusai fontos feltételei annak, hogy a negatív visszacsatolás viszonylag lassan, stabil oszcillációt eredményezve valósuljon meg. Ezen folyamatok eredményeként állandó körülmények mellett a *frq* expresszió RNS és fehérje szinten egyaránt robusztus, mintegy 22 órás periódushosszú ritmust követ. A FRQ nemcsak a negatív visszacsatolás kulcseleme, a citoszolikus FRQ a WCC mennyiségének stabilizálásával egy pozitív visszacsatolást is létrehoz (17).



3. ábra: A *Neurospora crassa* molekuláris órájának alapvető komponensei és egymásra hatásuk

Állandó körülmények és folyamatos sötétség mellett a WCC (d-WCC: „dark”-komplex) a *frq* és egyéb óra által kontrollált gének (*ccg-k*) ritmikus transzkripcióját szabályozza. A FRQ fehérje gátlólag hat vissza a WCC-re. Fény hatására a WCC szerkezetváltozása következik be, I-WCC („light” komplex) alakul ki, amely a gének fény által szabályozott régióihoz (LRE: light response element) kötődve fejt ki hatását. A világosban kifejeződő VVD a FRQ-val együtt részt vesz a negatív visszacsatolásban. Mind a FRQ, mind a WCC szabályozásában alapvető szerepet játszik a foszforiláció (P). (5. közlemény ábrája)

Az órakomponensek poszttranszlációs módosulásai közül legtöbbet a foszforiláció-defoszforiláció folyamatát vizsgálták. A FRQ fehérjének több mint 100 szerin és treonin maradéka foszforilálódhat különböző kinázok működése révén. A FRQ különlegessége, hogy nem rendelkezik állandó stabil szerkezettel, hanem az úgynevezett rendezetlen fehérjék csoportjába tartozik. Az egymást szigorú időbeli rendben követő foszforilációs lépések fokozatosan változtatják meg a fehérje egyes részeinek szerkezetét és ezáltal kölcsönhatásait, valamint a fehérje sejtbeni elhelyezkedését és stabilitását (18, 19). Hasonlóan más fajokban találtakhoz, központi szabályozó szerepe van e folyamatokban a kazein kinázoknak. A FRQ-FRH komplex stabilan köti a kazein kináz 1a-t (CK1a), amely a fehérje több régióját is képes foszforilálni, és e foszforilációs lépések egyrészt fékezik a fehérje magbani akkumulációját, másrészt elősegítik a FRQ ubikvitinációját és fokozatos degradációját a proteoszóma útvonalon

(16, 19-22). A kazein kináz 2-nek szintén szubsztrátja a FRQ, de kölcsönhatásuk valószínűleg tranziens jellegű (23), és szerepet játszhat a hőmérséklet kompenzáció szabályozásában (24). A kazein kinázokon kívül több más kinázzal is kölcsönhatásba kerül a FRQ. A PRD4, az emlős checkpoint kinase 2 ortológja, működése kapcsoló pont lehet a DNS károsodás, a sejtciklus szabályozása és az óraműködés között (25). Ezen kívül a protein kináz A (PKA) és a calcium/calmodulin dependens kináz 1 (CAMK-1) szerepét feltételezik a FRQ foszforilációjában. Mutációjuk ugyan nem szünteti meg a ritmust, de megváltoztatja a periódust (26, 27). Három protein foszfatáz aktivitása befolyásolja a *Neurospora* óra működését, ezek a protein foszfatáz 1 (PP1), a PP2A és a PP4 (28, 29). Egyelőre keveset tudunk arról, hogy ezek közül melyiknek van direkt, és melyiknek indirekt hatása a FRQ foszforiláltságára. A teljes hosszúságú FRQ mellett expresszáldódik egy rövidebb izoforma is, aminek pontos funkciója egyelőre ismeretlen, de erről később még tesztek említést.

A WCC működésének és sejtmagba való transzlokációjának szintén alapvető szabályozó mechanizmusa a foszforiláció. Tekintettel arra, hogy a dolgozatban bemutatott munka egy jelentős része éppen e folyamatok megismerésére irányult, ezek részletes ismertetése az "Eredmények és megbeszélés" fejezetben történik.

A fény mint *Zeitgeber* a WCC-en keresztül hat az órára, ugyanis a WCC kék fényre érzékeny receptorként is működik (30). A WC-1 kromoforként FAD-ot tartalmaz, amely a fehérje ún. light-oxygen-voltage (LOV vagy PASA) doménjéhez asszociált (11, 31) (2. ábra). Fény hatására a FAD kovalensen kötődik a LOV-doménhez, a WCC dimerként hiperkompleket képez, és aktiválja a fényérzékeny gének átíródását. Ezek közé a gének közé tartozik a *frq* és maga a *wc-1* is, így a fényviszonyok megváltozása gyorsan módosíthatja a cirkadián óra működését is (32). Ha az állandó sötétben növekvő gombát a szubjektív este idején, illetve az éjszaka kezdetén éri fényhatás, a FRQ szint tovább marad magas, és az óra korábbi időpontra áll be, míg ha az éjszaka végén történik a megvilágítás, akkor a FRQ szint a szokásosnál előbb kezd emelkedni, és az óra későbbi időpontra tolódik. A *wc-1* fényindukciója biztosítja a fényaktiváció hatására instabilabbá váló WC-1 pótlását (33, 34). Ha a gombát folyamatosan világosban tartjuk, a WCC nagyfokú aktivitással folyamatosan serkenti a *frq* expresszióját, az oszcilláció és így az óraműködés megszűnik, és a *frq* RNS és fehérje szintje állandó és magas lesz (azaz „steady state” alakul ki).

A WCC aktivitását és így az óraműködést is modulálja egy szintén LOV-domént tartalmazó ún. szekunder fényreceptor, a VIVID (VVD) (35) (2. és 3. ábra). A VVD expresszióját a WCC szabályozza, a fehérje csak világosban detektálható. A VVD a

fényadaptációért felelős molekuláris faktor, ugyanis gátolja a WCC fénytől megnövekedett aktivitását, és ezáltal tartós megvilágítás esetén egy idő után mérsékli a fényválaszt (36). Fénysötétség ciklusok esetén a világosban szintetizálódó VVD a FRQ-val együtt vesz részt a negatív visszacsatolásban és az óra fázisának beállításában. VVD hiányában 2-3 órás fáziskésés tapasztalható az óraműködésben.

A fény mellett a hőmérsékletváltozás a legtöbbet tanulmányozott *Zeitgeber* a gombában, és az óra fázisa jellegzetes hőmérséklet érzékenységet mutat (37). Ugyanakkor szeretném emlékeztetni az olvasót, hogy a cirkadián periódushossz hőmérsékletkompenzált, azaz széles hőmérséklettartományban gyakorlatilag állandó. Bár e folyamat szabályozásáról már számos adat áll rendelkezésre, a pontos mechanizmus egyelőre ismeretlen. Tudjuk, hogy szükséges hozzá a FRQ CK2 általi foszforilációja, befolyásolja a VVD, és a finom hangolás része lehet a FRQ rövidebb és hosszabb izoformájának hőmérsékletérzékeny expressziója (24, 38, 39).

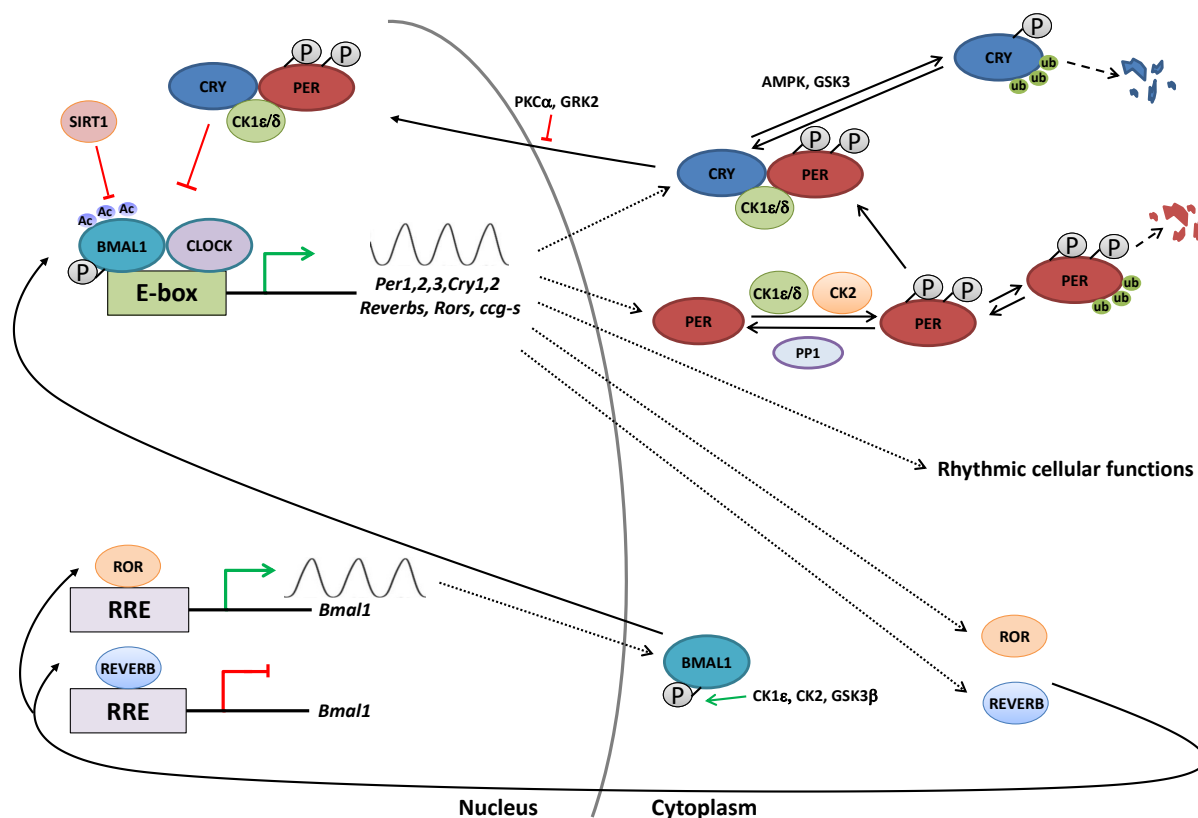
A *Neurospora* óra legfontosabb kimeneti faktorának — hasonlóan más fajokban találtakhoz — a pozitív komponenst, azaz a WCC-t tekintjük, amely az óra által szabályozott gének (*clock controlled genes* = *ccgs*) kifejeződését közvetlenül, vagy más faktorokon keresztül, közvetetten befolyásolva határozza meg különféle sejtszintű működések napi ritmusát (40).

Bizonyos körülmények mellett ritmusos fenotípust írtak le olyan *Neurospora* törzsekben is, amelyekben hiányzik az előbbieken vázolt molekuláris óra egy vagy több komponense, és jellemzően nem expresszálódik FRQ. Az ilyen ritmusokat összefoglaló néven FRQ-nélküli ritmusnak, a feltételezett órarendszert FRQ-nélküli oszcillátornak (FRQ-less oscillator, FLO) nevezik (18, 41). Egyes FLO-k működése csak speciális táptalajon tapasztalható, olyan kiegészítő komponensek mellett, mint a geraniol, farnezol, koffein vagy a ROS generátor menadion (42-44), és/vagy bizonyos mutációkhoz kötött (45-47). A FLO cirkadián óraként való definiálását korlátozza, hogy a legtöbb ezzel kapcsolatos tanulmány nem vizsgálta a cirkadián ritmus összes kritériumának, így például a hőmérsékletkompenzációnak a meglétét.

1.3.2. Az emlős sejtekben működő molekuláris óra

Az emlős óra pozitív faktora a CLOCK és a BMAL1 (ARNTL1, MOP3) transzkripciósfaktorok által alkotott komplex, az oszcillátor negatív szabályozói pedig a CRYPTOCHROME-ok (CRY1, CRY2) és a PERIOD (PER1, PER2, PER3) fehérjék (48, 49). Egyes szövegekben,

főleg idegsejtekben, a CLOCK helyett az NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2) szerepelhet a pozitív komplexben (50-52). A BMAL1 és CLOCK/NPAS2 fehérjék, a *Neurospora* WCC-éhez hasonlóan, a PAS domént tartalmazó transzkripciós faktorok csoportjába tartoznak. A pozitív faktor a *per* és *cry* gének E-box (EnhancerA pozitív-box) régiójához kötődve serkenti a génátírást, majd a megsztetizálódó PER és CRY multimer komplexként bejut a sejtmagba, és közvetlen kölcsönhatás révén gátolja a BMAL1-CLOCK/NPAS2 komplex DNS-hez való kötődését, létrehozva ezzel az alapvető visszacsatolási hurkot (4. ábra).



4. ábra: Az emlős sejtek molekuláris óraműködésének modellje

A BMAL1-CLOCK komplex a célgének promóterének E-box régiójához kötődve serkenti az óragének és a *ccg*-k átíródását. A citoplazmában keletkező PER és CRY fokozatosan felhalmozódik a magban, ahol gátolja a pozitív komponens aktivitását. A ROR és REVERB magreceptorok a *Bmal1* kifejeződésére hatva képeznek egy stabilizáló visszacsatolási hurkot. Különböző kinázok szabályozzák az órakomponensek stabilitását és sejten belüli lokalizációját. A BMAL1 SIRT1-től függő deacetilációja a sejt metabolikus aktivitását közvetíti az óraműködés felé. A zöld nyíl serkentésre, a piros, talpban végződő vonal gátlásra utal. (12. közlemény ábrája)

További visszacsatolási körök is részt vesznek az óraműködés szabályozásában, stabilizálásában. Ezek közül a legjobban jellemzett a REV-ERB (REV-ERB α/β) és ROR

(retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor, ROR $\alpha/\beta/\gamma$) fehérjék közreműködésével létrejövő kör. A BMAL1-CLOCK/NPAS2 komplex serkentőleg hat ezen magreceptorok kifejeződésére is, amik viszont közvetlenül hatnak vissza a *Bmal1* expressziójára, mégpedig a REV-ERB gátló (53), a ROR pedig serkentő módon (54-56). E hatások eredőjeként a BMAL1 szintje antifázisban ingadozik a PER fehérjék expressziójához viszonyítva (53, 57).

A BMAL1-CLOCK transzkripciós faktor komplex oszcilláló aktivitása közvetetten vagy közvetve számos gén (*cgc*-k) ritmikus kifejeződését is vezérli. Microarray vizsgálatok alapján átlagosan a gének 10%-ának expresszióját irányítja a sejtben a cirkadián óra (58, 59). A molekuláris oszcillátor finomhangolásában vesz részt a DBP (albumin D-site-binding protein) nevű transzkripciós faktor is, amely a *Per1* gén aktiválásán keresztül stabilizálja a periódust (60, 61). Finom szabályozónak tekintjük még a HLF (hepatic leukemia factor), a TEF (thyrotroph embryonic factor), és a DEC1 (differentiated embryo chondrocyte protein), DEC2 fehérjéket (62-67), de mivel ezekről nem lesz szó a kísérletes munka bemutatása során, eltekintek részletes ismertetésüktől.

Az órafehérjék poszttranszlációs módosulásai a fehérjék stabilitásának és sejtben belüli mozgásának fontos szabályozói az emlős rendszerben is. Így különböző kinázok, foszfatázok (pl. protein foszfatáz 1 és 5) (68, 69), ubikvitin ligáz komplexek (70-75), a szumoilációt (76) és acetilációt befolyásoló faktorok (77-79) egyaránt fontos komponensei az emlős molekuláris órának. A kazein kinázok itt is fontos szerephez jutnak, több régióban is képesek foszforilálni a PER fehérjéket, mégpedig szigorú időrendiségben, más és más hatást létrehozva (80-83). Egy genetikai defektus okozta betegség, a familiáris előretolt alvásfázis szindróma (FASPS) miatt különös jelentőségű a PER fehérjék CK1 δ és ϵ általi foszforilációja. Az eddig jellemzett családokban vagy a PER2 foszforilációs helyének mutációját vagy a CK1 megváltozott működését írták le. A PER stabilitásának csökkenése és a fehérje csökkent expressziója együttesen vezet a visszacsatolásban a gátlás gyorsabb megszűntéhez, és ezáltal a szabadon futó periódus rövidüléséhez (kb. 20 óra) és az alvási fázis korábbra tolódásához (84-86). A PER különböző kinázok által létrehozott foszforilációi interferálnak a fehérje felhalmozódásával a sejtmagban (83, 87, 88), míg a PER acetilációja és O-GlcNAcilációja a metabolizmustól függő módon befolyásolja a fehérje stabilitását (77, 89). A CRY poszttranszlációs foszforilációja is fontos szabályozási pont (90-92), ubikvitinációját pedig a DNS károsodás is befolyásolja (93).

A pozitív faktorok foszforilációja is ritmikus. Mindkét kazein kináz foszforilálja a BMAL1-et: a CK2 általi foszforiláció a fehérje acetilációját és magba lépését segíti, míg a

CK1 ϵ a GSK-3-mal együtt növeli a transzkripciót aktiváló hatást (68, 94). Szemben az előzőekkel a PKC gátolja a pozitív faktor aktivását (95).

A foszforiláción kívül más poszttranszlációs módosulások is fontos szerepet játszanak. A CLOCK acetiláz aktivitással rendelkezik, és a BMAL1 CLOCK általi acetilációja, és SIRT1-től függő deacetilációja a sejt metabolikus aktivitása és az óraműködés közötti kapcsolópontként működhet (78, 79). A jelenlegi modell szerint, amennyiben magas a NAD⁺ szint (pl. glükóz hiányában), a SIRT1 hiszton-deacetiláció, valamint a BMAL1 deacetilálása révén gátolja az óra által szabályozott gének átírását.

A fent ismertetett TTFL alapú molekuláris óraműködést elsősorban SCN neuronokban és májsejtekben vizsgálták részletesen. Bár a molekuláris óra alapvető komponenseit a legtöbb vizsgált sejtben sikerült kimutatni, egyelőre nem bizonyított, hogy azonos módon történik az időmérés minden perifériás sejtben. Több szövetben találtak olyan, transzkripciótól független oxidációs ciklust (peroxiredoxin oxidációs ciklus), amely egy citoplazmatikus óra jelenlétére utal (96). Ezen időmérési mechanizmus és a klasszikus TTFL-alapú óra egymásra gyakorolt hatásáról azonban egyelőre keveset tudunk.

1.4. A cirkadián ritmus szervezeti szintű regulációja emlősökben

Bár ritmusos működést sokféle magvas sejtben sikerült kimutatni, szervezeti szinten kiemelt irányító szerep jut a suprachiasmaticus magban (SCN) található neuronoknak. Ezt jól szemlélteti, hogy az SCN roncsolása számos élettani működés (pl. alvás/ébrenlét, kortikoszteroid szekréció, testhőmérséklet) cirkadián oszcillációjának megszűnésével jár (97-101). Ezen kívül az emlősök esetében legerősebb *Zeitgeber*-ként működő, ritmust meghatározó fényinformáció is az SCN-t éri el először a központi idegrendszerben. Az SCN funkcionális egységként működik, az egyes sejtek óraműködésének összehangolásában mind idegi összeköttetések, mind parakrin faktorok szerepet játszanak (102, 103). Környezeti hatásoktól izolált körülmények mellett az emberi SCN 25 órás periodicitású endogén ritmust generál. A retina kék fényre érzékeny melanopszin fotopigmentet tartalmazó ganglionsejtjeiben keletkezik elsősorban az ingerület, és ezen sejtek axonjai a vizuális ingereket továbbító idegpályáktól függetlenül működő tractus retinohypothalamicus-on keresztül érik el az SCN-t (104). Itt fő transzmitterként a glutamát játszik szerepet, de moduláló hatása van a substance P-nek és a PACAP-nak (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) is (105, 106). Mindennek eredményeként fény hatására CREB (cAMP response element-binding protein) mediált úton

aktiválódik a *period* gének kifejeződése, és ez a molekuláris óra fázisának megváltozását eredményezheti (107, 108).

Az SCN-nek igen kiterjedt központi idegrendszeri összeköttetései vannak (100), így részben direkt módon, részben más struktúrákon keresztül, indirekt úton képes befolyásolni különböző idegrendszeri területek és a perifériás szövetek ritmusát. A legjobban ismert az idegi és hormonális jelkövetítés a periféria felé, de tudjuk, hogy szerepet játszik a különböző metabolitok vérbeli szintjeinek ingadozása is, ami részben a táplálékfelvétel szintén SCN-ből induló ritmusos szabályozásának következménye. Ezen kívül fontos a testhőmérséklet oszcillációja is mint a perifériás ritmust szabályozó faktor (109, 110). Az idegi szabályozásban több szövet esetében is fontos szerepe van a szimpatikus beidegzésnek (111-113), a hormonok közül pedig a glukokortikoidok és a melatonin szerepe a legjobban ismert a ritmus közvetítésében (110, 114). A ritmusos szisztémás jel a perifériás sejtekben egyrészt közvetlenül befolyásolhat bizonyos működéseket, de hathat az adott sejt saját oszcillátorának szabályozásán keresztül is.

1.5. A cirkadián ritmus főbb humánélettani vonatkozásai

Régóta ismert számos élettani paraméter és folyamat szabályos napi ritmusa, és ezek jelentőse része állandó környezeti körülmények mellett is napszaki ingadozást mutat, azaz cirkadián szabályozás alatt áll. Az alvás-ébrenlét, a vizeletszekréció és a testhőmérséklet ritmusának vizsgálata alapján bizonyította Jürgen Aschoff híres andechsi "bunkerkísérletében", hogy az emberi szervezet is képes endogén időmérésre (3). Számos hormon szintjét szabályozza a cirkadián óra, legismertebb a korábban már említett melatonin és kortizol szekréciójának ritmusa, de jellegzetesen változik a nap során a CRH, az ACTH, a növekedési hormon, a prolaktin, az adrenalin, az inzulin, a pajzsmirigy hormonok és a tesztoszteron szintje is (115-120). A keringési rendszer fő paraméterei, a nyugalmi pulzus és vérnyomás is cirkadián ritmust követ, éjszakai minimummal, a hajnali órákban induló emelkedéssel és délutáni maximummal (121, 122). Az alapvető laborvizsgálati paraméterek közül kiemelendő a vérben a leukocita populációk számbeli változása és a szérum vasszintjének cirkadián oszcillációja (123-126). Az idegrendszer cirkadián regulációjára utal, hogy bizonyos szenzoros és kognitív funkciók esetében is egyértelmű napi ingadozás mérhető (122).

Emberben a cirkadián óra működésének jellemzésére markerként többnyire az alvás-ébrenléti fázis meghatározása, illetve az állandó megvilágítási körülmények mellett mért

melatonin-ritmus vizsgálata terjedt el. Ennek alapján különböző kronotípusokat különböztetünk meg, az extrém korai típustól („pacsirta”) az intermedier típuson át a szélsőségesen késői („bagoly”) típusokig (127). A kronotípust meghatározzák az óragének genetikai polimorfizmusai (128), esetleg mutációi (mint pl. a FASPS esetében), de ugyanazon egyénnél is változik az életkorral (129), és befolyásolják környezeti hatások is (130). Több mint 20 000 alany vizsgálatán alapuló tanulmány szerint, amennyiben az egyén saját igényei szerint, azaz a biológiai órájához igazodva alakíthatja alvását, annak időzítésére még manapság is a helyi természetes fényviszonyok vannak domináns hatással, annak ellenére, hogy nyilvánvalóan számos szociális tényező és a mesterséges megvilágítás is befolyásolja (131).

Úgy gondoljuk, hogy a cirkadián szabályozás élettani jelentősége az emberi szervezetben hasonló ahhoz, amit akár a növények és gombák, akár az állatok esetén feltételezünk (l. 1.1. fejezet): lehetővé teszi, hogy a szervezet felkészüljön a periodikus környezeti változásokra, és hogy időben elkülönülhessenek antagonistikus folyamatok.

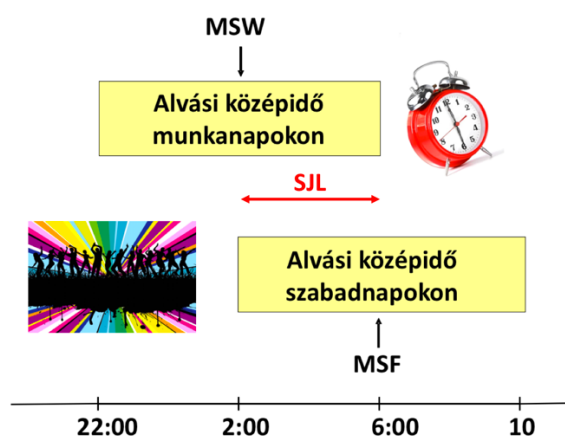
1.6. A cirkadián ritmus orvosi vonatkozásai

A cirkadián szabályozás és a patológiás folyamatok között többrétű kapcsolat lehet. Egyrészt a cirkadián ritmus zavara maga is szerepelhet megbetegedést kiváltó tényezőként. Másrészt számos olyan kórfolyamat ismert, amelynek a tüneteiben napszaki ingadozás tapasztalható, így a ritmus fontos orvosi vonatkozása a diagnosztikai mintavételek időzítése, valamint a gyógyszeres kezelés és egyéb terápiaformák időbeli optimalizálásának a lehetősége is.

A cirkadián ritmus endogén eredetű zavaráról beszélünk, ha a cirkadián óra nem képes a környezeti változások ritmusához alkalmazkodni. Ennek legjobban karakterizált formája a már említett FASPS (l. 1.3.2. fejezet), amikor a felgyorsult molekuláris óraműködés következtében a szervezet működési aktivása és a környezeti tényezők napszaki változása között nem alakul ki megfelelő összhang. Míg az endogén eredetű zavarokról egyelőre keveset tudunk, nagy számú adat áll rendelkezésre az exogén eredetű zavarokkal kapcsolatban. A cirkadián ritmus jellegzetes modernkori zavara a jetlag, amely több időzónát átlépő repülőutak következménye lehet. Ilyenkor a cirkadián óraműködés és a környezet közötti időbeli összhang néhány napra felborul, a belső időmérő rendszer csak némi lemaradással alkalmazkodik az új környezeti időhöz. A helyzetet tovább súlyosbítja az egyes szövetek, szervek egymáshoz képesti deszinkronizációja. Jellemző tünetek az étvágytalanság, a hányinger, a fejfájás, az

ingerlékenység és a kimerültség (132). A váltott műszakban történő munkavégzés jóval több embert érintő, komoly krónikus ritmuszavar, amit epidemiológiai és kísérletes vizsgálatok alapján ma már egyértelműen rizikótényezőnek tekintünk bizonyos megbetegedések kialakulása és lefolyása szempontjából. Ilyen betegségek a metabolikus szindróma, az obezitás, a diabetes mellitus, különböző kardiovaszkularis betegségek, szexuális diszfunkciók, pszichés kórképek és egyes rosszindulatú daganatok (133-137). Ennek alapján érthető, hogy 2007 óta az Egészségügyi Világszervezet (WHO) is rizikófaktorként tartja számon a váltott műszakban történő munkavégzést.

A cirkadián ritmus krónikus zavarának leggyakoribb formája a szociális jetlag (SJL), aminek jelentőségére az elmúlt 10-15 év kutatásai hívták fel a figyelmet. A SJL a munkanapokon és szabadnapokon mért alvási középido különbsége (138) (5. ábra). Az általános munka- és tanítási rend, a viszonylag korai, reggel 8 óras kezdés a korai típusoknak kedvez. A késői típusok a szociális kényszer folytán hétköznapiakon korán kelnek, hétvégén viszont a saját biológiai órájukhoz igazodva, a hétköznapiokhoz viszonyítva jelentősen később fekszenek és kelnek, aminek következtében nagy SJL-gel rendelkeznek. Egyre több tanulmány foglalkozik a SJL egészségkárosító hatásával, ezek szerint a SJL ma rizikófaktornak számít a depresszió (139), az elhízás (140), a metabolikus szindróma és a 2-es típusú diabetes kialakulása (141-143) szempontjából, és gyakran társul egészségkárosító magatartásformákkal (nagyértékű koffein fogyasztás, dohányzás) (138).



5. ábra: Az SJL létrejötte

Az SJL a szabadnapi alvási középido (MSW) és munkanapi alvási középido (MSF) különbségéből adódik. MSW: mid-sleep phase on workday; MSF: mid-sleep phase on free day. (Haraszi Réka ábrája alapján)

Számos kórfolyamat tünetei mutatnak jellegzetes napszaki ingadozást. Jellemző példa az akut kardiovaszkuláris események (miokardiális infarktus, stroke, egyes aritmiák) reggeli halmozódása (144-146), a láz délutáni felszökése és nagyon sok, az immunrendszer aktivitásának ritmusával összefüggő tünet. Fontos, járulékos tényezője a panaszok napi változékonyságának, hogy a fájdalomküszöb is cirkadián ingadozást mutat, nappal magasabb, késő este és éjszaka alacsonyabb (147, 148).

Ahogy említettem, a betegség tünetek időbeli változása szempontjából kiemelt szerepe van az óraműködés és az immunrendszer közötti szoros kölcsönhatásnak. Régóta ismert klinikai példák a szénanátha tüneteinek napszaki változásai, az asthma bronchiale rohamszerű rosszulléteinek hajnali gyakorisága vagy rheumathoid arthritisben az ízületi duzzanat, merevség és fájdalom reggeli súlyosbodása (149, 150). A szervezet bakteriális és virális fertőzésre adott válasza is jellegzetes napi ritmust követ (151, 152). A vérben a fehérvérsejt populációk ritmusos változásai egyrészt a csontvelői szabályozás ritmusát követik, de befolyásolja azt a szövetekbe való leukocita kivándorlás intenzitásának napszaki ingadozása is, amit egyrészt a leukociták saját órája, másrészt az endothelsejtek, valamint a szövetekben zajló fiziológiás és gyulladásos folyamatok ritmicitása egyaránt befolyásolhat (111, 112, 153-155). Ezzel összhangban számos, a leukociták vándorlását és működését befolyásoló citokin szintjének ingadozása is ismert (156-158). Óragénmódosított állatokon végzett vizsgálatok és gyulladásos modellek is alátámasztják az immunválasz és a cirkadián óra szoros kapcsoltságát (159-161). Ebben egyik kulcstényező a különböző órakomponensek általában gátló hatása az immunválaszban meghatározó NF- κ B útvonalra, aminek következtében az óraműködést általánosan antiinflammatorikusnak tartjuk (162-165).

A fiziológiás és patológias folyamatok ritmikus voltából logikusan következik, hogy a diagnosztikában is figyelni kell a vizsgálat és a mintavétel időpontjára (pl. laborvizsgálatok során), és célszerű lehet egyes terápiás eljárásokat is megfelelően időzíteni. A kronoterápia célja a hatások és mellékhatások arányának optimalizálása, amihez nemcsak a patológias folyamatok napszaki változásait kell figyelembe venni, hanem tekintettel kell lenni a gyógyszermetabolizmus és a kiválasztás időbeli változásaira is. Bár ma már szerepet kap a kronoterápia egyes gyulladásos betegségek és rosszindulatú daganatok kezelésében (166, 167), egyelőre kevésbé elterjedt, és a módszerek finomításán túl valószínűleg a személyre szabott terápia hozhat majd ezen a téren áttörést (168).

2. Célkitűzések

Amikor posztdoktori tanulmányutam során elkezdtem foglalkozni a cirkadián óra molekuláris részleteivel, fiziológusként folyamatosan foglalkoztatott, hogy az órakomponensek között feltárt kölcsönhatások, a fehérjék expresszióját és működését módosító mechanizmusok milyen építőelemei lehetnek a szervezeti szintű ritmusos működéseknek, és hogy ezeknek a ritmusoknak milyen szerepe van a fiziológiai funkciók biztosításában és az egészség megőrzésében. Munkacsoport vezetőként nagy öröm volt olyan projekteket is tervezni, amelyek komplex fiziológiai működések és a cirkadián ritmus kapcsolatát elemzik. Bátorítóan hatott, hogy a kronobiológia területén nem ritkaság az ilyen komplex szemlélet, és így az sem, hogy ugyanazon munkacsoport a ritmusos folyamatokat sejt, szövet és szervezeti szinten egyaránt kutatja, vagy akár több modellorganizmust is alkalmaz a vizsgálataiban. A disszertációban ismertetésre kerülő tanulmányok célkitűzései részben ezt a sokszínűségre törekvést tükrözik és az alábbi pontokban foglalhatók össze:

1. Több tanulmányban is a pozitív órakomponens szintjének és aktivitásának szabályozását kívántuk vizsgálni a *Neurospora crassa* modellszervezetben. Célunk volt a WCC limitáló komponense, a WC-1 expressziójának vizsgálata, promóterének feltérképezése, és egyes promóter szakaszok funkciójának jellemzése. Terveztük a WCC foszforilációjának elemzését, és annak vizsgálatát, hogy a foszforiláció milyen módon függ össze a komplex aktivitásának szabályozásával. A WCC közvetíti a környezeti fényváltozások hatását az óraműködésre, ezért különösen izgalmas kérdésnek ígérkezett a WCC fényválaszának és a fényadaptációban alapvető szerepet játszó VVD működésének tanulmányozása is.
2. A reaktív oxigén származékokról (ROS) ismert, hogy egyrészt a sejt állapotának és működésének érzékeny indikátorai, másrészt különböző celluláris folyamatok szabályozásában mint szignálmolekulák vesznek részt. Ehhez kapcsolódóan merült fel bennünk a kérdés, hogy miképpen befolyásolja a ROS termelés mértéke és jellege az endogén időmérést, és mi lehet a folyamat molekuláris mechanizmusa.
3. Miután az előző pontban ismertetett vizsgálatok a metabolizmus szerepére irányították figyelmünket az óraműködés szabályozásában, kíváncsiak voltunk, hogy milyen más komponensek játszhatnak szerepet a két folyamat összehangolásában. Mivel élesztőben a környezeti cukorkoncentráció érzékelésében meghatározó a RAS2 által mediált szignalizációs útvonal, vizsgálni kívántuk a jól bevált *Neurospora* modellorganizmusban,

hogyan szerepet játszik-e a RAS2 működése a cirkadián óra és a metabolikus állapot összehangolásában.

4. Tekintettel arra, hogy doktoranduszként neutrofil granulociták működéseit vizsgáltam, különösen érdekelt, hogy ezek, az immunrendszer első védelmi vonalát képező, a humán keringésben legnagyobb számban előforduló sejtek rendelkeznek-e saját molekuláris órával, és hogy milyen szerepet játszik a cirkadián szabályozás e sejtek válaszreakcióinak irányításában.
5. Szerettük volna ritmus vizsgálatainkat tovább bővíteni a humán fiziológiás működések irányába, mégpedig úgy, hogy az alvási ritmus és fiziológiás működések kapcsolatát teljesen természetes környezetben tanulmányozzuk (field study). Ezen belül is elsősorban a legtöbb embert érintő ritmuszavar, a SJL hatásaira kívántunk koncentrálni, így célul tűztük ki a hétközben előforduló alvásritmus váltások és a tanulmányi teljesítmény, a kardiovaszkuláris szabályozás és az alvásminőség/alváshatékonyság kapcsolatának elemzését.

3. Módszerek

A módszerek áttekintése során nem törekszem teljességre, csak a modellszervezettel kapcsolatos technikákat, illetve a kronobiológiában kevésbé jártas olvasók számára a ritmus elemzéshez használt módszereket ismertetem részletesebben. Az alkalmazott reagensekről, illetve egyéb módszerekről részletes információkat az értekezés végén felsorolt közlemények tartalmaznak.

Klónozási technikák

A genetikai módosításokhoz használt plazmidokat a gDNS templátról készült PCR termékek és promóter szakaszok pBM61 vektorba (*his-3* lókuszt célzó vektor) építésével hoztuk létre. A plazmidokat DH5 α sejtekben sokszorosítottuk. Rekombináns fehérje izolálása céljából a plazmidokkal BL-21-es *E. coli* baktériumokat transzformáltunk, és a fehérjeexpressziót 18 °C-on 16 órán keresztül 100 μ M izopropil-1-tio- β -galaktopiranoziddal (IPTG) indukáltuk.

Neurospora crassa tenyésztése, genetikai módosítása

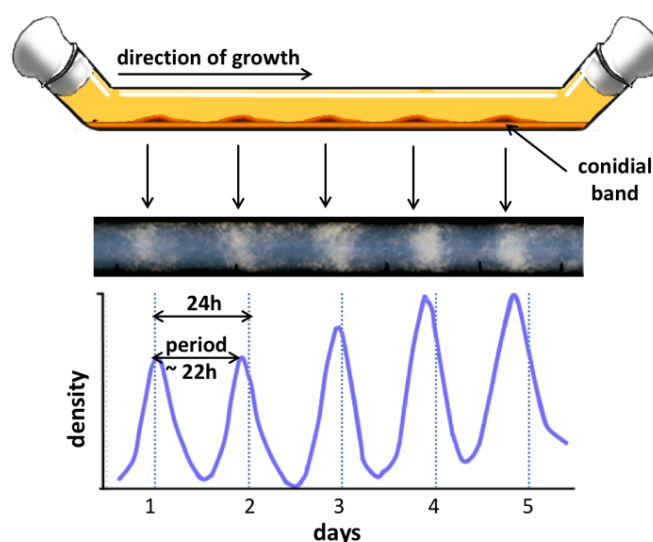
Az egyes tanulmányokhoz alkalmazott törzseket az Eredmények fejezet adott helyén specifikálom. Előljáróban érdemes megemlíteni, hogy kontrollként (*wt*) is többféle törzset használtunk, hiszen azt mindig a mutáns törzsek genetikai háttere szerint kellett megválasztanunk. A kronobiológiában leggyakrabban alkalmazott *bd* (vagy *frq*⁺) törzs egy természetes variáns, amely minimál táptalajon is mutat konidizációs ritmust.

A gombát szilárd és folyékony táptalajon egyaránt tenyésztettük. A folyékony alapmédium Vogel féle gombamédiumot (169), 2% glükózt, 0,5 % L-arginint és 10 ng/ml biotint tartalmazott. A futtatócső táptalaja hasonló volt, de csak 0,17 % arginint tartalmazott, 2,2 % agarral volt kiegészítve és nem volt benne glükóz. Amennyiben valamely táptalajban ezektől eltért a glükóz koncentráció, azt az eredmények ismertetésekor az egyes vizsgálatok leírása tartalmazza. A *qa-2*-promóter kinasavval való aktiválásához glükóz-mentes alapmédiumot használtunk, amihez 0,3 % kinasavat és 0,17 % arginint adtunk. Az *in vivo* luciferáz mérést 96 lyukú lemezen végeztük, a Vogel féle médium 0,025 % glükózt, 0,25 % fruktózt, 0,5 % szorbózt, 1 % agarózt, 10 ng/ml biotint tartalmazott és 150 μ M szentjánosbogár luciferinnel lett kiegészítve. A gombát általában 25 °C-on tenyésztettük, az ettől eltérő körülményt a megfelelő ábránál feltüntettem. A gombatörzsek elektroporációval történő

transzfekcióját, illetve keresztezését a Fungal Genetics Stock Center (URL: <http://www.fgsc.net/neurosporaprotocols>) ajánlását követve végeztük.

***Neurospora crassa* konidizációs ritmusának elemzése futtatócsövön**

Modellszervezetünk cirkadián tulajdonságainak jellemzésére az egyik legrégebben elterjedt módszer az ún. futtatócsöves vagy „race tube” analízis. Ehhez egy mindkét végén hajlított csőbe szilárd táptalajt töltünk, és a gombát a cső egyik végében oltjuk le (6. ábra). Miközben megfelelő körülmények között (konstans fény, fényben történő inkubációt követő konstans sötét, fény-sötétség vagy hőmérséklet ciklusok) inkubáljuk a tenyészetet, a gomba a cső hosszában növekedve naponta egy, aszexuális szaporítóképlet-együttest, ún. konídiumcsomót hoz. A növekedési frontot meghatározott időközönként jelöljük – ennek alapján készül az időtengely– majd a cső denzitometrálását követően egy számítógépes programmal (ChronOSX, T. Roenneberg, LMU Munich) meghatározhatók a cirkadián paraméterek. A denzitometriás adatokra a szoftver egy függvényt illeszt, aminek alapján fázist és átlagos periódushosszt kalkulál. Amennyiben a kísérletek leírásánál nem szerepel specifikáció, az inkubációs hőmérséklet 25 °C volt.



6. ábra: Futtatócső denzitometriás analízise

A bal végén leoltott futtató csövet először 24 órát világosban inkubáltuk, majd állandó sötétbe került. A középső képen látható kis fekete vonalak a naponkénti növekedési frontot jelölik. A ChronOSX szoftver az alsó ábrarészen lévő denzitometriás görbe alapján kalkulálja az átlagos periódushosszt. (8. közlemény ábrarészlete)

***In vivo* és *in vitro* luciferáz aktivitás mérés**

In vivo méréshez a szilárd táptalajra leoltott kultúrákat két napig állandó fényben vagy LD 12:12 óra mellett inkubáltuk 30 °C-on. A vizsgálatok egy részében a táptalaj glükózt (0,05 %) tartalmazott. A lumineszcenciát (Polarstar Optima luminométer, BMG Labtech) 30 percenként 4 s-os integrációs idővel detektáltuk 4-5 napon keresztül. Az adatokat a Chrono program segítségével elemeztük.

Az *in vitro* meghatározás folyékony kultúrákból készült sejtextraktumon történt, ATP-vel aktiváltuk a reakciót és Lumat LB 9501 (Berthold) készüléken mértünk.

Fehérje detektálási módszerek

A fehérjéket mind gomba-, mind emlős sejtek esetében sejtlyázumból specifikus antitestek felhasználásával Western blot technika segítségével mutattuk ki, a blottolás félszáraz rendszerben történt. Az SDS poliakrilamid gélen való fehérjeszeparálásnál az elektromobilitási különbségek kifejezetté tételéhez a gélben az akrilamid/biszakrilamid arányt tapasztalati úton állítottuk be. A kétdimenziós gélelektroforézishez ReadyStrip IPG (Bio-Rad) gélcsíkot használtunk, a fehérjemintákat a gyártó ajánlása szerint készítettük elő. Az izoelektromos fókuszálást Protean IEF (Bio-Rad) rendszerben végeztük.

Amennyiben nem állt rendelkezésre az adott fehérjére specifikus antitest, epitóppal jelölt fehérjét fejeztünk ki a sejtben és az epitópot felismerő antitest segítségével detektáltunk.

A BMAL1 sejten belüli elhelyezkedését immuncitokémia segítségével vizsgáltuk fluoreszcens konfokális mikroszkóp (LSM710, Zeiss) használatával. A VVD-GFP fúziós fehérjét, valamint a párhuzamos magfestést fluoreszcens mikroszkóppal (Leica DMI 6000B) detektáltuk.

Szubcelluláris frakcionálás

Szubcelluláris frakciók fehérjéinek detektálásához a sejtlyázumokat Ficoll, majd szacharóz tartalmú gradiensre mértük, és centrifugálással választottuk el a citoszolikus és magi frakciót az irodalomban elfogadott módszer (170) kismértékű módosításával: a mintatérfogatókat 10 %-ra csökkentettük (Eppendorf cső) és a döntő lépésnek tekinthető, a citoszolt a magtól elválasztó centrifugálást 8800 g-vel, 2 percig, 4 °C-on végeztük.

RNS vizsgálatok

Az RNS szintek meghatározásához a sejtekből Tripure® reagens (Roche) segítségével, a gyártó instrukciói alapján RNS-t izoláltunk. A minták DNáz kezelése után cDNS-t készítettünk a QuantiTect® reverz transzkripció kit (Quiagen), illetve a RevertAid® First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) használatával a gyártó előírásainak megfelelően. A gének relatív expresszióját ABI-Prism 7000 (Applied Biosystems), később pedig Light Cycler® 480 rendszer (Roche) használatával határoztuk meg TaqMan hidrolízis próbák alkalmazásával. *Neurospora crassa* minták esetében *aktint*, emlős sejtek esetében *Gapdh*-t alkalmaztunk háztartási génként.

Az RNS 5' végének meghatározásához az 5'RLM-RACE (5' RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends) technikát alkalmaztuk (Ambion Inc., USA).

Humán leukociták izolálása vénás vérmintából

A vérmintákat nátrium citrátot és sejtpreparáló gél tartalmazó Vacutainer® CPT™ csövekbe (Beckton-Dickinson) vettük. A plazma mintákat felhasználásig –80 °C-on tároltuk. A mononukleáris sejteket a plazma alatti sejtgűrűből, míg a neutrofil granulocitákat a vörösvérsejtek feletti frakcióból izoláltuk. A mintákban maradó vörösvérsejteket ozmotikus lízis révén elimináltuk. A minták tisztaságát metilénkékekkel való magfestéssel ellenőriztük. A mintákat csak abban az esetben használtuk a kísérletekhez, ha annak tisztasága legalább 97% volt.

Neutrofil granulociták szuperoxid termelésének és fagocitózis készségének vizsgálata

A szuperoxidtermelés követésére kemilumineszcens módszert alkalmaztunk. A méréshez használt HBSS (Hank's balanced salt solution) oldat 0,1 µM lucigenint tartalmazott. A szuperoxid termelést opszonizált zimozánnal aktiváltuk. Az opszonizáláshoz a zimozánt kevert humán savóban (3 egészséges férfi donor szérumának egyenlő arányú keveréke) 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A sejtek stimulálását követően a lumineszcencia intenzitását 37 °C-on követtük (Mithras LB 940 Multilabel Reader, Berthold Technologies). Az eredmények értékeléséhez a lumineszcencia változást leíró görbék felszálló szárának meredekségét határoztuk meg.

A neutrofil granulociták fagocitózis készségének méréséhez kevert humán savóval opszonizált, GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus*-t (171) használtunk. A baktériumok és neutrofil granulociták 100:1 arányú keverékét üveg fedőlemezre centrifugáltuk, amit azután

37°C-on 10 percig inkubáltunk 5% CO₂ jelenlétében. Mosást követően a mintákat paraformaldehiddel fixáltuk, majd Zeiss LSM710 lézer-scanning mikroszkóppal vizsgáltuk. ZEN 2011 SP2 black edition (Zeiss) szoftver segítségével képeket készítettünk, és 100 neutrofil granulocitát értékelve meghatároztuk a sejtek fagocitózis indexét (bekebelezett baktériumok száma/100 neutrofil granulocita).

Immunkémiai eljárások hormonszint és citokin meghatározáshoz

A humán vérplazma kortizolszintjét elektrokemilumineszcens immunoassay (Elecsys, Roche) segítségével határozták meg a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében. A CXCL12 plazma koncentrációjának méréséhez a Human SDF-1 alpha ELISA Immunoassay kitet (R&D Systems) használtuk. A vizelet 6-szulfátoximelatonin szintjét kompetitív ELISA eljárással (IBL International) határoztuk meg, és a koncentrációt a kreatinin szintre normalizálva adtuk meg.

Neutrofil granulociták morfológiai vizsgálata

A sejtek komplexitásának mértékére jellemző az oldalirányú fényszórás (SSC). A sejtizolálást követően a neutrofil granulocitákat paraformaldehiddel fixáltuk, majd az SSC-t 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.

Az érési stádiumok morfológiai elkülönítése céljából ujjbegyből vett vérből tárgylemezen kenetet is készítettünk, amelyet May-Grünwald/Giemsa oldattal festettünk a gyártó (Sigma-Aldrich) által javasolt protokoll szerint. Mintánként 100 sejtet számoltunk meg és a sejtmag szegmentáltsága alapján négyféle fejlődési alakot különböztettünk meg.

Szívfrekvencia variabilitás (HRV) analízis

A résztvevők által viselt Actiheart (CamNtech Ltd., UK) készülék a szívütések között eltelt idő hosszát (inter-beat-interval, IBI) rögzítette. Az adatok feldolgozását érvényben lévő szakmai ajánlások alapján végeztük (172, 173). Első lépésként az adatok elfogadhatóságát vizuális inspekcióval szűrtük. Az ARTiiFact szoftver segítségével detektáltuk és korrigáltuk a műtermékeket (174), majd az adatsort 5 perces szegmensekre bontottuk. Azokat a szegmenseket, amelyek 10%-nál nagyobb arányban tartalmaztak műtermékeket, kizártuk az analízisből. A HRV analízisére lehetőség van idő- és frekvencia tartományban is. Az

időtartományban két paramétert elemeztünk részletesen, melyek a vagus tónus mértékét jól jellemzik: az egymást követő intervallumok szórását kifejező RMSSD-t (root mean square of successive differences), valamint a pNN50-et, azaz azon egymást követő intervallumok arányát, melyek 50 ms-nál nagyobb mértékben különböznek egymástól. A HRV frekvencia tartományban való jellemzéséhez az IBI adatsor Fourier-transzformációjára van szükség, amelynek révén megállapítható, hogy a variabilitáshoz milyen frekvenciájú komponens milyen teljesítménnyel járul hozzá. Az adatfeldolgozáshoz a DADiSP 6.7-es szoftvert használtuk. Az 5 perces szegmensek Fourier-transzformáció révén meghatározott spektrális teljesítménysűrűségeit a következő frekvenciatartományokban átlagoltuk: nagyon alacsony (VLF - very low frequency, 0,0033-tól 0,04 Hz-ig), alacsony (LF - low frequency, 0,04-től 0,15 Hz-ig) és magas (HF - high frequency, 0,15-től 0,4 Hz-ig) tartomány.

Statisztikai elemzések

A statisztikai analízishez a SigmaPlot 11.0, illetve a Statistica szoftvert (13.2 verzió, StatSoft, Tulsa, OK, US) használtuk. Az ábrákon, illetve a szövegben az adatokat általában $\text{átlag} \pm \text{vagy} + \text{standard hibaként (S.E.M.)}$ ábrázoltuk, az ettől eltérő eseteket a megfelelő helyen külön jelöltem. A szignifikancia határ $p < 0,05$ volt, a szignifikáns eltérést az ábrákon csillaggal jelöltük (*, $p < 0,05$). A további statisztikai módszerek és jelölések leírása az eredmények ismertetéséhez kapcsolódva a megfelelő helyen található.

4. Eredmények és megbeszélés

A megosztott első szerzős közlemények témáját tárgyaló alfejezetekben részletesen, ábrákkal csak olyan eredményeket mutatok be, amikhez magam végeztem kísérletes munkát. A többi vizsgálat eredményét is természetesen röviden összefoglalom, hogy a munka teljes kontextusában követhető legyen.

4.1. A molekuláris óraműködés vizsgálata *Neurospora crassa* modellorganizmusban

Ahogy azt a bevezetőben már említettem, a molekuláris időmérés elvének konzerváltsága, valamint a kísérletes rendszer számos előnye miatt a cirkadián kutatás igen kedvelt modellorganizmusává vált a *Neurospora crassa*. Molekuláris vizsgálatainkat ezért részben ezen a rendszeren végeztük, ezeket az eredményeket mutatom be a következő öt alfejezetben.

4.1.1. A foszforiláció szerepe a molekuláris óra pozitív komponensének szabályozásában (1. közlemény)

Vizsgálataink kezdetekor már ismert volt, hogy a FRQ alapvető szerepet tölt be a negatív visszacsatolásban, azaz a WCC aktivitásának felfüggesztésében, ugyanakkor a gátlás létrejöttének molekuláris mechanizmusa felderítetlen volt.

4.1.1.1. A FRQ és a WCC közötti molekuláris és funkcionális kölcsönhatás vizsgálata

A FRQ és a WCC stabil molekuláris kölcsönhatásán alapuló gátlás ellen szóltak a munkacsoport korábbi eredményei és irodalmi adatok is. Ezek egyrészt arra mutattak rá, hogy míg a WCC döntően nukleáris elhelyezkedésű (175), addig a FRQ mintegy 90 %-a a citoplazmában detektálható, másrészt, hogy a WCC nagy része nem depletálható a sejtlyzátumból a FRQ elleni antitesttel (31, 176).

A molekuláris kölcsönhatáson alapuló gátlás lehetősége szempontjából alapvető kérdés a FRQ és a WCC mennyiségi viszonya a sejtmagban, ahol a negatív visszacsatolás megvalósul. Ennek vizsgálatához *in vitro* szintetizált, izotóppal jelölt fehérjékkel készítettünk kalibrációt a Western bloton detektált jelhez, aminek alapján becsültük a FRQ és a WCC limitáló komponensének, a WC-1-nek egymáshoz viszonyított moláris arányát a sejtmag frakciókban.

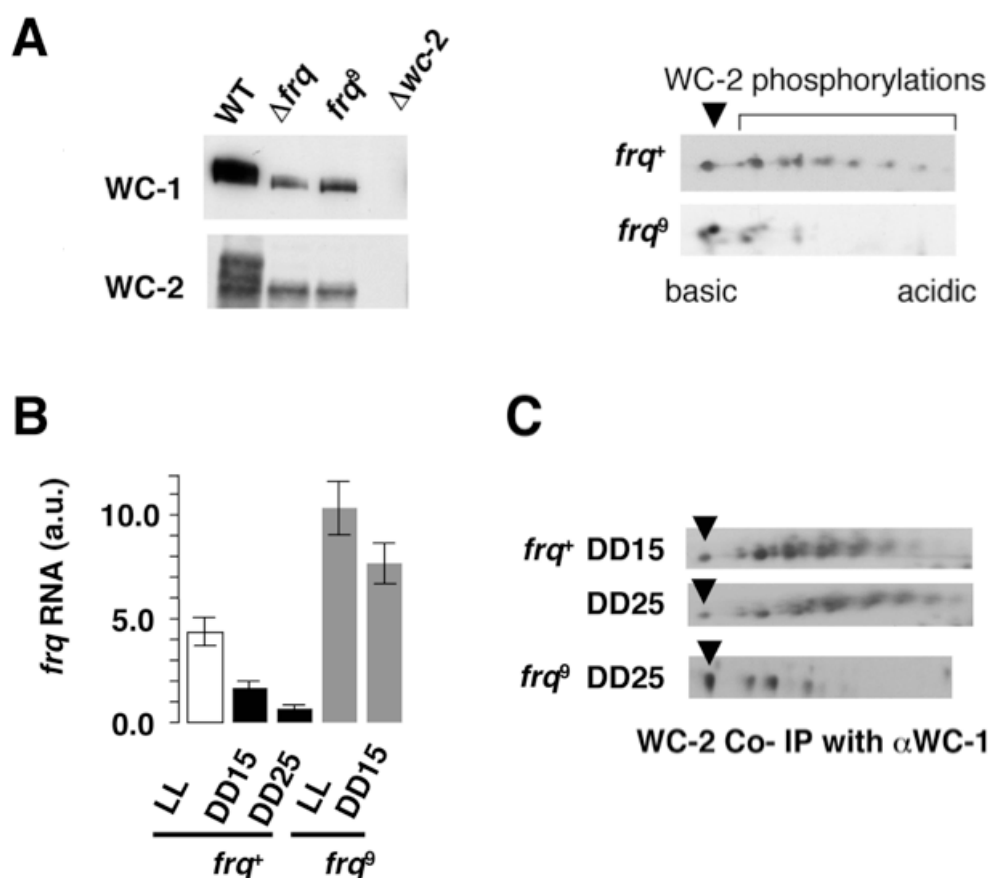
Az óraműködés szempontjából két szélsőséges állapotban történt a meghatározás, állandó világosban növekvő kultúrák mintáiból (LL), illetve DD25-ből (a világosból sötétbe való átmenet után 25 órával) származó mintákból. LL-ben a FRQ fehérje és RNS expressziója konstitutívan magas, míg DD25-ben minimális a transzkripció aktivitása, azaz ilyenkor a legalacsonyabb a WCC aktivitása a cirkadián ciklus folyamán. Mindkét állapotra a WCC moláris túlsúlya volt jellemző, LL-ben mintegy hétszeres, DD25-ben pedig körülbelül 15-szörös mennyiségben detektáltuk a WCC-et a FRQ-hez viszonyítva (ábrán nem bemutatott adat). Ez arra utal, hogy viszonylag kevés FRQ molekula jóval nagyobb mennyiségű WCC-et képes gátlás alatt tartani.

A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a sejt- és magextraktumok kromatográfiás elválasztását követően azonos frakcióban detektálható-e a FRQ és a WCC. Ehhez Superose 6 felhasználásával gélfiltrációt végeztünk. Akár világosban, akár sötétben inkubált sejtekből származó mintát vizsgáltunk, a FRQ és a WCC jól elkülönülő, minimális átfedést mutató frakciókban volt detektálható (ábrán nem bemutatott adat), ami szintén az ellen szól, hogy a két órakomponens nagy része szoros kölcsönhatásban lenne.

Megismételtük az immunprecipitációs vizsgálatokat, de csak a FRQ egy kis hányadát detektáltuk a precipitátumban (ábrán nem bemutatott adat), ami megint csak arra utal, hogy a WCC-nek csak egészen kis frakciója képezhet stabil komplexet a FRQ-vel. Az eddig ismertetett eredményekből arra következtettünk, hogy a FRQ és a WCC között valószínűleg tranzienst molekuláris kölcsönhatás van, ami önmagában nem lehet elég a WCC inaktiválásához, viszont képezheti egy katalitikus gátlás alapját.

A katalitikus folyamatok közül kézenfekvőnek tűnt a foszforiláció, hiszen mindkét WC fehérje foszfoprotein (34, 175). Első kérdés az volt, hogy tudunk-e detektálni a WCC foszforilációs állapotában FRQ-től függő változást. Ehhez két *frq*-deficiens törzs magextraktumait vizsgáltuk: a Δfrq -ben a teljes *frq*-t kódoló génszakasz hiányzik, míg a *frq*⁹-ben egy korai stop kodon következtében funkcionálisan inaktív fehérje keletkezik (177). A foszforiláció megítéléséhez az elektroforetikus mobilitást vizsgáltuk, ugyanis mind saját, mind mások adatai szerint e fehérjék foszforilált formái lassabban vándorolnak a gélben (7.A ábra). Szemben a *wt* mintákban látható elnyúltabb fehérjejelekkel, a *frq*-deficiens törzsek mintáiban viszonylag keskeny, nagyobb mobilitású csíkként detektáltuk a WC-1-et és a WC-2-t, azaz hiányoztak a hiperfoszforilációra jellemző fehérjeformák. A foszforiláció részletesebb elemzéséhez kétdimenziós gélelektroforézist végeztünk a *wt* (*bd* vagy *frq*⁺, ezek szinonimák) és a *frq*⁹ törzs mintáival, majd a fehérjéket Western bloton detektáltuk. WC-1-et sajnos nem

sikerült kimutatni a kétdimenziós gélből készült blotokon, mert a fehérje valószínűleg nem lép be megfelelő mennyiségben az izoelektromos fókuszáláshoz használt gélcsíkba. A WC-2 formákról viszont differenciált képet kaptunk (7.A ábra). A DD25-ös időpontban betakarított *wt*-ú mintákban számos, különböző izoelektromos pontú WC-2 forma volt jelen, míg a *frq*⁹-es mintákban a kevésbé negatív formák domináltak, ami, az egydimenziós gélelektroforézis eredményével összhangban, csökkent mértékű foszforilációra utal. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy a FRQ elősegíti a WCC foszforilációját.



7. ábra: A WC fehérjék expresszióját és foszforilációját egyaránt befolyásolja a FRQ

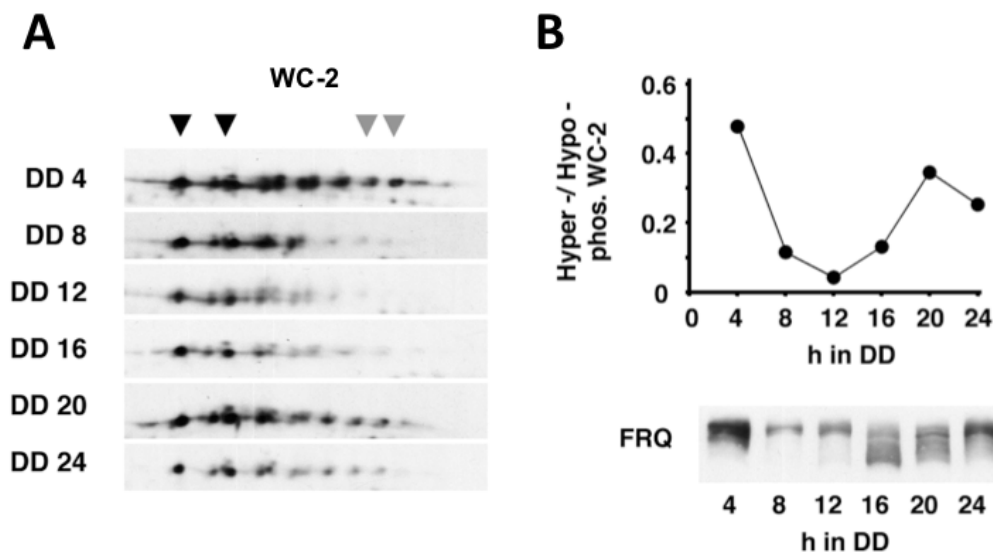
A) A WC-1 fehérjék szintje és elektroforetikus mobilitása *wt*-ú (*frq*⁺) és *frq*-deficiens törzsek magextraktumában. Bal oldali ábrarész: LL-ben nőtt minták egydimenziós gélen való elválasztását követően Western blot analízis történt, majd a blotot WC-1 és WC-2 elleni antitesttel hívtuk elő. WC-2 hiányában ($\Delta wc-2$) a WC-1 nem stabil. Jobb oldali ábrarész: A WC-2 foszforilációjának vizsgálata kétdimenziós gélből készült immunobloton (DD25-ös minták) *wt*-ú (*frq*⁺) és *frq*⁹ törzsekben. **B)** *frq* RNS szintek az ábrán jelölt törzsekben világosban (LL) és sötétben nőtt (DD15 és DD25) kultúrákban. Az RNS kvantifikálása cDNS-sé való átírást követően valós idejű PCR-rel történt. **C)** A WC-2 foszforilációs állapota a WCC-ben DD15 és DD25 időpontban. *frq*⁺ és *frq*⁹ sejtextraktumokat anti-WC-1 antitesttel precipitáltunk, majd a fehérjéket kétdimenziós gélen szeparáltuk, és az immunoblotot WC-2 elleni antitesttel hívtuk elő.

A következő kérdés az volt, hogy látunk-e összefüggést a WCC foszforilációja és aktivitása, azaz a *frq* transzkripció mértéke között. A *frq*⁹-es törzs előnye, hogy bár funkcionáló FRQ-je nincsen, a *frq* RNS detektálható benne. A 7.B ábrán látható, hogy akár világosban, akár sötétben nőttek a kultúrák, a *frq*⁹-ben jóval magasabb volt az RNS expresszió, mint a kontroll mintákban, annak ellenére, hogy a WCC teljes mennyisége ebben a törzsben sokkal alacsonyabb, mint a *wt*-ban. Mindez arra utal, hogy a WCC aktivitása nem arányos a komplex abszolút mennyiségével, a *wt*-ban annak egy jelentős része valószínűleg inaktív, foszforilált formában található, és a nagy aktivitású forma a *frq*-deficiens törzsben is megfelelő mennyiségben jelenlévő hipofoszforilált WCC.

Mivel a teljes WC-2 készletből transzkripciót serkentő aktivitással csak a WC-1-gyel komplexet alkotó frakció rendelkezik, következő lépésként a WC-1 elleni antitesttel immunprecipitálható WC-2 foszforilációját elemeztük (7.C ábra). Az ábrán nyíllal jelölt, nem foszforiláltnak tekintett fehérjeforma kvantifikálása a következő eredményre vezetett: a kontroll törzsben DD15 időpontban a komplexben lévő WC-2 mintegy 10 %-a, DD25-ben pedig 6,5 %-a nem volt foszforilált, amely különbség jól tükrözi a két időpont közötti aktivitásbeli különbséget. A *frq*⁹ törzsben viszont a WC-1-hez kapcsolódott WC-2 mennyiség nagyjából 50 %-át tette ki a nem foszforilált forma DD25-ben. Ez azt jelenti, hogy bár e törzsben a WCC teljes mennyisége csak mintegy negyede a *wt*-ban található fehérjének, a nem foszforilált WC-2 abszolút mennyisége még így is nagyobb, mint a kontrollban, ami magyarázhatja a törzs vad típusénál nagyobb transzkripciós aktivitását.

4.1.1.2. A WCC foszforilációja és aktivitása párhuzamosan változik

A következő kérdés az volt, hogy látunk-e a WC-2 foszforilációjában cirkadián oszcillációt. Ehhez sötétben növekvő kultúrákból 4 óránként vettünk mintát, majd kétdimenziós gélről készült Western blot segítségével elemeztük őket (8.A ábra). A foszforiláció mértéke időben jellegzetesen változott: a hiper- és hipofoszforilált formák aránya DD12-ben mutatott minimumot, abban az időpontban, amikor a FRQ szintje alacsony, megszűnik a negatív visszacsatolás, és a *frq* transzkripció nagy aktivitással újra indul. A DD20 órás mintában láttunk újra nagymértékű WC-2 foszforilációt, azaz abban az időpontban, amikor magas a FRQ szintje és erőteljes a negatív visszacsatolás (8.B ábra). Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a WC-2 foszforiláltsága oszcillál, és a foszforiláció mértéke fordítottan arányos a transzkripciós aktivitással.

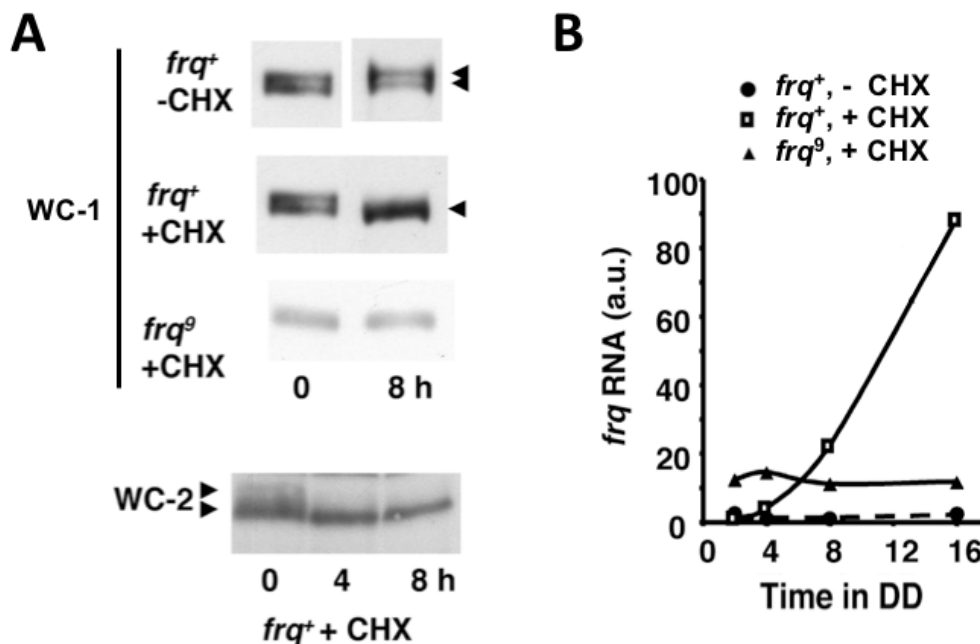


8. ábra: A WC-2 foszforilációja a FRQ szintekhez hasonlóan napi ritmust követ

A) A WC-2 foszforilációjának elemzése különböző ideig sötétben inkubált *frq*⁺ kultúrák sejtizátumában kétdimenziós gélelektroforézissel és Western-blot technikával. **B)** A WC-2 foszforiláció mértékének és a FRQ expresszió változásának párhuzamos analízise. Felső ábrarész: Az A) ábrarészen nyíllal jelölt 2-2 hipo- (fekete nyíl) és hiperfoszforilált (szürke nyíl) fehérjeforma kvantifikálása denzitometriásan történt, majd a hiper- és hipofoszforilált formák denzitásainak arányát ábrázoltuk a sötétben történő inkubáció idejének függvényében. Alsó ábrarész: A FRQ expresszió analízise egydimenziós gélen, Western blot technikával különböző DD időpontokban.

A WCC foszforilációjának és aktivitásának összefüggését tovább vizsgálandó, olyan kísérleti körülményt kerestünk, amelynek során a WCC foszforilációját *in vivo* markánsan tudjuk változtatni. Ehhez egy korábbi megfigyelésünket hasznosítottuk. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy amennyiben a kultúrákat a fény-sötétség váltás előtt a transzlációt gátló cikloheximiddel (CHX) kezeljük, a WC fehérjék elektroforetikus mobilitásában viszonylag rövid időn belül eltolódás következik be (9.A ábra), ami a sötétben viszonylag stabil WCC defoszforilációjára utal. A jelenség pontos okát nem tudjuk, de feltételezhető, hogy a foszforilációs állapotot befolyásoló kinázok és foszfatázok nem azonos sebességgel bomlanak a sejtben, így a transzláció gátlása a kináz/foszfatáz-aktivitás egyensúlyának eltolódásához és a WCC fiziológiásnál markánsabb defoszforilációjához vezethet. Egy másik lehetséges magyarázat a kináz aktivitás viszonylagos csökkenésére, hogy arra az újonnan szintetizálódó FRQ van serkentő hatással, és CHX jelenlétében ez a hatás esik ki. Mint ahogy a 9.B ábrán látható, a defoszforilációval párhuzamosan a *frq* RNS szint erőteljesen emelkedik. Mivel ilyenkor új WC fehérjék nem szintetizálódnak, a meglévő komponensek aktiválódása lehet az oka a génexpresszió növekedésének. Megjegyzendő, hogy a *frq* szint a CHX adást követően

olyan magas lett, amilyen szintet a cirkadián ciklus folyamán soha nem detektálunk. Ez arra utal, hogy normál óraműködés mellett a WCC egy jelentős része mindig inaktív állapotban van. Amennyiben ugyanezt a kísérletet a *frq*⁹-es törzzsel végeztük, sem a WC-1 foszforiláltsága, sem a *frq*⁹ RNS szint nem változott (9.B ábra), ami arra utal, hogy ebben a törzsben a WCC már eleve teljes aktivitással működött. A $\Delta wc-1$ törzsben sem következett be *frq* RNS szint változás (ábrán nem bemutatott adat), ami az előző eredménnyel együtt arra utal, hogy a transzkripció aktivitás változása funkcionáló órakomponensek jelenlétéhez kötött, és nem a CHX valamilyen órától független, pleiotróp hatásáról van szó. Fontos megjegyezni azt is, hogy a FRQ bomlásának sebessége az LD-váltást követően CHX-től független (20), így a transzkripció aktivitás fokozódásának valószínűleg nem lehet egyedüli oka a FRQ szintjének változása.



9. ábra: A WCC defoszforilációja és aktivitásának növekedése összefüggést mutat

A) A WCC CHX hatására történő defoszforilációja. Az állandó világosban növő mintákat a sötétbe történő áthelyezéssel egyidőben 10 μ g/ml CHX-del kezeltük, majd a jelzett időpontokban betakarítottuk. A teljes sejtlizátumokból készült mintákat a feltüntetett fehérjék elleni antitesttel Western bloton analizáltuk. A nyilak a különböző mértékben foszforilált fehérjeformákat mutatják. **B)** Növekvő *frq* expresszió CHX-del kezelt kultúrákban. Az A) részben ismertetett kezelést követően RNS-t preparáltunk, aminek kvantifikálása cDNS-sé való átírást követően kvantitatív valós idejű PCR-rel történt.

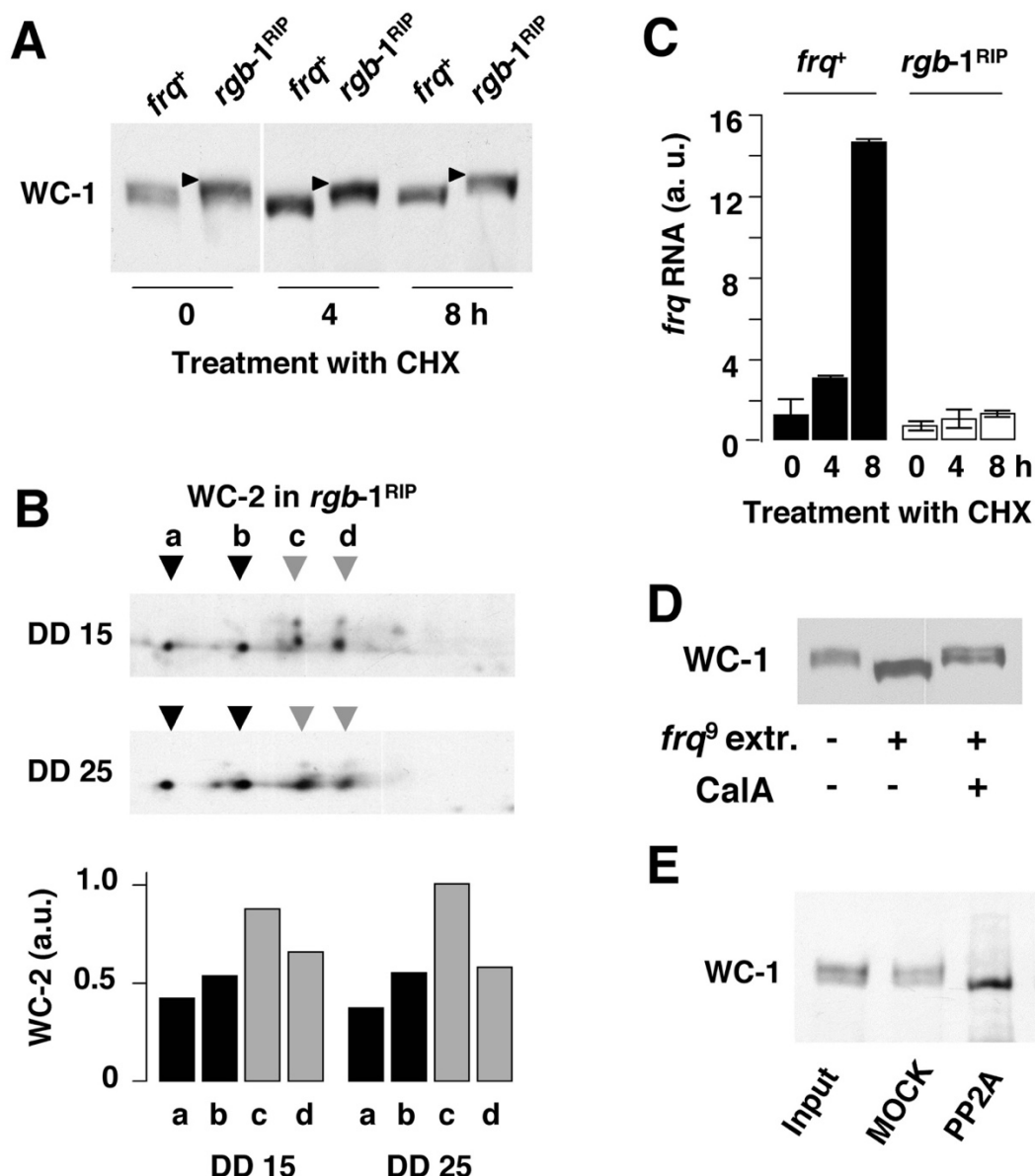
Egy következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a FRQ szintjének szorosabb, mesterséges kontrollja esetén is korrelál-e a WCC foszforilációjának és aktivitásának változása. Ehhez a *frq*⁹, *qa-FRQ-His* törzsben kinasav hozzáadásával és elvételével szabályoztuk a FRQ

expressziót. A FRQ szintézis indukcióját követően a WC fehérjék szintjének és foszforiláltságának fokozódásával párhuzamosan csökkent a *frq*⁰ RNS szintje. Ezzel szemben a kinasav kimosását követően mérséklődött a WCC foszforilációja és ezzel egyidőben emelkedett a *frq*⁰ expresszió (ábrán nem bemutatott adat). Mindez megint csak arra utal, hogy a WCC foszforiláltsága és aktivitása szorosan kapcsolt folyamatok.

A továbbiakban elektroforetikus mobilitás-eltolódás vizsgálattal (electrophoretic mobility shift assay, EMSA) kimutattuk, hogy a *frq*⁰-es törzs azonos mennyiségű magextraktuma több C-boxot (*frq*-promóter WCC-et kötő régiója) tartalmazó oligonukleotidot köt, mint a *wt*-ból készült preparátum. Ez is megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a *frq*⁰-ben lévő kis mennyiségű, de hipofoszforilált WCC nagyobb transzkripciós aktivitással rendelkezik, mint a *frq*⁺-ban található több, de jobban foszforilált komplex. Tisztított FRQ-His hozzáadása a *frq*⁰-es magextraktumhoz, illetve a FRQ immunodepléciója a *frq*⁺ extraktumból nem változtatta meg a C-boxhoz való kötődést, ami amellet szól, hogy a WCC transzkripciós aktivitását nem a FRQ-vel való közvetlen komplexképződés határozza meg. Kimutattuk azt is, hogy a hipofoszforilált WC-2 formáknak nagyobb az affinitása a C-boxhoz, mint a hiperfoszforilált formáknak (ábrán nem bemutatott adatok).

4.1.1.3. A PP2A szerepének vizsgálata a WCC foszforilációjának és aktivitásának szempontjából

Természetesen felmerült a kérdés, hogy mely foszfatáz lehet felelős a WCC defoszforilálásáért, azaz aktivációjáért. Vizsgálatainkkal egy időben mutatta ki Yi Liu munkacsoportja, hogy amennyiben a PP2A regulációs alegysége, az RGB-1 fehérje egy RIP mutáció következtében hiányzik, a *frq* expresszió alacsonyabb, mint a *wt*-ban (28). Ez egybevág egy csökkent aktivitású WCC jelenlétével a foszfatáz-deficiens törzsben. Valóban, a várakozásnak megfelelően, a WC-1 hiperfoszforilált formái voltak detektálhatók az *rgb-1*^{RIP}-ben (10.A ábra). A WC-2 esetében mind DD15-ben, mind DD25-ben négy domináns fehérjeformát lehetett detektálni a kétdimenziós gél Western blotján, ami arra utalt, hogy a WC-2 foszforilációja nem mutat számottevő cirkadián ingadozást (10.B ábra). A foszforilációs ingadozás hiánya a mutánsban összhangban van a *frq* expresszió alacsony amplitudójú ritmusával (28), és arra utal, hogy a PP2A fontos szerepet játszik a WCC aktivitásának szabályozásában.



10. ábra: A PP2A meghatározó szerepet játszik a WCC regulációjában

A) A WC-1 PP2A-tól függő foszforilációs állapota. Világosban nőtt, a jelzett ideig CHX-del (10 µg/ml) kezelt *frq*⁺ és *rgb-1*^{RIP} kultúrák mintáinak Western blot analízise anti-WC-1 antitest segítségével. **B)** A WC-2 foszforilációs állapota DD15 és DD25 időpontban az *rgb-1*^{RIP} törzsben. Felső ábrarész: A fehérjék kétdimenziós gélen való szeparálását követően készült Western blotot WC-2 elleni antitesttel hívtuk elő. A betűkkel jelölt fekete és szürke nyilak kevésbé (a,b) és jobban (c,d) foszforilált formákra mutatnak. Alsó ábrarész: A felső ábrarészen betűvel jelölt fehérjeformák denzitometriás analízise. **C)** A CHX kezelést követő *frq* szint emelkedés függ a PP2A jelenlététől. DD15 időpontban CHX-et adtunk a *frq*⁺ és *rgb-1*^{RIP} kultúrákhoz, majd a jelölt időpontokban betakarítottuk őket. Az RNS szintek kvantifikálása valós idejű PCR-rel történt. **D)** *frq*⁹-es extraktum hatására a WC-1 *in vitro* defoszforilálódik. A WC-1-et *rgb-1*^{RIP} sejtlizátumból immunprecipitáltuk (1. sáv), majd 1 órát 30 °C-on *frq*⁹-es extraktummal inkubáltuk, a foszfatázt gátló caliculin nélkül (2. sáv) vagy annak jelenlétében (3. sáv), amit Western blot analízis követett. **E)** A WC-1 defoszforilációja tisztított PP2A-val. Az előző pontban leírt immunprecipitátumot (Input) PP2A AC dimerrel (Upstate Biotech) (PP2A) vagy anélkül (MOCK) inkubáltuk 20 percig 30 °C-on. A Western blotot anti-WC-1 antitesttel hívtuk elő.

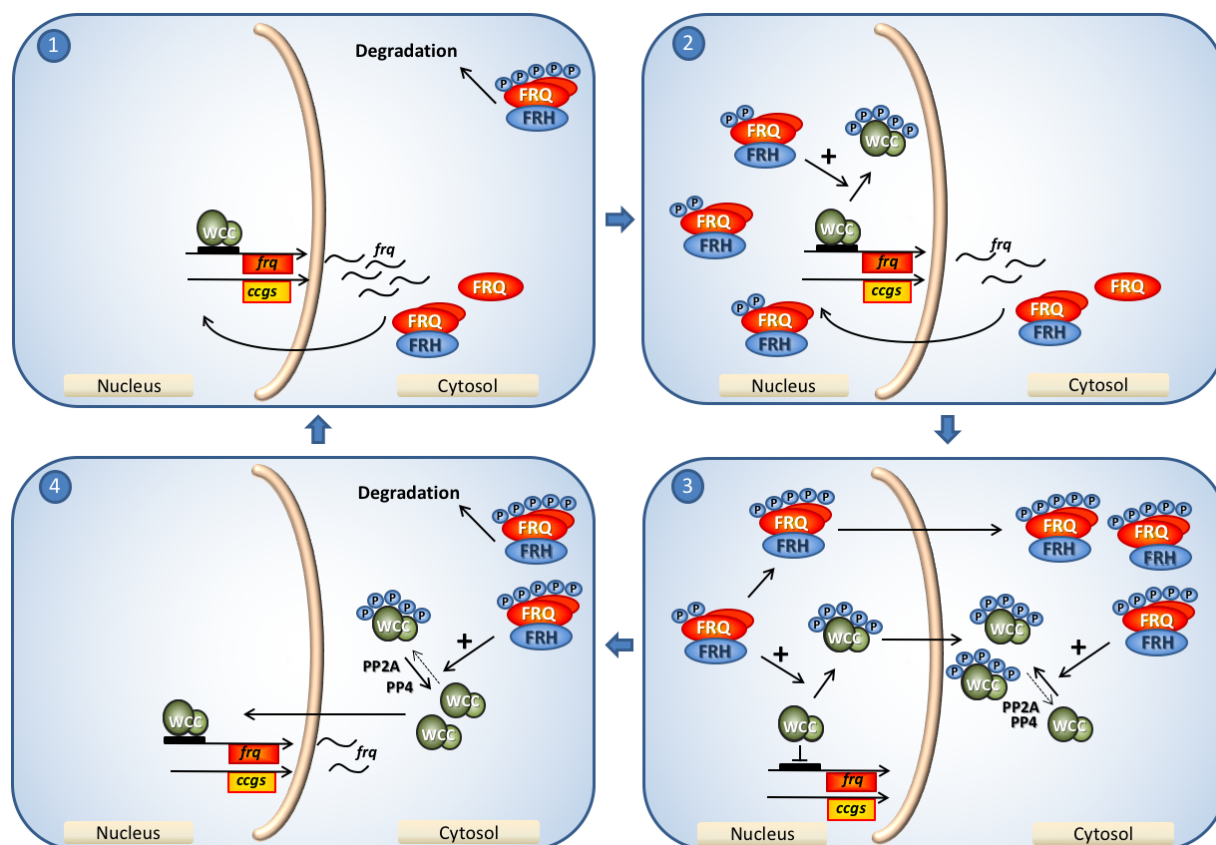
A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a CHX kezelés hatására bekövetkező foszforiláció függ-e a PP2A aktivásától. DD15-ben, azaz abban az időpontban végeztük a CHX kezelést, amikor a vad típusban maximális a *frq* expresszió (10.A ábra). Míg a *wt*-ban a korábbiakban látotthoz (LD átmenetkor adott CHX hatása, 9. ábra) hasonlóan defoszforilálódott a WC-1 és jelentősen emelkedett a *frq* transzkripció, addig az *rgb-1^{RIP}* törzsben se a WC-1 defoszforilációja, se az RNS szint emelkedése nem volt számottevő (10.A,C ábra). Mindez arra utal, hogy a WCC CHX hatására bekövetkező defoszforilációjának és aktivációjának egyaránt feltétele az RGB-1 jelenléte.

A következő kérdésünk az volt, hogy a foszfatáz-deficiens törzsben hiperfoszforilált WC-1 defoszforilálódik-e a *frq⁹*-ben jelenlévő foszfatáz hatására. Ehhez az *rgb-1^{RIP}* törzs sejtextraktumából immunprecipitáltuk a WC-1-et, majd a precipitátumot *frq⁹*-es minta extraktumával inkubáltuk (10.D ábra). A WC-1 elektroforetikus mobilitása megnőtt, és ez caliculin A-val, egy hatékony foszfatáz gátlószerezrel kivédhető volt. Egy következő kísérletben azt is megmutattuk, hogy az immunprecipitált WC-1 tisztított PP2A hatására is defoszforilálódik, azaz a fehérje a foszfatáz közvetlen szubsztrátja (10.E ábra).

A foszfatáz és a FRQ közötti esetleges kölcsönhatás vizsgálatához egy olyan törzset hoztunk létre, amelyben az endogén fehérje mellett az RGB-1 FLAG-tag-gel rendelkező formája is expresszálódik a *qa2*-promóter által szabályozott módon. A törzsben a kinasav hatására a fiziológiásat meghaladó RGB-1 szint alakul ki. Az ilyenkor tapasztalt kisebb mértékű WC-2 foszforiláció arra utalt, hogy a FLAG-tag mellett is funkcióképes volt a fehérje. Ugyanakkor a FLAG-tag elleni antitesttel a FRQ nem volt precipitálható, ami annak lehet a jele, hogy a FRQ és a foszfatáz nem alkot stabil komplexet (ábrán nem bemutatott adatok).

4.1.1.4. Következtetések

Itt összefoglalt munkánk a *Neurospora crassa* cirkadián órájának szabályozását új megvilágításba helyezte. Eredményeink alapján valószínű, hogy a FRQ a WCC foszforilációjának fokozása révén gátolja saját RNS-ének transzkripcióját. A hiperfoszforilált WCC egy inaktív készletet képez a sejtben, amiből a PP2A általi defoszforiláció révén képződhet aktív transzkripciós faktor komplex. Ezen adatok és további irodalmi adatok alapján (17, 19, 21) a *Neurospora* óra működésének egy részletesebb modellje körvonalazódott, amelyet a 11. ábra részletes leírással kiegészítve mutat be.



11. ábra: A FRQ-alapú oszcillátor molekuláris történései a nap folyamán

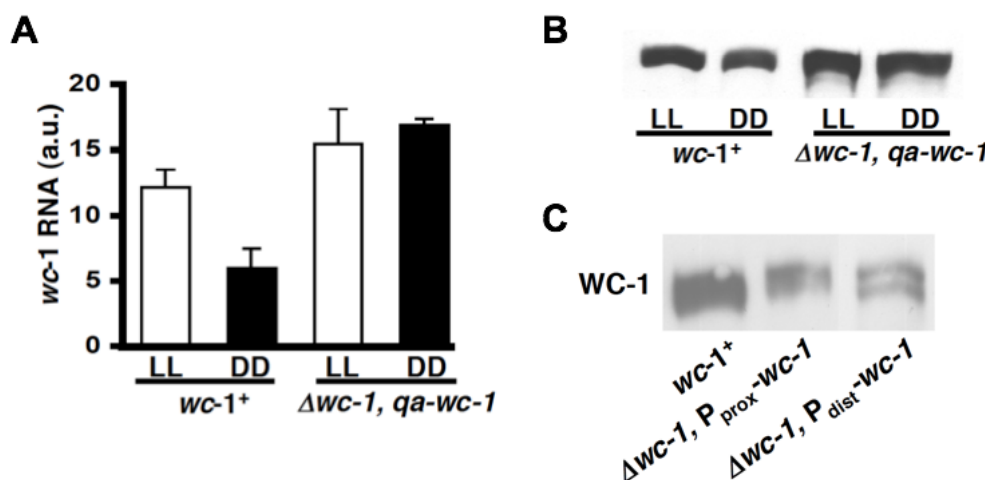
Az ábra négy szakaszra bontva mutatja a molekuláris komponensek alakulását: 1. kép: A szubjektív éjszaka végén a WCC aktiválja a *frq* transzkripcióját, amelyet 4-6 óra késéssel követ a FRQ fehérje felhalmozódása. A FRQ komplexet alkot az FRH-zal. 2. kép: A nap közepén a magban is folyamatosan akumulálódó FRQ serkenti a WCC CK1a és CK2 általi foszforilációját és ezzel inaktivációját, aminek következtében a *frq* transzkripció lassul. 3. kép: A szubjektív este folyamán a *frq* transzkripció minimálisra csökken. A FRQ folyamatosan foszforilálódik és a citoplazmában akumulálódik, ahol serkenti a WCC inaktív, azaz foszforilált formájának felhalmozódását. 4. kép: Az éjszaka folyamán a foszforilált FRQ lebomlik. Mennyisége csökken, és ennek révén a WCC defoszforilációja válik dominánssá a foszforilációval szemben. Az aktív WCC a magban kötődik a *frq*-promóterhez és ezzel a ciklus újra indul. (8. közlemény ábrája)

4.1.2. A WC-1 expresszió szabályozásának elemzése

(2. és 3. közlemény)

Míg a WC-1 fehérje mennyisége kis amplitúdójú cirkadián oszcillációt mutat (178) (l. még 38. ábra), addig a *wc-1* RNS esetében nem sikerült állandó körülmények mellett ritmikus expressziót kimutatni (13, 34), mindez pedig a WC-1 szintek poszttranszkripciós szabályozására utal. Ezzel összhangban, ha egy *wc-1* hiányos törzset úgy módosítanak, hogy abban egy indukálható, heterológ promóter irányítja a *wc-1* kifejeződését, az indukciót

követően ritmusos fenotípus jelenik meg (178). Ezek alapján felvetődött a kérdés, hogy van-e jelentősége a WC-1 expresszió transzkripció szintű szabályozásának az óraműködés szempontjából.



12. ábra: A WC-1 RNS, illetve fehérje szintjei a kontroll törzsben és azokban a törzsekben, amelyekben a *wc-1* expresszióját a *wt*-étől eltérő promóterek szabályozzák

A) A *wc-1* RNS expressziója a *wc-1⁺* és a $\Delta wc-1, qa-wc-1$ törzsben. A folyékony kultúrák állandó világosban nőttek standard médiumban, majd 15 órán át QA-médiumban (kínasavat tartalmazó médium) világosban (LL) vagy sötétben (DD). Az RNS szintek kvantifikálása valós idejű PCR-rel történt (n=3). B, C) WC-1 szintek elemzése Western blot technikával teljes sejtextraktumon. A jelzett kultúrák az A) pontban leírtak szerint (B), illetve standard médiumban állandó világosban (C) nőttek.

4.1.2.1. A *wc-1* gén kifejeződését több promóter szabályozza

Mi is létrehoztunk egy, a *wc-1* gént heterológ promóter révén szabályozó törzset ($\Delta wc-1, qa-wc-1$), amelyben kínasavval indukálható a WC-1 kifejeződése. A törzsben a kontroll, *bd* háttérű törzshöz (amit a $\Delta wc-1$ -től megkülönböztetendő, itt *wc-1⁺*-nak nevezünk) hasonló WC-1 RNS és fehérjeszinteket detektáltunk (12.A,B ábra). Ennek ellenére, a törzs konidizációs ritmusa állandó körülmények (DD) mellett egy kismértékű, de konzekvens fáziskésést mutatott a *wc-1⁺*-hoz viszonyítva (1. táblázat). A két törzs közötti különbség kifejezettebbé vált, amennyiben különböző fény/sötétség ciklusokban inkubáltuk a futtató csöveket. A legnagyobb, 4 órát meghaladó fáziskésést az igen szélsőséges, 1 óra világos/23 óra sötét ciklus mellett tapasztaltuk (1. táblázat, 13.A ábra). A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a cirkadián ciklus különböző időpontjaiban alkalmazott rövid fényimpulzusra hogyan reagál a konidizációs fázis

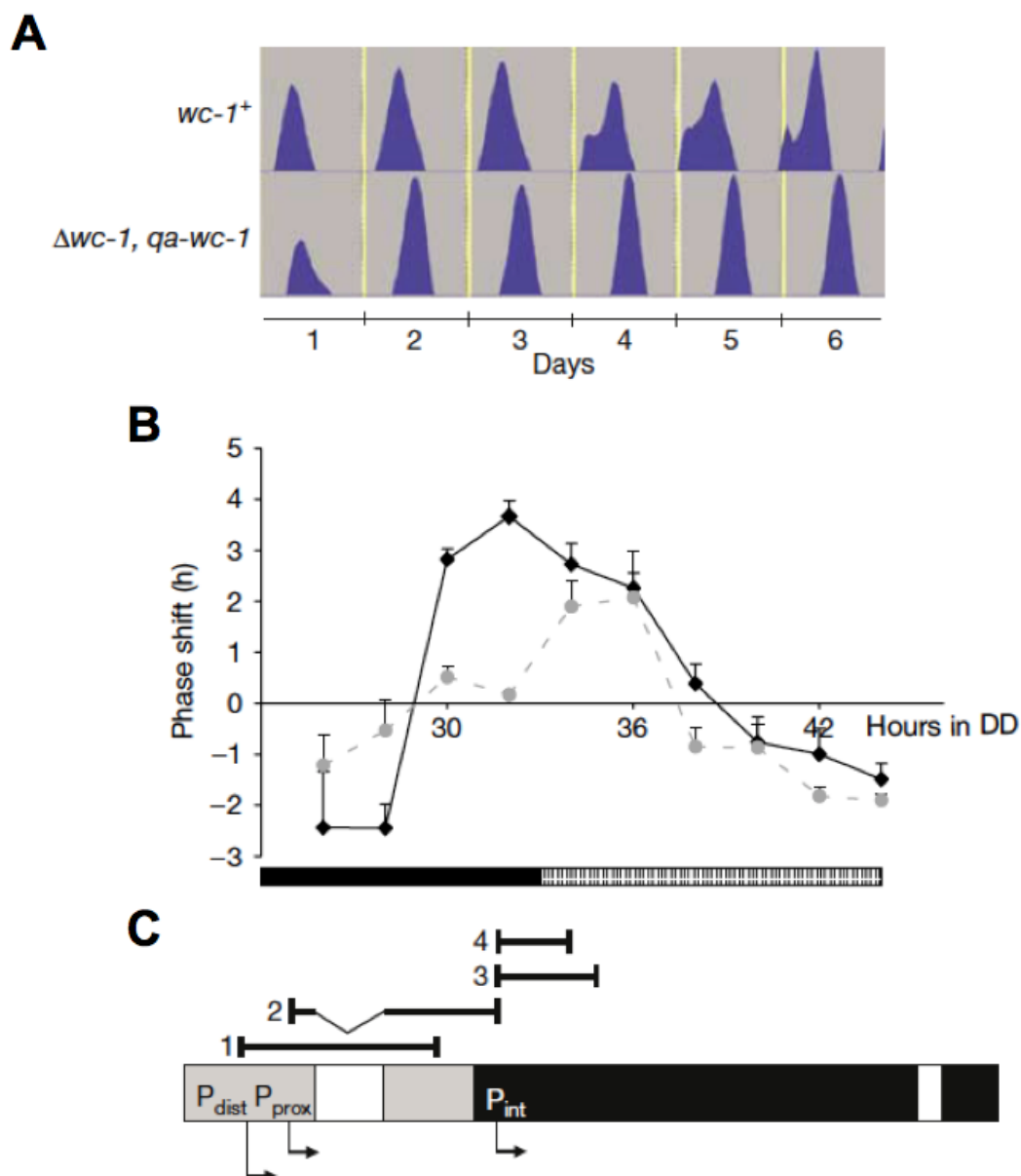
(13.B ábra). Ahogy már korábban szó volt róla a *frq* szintek kapcsán, a cirkadián óraműködés általános jellemzője, hogy a szubjektív éjszaka végén, illetve kora reggel alkalmazott fényinger későbbi időpontra állítja át az órát (fázis előretolódás), míg azok a fényimpulzusok, amik a szubjektív nap végén, illetve éjszaka kezdetén érik a szervezetet, fáziskésést okoznak. Vad típusú óraműködés mellett *Neurospora*-ban a legnagyobb fázis-előretolódás a szubjektív éjszaka késői szakaszában adott fényimpulzus esetén volt tapasztalható, a legnagyobb késést pedig a szubjektív éjszaka elején alkalmazott fényhatás mellett mértük. A maximális előretolódás és késés közötti különbség 8 óra volt a kísérleteinkben. Ez valamivel kevesebb, mint amit mások korábban publikáltak (35), az eltérés oka lehet esetleg a táptalaj összetételének különbözősége (esetünkben kinasavat tartalmazott). Míg a két törzs fázisválasza hasonló volt a szubjektív nappal időszakában alkalmazott fényimpulzus esetén, addig a szubjektív éjszaka alatti fényhatásra a $\Delta wc-1$, $qa-wc-1$ törzs kisebb fáziseltolódással válaszolt, mint a kontroll, és ennek következtében a maximális előretolódás és késés közötti különbség is kevesebb volt, mint 4 óra. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *wc-1* szabályozott transzkripciója szükséges az óra megfelelő fényválaszához.

1. táblázat: A $\Delta wc-1$, $qa-wc-1$ konidizációs ritmusa eltér a kontroll törzsetől

		Period (h; mean $\pm$ s.e.m.)	Peak of conidiation (h; mean $\pm$ s.e.m.)
DD	<i>wc-1</i> ⁺	21.83 $\pm$ 0.17	22.28 $\pm$ 0.15 (CT)
	$\Delta wc-1$, $qa-wc-1$	21.44 $\pm$ 0.26	22.81 $\pm$ 0.32 (CT)
LD (12:12)	<i>wc-1</i> ⁺	24.3 $\pm$ 0.32	22.81 $\pm$ 0.31 (ZT)
	$\Delta wc-1$, $qa-wc-1$	24.06 $\pm$ 0.024	1.50 $\pm$ 0.59 (ZT)
LD (6:18)	<i>wc-1</i> ⁺	24.01 $\pm$ 0.32	18.7 $\pm$ 0.34 (ZT)
	$\Delta wc-1$, $qa-wc-1$	24.45 $\pm$ 0.13	21.84 $\pm$ 0.5 (ZT)
LD (1:23)	<i>wc-1</i> ⁺	23.62 $\pm$ 0.005	8.32 $\pm$ 0.20 (ZT)
	$\Delta wc-1$, $qa-wc-1$	24.07 $\pm$ 0.09	12.70 $\pm$ 0.27 (ZT)

A futtatósöveket a leoltást követően 2 napig világosban, majd a feltüntetett körülmények mellett további 4-5 napig inkubáltuk (n=5-14).

A *wc-1* gén expressziójának további elemzéséhez a *wc-1* RNS 5' szakaszát vizsgáltuk világosban nőtt *wt*-ú (*wc-1*⁺) kultúrák RNS preparátumain. Ehhez az 5'RLM-RACE (5' RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends) technikát alkalmaztuk. Három különböző 5' véget találtunk: a start kodontól legtávolabbi a -1222-es, a következő a -924-es, míg a harmadik az ORF-on belül, a +175-ös pozíciónál induló transzkripciónak felelt meg (13.C ábra). Szekvenálás és diagnosztikus PCR révén megállapítottuk, hogy a -866-os és -455-ös pozíció között egy intron helyezkedik el.

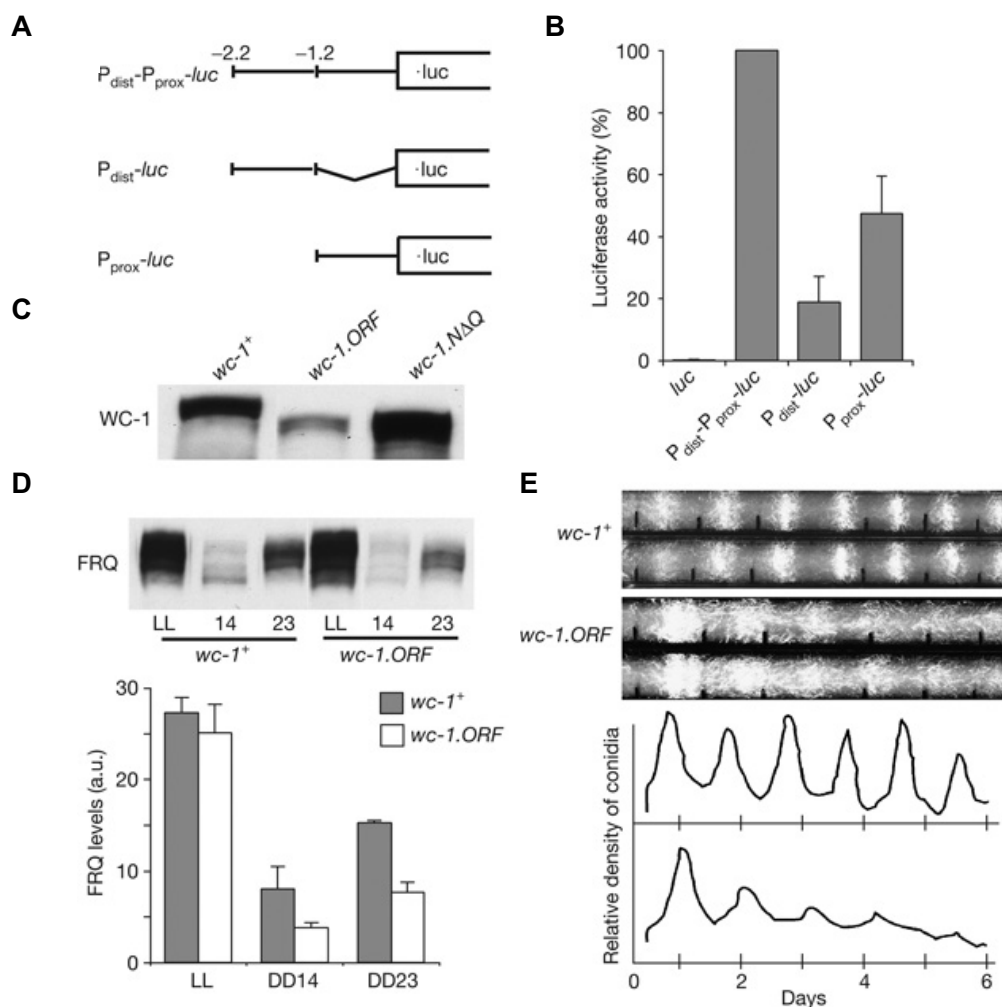


13. ábra: A *wc-1* transzkripció komplex szabályozása

A) A konidizációs ritmus fázisa függ a *wc-1* promóter működésétől. A jelzett törzsekkel leoltott futtató csöveket 1:23 órás LD-ciklusokban inkubáltuk (a rövid sárga szakasz a megvilágítás időszaka). Az átlagos konidium denzitás ($n=3$) az idő függvényében van feltüntetve. **B)** A fénypulzusra adott fázisválasz a *wc-1⁺* (fekete vonal) és a $\Delta wc-1, qa-wc-1$ (szaggatott szürke vonal) törzsben. A sötétben inkubált csöveket az adott időpontban 20 percre világosba tettük. A fáziseltolódást kontrollesövekben (ugyanazon törzzsel leoltott, állandó sötétben lévő csövek) mért fázishoz viszonyítva határoztuk meg, és a fénypulzus időpontjának függvényében ábrázoltuk. A diagram alatti fekete és szürke pöttyözött szakasz a szubjektív éjszaka és nappal időszakát jelöli. **(C)** A *wc-1* transzkripciója több helyen iniciálódhat. A *wc-1* gén sematikus ábráján a 5'RLM-RACE során azonosított 4 amplikon, és a megfelelő start helyekhez tartozó lehetséges promóter régiók vannak feltüntetve.

A putatív 5' végek előtt (azaz 5' irányban) elhelyezkedő *wc-1* génszakaszok promóter funkcióját luciferáz (luc) riportter segítségével vizsgáltuk. A *bd, his3-* törzs transzformálásához

használt konstrukciókban a luciferáz kódoló régiója elé építettük be a *wc-1* gén -2223 és -1 ($P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}\text{-luc}$), a -2223 és -1212 ($P_{\text{dist}}\text{-luc}$), valamint a -1179 és -1 ($P_{\text{prox}}\text{-luc}$) pozíciók közötti szakaszokat (14.A ábra). A riporter törzseket állandó világosban inkubáltuk, majd a teljes sejtextraktumok luciferáz aktivitását mértük (14.B ábra).



14. ábra: A *wc-1* gén különböző szakaszainak promóter aktivitása

A) A luciferáz riporter konstrukciók sematikus szerkezete. **B)** Az egyes génszakaszok promóter aktivitása. A feltüntetett törzsek folyékony kultúráit állandó világosban 25 °C-on inkubáltuk. A teljes sejtextraktumok relatív luciferáz aktivitását ábrázoltuk úgy, hogy a $P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}\text{-luc}$ -ot tartalmazó törzsben mérhető aktivitást tekintettük 100 %-nak ($n=5-8$). **C)** A *wc-1.ORF* törzsben egy, az aminoterminális részt nem tartalmazó fehérjeforma expresszálódik. A *wc-1.ORF* és $\Delta wc-1$, *qa-wc-1.ΔQ* (a 67-1167. aminosavat tartalmazó fehérjeformát expresszáló törzs) állandó világosban 25 °C-on nőttek standard médiumban, majd a $\Delta wc-1$, *qa-wc-1.ΔQ*-t kinasav-tartalmú médiumba oltottuk át 15 órára. A sejtextraktumok Western-blot analízise anti-WC-1 antitesttel történt. Reprezentatív blot. **D)** A FRQ szintjének összehasonlítása a *wc-1⁺* és *wc-1.ORF* törzsben. A folyékony kultúrák állandó világosban (LL) és az LD váltást követően 14, illetve 23 órán át sötétben nőttek. Felső ábrarész: Western blot analízis anti-FRQ antitesttel. Reprezentatív blot. Alsó ábrarész: A Western blot denzitometriás kvantifikálása ($n=3$). **E)** A *wc-1.ORF* törzs lecsengő konidizációs ritmust mutat. 2-2 reprezentatív futtató cső képe (felső ábrarész) és az átlagos konidizációs denzitás az idő függvényében (alsó ábrarész).

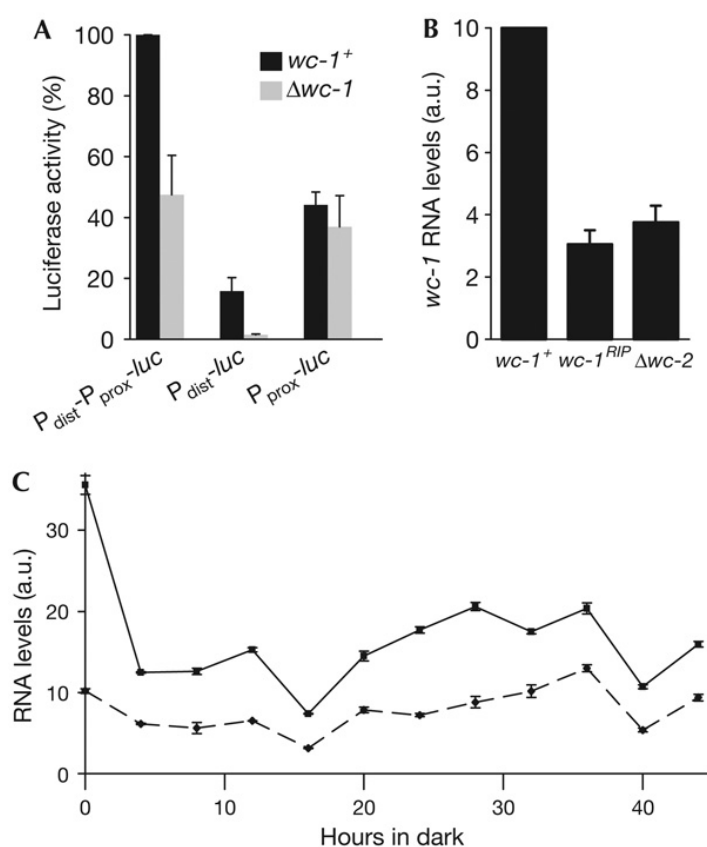
A $P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}\text{-}luc$ -ot tartalmazó törzs aktivitása mintegy 200-szorosa volt a kontroll törzsének (promóter nélküli, csak *luc* szakaszt tartalmazó konstrukcióval előállított *luc* elnevezésű törzs), míg a $P_{\text{dist}}\text{-}luc$ -ot tartalmazó törzs extraktumában 40-szeres, a $P_{\text{prox}}\text{-}luc$ -ot tartalmazó törzs extraktumában 100-szoros aktivitást mértünk. A $P_{\text{dist}}\text{-}luc$ esetében az 5'-UTR természetesen különbözik az endogén *wc-1* RNS, illetve a $P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}\text{-}luc$ -ban a disztális promóter által szabályozottan kifejeződő RNS 5'-UTR-jától, ezért a két külön konstrukcióhoz (P_{dist} és P_{prox}) tartozó aktivitások összege nem feltétlenül feleltethető meg az összetett promóter ($P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}$) mellett mért értéknek.

A +175-ös pozíciónál induló 5'RLM-RACE amplikon fiziológias relevanciájának vizsgálatára egy olyan $\Delta wc-1$, *bd* háttérű törzset (*wc-1*.ORF) hoztunk létre, amelyben a *his3* lókuszbba csak a *wc-1* ORF épült be. A WC-1 C-terminális régióját felismerő antitesttel egy, a teljes hosszúságú fehérjénél rövidebb fehérjeformát detektáltunk Western bloton (14.C ábra). Ennek elektroforetikus mobilitása gyakorlatilag megegyezett a glutaminban gazdag, N-terminális régiót (2. ábra) nem tartalmazó fehérjeformáéval, amelynek start kodonja a 67. aminosavnak (Met) megfelelő pozícióban van. A Western blot kalibrálása segítségével becsültük a *wt*-ű törzs blotján ebben a magasságban detektálható fehérjeforma mennyiségét, ami a teljes hosszúságú fehérje mintegy negyedének adódott (nem bemutatott adat). Mindez arra utal, hogy a *wc-1* gén ORF régióján belül található egy promóter (P_{int}), amely egy N-terminálisan rövidebb fehérjeforma expresszióját szabályozza. E fehérje fiziológias jelentősége egyelőre tisztázatlan. A *wc-1*.ORF törzsben állandó világosban fiziológias FRQ-szint detektálható, míg sötétben a FRQ szint alacsonyabb, mint a kontrollban (14.D ábra). Futtató csövön, állandó körülmények mellett a törzs konidizációs ritmusa lecsengő jellegű, a harmadik naptól elmosódottá válik (14.E ábra).

4.1.2.2. A *wc-1* promóterek regulációjának vizsgálata

A *wc-1* expressziója megvilágítás hatására gyorsan és jelentősen emelkedik (179), amit adaptáció követ, és állandó világosban a sötétben mértnél valamivel magasabban állandósul az RNS szint. A *wc-1* gén fényválaszát mind a WCC, mind az adaptációért nagy részben felelős VVD aktivitása befolyásolja. Felmerül a kérdés, hogy mi a helyzet állandó sötétben, akkor is befolyásolja-e a WCC a WC-1 expressziót. Ezt vizsgáltuk abban a *wc-1*-hiányos törzsben, amelyben a *wc-1* gén $P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}$ szakasza irányította a luciferáz átíródását ($\Delta wc-1$, $P_{\text{dist}}\text{-}P_{\text{prox}}\text{-}luc$). A vad típusú háttérhez képest mintegy 50 %-os aktivitást mértünk, ami arra utal, hogy a

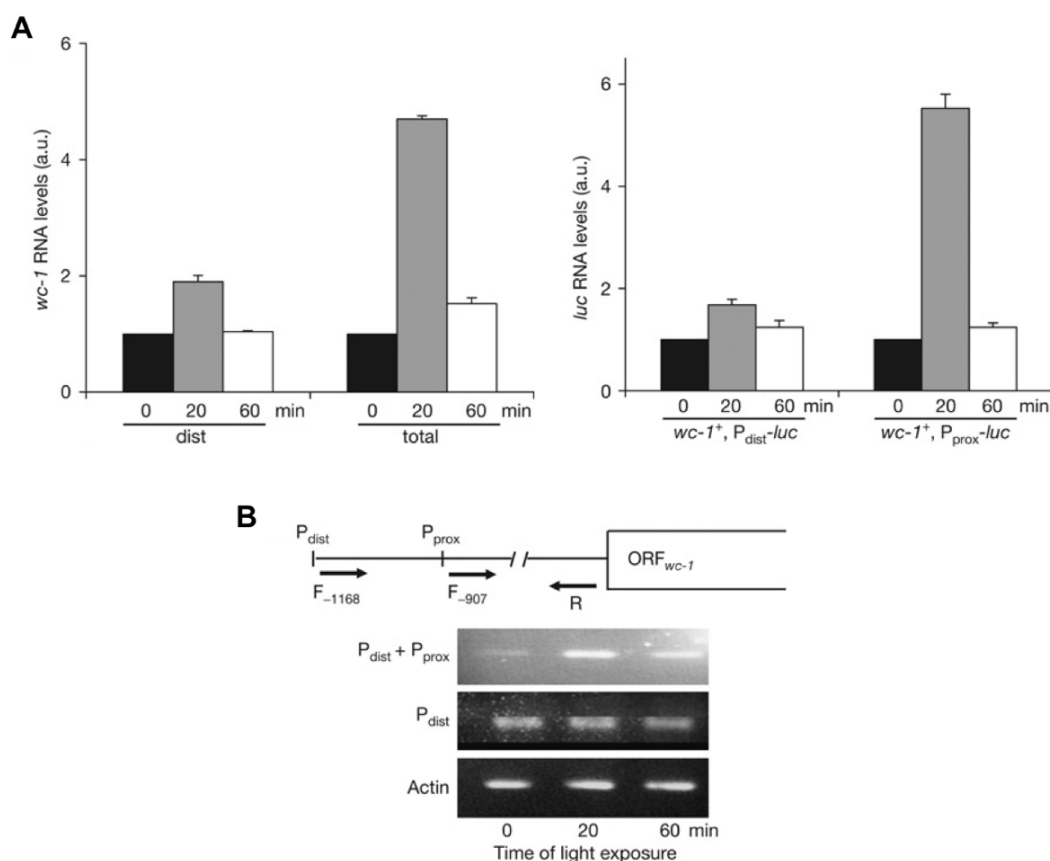
WCC sötétben is szerepet játszik saját kifejeződésének szabályozásában (15.A ábra). Ez összhangban volt azzal a megfigyeléssel, hogy a funkcionális WC-1-gyel nem rendelkező *wc-1^{RIP}*, illetve a WC-2 hiányában WC-1-et detektálható mennyiségben nem tartalmazó $\Delta wc-2$ törzsben is alacsony volt a *wc-1* RNS szintje sötétben (15.B ábra). Annak vizsgálatára, hogy a két promóter szakasz közül melyik működik WC-1-függő módon sötétben, a $\Delta wc-1$ törzset is transzformáltuk a P_{dist} -*luc* és P_{prox} -*luc* konstrukciókkal. Míg a proximális promótert tartalmazó törzsek aktivitása nem különbözött egymástól, a disztális promóter aktivitása WC-1 hiányában jelentősen alacsonyabb volt, mint vad típusú háttér esetén (15.A ábra). Ennek alapján a disztális promóter működése függ a WC-1 jelenlététől sötétben.



15. ábra: A *wc-1* expressziót sötétben is szabályozza a WCC

A) Különböző *wc-1* promóter szakaszok WC-1-függésének vizsgálata. A feltüntetett konstrukciókkal (l. előző ábra) transzformált *wc-1⁺* és $\Delta wc-1$ törzseket DD23-ban takarítottuk be, és a teljes sejtextraktumok luciferáz aktivitását mértük. A *wc-1⁺*, P_{dist} - P_{prox} -*luc* törzsben mérhető aktivitást tekintettük 100 %-nak (n=4). **B)** A *wc-1* expresszió vizsgálata *wc-1*-deficiens törzsekben. A folyékony kultúrákat DD24-ben takarítottuk be. Az RNS szintek kvantifikálása valós idejű PCR-rel történt (n=3). **C)** A P_{prox} és P_{dist} aktivitása állandó világosban és különböző DD időpontokban. A *wc-1⁺* folyékony kultúráját 24 órán át világosban inkubáltuk, majd (0 időpont) állandó sötétbe került a feltüntetett időtartamra. A teljes (fekete vonal) és a P_{dist} -re specifikus (szaggatott vonal) RNS mennyiségét valós idejű PCR-rel határoztuk meg.

A megfelelő génszakaszokra specifikus primerek és próba használatával meghatároztuk a teljes *wc-1* RNS mennyiségének és a disztális promóterhez tartozó transzkriptum szintjének alakulását két egymást követő cirkadián ciklus folyamán (15.C ábra). Egyik esetben sem tapasztaltunk cirkadián oszcillációt, ami összhangban volt korábbi irodalmi adatokkal (13). Míg azonban a P_{dist} -re specifikus RNS szintje nem különbözött világosban és sötétben, addig a teljes RNS mennyiség világosban mintegy kétszerese volt a sötétben detektált szintnek (0. időpont). Ez pedig arra utal, hogy döntően a proximális promóter lehet fényre érzékeny.



16. ábra: A fényérzékeny *wc-1* promóter szakasz azonosítása

A) A P_{dist} és P_{prox} szakaszok fényreakciójának vizsgálata. A *wc-1⁺* (bal ábrarész), illetve a *wc-1⁺* (*wt*, *bd*), P_{dist} -*luc* és *wc-1⁺*, P_{prox} -*luc* (jobb ábrarész) törzsek folyékony kultúráit a sötétbe történő áthelyezést követően 24 órával világítottuk meg a feltüntetett ideig, majd RNS-t preparáltunk, és azt valós idejű PCR-rel kvantifikáltuk. A DD kultúrákban (0 időpont) mért RNS mennyiségre normalizáltunk az ábrázolásnál. **B)** A P_{prox} promóter mutat fényérzékenységet. Felső ábrarész: A felhasznált primerek génszakaszokhoz való illeszkedését mutató sematikus ábra (F: forward primer, R: reverse primer). A számok a start kodontól való távolságot jelölik. Alsó ábrarész: az A) pontban ismertetett módon fényrel kezelt *wc-1⁺* kultúrából készült cDNS szolgáltat templákként a szemi-kvantitatív (23 ciklusból álló) PCR-hez. Az aktint kontrollként használtuk.

A következőkben az egyes promóterszakaszok fényválaszát vizsgáltuk. Ehhez a *wc-1⁺* törzsben a teljes és a disztális promóterre specifikus *wc-1* RNS szinteket határoztunk meg,

valamint mértük a $wc-I^+$ háttérű $P_{\text{dist}}\text{-}luc$ -ot és $P_{\text{prox}}\text{-}luc$ -ot tartalmazó törzsekben a luciferáz RNS mennyiségét (16.A ábra). Mindkét esetben ugyanarra a következtetésre jutottunk: míg a disztális promóter csak nagyon mérsékelt fényválaszt ad, addig a proximális promóter jelentős mértékben indukálható fénnel. Ezeket az eredményeinket szemikvantitatív PCR vizsgálattal is megerősítettük, melynek során egyrészt a disztális promóter által szabályozott régióra specifikus, másrészt a teljes $wc-I$ RNS mennyiséget reprezentáló termékeket amplifikáltunk (16.B ábra).

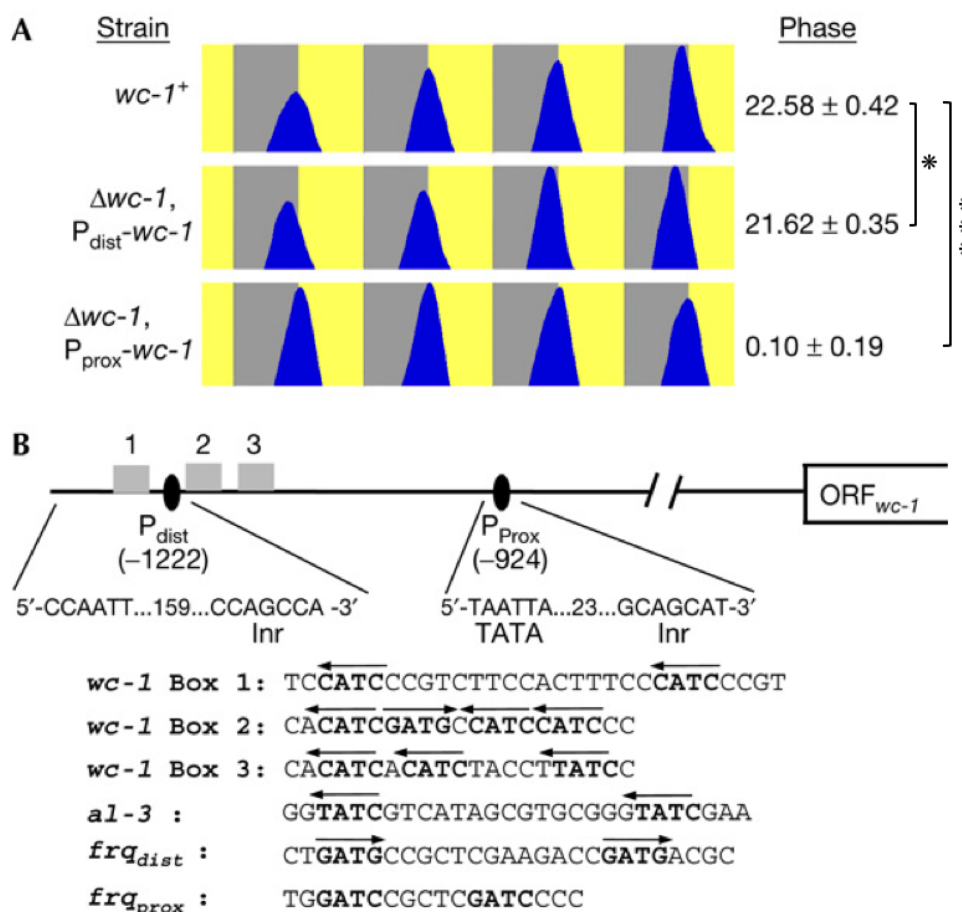
2. táblázat: A disztális és proximális promótert tartalmazó törzsek cirkadián működésének összehasonlítása a wt működésével

		period (hours $\pm$ SEM)	peak of conidiation (hours $\pm$ SEM)
DD	$wc-I^+$	21.83 $\pm$ 0.17	22.28 $\pm$ 0.15 (CT)
	$\Delta wc-I, P_{\text{dist}}\text{-}wc-I$	22.38 $\pm$ 0.42	21.07 $\pm$ 1.09 (CT)
	$\Delta wc-I, P_{\text{prox}}\text{-}wc-I$	24.84 $\pm$ 0.80	23.45 $\pm$ 1.12 (CT)
LD (12:12)	$wc-I^+$	24.3 $\pm$ 0.32	22.81 $\pm$ 0.31 (ZT)
	$\Delta wc-I, P_{\text{dist}}\text{-}wc-I$	23.96 $\pm$ 0.04	21.62 $\pm$ 0.35 (ZT)
	$\Delta wc-I, P_{\text{prox}}\text{-}wc-I$	23.95 $\pm$ 0.06	0.1 $\pm$ 0.19 (ZT)
LD (1:23)	$wc-I^+$	23.62 $\pm$ 0.005	8.32 $\pm$ 0.20 (ZT)
	$\Delta wc-I, P_{\text{dist}}\text{-}wc-I$	23.73 $\pm$ 0.26	8.51 $\pm$ 0.37 (ZT)
	$\Delta wc-I, P_{\text{prox}}\text{-}wc-I$	25.03 $\pm$ 0.63	15.42 $\pm$ 0.75 (ZT)

A futtatócsöveket a leoltást követően 2 napig világosban, majd a feltüntetett körülmények mellett további 4-5 napig inkubáltuk (n=3-5).

A disztális és proximális promóterek szabadon futó ritmusban betöltött szerepének tanulmányozására olyan törzseket hoztunk létre, amelyekben az endogén $wc-I$ gén deletált, viszont a $his3$ lókuszbba a $P_{\text{prox}}\text{-}wc-I$, illetve $P_{\text{dist}}\text{-}wc-I$ konstrukció épült be, azaz a WC-1 kifejeződését a megfelelő promóter szakaszok külön-külön szabályozzák. Mindkét törzsben kissé csökkent WC-1 szintet detektáltunk (12.C ábra). A törzsek konidizációs ritmust mutattak mind állandó sötétben, mind LD-ciklusokban. Míg a disztális promótert tartalmazó törzs periódushossza sötétben a vad típuséhoz hasonló volt, a proximális promóterrel rendelkező törzs hosszabb periódusú volt (2. táblázat). A konidizáció fázisában is a proximális promóterű törzs mutatott jelentősebb eltérést, LD 12:12 óra esetén 1,3 órás, míg LD 1:23 óra esetén több mint 7 órás késést detektáltunk a kontrollhoz képest (17.A ábra, 2. táblázat). A disztális promóterrel rendelkező törzsre ezzel szemben a kismértékű fázis előretolódás volt jellemző. Eredményeink

összességében arra mutatnak rá, hogy a fiziológiás fázis beállításához mindkét promóter működésére szükség van.



17. ábra: A *wc-1* gén összetett szabályozása és ennek szerepe a konidizációs ritmusban

A) Mindkét promóter működéséhez kötött a konidizációs fázis megfelelő beállítása. A jelzett törzsekkel leoltott futtató csöveket 12:12 órás LD ciklusokban inkubáltuk. A denzitometriás analízis eredménye látható (szürke téglalap: sötét időszak, sárga téglalap: világos időszak), a konidizációs csúcsok fázisát ZT skálán adtuk meg ($n = 6$). (*) $p < 0,05$; (***) $p < 0,005$. **B)** A WCC szerepe a proximális és disztális promóter régiók szabályozásában. Felső rész: a putatív CCAAT, TATA és iniciátor (Inr) szekvenciák *wc-1* génen belüli elhelyezkedésének sematikus ábrázolása. A szürke téglalapok (Box 1, 2, 3) a GATN típusú, lehetséges WCC-kötő szakaszok elhelyezkedését mutatják. Alsó ábrarész: a *wc-1* promóter (Box 1-3), a *frq* (11) és az *al-3* LRE (180) szekvencia összehasonlítása. A nyílak a GATN szekvenciák irányultságát jelölik.

4.1.2.3. Következtetések és továbbvezető megfigyelések

A fent ismertetett munka során a WC-1 kifejeződésének transzkripció szinten történő szabályozását elemeztük. Három, egymástól az 5' régióban különböző mRNS-t azonosítottunk, és megmutattuk, hogy az átírás kezdetétől 5' irányban elhelyezkedő génszakaszok promóterként működnek (17.B ábra). A P_{dist} működése sötétben a WCC aktivitásához kötött,

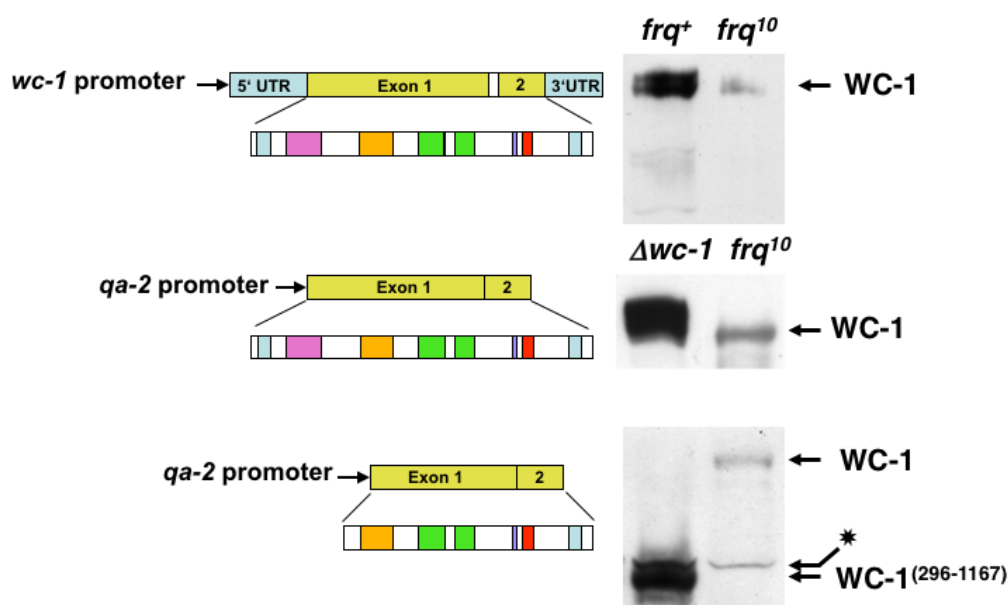
fényre azonban alig reagál. Ezzel szemben a P_{prox} által kontrollált transzkripció sötétben független a WCC jelenlététől, ugyanakkor fénnel hatékonyan indukálható. Mindkét transzkripció iniciációs hely közelében található vagy CCAAT box vagy TATA box, és azonosíthatók GATA típusú, ismétlődő szekvencia szakaszok is, amelyek a WCC kötőhelyeül szolgálhatnak (17.B ábra). A kódoló régió belül elhelyezkedő P_{ORF} -hoz kapcsolt konszenzus szabályozó elemeket sajnos nem sikerült azonosítani, és a promóter funkciója is tisztázatlan egyelőre. A P_{prox} biztosíthatja a WC-1 bazális szintjét sötétben, az e feletti, WCC-től függő átíródást pedig a P_{dist} irányíthatja. Ha fény éri a gombát, akkor viszont a P_{prox} megnövekedett aktivitása serkenti gyorsan és hatékonyan a *wc-1* transzkripciót.

Mi lehet a WC-1 expresszió ilyen komplex szabályozásának az értelme? A WC-1 szintnek kitüntetett jelentősége van, hiszen ez a WCC limitáló komponense, azaz szintje meghatározza az aktiválható pozitív faktor mennyiségét. Egyes transzkripciós faktorok jellegzetes tulajdonsága, hogy miután aktiváltak célgénjüket degradációs útra terelődnek, azaz minél aktívabban működnek, annál gyorsabb a bomlásuk (181-183). Az általunk jellemzett pozitív visszacsatolás sötétben a P_{dist} -re, fény hatására a P_{prox} -ra, biztosíthatja a WC-1 szint stabilitását a WCC megnövekedett aktivitása esetén.

Fontos szempont az is, hogy a WCC szintjének a FRQ mennyiségéhez kell illeszkednie, hiszen amikor nagy aktivitással működik a WCC, sok FRQ keletkezik, és a magas FRQ szintről indulva csak ezzel arányos WCC mennyiség lehet képes időben felfüggeszteni a negatív visszacsatolást, és biztosítani az állandó periódusú óraműködést. Ezt az illesztést segítheti a WCC mennyiségének FRQ általi szabályozása is. Ennek részletes analizisével foglalkozott egy olyan tanulmányunk (17), amelyben társszerzőként vettem részt, ezért annak lényeges felismeréseit röviden foglalom össze, és az általam végzett kísérletes munkák közül csak azt mutatom be ábrán, ami az előző tanulmány témájához szorosabban kapcsolódik.

A kísérletes munka kezdetekor már más munkacsoportok korábbi megfigyelései alapján valószínűsíthető volt, hogy a FRQ poszttranszkripciós szinten serkenti a WC-1 expressziót (34, 178). Annak vizsgálatára, hogy ez a szabályozás a transláció szintjén valósul-e meg, ami gyakran az RNS 5' és 3' UTR-jéhez köthető (184), olyan törzseket hoztunk létre, amelyekben ezek a régiók hiányoznak, ugyanis a *wc-1* átíródását a kinasavval indukálható *qa2*-promóter irányítja, és a promótert közvetlenül követi az intront nem tartalmazó kódoló régió (18. ábra). A transzformáláshoz használt egyik konstrukcióban a teljes kódoló szakasz benne volt, míg a másik egy N-terminálisan rövidített, a glutaminban és metioninban gazdag régiót nem tartalmazó fehérjeforma információját hordozta (2. ábra). Ez utóbbi régió számos potenciális

start kodont tartalmaz, ezért merült fel, hogy a transzláció szabályozásában esetleg szerepe lehet. Kínasavval történő indukciót követően a $\Delta wc-1$ háttérű törzsben jelentős, a kontrolléhoz (frq^+) hasonló mértékű expresszió volt detektálható, míg a frq -hiányos törzsben (frq^{10}) nagyon alacsony, illetve a mi antitestünkkel nem detektálható mennyiségben voltak jelen a fehérjeformák (18. ábra). Ezek szerint, amennyiben a transzláció szabályozásában esetlegesen résztvevő RNS régiókat (3' és 5' UTR, N-terminális régiónak megfelelő szakasz) elimináljuk a $wc-1$ génből, akkor is pozitívan hat az expressziójára a FRQ. Érdekes még megjegyezni, hogy a frq^{10} háttérű törzsben magasabb ($2,3 \pm 0,4$ -szerez, $n=4$) volt a $wc-1$ RNS mennyisége, mint a frq^+ -ban. Bár azt nem tudjuk kizárni, hogy az RNS 3' és 5' UTR-t nem tartalmazó szakasza regulációs tulajdonsággal rendelkezik, adataink leginkább arra utalnak, hogy a FRQ-től függő pozitív visszacsatolás poszttranszlációs szinten, és nem a transzkripció vagy transzláció szintjén valósul meg.



18. ábra: $wc-1$ génrégiók szerepe a FRQ WC-1 expressziót fokozó hatásában

Bal oldali rész: a $wc-1$ gén (felül), valamint a $\Delta wc-1$ és frq^{10} transzformálásához használt konstrukciók (középen és alul) szerkezete. A doméneket jelző színek megfelelnek a 3. ábrán használt színjelöléseknek. Jobb oldali rész: a feltüntetett törzsekben expresszálódó WC-1 formák Western blot analízise. A csillag egy aspecifikus keresztreakciót jelöl.

A tanulmány további eredményei arra mutattak rá, hogy a FRQ térben és időben elkülönülten vesz részt a negatív, illetve a pozitív visszacsatolásban. Míg a negatív visszacsatolásban a frissen szintetizált, kevésbé foszforilált nukleáris FRQ az aktív, addig a

pozitív visszacsatolásban a citoplazmatikus, foszforilált FRQ játszik szerepet. Azt is megmutattuk, hogy a FRQ PEST-2-es régiójában (2. ábra) található szerinek foszforilációja alapvető a WC-1 expressziót fokozó hatás szempontjából, ugyanakkor nem szükséges a negatív visszacsatoláshoz. Eredményeink alapján egy olyan modell körvonalazódik, ami szerint a FRQ keletkezését követően nukleáris represszorból fokozatosan citoplazmatikus aktivátorrá válik. Citoplazmatikus aktivátor funkciója révén elősegíti saját transzkripciós regulátorának inaktív, azaz foszforilált formában való felhalmozódását, ami a következő cirkadián ciklus folyamán defoszforilálódhat és kifejtheti transzkripciót serkentő hatását (11. ábra).

4.1.3. A *Neurospora crassa* óra fényválaszának molekuláris elemzése

(6. közlemény)

A cirkadián órák kitüntetett bemenete a környezeti fényinformációt közvetítő rendszer. Ugyanakkor tudjuk, hogy az endogén időmérő rendszer igen különböző fényintenzitásnak lehet kitéve még hasonló élőhely esetében is; például egy fatörzs árnyékában növe gombafonalat olyan intenzitású fény ér napközben, mint egy másik gombatelepet a fatörzs fénynek kitett felszínén egy teliholdas éjszakán. Ezenkívül a fényintenzitás erőteljesen függ az időjárástól is. Nyilvánvalóan az órának minden fényjelet a napszagnak megfelelően kell interpretálnia, amiből arra következtethetünk, hogy az óra valószínűleg sokkal inkább a fényintenzitás időbeli változásait értelmezi és nem az abszolút fényintenzitások jelentik számára az irányadó információt. Hogy a fényintenzitások megkülönböztetése milyen molekuláris történésekhez köthető, az a vizsgálataink kezdetekor ismeretlen volt. Ismert volt viszont, ahogy a bevezetőben már említettem, hogy a *Neurospora*-nak két kék fényre reagáló receptora van, az egyik a mindig jelenlévő WCC, a másik a csak fény hatására kifejeződő VVD.

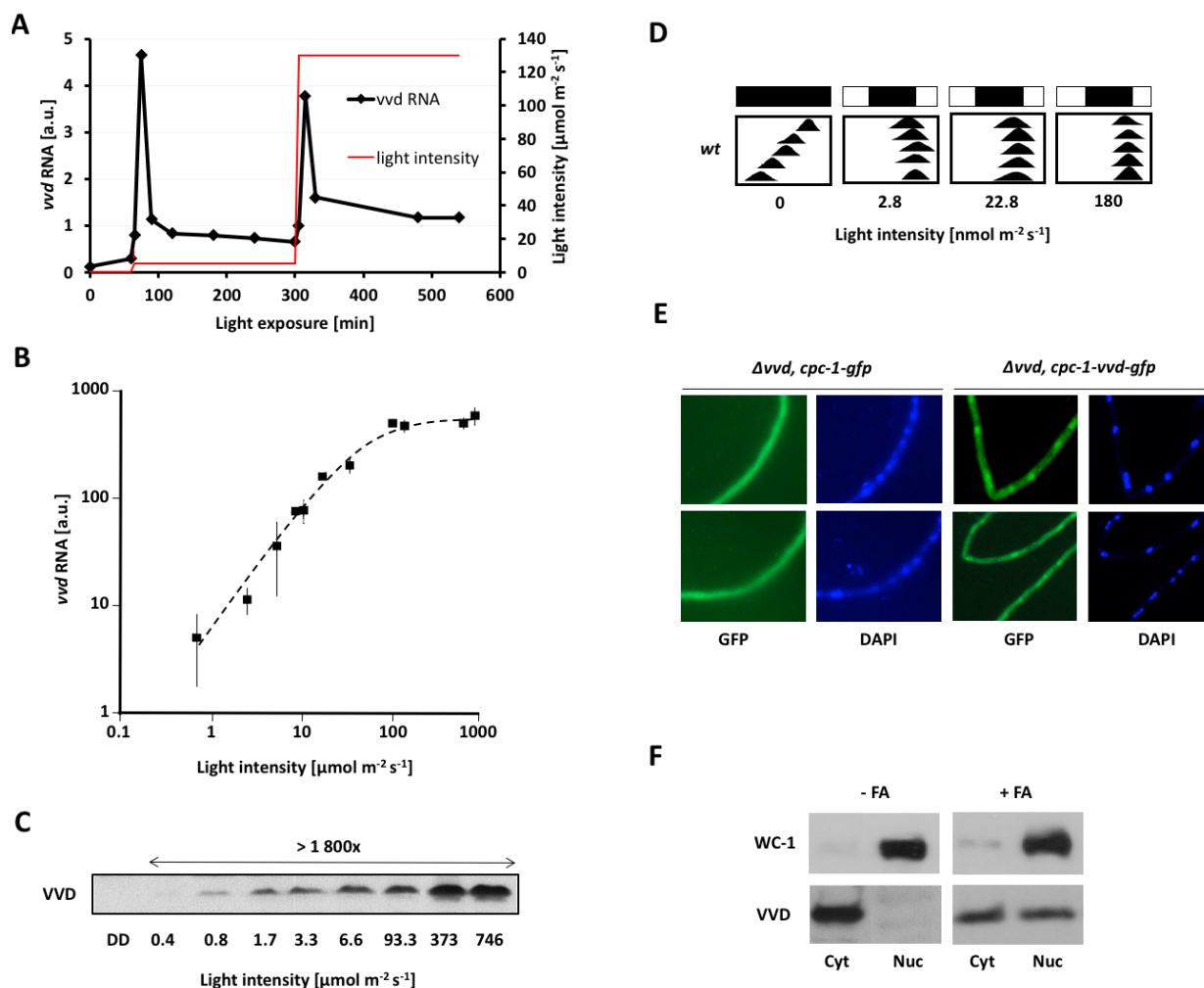
A VVD-et a fényadaptáció alapvető komponenseként írták le. Fényérzékelésének feltétele a LOV doménen belül egy konzervált cisztein oldallánc és a flavin közötti stabil kovalens kötés létrejötte, ezt nevezzük fotoadduktum képzésnek (185). Kristályszerkezeti vizsgálatok szerint a kovalens kapcsolat megakadályozza, hogy a LOV domén és a fehérje másik részén található hélix egymással kölcsönhatásba lépjen, aminek révén a LOV domén más interakciók számára szabaddá válhat. Amennyiben kialakult az úgynevezett fénykonformáció, a VVD további fényválaszra nem képes, csak ha felbomlik a fotoadduktum, ami igen lassú folyamat ($t_{1/2} \approx 4,5$ óra) (185, 186). Ismert volt az is, hogy a VVD fény jelenlétében dimert képez, bár ennek jelentősége nem tisztázott (187).

Funkcionális szempontból a VVD-et a FRQ-hez hasonlóan az óra negatív komponensének tekintjük, ami LD-ciklusok mellett hozzájárul az óraműködés szabályozásához. VVD hiányában a konidizációs ritmus fázisa néhány órás késést mutat, és elmarad vagy csökken a fényadaptáció, azaz a fény hatására indukálódó transzkripció növekedés idővel nem mérséklődik (35). Mindezek alapján az a feltételezés vált az irodalomban elfogadottá, hogy a fény hatására keletkező VVD valamilyen módon gátolja a WCC fényreceptor funkcióját, de a mechanizmussal kapcsolatban semmilyen adat nem állt rendelkezésre.

A következőkben bemutatásra kerülő tanulmány célja elsősorban a VVD fényválaszt szabályozó hatásának molekuláris elemzése és az óraműködéssel kapcsolatos funkciójának jobb megismerése volt. Feltételeztük, hogy a VVD és a WCC kölcsönhatása szükséges ahhoz, hogy megfelelően ütemezett óraműködés jöjjön létre akár igen különböző intenzitású környezeti fényviszonyok mellett is.

4.1.3.1. A VVD fényválaszt befolyásoló szerepének és celluláris lokalizációjának vizsgálata

A *vvd* a fényre nagyon gyorsan válaszoló gének közé tartozik. Kísérleteinkben elsőként azt vizsgáltuk, hogy fényindukciója érzékeny-e fényintenzitás változásokra. Ehhez először a sötétben növekvő micéliumokat egészen alacsony intenzitású fénnel világítottuk meg 4 órán keresztül, majd emeltük a fényintenzitást sokszorosára, és közben újabb mintákat vettünk. A vártan megfelelően sötétben gyakorlatilag nem termelődött *vvd* RNS, majd a kezdeti gyors fényindukciót követően szintén gyors adaptáció volt tapasztalható, és kb. egy óra elteltével az RNS szint stabilizálódott (19.A ábra). A fényintenzitás emelésekor az előzőhöz hasonló kinetikájú választ láttunk, de az adaptációt követően magasabb szinten stabilizálódott az expresszió. Ez megerősítette azokat a korábbi eredményeket, amelyek szerint a fényadaptációt követően a fényintenzitás emelésére képes válaszolni a gomba fényérzékelő rendszere (188). Tovább vizsgáltuk az összefüggést a *vvd* expresszió és a fényintenzitás között, és azt tapasztaltuk, hogy a fényintenzitás változást követően beálló stabil expresszió mértéke mind RNS, mind fehérje szinten mintegy két nagyságrendnyi fényintenzitás különbséget volt képes tükrözni (19.B,C ábra), azaz a VVD szintek igen széles intenzitástartományban képesek érzékenyen reagálni a fényerősség változására. Ebből a szempontból a *vvd* kivételesnek bizonyult, mert a fényre szintén gyorsan válaszoló *frq*, *al-2* és *wc-1* gének esetében sokkal gyorsabb telítődés volt megfigyelhető (20. ábra).



19. ábra: A VVD expresszió fényfüggésének és a fehérje sejtben belüli lokalizációjának vizsgálata

A) A *vvd* transzkripció fotoadaptációja és reaktivációja. 24 órán át sötétben inkubált *wt* (*bd*) micéliumokat 4 órán keresztül $5 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ intenzitású fénnel világítottunk meg, majd további 4 órára az intenzitást $130 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ -ra emeltük. A *vvd* RNS aktinhoz viszonyított mennyiségét határoztuk meg a feltüntetett időpontokban.

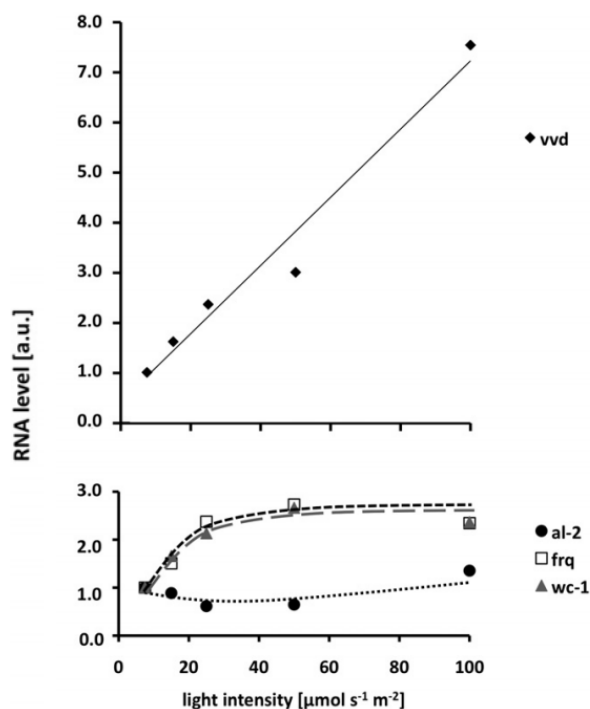
B) Fotoadaptált állapotban a *vvd* RNS mennyisége arányos a fényintenzitással. A micéliumok a feltüntetett fényintenzitás mellett nőttek 48 órán keresztül, a *vvd* RNS kvantifikálása az előbbieken ismertetett módon történt 6-6 mintából, két független kísérlet során (SD).

C) A VVD fehérje mennyisége függ a fényintenzitástól. A B) pont szerint inkubált minták fehérjelizátumait anti-VVD antitesttel elemeztük Western bloton. Reprezentatív blot ($n=3$).

D) A konidizációs ritmus elemzése alacsony fényintenzitású LD-ciklusokban. A *wt* (*bd*) gombával leoltot futtató csöveket 13:13 órás LD ciklusokban inkubáltuk a feltüntetett fényintenzitásokat alkalmazva. A konídiumok időbeli elhelyezkedését denzitometriásan elemeztük, és az egymást követő ciklusokat egymás alatt ábrázoltuk. A világos és sötét időszakokat fehér és fekete szakaszok jelölik. Reprezentatív csövek eredményei ($n \geq 9$).

E) VVD-GFP sejtben belüli lokalizációja. A *Δvvd*, *cpc1-vvd-gfp* és a megfelelő kontroll törzs micéliumainak fluoreszcens mikroszkópos képe. A DAPI festés a magokat jelöli.

F) Formaldehid (FA) fixálást követően a VVD a magfrakcióban detektálható. A világosban növekvő *wt* micéliumokat 1% formaldehiddel inkubáltuk 15 percig a betakarítást megelőzően (jobb panel). A szubcelluláris frakcionálást követően Western blot analízis történt anti-VVD és anti-WC-1 antitesttel.



20. ábra: A *vvd* és más fénnel indukálható gének (*al-2*, *frq* és *wc-1*) expressziójának függése a fényintenzitástól

A folyékony kultúrák 48 órán át inkubálódtak az adott fényintenzitás mellett. RNS preparálást követően, cDNS-t írtunk és valós idejű PCR alapján történt a kvantifikáció. A legalacsonyabb fényintenzitás mellett mért értéket tekintettük 1-nek. Két független kísérlet eredményeinek átlagértékeit ábrázoltuk.

A rendelkezésünkre álló módszerekkel $0,8 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ -nál alacsonyabb fényintenzitás mellett sem RNS, sem fehérje szinten nem tudtuk detektálni a VVD-et, ami természetesen nem zárja ki, hogy ilyen körülmények között is kis mennyiségben jelen van. Feltettük ezért a kérdést, hogy vajon ilyen egészen alacsony fényintenzitásokra reagál-e még a *Neurospora* cirkadián órája, azaz érzékeli-e a fényjelet. A kérdés megválaszolásához futtató csövön vizsgáltuk a konidizációs ritmust LD-ciklusok (13:13 óra) mellett, különböző fényintenzitások alkalmazásával. Jól látható a 19.D ábrán, hogy még $2,8 \text{ nmol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ fényintenzitás mellett (ez volt a legalacsonyabb intenzitás, amit stabilan biztosítani tudtunk) is kialakult az LD-ciklusnak megfelelő 26 órás periódushosszú ritmus, azaz az óra működését irányító fotoreceptor ilyen alacsony fényerősség érzékelésére is képes. Az eddig leírtak alapján arra következtethetünk, hogy a *Neurospora crassa* fotoreceptor rendszere 5 nagyságrendnyi fényintenzitás tartományban is képes a fényerősség megkülönböztetésére.

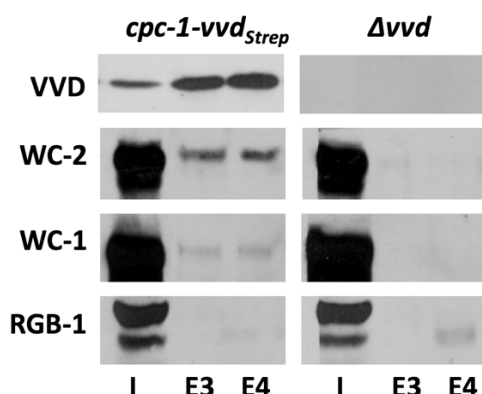
Amennyiben feltételezzük, hogy a VVD közvetlen interakció révén gátolja a WCC-et, azonos sejtkompartmentben kell lennie a két fotoreceptornek. Az régóta ismert volt, hogy az

aktív WCC a sejtmagban található, a VVD-et viszont szubcelluláris frakcionálást követően a citoplazma frakcióban találták (189). A VVD sejten belüli lokalizációjának mikroszkópos vizsgálatához egy olyan Δvvd háttérű törzset hoztunk létre, amelyben a konstitutívan aktív *cpc-I* promóter vezérli egy VVD-GFP fúziós fehérje kifejeződését. Míg a Δvvd -nek a magas karotin tartalom miatt erős narancsos színe van, a VVD-GFP-t expresszáló törzs a *wt*-hoz hasonló színezetet mutatott. Ezen kívül a konidizációs fázis is a *wt*-nak megfelelő volt, azaz a fúziós fehérje pótolta a VVD funkcióját a Δvvd háttér mellett. Fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálva a micéliumokat megállapítottuk, hogy a VVD-GFP mind a citoplazmában, mind a magban megjelent, de erősebb volt a magi festődés, mint a citoszolikus (19.E ábra). Mivel a GFP önmagában teljesen homogén eloszlást mutatott, arra következtethetünk, hogy a VVD jelenléte segíti elő a fúziós fehérje magban való dúsulását. Tekintettel arra, hogy ez az eredmény ellentmondott az irodalmi adatoknak (189), tovább vizsgáldtunk. Arra gondoltunk, hogy mivel a VVD egy kisméretű fehérje (21 kDa), elképzelhető, hogy a frakcionálási eljárás során kikerül a magból, és ezért nem sikerült korábban a magfrakcióban detektálni. Ebből kiindulva a micéliumok egy részét a betakarítás előtt 15 percig 1 %-os formaldehiddel kezeltük, hogy a fehérjék keresztkötések kialakulása révén nagyobb komplexeket képezve a "helyükön" maradjanak (19.F ábra). Míg a kezeletlen micéliumok esetében csak a citoszolban volt VVD kimutatható, a formaldehiddel kezelt minták magfrakciójában is jelentős mennyiségben tudunk VVD-et detektálni, ugyanakkor a citoplazmában csökkent a szintje. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy VVD *in vivo* jelen van a magban is, azaz ott interakcióba léphet a WCC-szel.

4.1.3.2. A VVD gátló hatása a WCC dimerizációjára

Irodalmi adatok szerint a VVD fény hatására dinamikus szerkezetű dimert képez (187). Feltételeztük, hogy a LOV domének révén hasonló dimerizáció létrejöhet a WC-1 és a VVD között is, ami megakadályozhatja a WCC fény jelenlétében jellemző homodimerizációját és ezzel aktivációját. Minden próbálkozás ellenére sem sikerült koimmunoprecipitációval kimutatnunk kölcsönhatást, se a WCC komponensei, se a VVD elleni antitestet használva, ami arra utal, hogy nem alakul ki stabil komplex a két fényreceptor között. A kérdés további vizsgálatához egy olyan Δvvd háttérű törzset hoztunk létre, ami egy Strep-tag-gel (8 aminosav tartalmú jelölés) rendelkező VVD fúziós fehérjét expresszál. A VVD_{Strep} fehérjét streptavidin analóggal, Streptactin-nal fedett gyöngyökkel tisztítottuk, aminek során kis mennyiségben, de specifikusan megjelent az eluátumban a VVD-del együtt a WCC mindkét komponense (21.

ábra), míg az RGB-1 fehérje, ami szintén jelentős mennyiségben volt kimutatható a fehérjeextraktumban (input), nem volt detektálható az eluátumban.



21. ábra: A VVD kölcsönhatása a WCC-szel

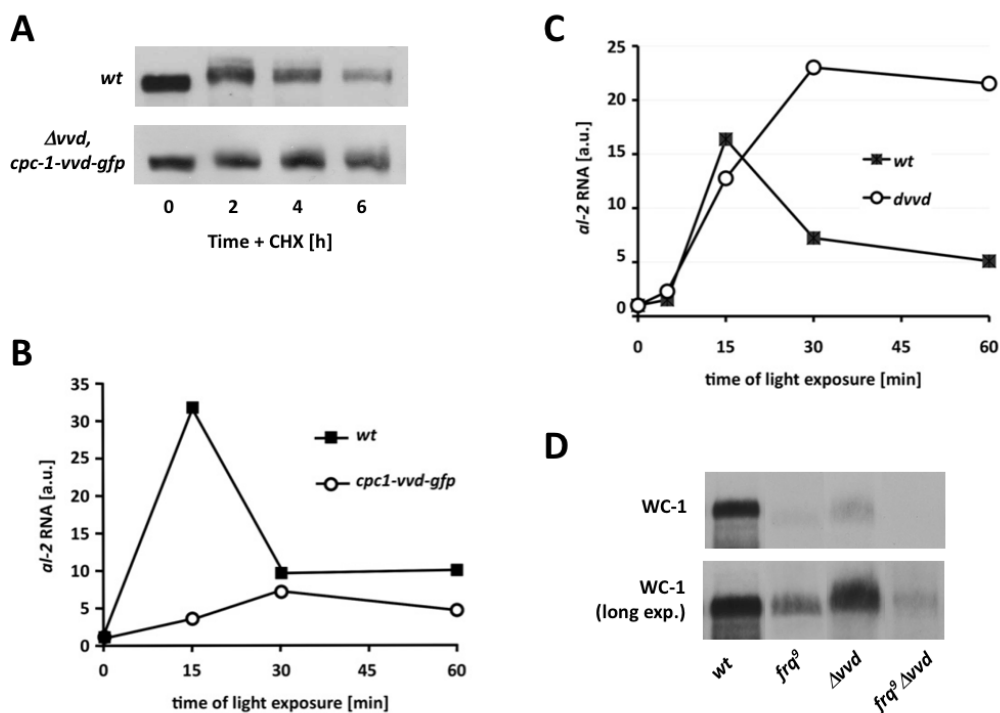
A Δvvd , *cpc-1-vvd-Strep* törzs teljes fehérje extraktumát Strep-Tactin oszlophoz adtuk, majd mosást követően desthiobiotin tartalmú pufferrel történt az elúció. A 3. és 4. elúciós frakciók (E3 és E4) Western blot analízise történt a feltüntetett antitestekkel. I= input

A VVD és a WC-1 közötti, valószínűleg gyenge és átmeneti kölcsönhatás lehetőségét a munkacsoport más tagjai élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával vizsgálták tovább. Ennek során sikerült kimutatni, hogy a két fehérje LOV doménje fény jelenlétében egymással kapcsolatba léphet, míg sötétben a domének nem kerülnek kölcsönhatásba (ábrán nem bemutatott adat).

A következő kérdésünk az volt, hogy a WCC fény hatására bekövetkező dimerizációját képes-e gátolni a VVD és a WC-1 LOV doménje közötti kölcsönhatás. A magextraktumokban az aktív, DNS-hez kötődő WCC-et radioaktívan jelzett oligonukleotiddal jelöltük, aminek szekvenciája a *frq* promóter WCC-kötő elemének felelt meg. EMSA segítségével megkülönböztethető az alacsonyabb mobilitású, fényhatásra létrejövő WCC dimer, ugyanis az a gélben lassabban vándorol, mint a monomer. Amennyiben fényben inkubált magextraktumhoz a VVD megvilágított rekombináns változatát ($\text{His}_6\text{-VVD}_{36}$) adtuk, döntően a sötét állapotra jellemző monomer WCC forma jelent meg az autoradiográfiás képen (ábrán nem bemutatott adat). Ez az eredmény arra utal, hogy a $\text{His}_6\text{-VVD}_{36}$ képes a fény által aktivált WCC-et semlegesíteni, azaz a sötét formává alakítani. Ezután egy hasonló minta sötétbe került, és anti-His antitestet adtunk hozzá, amiről feltételeztük, hogy oligomerizálja és így neutralizálja a VVD származékot. Valóban, az EMSA-n elsősorban WCC dimer volt detektálható, annak ellenére, hogy nem történt újabb fényexpozíció (ábrán nem bemutatott adat).

Ahhoz, hogy a WCC széles tartományban képes legyen fényintenzitások megkülönböztetésére, egy frakciónak mindig sötét konformációban kell lennie. A kérdés alaposabb tanulmányozásához sötétben inkubált micéliumokat különböző intenzitású fénnel

világítottunk meg, és a WCC dimer kialakulásának kinetikáját EMSA segítségével vizsgáltuk. Míg a WCC aktivációja viszonylag gyorsan végbe ment (pl. közepesen alacsony fényintenzitás mellett 20-30 percet vett igénybe), a dimer féléletideje sötétbe helyezést követően kb. 4 óra volt (ábrán nem bemutatott adat). A két folyamat sebességét figyelembe véve feltételezhetjük, hogy míg erős, tartós megvilágításnál a WCC nagyon kis része van sötét konformációban, addig közepes fényintenzitásnál 10 % feletti lehet ez az arány, alacsony, derengő fény mellett pedig meghaladhatja a 30 %-ot. Ezek az arányok lehetővé teszik, hogy mérsékelt erő fényintenzitás mellett a rendszer további intenzitásváltozásokra érzékenyen tudjon reagálni. Eddig bemutatott eredményeink pedig összességében arra utalnak, hogy ennek a válaszképes WCC frakciónak a fenntartásában alapvető szerepe van a VVD-del kialakított kölcsönhatásnak.



22. ábra: A VVD WCC-et gátló és egyben stabilizáló hatása

A) A VVD-et tartalmazó fúziós fehérjét konstitutívan kifejező törzsben (Δvvd , *cpc1-vvd-gfp*) fény jelenlétében stabilabb a WC-1, mint a *wt*-ban. Sötétben növekvő micéliumokat CHX-del (10 μ g/ml) 30 percig inkubáltunk, majd a feltüntetett időtartamra világosba helyeztünk. A fehérjelizátumok Western blot analízise anti-WC-1 antitesttel történt. **B)** A sötétben is kifejeződő VVD-GFP erőteljesen gátolja az *al-2* fényindukcióját. A sötétben növeő folyékony kultúrák a megfelelő időszakra világosba kerültek, majd betakarítottuk őket és RNS-t preparáltunk. Az *al-2* RNS szintek kvantifikálása valós idejű PCR-rel történt. Reprezentatív kísérlet eredményei (n=4). **C)** Erőteljes és nem adaptálódó *al-2* transzkripció jellemző a Δvvd törzsben. A feltüntetett törzsekkel a kísérlet a B) pontban leírtak szerint zajlott. **D)** A FRQ és a VVD stabilizáló hatása a WC-1-re. A megjelölt, világosban növeő kultúrákból készült fehérjelizátumok WC-1 szintjeit Western bloton vizsgáltuk. long exp. = hosszú expozíció; reprezentatív blot (n=3).

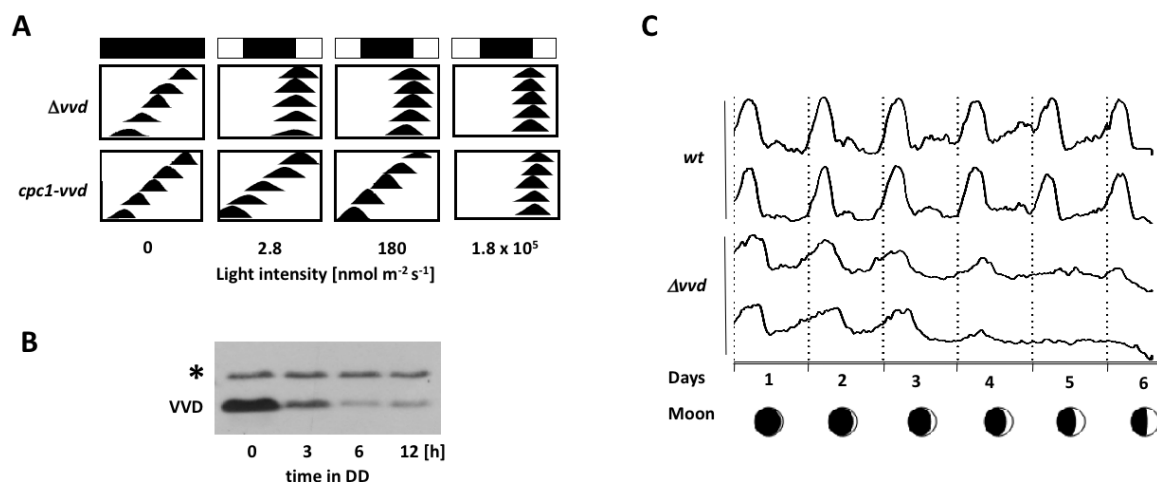
A DNS-hez kötődő, aktivált WCC gyorsan bomlik (190). Ebből az következik, hogy amennyiben a VVD gátolja a WCC aktivitását, várható, hogy annak stabilitását is befolyásolja. Ha sötétben növekvő micéliumokat az új szintézist gátló CHX-del kezelünk, majd fényre helyezünk, a WC-1 szintje viszonylag gyorsan csökken (22.A ábra). Ilyen körülmények között VVD nincs jelen a rendszerben, hiszen annak szintézise csak a fényhatást követően indulna el, de a szintézist a CHX gátolja. Amennyiben ugyanezt a kísérletet a VVD-GFP fehérjét konstitutívan expresszáló Δvvd , $cpc1-vvd-gfp$ törzsszel végeztük, amelyben már a CHX kezelés előtt jelen volt a fehérje, a kezelést követően 6 órával is jelentős mennyiségben lehetett WC-1-et detektálni, ami arra utal, hogy a sötétben szintetizált VVD származék stabilizálta a WCC-et. Ezzel párhuzamosan azt is kimutattuk, hogy a fényindukció időpontjában jelen lévő VVD-GFP hatékonyan gátolja a fény által indukált *al-2* transzkripciót (22.B ábra), ugyanakkor a VVD hiányos törzsben a fényválasz elsősorban az adaptációs fázisban (amikor már megjelenik a VVD a *wt*-ban) különbözik a *wt*-ú törzsben tapasztalttól (22.C).

A WCC szintje és aktivitása, ahogy azt már korábban említettem, nem csupán a VVD-től függ. Poszttranszkripció szinten a FRQ gátolja és stabilizálja a WCC-et (190, 191), és ahogy azt előző munkánkban kimutattuk, a WCC is pozitívan hat a WC-1 kifejeződésére (192). A FRQ és a VVD WC-1-et, és így magát a WCC-et stabilizáló hatásának elemzéséhez összehasonlítottuk a WC-1 szinteket különböző mutáns törzsekben (22.D ábra). Ahogy az korábbról már ismert volt, mind a működő FRQ fehérjét nem expresszáló *frq*⁹-es törzsben, mind a Δvvd törzsben kevesebb WC-1 mutatható ki, mint a *wt*-ban. Ezután a két törzset kereszteztük, létrehozva a *frq*⁹, Δvvd törzset, amiben még alacsonyabb volt a WC-1 expresszió. Ez arra utal, hogy a FRQ és a VVD egymástól függetlenül vesz részt a WCC stabilizálásában.

4.1.3.3. A nap folyamán szintetizálódó VVD elnyomhatja az éjszakai fényjelek ritmust zavaró hatását

Eddigi eredményeink szerint a keletkező VVD mennyisége egy bizonyos tartományban arányos a fényintenzitás erősségével, és azt is láttuk, hogy a VVD hatékonyan gátolni képes a WCC fény általi aktivációját. Amennyiben a VVD gátló hatása arányos a mennyiségével, a VVD szint egy molekuláris memóriaként szolgálhat a megelőző fényperiódusra vonatkozóan. Ebben az esetben azt várhatjuk, hogy a VVD "overexpressziója" esetén az órarendszer bizonyos fényintenzitást negligálhat, és ilyenkor a periódushossz nem alakul az LD ciklusnak megfelelően. Ezt úgy vizsgáltuk, hogy a Δvvd és a Δvvd , $cpc1-vvd-gfp$ törzs konidizációs ritmusát összehasonlítottuk különböző fényintenzitású, de mindig 26 óra periódusú LD

ciklusokban (23.A ábra). Míg a VVD-et nem expresszáló törzs még egészen alacsony fényintenzitásra is érzékeny volt, addig a VVD-GFP-t fénytől függetlenül, viszonylag nagy mennyiségben kifejező törzs csak magasabb fényintenzitás mellett vette fel az endogén periódustól jelentősen különböző 26 órás periódushosszt, alacsonyabb fényintenzitások esetén szabadon futó periódussal hozta a konídiumokat, azaz úgy viselkedett, mintha állandó sötétben lenne.

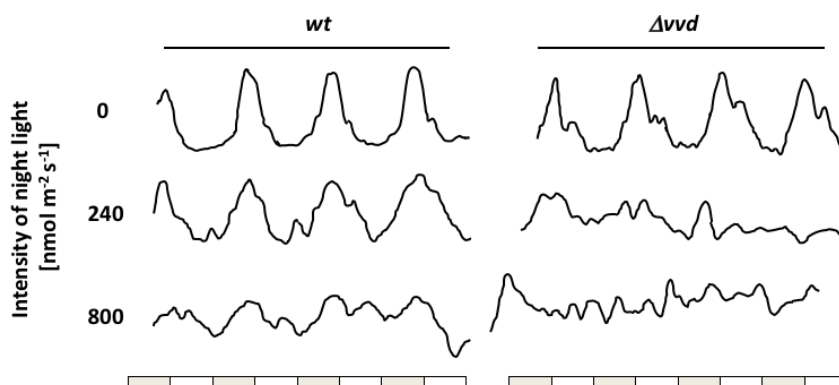


23. ábra: A VVD szerepe a *Neurospora* óra fényérzékelésében

A) Állandó magas VVD expresszió hatására az óra fényérzékenysége csökken. A konidizációs ritmus denzitometriás elemzése különböző intenzitású fény alkalmazásával 13:13 órás LD ciklusok mellett történt a Δvvd és Δvvd , $cpc1-vvd-gfp$ törzsben. A világos fázisban mérhető fényintenzitások vannak feltüntetve. Reprezentatív futtató csövek adatai (n=9). Az egymást követő ciklusok konídium csomóinak időbeli elhelyezkedése egymás alá rendezve látható az ábrákon. A világos és sötét időszakokat fehér és fekete szakaszok jelölik. B) A VVD szintek alakulása a sötét fázisban. Világosban növekvő folyékony kultúrák a jelzett időre sötétbe kerültek. A fehérjelizátumok Western blot analízise anti-VVD antitesttel történt. A csillag keresztreakciót jelöl, ami töltéskontrollként is szolgálhat. C) A VVD jelenléte szükséges a természetes fotoperiódushoz való alkalmazkodáshoz. A futtatócsövekben a jelzett törzsek természetes fényviszonyok mellett (egy állandó hőmérsékletű (21°C) szoba ablakában) növekedtek. A holdfázisokat az ábra alján jelöltük. 6 nap denzitometriás elemzése látható 2-2 reprezentatív cső adataival (n=6).

Felmerül a kérdés, hogy mi lehet az élettani funkciója a fényválasz VVD-függő deszenzitizációjának. Tudjuk, hogy a természetben a fotoperiódusok zajosak lehetnek. Jellemző ez az éjszakai időszakra is, ami nem mindig jelent teljes sötétséget. Így például egy teliholdas éjszakán a fényintenzitás akár $20 \text{ nmol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ is lehet, ami adataink szerint jóval meghaladja a WCC fényküszöbét, és ennek ellenére nem zavarja meg a ritmust, a rendszer sötét periódust érzékel. Először azt vizsgáltuk, hogy a fényperiódusban szintetizált VVD milyen féléletidővel rendelkezik (23.B ábra). Láthatjuk, hogy a VVD mennyisége bár viszonylag gyorsan csökken az LD átmenetet követően, gyakorlatilag a teljes sötét periódusban detektálható marad, azaz

képes lehet a WCC aktivitásának befolyásolására. Ennek vizsgálatára futtató csöveken vizsgáltuk a *wt* és a Δvvd ritmusát természetes fény mellett (23.C ábra). A vizsgálat kezdetekor újhhold volt, a végére (6 nappal később) pedig majdnem félhold. Míg a *wt* a teljes időszakban robusztus ritmust mutatott, addig a Δvvd -ben 3-4 nap után a ritmus ellapult, majd egyáltalán nem volt detektálható. A jelenség megerősítéséhez laboratóriumi, azaz jobban kontrollált körülmények mellett is végeztünk kísérletet. A két törzzsel leoltott futtató csöveket 12:12 órás erős/gyenge fény ciklusokban inkubáltuk, úgy hogy a gyenge fényperiódusban mi szabályoztuk a fény intenzitását, 0, 240 és 800 $\text{nmol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ -es értékeket beállítva (24. ábra). Amíg a *wt* esetében még a legnagyobb intenzitás mellett is felismerhető volt a ritmus a denzitometriás képen, addig a Δvvd -ben már 240 $\text{nmol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ -es intenzitás mellett sem volt jól kivehető oszcilláció. Eredményeink alátámasztják azt a hipotézisünket, hogy természetes, azaz éjszakai fényhatásoktól nem mindig mentes fényviszonyok mellett a VVD aktivitása szükséges a cirkadián óra robusztus működéséhez.



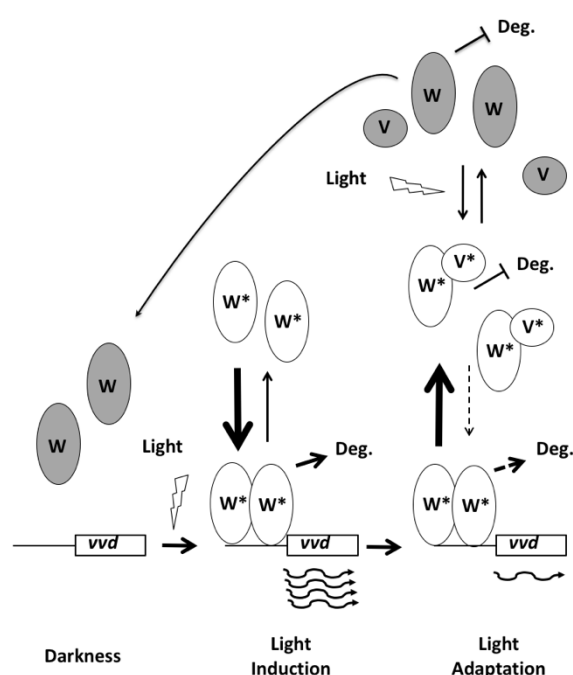
24. ábra: VVD-re szükség van mesterséges holdfény mellett is a ritmus kialakulásához

A) Futató csövekben a *wt* és a Δvvd törzs konidizációs ritmusát elemeztük 12:12 óra erős/gyenge fény ciklusokban. Az erős fénynek a fehérrel, a gyenge fénynek (intenzitása az ábrán fel van tüntetve) a szürkével jelzett időszakok feleltek meg. Reprezentatív csövek denzitometriás analízise (n=4).

4.1.3.4. Összefoglalás és következtetések

Eredményeink alapján a következő elképzelés alakult ki a gomba fényadaptációjával kapcsolatban: a fény hatására dimerizálódó és aktiválódó WCC készlet egy részét molekuláris interakció révén a némi késéssel megjelenő VVD újra monomer állapotba hozza, ezzel inaktíválja és egyidejűleg stabilizálja azt (25. ábra). A VVD tehát elősegíti, hogy a WCC sötét konformációban, azaz újra aktiválható formában akkumulálódjék, aminek következtében a fényérzékelő rendszer egy fényintenzitás növekedésre ismét reagálni tud. Fontos tulajdonsága

a VVD-nek, hogy viszonylag széles tartományban a fényhatás erősségével és idejével arányos az expressziójának nagysága, aminek révén a VVD készlet molekuláris memóriát képezhet a megelőző időszak fényintenzitására vonatkozóan. Ezzel összefüggésben megmutattuk, hogy a fehérje a fotociklus sötét fázisában még 10-12 óra múltán is kimutatható, így gátolni képes, hogy a WCC gyenge fény hatására aktiválódjék, és ezáltal destabilizálja az óraműködést. Erre utalnak azok az eredményeink is, amelyek szerint VVD hiányában természetes fotociklusokban már a félhold fénye is megzavarja a ritmusos működést *Neurospora*-ban, míg a *wt*-ban ez nem okoz ritmuszavart. Mindez azt jelenti, hogy természetes körülmények között a VVD a cirkadián óra esszenciális komponense.



25. ábra: A WCC és a VVD közötti kölcsönhatás szerepe a fényadaptációban

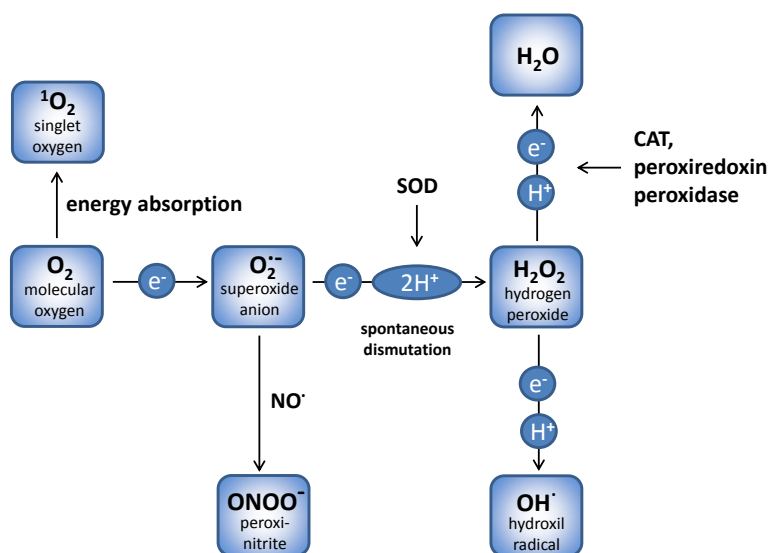
W jelöli a WCC-et, V a VVD-et, a fényaktivált fehérjék mellett pedig csillag szerepel. Fény hatására a WCC aktiválódik és dimerizálódik, és ezzel egyidejűleg serkenti a *vvd* átírását. A fény által aktivált és DNS-hez kötődő WCC gyorsan bomlik (Deg.). Amint a VVD a fényintenzitás mértékével arányos mennyiségben felhalmozódik, kölcsönhatásba lép a WCC-szel, verseng annak homodimerizációjával és megakadályozza a DNS-hez való kötődését. A fény által aktivált WCC-ből és VVD-ből kialakuló dimer inaktív, és a fotoadduktum felbomlása révén lassan újra sötét konformációba kerül. Ekkor, azaz fotoadaptált állapotban, a rendszer újra válaszképes lesz, és reagálhat a fényintenzitás újabb növekedésére.

A VVD mellett a WCC aktivitását és degradációját a FRQ is gátolja, ez a hatás fénytől független. Azt tapasztaltuk, hogy a FRQ és a VVD WCC stabilitást befolyásoló hatása additív. Fontos megjegyezni, hogy bár a FRQ mennyiség nem olyan érzékeny indikátora a fényintenzitásnak, mint a VVD szintje, a FRQ expresszió is jóval magasabb világosban, mint sötétben, azaz bizonyos mértékben a FRQ mennyiség is illeszkedik az LD ciklusokban fluktuáló WCC aktivitáshoz és szintekhez, és ez szintén hozzájárulhat az óraműködés stabilizálásához.

Mind a WCC, mind a VVD LOV doménjét viszonylag lassú fotociklus jellemzi szemben más ismert LOV domének perces vagy szekundumos nagyságrendű fotoadduktum stabilitásával (186, 193, 194). Azt gondoljuk, hogy ez az elhúzódó aktív állapot egyfajta elsimító hatást biztosít, aminek révén a fényérzékelő rendszer a fényperiódus maximális jeleire emlékezik, és rövid, zajszerű fényintenzitás fluktuációk (pl. amikor egy felhő rövid időre eltakarja a napot) nem tevődnek át rá.

4.1.4. A reaktív oxigén származékok (ROS) hatása a molekuláris óra működésére (7. és 8. közlemény)

Ennek a kérdéskörnek a vizsgálatát a munkacsoport egy véletlen megfigyelése indította el. A konidizációs ritmus állandó körülmények mellett csak bizonyos genetikai háttér (pl. *bd*) mellett, illetve speciális (általában ROS tartalmú vagy annak termelését serkentő vegyületet tartalmazó) táptalajon figyelhető meg. Mivel egy bizonyos gén hiányának hatását nem *bd* háttérű törzsben vizsgáltuk, a futtatócsöves kísérlet táptalajához ROS generátor menadiont adtunk. Meglepődve tapasztaltuk, hogy LD-ciklusokban a menadion mennyiségétől függően változik a *wt*-ban a konidizációs fázis, és ezen a nyomon elindulva kezdtük meg vizsgálatainkat.



26. ábra: Különböző reaktív oxigén származékok keletkezése a sejtben

Az utóbbi évtizedekben nyilvánvalóvá vált, hogy a különböző ROS-ok (26. ábra) nemcsak toxikus faktorként lehetnek jelen a sejtekben, hanem fontos szignalizációs szerepet is

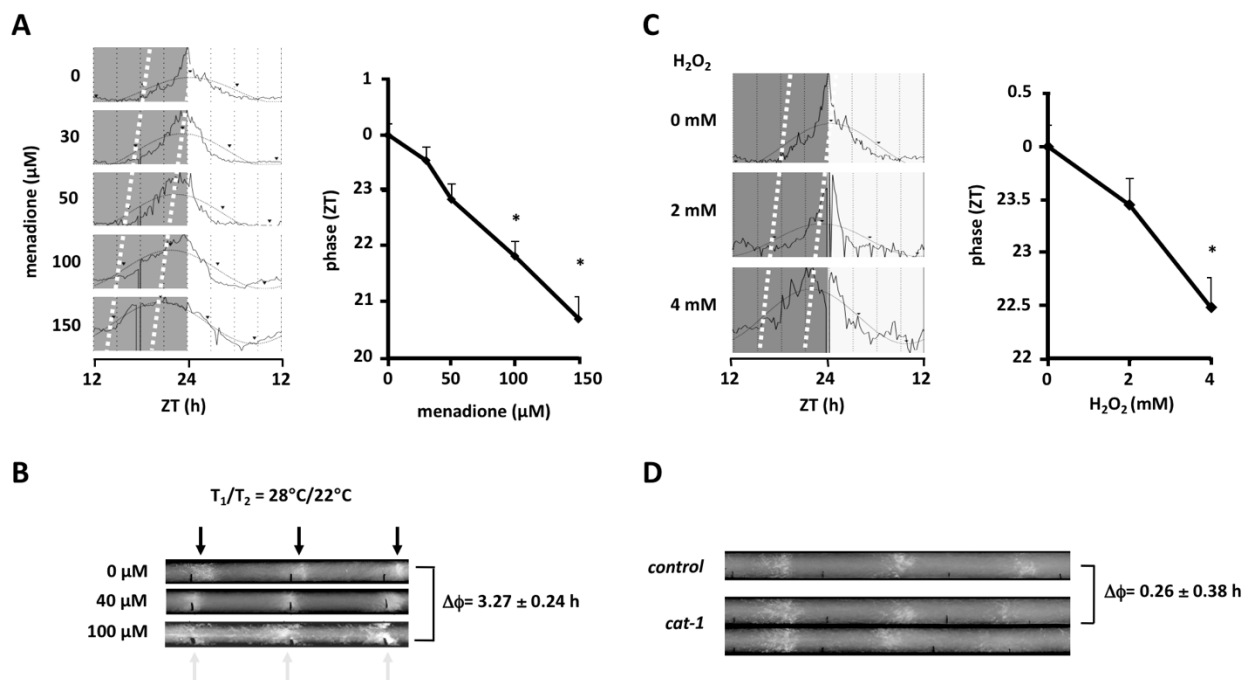
betöltenek (195-197). Így *Neurospora crassa*-ban is több ROS-függő celluláris folyamatot írtak le, ide tartozik többek között a növekedés és a differenciálódás számos részfolymata. A NOX-1 nevű NADPH-oxidáz aktivitásához kötött a normális hypha növekedés, a szexuális és aszexuális fejlődés, míg a NOX-2 működése döntően a szexuális spóráképzést befolyásolja (198). A fényválaszokban is szignalizációs szerep jut a ROS képződésnek, ilyen a karotin szintézis növekedése és a termőtest polaritásának fénytől függő alakulása (199).

Vizsgálataink kezdetekor már néhány szórványos adat rendelkezésre állt arra vonatkozólag is, hogy bizonyos ROS típusok részt vehetnek a cirkadián ritmus szabályozásában. Zebrahal Z3 sejtekben kimutatták, hogy a H₂O₂ kezelés óragén expressziót indukál bennük, és szinkronizálja a *zPer1* expressziójának oszcillációját, a H₂O₂ szintet csökkentő kataláz overexpressziója pedig ezzel ellentétes hatásokat vált ki (200). *Drosophila*-ban viszont a ROS gátlólag hatott az óraműködésre, ugyanis H₂O₂ hatására a lokomotor aktivitás ritmusának amplitúdója alacsonyabb lett (201). *Neurospora*-ban, amellet, hogy magasabb ROS koncentrációk mellett kifejezett konidizációs ritmus figyelhető meg (47, 202), a ROS szintek kataláz és NOX-1 függő cirkadián ingadozását írták le (203). A felsorolt megfigyelések ellenére egyetlen organizmussal kapcsolatban sem állt rendelkezésre adat arról, hogy a ROS szintek befolyásolják-e a ritmus két alapvető paraméterét, a periódust és a fázist. Épp ezért találtuk különösen izgalmasnak megfigyelésünket, és kezdtünk további vizsgálatokba a ROS termelés és a cirkadián szabályozás kapcsolatának részletesebb tanulmányozására.

4.1.4.1. A ROS szintek hatása a cirkadián óra fázisára

A menadion vagy K3 vitamin egy olyan vegyület, amit a sejtek könnyedén felvesznek és flavoenzimeikkel szemikinonná alakítanak. A szemikinon rendkívül instabil, spontán reoxidációval újra menadionná alakul, és eközben szuperoxid anion (O₂⁻) keletkezik. A már említett, véletlen megfigyelést eredményező kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy LD-ciklusokban a menadion koncentráció-függő módon megváltoztatja a *wt*-ú törzs (ezúttal a legáltalánosabban használt FGSC 2489-es *wt*) konidizációs fázisát (27.A ábra). Mivel nem *bd* háttérű volt a törzsünk, gyengébb intenzitásúak, de azért jól detektálhatóak voltak a konidizációs csomók a futtatócsövekben. A menadion hatása jelentős volt, az általunk használt maximális, 150 µM menadion koncentráció csaknem 4 órás fázis előretolódást okozott. A következőkben kimutattuk, hogy a menadion hatása hőmérséklet-ciklusokban is megfigyelhető, azaz nem függ attól, hogy milyen környezeti paraméter vezérli a ritmust (27.B ábra).

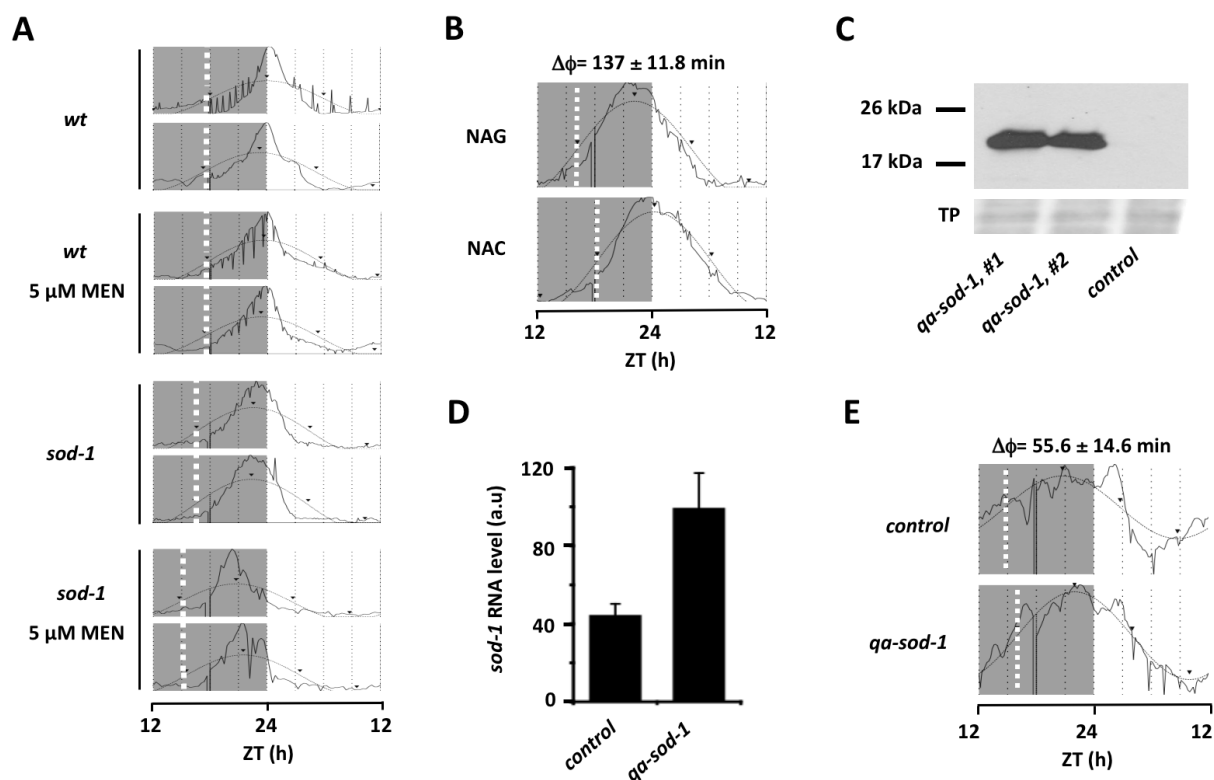
A ROS szintet a továbbiakban a táptalajhoz történő H_2O_2 hozzáadással növeltük. A H_2O_2 egyrészt emelheti a O_2^- szintet a szuperoxid dizmutázok (SOD-ok) (26. ábra) által katalizált reakció végtermék gátlása révén, másrészt növelheti a H_2O_2 -ból keletkező szabadgyökök mennyiségét. A 27.C ábrán látható, hogy H_2O_2 hatására is koncentrációfüggő fázissietés tapasztalható. A H_2O_2 -ot kataláz (CAT) alakítja tovább a sejtben (26. ábra). Mivel a CAT-1 szerepe merült fel a cirkadián ritmus szabályozásával kapcsolatban *Neurospora*-ban (203), összehasonlítottuk a *wt* és a *cat-1* deléciós mutáns fázisát, de nem találtunk szignifikáns különbséget (27.D ábra). Elképzelhető, hogy a *cat-1* kiesését a kísérleti körülményeink mellett más katalázok aktivitása kompenzálni képes, de az is lehetséges, hogy a CAT-1 szubsztrátjaként szolgáló H_2O_2 frakció nem játszik szerepet a fázis meghatározásában.



27. ábra: A ROS szint változása módosítja a konidizáció fázisát

A) Menadion koncentráció függő módon korábbra állítja a *wt*-ú törzsben (FGSC 2489) a fázist. A táptalajhoz a feltüntetett koncentrációban menadiont adtunk, a csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk. Bal ábrarész: a konidium denzitás változása és az illesztett szinusz görbe az idő függvényében. A nyilak a fázis referencia pontokat (konidizációs "onset", "peak", "offset", "trough") jelölik. A szaggatott fehér vonalak az "onset", illetve a "peak" referenciapontokat kötik össze. Reprezentatív csövek. Jobb ábrarész: A peak-hez tartozó időpontok a menadion koncentráció függvényében. ($n=11-17$, ANOVA, Tukey HSD teszt) **B)** A menadion hőmérséklet ciklusok mellett is hat a fázisra. A *wt*-ú törzssel leoltott futtató csöveket sötétben, $28^\circ\text{C}/22^\circ\text{C}$ (12:12 óra) ciklusokban inkubáltuk. A 0 és 100 μM menadiont tartalmazó minták között mért fáziskülönbség van feltüntetve, a nyilak a konidium denzitás maximumát jelölik. A csövek hosszát úgy állítottuk be, hogy a napi növekedési szakaszok nagyjából azonosak legyenek. Reprezentatív csövek ($n=4-8$). **C)** H_2O_2 hatása a konidizáció fázisára. A kísérleti körülmények és az analízis az **A)** pontban leírtakkal egyező volt. ($n=5-16$, ANOVA, Tukey HSD teszt) **D)** A kataláz-1 aktivitása nem befolyásolja a konidizáció fázisát. A futtató csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk, és a két törzs közötti fáziskülönbséget tüntettük föl. Reprezentatív csövek ($n=6$).

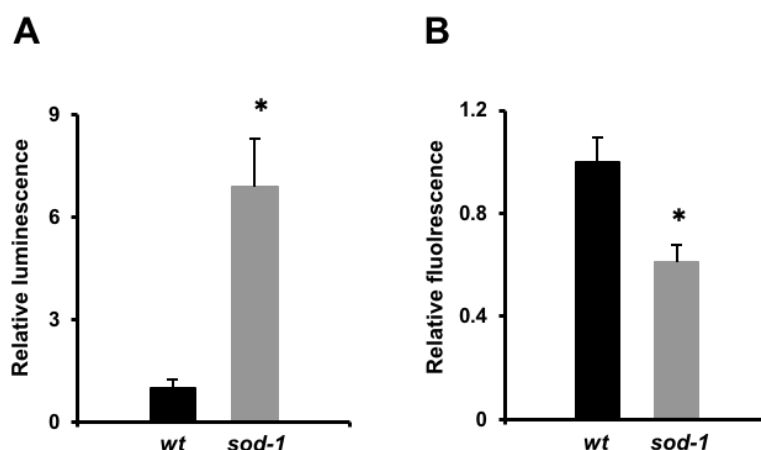
A következőkben a SOD aktivitás szerepét vizsgáltuk a *sod-1* hiányos törzs (RIP mutáns, FGSC 7438) segítségével, hiszen ebben a törzsben az endogén O_2^- szint megváltozásával számolhatunk.



28. ábra: A SOD-1 aktivitás és az endogén ROS termelés szerepe a konidizációs fázis szabályozásában

A) A *sod-1* mutánsra korábbi fázis és fokozott menadion érzékenység jellemző. A *wt*-ú (ebben az esetben FGSC 988) és *sod-1* hiányos törzsekkel leoltott futtató csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk menadion nélkül, illetve 5 μ M menadionnal. A konídium denzitás változás (illesztett szinusz görbével) az idő függvényében látható, a kis nyilak a fázis referencia pontokat (l. előző ábra) jelölik. A szaggatott fehér vonalak az "onset"-nek megfelelő referenciapontokat jelölik. Reprezentatív csövek. (n=4) **B)** A ROS szintet csökkentő NAC fáziskésést okoz. A *bd* törzzsel leoltott, 5 mM NAC-t, illetve NAG-t tartalmazó táptalajjal készített futtató csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk. Az analízis és ábrázolás az A) pontban leírtaknak megfelelően történt. (n=4) **C)** SOD-1_{FLAG} fehérje detektálása a *qa-sod-1*_{FLAG}, *bd* törzsben. A feltüntetett törzsek micéliumait 16 órán át kinasav tartalmú médiumban inkubáltuk. A két transzformáns és a kontroll törzs (*bd*) teljes sejt extraktumát Western bloton anti-FLAG antitest segítségével analizáltuk. **D)** A *qa-sod-1*_{FLAG}, *bd* és *bd* (control) törzsek micéliumait 16 órán át kinasav tartalmú médiumban inkubáltuk. A *sod-1* RNS mennyiségét valós idejű PCR segítségével határoztuk meg. (n=3) **E)** A SOD-1 overexpressziója fáziskéséshez vezet. A *qa-sod-1*_{FLAG}, *bd* és *bd* (control) törzzsel leoltott futtató csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk. A táptalaj kinasavat tartalmazott. Az analízis és ábrázolás az A) pontban leírtaknak megfelelően történt. (n=5)

LD-ciklusokban a *sod-1* hiányos törzs fázisa több mint egy órával korábbi volt, mint a *wt*-é, és a fázis fokozottan érzékeny volt menadionra: míg a *wt*-ban kis mennyiségű, azaz 5 μM menadion nem befolyásolta a konidizáció időzítését, addig ugyanez a koncentráció a *del*éciós törzsben korábbi időpontra állította a fázist (28.A ábra). Az érzékenység fokozódás hátterében elképzeléseink szerint az állhat, hogy a menadion hatására képződő O_2^- SOD-1 hiányában kevésbé alakul tovább, és ez jelentős O_2^- -szint emelkedéshez vezethet. A továbbiakban azt is igazoltuk, hogy a *sod-1* mutáció mérhető mértékben eltolja a sejtekben a ROS egyensúlyt: a *wt*-sal összehasonlítva emelkedett O_2^- és csökkent H_2O_2 szintek voltak detektálhatók (29. ábra). Szemben a *sod-1*-gyel a *sod-2* hiánya nem okozott fázisváltozást (nem bemutatott adat). Fenti eredményeink összességében arra utalnak, hogy a menadion fázisra gyakorolt hatását inkább a O_2^- , és nem a belőle képződő H_2O_2 közvetíti.



29. ábra: SOD-1 hiányában megnő a O_2^- -termelés és csökken a H_2O_2 szintje

A) O_2^- -termelés függése a SOD-1 jelenlététől. Állandó világosban növekvő folyékony kultúrákból kivett micéliumokhoz lucigenint tartalmazó puffert adtunk, és mértük a lumineszcenciát, amit a szárazsúlyra normalizáltunk. **B)** A H_2O_2 -szint függése a SOD-1 jelenlététől. Állandó világosban növekvő folyékony kultúrákból kivett micéliumokhoz Amplex Red-et és tormaperoxidázt tartalmazó puffert adtunk, 1,5 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk a mintákat és mértük a fluoreszcenciát, amit a szárazsúlyra normalizáltunk.

Mivel a környezeti körülmények napszaki változása mellett bizonyos táptalajokon és növekedési körülmények mellett kimutattak ritmusos konidizációt olyan törzsekben is, amelyekben hiányzott valamelyik központi órakomponens (204), a következőkben azt vizsgáltuk, hogy a *frq* gén hiányában tudunk-e menadionra érzékeny ritmust detektálni. A *frq*¹⁰, *bd* törzs azonban igen magas menadion koncentráció mellett sem mutatott ritmusos konidizációt, ami azt jelenti, hogy az általunk detektált, menadionra érzékeny ritmus létrejöttének feltétele a FRQ-WCC függő oszcillátor működése.

Miután az eddig bemutatott eredmények szerint emelkedett ROS szintek mellett megváltozik a konidizáció fázisa, a következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a nyugalmi ROS termelés is hatással van-e ritmusra. A normál, ROS-mentes táptalajon is konidizációs ritmust mutató *bd* törzset vizsgáltuk, és a bazális ROS szintek csökkentése céljából N-acetilciszteint (NAC) adtunk a táptalajhoz. A kontroll, N-acetilglicin (NAG) tartalmú táptalajhoz képest fáziskésést tapasztaltunk (28.B ábra). A bazális ROS szint további manipulálására SOD-1-et overexpresszáló törzset hoztunk létre, amelyben a *qa*-promóter indukálását követően jól detektálható volt a FLAG-tag-et hordozó fehérje (28.C ábra). Az RNS mennyiségből következően a kontrollhoz képest mintegy kétszeres SOD-1 szint alakulhatott ki a sejtekben (28.D ábra). LD-ciklusokban a vártan megfelelően fáziskésés volt mérhető (28.E ábra), ami ugyancsak arra utalt, hogy a bazális körülmények mellett termelődő O_2^- is szerepet játszik a konidizációs fázis szabályozásában.

Mi lehet a forrása a bazális körülmények között megjelenő O_2^- -nak? O_2^- termelődik a sejtben egyrészt különböző metabolikus folyamatok során, másrészt NOX enzimek aktivitása révén. *Neurospora*-ban két NOX enzim ismert, a NOX-1 és NOX-2 (198). LD-ciklusokban vizsgáltuk a konidizációs fázist *nox-1*, *nox-2* és *nor-1* (mindkét NADPH oxidáz működéséhez szükséges szabályozó alegységet kódoló gén) deléciós mutánsokban, de nem találtunk eltérést a kontrollhoz képest (3. táblázat), ami arra utal, hogy nem a NOX-aktivitáshoz, hanem inkább a metabolikus folyamatokhoz kötődő O_2^- -termelés játszhat szerepet a fázis regulációjában. Megjegyzendő, hogy a *nor-1* deléciós mutáns heterokariota, így nem zárható ki, hogy a meglévő alacsonyabb NOR-1 szint nem limitálja az óraműködés szabályozásához esetlegesen szükséges NOX aktivitást ebben a törzsben.

3. táblázat: A *nox* mutánsok fázisa nem különbözik a kontrollétól

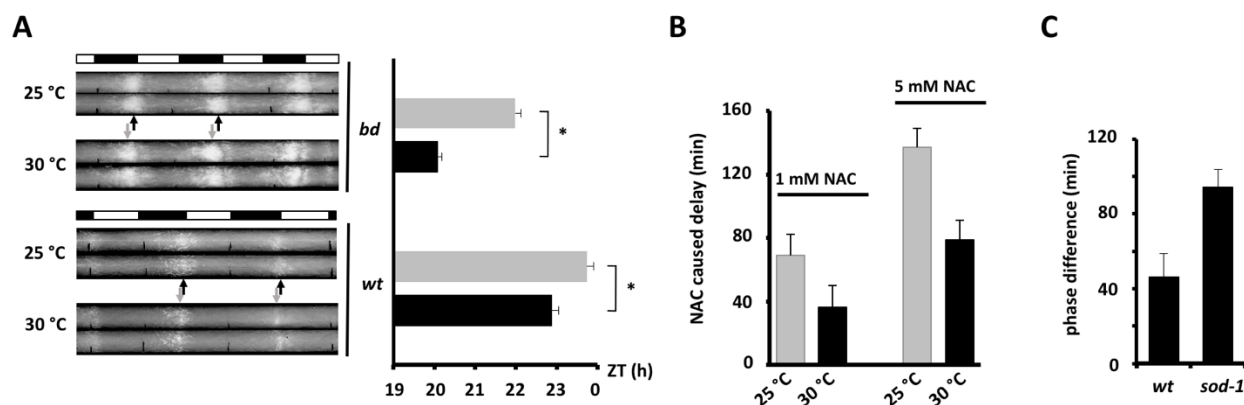
	<i>nox-1</i>	<i>nox-2</i>	<i>nor-1</i>
fázis (ZT, h, SEM)	23.82±0.36 n=9	23.25±0.27 n=4	23.9±0.41 n=8
kontroll fázisa (ZT, h, SEM)	24.0±0.20 n=16	23.72±0.13 n=14	24.06±0.22 n=6
kontroll törzs	FGSC #2489	FGSC #988	<i>mus51</i> FGSC #9718
p (egyszempontos ANOVA)	p>0.05	p>0.05	p>0.05

Az egyes törzseket futtató csövön vizsgáltuk LD-ciklusban (12-12 óra). Fázisként a konidizáció maximumának ZT időpontját adtuk meg.

4.1.4.2. A ROS szerepe a konidizációs fázis hőmérsékletfüggésének szabályozásában

Mivel az eddig ismertett eredményeink alapján elsősorban a metabolizmus során keletkező ROS szerepe tűnt valószínűnek a konidizáció időpontjának szabályozásában, a

metabolizmus pedig erősen függ a környezeti hőmérséklettől, a következőkben azt vizsgáltuk, hogy a ROS szintek és a ritmus hőmérsékletfüggése között látunk-e összefüggést. A hipotézist alátámasztotta az az irodalmi adat is, amely szerint a hőmérséklet emelkedés hatására *Neurospora*-ban kimutathatóan növekszik a O_2^- -termelés (205). Először a *wt*-ú FGSC 988 és *bd* törzsek konidizációjának fázisát hasonlítottuk össze LD-ciklusokban (12:12 óra) 25 és 30 °C-on. Mindkét törzsben a magasabb hőmérséklethez szignifikánsan korábbi fázis tartozott, azaz viszonylag mérsékelt hőmérsékletváltozás hatással van a konidizáció időzítésére (30.A ábra). Érdekes módon a hatás kifejezettebb volt a *bd* törzsben, ami arra utalhat, hogy a RAS-1 aktivitás (ami irodalmi adatok szerint a *bd* genotípus következménye (202)) szerepet játszik a hőmérsékletváltozásra adott válasz kialakításában.



30. ábra: A hőmérséklet ROS-függő módon befolyásolja a konidizáció fázisát

A) A konidizáció fázisa hőmérsékletfüggő. A *wt*-ú FGSC 988 és a *bd* törzsszel leoltott futtató csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk 25, illetve 30 °C-on. Bal oldali ábrarész: A jobb összehasonlíthatóság érdekében a csövek hosszát úgy állítottuk be, hogy a napi növekedési szakaszok nagyjából azonosak legyenek. A sötét és világos periódusokat a csövek képe fölött jelöltük. A szürke nyilak a magasabb, a fekete nyilak az alacsonyabb hőmérsékleten mutatják a konidizáció maximumát. 2-2 reprezentatív cső képe. Jobb oldali ábrarész: Az átlagos fázisok statisztikai összehasonlítása, szürke oszlop: 25 °C, fekete oszlop: 30 °C (egyszempontos ANOVA, $n=12-16$). **B)** A ROS megkötése hőmérsékletfüggő módon befolyásolja a fázist. A *bd* törzsszel leoltott futtató csöveket LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk 25, illetve 30 °C-on. A diagramm az NAC és NAG tartalmú csövek közötti fáziskülönbséget mutatja. ($n=4$) **C)** A *sod-1* mutáns fázisa érzékenyebb a hőmérsékletváltoztatásra, mint a *wt*-é. A kontroll és a *sod-1* törzsszel leoltott futtató csövek LD-ciklusokban (12:12 óra) voltak 25 vagy 30 °C-on. A két hőmérsékleten mért fázisok különbségeit mutatja a diagramm. ($n=10-19$)

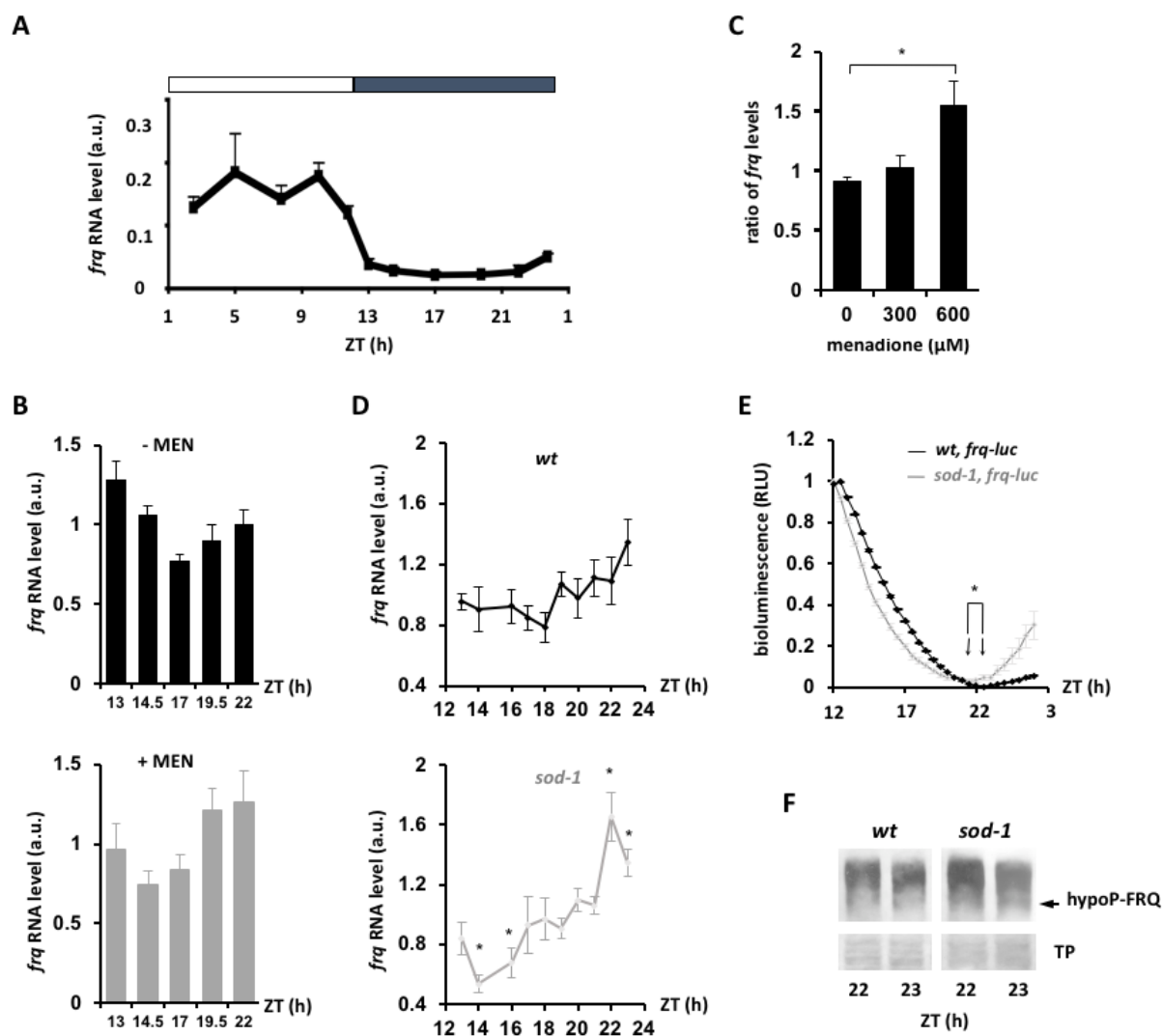
A ROS esetleges közvetítő szerepének vizsgálatára NAC-t adtunk a táptalajhoz két különböző koncentrációban, és az NAC okozta fáziskésést hasonlítottuk össze (30.B ábra). A kísérletekben a *bd* törzset használtuk, hiszen más *wt*-ú törzs NAC jelenlétében nem mutat ritmusos konidizációt. Míg 25°C-on 1 mM NAC mellett több mint egy órás késést mértünk, addig 30°C-on csak átlagosan 36 perc volt az eltolódás. A 25°C-on tapasztalthoz hasonló

mérsékelt fázis módosító hatáshoz 30°C-on jóval magasabb, 5 mM NAC koncentrációra volt szükség. Mindez arra utal, hogy a ROS szint emelkedés szerepet játszik abban, hogy magasabb hőmérsékleten korábbi fázis alakul ki. A kérdés további elemzéséhez a *sod-1* mutáns fázisát vizsgáltuk szintén 25 és 30°C-on. Ebben a törzsben azt várjuk, hogy egy adott hőmérsékletemelkedés nagyobb O_2^- szint emelkedést okoz, mint a *wt*-ban, hiszen a keletkező többlet O_2^- tovább alakulása akadályozott. A 30.C ábrán látható, hogy a hőmérsékletváltozás a *sod-1* defektusos törzsben valóban nagyobb fázisváltozást eredményezett, mint a kontroll törzsben. A különbséget statisztikai analízis eredménye is alátámasztotta, szignifikáns törzs x hőmérséklet interakció volt kimutatható ($p=0,004$, két-szemponos ANOVA, $n=10-19$).

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a hőmérsékletváltoztatás a ROS szint módosításán keresztül befolyásolja a konidizáció időzítését.

4.1.4.3. A ROS szintek változása befolyásolja a molekuláris óra működését

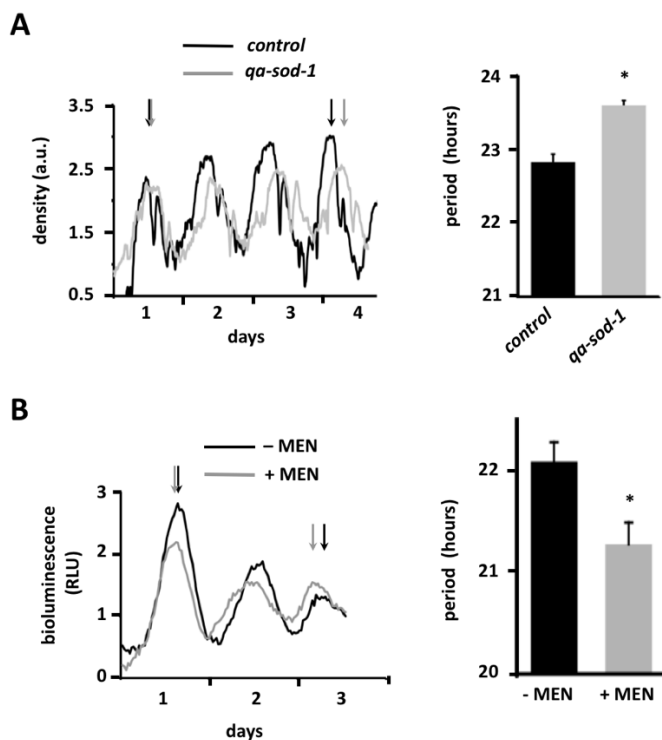
Annak eldöntésére, hogy a ROS szint fázisra gyakorolt hatása a molekuláris óra modulálásán keresztül valósul-e meg, vagy esetleg csak az óra kimenete módosul, a következőkben a molekuláris órakomponensek szintjét és működését vizsgáltuk a ROS termelés függvényében. LD-ciklusokban a *frq* expresszió igen nagy amplitúdóval változik, hiszen a világosbani magas szinteket követően sötétben hirtelen csökken az RNS szint, és csak a sötét szakasz végén látunk ismét mérsékelt emelkedést (31.A ábra). Amennyiben a *frq* RNS expressziót az LD-ciklus sötét fázisában menadion jelenlétében mértük, azt tapasztaltuk, hogy már az időszak első felében növekedésnek indul a szintézis (31.B ábra). Ha a fázis első felében (ZT 14,5) és közepén (ZT 17) mért RNS szintek arányát képeztük, a menadion jelenlétében kapott arány szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll körülmények mellett számolt hányados, és ez a különbség növelhető volt a menadion koncentráció növelésével (31.C ábra). Mindez arra utal, hogy a molekuláris óra fázisa a konidizációs fázishoz hasonlóan reagál menadionra. Megjegyzendő, hogy a molekuláris óra vizsgálatához használt folyékony kultúrákhoz magasabb menadion koncentrációkat kellett alkalmaznunk, mint a futtató csövek táptalajához. A folyékony médiumban tapasztalt kisebb menadion érzékenységet az ilyen körülmények mellett kimutatott magasabb SOD-1 aktivitás lehet felelős (206). A következő vizsgálatban a *frq* expressziót a *wt*-ú és a *sod-1* mutáns törzsben hasonlítottuk össze az előzőekhez hasonlóan az LD-ciklus sötét fázisában (31.D ábra). A mutánsban, a vártan megfelelően, korábban indult növekedésnek az RNS expresszió, mint a *wt*-ban (törzs x idő interakció, két-szemponos ANOVA, $p=0,023$).



31. ábra: LD-ciklusokban a ROS szint emelkedése a *frq* expresszió fázisának megváltozásához vezet

A) A *frq* expresszió időbeli változása LD-ciklusban. *wt*-ú (FGSC 2489) törzs folyékony kultúráit LD-ciklusokban (12:12 óra) inkubáltuk, majd a megjelölt időpontokban betakarított mintákban a *frq* RNS szintet valós-idejű PCR-rel határoztuk meg. A világos és sötét időszakot az ábra felső részén jelöltük. (n=3) **B)** Menadion jelenlétében korábbra helyeződik a *frq* expresszió minimuma. A vizsgálat az A) pontban leírtaknak megfelelően történt. A kultúrák menadion mentes (-MEN, felül) vagy 300 μM menadion (+MEN, alul) tartalmazó folyékony médiumban nőttek. Egy idősorozat mintái ugyanabból a kultúrából származtak, és az expressziós értékeket ugyanazon kultúra mintáinak átlagos értékére normalizáltuk. (n=3) **C)** A *frq* expresszió menadion hatására bekövetkező fáziseltolódásának elemzése. Az A) pontnak megfelelően folyt a mintafeldolgozás. A ZT17-es és ZT14,5-ös minták *frq* expresszióinak hányadosát képeztük. (ANOVA, Tukey-HSD teszt, n=5-9) **D)** A *sod-1* mutánsban (alsó ábrarész) előbb emelkedik a *frq* expresszió, mint a *wt*-ban (FGSC 988) (felső ábrarész). A vizsgálat az A) pontban leírtaknak megfelelően történt. A csillag azokat az időpontokat jelöli, amiknek az értéke szignifikánsan különbözött az összes minta átlagos értékétől (egymintás t-próba, n=6). **E)** A *frq*-promóter aktivitásának fázisa a *sod-1* mutáció mellett korábbi, mint *wt*-ú háttérben. 2 napig LD-ciklusban inkubáltuk a mintákat, majd a következő ciklus sötét fázisában detektáltuk a luciferáz aktivitást. A lumineszcencia értékeket a 0 időpontos minta értékére normalizáltuk. A nyílak a minimum pontokra mutatnak. A csillag a *wt* értékétől való szignifikáns eltérést jelzi (egyszempontos ANOVA, n=14-36). **F)** A *sod-1* mutánsban az újonnan szintetizált, hipofosforilált FRQ már a sötét fázis végén detektálható. A fehérjeminták a D) pont mintáiból készültek. A Western blot analízishez anti-FRQ antitestet használtunk. TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll)

Az óraműködés SOD-1-től függő megváltozásának megerősítésére létrehoztuk a *sod-1*, *frq-luc* törzset, amelyben hiányzik a SOD-1, és a *frq* promóter által szabályozott luciferáz aktivitás *in vivo* követhető. Itt is az LD-ciklus sötét fázisát vizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy SOD-1 hiányában a promóter aktivitás minimum pontja szignifikánsan korábbra esik, mint a megfelelő kontroll törzsben (31.E ábra). A fáziskülönbséget fehérje szinten is detektáltuk: a hipofoszforilált formában megjelenő, azaz nagyobb elektroforetikus mobilitású, újonnan szintetizált FRQ ZT22-23 időpontban már egyértelműen detektálható volt a *sod-1* mutánsban, míg a kontroll törzsben ZT23-ban is csak igen kis mennyiségben jelent meg (31.F ábra).



32. ábra: ROS hatására megváltozik a cirkadián óra periódushossza

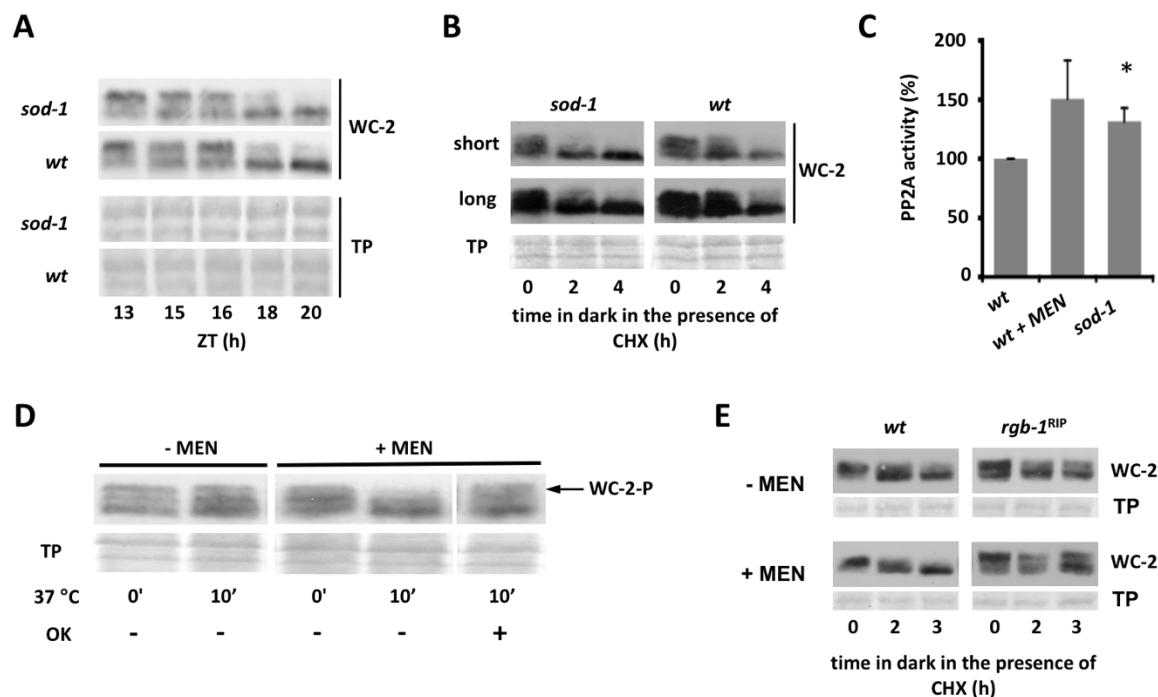
A) A *sod-1* overexpressziója periódus hosszabbodáshoz vezet. A *qa-sod-1_{FLAG}*, *bd* és a *bd* (control) törzsszel leoltott, kinasavas táptalajt tartalmazó futtató csöveket 24 óráig világosban, majd állandó sötétben inkubáltuk. Az egyes csövek denzitometriás görbéjének átlagát ábrázoltuk (bal ábrarész). A fekete és szürke nyilak az első és utolsó napon jelölik a denzitás maximumát a két törzsben. A periódus megállapításához a denzitometriás képeket a Chrono programmal analizáltuk (jobb ábrarész) (egyszempontos ANOVA, $n=10$). **B)** Menadion jelenlétében rövidebb a periódus. A *bd*, *frq-luc* *in vivo* luciferáz aktivitása. A mintákat a leoltást követően 2 napig világosban inkubáltuk, majd állandó sötétben mértük a luciferáz aktivitást. Bal ábrarész: Az aktivitás időbeli lefutását ábrázoltuk (összes mérés átlaga). A fekete és szürke nyilak az első és a 3. napon a maximális aktivitás fázisát jelölik menadion nélkül és annak jelenlétében. A jobb értelmezhetőség érdekében a görbék kezdeti szakaszait egymásra fektettük. A 0 időpont az első napi minimális aktivitás időpontjának felel meg a menadionnal kezelt mintákban. Jobb ábrarész: A Chrono programmal meghatározott periódusok (egyszempontos ANOVA, $n=9-12$).

Eddig ismertetett adataink összességében azt valószínűsítették, hogy a ROS szintek elsődlegesen az oszcillátor működésére hatva befolyásolják a konidizációs ritmust. Ebben az esetben viszont várható, hogy az órafunkció állandó, azaz szabadon futó körülmények mellett is érzékeny ROS-ra, azaz a ROS szinttől függhet a periódus. A következőkben ezért meghatároztuk a szabadon futó periódushosszt a SOD-1-et overexpresszáló, a megfelelő kontroll, valamint a *bd, frq-luc* törzsekben menadion jelenlétében és anélkül (32. ábra). A SOD-1 szint emelkedése szignifikáns periódus hosszabbodást, míg menadion jelenléte periódus csökkenést eredményezett. Ez az eredmény összhangban van egyrészt a fáziskülönbséggel kapcsolatos megfigyeléseinkkel, valamint azokkal az irodalmi adatokkal, amelyek szerint SOD-1 hiányában a *wt*-hoz képest rövidebb periódus detektálható (47).

Mivel a *frq* szintek oszcillációjának időbeli eltolódása a WCC aktivitásának fázisváltozásával járhat, és, ahogy azt korábbi eredményeink igazolták, a WCC aktivitását annak foszforiláltsága határozza meg, megvizsgáltuk, hogy a ROS szintek és a WCC foszforilációs állapota között látunk-e összefüggést. Ahogy azt a korábbiakban már bemutattam, a WC-2 foszforiláltsága Western bloton jól megítélhető, hiszen a hiperfoszforilált fehérjeformák mobilitása kisebb a gélben, mint a nem vagy hipofoszforilált formáké. LD ciklusokban a WC-2 hiperfoszforilált formái dominálnak a világos szakaszban, míg az LD-átmenetet követően fokozatos defoszforiláció figyelhető meg (33.A ábra). Ezt a folyamatot a *wt*-ban és a *sod-1* mutánsban összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy bár kismértékben, de gyorsabb volt a defoszforiláció SOD-1 hiányában. Ahogy korábban már láttuk, a WCC defoszforilációját a transzlációt gátló CHX-del történő kezelés meggyorsítja. Ilyen körülmények mellett a két törzs között a defoszforiláció sebességének különbsége még kifejezettebb volt (33.B ábra).

A WCC defoszforilációjában, ahogy korábban láthattuk, alapvető szerepet játszik a PP2A. Ezen kívül különböző organizmusokban összefüggést találtak a ROS szintek és a PP2A aktivitása között (207-210). Ebből kiindulva teljes sejtlizátumokban PP2A aktivitást mértünk, ami a *sod-1* mutánsban szignifikánsan magasabb volt, mint a *wt*-ban, és menadion kezelésre tendenciózus emelkedés volt kimutatható (33.C ábra). A következő kérdés az volt, hogy a magasabb ROS szinteknél tapasztalt emelkedett PP2A aktivitás hozzájárul-e a WCC gyorsabb defoszforilációjához, és ezáltal korábbi aktiválásához a cirkadián ciklus során. A ROS szint gyors emelése céljából a folyékony kultúrákat a sötét fázis elején (ZT13) nagy koncentrációjú (300 μ M) menadionnal kezeltük, majd két órával később betakarítottuk. Az ezekből a kultúrákból nyert lizátumokat 10 percig 37 °C-on inkubáltuk, és követtük a WC-2

foszforilációjának alakulását. A 33.D ábrán látható, hogy míg a menadionnal nem kezelt sejtek lizátumában gyakorlatilag nem változott a WC-2 foszforiláltsága az inkubáció során, addig a kezelt sejtek mintáiban a kis mobilitású fehérjeformák mennyisége jelentősen redukálódott. A folyamat gátolható volt a PP2A specifikus gátlószerevel, okadánsavval, ami egyértelműen arra utal, hogy a megnövekedett PP2A aktivitás felelős a gyorsabb defoszforilációért a menadionnal kezelt sejtek mintáiban.



33. ábra: A ROS szint befolyásolja a WCC PP2A-függő defoszforilációját

A) A *sod-1* mutánsban a ciklus sötét fázisában gyorsabb a WC-2 defoszforilációja, mint a *wt*-ban. Az LD-ciklusban (12:12 óra) növény kultúrákat a jelzett időpontokban takarítottuk be, majd a teljes sejtextraktumokat Western bloton anti WC-2 antitesttel analizáltuk. Reprezentatív blot (n=4). TP: TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll) **B)** CHX kezelés hatására gyorsul a WC-2 defoszforilációja és a *sod-1* mutáns és a *wt*-ú törzs közötti különbség kifejezettebbé válik. Az **A)** pontnál leírtaknak megfelelően zajlott a kísérlet, annyi különbséggel, hogy az utolsó LD-váltáskor a kultúrákhoz 10 µg/ml CHX-et adtunk. **C)** A ROS szint befolyásolja a PP2A aktivitást. A kultúrákat állandó világosban inkubáltuk, majd a teljes sejtextraktumok PP2A aktivitását mértük. Az aktivitásokat a menadionnal nem kezelt *wt*-ú minta aktivitásához viszonyítottuk. (n=4, egymintás t-próba) **D)** A WC-2 *in vitro* defoszforilációja gyorsabb a menadionnal kezelt kultúrák mintáiban. Az LD-ciklusokban növény folyékony kultúrák egy részéhez ZT13 időpontban 300 µM menadiont adtunk, majd azokat két órával később (ZT15) betakarítottuk. A lizátumokat a feltüntetett ideig 37 °C-on inkubáltuk okadánsav (OK, 10 nM) jelenlétében vagy anélkül, és Western bloton elemeztük a WC-2 foszforilációját. A nyíl a hiperfoszforilált WC-2 formára mutat. TP: TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll). Reprezentatív kísérlet (n=3). **E)** A menadion a PP2A-függő WC-2 defoszforilációt befolyásolja. A kísérlet a feltüntetett törzsekkel az **A)** pontban ismertetettnek megfelelően folyt, annyi változtatással, hogy a kultúrák egy részéhez (+MEN) ZT11-ben 300 µM menadiont adtunk, majd az LD átmenetkor minden kultúrát 10 µg/ml CHX-del kezeltünk. (n=3)

A következő kísérletekben a PP2A regulátoros alegységét nem tartalmazó *rgb-1* mutánsban vizsgáltuk a WC-2 defoszforilációját a ciklus sötét fázisában. A defoszforiláció gyorsítására itt is CHX-et adtunk a kultúrákhoz. Már menadion nélkül is jelentősen lassult defoszforiláció volt tapasztalható a mutánsban a *wt*-hoz képest, és míg menadion hatására a defoszforiláció tovább gyorsult a *wt*-ban, addig az *rgb-1* törzsben nem történt kifejezett változás (33.E ábra). Mindez amellett szól, hogy a ROS szint növekedése valóban a PP2A aktivitás növelésén keresztül hat a molekuláris órára.

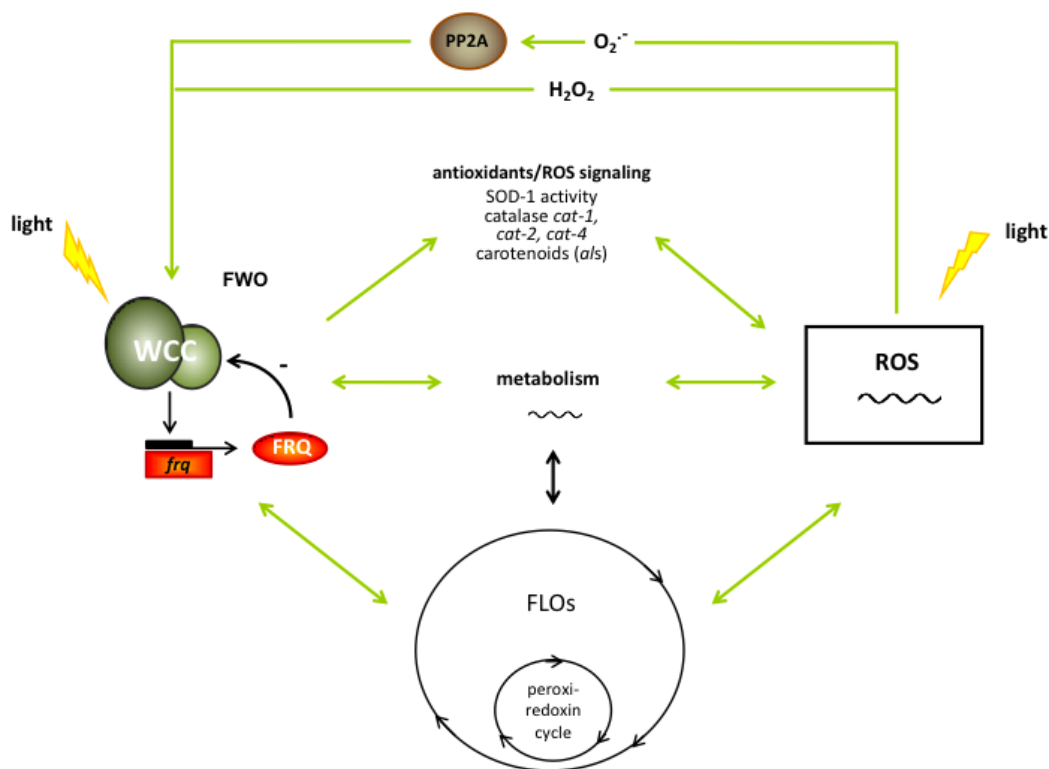
4.1.4.4. Összefoglalás és továbbvezető gondolatok

Kimutattuk, hogy a bazális és az emelkedett ROS termelés egyaránt hatással van a cirkadián óra működésére mind a külső körülmények ciklikus változásai esetén, mind állandó környezeti viszonyok mellett. A különböző ROS formák közül e folyamatban elsősorban a O_2^- szerepét igazoltuk. O_2^- alapvetően két úton képződhet *Neurospora*-ban, NOX aktivitás útján, illetve a metabolizmus során. A NOX mutánsokban azonban nem láttunk a *wt*-tól eltérő ritmust. Ennek ellenére ezen enzimek szerepét az óraszabályozásban nem zárhatjuk ki teljesen, hiszen lehetséges, hogy kompenzálni képesek egymás funkciójának kiesését. A kérdést *nox-1*, *nox-2* kettős mutáns előállításával és vizsgálatával lehetne tisztázni. Mindenesetre a kompenzáció ellen szól, hogy a két mutánsnak igen eltérő a fenotípusa, azaz az enzimek sejtműködésben betöltött funkciója is jelentősen különbözhet (198). Eddigi megfigyeléseink tehát, beleértve a hőmérsékletválaszt is, inkább azt valószínűsítik, hogy a metabolizmus során keletkező O_2^- szint a meghatározó az óra szabályozása szempontjából. Eredményeink szerint az óra szabályozásában szerepet játszik a *sod-1* aktivitás is. Itt is felmerülhet a két SOD enzim kompenzációs együttműködésének lehetősége, bár a SOD-1 funkció kiesésének SOD-2 általi kompenzációja valószínűtlen, hiszen a két enzim sejten belüli lokalizációja részben különbözik (211).

Kimutattuk azt is, hogy a ROS szint befolyásolja a PP2A aktivitását. Az eddigiek alapján egy olyan modell rajzolódik ki, ami szerint a ROS szint emelkedése, növelve a PP2A aktivitását és ezáltal gyorsítva a WCC defoszforilációját, képes korábbra ütemezni a konidizációs fázist és rövidíteni a cirkadián periódust. Yoshida és munkatársai egy másik lehetőséget vetettek fel a ROS szint és a molekuláris óra közötti kölcsönhatást illetően (203). *In vitro* rendszerben, rekombináns fehérjék alkalmazásával azt találták, hogy H_2O_2 fokozza a WCC DNS-hez való kötődését, és feltételezték, hogy ez a folyamat áll *in vivo* is az aktivitás fokozódás hátterében. Bár a mi eredményeink nem erősítették meg ezt a mechanizmust, nem

zárható ki, hogy a ROS szintek a PP2A aktivitás befolyásolása mellett a LOV doménre közvetlenül hatva is befolyásolják a molekuláris órát.

A ROS szintek hatásával kapcsolatos eredményeink egy érdekes humán megfigyeléssel is kapcsolatba hozhatók. Jól ismert tény, hogy a kor előrehaladtával koraibbá válik az alvási fázis. Elképzelhető, hogy ebben a folyamatban szerepet játszik az idős korban csökkent antioxidáns aktivitás, és az ezzel járó ROS szint növekedés óra működést módosító hatása.



34. ábra: A ROS termelés és az időmérés közötti kölcsönhatások lehetőségei *Neurospora crassa*-ban

Részletes magyarázat a szövegben. FWO = FRQ/WC-based oscillator, FLO = FRQ-less oscillator

A ROS szintek és a belső időmérés közötti kölcsönhatás, mint ahogy arra már a bevezetőben is utaltam, kétirányú és igen sokrétű lehet. A főbb kölcsönhatási lehetőségeket a 34. ábra foglalja össze. A klasszikus TTFL alapú *Neurospora* oszcillátor egyrészt közvetlenül, a ROS homeosztázist befolyásoló faktorok (pl. katalázok, karotinoidok) expressziójának szabályozásán keresztül, másrészt közvetve, a metabolizmust és a morfogenezist befolyásolva is szabályozza a ROS szintek időbeli alakulását. Kitüntetett szerepe lehet a fényhatásnak a ROS és az óra közötti kölcsönhatásban, ugyanis a fény a ROS szintek és az óra egyaránt fontos regulátora. A ROS szintek emelkedése segíti a nem-klasszikus oszcillátorok (FLO-k)

működéséhez köthető ritmusos fenotípus megjelenését is (42, 212). A korábban már említett ritmusos peroxiredoxin aktivitás *Neurospora*-ban is részt vehet a ROS szintek alakításában, és ritmusának nem feltétele, de szabályozója az FWO (96). Egyre több megfigyelés támasztja alá a metabolizmus és a ritmus kétirányú szoros kölcsönhatását. Az FWO időben koordinálja a metabolikus folyamatokat és ezáltal a ROS termelést is, ugyanakkor a metabolikus környezet változásai gyakran közvetlenül, poszttranszlációs mechanizmusokra hatva módosítják a metabolizmus időbeliségét, és így a ROS termelés ritmusát is. Ilyenkor a ROS szint változása, visszahatva a klasszikus oszcillátorra, segíthet a cirkadián óra és a metabolizmus szabályozásának szinkronizálásában.

4.1.5. A RAS2 monomer G fehérje szerepe az óraműködés metabolikus kompenzációjában (11. közlemény)

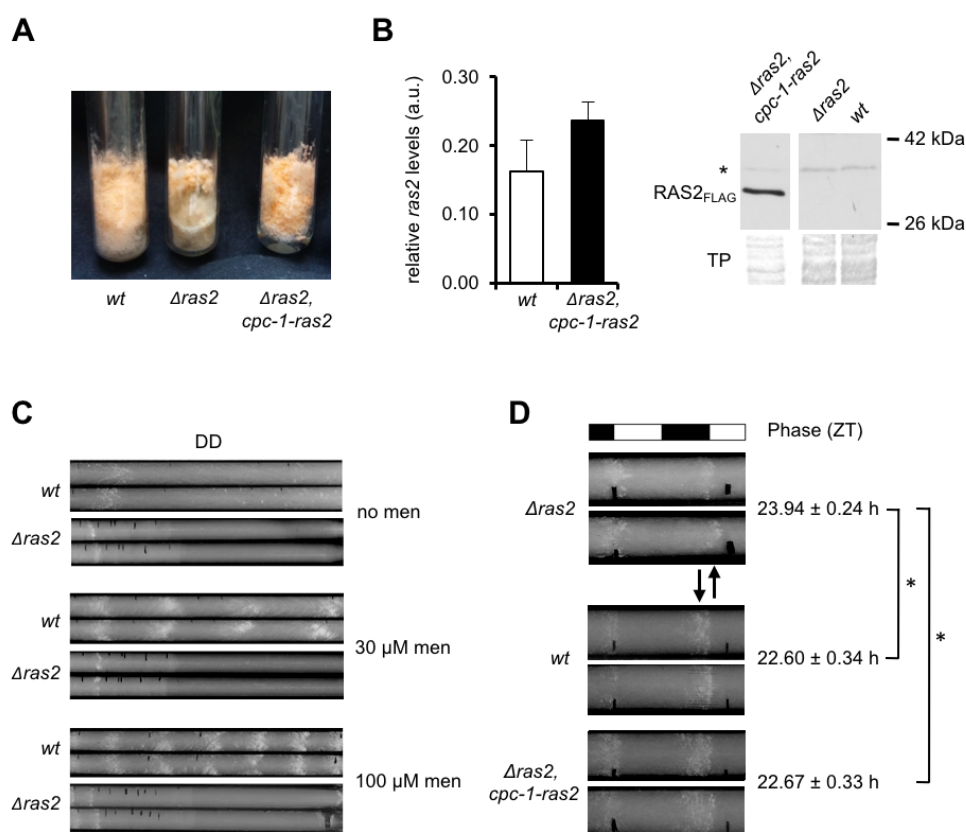
Az előző fejezetben bemutatott tanulmány mellett számos, különböző organizmusokon végzett vizsgálat eredménye mutatott rá a cirkadián időmérés és a metabolizmus közötti kapcsolatra. E kölcsönhatás egy fontos jellemzője a metabolikus kompenzáció, ami azt jelenti, hogy a táplálék ellátottságtól, és így a metabolikus folyamatok jellegétől és intenzitásától független a cirkadián ritmus periódusa. Egyelőre viszonylag keveset tudunk arról, hogy milyen molekuláris történések állnak a metabolikus kompenzáció hátterében. *Neurospora*-ban a CSP-1 (conidial separation 1) nevű transzkripciós represszort azonosították, mint a különböző cukorszintekhez való adaptáció egyik kulcs faktorát (213). A felállított modell alaptétele, hogy a WCC által szabályozott módon expresszáldó CSP-1 gátló faktorként visszahat a *wc-1* transzkripcióra. Általános jelenség, hogy a glükóz szint emelkedése a transzlációt serkenti, ami önmagában a WC-1 szintézis növekedését is maga után vonná. A CSP-1 általi negatív visszacsatolás — csökkentve a rendelkezésre álló *wc-1* RNS mennyiséget — viszont kompenzációt biztosíthat a megemelkedett transzlációs aktivitás ellenére.

Figyelmünk azért irányult a RAS-mediálta útvonalak felé, mert azokról élesztőben ismert volt, hogy központi szerepet játszanak a glükóz szint érzékelésében. Tekintettel arra, hogy *Saccharomyces cerevisiae*-ben és *Neurospora*-ban ugyanaz a két RAS (RAS1 és RAS2) altípus található, ugyanakkor az élesztővel ellentétben *Neurospora*-ban igen jól jellemzett a molekuláris óra működése, kézenfekvőnek tűnt a RAS szignalizáció és az óra kölcsönhatását *Neurospora*-ban vizsgálni.

A RAS monomer G fehérjék jellemzően több olyan folyamat szabályozásában szerepelnek, amelyeket a cirkadián óra is regulál, ilyenek például a sejtnövekedés, a metabolizmus, illetve az onkogén transzformáció (214, 215). Néhány, a RAS szignalizáció és a cirkadián óra közötti kölcsönhatásra utaló konkrét adat már vizsgálataink kezdetekor is ismert volt. Kimutatták, hogy az óra befolyásolja a RAS fehérjék expresszióját különböző emlős szövetekben (216-218), illetve hogy a RAS-mediálta útvonalak az óra kimenetét képezhetik vagy hathatnak kimeneti utakra (219-227). *Neurospora*-ban a RAS-1 fehérje aktiváló mutációja (*bd* törzs) mellett minimál táptalajon is detektálható konidizációs ritmus, e törzsben a *wc-1* expressziót jobban serkenti a megvilágítás (202), és ahogy az előző fejezetben ismertettük, a konidizációs fázis nagyobb hőmérsékletérzékenységet mutat (228). *Drosophila*-ban a pozitív komplex CLOCK/CYCLE aktivitását szabályozza a RAS (229), egérben pedig a dexametasonnal indukálható RAS fehérje (DEXRAS1) szerepelhet az óra bemeneti faktoraként (230-233). Ráksejtekben az onkogén RAS részt vesz az óraműködés elnyomásában (234), egér SCN-ben pedig kimutatták, hogy a RAS szignalizáció, az ERK-re és a glikogén szintetáz kinázra hatva, a periódus regulátora (235). A RAS mediálta útvonalak és az óraműködés közötti kölcsönhatásokra vonatkozó soktérű adat, valamint a metabolizmus és a RAS szignalizáció élesztőben ismert összefüggése alapján merült föl bennünk a kérdés, hogy vajon a cirkadián óra metabolizmus általi szabályozásában lehet-e szerepe a RAS2 fehérjének.

4.1.5.1. A RAS2 mutáció hatása a cirkadián ritmusra *Neurospora crassa*-ban

Vizsgálatainkhoz a *Neurospora* Genom Projekt keretében előállított $\Delta ras2$ (FGSC 12467) törzset használtuk, amelynek fenotípusa megegyezett a korábban *ras* mutánsként jellemzett *smco7* törzs fenotípusával (236). Agar tartalmú táptalajon a törzs kevés légmicéliumot és ennek megfelelően viszonylag kismennyiségű konídiumot fejleszt, amik félhold alakban rendeződnek a ferde agar felső részére (35.A ábra), míg folyékony médiumban a lassú, koloniális (labdaszerű) növekedés jellemző rá. Annak bizonyítására, hogy valóban a *ras2* génhiány felelős ezekért a morfológiai jegyekért, létrehoztunk egy olyan törzset, ami a $\Delta ras2$ háttér mellett a *cpc-1* promóter irányításával expresszálja a RAS2 FLAG peptiddel megjelölt változatát. A $\Delta ras2$, *cpc-1-ras2* törzsben a vadtypushoz hasonló mennyiségben detektáltunk *ras2*-specifikus RNS-t, és az anti-FLAG antitest egy, a vártnak megfelelő nagyságú fehérjét ismert fel Western bloton (35.B ábra). A fúziós fehérje expressziója révén a $\Delta ras2$ háttér mellett a *wt*-ra (FGSC 2489) jellemző fenotípus alakult ki (35.A ábra), ami arra utal, hogy a FLAG-gel jelölt fehérje funkcionális szempontból megfelel az endogén RAS2-nek.



35. ábra: A RAS2 hiányának hatása a konidizációs ritmusra

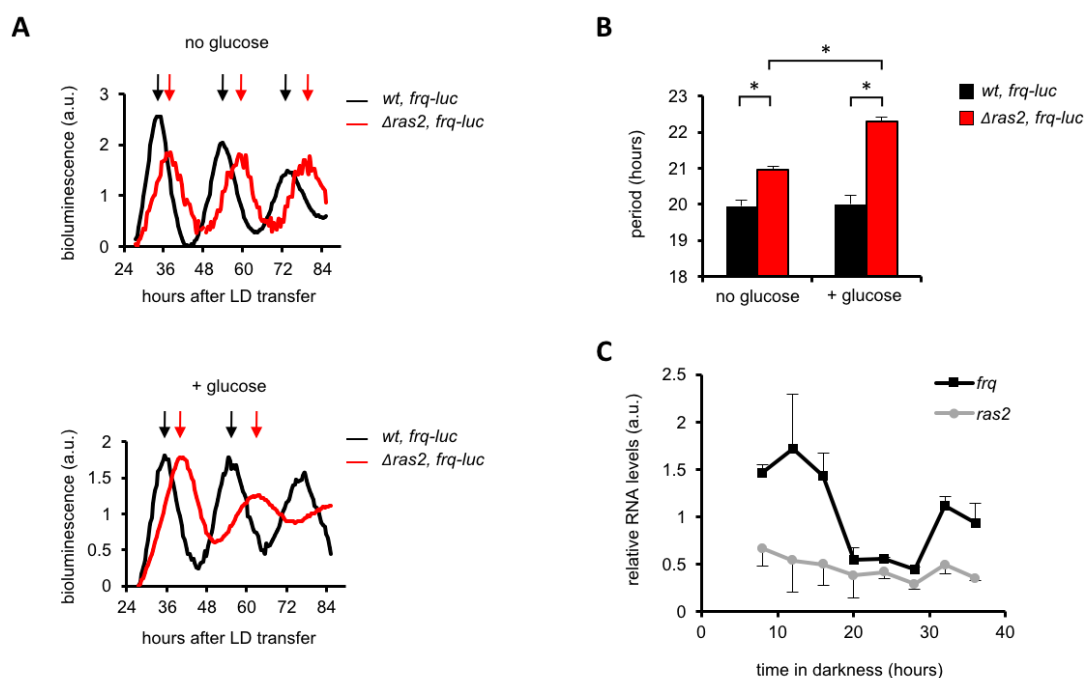
A) A $\Delta ras2$ *wt*-től eltérő fenotípusa és a növekedési defektus kompenzálása a RAS2_{FLAG} heterológ expressziója révén. Reprezentatív ferde agar csövek képe. **B)** A RAS2_{FLAG} expressziójának vizsgálata. Bal ábrarész: A *ras2* RNS actin-hoz viszonyított kifejeződése ferde agar kultúrákban (n=4). Jobb ábrarész: Világosban nött folyékony kultúrák sejtextraktumainak Western blot analízise anti-FLAG antitesttel. A csillag aspecifikus fehérjecsíkot jelöl, TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll). **C)** Menadion hatására sem jelenik meg konidizációs ritmus $\Delta ras2$ DD kultúrákban. A futató cső táptalaja a feltüntetett koncentrációban tartalmazott menadiont. Reprezentatív csövek képei. **D)** LD ciklusokban fáziskésés tapasztalható a $\Delta ras2$ -ben. A feltüntetett törzsek futatócsövei mellett a konidizációs csúcs (nyíl) fázisát adjuk meg. A jobb összehasonlíthatóság érdekében a csövek képét úgy állítottuk be, hogy a napi növekedési szakaszok azonosak legyenek. Reprezentatív csövek képei.

A cirkadián fenotípus vizsgálatára először állandó körülmények mellett végeztünk futatócsöves vizsgálatot. Az *smco7* törzzsel kapcsolatban korábban leírtaknak megfelelően a $\Delta ras2$ igen lassú növekedést mutatott. Tekintettel arra, hogy a $\Delta ras2$ nem *bd* háttérű törzs, menadiont tartalmazó futatócsövön vizsgáltuk a ritmust. Míg a kontrollban viszonylag alacsony menadion koncentráció (30 μ M) mellett is kifejezett volt a ritmusos konidizáció, a mutánsban nem jelentek meg konídiumcsomók még 100 μ M menadion jelenlétében sem (35.C ábra), azaz megváltozott a ritmus ROS érzékenysége. Ez volt az első megfigyelés, ami arra utalt, hogy a *ras2* mutáció hatással van a cirkadián oszcillátorra vagy annak kimenetére.

Mivel a változó környezeti körülmények erőteljesebb ritmus generáló hatással bírnak, a futtatócsöves vizsgálatokat 12:12 óra L/D-ciklusokban folytattuk. Ilyen körülmények mellett a $\Delta ras2$ -ben is ritmusos spóráképzés volt megfigyelhető, de a konidizáció késett a *wt*-hoz képest (35.D ábra). A $\Delta ras2$, *cpc-1-ras2* törzsben viszont a *wt*-nak megfelelő fázist detektáltunk, ami egyrészt igazolja, hogy a RAS2 hiánya volt felelős az óraműködés megváltozásáért, másrészt arra utal, hogy a fehérje FLAG epitóppal való jelölése a funkciót nem befolyásolta.

4.1.5.2. A RAS2 és a molekuláris óra közötti kölcsönhatás vizsgálata

Miután a futtatócsövön tett megfigyelések arra utaltak, hogy a RAS2-nek szerepe lehet a cirkadián ritmus szabályozásában, a RAS2 molekuláris óraműködésre kifejtett hatását vizsgáltuk.



36. ábra: A RAS2 és a cirkadián óra kölcsönhatásának vizsgálata

A) A $\Delta ras2$ -ben hosszabb periódusú és kevésbé robusztus a *frq*-promóter aktivitásának ritmusa, mint a *wt*-ban. A feltüntetett törzsek *in vivo* luciferáz aktivitását mértük glükóz-mentes és glükóz-tartalmú táptalajon. Egy reprezentatív kísérlet párhuzamos méréseinek átlagát mutatják a görbék ($n=10-14$). A fekete és piros nyilak a megfelelő törzsben a luciferáz aktivitás maximumának megfelelő időpontokat jelölik. **B)** A periódus glükóz érzékenysége $\Delta ras2$ -ben. Az A) pontban ismertetett kísérletek kvantitatív analízise. ($n=22-28$) **C)** A *ras2* expresszió nem mutat ritmust. A *wt*-ú törzs folyékony kultúráit az LD-átmenetet követően a feltüntetett időpontban takarítottuk be, majd a *frq* és a *ras2* RNS *actin*-hoz viszonyított expresszióját határoztuk meg. ($n=3$)

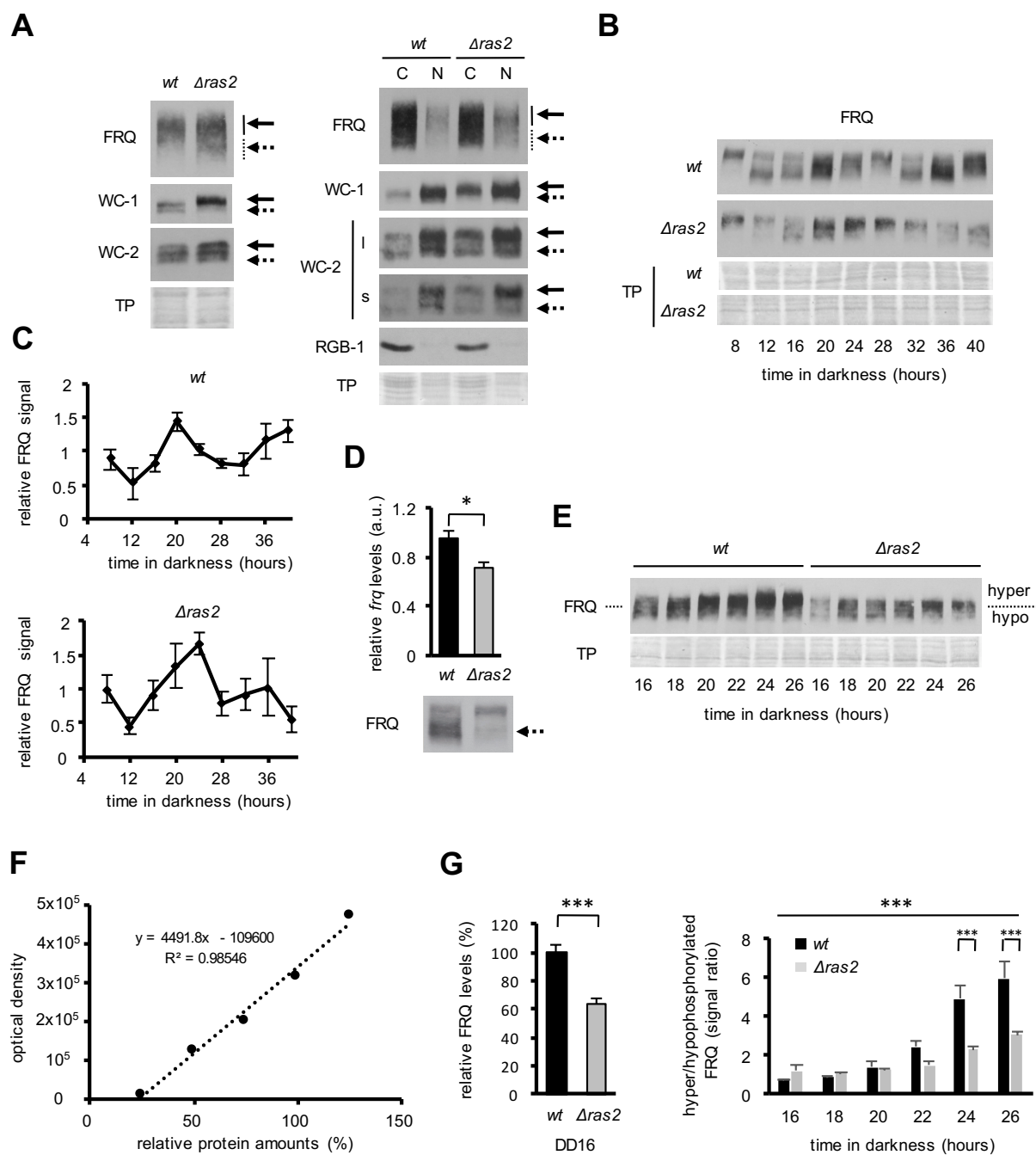
Egy olyan *ras2* génhíányos törzset hoztunk létre, amelyben a *frq* promóter által szabályozott luciferáz aktivitás alapján tanulmányozható az oszcillátorfunkció. Állandó

körülmények között detektálva a luciferáz aktivitást, *ras2* hiányában a *wt*-énál mintegy egy órával hosszabb periódust mértünk (36.A, B ábra). Ez a különbség a későbbiekben glükóztól függőnek bizonyult. Míg a *wt*-ban glükóz hozzáadása a táptalajhoz nem okozott sem a periódusban, sem a ritmus robusztusságában változást, addig a $\Delta ras2$ háttér mellett a periódus további egy órával hosszabb lett, és az oszcilláció amplitúdója kifejezetten csökkent. Mindez arra utal, hogy az óraműködés metabolikus kompenzációja a RAS2 működését igényli.

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a cirkadián óra hatással van-e a *ras2* kifejeződésére. Az 36.C ábrán látható, hogy míg a *frq* szintek ritmikus változása jól követhető, ugyanezekben a mintákban a *ras2* RNS nem oszcillál, azaz a *ras2* nem óra által kontrollált gén.

Az órakomponensek fehérje szintű tanulmányozásával folytattuk vizsgálatainkat. Mivel a periódushosszal kapcsolatos eredményeink szerint a *ras2* hiánya glükóz jelenlétében erőteljesebb fenotípussal párosul, folyékony kultúráink médiuma glükózt tartalmazott. Amennyiben a kultúrákat állandó világosban inkubáltuk, minimális FRQ szint különbséget láttunk a $\Delta ras2$ és a *wt* között, viszont a nagyobb elektroforetikus mobilitású, hipofoszforylált, azaz frissen szintetizált fehérjeformák egyértelműen nagyobb mennyiségben voltak jelen $\Delta ras2$ -ben, mint a *wt*-ban (37.A ábra). A WC-1 expressziója is emelkedett volt a mutánsban, és mindkét WC fehérje hiperfoszforylált formái domináltak. Ezután szubcelluláris frakcionálást végeztünk az órakomponensek sejten belüli elhelyezkedésének vizsgálata céljából. A $\Delta ras2$ magi frakciója több hipofoszforylált FRQ-et tartalmazott, míg a WC fehérjeformák esetén megint csak a hiperfoszforyláció irányába való eltolódás volt jellemző a *wt*-hoz képest (37.A ábra). Jellegzetes volt még a mutánsban a WC-1 hiperfoszforylált formájának felszaporodása a citoszolikus frakcióban. Mindezek a foszforylációs változások egy olyan modellbe illeszthetők, ami szerint *ras2* hiányában nagyobb mennyiségben jelenik meg a hipofoszforylált FRQ a magban, amiről tudjuk, hogy elősegíti a WCC foszforylációját és inaktivációját.

Az oszcillátor működésének további elemzéséhez állandó sötétben növekvő kultúrákban vizsgáltuk a FRQ szintek időfüggő változásait. Mindkét törzs mintáiban oszcillációt láttunk, ugyanakkor a mutánsban kismértékű fáziskésés, valamint, elsősorban a második napon, egyértelmű amplitúdó csökkenés volt tapasztalható (37.B, C ábra). A fáziskésést jól reprezentálta a $\Delta ras2$ DD12-es mintájában a kontrollban mértnél alacsonyabb *frq* RNS szint, valamint a bloton a frissen szintetizált, hipofoszforylált FRQ minimális mennyisége (37.D ábra).



37. ábra: Az óra komponensek expressziójának és oszcillációjának eltérése $\Delta ras2$ -ben

A) A FRQ és a WC fehérjék megváltozott expressziója és foszforilációja RAS2 hiányában. A folyékony médiumban, állandó fény mellett nőtt kultúrákból teljes sejt extraktumot (bal oldali ábrarész), illetve citoszol (C) és magfrakciót (N) készítettünk (jobb oldali ábrarész), és a felirtnak megfelelő fehérjéket Western bloton detektáltuk. Reprezentatív blot képe. A folytonos és szaggatott vonalú nyilak a hiper-, illetve hipofoszforilált fehérjeformákra mutatnak. Az RGB-1 citoszolikus markerként szolgált, TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll), l (long): hosszú, s (short): rövid filmexpozíció. **B)** A FRQ oszcilláció vizsgálata. Az LD átmenettel szinkronizált sötétben növő kultúrákat az ábrán jelölt időpontokban takarítottuk be és a fehérje extraktumokat Western bloton analizáltuk. Reprezentatív blot képe. **C)** A FRQ szintek cirkadián változása $\Delta ras2$ -ben és *wt*-ban. A B) ábrarészben bemutatott vizsgálatok denzitometriás analízise. A FRQ-specifikus szignál-t az ugyanazon kísérlet mintáiban mért átlagos denzitáshoz viszonyítva adtuk meg. (n=4) **D)** DD12-ben a $\Delta ras2$ -ben alacsonyabb *frq* RNS szint és kevesebb hipofoszforilált FRQ fehérje detektálható a *wt*-hoz képest. Az RNS szint

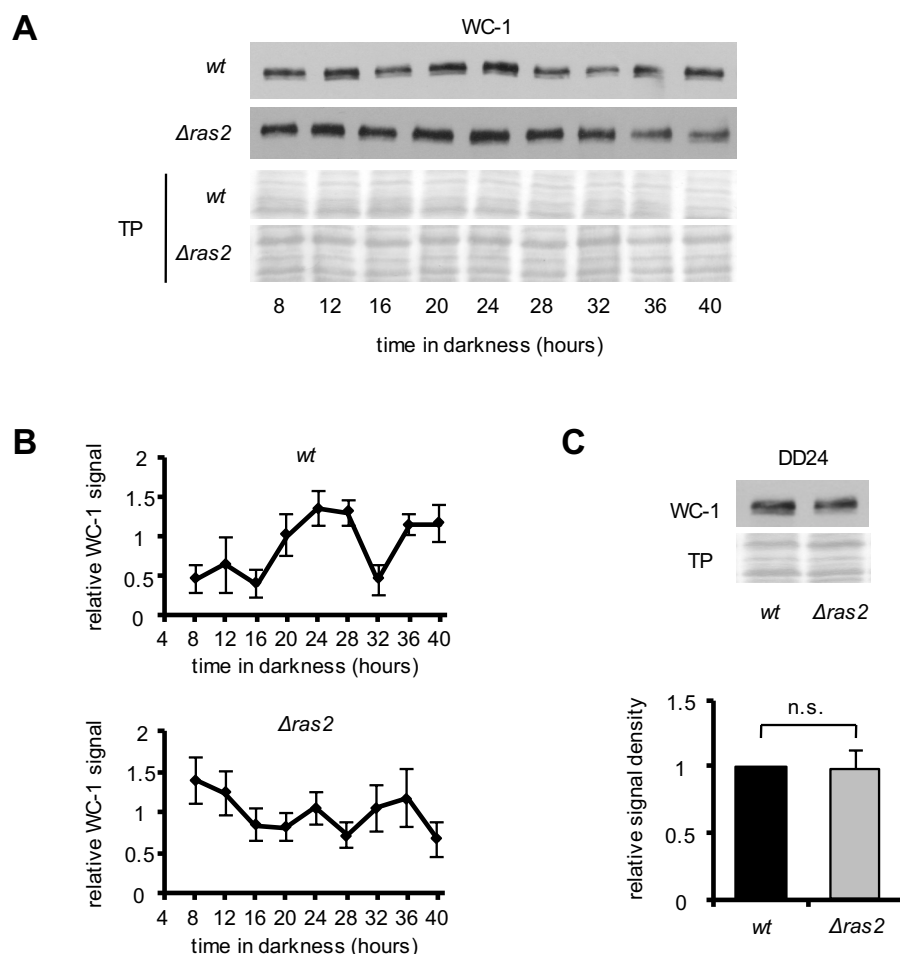
mérése valós-idejű PCR-rel (felső ábrarész) ($n=4$), a fehérje analízis Western blottal (alsó ábrarész) történt. Reprezentatív blot képe. A nyíl hipofoszforilált FRQ formára mutat. **E)** A FRQ foszforilációjának részletesebb elemzése. DD16 és DD26 között két óránként vettünk mintát a folyékony médiumban növekvő kultúrákból, majd a fehérjeextraktumokat Western blottal elemeztük. Reprezentatív blot képe. A szaggatott vonal a DD16 időponthoz tartozó FRQ jel elektroforetikus mobilitási tartományának felét jelöli, ami szerint hiper- és hipofoszforilált formákat különböztettünk meg. TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll). **F)** A FRQ fehérjeszignál kalibrációja. Emelkedő mennyiségű (25-125 %) *wt*-ú fehérjemintát analizáltunk Western bloton. A FRQ-specifikus fehérje csíkokhoz tartozó denzitásokat ábrázoltuk, majd regressziós egyenest illesztettünk a pontokra. **G)** A FRQ expresszió és foszforiláció kvantifikálása. Bal oldali ábrarész: A FRQ mennyiségének meghatározása DD16-os fehérjemintákon az F) ábrarészben bemutatott kalibrációs egyenes alapján. 100%-nak tekintettük a *wt*-ú mintákban mért átlagos denzitást ($n=4$, ***: $p \leq 0,005$, párosított t-próba). Jobb oldali ábrarész: A hiper- és hipofoszforilált FRQ formákat (E) ábrarész) denzitometriásan hasonlítottuk össze a feltüntetett időpontokban ($n=3$, ***: $p \leq 0,005$, szignifikáns idő x törzs interakció (ANOVA), Tukey HSD teszt).

A *wt*-ban DD16-tól kezdve a FRQ egyre fokozódó foszforilációja figyelhető meg, ezért a két törzs közötti foszforilációs eltérés alaposabb vizsgálatához DD16 és DD26 között nagyobb felbontásban hasonlítottuk össze a különböző FRQ formák mennyiségét (37.E ábra). A $\Delta ras2$ -ben a FRQ szint minden időpontban alacsonyabb volt, mint a kontrollban. DD16-ban kalibráció segítségével becsültük a teljes FRQ mennyiség arányát a két törzsben, eszerint a FRQ expresszió mintegy 60 %-a a *wt*-ban mért szintnek és a foszforilációból fakadó mobilitás csökkenés is jelentősen elmaradt a *wt*-ban tapasztalttól (37.F, G ábra). Meghatároztuk az erősebben és kevésbé foszforilált formák arányát a különböző időpontokban, és a statisztikai elemzés szignifikáns idő x törzs interakciót mutatott. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a RAS2 hatással van a FRQ mennyiségének és foszforilációjának alakulására állandó körülmények, azaz működő óra mellett is.

Irodalmi adatok szerint a WC-1 mennyiség csak kismértékben oszcillál (178, 237), ezt tapasztaltuk mi is a *wt*-ú mintáinkon (38. A, B ábra). Ezzel szemben $\Delta ras2$ -ben, bár a WC-1 szintje hasonló volt, mint a kontrollban (38.C ábra), nem tudtunk ritmikus WC-1 expressziót detektálni. Ez megint csak arra utal, hogy a molekuláris óra működése kevésbé robusztus RAS2 hiányában.

Mivel a FRQ foszforilációja hatással van a fehérje sejtmagba kerülésére, az pedig alapvető a negatív visszacsatolás szempontjából, a következőkben a FRQ szubcelluláris megoszlását vizsgáltuk a cirkadián ciklus folyamán (39. ábra). Az LD átmenetet követően a FRQ mennyisége mind a magban, mind a citoszolban csökken, majd DD16-ban, az újszintézissel egyidejűleg, jelentős nukleáris frakció detektálható, de ennek szintje DD20-ra már újra csökken. A $\Delta ras2$ -ben DD16-ig hasonló tendencia tapasztalható, de már ekkor

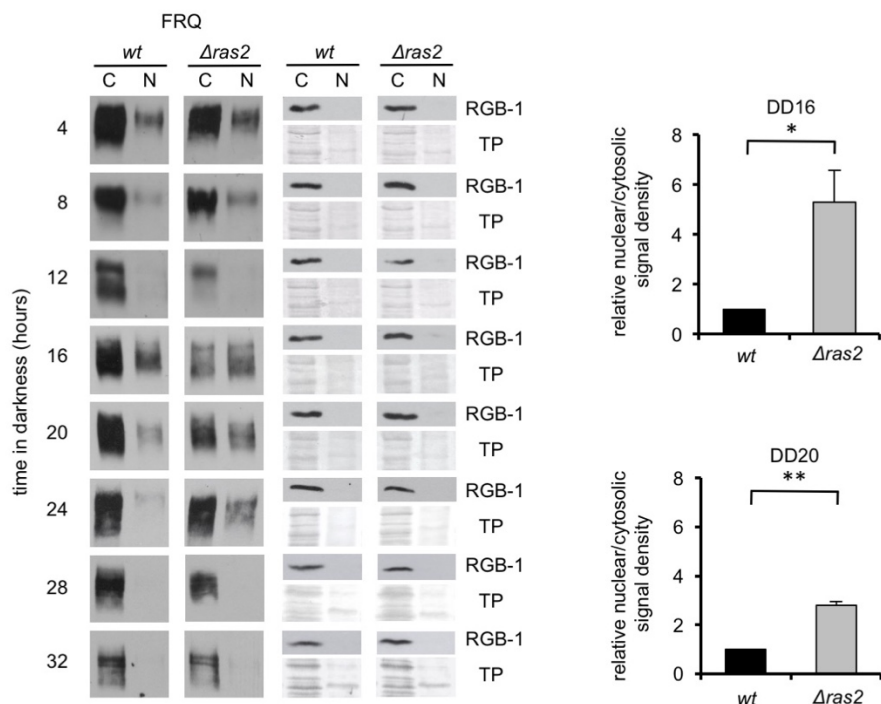
nagyobb a magi FRQ-frakció, mint a vadttípusban, és az jelentős marad egészen DD24-ig. A két törzs közötti különbség statisztikai elemzése szignifikáns törzs hatást mutatott.



38. ábra: A WC-1 expressziójának összehasonlítása állandó körülmények között $\Delta ras2$ -ben és *wt*-ban

A) A WC-1 szintek alakulása DD8 és DD40 időpontok között a két törzsben. Az LD átmenettel szinkronizált sötétben növekvő kultúrákat az ábrán jelölt időpontokban takarítottuk be és a fehérje extraktumokat Western bloton analizáltuk. **B)** Relatív WC-1 szintek összehasonlítása *wt*-ban és $\Delta ras2$ -ben. Az előző pontban bemutatott kísérlet blotjain történt a denzitometriás mérés, a WC1-specifikus szignál-t az ugyanazon kísérlet mintáiban mért átlagos denzitáshoz viszonyítva adtuk meg ($n=3-6$). **C)** DD24-ben hasonló a WC1 expresszió a két törzsben. Felső ábrarész: A feltüntetett törzsek kultúráit a fény-sötétség átmenetet követően 24 órával takarítottuk be, és a fehérjeextraktumokat Western blot segítségével analizáltuk. Reprezentatív blot képe. Alsó ábrarész: A Western bloton detektált szignál denzitometriás analízise (l. előző pont). ($n=4$, egymintás t-próba; n.s. = nem szignifikáns).

A bemutatott eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a RAS2 részt vesz a FRQ sejten belüli elhelyezkedésének szabályozásában.



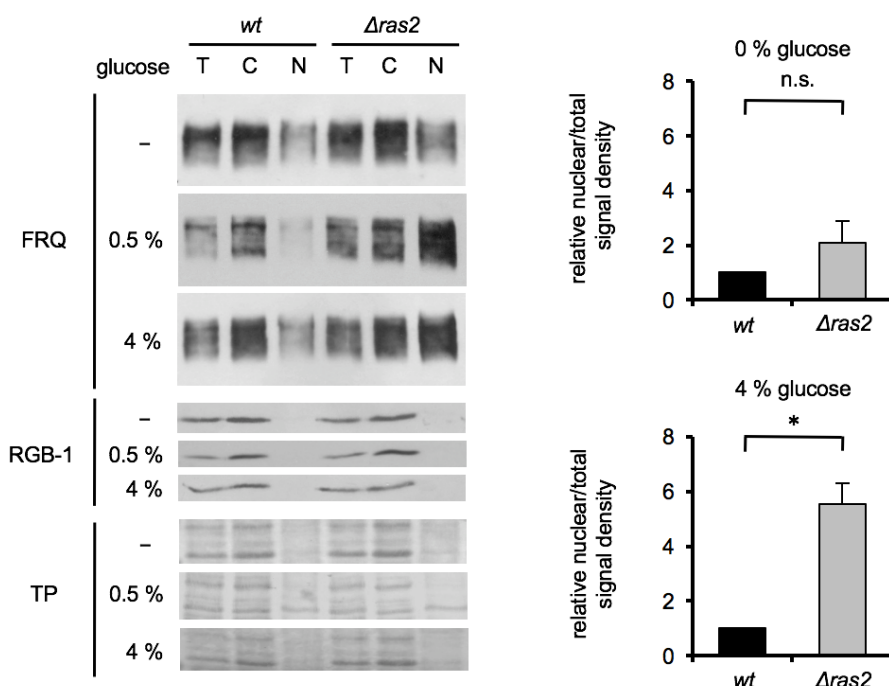
39. ábra: A RAS2 szerepet játszik a nukleáris FRQ szintek szabályozásában

A) DD4 és DD32 között négy óránként vettünk mintát a folyékony médiumban növekvő kultúrákból, majd szubcelluláris frakcionálást követően a fehérjeminták FRQ szintjét Western blot alapján elemeztük. Bal oldali ábrarész: reprezentatív Western blotok képe. C: citoszol frakció, N: magi frakció; az RGB-1 citoszolikus markerként szolgált, TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll). Jobb oldali ábrarész: A DD16 és DD20 minták esetében a magi és citoszolikus szignálok arányát számoltuk. Ugyanazon kísérletben a *wt*-ban megállapított arányt tekintettük 1-nek ($n=3-4$, **: $p \leq 0,01$, egymintás t-próba).

4.1.5.3. A molekuláris óra glükózra adott válaszát befolyásolja a RAS2

Tekintettel arra, hogy a RAS2 cirkadián fenotípusra való hatása glükózfüggőnek bizonyult, a következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a FRQ expressziójára és szubcelluláris megoszlására másként hat-e a glükóz a $\Delta ras2$ -ben, mint *wt*-ban. Világosan növekvő kultúrákat egy éjszakán át glükózmentes médiumban inkubáltunk, majd 0,5%, illetve 4% glükózt adtunk hozzá. Az alacsonyabb glükózszint mellett *wt*-ban gyakorlatilag nem változott a FRQ mag és citoszol közötti megoszlása, míg $\Delta ras2$ -ben a fehérje magban való felhalmozódása volt megfigyelhető (40. ábra). A magasabb (4%) glükózkoncentráció hatására mindkét törzsben jelentősen nőtt a hipofoszforilált FRQ mennyisége, de $\Delta ras2$ -ben ennek jóval nagyobb hányada jutott a magra, mint a *wt*-ban. Mivel a magas glükózkoncentráció számottevő ozmotikus terhelést jelent, a glükóz hatásának specifikusságát vizsgálandó, megismételtük a kísérletet ugyanolyan ozmotikus koncentrációban adott NaCl-dal is, de az nem befolyásolta a nukleáris FRQ szintet $\Delta ras2$ -ben (nem bemutatott kísérlet). Eredményeink tehát arra utalnak,

hogy a RAS2 részvételével működő útvonal szerepet játszik az oszcillátorműködés változó glükóz mennyiségekhez való alkalmazkodásában.

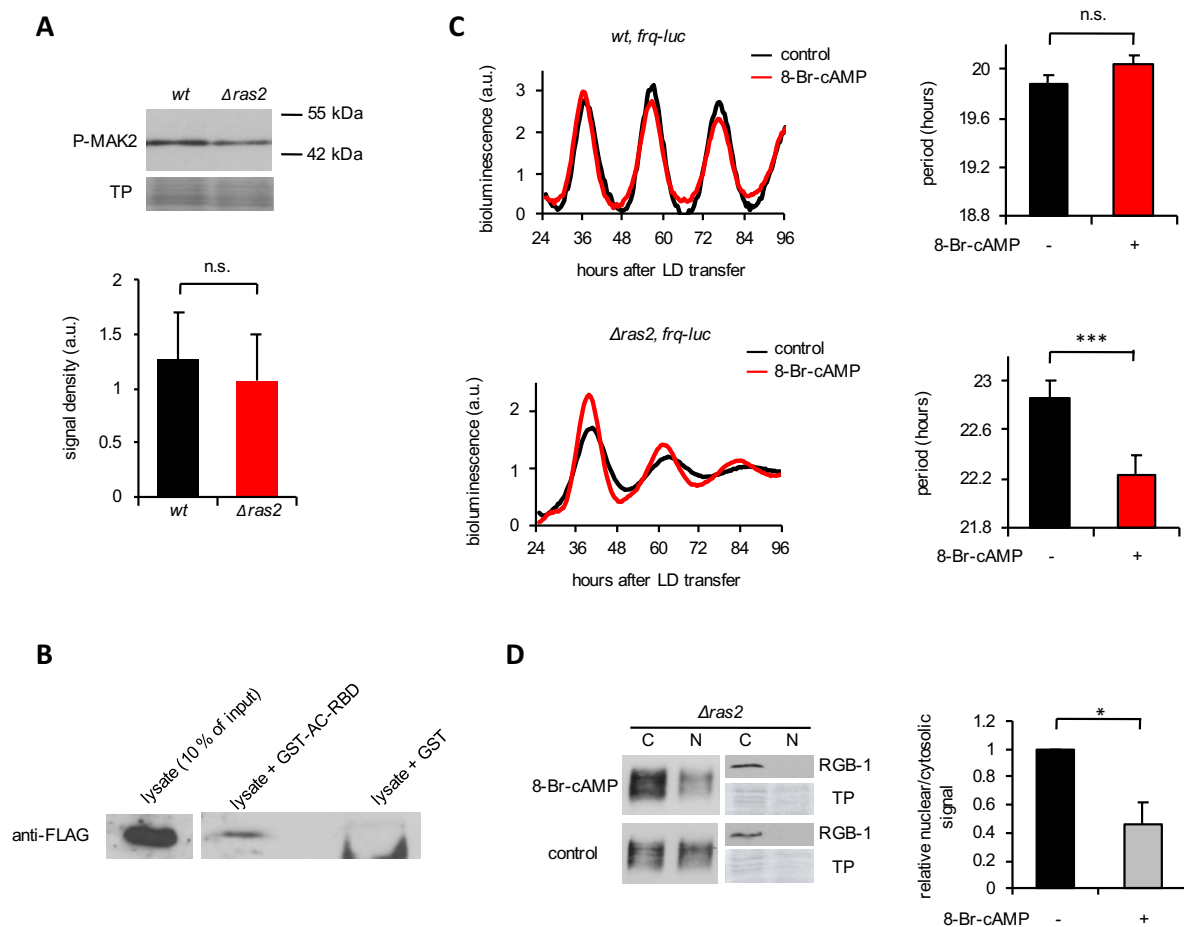


40. ábra: A RAS2 gátolja a FRQ glükóz hatására bekövetkező magi akkumulációját

A standard médiumban, állandó világosban növesztett gombát 16 órán át glükóz-mentes médiumba oltottuk át, majd 0,5 %, illetve 4 % glükózt adtunk a kultúrákhoz és azokat további 4 órát inkubáltuk. Bal oldali ábrarész: reprezentatív blotok képei. A FRQ szinteket a teljes (T), a citoszolikus (C) és magi (N) frakciókban Western blottal analizáltuk. Az RGB-1 citoszolikus markerként szolgált, TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll). Jobb oldali ábrarész: Densitometriás analízis. A magi és citoszolikus szignálok arányát számoltuk, és ugyanazon kísérletben a wt-ban megállapított arányt tekintettük 1-nek (n=4, egymintás t-próba, n.s. = nem szignifikáns).

4.1.5.4. A cirkadián óra és a RAS2 közötti lehetséges szignalizációs utak vizsgálata

Saccharomyces cerevisiae-ben a RAS2 mind a MAPK útvonalat, mind az adenilátcikláshoz kapcsolt szignalizációs utakat befolyásolja (238-240). *Neurospora*-ban a MAPK ortológot MAK2-nek hívják (241, 242). Összehasonlítottuk az aktív, azaz foszforilált MAK2 szinteket a wt-ban és a $\Delta ras2$ -ben, de nem tapasztaltunk különbséget (41.A ábra), ami arra utal, hogy valószínűleg nem a MAK2 közvetíti a RAS2 hatását a mi kísérleti körülményeink mellett. Ezután az adenilátcikláshoz kapcsolt szignalizáció szerepét vizsgáltuk, és kimutattuk, hogy az adenilátcikláz *E. coli*-ban expresszált RAS-kötő doménje *in vitro* specifikusan köti a RAS2-t, ami felveti annak lehetőségét, hogy a RAS2 és az adenilátcikláz *in vivo* is komplexet képez (41.B ábra).



41. ábra: A RAS2 és az óra közötti szignalizáció vizsgálata

A) A P-MAK szintek nem különböznek *wt*-ban és $\Delta ras2$ -ben. Világosan nőtt kultúrák teljes sejtextaktumainak vizsgálata Western bloton. Felső ábrarész: Reprezentatív blot képe. A P-MAK2 detektáláshoz egy anti-phospho-44/42 MAPK antitestet (Cell Signaling) használtunk. Alsó ábrarész: A blotok denzitometriás kvantifikálása ($n=5$, kétmintás *t*-próba). TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll). **B)** In vitro interakció a RAS2 és az adenilátcikláz RAS-kötő doménje között. *E. coli*-ban expresszált GST-t, illetve GST-AC-RBD-t kötöttünk glutation-agaróz gyöngyökhöz, majd azokat RAS2_{Flag}-et tartalmazó *Neurospora* extraktummal inkubáltuk, és mosást követően a fehérjéket mintapufferrel eluáltuk. A mintákat Western bloton elemeztük anti-FLAG antitest segítségével. **C)** A cAMP analóg megváltoztatja a *ras2* hiányos törzs periódusát. Bal oldali ábrarészek: A feltüntetett törzsek *in vivo* luciferáz aktivitását mértük 8-Br-cAMP jelenlétében (piros görbe), illetve anélkül (fekete görbe). Egy reprezentatív kísérlet átlagát mutatják a görbék ($n=6$). Jobb oldali ábrarészek: A kísérletek kvantitatív analízise a Crono-programmal történt. $n=19-20$, ***: $p \leq 0,005$, kétmintás *t*-próba, n.s. = nem szignifikáns **D)** A 8-Br-cAMP gátolja a FRQ glükóz-függő felhalmozódását a magban $\Delta ras2$ -ben. A kísérlet részletei és az analízis módja megegyezik a 40. ábránál leírtakkal, annyi kiegészítéssel, hogy a glükóz adását megelőzően 1 órával 1 mM 8-Br-cAMP-t vagy oldószert (control) adtunk a kultúrákhoz. Bal oldali ábrarész: reprezentatív blot képei. Jobb oldali ábrarész: Denzitometriás analízis ($n=4$, egymintás *t*-próba).

Az útvonal további elemzéséhez megvizsgáltuk, hogy a membránpermeábilis és viszonylag stabil cAMP analóg, a 8-Br-cAMP hogyan befolyásolja a *frq*-promóter működését glükóz jelenlétében. Míg *wt*-ú háttér mellett a cAMP analóg nem volt hatással a periódusra, addig a $\Delta ras2$ -ben kismértékben, de rövidebbé tette a periódushosszt (41.C ábra). Ezen kívül a

8-Br-cAMP megakadályozta *Δras2*-ben a glükóz hatására bekövetkező FRQ akkumulációt a magban (41.D ábra). Összefoglalva, eredményeink azt valószínűsítik, hogy cAMP szerepel hírvivőként a RAS2 és a molekuláris óra közötti kölcsönhatásban.

4.1.5.5. Következtetések

Eredményeink elsőként utaltak arra, hogy a RAS2 a cirkadián óra szabályozó faktora *Neurospora*-ban. Ezen kívül úgy gondoljuk, hogy a RAS2 olyan jelátviteli útvonal tagja, amely segíti a megfelelő amplitúdójú és állandó periódushosszú óraműködés fenntartását változó metabolikus körülmények esetén is. E kompenzációs mechanizmust a következő modell magyarázhatja: a környezeti glükóz szint növekedése általában a sejtek transzlációs aktivitását növeli, ami a FRQ szintézisének emelkedését is jelenti. Ugyanakkor a glükóz növeli a RAS2-PKA útvonal aktivitását. Amennyiben a PKA foszforilálja a FRQ-et (26), mérséklődik a fehérje magban való felhalmozódása és az intenzívebb FRQ szintézis ellenére nem gyorsul a negatív visszacsatolás. Mindezek eredményeként a glükóz koncentráció növekedése ellenére a periódus változatlan maradhat. Elképzelésünk jó összhangban van egy, a vizsgálatainkkal egy időben publikált elképzeléssel (243). Eszerint a FRQ aktivitását meghatározó foszforilációs történések sebessége játszik fő szerepet a periódus meghatározásában, szemben a korábbi elképzeléssel, amelyik a FRQ szintézis és bomlás egymáshoz viszonyított intenzitását tekintette elsődlegesnek.

Bár eredményeink a cAMP-PKA-közvetítette útvonal szerepét valószínűsítették, nem zárható ki, hogy hasonlóan más gombákban találtakhoz, MAP kinázok is szerepet játszanak a RAS2 aktivációt követő jeltovábbításban. Mintáinkban az Erk homológ nem tűnt meghatározónak ebből a szempontból, de más MAP kinázok (JNK, p38) részvételét nem vizsgáltuk behatóbban.

Összességében úgy gondoljuk, hogy a cirkadián óra működésének metabolikus szabályozásában a CSP1 és a nemrég jellemzett PRD-1 mellett a RAS2 tölt be fontos szerepet. Míg a CSP1 hiánya rövidíti a periódust, a *prd-1* és *ras2* mutánsokban a kontrollénál hosszabb periódus detektálható. A több pillérű és részben ellentétes irányú szabályozások egyensúlya biztosíthatja az időmérés stabilitását változó metabolikus környezet mellett. Míg a CSP1 elsősorban a WC-1 szint szabályozását irányítja (213), a PRD-1 molekuláris hatását pedig nem ismerjük (244, 245), a RAS2 a FRQ módosításán keresztül szólhat bele a folyamatba.

4.2. A humán óraműködés és annak zavarával összefüggő állapotok vizsgálata

Korábbi kísérletes munkám és az intézetben működő más munkacsoportok kiterjedt metodikai és elméleti tapasztalatai az immunbiológiai kutatások terén, valamint az ehhez kapcsolódó támogató légkör bátorított arra, hogy a cirkadián óra működésére irányuló molekuláris vizsgálatainkat humán fehérvérsejtekre is kiterjesszük. Az első ilyen témájú tanulmányunkat mutatom be a fejezet elején.

Az utóbbi időben a kronobiológiai kutatások homlokterébe került a leggyakoribb humán krónikus ritmuszavar, a szociális jetlag következményeinek vizsgálata. Ez az izgalmas, közegészségügyi szempontból is nagy jelentőségű probléma régóta érdekelt minket, így két tanulmányunk is foglalkozik vele, ezeket ismertetem a fejezet második felében.

4.2.1. Neutrofil granulociták ritmusos működésének vizsgálata

(10. és 12. közlemény)

A dolgozat bevezető fejezetében már szoltam az immunműködések és a cirkadián óra közötti kapcsolatok klinikai jelentőségéről és a szabályozással kapcsolatos néhány kísérletes eredményről. Vizsgálataink kezdetekor ismert volt, hogy a vér mononukleáris sejtfrakciójában jól detektálhatók a molekuláris óra különböző komponensei, ugyanakkor a vérben legnagyobb számban jelenlévő neutrofil granulocitákkal kapcsolatban csak igen hézagosan álltak adatok rendelkezésre.

A neutrofil granulociták a veleszületett immunitás esszenciális elemei, elsősorban bakteriális és gombás fertőzésekkel szemben nyújtanak védelmet. A mikrobákat sejtfelszíni receptoraikkal ismerik fel, ami a sejtek aktiválódásához és a mikrobák bekebelezéséhez vezet. A kórokozók elpusztításáért felelős effektor funkciók a fagocitózis, a degranuláció, a reaktív oxigénszármazékok (ROS) termelése, valamint a Neutrophil Extracellular Trap (NET) képzése. Emellett a sejtek extracelluláris vezikulákat is termelnek, melyek többek között más immunsejtek citokinszekrécióját szabályozzák (246, 247), részt vesznek a trombocita aktiválásban (248, 249), és antibakteriális hatást is kifejtene (250). Míg a neutrofil granulociták alulműködése fatális kimenetelű fertőzésekhez vezethet (251), addig ugyanezen sejtek túlműködése súlyos autoimmun és krónikus gyulladásos állapotok kialakulását idézheti elő (252, 253).

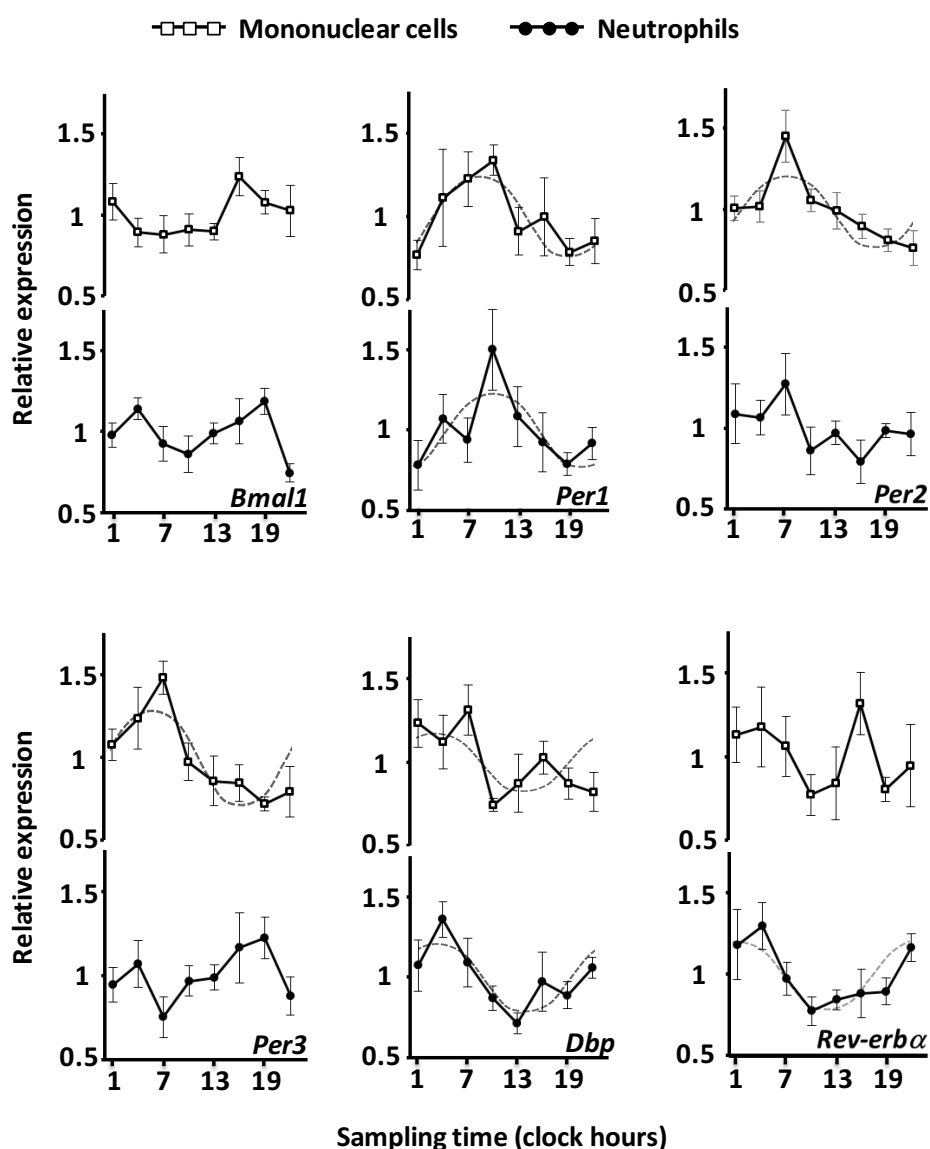
A neutrofil granulociták működésének időbeli szabályozottságára már utaltak adatok. Egéren végzett kísérletekből ismert volt, hogy a neutrofil sejtek szöveti sérülést követő vagy endotoxin hatására történő kivándorlása a vérpályából napi ritmust követ, ami elsősorban az endothelsejtek adhézíós receptorainak ritmikus kifejeződésére vezethető vissza és adrenerg szabályozás alatt áll (112). A CXCL5 nevű, epiteliális kemokin megjelenése is ritmusos a tüdőben, ami a neutrofil sejtek inflammatorikus válaszainak időbeliségét is meghatározza (254). A neutrofil granulociták egyes felszíni receptorainak és fagocita aktivitásának ritmusos voltára utaló adatok is rendelkezésre álltak (255-257). Ismert volt továbbá, hogy a neutrofil granulociták száma a vérben kis amplitúdójú napi ingadozást mutat (124, 258), és egy igen részletes, egérmodellen végzett munka eredményei arra utaltak, hogy az előregedett neutrofil sejtek vérből csontvelőbe való áramlása, azaz eliminációja is ritmusos (153). Bár ritmusos *Per1* expressziót kimutattak neutrofil granulocitában és ismert volt, hogy endotoxinra érzékeny az óragének szintje (259, 260), a nyugvó granulociták molekuláris óraműködésének elemzése nem történt meg.

Joggal merülhet fel a kérdés, hogy egy, a perifériás keringésben mindössze néhány órát tartózkodó sejtben érdemes-e az óraműködést vizsgálni, hiszen a sejtkészlet egy napon belül is többször megújul. Úgy gondolkodtunk, hogy amennyiben a keringő neutrofil granulocitákban szinkron módon működik a molekuláris óra, akkor az órakomponens kifejeződésnek a populáció dinamizmusa ellenére ritmusosnak kell lennie a teljes sejtkészlet szintjén.

4.2.1.1. Neutrofil granulocitákban és a mononukleáris sejtekben különbözik az óragének expressziója és poszttranszlációs módosulása

Számos, a hemopoetikus vonalhoz tartozó sejtben — így makrofágokban, eozinofil granulocitákban, T és B limfocitákban, valamint dendritikus sejtekben — mutattak ki molekuláris óraműködést, azaz az óragének oszcilláló expresszióját (261-268). Neutrofil granulocitákban korábban nem történt ezzel kapcsolatban részletes elemzés. Munkánk első lépéseként ezért humán sejtek RNS preparátumain a jól ismert óragének expressziós mintázatát vizsgáltuk a nap folyamán és azt összehasonlítottuk a mononukleáris frakcióéval. Az egészséges önként vállalkozóktól 4 óránként vettünk vért, és minden mintából mononukleáris frakciót és neutrofil granulocitákat különítettünk el, amikből fehérje és RNS preparátumokat készítettünk. Az RNS méréseknél először *Gapdh*-t használtunk háztartási géneként, ugyanis ezt más leukociták óragén monitorozásához már korábban alkalmazták (262, 269-271). A mononukleáris sejtekben mindegyik *Per* gén, valamint a *Dbp* is szignifikáns ritmicitást

mutatott, aminek fázisa a korábban leírtakkal egyező volt (263, 267, 272) (42. ábra, 4. táblázat). A *Bmal1* esetében csak tendenciózus ritmus volt kimutatható ($p=0,055$), míg a *Rev-erba* expressziója nem változott szabályosan. Az ugyanezen személyek neutrofil granulocita mintáit vizsgálva teljesen más képet láttunk. Csak a *Per1*, a *Dbp* és a *Rev-erba* kifejeződése volt ritmusos, míg a másik három gén esetében nem detektáltunk szignifikáns oszcillációt. Ezek az adatok arra utalnak, hogy neutrofil granulocitákban és mononukleáris sejtekben alapvetően különbözik a molekuláris óra működése.



42. ábra: Az óragén expressziós mintázatok összehasonlítása a mononukleáris frakcióban és neutrofil granulocitákban

Az RNS szint mérése valós-idejű PCR-rel történt. A feltüntetett gének *Gapdh*-hoz viszonyított expresszióját az adott donor összes mintájában mért értékek átlagához viszonyítottuk ($n=6$). A szaggatott vonallal rajzolt görbék 24 órás periódusú szinusz görbe szignifikáns illeszkedését jelölik.

4. táblázat: RNS szintek akrofázisai mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban

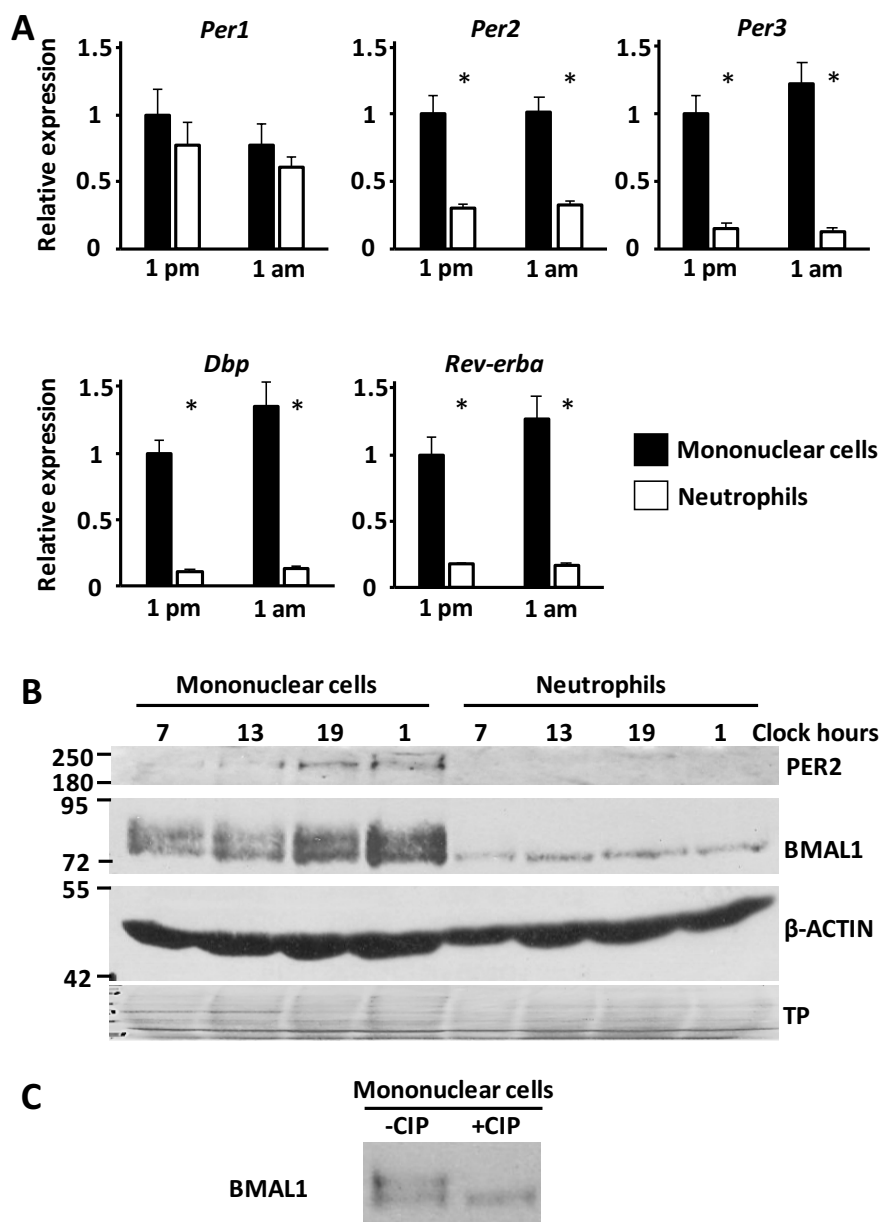
Sejttípus	Cirkadián gén	Akrofázis (h : min)	p
Mononukleáris sejtek	<i>Per1</i>	8 : 26	0,0128
	<i>Per2</i>	7 : 15	0,0002
	<i>Per3</i>	5 : 46	0,0001
	<i>Dbp</i>	3 : 44	0,0400
Neutrofil granulociták	<i>Per1</i>	9 : 51	0,0308
	<i>Dbp</i>	2 : 40	0,0024
	<i>Rev-erb</i>	1 : 24	0,0022

Az akrofázist 24 órás periódusú illesztett szinusz görbe alapján határoztuk meg (Time Series Analysis - Single Cosinor v 6.2 Software (Expert Soft Technology), n=6).

Mivel méréseinkben relatív expressziót határoztunk meg, csak akkor összehasonlíthatók az adatok, ha feltételezzük, hogy a háztartási gének expressziója egyik sejtben sem ingadozik időben. Ennek ellenőrzésére megvizsgáltuk egy másik gyakran alkalmazott háztartási génhez, az *aktin*hoz viszonyított *Gapdh* szinteket, ami azonban nem mutatott időfüggést (nem bemutatott adat). A következőkben az óragénexpressziót egy belső kontrollhoz, a *Bmal1*-hez képest is meghatároztuk. Az volt ugyanis az alaphipotézisünk, hogy amennyiben hasonló óraműködés van a különböző sejtekben, akkor az óragének egymáshoz viszonyított aránya is hasonló. Két időpontban végeztük el a részletesebb elemzést, éjjel 1 és délután 13 órakor (43.A ábra). Míg az így számolt *Per1* szintek nagyjából hasonlóak voltak a két sejtféleségben, a másik négy gén esetében szignifikánsan különböző expressziós szinteket kaptunk. Mindez megint csak arra utal, hogy a két sejtfrakcióban jelentősen eltérő az óraműködés.

A következőkben a molekuláris óra alapvető komponenseinek, a PER2-nek és a BMAL1-nek a fehérje szintű expresszióját hasonlítottuk össze a nap különböző időpontjaiban a két sejtfrakcióban. A mononukleáris frakcióban a PER2 gyengén, de detektálható volt minden időpontban, míg a neutrofil granulocitákból származó minták hasonló fehérjemennyiséget tartalmazó mintáiban nem tudtunk PER2-t kimutatni (43.B ábra). A BMAL1 expresszió is jelentős különbséget mutatott a két sejttípusban. A mononukleáris sejtekben jól detektálható, kis amplitúdójú, az RNS szint változását követő fehérjeszinteket láttunk, ami két elkülönülő csíkként, azaz különböző elektroforetikus mobilitású fehérjeformaként jelent meg. A neutrofil granulocita frakcióban viszont igen kicsi volt a bloton a jelintenzitás, és az a nagyobb

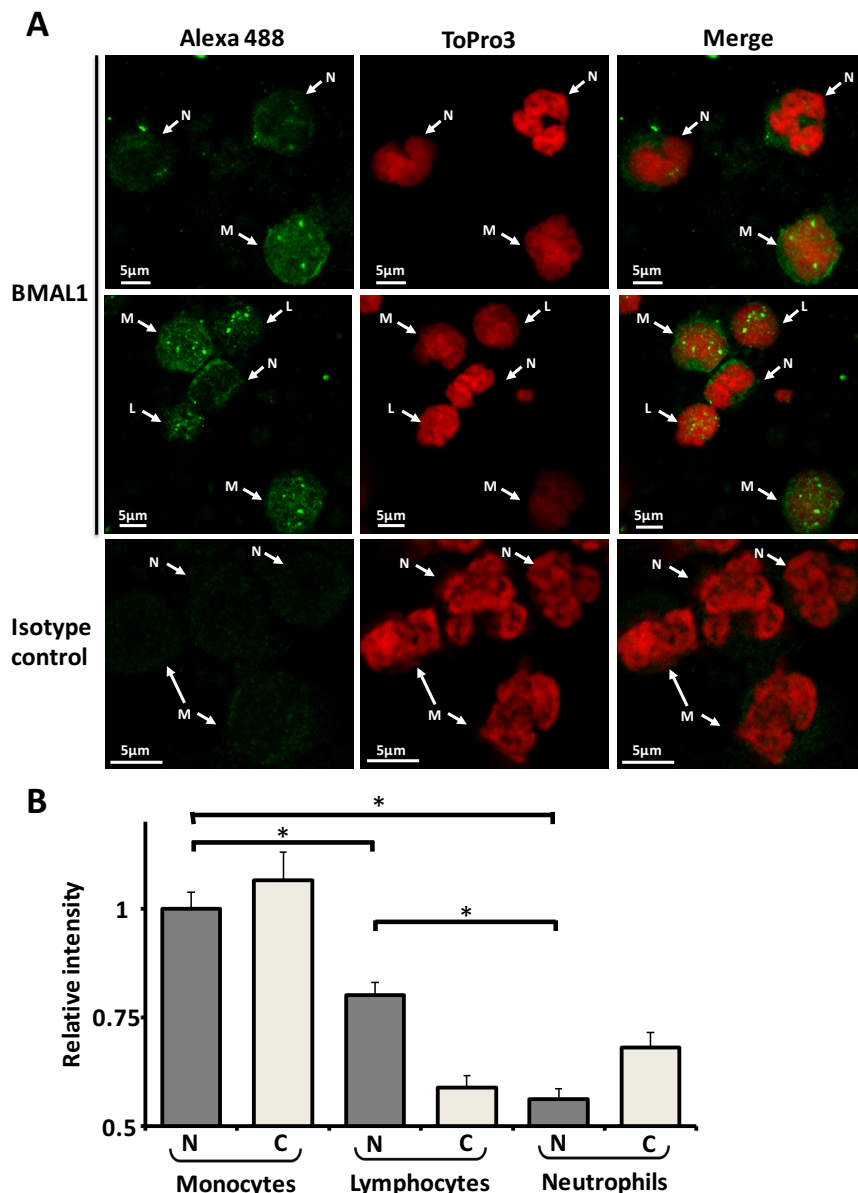
mobilitású fehérjeformának felelt meg.



43. ábra: Különbségek az óra komponensek megjelenésében mononukleáris sejtekben és neutrofil granulocitákban

A) Az ábrán feltüntetett gének RNS szintjei mononukleáris sejtekben (fekete oszlop) és neutrofil granulocitákban (fehér oszlop). Az RNS szint mérése valós-idejű PCR-rel történt. Az időpontok a vérvétel idejét jelzik, a *Bmal1* volt a viszonyítási gén. Ismétléses ANOVA, Dunn's féle többszörös összehasonlítás, $n=10-12$. **B)** A PER2 és a BMAL1 expressziójának összehasonlítása a jelölt sejtek lizátumában Western blot technikával. A vérvételi időpontok vannak az ábra tetején feltüntetve, a bal oldalon pedig a molekulatömeg markerek (kDa) pozícióját jelöltük. A β -AKTIN detektálása és a teljes fehérje festés (Ponceau, TP) mintafelviteli kontrollként szolgált. **C)** A BMAL1 fehérjeformák összehasonlítása Western blot technikával alkalikus foszfátazzal kezelt (+CIP) és nem kezelt (-CIP) mononukleáris sejtizátumban.

A BMAL1-ről ismert, hogy foszforilációja alapvetően befolyásolja a működését (68, 273, 274), és hogy, amint mi is megmutattuk a mintánkon, a foszforiláció ebben az esetben is elektroforetikus mobilitás csökkenést okozhat (43.C ábra). Ezek alapján a neutrofil sejtekben csökkent mértékű a BMAL-1 foszforilációja.



44. ábra: A BMAL1 sejten belüli elhelyezkedése különböző perifériás leukocitákban

A) A fehérvérsejtek immunfestése anti-BMAL1 és izotípus kontroll antitesttel. A sejtfrakciókat délután 13 órakor vett vérmintából preparáltuk, a mononukleáris és neutrofil sejtek preparátumát 1:1 volumenarányban kevertük. Piros: sejtmag (ToPro), zöld: BMAL1 elleni antitest vagy izotípus kontroll (Alexa 488), N: neutrofil granulocita, M: monocita, L: limfocita. **B)** A BMAL1-specifikus jelölődés statisztikai analízise. A jelintenzitásokat az azonos fedőlemezen lévő monocitákon mért átlagos magi jelintenzitásra normalizáltuk. N: sejtmagi jelintenzitás, C: citoplazmatikus jelintenzitás, n=28-41, ANOVA, Bonferroni korrekció.

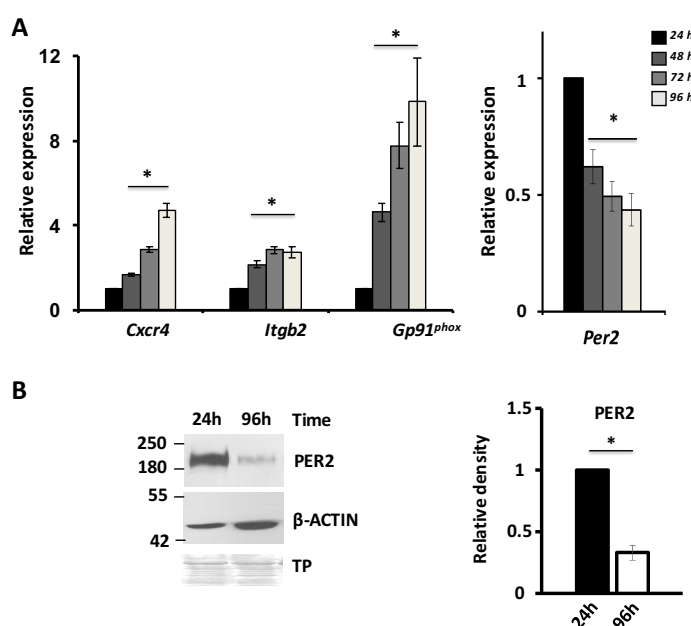
Tekintettel arra, hogy irodalmi adatok szerint a BMAL1 foszforilációja és nukleáris

lokalizációja összefüggést mutat (273), a továbbiakban a fehérje sejten belüli lokalizációját vizsgáltuk immunfestéssel (44.A ábra). A nukleáris festődés jóval alacsonyabb intenzitású volt neutrofil granulocitákban, mint limfocitákban és monocitákban, és míg a BMAL1 jel nagyjából egyenletesen oszlott meg a mag és a citoszol között monocitákban, és dúsult a limfocita magokban, neutrofil granulocitákban elsősorban a citoszolra lokalizálódott.

Eredményeinket összefoglalva, az órakomponensek expressziós különbsége, valamint azok foszforilációjának és szubcelluláris eloszlásának eltérése arra enged következtetni, hogy a neutrofil granulociták és a mononukleáris vérsejtek molekuláris órája eltérő módon működik, és a neutrofil granulociták gyengébb (downregulált) órafunkcióval rendelkeznek.

4.2.1.2. PLB-985 sejtek differenciálódása folyamán változik a PER2 expressziója

Az eddig ismertetett eredmények alapján feltételezhető, hogy a myeloid differenciáció folyamán a molekuláris óra működése jelentős változáson megy át. Ennek további vizsgálata céljából a PLB-985 myeloid leukémia sejtvonalon követtük a PER2 expresszióját a sejtek granulocita irányba való differenciálódásának indukálásától kezdve.



45. ábra: A PER2 expresszió változása PLB-985 sejtekben a neutrofil granulocita irányba való differenciálódás folyamán

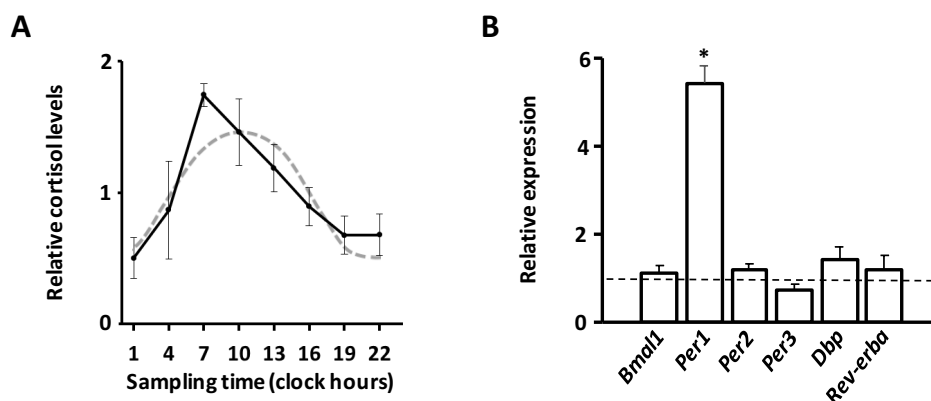
A) Az *Itgb2*, a *Cxcr4*, a *Gp91^{phox}* (bal oldal) és a *Per2* RNS szintje (jobb oldal) a differenciálás indukálásától számított különböző időpontokban. Az RNS szint mérése valós-idejű PCR-rel történt, *Gapdh* volt a referencia gén. 1-nek tekintettük az adott sejt kultúra 24 órás mintáján mért értéket. n=4, egyszempontos ANOVA, Tukey teszt.

B) A PER2 és a β -AKTIN szintjének vizsgálata. Bal oldali ábrarész: reprezentatív Western blot. Bal oldalon a számok a molekulatömeg markerek pozícióját jelölik (kDa). Jobb oldali ábrarész: a 24 és 96 órás szignálok denzitometriás analízise (n=4, egymintás t-próba). TP: total protein, Ponceau-festés (mintafelviteli kontroll)

Differenciációs markerként detektáltuk a *Cxcr4*, az *Itgb2* és a *Gp91^{phox}* (NADPH oxidáz alegység) szintjét is. Míg a markerek mennyisége a négy napos differenciálódás folyamán jelentősen növekedett, egyértelmű csökkenés volt megfigyelhető a *Per2* RNS *Bmal1*-hez viszonyított mennyiségében (45.A ábra). Hasonló változást láttunk a fehérjében, a PER2 szintje jóval alacsonyabb volt a 4. napon, mint az első napon, ugyanakkor, ahogy az irodalmi adatok alapján várható volt (275), a β -AKTIN expresszió erősödött (45.B ábra). Megfigyeléseink szerint tehát a granulocita irányba való differenciálódás folyamán jelentősen módosul az egyik központi órakomponens expressziója.

4.2.1.3. Kortizol hatása a neutrofil granulociták óragén expressziójára

Amennyiben a molekuláris óra működése gyengült, azaz nem robusztus neutrofil granulocitákban, felmerül a kérdés, hogy a saját perifériás óra helyett vajon szisztémás hatások képesek-e a sejteket ritmusos működésre készíteni. A kortizolnak jól ismert a ritmusos expressziója, és azt is tudjuk, hogy immunsejtek működését is befolyásolhatja. Először donoraink kortizol szekréciójának időbeli lefutását vizsgáltuk, amihez a vérplazma mintákban meghatároztuk a hormon koncentrációját (46.A ábra).



46. ábra: Kortizol hatására nő a *Per1* expresszió neutrofil granulocitákban

A) A kortizol koncentrációjának napi ingadozása donoraink vérplazma mintáiban. A megjelölt időpontokban vett vérminta plazmafrakciójában határoztuk meg a kortizol koncentrációját. Az értékeket mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagához viszonyítottuk. A szaggatott vonal 24 órás periódusú szinusz görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (akrofázis: 9:33 óra, $n=4$). **B)** Kortizol hatása a neutrofil granulociták óragén expressziójára. Az izolált sejteket 60 percig kezeltük 300 ng/ml kortizollal. Az RNS szinteket valós-idejű PCR-rel, *Gapdh*-hoz viszonyítva határoztuk meg. Az értékeket a kontroll (csak vivőanyaggal kezelt) mintákban mérhető expressziós szintekhez viszonyítottuk ($n=4$, egymintás t -próba).

A kortizolszintek a vártak megfelelő napi ingadozást mutattak, reggeli maximummal és késő esti minimummal. A következő kérdésünk azt volt, hogy kortizol hatására változik-e neutrofil granulocitákban egyes óragének expressziója. Ehhez délutáni vérmintákból preparáltunk sejteket, ekkor a kortizol mennyisége csökkenő fázisban van a vérben. Az izolált sejteket egy órán át inkubáltuk olyan mennyiségű hormonnal, ami a fiziológias koncentrációtartománynak megfelelő. Meglepő nagyon karakterisztikus különbséget tapasztaltunk a génexpresszióban: míg a *Per1* expressziója többszörösére nőtt a kezelés nyomán, a többi óragén szintje nem mutatott számottevő változást (46.B ábra).

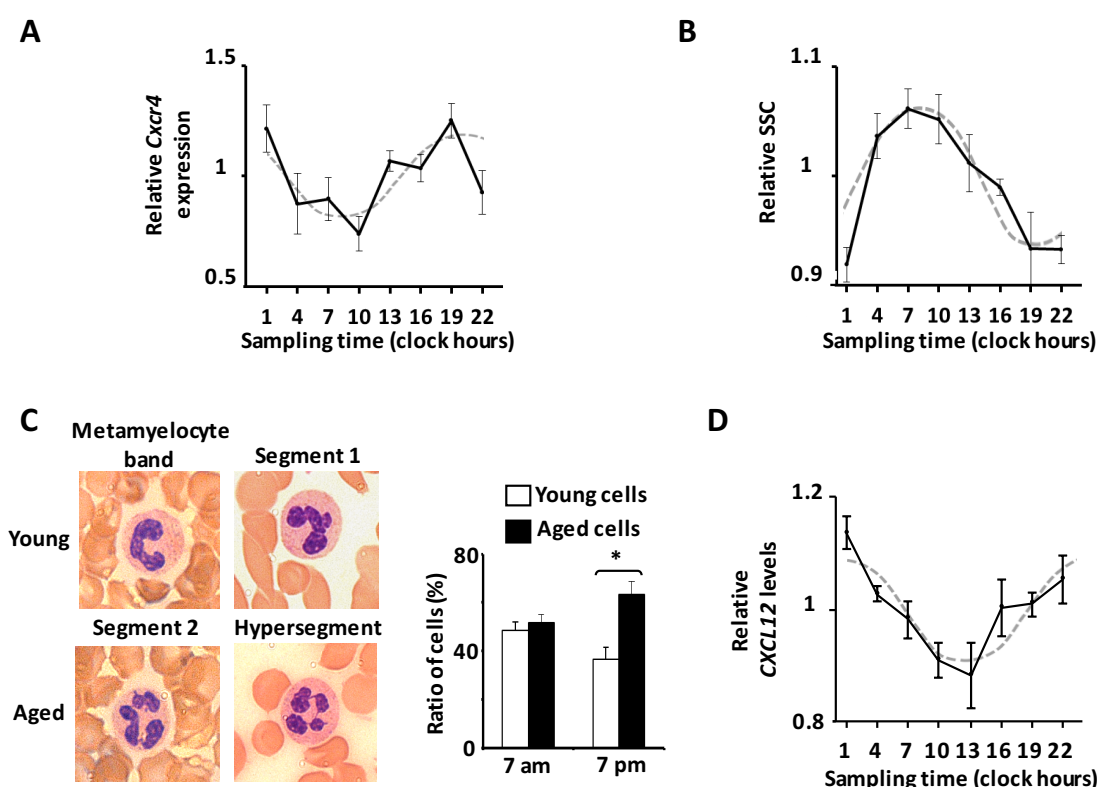
Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a *Per1* kifejeződését neutrofil granulocitákban a glukokortikoid receptor befolyásolni képes, és így a *Per1* szint reggeli emelkedése e sejtekben részben vagy egészben a kortizol szint változásának következménye lehet.

4.2.1.4. A perifériás neutrofil granulocita populáció korszerinti összetételének napszaki változásai

Egy, a vizsgálatainkkal párhuzamosan megjelenő tanulmány kimutatta, hogy egérben a neutrofil granulociták vérből csontvelőbe való visszaáramlása napi ritmust követ, és ezzel párhuzamosan változik a perifériás sejtpopulációban az idős/fiatal sejtek megoszlása (153, 276). Mivel a neutrofil granulociták patogénekkal szembeni válaszkészsége változhat a sejt érése során, a perifériás sejtpopuláción belüli koreloszlás változás — alternatív mechanizmusként — hozzájárulhat a neutrofil granulocita működés napszaki változásaihoz. Ezt a lehetőséget jártuk körbe a továbbiakban.

A CXCR4 kemokin receptor expressziója egér neutrofil granulociták érése és öregedése során növekszik (153, 276), így annak vizsgálatára, hogy a perifériás humán neutrofil granulocita populáció mutat-e változást a nap során a fiatal/idős sejtek arányát illetően, mértük hogy hogyan alakul a különböző időben nyert mintákban a *Cxcr4* RNS szintje (47.A ábra). A receptor kifejeződése szignifikáns oszcillációt mutatott, melynek maximuma az esti órákra esett (akrofázis: 20 óra). További kormarkerként szolgálhat a neutrofil granulociták granulum készlete, amiről jó információt szolgáltat az áramlási citométerrel mérhető oldalirányú fényszórás (SSC) (153, 277), ami szintén ritmusosnak bizonyult (47.B ábra). Ezek az eredmények tehát arra utalnak, hogy a neutrofil granulocita populáció kor szerinti összetétele változik a nap folyamán: az idős sejtek (magasabb *Cxcr4* szintek és alacsonyabb SSC) aránya magasabb az esti/éjszakai időszakban, mint a reggeli/nappali időszakban. A kormegoszlás morfológiai követésére ujjbegyből vett vérből keneteket készítettünk reggel 7 és este 19 órakor,

és a magmorfológia alapján négy kategóriába soroltuk a sejteket az érettség sorrendjében: metamielocita/band, szegment1, szegment 2 és hiperszegment (47.C ábra). 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. Az előző adatokkal összhangban az esti mintákban szignifikánsan magasabb volt az idős sejtek aránya, míg a reggeli mintákban nem volt különbség a fiatal és idősebb populáció nagyságában (47.C ábra).



47. ábra: A neutrofil granulocita populáció korszerinti összetételének vizsgálata

A) Perifériás neutrofil granulociták *Cxcr4* expressziójának változása a nap folyamán. A 3 óránként vett vérmintákból preparált sejtek RNS szintjeit valós idejű PCR segítségével határoztuk meg. Referenciagénként *Gapdh*-t alkalmaztunk. Az adatokat az adott donor összes mintájában mért értékek átlagához viszonyítottuk. A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú szinusz görbe szignifikáns illeszkedését mutatja ($n=6$, cosinor analízis). **B)** Neutrofil granulocitákon detektált oldalirányú fényszórás (SSC) a nap különböző időpontjaiban. A mintavétel, a normalizálás és a görbeillesztés módja egyezik az A) pontban leírttal ($n=4$). **C)** Neutrofil granulocita érési stádiumainak vizsgálata a magmorfológia alapján. A keneteket reggel 7 és este 19 órakor készítettük (bal oldali ábrarész). Minden keneten 100 sejtet számoltunk meg és megállapítottuk, hogy milyen az egyes fejlődési alakok százalékos megoszlása a mintában (jobb oldali ábrarész) ($n=5$, kétszemponos ANOVA, Tukey-teszt) **D)** A vérplazma CXCL12 koncentrációjának napi ingadozása. A mintavétel, a normalizálás és a görbeillesztés módja egyezik az A) pontban leírttal ($n=4$).

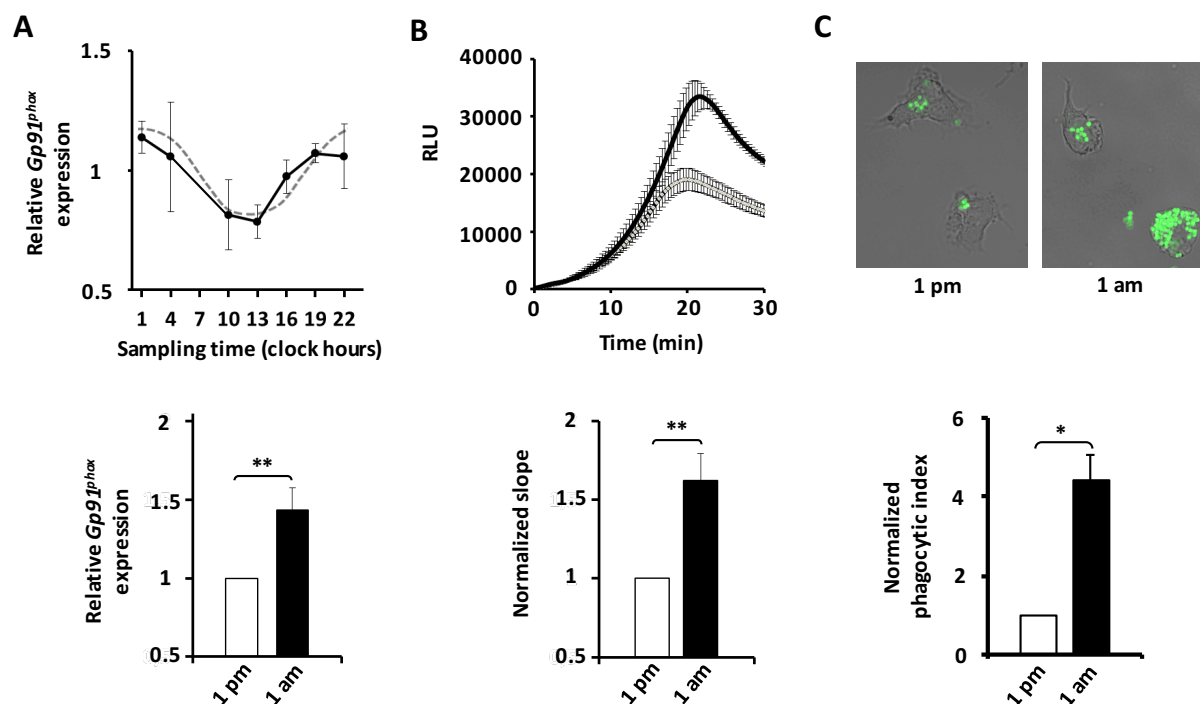
Mivel a neutrofil granulociták csontvelőből való kiáramlásának, valamint homing-jának és eliminációjának is fontos szabályozói a különböző csontvelői citokinek és kemokinek, feltételeztük, hogy ezek mennyisége is időbeli változást mutat. A CXCR4 receptor liganduma a CXCL12 nevű kemokin, amely legnagyobb mennyiségben a csontvelőben termelődik (278, 279), így a vérplazmában mérhető koncentrációja a csontvelő működésének indikátora lehet. A 47.D ábrán látható, hogy a CXCL12 plazma koncentrációja ritmusosan változik a nap folyamán, mégpedig hasonló fázisban, mint a sejtekben mérhető *Cxcr4* expresszió (47.A ábra).

Eredményeink megerősítik feltevésünket, miszerint a neutrofil granulociták időfüggő eliminációjában és a populáció korszerinti összetételének szabályozásában szerepe lehet a csontvelő ritmusos működésének.

4.2.1.5. A neutrofil granulociták válaszkészségének ritmusos változása

Ahogy arra már utaltunk, a neutrofil sejtek érése során a *Gp91^{phox}* expressziójának növekedése figyelhető meg. Mivel a neutrofil granulocita populáció korszerinti megoszlása ritmusosnak bizonyult, felvetődött, hogy a *Gp91^{phox}* expresszió is napi ingadozást mutat. Azt tapasztaltuk, hogy az RNS szint oszcillál, és maximuma a késő esti időszakban mérhető (48.A ábra), tehát a vártak megfelelően akkor, amikor az idős sejtek aránya magasabb a keringésben. Természetesen felmerült, hogy ez az expresszióváltozás a funkció időbeli változásával járhat. Az RNS szint maximumát és minimumát röviddel követő időpontokban izolált sejteket opszonizált zimoszánnal stimuláltunk, és összehasonlítottuk a szuperoxid termelő képességüket. Szignifikánsan magasabb volt a sejtek szuperoxid termelése az éjjel 1 órás minták esetében, mint a kora délutáni mintákban (48.B ábra).

A következő kísérletben a sejtek egy másik jelentős effektor válaszát, a fagocitózis kapacitást vizsgáltuk. Kevert humán savóval opszonizált, GFP-t expresszáló *Staphylococcus aureus*-t adtunk a sejtekhez és meghatároztuk a fagocita indexet. Az éjszakai időpontban izolált sejtek jóval több baktériumot kebeleztek be, mint a nappal nyert sejtek (48.C ábra), ami szintén azt támasztja alá, hogy az idősebb, azaz esti-éjszakai órákban nagyobb arányban előforduló sejtek hatékonyabban vesznek részt az immunválaszban.



48. ábra: A neutrofil granulociták válaszkészségének napszaki különbségei

A) A $Gp91^{phox}$ expresszió napi ingadozást mutat. Felső ábrarész: A 3 óránként vett vérmintákból preparált sejtek RNS szintjeit valós idejű PCR segítségével határoztuk meg. Referenciagénként *Gapdh*-t alkalmaztunk. Az adatokat mindig az adott donor összes mintájában mért értékek átlagára normalizáltuk ($n=6$). A szaggatott vonal 24 órás periódushosszú szinusz görbe szignifikáns illeszkedését jelöli (cosinor analízis). Alsó ábrarész: A $Gp91^{phox}$ expresszió statisztikai összehasonlítása 13 órakor és 1 órakor izolált neutrofil granulocitákban ($n=14$, $**p<0,01$, egymintás t-próba). **B)** A neutrofil granulociták szuperoxid termelő képességének változása. A sejteket 13 órakor (fehér vonal) és 1 órakor (fekete vonal) izoláltuk, majd kevert humán savóval opsonizált zimozánnal stimuláltuk a szuperoxid termelést. Felső ábrarész: Szuperoxid termelés a stimulust követően az idő függvényében ($n=4$). Alsó ábrarész: Statisztikai összehasonlítás, ahol az értékeket az adott donor 13 órás értékeire normalizáltuk ($n=4$, $**p<0,01$, egymintás t-próba). **C)** Neutrofil granulociták fagocita aktivitásának napszaki különbsége. A sejteket 13 órakor és éjjel 1 órakor izoláltuk, majd kevert human savóval opsonizált, GFP-t kifejező *S. aureus*-szal inkubáltuk. Felső ábrarész: Reprezentatív felvételek. Alsó ábrarész: A fagocita-index (100 sejt által bekebelezett baktériumok száma) statisztikai összehasonlítása. Az értékeket az adott donor 13 órás értékeire normalizáltuk ($n=3$, $*p<0,05$, egymintás t-próba).

4.2.1.6. Az eredmények értelmezése, következtetések

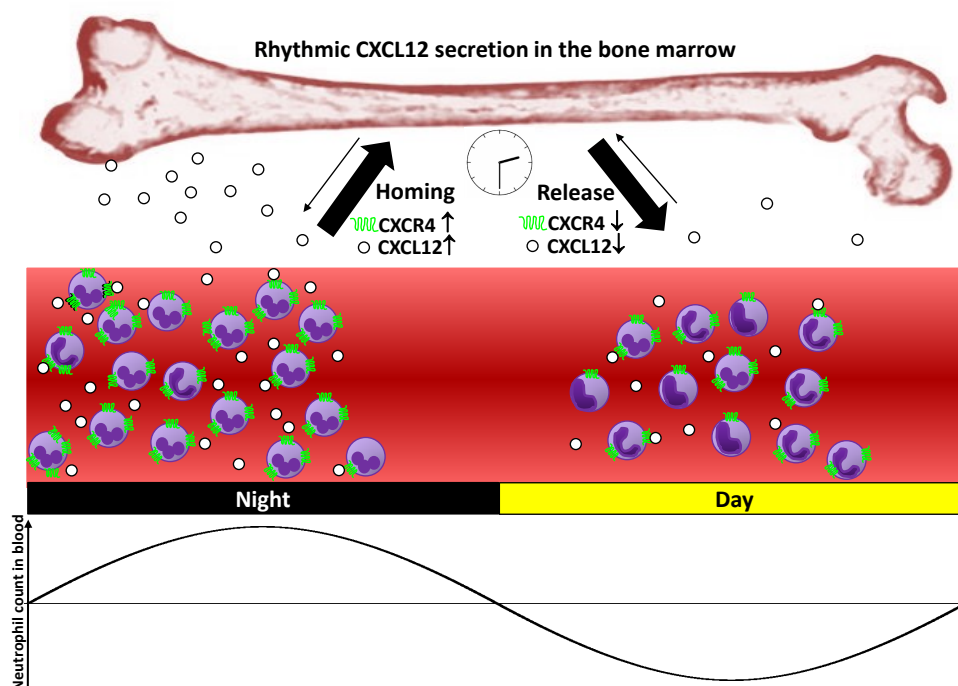
Eredményeink szerint neutrofil granulocitákban, szemben más fehérvérsejtekkel, nem detektálható robusztus oszcillátorműködés. Elképzelhető, hogy ez a jelenség éppen a sejtek gyors, a periférián is folyó érésével van összefüggésben, ugyanis hasonló megfigyeléseket írtak le más olyan szövetek (thymus és here) vizsgálata kapcsán, amelyek gyorsan differenciálódó sejteket tartalmaznak (280, 281). Ezek alapján felmerült, hogy az órafunkció felfüggesztésre kerül a sejt differenciálódás folyamán, bár a folyamat mechanizmusa egyelőre nem ismert.

Az óra molekuláris komponensei közül vizsgálatainkban háromnak az expressziója mutatott oszcillációt a neutrofil sejtekben. Míg a *Per1* esetében eredményeink arra utaltak, hogy a kortizol ingadozásra adott válaszára van szó, a *Dbp* és a *Rev-erba* ritmusos expressziójának háttéréről egyelőre nem áll rendelkezésre adat. Mivel mindkét gén glukokortikoid érzékenységet mutat hepatocitákban (282, 283), itt sem zárható ki a kortizol szabályozó szerepe. Elképzelhető, hogy nem közvetlen és/vagy gyors kortizol hatásról van szó ebben az esetben, és így az általunk alkalmazott 1 órás kezelés nem jól modellezte az *in vivo* viszonyokat. Hosszabb, esetleg *in vivo* kezeléssel lehetne tovább vizsgálni a kérdést.

A neutrofil granulociták eliminációs mechanizmusai közül a szuperoxid termelés és a fagocitózis napszaki változását tapasztaltuk. Irodalmi adatok szerint élesztő sejtek bekebelezésekor humán neutrofil granulociták fagocitózis hatékonysága alacsony amplitúdójú napi ingadozást mutat, aminek maximuma az éjszaka során mérhető (256). Mi *Staphylococcus aureus*-t használva több mint ötszörös különbséget tapasztaltunk a nappali és éjszakai fagocitózis készség összehasonlításakor, azaz jóval nagyobb, mint amekkorát élesztővel kapcsolatban írtak le. Ez a különbség arra utal, hogy az óra fagocitózis készségre gyakorolt hatása függhet a mikroorganizmus típusától.

Eredményeink alapján felvetődik, hogy a perifériás neutrofil granulocitakészlet válaszkészségének napszaki változásaiért a sejtészlet kor szerinti megoszlásában tapasztalható oszcilláció felelős. Ezzel kapcsolatban a következő modellt támasztják alá adataink (49. ábra). A reggeli órákban az alacsony CXCL12 szint a csontvelőben a fiatal neutrofil granulocita alakok mobilizációját segíti. Ennek következtében ebben az időszakban a *Cxcr4* szint viszonylag alacsony a perifériás sejtészletben. A keringésben a sejtek érésen mennek keresztül, aminek során egyre növekszik a *Cxcr4* és további érési markerek (pl. *Gp91^{phox}*) kifejeződése. Az érett sejtek arányának növekedését a sejtek keringésből történő intenzív eliminációja követi, aminek révén a késő esti, éjszakai időszakban a sejtpopulációban mérhető *Cxcr4* szint újra csökken. Ennek az eliminációnak lehet oka a megnövekedett csontvelői CXCL12 szekréció ebben az időszakban. Az, hogy a CXCL12 szekréció napi ingadozása a csontvelői sztrómasejtek óraműködésének következménye-e és/vagy szisztémás mechanizmusok (pl. adrenerg hatások) hozzák-e létre, egyelőre nem ismert. Casanova-Acebes és munkatársai egészen végzett vizsgálatok során kimutatták, hogy a csontvelőbe visszavándorló érett neutrofil sejteket bekebelező makrofágok olyan szignálokat generálnak, melyek gátolják a retikuláris sejtek CXCL12 szekrécióját, és így megnő a progenitor sejtek kilépése a vérpályába (153). Ez a visszacsatolási mechanizmus segítheti a csontvelői ki/bevándorlást

ritmus elmélyítését, stabilizálását. A CXCL12-vel ellentétes hatású a csontvelői endotélsejtek és megakariociták által termelt CXCL2, amely a neutrofil granulociták keringésbe történő kijutását serkenti (284, 285). Érdeemes lenne azt is vizsgálni, hogy a CXCL2 és receptorának a CXCR2-nek a kölcsönhatása is hozzájárul-e a perifériás sejt populáció korbeli összetételének szabályozásához. Ezen kívül a melatonin szabályozó szerepe is felmerül, ugyanis az serkentőleg hat a neutrofil granulociták kemotaxisára (286), és ennek megfelelően az éjszakai magas melatoninszint hozzájárulhat a fiatal neutrofil alakok csontvelőből történő mobilizációjához. A csontvelőn kívül a lép és a máj szintén fontos szerepet töltenek be a neutrofil sejtek eliminációjában, így ezen szervek ritmikus működése szintén hozzájárulhat a perifériás neutrofil granulocita populáció kor szerinti eloszlásának ingadozásához. A keringő sejt készlet nagyságának és érettség szerinti összetételének időbeli változását befolyásolhatja a sejtek marginációjának és a különböző szövetekbe való kiáramlásának ritmicitása is.



49. ábra: A humán neutrofil granulocita populáció kor szerinti megoszlásának változása (ábra felső része) és a sejtszám alakulása (alsó ábrarész) a nap folyamán

További részletes magyarázat a szövegben.

A periférián lévő neutrofil sejtek hatékonyságát nemcsak kor szerinti megoszlásuk, hanem abszolút számuk is befolyásolja, ami szintén cirkadián szabályozás alatt áll. Saját (nem bemutatott adat) és mások adatai alapján (123, 124) a neutrofilszám maximális értéke az este

20 és a hajnali 2 óra közötti időszakra esik. Megállapíthatjuk tehát, hogy mind a sejtszám ingadozásai, mind a sejtek válaszkészségének ritmusa alapján a keringő sejtészlet maximális hatékonysága az esti, kora éjszakai órákra tehető. Az időbeli változások biológiai előnye lehet, hogy a nappali időszakra mérséklődő gyulladásos jelenségek nem korlátozzák annyira az aktivitást. Ugyanakkor a jelenség szerepet játszhat egyes gyulladásos tünetek hajnali, reggeli súlyosbodásában is.

4.2.2. Az alvás időzítése és az egyetemi tanulmányi teljesítmény közötti összefüggések (9. közlemény)

Az emberi szervezet ritmusos működésének legtöbbet vizsgált mutatója az alvás-ébrenléti ritmus. Az alvás időbeli jellemzőit alapvetően két szabályozási mód határozza meg, a homeosztatis és a cirkadián szabályozás. Az időbeli viszonyok nagyobb populáción való követésére általában kérdőíveket használnak. Több ilyen kérdőív létezik, de a szociális jetlag meghatározására csak az MCTQ (Munich ChronoType Questionnaire) terjedt el mint megfelelően validált eszköz (138, 140), aminek alapján mára már több mint 100 ezer adat áll rendelkezésre a világ legkülönbözőbb pontjairól.

Az MCTQ külön kérdez rá a munkanapi és szabadnapi elalvási, ébredési adatokra és egyéb, az alvás időzítését befolyásoló tényezőkre. A kronotípus jellemzésére a szabadnapi alvási középideőt (MSF_{sc}) használjuk, mégpedig egy, a hétközben felhalmozott alváshiány szerint korrigált formában (erre utal az „sc” index). Az MSF az az időpont, ami előtt és után ugyanannyit alszik a vizsgált személy, átlagos értéke az európai felnőtt lakosságban 3:30 és 4:00 óra közé esik. Míg a hagyományos munkaidő a korai típusok természetes alvásidőzítéséhez illeszkedik, addig a késői típusok esetében gyakori a hétköznapi és a hétvégi vagy szabadnapi alvásablak jelentős eltérése. Ezen eltérés mértékét jellemzi a SJL, ami definíció szerint a munkanapi és szabadnapi alvási középideők különbsége. A kronotípus jellegzetesen változik az életkorral, 20 és 25 éves kor között van az MSF_{sc} maximuma (287), amiből adódóan a szociális jetlag ezt a korosztályt sújtja a leginkább. Ez a tény különösen indokoltá teszi a SJL hatásainak ebben a korcsoportban történő vizsgálatát.

Tanulmányok sora foglalkozott már azzal a kérdéssel, hogy az alvás mennyisége és minősége milyen összefüggést mutat memória funkciókkal és a tanulmányi teljesítménnyel. Logikusnak tűnik, hogy a krónikus alváshiány a gyenge teljesítmény prediktora, és hogy mind az alváshossz, mind az alvásminőség pozitív összefüggést mutat a tanulmányi teljesítménnyel

(288-291). Fontos megemlítenünk, hogy egyes vizsgálatok szerint az alvás időzítése meghatározóbb a tanulmányi teljesítmény szempontjából, mint az alvás hossza (292, 293), és összefüggés mutatható ki a reggeli-esti preferencia (kronotípus) és a feladatmegoldás eredményessége között is, mégpedig aszerint, hogy mikor történik a tanulók tudásának felmérése (294, 295).

A fentiek alapján feltételeztük, hogy az alvás időzítése hatással lehet egyetemünk hallgatóinak tanulmányi teljesítményére is, és hogy ebben a hatásban a SJL meghatározó tényező lehet, sőt, esetleg jobb prediktornak adódik, mint a kronotípus.

4.2.2.1. A vizsgált minta alapvető jellemzői, valamint az időzónán belüli elhelyezkedés és a kronotípus összefüggései

A vizsgálatba bevont személyek (n=753) a Semmelweis Egyetem azon orvostan-, fogorvostan-, illetve gyógyszerész hallgatói közül kerültek ki, akik 2009 és 2012 között hallgatták az élettan tárgyat. Lefordítottuk az MCTQ-t angolról magyarra, majd validálás céljából egy független nyelvi szakértővel visszafordítottuk angolra. A kérdőív immáron magyar változatát télen, a szorgalmi időszak folyamán töltötték ki a hallgatók, aminek alapján meghatároztuk alvásuk alapvető időbeli jellemzőit (5. táblázat). Az átlagos MSF_{sc} (4:04) a felnőtt populációra jellemző tartományban volt, és a SJL mértéke (1 óra 24 perc) is közel esett a más tanulmányokban megállapított értékekhez (140, 296). Mintánkban a férfiak későbbi kronotípusúak voltak, mint a nők, ez korábbi eredményekkel szintén összhangban volt (127, 129).

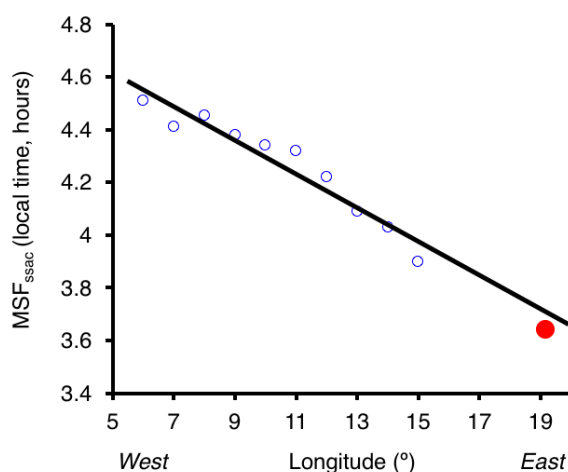
5. táblázat: A teljes mintára, illetve a két nemre jellemző alvásmutatók.

	All	Male	Female	<i>p</i>
MSF (local time, h:min)	4:50 am ± 0:02	5:03 am ± 0:05	4:45 am ± 0:03	0.001
MSW (local time, h:min)	3:27 am ± 0:02	3:36 am ± 0:04	3:23 am ± 0:02	0.001
MSF _{sc} (local time, h:min)	4:04 am ± 0:02	4:18 am ± 0:04	3:57 am ± 0:02	<0.001
SJL (h:min)	1:24 ± 0:02	1:28 ± 0:04	1:22 ± 0:02	0.23

A két nem adatainak összehasonlítása kétmintás t-próbával történt (n=753, ebből 241 férfi, 512 nő).

Az MCTQ németországi adatainak elemzése kapcsán Roenneberg és munkatársai (131) megmutatták, hogy a kronotípus szorosan korrelál a vizsgált személyek lakóhelyének földrajzi hosszúsági fokával, ami azt jelenti, hogy ahol korábban kel fel a nap az adott időzónán belül, ott korábbi az átlagos kronotípus. Budapest ebben az időzónában kifejezetten keleten

helyezkedik el, és ezzel összhangban a legkorábbi időpontra esett a mintánk átlagos alvási középideje. A 50. ábrán az is jól látható, hogy az átlagos MSF_{sc} érték (életkor és nem szerint normalizálva) jól illeszkedett a németországi mintát jellemző korrelációs egyenesre. Így a korábban vizsgált populációtól az időzónában jóval keletebbre élők felmérésével sikerült megerősítenünk a kronotípus és a földrajzi elhelyezkedés közötti szoros kapcsolat tényét.



50. ábra: Az átlagos kronotípus és az időzónán belüli földrajzi elhelyezkedés összefüggése

A németországi adatok (üres karikák, (131)) és a mintákra jellemző adat (piros teli karika). Az MSF_{sc} nem, életkor és hétköznapi alvásihiány figyelembevételével korrigált érték. (n=753)

4.2.2.2. Az SJL és a tanulmányi teljesítmény közötti összefüggés

Következő elemzéseinkben csak azoknak a hallgatóknak az adatait vettük figyelembe, akiknek a tudását ugyanazon rendszer szerint értékelték élettanból, ezek a 2010 és 2012 között intézetünkben tanuló orvos- és fogorvostanhallgatók közül kerültek ki. Az élettan tárgy terén nyújtott teljesítményt több szempontból is reprezentatívnak éreztük a tanulmányi teljesítőképesség vizsgálatára. Egy nagy integratív tantárgyról van szó, aminek megfelelő teljesítéséhez egyaránt van szükség memorizálásra és komplex folyamatok logikus átlátására. Ugyanakkor az élettani ismeretek elsajátítása különösebb, készségszerű adottságokat nem igényel. A tárgy teljesítése a preklinikai modul megkezdésének egyik feltétele, ami a tárgy tanulásának motivációját szintén erősen meghatározza.

A hallgatók tanulmányi teljesítménye a szorgalmi időszakban a heti rendszerességgel írt tesztek eredményei, a vizsgaidőszakban pedig egy írásbeli és egy szóbeli vizsga alapján kerül értékelésre (51. ábra). Ebből mi az írásbeli számonkérések százalékos értékeit használtuk az összehasonlításokban. A heti tesztek közül összesen 12-t írtak a hallgatók, ezek 10-10 kérdést

tartalmaztak az elmúlt időszak előadásainak anyagából. Mindig a heti gyakorlat legelején, azaz délelőtti gyakorlatoknál reggel 8, délutáni gyakorlatoknál 14 óra körül volt a dolgozat, és 15 perc állt rendelkezésre a megoldására. A vizsgaidőszakban a hallgatók 8:30 órakor kezdték a tesztírást, és 25 kérdést 45 perc alatt kellett megválaszolniuk.

Winter time							Summer time							
February			March				April			May		June and end of August		
Lecture term											Exam period			
Test	Test	Test	Test	Test	Test	Test	Test	Test	Test	Test	Test	Final Test		
Average of weekly test grades (%)											Final test grade (%)			

51. ábra: A szemeszter időbeosztása az élettan tesztekkel és a szigorlattal

A szorgalmi időszak 2-13. hetén került sor a heti tesztekre, míg a záróvizsgát a május közepétől június végéig terjedő időszakban tették le a hallgatók egy általuk választott vizsganapon.

A nemek közötti eloszlás és az egyes alvási ritmus mutatók hasonlóak voltak a korábban elemzett nagyobb mintában találtakhoz (6. táblázat). Érdekes módon, bár a gyakorlati időpontok központilag kerültek elosztásra, a reggeli gyakorlatokra járó hallgatók átlagos MSF_{sc} -je korábbi volt, mint a délutáni gyakorlatokon résztvevőké. Ez a különbség valószínűleg nem vezethető vissza a kronotípus "átállítására", ugyanis minden hallgatónak szinte minden nap volt korai órája valamilyen tárgyból. Mindenesetre ezek alapján a tesztírást idejét mint kofaktort be kellett vezetnünk a további elemzésekbe. Szemben az átlagos kronotípussal, a SJL nem mutatott különbséget a két csoport között.

6. táblázat: Az MSF_{sc} és a SJL mértéke, valamint a tanulmányi teljesítmény mutatói az egyes hallgatói csoportokban

	Faculty			Sex			Time of weekly test		
	Medicine <i>n</i> = 181	Dentistry <i>n</i> = 66	<i>p</i>	Male <i>n</i> = 78	Female <i>n</i> = 169	<i>p</i>	Morning <i>n</i> = 129	Afternoon <i>n</i> = 118	<i>p</i>
MSF_{sc} (local time, h:min)	4:04 am ± 0:04	3:51 am ± 0:07	0.097	4:16 am ± 0:06	3:55 am ± 0:04	0.014	3:52 am ± 0:04	4:13 am ± 0:05	0.007
SJL (h:min)	1:24 ± 0:03	1:15 ± 0:05	0.11	1:27 ± 0:05	1:19 ± 0:03	0.26	1:18 ± 0:04	1:28 ± 0:04	0.109
Weekly average grade (%)	71.13 ± 0.72	63.33 ± 1.33	<0.001	69.05 ± 1.12	69.01 ± 0.78	0.98	69.00 ± 0.97	68.67 ± 0.88	0.80
Final grade (%)	75.12 ± 1.08	68.80 ± 1.55	<0.001	74.78 ± 1.72	71.91 ± 0.98	0.12	72.97 ± 1.15	73.23 ± 1.39	0.88

Az összehasonlítások kétmintás t-próbával történtek.

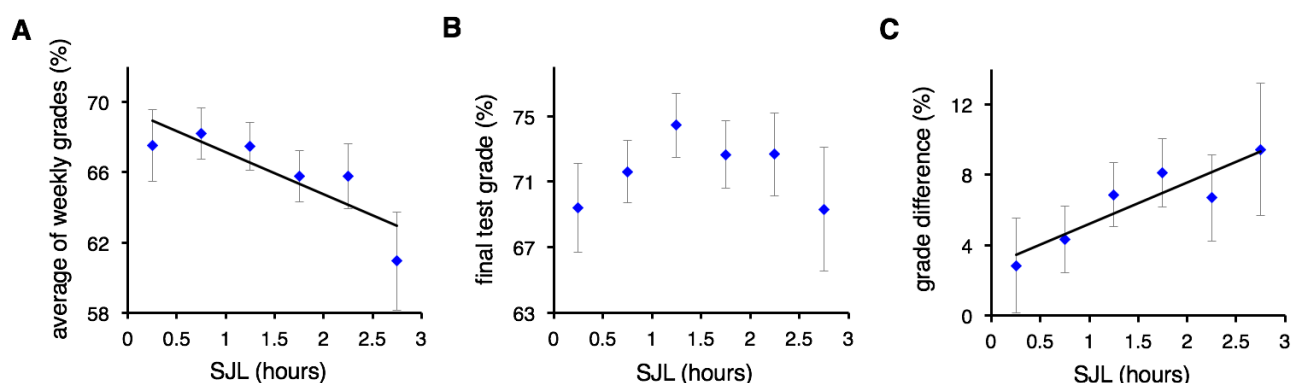
Tekintettel arra, hogy a fogorvostanhallgatók mind a heti számonkéréseken, mind a vizsgán gyengébben teljesítettek, mint az orvostanhallgatók (6. táblázat), a kart is figyelembe kellett vennünk mint kofaktort. Mivel a minta homogén volt életkor tekintetében ($20,52 \pm 1,48$ év, SD), azzal nem kellett korrigálnunk, viszont a nem minden további elemzésünkben kofaktorként szerepelt.

A minta jellemzését követően többváltozós lineáris regressziós analízissel vizsgáltuk az alvásmutatók és a tanulmányi teljesítmény összefüggéseit. Az alvás hossza se munkanapokon, se szabadnapokon nem mutatott összefüggést a heti tesztek eredményével ($B=0,66$, $p=0,33$; illetve $B=-0,53$, $p=0,29$). A kronotípus és a hétköznapi alvási középido (MSW) sem korrelált a szemeszter alatti tanulmányi teljesítménnyel. Ezzel szemben a SJL és a teljesítmény között negatív összefüggést állapítottunk meg, tehát a nagyobb mértékű SJL rosszabb évközi eredményekkel társult (7. táblázat, 52.A ábra).

7. táblázat: Regressziós analízis az MSF_{sc} , a SJL, az MSW és a tanulmányi teljesítmény közötti összefüggések vizsgálatára

	Weekly average grade		Final exam grade		Grade difference	
	B (with 95% CI)	p	B (with 95% CI)	p	B (with 95% CI)	p
MSF_{sc}	-0.93 (-2.16 to 0.29)	0.135	0.55 (-1.16 to 2.28)	0.523	1.45 (-0.19 to 3.11)	0.084
SJL	-1.81 (-3.42 to -0.19)	0.028	-0.17 (-2.27 to 1.92)	0.871	2.46 (0.27 to 4.65)	0.028
MSW	-0.61 (-2.24 to 1.02)	0.464	0.20 (-2.11 to 2.42)	0.863	0.19 (-2.06 to 2.44)	0.868

A nem, a heti teszt írásának ideje (délelőtt vagy délután) és a kar kofaktorként szerepelt az összehasonlításokban.
B: nem standardizált regressziós koefficiens, CI: konfidencia intervallum.



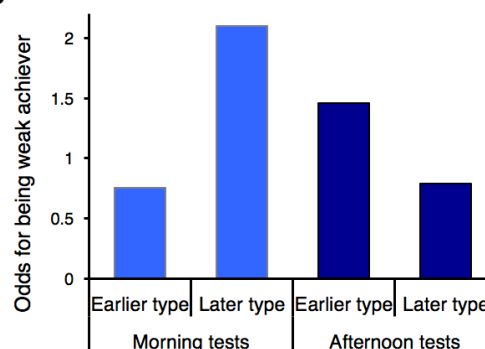
52. ábra: A SJL kapcsolata a heti tesztek eredményeivel (A), a vizsga tesztek eredményeivel (B) és a két teszt eredményei közötti különbséggel (C)

30 perces SJL intervallumokra eső átlagértékeket tüntettünk fel az ábrán. Mivel az első és az utolsó intervallumba kevesebb mint 10 személy tartozott, ezek ábrázolását elhagytuk. Amennyiben a statisztikai analízissel kapcsolatot lehetett találni, a lineáris regresszióknak megfelelő trendvonalakat tüntettünk fel.

Következő kérdésünk az volt, hogy vajon kronotípustól függően másképp teljesítenek-e a hallgatók a délelőtti, illetve délutáni teszteken. Míg a reggeli órákon résztvevők körében negatív korrelációt láttunk a kronotípus és a teszt eredmények között ($B=-2,37$, $p=0,026$), a kora délutáni tesztek esetében nem volt összefüggés. A kérdés további vizsgálatához a medián szerint először két csoportba rendeztük a hallgatókat, a korábbi és későbbi típusok csoportjába, majd gyengébben és jobban teljesítőket különböztettünk meg (53.A ábra). Mindkét kronotípus csoportban kiszámoltuk a gyengén teljesítés esélyhányadosát külön-külön a reggeli és délutáni tesztíráásra. A reggel írók körében több mint kétszer nagyobb eséllyel voltak gyengébben teljesítők a későbbi kronotípusok, mint a koraiak, míg a délutáni csoportban fordított volt az összefüggés (53.B ábra). Logisztikus regressziós elemzéssel pedig azt állapítottuk meg, hogy a késői típusok nagyobb valószínűséggel teljesítettek gyengén reggel, mint a korai csoportba tartozók, és bár a délutáni csoportoknál inverz tendencia volt megfigyelhető, az nem érte el a szignifikancia küszöböt (53.A ábra). Itt érdemes visszaemlékeznünk, hogy a délutáni tesztíráás 14:00 óra körül volt, ami nem számít extrém időpontnak sem a korai, sem a késői típusok szempontjából.

A

	Low achievers	High achievers	Adjusted odds ratio	<i>p</i>
Morning test-takers				
Earlier type	28	37	2.44	0.017
Later type	43	21		
Afternoon test-takers				
Earlier type	35	24	0.54	0.10
Later type	26	33		

B

53. ábra: A kronotípus, a tesztíráás időpontja és a tanulmányi teljesítmény közötti kapcsolat vizsgálata

A) Regresszió analízis eredményei. A táblázatban megadott szempontok szerint mind a reggeli, mind a délutáni tesztírókat a szövegben részletesen leírt módon késői és korai, illetve jobban és gyengébben teljesítők csoportjába soroltuk. Az első két oszlopban az egyes csoportok létszáma látható. A logisztikus regressziós vizsgálatban a nem szerepelt kofaktorként. **B)** A gyenge teljesítmény esélye a teszt időpontjának és a kronotípusnak a függvényében az A) pont táblázatának adatai alapján. $n=247$

A vizsgaidőszakban a hallgatóknak általában nincsen időhöz kötött tevékenységük, és így maguk oszthatják be tanulási és pihenési idejüket. Ezek alapján feltételeztük, hogy a hallgatókat ebben az időszakban jóval kevésbé érinti a SJL, mint a szorgalmi időszakban, amikor csaknem minden nap reggel 8 órakor kezdődik előadásuk vagy gyakorlatuk.

Feltételezésünk ellenőrzésére a hallgatókat egy további rövid kérdőív kitöltésére kértük meg. Ebben arról nyilatkoztak, hogy szabadabban választhatják-e meg alvási idejüket a vizsgaidőszakban, mint a szorgalmi időszakban, illetve, hogy az alvásuk időzítése inkább a szorgalmi időszak munka- vagy hétvégi napjaihoz hasonlóan alakul-e. A megkérdezettek 93 %-a válaszolt a feltételezettnek megfelelően, ami tehát arra utal, hogy a vizsgaidőszakban jóval kevésbé jellemző a hallgatókra a SJL, mint a szorgalmi időszakban. Ezután megvizsgáltuk, hogy van-e korreláció az alvási jellemzők és a vizsgateszt eredménye között (7. táblázat, 52.B ábra), de nem volt összefüggés. Ez viszont arra utal, hogy azok a hallgatók, akiknek a hétköznapi időbeosztása jelentősen különbözött a biológiai órájuk szerinti ideális beosztástól a szorgalmi időszakban (azaz nagy volt a SJL-ük), jobban tudtak tanulni és teljesíteni a vizsgaidőszakban, azaz akkor, amikor szabadon oszthatták be idejüket és nem volt SJL-ük. Ebből a gondolatból kiindulva megvizsgáltuk, hogy a hallgatók egyéni teljesítménykülönbsége a két időszak között mutat-e összefüggést a szorgalmi időszakban tapasztalt SJL-gel (7. táblázat, 52.C ábra). Láthatjuk, hogy a vizsgaidőszakban tapasztalt teljesítményjavulás a szorgalmi időszakhoz képest pozitívan korrelált az SJL-gel. Mindez arra mutat, hogy a SJL hozzájárult a szorgalmi időszakban tapasztalt gyengébb tanulmányi teljesítményhez.

4.2.2.3. Összefoglalás, következtetések, limitációk

Mintánkban az átlagos kronotípus és a lakóhely időzónán belüli elhelyezkedésének összefüggése értékes adattal erősítette meg azt a korábbi feltevést, hogy még a modern, városi ember esetében is a természetes fényviszonyok (napkelte, napnyugta időpontja) számítanak a legmeghatározóbb "Zeitgeber"-nek. Ezen kívül adatpontunk jó illeszkedése a korábban felvett korrelációs egyenesre az általunk magyarra átültetett MCTQ validitásának alátámasztására is szolgált.

Eredményeink szerint a SJL negatívan korrelál a heti tesztek eredményével. Ezzel szemben a korábbi SJL nem mutatott összefüggést a vizsgateszt eredményével, amit abban az időszakban írtak a hallgatók, amikor saját ritmusuk szerint alhattak, azaz nem volt SJL-ük. A hetenkénti teszt időpontja szintén befolyásolta a tanulmányi teljesítményt, különösen a reggeli tesztek esetében volt nyilvánvaló a kapcsolat, ilyenkor ugyanis a relatíve késői típusok gyengébben teljesítettek, mint a koraiak. Érdekes még egyszer kiemelni azt is, hogy az alvás hossza a mintánkban nem mutatott összefüggést a teljesítménnyel. Fontos előnye volt a rendelkezésünkre álló adatoknak, hogy individuális teljesítmény különbségeket is meg tudtunk határozni a két időszak között. Ennek kapcsán azt láttuk, hogy a szorgalmi időszakban nagyobb

SJL-gel rendelkező és gyengébb teljesítményt mutató hallgatók a vizsgaidőszakban eredményesen tudtak tanulni, és ezzel korábbi lemaradásuk a vizsgára kompenzálódott. Úgy gondoljuk, hogy ebben az SJL megszűnése a vizsgaidőszakra fontos faktorként szerepelhet. Bár a kronotípus szorosan korrelál a SJL-gel, mintánkban csak a SJL mutatott összefüggést a tanulmányi teljesítménnyel, a kronotípus nem. Ennek alapján feltételezzük, hogy a kronotípus tanulási eredményességre való hatásában (amit más tanulmányok felvetettek) (294, 295, 297, 298), meghatározó mediáló tényező lehet az alvási időablak szociális kényszer szülte eltérése a belső óra által diktált alvásidőzítéstől.

Az eredmények értékelésekor bizonyos limitáló tényezőket is figyelembe kell venni. Tanulmányunkban az alvásnak csak mennyiségi mutatóit használtuk, az alvásminőséget nem mértük, pedig az is befolyásolhatja a tanulmányi teljesítményt. Mintánkban nagyobb arányban voltak nők, mint férfiak, ezért a nemet kofaktorként figyelembe kellett vennünk az elemzéskor. A nemi arányok egyébként jól megfeleltek az európai egyetemek orvosi fakultásaira jellemző nemi összetételnek. A heti tesztek és vizsgatesztek összehasonlításának limitáló tényezője lehet, hogy míg a heti tesztek egy viszonylag kis anyagrészt kértek számon, a vizsgateszt anyaga a teljes tananyagból került ki.

Eredményeink egy új területen, az egyetemi tanulmányi teljesítménnyel kapcsolatban mutatnak rá a SJL negatív hatásaira, és egyben felhívják a figyelmet a SJL mérséklésének fontosságára. Ennek megfelelően a következő fejezet végén, amiben a SJL egy további fiziológiás működéssel való kapcsolatának elemzését ismertetem, röviden összefoglalom javaslatainkat arra vonatkozólag, hogy milyen módon lehetne csökkenteni a SJL mértékét társadalmunkban.

4.2.3. A szociális jetlag összefüggése az alvásminőséggel és a szív működés szabályozásával (13. közlemény)

Epidemiológiai és kísérletes adatok alapján ma már elfogadott, hogy a cirkadián ritmus komoly zavarai járó állapotok, mint például a többműszakos munkavégzés vagy a gyakori jetlag, különböző kardiovaszkuláris megbetegedések rizikófaktorai (299-303). Ugyan a SJL jobbra mérsékeltebb ritmuszavarral jár, de sokkal nagyobb populációt érint, mint az előbb említett állapotok, ezért a kardiovaszkuláris rendszerre kifejtett esetleges negatív hatása szintén komoly népegészségügyi problémát jelenthet.

A most ismertetésre kerülő tanulmányban a szociális jetlag és a kardiovaszkuláris szabályozás összefüggésének vizsgálatához alanyaink szívfrekvencia variabilitását (heart rate variability = HRV) elemeztük. A szívfrekvencia variabilitás a szív autonóm idegrendszeri szabályozását jól jellemző mutató (172, 173). Szempontunkból a módszer fontos előnye volt, hogy tudományos célra validált, kényelmesen, természetes otthoni környezetben hordható mérőeszköz állt rendelkezésünkre. A HRV az egymást követő szívverések közötti időtartamok változékonyságát jellemzi, amit alapvetően a szimpatikus és paraszimpatikus idegrendszer aktivitása határoz meg. Az egészséges autonóm szabályozás paraszimpatikus dominanciával párosul, amire a relatíve nagy HRV jellemző. A HRV csökkenése ezzel szemben a szimpatikus aktivitás fokozódására utal, ami viszont kardiovaszkuláris megbetegedések ismert rizikófaktora (172, 304). Mivel az autonóm idegrendszer működése és az alvásszabályozás szoros kapcsolatban állnak egymással, a HRV az alvásminőségnek és az alváshatékonyságnak is elfogadott mutatója. Az elalvást a paraszimpatikus tónus növekedése kíséri, ennek megfelelően az elalvástól kezdve a HRV fokozatosan növekszik, és maximumát a lassú hullámú alvás stádiumában éri el (305-308), amit a legpihentetőbb alvászakasznak tekintünk (309).

Vizsgálatainkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a jelentős SJL-nek kitett egyéneknél a hétköznapi, a kronotípus szerinti endogén alvásfázistól eltérő alvásidőzítés hatással van-e a kardiovaszkuláris szabályozásra és az alvásminőségre.

4.2.3.1. A vizsgálatban résztvevők alapvető jellemzői, napi ritmusuk és alvásidőzítésük jellegzetességei

Egészséges fiatal férfi egyetemisták körében olyan önkéntes vizsgálati alanyokat kerestünk, akik viszonylag szabályos időbeosztás szerint éltek mind a munkanapokon, mind a hétvégeken. Fontos volt az is, hogy az előzetesen kitöltött MCTQ kérdőív alapján a különböző mértékű SJL-gel rendelkezők hasonló arányban forduljanak elő a mintánkban. A minta kor ($23,2 \pm 1,5$ év, SD), BMI ($22,8 \pm 2,5$, SD) és szociális helyzet (budapesti egyetemisták) szerint homogénnek volt tekinthető. A résztvevők elmondásuk szerint egészségesek voltak, gyógyszert nem szedtek, és egyikük anamnézisében sem szerepelt alvászavar vagy kardiovaszkuláris megbetegedés. Fontos feltétel volt az is, hogy a vizsgálati időszakot megelőző hónapban nem vettek részt jetlag-gel járó utazáson. Az esetleges kardiovaszkuláris rizikó felmérése céljából egy rövid kérdőíven nyilatkoztak dohányzással, koffein tartalmú italok fogyasztásával és fizikai aktivitással kapcsolatos szokásaikról, valamint vérnyomásukról és koleszterin szintjükéről. Csak azok maradtak a mintában, akiknél ennek alapján nem volt megállapítható fokozott

kardiovaszkuláris kockázat. Kértük a résztvevőket, hogy a vizsgálati időszakban tartózkodjanak az extrém fizikai megerőltetéstől és az alkohol fogyasztástól. A fenti szempontok szerint a mérést követően megismételtük az interjút, aminek nyomán az először kiválasztott 35 alanyból 33-an feleltek meg minden kritériumnak, így az ő adataikat vettük figyelembe az elemzés során.

A vizsgálat 2016/17 tele és 2017 tavasza között zajlott, a tavaszi óráátállítást követő két hétben szünetelt. Minden hónapban hasonló számú kicsi és nagy SJL-ű alanyunk volt, és egy-egy résztvevő számára egy hétig tartott a vizsgálat. Fontos volt, hogy alanyaink megszokott környezetükben élve, tevékenységüket a szokásos időbeosztásuk szerint végezzék. Ennek megfelelően többségük ébresztőórára kelt a munkanapokon, viszont mindannyian maguktól ébredtek hétvégén. A hét teljes időszakában alvásnaplót vezettek, aminek alapján az erre a periódusra vonatkozó SJL-üket meg tudtuk határozni. Egy hétköznap (szerda) és ugyanazon hét szombat éjszakáján hordták a HRV meghatározáshoz szükséges, EKG alapú készüléket (Actiheart), ugyanezen napokon este és reggel vizelet mintát tettek el, és rögtön ébredés után kitöltötték a Groningen alvásminőség kérdőívet. A két vizsgálati éjszakára vonatkozó elalvási és ébredési időt az Actiheart software határozta meg, ezeket az időpontokat az alvásnapló alapján ellenőriztük. Az eszerint számolt SJL-t használtuk később a HRV paraméterekkel való korrelációs analízisekben.

A SJL mediánja (93 perc) szerint két csoportba soroltuk a résztvevőket, a kisebb és nagyobb SJL-űek csoportjába. A 93 perces érték jól megfelelt az európai felnőtt lakosságra jellemző átlagértéknek (138, 310, 311), és ennél adódott egy viszonylag nagyobb különbség (10 perc) két egymást követő SJL érték között. A két csoport se kor, se BMI szerint nem különbözött szignifikánsan (adatok a 13. közleményben).

8. táblázat: Az alvás időzítésének és időtartamának összehasonlítása a kisebb és nagyobb SJL-ű csoportban

Time (hh:mm)	Workday		Free day		Comparisons	
	Lower SJL	Higher SJL	Lower SJL	Higher SJL	Workday	Free day
					p	p
Bedtime	23:45 (00:52)	23:51 (00:49)	23:56 (00:48)	01:27 (00:52)	0.775	<0.0001
Sleep onset	23:57 (00:50)	00:03 (00:51)	00:09 (00:50)	01:36 (00:51)	0.713	<0.0001
Waking up	07:09 (00:39)	07:02 (00:28)	08:45 (01:09)	10:00 (01:40)	0.540	0.019
Sleep duration	07:13 (00:56)	06:59 (00:43)	08:35 (01:11)	08:25 (01:27)	0.433	0.706

A csoportra jellemző átlagértékek vannak feltüntetve (SD). Kétmintás t-próba, n=17 (kisebb SJL-ű csoport; lower SJL), n=16 (nagyobb SJL-ű csoport; higher SJL)

Elsőként azt kívántuk ellenőrizni, hogy a vizsgálat hetében alanyaink valóban a rájuk jellemző ritmus szerint aludtak-e. Ehhez az alvási naplóból nyert adatokat összehasonlítottuk a korábban kitöltött és az általános alvási jellemzőikre rákérdező MCTQ adataival. Mind a kronotípus (MSF_{sc}), mind a SJL esetében jó korrelációt kaptunk ($r=0,702$, $p<0,001$; illetve $r=0,763$, $p<0,001$, Pearson-féle korreláció). A 8. táblázat külön mutatja a két résztvevő csoport alvási időadatait a vizsgálat napjaira vonatkozóan. Hétköznapokon a két csoport adatai nem különböztek, míg hétvégén a nagyobb SJL-ű csoport szignifikánsan később feküdt le és aludt el, és természetesen másnap később kelt, mint a másik csoport. Mindkét csoport hasonló mértékben hosszabban aludt hétvégén, mint hétköznap. Mivel a homeosztatisz alvásszabályozás egy fontos faktora az ébren töltött idő, ezt is meghatároztuk mindkét mérés előtti napra, de sem csoport, sem csoport x nap hatást nem találtunk (9. táblázat).

9. táblázat: A mérést megelőzően ébren töltött idő összehasonlítása a két csoport között

	Lower SJL		Higher SJL	
	workday	free day	workday	free day
time awake (hh:mm)	16:35 (00:15)	15:21 (00:16)	16:34 (00:09)	15:07 (00:19)

A csoportra jellemző átlagértékek vannak feltüntetve (SEM). Kétszemponos ANOVA-val se csoport, se csoport x nap hatás nem mutatható ki ($p=628$). $n=17$ (kisebb SJL-ű csoport; lower SJL), $n=16$ (nagyobb SJL-ű csoport; higher SJL)

Az endogén ritmus indikátorának tekintett melatonin gyorsan metabolizálódik 6-szulfátomelatoninná, ami a vesén keresztül választódik ki, így vizeletben megjelenő mennyisége jól jellemzi a melatonin elválasztást.

10. táblázat: A melatonin metabolit kreatininre normalizált koncentrációja a reggeli és esti vizeletben: csoportok közötti összehasonlítás

					Comparisons	
	Workday		Free day		Workday	Free day
6-sulfatoxymelatonin/ creatinine ratio (mmol/nmol)	Lower SJL	Higher SJL	Lower SJL	Higher SJL	p	p
Evening	2.143 (0.645)	2.293 (0.410)	3.654 (0.715)	3.988 (1.048)	0.242	0.796
Morning	10.557 (1.354)	10.791 (1.718)	16.021 (4.165)	12.502 (2.318)	0.858	0.648

A csoportra jellemző átlagértékek vannak feltüntetve (SEM). Mann-Whietney U teszt, $n=17$ (kisebb SJL-ű csoport; lower SJL), $n=14$ (nagyobb SJL-ű csoport; higher SJL)

Alanyaink reggeli és esti mintái között jelentős különbség volt, a metabolit koncentrációjának átlagos egyéni hányadosa (reggeli/esti) $6,75 \pm 0,75$ volt, ami jól mutatja, hogy a résztvevők cirkadián ritmusa a fiziológiásnak megfelelő volt. Ugyanakkor sem az esti, sem a reggeli melatonin koncentráció nem mutatott összefüggést a SJL-gel (10. táblázat), azaz a melatonin vizeletben mérhető szintje nem tűnt a ritmusváltozás érzékeny indikátorának.

4.2.3.2. A HRV időtartományban történő elemzése

Első megközelítésként az alvás teljes időtartamára számított átlagos variabilitás mutatókat hasonlítottuk össze a két nap között a két vizsgálati csoportban külön-külön. Erre az időtartamra egyedül a legáltalánosabb HRV paraméter, az SDNN (standard deviation of the normal to normal intervals; a ciklushosszak szórásai) mutatott különbséget a két nap között: a nagyobb SJL-gel rendelkező csoportban a hétvégi érték magasabb volt, mint a hétköznapi (11. táblázat).

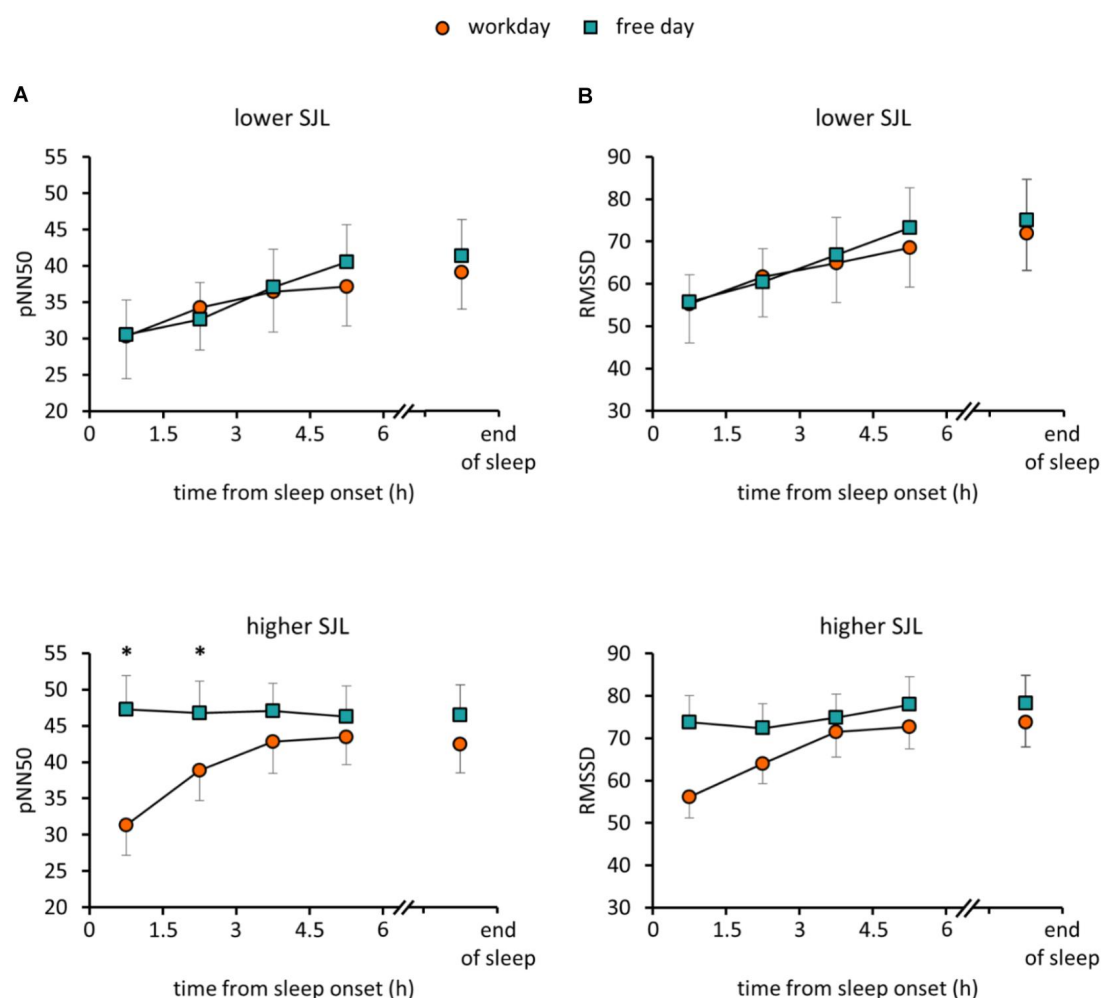
11. táblázat: A teljes éjszakára számított szívfrekvencia mutatók és összehasonlításuk

	Lower SJL		Higher SJL		Comparisons	
					Lower SJL	Higher SJL
	Workday	Free day	Workday	Free day	p	p
HR (1/min)	59.1 (2.1)	58.1 (1.3)	57.8 (1.8)	57.2 (2.1)	0.520	0.739
SDNN	86.8 (7.3)	95.1 (6.4)	91.5 (6.2)	102.2 (6.9)	0.088	0.018
RMSSD	61.1 (8.3)	64.9 (7.4)	64.1 (4.5)	72.8 (5.4)	0.422	0.092
pNN50	32.8 (5.1)	35.2 (4.3)	37.7 (3.6)	44.2 (3.9)	0.540	0.107

Az elalvástól ébredésig mért szívfrekvencia és HRV adatok átlagát mutatja a táblázat. A munka- és szabad napokra vonatkozó értékeket hasonlítottuk össze mindkét csoporton belül. Párosított t-próba, $n=17$ (lower SJL), $n=14$ (higher SJL).

Következő lépésként részletesebb elemzést végeztünk, amihez az alvást másfél órás szakaszokra osztottuk, és a HRV paramétereket egy-egy időszakaszra átlagolva ábrázoltuk az elalvástól kezdve. Mivel a minimális alváshossz 6 óra volt a mintánkban, 4 egymást követő időblokkot elemeztünk mindkét éjszaka. A vagus aktivitás jellemzésére leggyakrabban használt paraméterek, a pNN50 (az 50 ms-nál nagyobb szomszédos RR-intervallum különbségek százalékos előfordulása) és az RMSSD (az egymás utáni RR-intervallum különbségek négyzetes középértéke) alakulását mutatja a 54. ábra. Az ismétléses ANOVA vizsgálat során három faktort (csoport, nap és alvási blokk) vettünk figyelembe, amelyek közül a blokknak volt hatása mindkét HRV paraméter esetében, a pNN50 esetében pedig nap x blokk x csoport interakció is kimutatható volt ($p=0,015$). Az ábrán látható, hogy az alacsonyabb SJL-ű csoport

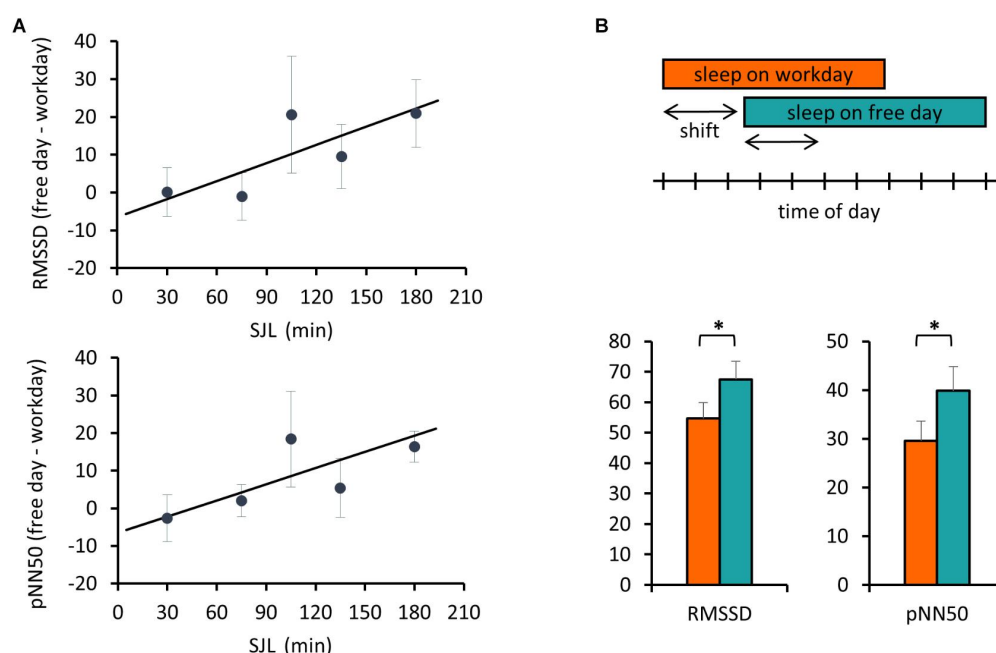
esetében a két nap görbéje nagyon hasonló lefutású volt. Ezzel szemben a magasabb SJL-ű csoportban az első két alvási blokkban az egyénenkénti HRV értékek jelentősen különböztek, mégpedig olyan módon, hogy a szabad nap éjszakájának első felét nagyobb variabilitás, azaz jelentősebb paraszimpatikus aktivitás jellemezte, mint a munkanapi alvás azonos időszakmenségét. A post hoc teszt alapján egyetlen alvási időblokkban sem volt különbség a két csoport között. Az RMSSD esetében a pNN50-nél tapasztalthoz hasonló tendenciát láttunk, de az interakció itt nem érte el a szignifikancia szintet ($p=0,059$).



54. ábra: A HRV paraméterek alakulása az alvás folyamán

A pNN50 (A) és RMSSD (B) adatok átlagát 1,5 órás időszakokra számoltuk, és külön ábrázoltuk a szabad (zöld) és munkanapokra (piros) vonatkozó értékeket mind a kisebb (felső panel), mind a nagyobb (alsó panel) SJL-ű csoportban. Az utolsó alvási blokk adata (a tengelytörés után külön pontként feltüntetve) a hétköznapi alvás utolsó 1,5 órájára számolt érték, illetve szabadnapon az ennek megfelelő időszakra vonatkozó átlagos HRV (ugyanannyi idővel az elalvástól számítva, mint a hétköznapon). Az első hat órás adatokat ismétléses ANOVA-val elemeztük (faktorok: nap, alvási blokk, résztvevő csoport), post hoc tesztként Fisher tesztet alkalmaztunk. Az alvás végi adatok összehasonlítása párosított t-próbával történt. $n=15$ (lower SJL), $n=11$ (higher SJL)

Felmerült bennünk, hogy az alvás első felében-harmadában tapasztalt különbséget nem kompenzálja-e egy ellentétes irányú eltérés az alvás végén, azaz egy olyan időszakban, ami egyeseknél kimaradt az eddig ismertetett elemzésből (itt nyilvánvalóan azokról van szó, akik 6 óránál többet aludtak). Ennek vizsgálatához a hétköznapi alvási időszakok utolsó másfél órájára és az ennek megfelelő hétvégi időszakra (ugyanannyi idővel az elalvást követően) is elvégeztük az összehasonlítást, de nem találtunk különbséget a két éjszaka között (54. ábra, utolsó pontok a diagrammokon), azaz az alvás végén nem kompenzálódott a korábbi alvásszakaszban tapasztalt különbség.



55. ábra: A két nap közötti HRV különbség és az SJL kapcsolatának vizsgálata

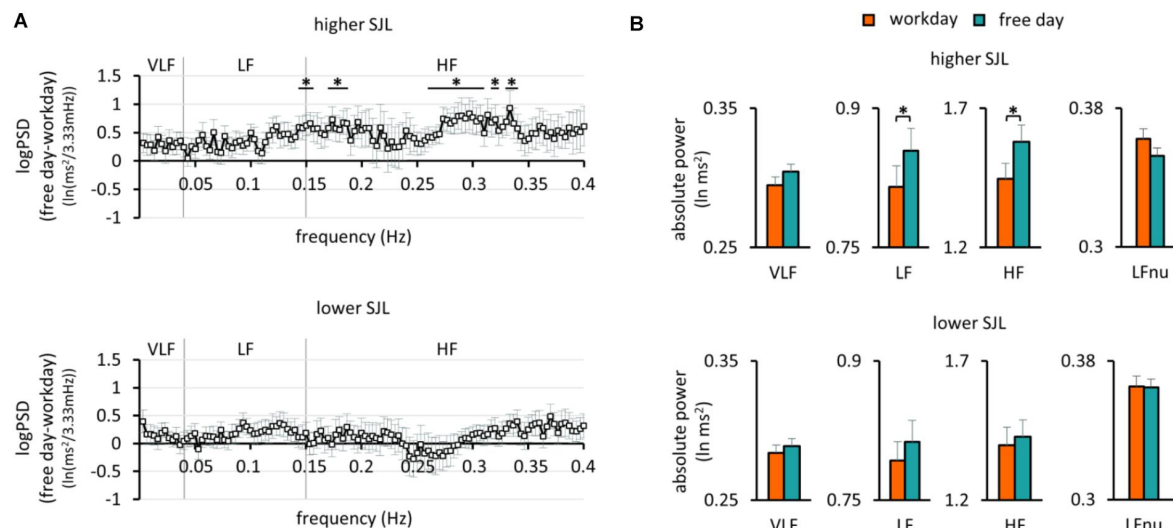
A) A HRV paraméterek két nap közötti különbsége korrelál az SJL-lel az alvás első két órájában. Meghatároztuk az RMSSD (felső ábrarész) és pNN50 (alsó ábrarész) első két órára vonatkozó átlagértékét, és a szabad napi - munkanapi értékek individuális különbségeit korreláltattuk az SJL értékével. Ábrázoláskor a 30, illetve (kisebb elemszám esetén) 60 perces SJL intervallumokhoz tartozó átlagértékeket és a lineáris regressziót jellemző trend vonalat tüntettük fel. Pearson-féle korreláció, $n=30$. **B)** Az alvási idő korábbra tolódása alacsonyabb HRV-vel párosul a hétköznapiakon. Felső ábrarész: Az elemzett időszak szemléltetése. Minden vizsgált személy esetében a hétköznapi és hétvégi elalvási időpont közötti időtartamra (shift, kétirányú nyíllal jelölt, az elalvástól számított azonos hosszúságú időszak a két napon) határoztuk meg az átlagos HRV értékét mind a munkanapon, mind a szabad napon. Párosított t-próba, $n=18$, $p=0,016$ (RMSSD), $0,009$ (pNN50)

A következőkben a SJL és az alvás első szegmenseiben tapasztalt, két nap közötti HRV eltérések összefüggéseire összpontosítottunk. Amennyiben az első 3 órát vizsgáltuk (az 54. ábrán lévő első két alvási blokknak megfelelő időszak), a SJL és a szabadnapi-munkanapi egyéni pNN50 különbség pozitív korrelációt mutatott (Pearson-féle korreláció, $r=0,39$,

$p=0,033$, $n=30$). Ha az elemzést az első két órára szűkítettük, mind a $pNN50$ ($r=0,414$, $p=0,023$, $n=30$), mind az $RMSSD$ ($r=0,365$, $p=0,047$, $n=30$) esetében pozitív összefüggést láttunk (55.A ábra), azaz nagyobb SJL-hez nagyobb HRV különbség társult. Az eddigiek alapján úgy tűnik, hogy a kronotípusnak nem megfelelő, korai elalvás a hétköznapi HRV csökkenést eredményez az alvás első néhány órájában a hétvégi értékekkel összehasonlítva. Következő elemzésünk ezért pontosan arra az időszakra irányult, ami megfelelt az elalvási idő két nap közötti eltolódásának (55.B ábra). Azok adatait dolgoztuk fel, akiknél minimum 25 perc volt ez az időintervallum. Feltételezésünkkel összhangban mindkét paraméter esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a HRV a hétköznapiakon, mint a szabadnapokon.

4.2.3.3. A HRV frekvencia tartományban történő elemzése

A HRV szabad és munkanapok közötti változását a frekvencia tartományban való elemzéssel is vizsgáltuk. Ha a spektrális teljesítmény-sűrűség (power spectral density, PSD) két nap közötti különbségét elemeztük az alvás első két órájában, a nagyobb SJL-ű csoportban szignifikáns eltérést láttunk több frekvencia tartományban is, míg az alacsonyabb SJL-ű csoportban nem volt különbség (56.A ábra).



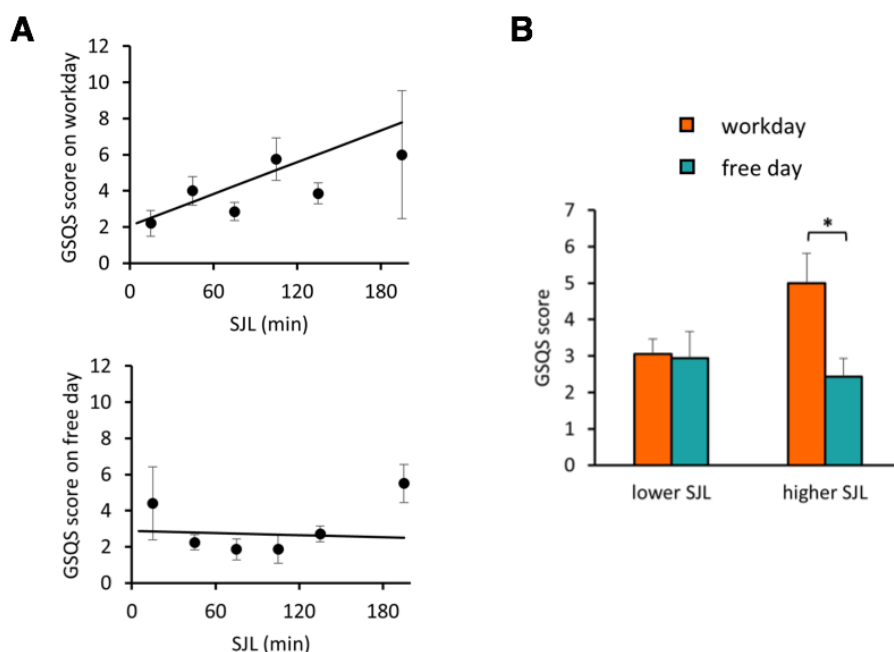
56. ábra: A HRV frekvencia tartományban történő analízise az alvás első két órájában

A) A teljesítménysűrűségek két nap közötti különbsége a nagyobb (felső ábrarész) és kisebb (alsó ábrarész) SJL-ű csoportban. A csillaggal jelölt tartományokban szignifikáns a különbség a két nap között. Egymintás t-próba, $n=13$ (higher SJL), $n=17$ (lower SJL) **B)** A különböző frekvencia tartományba eső abszolút teljesítmények napok közötti összehasonlítása a nagy és kis SJL-ű csoportban. Párosított t-próba, $n=13$ (higher SJL), $n=17$ (lower SJL).

Ha frekvencia tartományokban külön-külön végeztünk összehasonlítást, azt láttuk, hogy a napok közötti eltérés a nagyobb SJL-ű csoportban az alacsony (LF) és a magas (HF) frekvencia tartományban volt jelentős, míg a nagyon alacsony frekvenciatartományban (VLF) nem volt jellemző (56.B ábra). Az LF tartomány jellemzi tipikusan a vagus aktivitást (173, 312, 313), a HF tartomány pedig a szimpatikus és paraszimpatikus tónus együttes markere. A szimpatikus aktivitás elfogadott mutatója az alacsony frekvenciájú tartományra eső normalizált teljesítmény ($LF_{nu} = LF / (LF + HF)$), ebben nem láttunk különbséget (56.B ábra). Összességében tehát ezek az eredmények is arra utalnak, hogy a nagy SJL-ű csoportban a paraszimpatikus moduláció volt különböző a két éjszaka első két órájában.

4.2.3.4. Az SJL és a szubjektív alvásminőség összefüggése

Az alvásminőség vizsgálatához a Groningen alvásminőség kérdőív validált, magyar változatát használtuk (314, 315). Ez a kérdőív az elmúlt éjszakai alvásra vonatkozó 15, egyszerűen értelmezhető, eldöntendő kérdésből áll. 14 kérdésre adott válasz alapján rendel számot (GSQS score) az alvásminőséghez, a nagyobb összérték rosszabb, az alacsonyabb jobb alvásminőséget jelez.



57. ábra: A SJL és az alvásminőség összefüggése

A) Nagyobb SJL-hez rosszabb alvásminőség társul hétköznapokon. Ábrázoláskor a 30, illetve, az utolsó pontnál a kisebb elemszám miatt 90 perces SJL intervallumokhoz tartozó átlagértékeket és a lineáris regressziót jellemző trend vonalat tüntettük fel. Pearson korreláció; hétköznapokon (felső ábrarész): $r=0,404$, $p=0,02$, $n=33$; szabad napokon (alsó ábrarész): $r=-0,041$, $p=0,82$, $n=33$ **B)** A nagyobb SJL-ű csoport rosszabb alvásminőségről számolt be a hétköznapokon. Az egyes csoportok átlagos GSQS értéke szabad és munkanapokon. Párosított t-próba, $n=17$ (kisebb SJL), $n=16$ (nagyobb SJL)

Vizsgálatunkban a SJL összefüggést mutatott a munkanapi alvásminőséggel, mégpedig úgy, hogy nagyobb SJL-hez rosszabb alvásminőség társult. Ezzel szemben a szabad napokon nem volt összefüggés (57.A ábra). Amennyiben a két csoport értékeit külön vizsgáltuk, azt láttuk, hogy a kis SJL-ű csoportba tartozók alvásminősége hasonló volt a munka- és szabad napokon, míg a nagyobb SJL-gel rendelkezőknek rosszabb volt a munkanapi alvásminősége, mint a saját szabadnapi alvásminőségük, illetve mint a másik csoporté a hétköznapon (kétmintás t-próba, $p=0,043$) (57.B ábra).

4.2.3.5. Az eredmények összefoglalása, limitáló tényezők, továbbvezető gondolatok

Megfigyeléseink szerint az alvás első néhány órájában a SJL mértékével arányosan különbözött vizsgálati alanyaink munkanapi és szabad napi HRV-je, azaz minél inkább eltért az adott egyén munkanapi alvásidőzítése a kronotípusához közelebb álló szabadnapi alvásidőzítéstől, annál gyengébben érvényesült a paraszimpatikus aktivitás a kardiovaszkuláris szabályozásában. Kimutattuk azt is, hogy ezt az eltérést nem kompenzálta ellentétes irányú különbség az alvás későbbi szakaszaiban. Ezek alapján azt mondhatjuk, hogy az endogén ritmustól eltérő, szociális tényezők által meghatározott alvásidőzítéshez összességében kedvezőtlenebb autonóm reguláció társult hétköznap éjszaka. A nagyobb SJL-gel (és ennek megfelelően későbbi kronotípussal) rendelkezők esetében feltételezhetjük, hogy biológiai órájuk a hétköznap alvásuk kezdeti időszakában nem hat serkentőleg alvásukra, míg hétvégén, amikor később fekszenek le, cirkadián ritmusuk is segíti alvásukat elmélyíteni, annak regeneratív jellegét növelni. Az alvásidőzítés és cirkadián szabályozás szerepét erősíti az a tény is, hogy a két csoport alváshossza, és így hétköznap felhalmozódott alvásmegvonása között, valamint az egyes napokon ébren töltött ideje (meghatározó homeosztatisztikus alvásszabályozási faktor) között nem volt különbség.

Fontos jellemzője volt vizsgálatainknak, hogy egyéni HRV változásokat vett figyelembe. A HRV abszolút értéke ugyanis az egyének között hasonló körülmények mellett is igen nagy különbségeket mutat, ezért az egyéni értékek változásai informatívabbnak tekinthetők. Az abszolút HRV értékek egyéni különbségeinek okai nagyrészt ismeretlenek (316), de tudjuk, hogy az autonóm szabályozás plaszticitásán túl különböző agyi régiók strukturális és funkcionális tulajdonságaival is összefüggést mutatnak (304, 317). Mindazonáltal érdemes megjegyezni, hogy a nagyobb SJL-ű csoport átlagos HRV értékei mindkét éjszaka magasabbak voltak a másik csoporténál. Nagyobb elemszám mellett végzett

további vizsgálatok dönthetnék csak el, hogy a nagyobb SJL-hez és/vagy késői kronotípushoz tipikusan nagyobb éjszakai HRV társul-e.

Irodalmi adatok szerint a HRV paraméterek mind egészséges, mind patológiás körülmények között szenzitív indikátorai a kardiovaszkuláris rendszer működésének. Egészséges férfiakban a vagus tónust jellemző HRV paraméterek szoros összefüggést mutattak az endothel funkcióval (318). Egy igen nagy számú adatra (22 ezer alany adatai 8 tanulmányból) támaszkodó metaanalízis szerint egészséges emberek esetében is növeli a kardiovaszkuláris betegségek jövőbeni kialakulásának valószínűségét a normál tartományon belüli, de viszonylag alacsony HRV (319). Ezen kívül az autonóm reguláció megváltozása hozzájárulhat magas vérnyomás kialakulásához, a koronáriák állapotának romlásához, aritmiák és kongesztív szívelégtelenség kifejlődéséhez (320-324). Mindezek alapján eredményeink arra hívják fel a figyelmet, hogy a SJL negatív hatással lehet a kardiovaszkuláris szabályozásra, és ezáltal növelheti a szív- és érrendszeri megbetegedések kialakulásának kockázatát.

Az autonóm idegrendszer működése és az alvás szabályozás közötti szoros kölcsönhatás régóta ismert, aminek révén a HRV az alvásminőség egyik indikátorának is tekinthető. Így nem meglepő, hogy mintánkban a HRV változáshoz hasonlóan a hétköznapi szubjektív alvásminőség is negatív összefüggést mutatott a SJL-gel. Összességében eredményeink arra utalnak, hogy a SJL károsan befolyásolja a kardiovaszkuláris szabályozást, valamint az alvás minőségét és hatékonyságát.

Eredményeink értékelésekor ezúttal is figyelembe kell venni bizonyos limitáló tényezőket. Bár az értékelt mintánk sok szempontból homogén volt, a minta viszonylag kicsinek tekinthető. Annak érdekében, hogy ciklikus hormonális hatások ne limitálják az értékelést, csak férfiakat vontunk be a tanulmányba, így nem zárható ki, hogy a talált összefüggések nőkre nem vagy csak részben érvényesek. A homogenitás érdekében csak fiatal alanyaink voltak, ezért egy további tanulmány témája lehetne, hogy a kor befolyásolja-e az általunk talált összefüggéseket. Ez azért is érdekes, mert tudjuk, hogy az alvásszabályozás az életkorral jelentősen változik.

Mindkét tanulmányunk eredményei és számos, az utóbbi néhány évben megjelent, a SJL egészségkárosító hatását valószínűsítő irodalmi adat is nyomatékosítja e ritmuszavar mérséklésének fontosságát. A munkaidő rugalmasabbá tétele, az iskolai időbeosztás megváltoztatása, a reggeli munka- vagy oktatáskezdésnek a korcsoporthoz illesztett (későbbre) időzítése nagymértékben hozzájárulhatna a SJL csökkentéséhez. Fontos elgondolkozni a nyári időszámítás káros következményein és megszüntetésén is, hiszen az a cirkadián óra fázisának

későbbre állításával tovább fokozza a SJL-et. Ilyen szempontból üdvözlendő, hogy kronobiológusok egyre intenzívebben lépnek föl a nyári időszámítás megszüntetése érdekében különböző társadalmi fórumokon is. Ugyanakkor nem szabad elfeledkezni a megfelelő egyéni stratégiák fontosságáról sem. A reggeli időszakban a környező fényintenzitás növelése, a napközbeni gyakoribb természetes fényexpozíció, ugyanakkor az esti órákban a nagy intenzitású mesterséges fény kerülése belső óránk fázisát korábbra állíthatja. Mivel a táplálkozás szintén hatékony fázismeghatározó, étkezéseink megfelelő időzítése is fontos eszköze lehet cirkadián óránk megfelelő beállításának.

5. Az eredmények összefoglalása

1. Az óra negatív komponense, a FRQ és a pozitív komponens WCC molekuláris együttműködésének új aspektusát tártuk fel. Kimutattuk, hogy a FRQ elősegíti a WCC foszforilációját, amivel egyidejűleg a komplex *frq*-promóterhez való kötődése gátlódik. Ezzel szemben a hipofoszforilált komplex kötődik a promóterhez és aktiválja a génátírást. A WCC foszforilációjának központi szabályozó szerepét alátámasztja az az eredményünk is, mely szerint a foszforiláció ritmusosan változik a cirkadián ciklus folyamán. Megmutattuk azt is, hogy a WCC defoszforilációja és ezáltal aktivációja a PP2A működéséhez kötött.
2. Részletesen elemeztük a WC-1, a WCC mennyiségét limitáló faktor expressziójának szabályozását. A *wc-1* génen belül három, különböző funkciójú promóter-régiót azonosítottunk. Eredményeink egyértelművé tették, hogy a WC-1 kifejeződésének transzkripció szinten történő szabályozása fontos szerepet játszik a kimeneti ritmus fázisának beállításában. További eredményeink pedig arra utaltak, hogy a FRQ poszttranszkripciós szinten hatva serkenti a WC-1 expressziót.
3. Kimutattuk, hogy a WCC fényindukálta dimerizációját és ezzel aktiválódását egy másik kék-fény receptor, a VVD a WCC-szel dinamikus heterodimert képezve gátolja. A VVD szintje érzékeny indikátora a megelőző időszak fényintenzitásának, molekuláris memóriaként működve, védi a cirkadián órát a zavaró, rövid vagy kis intenzitású fényingerektől, így működése alapvető feltétele a ritmus stabilitásának természetes fényhatások mellett.
4. Kimutattuk, hogy a bazális és az emelkedett ROS szint hatással van a cirkadián óra működésére mind ciklikusan változó, mind állandó környezeti körülmények esetén. Megfigyeléseink azt valószínűsítik, hogy a metabolismus során keletkező és SOD-1 aktivitástól is függő O_2^- mennyiség a meghatározó az óra szabályozása szempontjából. Kimutattuk továbbá, hogy a PP2A-aktivitás függ a ROS szinttől, így a ROS termelés emelkedése a WCC defoszforilációján keresztül befolyásolhatja annak aktivitását és így az óraműködést.
5. Eredményeink szerint a monomer G fehérje RAS2 részt vesz az óraműködés stabilizálásában változó környezeti glükóz koncentráció mellett. Kimutattuk, hogy RAS2

hiányában a negatív komponens FRQ foszforilációja és sejten belüli lokalizációja megváltozik, és hogy a RAS2 kölcsönhatásba lép az adenilátciklázsal. Eredményeink alapján valószínű, hogy a RAS jelátviteli útvonal cAMP-függő módon vesz részt az óraműködés metabolikus kompenzációjában.

6. Részletesen elemeztük a molekuláris óra komponenseinek expresszióját humán neutrofil granulocitákban, és nem találtunk minden alapvető komponensre kiterjedő robusztus oszcillációt. Kimutattuk azonban, hogy a keringő neutrofil granulocita készlet érettség szerinti összetétele cirkadián ingadozást követ. Eredményeink arra utalnak, hogy a neutrofil sejtek válaszkészségének napszaki változásait nem a saját molekuláris óra, hanem szisztémás faktorok szabályozhatják, és hogy a szabályozás egy lényeges eleme lehet a sejt készlet érettség szerinti összetételének időbeli változása.
7. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a szociális jetlag negatívan korrelál több élettani funkcióval. Ezen belül kimutattuk, hogy nagyobb szociális jetlag-hez gyengébb tanulmányi teljesítmény társul, és hogy a viszonylag késői típusok rosszabbul teljesítenek reggel, mint a korai típusok. További vizsgálatainkban a szociális jetlag negatív összefüggést mutatott a szív autonóm szabályozását jellemző HRV mutatókkal, és ezzel párhuzamosan a nagyobb szociális jetlag-hez rosszabb hétköznapi alvásminőség társult.

6. Köszönetnyilvánítás

A dolgozatot zárva, szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik az évek során tudományos gondolkodásomat, szemléletemet formálták, illetve biztatásukkal, tanácsaikkal vagy anyagi eszközökkel támogatták a munkámat.

Elsőként szeretnék megemlékezni gimnáziumi tanáraimról és arról a szellemi közösségről, amely, akkori nevén a Fazekas Mihály Fővárosi Gyakorló Gimnáziumban körülvett. Fontosnak érzem kiemelni matematika tanárom, Táborné Vincze Márta, magyar tanárom, Sümeginé dr. Tóth Piroska és történelem tanárom, Jóvérné Szirtes Ágota nevét, akik elemző gondolkodásra és problémamegközelítésre, igényes munkára tanítottak.

A tudomány világába TDK témavezetőm, Dr. Kapus András vezetett be, akinek barátsága, támogatása a PhD tanulmányaim alatt is meghatározó volt. Köszönöm PhD témavezetőmnek, Dr. Ligeti Erzsébetnek, hogy a korábbi közös munkát követően is figyelemmel kísérte tevékenységemet, tanácsokkal, eszközökkel támogatta munkámat. Köszönöm az Élettani Intézet igazgatóinak, Dr. Fonyó Attilának, Dr. Spät Andrásnak és Dr. Hunyady Lászlónak a munkámhoz nyújtott segítséget, a megfelelő feltételek biztosítását.

Szeretettel gondolok vissza azokra az időszakokra, amiket Wilhelm Just, Felix Wieland, később pedig Walter Neupert munkacsoportjában tölthettem. Diákként, illetve fiatal kutatóként példát jelentett számomra tudomány iránti alázatuk, kutatói szemléletük, támogató emberségük.

Dr. Michael Brunner mellett először Münchenben, majd Heidelbergben összesen hat évig dolgoztam. Gondolkodásmódja azóta is vezérfonalként szolgál számomra, büszke vagyok barátságára, és hálás azért, hogy önálló munkacsoport alakításomat eszközökkel is támogatta.

Nagyon köszönöm egykori és jelenlegi közvetlen munkatársaimnak Dr. Gyöngyösi Norbertnek, Dr. Ella Krisztinának, Südy Ágnesnek, Szőke Anitának és Makara Krisztinának, hogy csatlakoztak munkacsoportomhoz, és kitartásukkal, lelkesedésükkel, szakmai hozzáértésükkel és igyekezetükkel számos akadály leküzdésében társaim voltak. Vitathatatlan érdemük laborunk barátságos és támogató légkörének megteremtése, megőrzése. Köszönöm a laborban dolgozó diákkörös hallgatók lelkes együttműködését is.

Köszönöm az Élettani Intézet munkatársainak a sok segítséget. Külön köszönet illeti Dr. Mócsai Attilát és Dr. Geiszt Miklóst, akikkel a PhD megkezdése óta dolgozunk együtt és egymás mellett, és mind eszközökkel, mind tanácsokkal segítették munkámat.

Végül köszönöm családomnak, hogy mindvégig mellettem álltak, szeretettel és megértéssel támogatták munkámat.

7. Irodalomjegyzék

1. Tannenbaum GS, Martin JB. Evidence for an endogenous ultradian rhythm governing growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*. 1976;98(3):562-70. Epub 1976/03/01. doi: 10.1210/endo-98-3-562. PubMed PMID: 1261487.
2. Tannenbaum GS, Martin JB, Colle E. Ultradian growth hormone rhythm in the rat: effects of feeding, hyperglycemia, and insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology*. 1976;99(3):720-7. Epub 1976/09/01. doi: 10.1210/endo-99-3-720. PubMed PMID: 954665.
3. Aschoff J. CIRCADIAN RHYTHMS IN MAN. *Science (New York, NY)*. 1965;148(3676):1427-32. Epub 1965/06/11. doi: 10.1126/science.148.3676.1427. PubMed PMID: 14294139.
4. Reyes BA, Pendergast JS, Yamazaki S. Mammalian peripheral circadian oscillators are temperature compensated. *Journal of biological rhythms*. 2008;23(1):95-8. Epub 2008/02/09. doi: 10.1177/0748730407311855. PubMed PMID: 18258762; PubMed Central PMCID: PMC2365757.
5. Kozma-Bognár László NF. Sejtbiológia. In: Gábor S, editor. *Sejtbiológia: Medicina*; 2004.
6. Jud C, Schmutz I, Hampp G, Oster H, Albrecht U. A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. *Biological procedures online*. 2005;7:101-16. Epub 2005/09/02. doi: 10.1251/bpo109. PubMed PMID: 16136228; PubMed Central PMCID: PMC2365757.
7. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 2005;6(7):544-56. Epub 2005/06/14. doi: 10.1038/nrg1633. PubMed PMID: 15951747; PubMed Central PMCID: PMC2735866.
8. Konopka RJ, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(9):2112-6. Epub 1971/09/01. doi: 10.1073/pnas.68.9.2112. PubMed PMID: 5002428; PubMed Central PMCID: PMC2365757.
9. Siwicki KK, Eastman C, Petersen G, Rosbash M, Hall JC. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*. 1988;1(2):141-50. Epub 1988/04/01. doi: 10.1016/0896-6273(88)90198-5. PubMed PMID: 3152288.
10. Hardin PE, Hall JC, Rosbash M. Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990;343(6258):536-40. Epub 1990/02/08. doi: 10.1038/343536a0. PubMed PMID: 2105471.
11. Froehlich AC, Liu Y, Loros JJ, Dunlap JC. White Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequency promoter. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5582):815-9. Epub 2002/07/06. doi: 10.1126/science.1073681. PubMed PMID: 12098706.
12. Belden WJ, Lewis ZA, Selker EU, Loros JJ, Dunlap JC. CHD1 remodels chromatin and influences transient DNA methylation at the clock gene frequency. *PLoS Genet*. 2011;7(7):e1002166. Epub 2011/08/04. doi: 10.1371/journal.pgen.1002166. PubMed PMID: 21811413; PubMed Central PMCID: PMC2365757.
13. Merrow M, Franchi L, Dragovic Z, Gori M, Johnson J, Brunner M, et al. Circadian regulation of the light input pathway in *Neurospora crassa*. *EMBO J*. 2001;20(3):307-15. Epub 2001/02/07. doi: 10.1093/emboj/20.3.307. PubMed PMID: 11157738; PubMed Central PMCID: PMC2365757.
14. Guo J, Cheng P, Liu Y. Functional significance of FRH in regulating the phosphorylation and stability of *Neurospora* circadian clock protein FRQ. *J Biol Chem*. 2010;285(15):11508-15. Epub 2010/02/18. doi: 10.1074/jbc.M109.071688. PubMed PMID: 20159972; PubMed Central PMCID: PMC2365757.

15. Froehlich AC, Loros JJ, Dunlap JC. Rhythmic binding of a WHITE COLLAR-containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5914-9. Epub 2003/04/26. doi: 10.1073/pnas.1030057100. PubMed PMID: 12714686; PubMed Central PMCID: PMCPMC156301.
16. He Q, Cheng P, Yang Y, He Q, Yu H, Liu Y. FWD1-mediated degradation of FREQUENCY in *Neurospora* establishes a conserved mechanism for circadian clock regulation. *EMBO J*. 2003;22(17):4421-30. Epub 2003/08/28. doi: 10.1093/emboj/cdg425. PubMed PMID: 12941694; PubMed Central PMCID: PMCPMC202367.
17. Schafmeier T, Kaldi K, Diernfellner A, Mohr C, Brunner M. Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev*. 2006;20(3):297-306. Epub 2006/01/20. doi: 10.1101/gad.360906. PubMed PMID: 16421276; PubMed Central PMCID: PMCPMC1361701.
18. Dunlap JC, Loros JJ. Making Time: Conservation of Biological Clocks from Fungi to Animals. *Microbiol Spectr*. 2017;5(3). Epub 2017/05/21. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0039-2016. PubMed PMID: 28527179; PubMed Central PMCID: PMCPMC5446046.
19. Querfurth C, Diernfellner AC, Gin E, Malzahn E, Hofer T, Brunner M. Circadian conformational change of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY triggered by clustered hyperphosphorylation of a basic domain. *Mol Cell*. 2011;43(5):713-22. Epub 2011/09/03. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.033. PubMed PMID: 21884974.
20. Gorl M, Mellow M, Huttner B, Johnson J, Roenneberg T, Brunner M. A PEST-like element in FREQUENCY determines the length of the circadian period in *Neurospora crassa*. *EMBO J*. 2001;20(24):7074-84. Epub 2001/12/18. doi: 10.1093/emboj/20.24.7074. PubMed PMID: 11742984; PubMed Central PMCID: PMCPMC125781.
21. He Q, Cha J, He Q, Lee HC, Yang Y, Liu Y. CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the WHITE COLLAR complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. *Genes Dev*. 2006;20(18):2552-65. Epub 2006/09/19. doi: 10.1101/gad.1463506. PubMed PMID: 16980584; PubMed Central PMCID: PMCPMC1578678.
22. Diernfellner AC, Querfurth C, Salazar C, Hofer T, Brunner M. Phosphorylation modulates rapid nucleocytoplasmic shuttling and cytoplasmic accumulation of *Neurospora* clock protein FRQ on a circadian time scale. *Genes Dev*. 2009;23(18):2192-200. Epub 2009/09/18. doi: 10.1101/gad.538209. PubMed PMID: 19759264; PubMed Central PMCID: PMCPMC2751991.
23. Baker CL, Kettenbach AN, Loros JJ, Gerber SA, Dunlap JC. Quantitative proteomics reveals a dynamic interactome and phase-specific phosphorylation in the *Neurospora* circadian clock. *Mol Cell*. 2009;34(3):354-63. Epub 2009/05/20. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.023. PubMed PMID: 19450533; PubMed Central PMCID: PMCPMC2711022.
24. Mehra A, Shi M, Baker CL, Colot HV, Loros JJ, Dunlap JC. A role for casein kinase 2 in the mechanism underlying circadian temperature compensation. *Cell*. 2009;137(4):749-60. Epub 2009/05/20. doi: 10.1016/j.cell.2009.03.019. PubMed PMID: 19450520; PubMed Central PMCID: PMCPMC2718715.
25. Pogue AM, Liu Q, Baker CL, Dunlap JC, Loros JJ. The *Neurospora* checkpoint kinase 2: a regulatory link between the circadian and cell cycles. *Science (New York, NY)*. 2006;313(5787):644-9. Epub 2006/07/01. doi: 10.1126/science.1121716. PubMed PMID: 16809488.
26. Huang G, Chen S, Li S, Cha J, Long C, Li L, et al. Protein kinase A and casein kinases mediate sequential phosphorylation events in the circadian negative feedback loop. *Genes Dev*. 2007;21(24):3283-95. Epub 2007/12/15. doi: 10.1101/gad.1610207. PubMed PMID: 18079175; PubMed Central PMCID: PMCPMC2113029.
27. Yang Y, Cheng P, Zhi G, Liu Y. Identification of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase that phosphorylates the *Neurospora* circadian clock protein FREQUENCY. *J Biol Chem*. 2001;276(44):41064-72. Epub 2001/09/12. doi: 10.1074/jbc.M106905200. PubMed PMID: 11551951.

28. Yang Y, He Q, Cheng P, Wragge P, Yarden O, Liu Y. Distinct roles for PP1 and PP2A in the *Neurospora* circadian clock. *Genes Dev.* 2004;18(3):255-60. Epub 2004/02/12. doi: 10.1101/gad.1152604. PubMed PMID: 14871927; PubMed Central PMCID: PMCPMC338279.
29. Cha J, Chang SS, Huang G, Cheng P, Liu Y. Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. *EMBO J.* 2008;27(24):3246-55. Epub 2008/11/21. doi: 10.1038/emboj.2008.245. PubMed PMID: 19020516; PubMed Central PMCID: PMCPMC2609740.
30. Linden H, Macino G. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J.* 1997;16(1):98-109. Epub 1997/01/02. doi: 10.1093/emboj/16.1.98. PubMed PMID: 9009271; PubMed Central PMCID: PMCPMC1169617.
31. He Q, Cheng P, Yang Y, Wang L, Gardner KH, Liu Y. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science (New York, NY)*. 2002;297(5582):840-3. Epub 2002/07/06. doi: 10.1126/science.1072795. PubMed PMID: 12098705.
32. Crosthwaite SK, Loros JJ, Dunlap JC. Light-induced resetting of a circadian clock is mediated by a rapid increase in frequency transcript. *Cell.* 1995;81(7):1003-12. Epub 1995/06/30. doi: 10.1016/s0092-8674(05)80005-4. PubMed PMID: 7600569.
33. Talora C, Franchi L, Linden H, Ballario P, Macino G. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J.* 1999;18(18):4961-8. Epub 1999/09/16. doi: 10.1093/emboj/18.18.4961. PubMed PMID: 10487748; PubMed Central PMCID: PMCPMC1171567.
34. Lee K, Loros JJ, Dunlap JC. Interconnected feedback loops in the *Neurospora* circadian system. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5476):107-10. Epub 2000/07/07. doi: 10.1126/science.289.5476.107. PubMed PMID: 10884222.
35. Heintzen C, Loros JJ, Dunlap JC. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop that represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. *Cell.* 2001;104(3):453-64. Epub 2001/03/10. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00232-x. PubMed PMID: 11239402.
36. Chen CH, DeMay BS, Gladfelter AS, Dunlap JC, Loros JJ. Physical interaction between VIVID and white collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(38):16715-20. Epub 2010/08/25. doi: 10.1073/pnas.1011190107. PubMed PMID: 20733070; PubMed Central PMCID: PMCPMC2944764.
37. Liu Y, Merrow M, Loros JJ, Dunlap JC. How temperature changes reset a circadian oscillator. *Science (New York, NY)*. 1998;281(5378):825-9. Epub 1998/08/07. doi: 10.1126/science.281.5378.825. PubMed PMID: 9694654.
38. Hunt SM, Elvin M, Crosthwaite SK, Heintzen C. The PAS/LOV protein VIVID controls temperature compensation of circadian clock phase and development in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 2007;21(15):1964-74. Epub 2007/08/03. doi: 10.1101/gad.437107. PubMed PMID: 17671094; PubMed Central PMCID: PMCPMC1935033.
39. Diernfellner A, Colot HV, Dintzis O, Loros JJ, Dunlap JC, Brunner M. Long and short isoforms of *Neurospora* clock protein FRQ support temperature-compensated circadian rhythms. *FEBS Lett.* 2007;581(30):5759-64. Epub 2007/11/27. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.043. PubMed PMID: 18037381; PubMed Central PMCID: PMCPMC2704016.
40. Smith KM, Sancar G, Dekhang R, Sullivan CM, Li S, Tag AG, et al. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genome-wide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. *Eukaryot Cell.* 2010;9(10):1549-56. Epub 2010/08/03. doi: 10.1128/EC.00154-10. PubMed PMID: 20675579; PubMed Central PMCID: PMCPMC2950426.
41. Iwasaki H, Dunlap JC. Microbial circadian oscillatory systems in *Neurospora* and *Synechococcus*: models for cellular clocks. *Current opinion in microbiology.* 2000;3(2):189-96. Epub 2000/04/04. doi: 10.1016/s1369-5274(00)00074-6. PubMed PMID: 10744993.

42. Brody S, Oelhafen K, Schneider K, Perrino S, Goetz A, Wang C, et al. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Downstream effectors. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2010;47(2):159-68. Epub 2009/10/06. doi: 10.1016/j.fgb.2009.09.006. PubMed PMID: 19800017.
43. Granshaw T, Tsukamoto M, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: farnesol or geraniol allow expression of rhythmicity in the otherwise arrhythmic strains *frq10*, *wc-1*, and *wc-2*. *Journal of biological rhythms*. 2003;18(4):287-96. Epub 2003/08/23. doi: 10.1177/0748730403255934. PubMed PMID: 12932081.
44. Lakin-Thomas PL, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: lipid deficiencies restore robust rhythmicity to null frequency and white-collar mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):256-61. Epub 2000/01/05. doi: 10.1073/pnas.97.1.256. PubMed PMID: 10618405; PubMed Central PMCID: PMCPMC26650.
45. Lombardi L, Schneider K, Tsukamoto M, Brody S. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: clock mutant effects in the absence of a *frq*-based oscillator. *Genetics*. 2007;175(3):1175-83. Epub 2007/01/24. doi: 10.1534/genetics.106.068270. PubMed PMID: 17237512; PubMed Central PMCID: PMCPMC1840085.
46. Schneider K, Perrino S, Oelhafen K, Li S, Zatzepin A, Lakin-Thomas P, et al. Rhythmic conidiation in constant light in vivid mutants of *Neurospora crassa*. *Genetics*. 2009;181(3):917-31. Epub 2009/01/14. doi: 10.1534/genetics.108.097808. PubMed PMID: 19139144; PubMed Central PMCID: PMCPMC2651064.
47. Yoshida Y, Maeda T, Lee B, Hasunuma K. Conidiation rhythm and light entrainment in superoxide dismutase mutant in *Neurospora crassa*. *Mol Genet Genomics*. 2008;279(2):193-202. Epub 2007/12/18. doi: 10.1007/s00438-007-0308-z. PubMed PMID: 18084778.
48. Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:647-76. Epub 2001/02/22. doi: 10.1146/annurev.physiol.63.1.647. PubMed PMID: 11181971.
49. Schibler U. The daily timing of gene expression and physiology in mammals. *Dialogues Clin Neurosci*. 2007;9(3):257-72. Epub 2007/11/01. PubMed PMID: 17969863; PubMed Central PMCID: PMCPMC3202490.
50. Debruyne JP, Noton E, Lambert CM, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM. A clock shock: mouse *CLOCK* is not required for circadian oscillator function. *Neuron*. 2006;50(3):465-77. Epub 2006/05/06. doi: 10.1016/j.neuron.2006.03.041. PubMed PMID: 16675400.
51. DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM. *CLOCK* and *NPAS2* have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat Neurosci*. 2007;10(5):543-5. Epub 2007/04/10. doi: 10.1038/nn1884. PubMed PMID: 17417633; PubMed Central PMCID: PMCPMC2782643.
52. Landgraf D, Wang LL, Diemer T, Welsh DK. *NPAS2* Compensates for Loss of *CLOCK* in Peripheral Circadian Oscillators. *PLoS Genet*. 2016;12(2):e1005882. Epub 2016/02/20. doi: 10.1371/journal.pgen.1005882. PubMed PMID: 26895328; PubMed Central PMCID: PMCPMC4760943.
53. Preitner N, Damiola F, Lopez-Molina L, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, et al. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*. 2002;110(2):251-60. Epub 2002/08/02. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00825-5. PubMed PMID: 12150932.
54. Akashi M, Takumi T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock *Bmal1*. *Nat Struct Mol Biol*. 2005;12(5):441-8. Epub 2005/04/12. doi: 10.1038/nsmb925. PubMed PMID: 15821743.
55. Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N. Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of biological rhythms*. 2005;20(5):391-403. Epub 2005/11/04. doi: 10.1177/0748730405277232. PubMed PMID: 16267379.

56. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*. 2004;43(4):527-37. Epub 2004/08/18. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.018. PubMed PMID: 15312651.
57. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature*. 2002;418(6897):534-9. Epub 2002/08/02. doi: 10.1038/nature00906. PubMed PMID: 12152080.
58. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*. 2002;109(3):307-20. Epub 2002/05/23. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00722-5. PubMed PMID: 12015981.
59. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*. 2002;417(6884):78-83. Epub 2002/04/23. doi: 10.1038/nature744. PubMed PMID: 11967526.
60. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the circadian oscillatory mechanism. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4773-81. Epub 2000/06/10. doi: 10.1128/mcb.20.13.4773-4781.2000. PubMed PMID: 10848603; PubMed Central PMCID: PMCPMC85912.
61. Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, et al. Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Lett*. 2011;585(14):2217-22. Epub 2011/06/04. doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.038. PubMed PMID: 21635892.
62. Hamaguchi H, Fujimoto K, Kawamoto T, Noshiro M, Maemura K, Takeda N, et al. Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system. *Biochem J*. 2004;382(Pt 1):43-50. Epub 2004/05/19. doi: 10.1042/BJ20031760. PubMed PMID: 15147242; PubMed Central PMCID: PMCPMC1133913.
63. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*. 2002;419(6909):841-4. Epub 2002/10/25. doi: 10.1038/nature01123. PubMed PMID: 12397359.
64. Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, et al. A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313(1):117-24. Epub 2003/12/16. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.11.099. PubMed PMID: 14672706.
65. Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:407-41. Epub 2004/10/16. doi: 10.1146/annurev.genom.5.061903.175925. PubMed PMID: 15485355; PubMed Central PMCID: PMCPMC3770722.
66. Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Honda KK, Honma S, et al. Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation. Interaction with BMAL1. *Eur J Biochem*. 2004;271(22):4409-19. Epub 2004/11/25. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04379.x. PubMed PMID: 15560782.
67. Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes Dev*. 2001;15(8):995-1006. Epub 2001/04/24. doi: 10.1101/gad.873501. PubMed PMID: 11316793; PubMed Central PMCID: PMCPMC312673.
68. Sahar S, Zocchi L, Kinoshita C, Borrelli E, Sassone-Corsi P. Regulation of BMAL1 protein stability and circadian function by GSK3beta-mediated phosphorylation. *PLoS One*. 2010;5(1):e8561. Epub 2010/01/06. doi: 10.1371/journal.pone.0008561. PubMed PMID: 20049328; PubMed Central PMCID: PMCPMC2797305.
69. Partch CL, Shields KF, Thompson CL, Selby CP, Sancar A. Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10467-72. Epub 2006/06/23. doi: 10.1073/pnas.0604138103. PubMed PMID: 16790549; PubMed Central PMCID: PMCPMC1502481.

70. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan PM, Godinho SI, et al. SCFFbxl3 controls the oscillation of the circadian clock by directing the degradation of cryptochrome proteins. *Science* (New York, NY). 2007;316(5826):900-4. Epub 2007/04/28. doi: 10.1126/science.1141194. PubMed PMID: 17463251.
71. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(2):139-48. Epub 2007/01/25. doi: 10.1038/nrm2106. PubMed PMID: 17245414.
72. Meng QJ, Logunova L, Maywood ES, Gallego M, Lebiecki J, Brown TM, et al. Setting clock speed in mammals: the CK1 epsilon tau mutation in mice accelerates circadian pacemakers by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*. 2008;58(1):78-88. Epub 2008/04/11. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.019. PubMed PMID: 18400165; PubMed Central PMCID: PMCPMC3756141.
73. Siepka SM, Yoo SH, Park J, Song W, Kumar V, Hu Y, et al. Circadian mutant Overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell*. 2007;129(5):1011-23. Epub 2007/04/28. doi: 10.1016/j.cell.2007.04.030. PubMed PMID: 17462724; PubMed Central PMCID: PMCPMC3762874.
74. Hirano A, Fu YH, Ptacek LJ. The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23(12):1053-60. Epub 2016/12/07. doi: 10.1038/nsmb.3326. PubMed PMID: 27922612.
75. Yoo SH, Mohawk JA, Siepka SM, Shan Y, Huh SK, Hong HK, et al. Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell*. 2013;152(5):1091-105. Epub 2013/03/05. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.055. PubMed PMID: 23452855; PubMed Central PMCID: PMCPMC3694781.
76. Cardone L, Hirayama J, Giordano F, Tamaru T, Palvimo JJ, Sassone-Corsi P. Circadian clock control by SUMOylation of BMAL1. *Science* (New York, NY). 2005;309(5739):1390-4. Epub 2005/08/20. doi: 10.1126/science.1110689. PubMed PMID: 16109848.
77. Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, Kreppel F, et al. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell*. 2008;134(2):317-28. Epub 2008/07/30. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.050. PubMed PMID: 18662546.
78. Hirayama J, Sahar S, Grimaldi B, Tamaru T, Takamatsu K, Nakahata Y, et al. CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*. 2007;450(7172):1086-90. Epub 2007/12/14. doi: 10.1038/nature06394. PubMed PMID: 18075593.
79. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell*. 2008;134(2):329-40. Epub 2008/07/30. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.002. PubMed PMID: 18662547; PubMed Central PMCID: PMCPMC3526943.
80. Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*. 2002;22(6):1693-703. Epub 2002/02/28. doi: 10.1128/mcb.22.6.1693-1703.2002. PubMed PMID: 11865049; PubMed Central PMCID: PMCPMC135601.
81. Lee C, Etchegaray JP, Cagampang FR, Loudon AS, Reppert SM. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*. 2001;107(7):855-67. Epub 2002/01/10. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00610-9. PubMed PMID: 11779462.
82. Tsuchiya Y, Akashi M, Matsuda M, Goto K, Miyata Y, Node K, et al. Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Sci Signal*. 2009;2(73):ra26. Epub 2009/06/06. doi: 10.1126/scisignal.2000305. PubMed PMID: 19491384.
83. Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao ZH, Virshup DM. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4888-99. Epub 2000/06/10. doi: 10.1128/mcb.20.13.4888-4899.2000. PubMed PMID: 10848614; PubMed Central PMCID: PMCPMC85940.

84. Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, et al. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* (New York, NY). 2001;291(5506):1040-3. Epub 2001/03/10. doi: 10.1126/science.1057499. PubMed PMID: 11232563.
85. Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, et al. Functional consequences of a CKIdelta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*. 2005;434(7033):640-4. Epub 2005/04/01. doi: 10.1038/nature03453. PubMed PMID: 15800623.
86. Shanware NP, Hutchinson JA, Kim SH, Zhan L, Bowler MJ, Tibbetts RS. Casein kinase 1-dependent phosphorylation of familial advanced sleep phase syndrome-associated residues controls PERIOD 2 stability. *J Biol Chem*. 2011;286(14):12766-74. Epub 2011/02/18. doi: 10.1074/jbc.M111.224014. PubMed PMID: 21324900; PubMed Central PMCID: PMC3069476.
87. Jakubcakova V, Oster H, Tamanini F, Cadenas C, Leitges M, van der Horst GT, et al. Light entrainment of the mammalian circadian clock by a PRKCA-dependent posttranslational mechanism. *Neuron*. 2007;54(5):831-43. Epub 2007/06/08. doi: 10.1016/j.neuron.2007.04.031. PubMed PMID: 17553429.
88. Mehta N, Cheng AH, Chiang CK, Mendoza-Viveros L, Ling HH, Patel A, et al. GRK2 Fine-Tunes Circadian Clock Speed and Entrainment via Transcriptional and Post-translational Control of PERIOD Proteins. *Cell reports*. 2015;12(8):1272-88. Epub 2015/08/19. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.037. PubMed PMID: 26279567.
89. Kaasik K, Kivimae S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, et al. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab*. 2013;17(2):291-302. Epub 2013/02/12. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.017. PubMed PMID: 23395175; PubMed Central PMCID: PMC3597447.
90. Harada Y, Sakai M, Kurabayashi N, Hirota T, Fukada Y. Ser-557-phosphorylated mCRY2 is degraded upon synergistic phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 beta. *J Biol Chem*. 2005;280(36):31714-21. Epub 2005/06/28. doi: 10.1074/jbc.M506225200. PubMed PMID: 15980066.
91. Kurabayashi N, Hirota T, Sakai M, Sanada K, Fukada Y. DYRK1A and glycogen synthase kinase 3beta, a dual-kinase mechanism directing proteasomal degradation of CRY2 for circadian timekeeping. *Mol Cell Biol*. 2010;30(7):1757-68. Epub 2010/02/04. doi: 10.1128/MCB.01047-09. PubMed PMID: 20123978; PubMed Central PMCID: PMC2838083.
92. Lamia KA, Sachdeva UM, DiTacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, et al. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* (New York, NY). 2009;326(5951):437-40. Epub 2009/10/17. doi: 10.1126/science.1172156. PubMed PMID: 19833968; PubMed Central PMCID: PMC2819106.
93. Papp SJ, Huber AL, Jordan SD, Kriebs A, Nguyen M, Moresco JJ, et al. DNA damage shifts circadian clock time via Hausp-dependent Cry1 stabilization. *Elife*. 2015;4. Epub 2015/03/11. doi: 10.7554/eLife.04883. PubMed PMID: 25756610; PubMed Central PMCID: PMC4352707.
94. Tamaru T, Hattori M, Honda K, Nakahata Y, Sassone-Corsi P, van der Horst GT, et al. CRY Drives Cyclic CK2-Mediated BMAL1 Phosphorylation to Control the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol*. 2015;13(11):e1002293. Epub 2015/11/13. doi: 10.1371/journal.pbio.1002293. PubMed PMID: 26562092; PubMed Central PMCID: PMC4642984.
95. Robles MS, Boyault C, Knutti D, Padmanabhan K, Weitz CJ. Identification of RACK1 and protein kinase Calpha as integral components of the mammalian circadian clock. *Science* (New York, NY). 2010;327(5964):463-6. Epub 2010/01/23. doi: 10.1126/science.1180067. PubMed PMID: 20093473.
96. Edgar RS, Green EW, Zhao Y, van Ooijen G, Olmedo M, Qin X, et al. Peroxiredoxins are conserved markers of circadian rhythms. *Nature*. 2012;485(7399):459-64. Epub 2012/05/25. doi: 10.1038/nature11088. PubMed PMID: 22622569; PubMed Central PMCID: PMC3398137.

97. Eastman CI, Mistlberger RE, Rechtschaffen A. Suprachiasmatic nuclei lesions eliminate circadian temperature and sleep rhythms in the rat. *Physiol Behav.* 1984;32(3):357-68. Epub 1984/03/01. doi: 10.1016/0031-9384(84)90248-8. PubMed PMID: 6463124.
98. Kawamura H, Ibuka N. The search for circadian rhythm pacemakers in the light of lesion experiments. *Chronobiologia.* 1978;5(1):69-88. Epub 1978/01/01. PubMed PMID: 357115.
99. Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972;42(1):201-6. Epub 1972/07/13. doi: 10.1016/0006-8993(72)90054-6. PubMed PMID: 5047187.
100. Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M. Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science (New York, NY).* 1990;247(4945):975-8. Epub 1990/02/23. doi: 10.1126/science.2305266. PubMed PMID: 2305266.
101. Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972;69(6):1583-6. Epub 1972/06/01. doi: 10.1073/pnas.69.6.1583. PubMed PMID: 4556464; PubMed Central PMCID: PMCPMC426753.
102. Maywood ES, Reddy AB, Wong GK, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, et al. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol.* 2006;16(6):599-605. Epub 2006/03/21. doi: 10.1016/j.cub.2006.02.023. PubMed PMID: 16546085.
103. Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, Sheward WJ, et al. The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell.* 2002;109(4):497-508. Epub 2002/06/28. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00736-5. PubMed PMID: 12086606.
104. Moore RY, Speh JC, Card JP. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol.* 1995;352(3):351-66. Epub 1995/02/13. doi: 10.1002/cne.903520304. PubMed PMID: 7706557.
105. Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J, Gillette MU. Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(23):13468-73. Epub 1999/11/11. doi: 10.1073/pnas.96.23.13468. PubMed PMID: 10557344; PubMed Central PMCID: PMCPMC23971.
106. Hamada T, Yamanouchi S, Watanabe A, Shibata S, Watanabe S. Involvement of glutamate release in substance P-induced phase delays of suprachiasmatic neuron activity rhythm in vitro. *Brain Res.* 1999;836(1-2):190-3. Epub 1999/07/23. doi: 10.1016/s0006-8993(99)01565-6. PubMed PMID: 10415417.
107. Tischkau SA, Mitchell JW, Tyan SH, Buchanan GF, Gillette MU. Ca²⁺/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem.* 2003;278(2):718-23. Epub 2002/11/01. doi: 10.1074/jbc.M209241200. PubMed PMID: 12409294.
108. O'Neill JS, Reddy AB. The essential role of cAMP/Ca²⁺ signalling in mammalian circadian timekeeping. *Biochem Soc Trans.* 2012;40(1):44-50. Epub 2012/01/21. doi: 10.1042/BST20110691. PubMed PMID: 22260664; PubMed Central PMCID: PMCPMC3399769.
109. Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science (New York, NY).* 2010;330(6002):379-85. Epub 2010/10/16. doi: 10.1126/science.1195262. PubMed PMID: 20947768; PubMed Central PMCID: PMCPMC3625727.
110. Schibler U, Gotic I, Saini C, Gos P, Curie T, Emmenegger Y, et al. Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2015;80:223-32. Epub 2015/12/20. doi: 10.1101/sqb.2015.80.027490. PubMed PMID: 26683231.

111. Druzd D, de Juan A, Scheiermann C. Circadian rhythms in leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol.* 2014;36(2):149-62. Epub 2014/01/18. doi: 10.1007/s00281-013-0414-4. PubMed PMID: 24435096.
112. Scheiermann C, Kunisaki Y, Lucas D, Chow A, Jang JE, Zhang D, et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity.* 2012;37(2):290-301. Epub 2012/08/07. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.021. PubMed PMID: 22863835; PubMed Central PMCID: PMC3428436.
113. Hirai T. Regulation of Clock Genes by Adrenergic Receptor Signaling in Osteoblasts. *Neurochem Res.* 2018;43(1):129-35. Epub 2017/07/29. doi: 10.1007/s11064-017-2365-y. PubMed PMID: 28752422.
114. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol.* 2007;195(2):187-98. Epub 2007/10/24. doi: 10.1677/JOE-07-0378. PubMed PMID: 17951531.
115. Krieger DT. Rhythms of ACTH and corticosteroid secretion in health and disease, and their experimental modification. *J Steroid Biochem.* 1975;6(5):785-91. Epub 1975/05/01. doi: 10.1016/0022-4731(75)90068-0. PubMed PMID: 171514.
116. Boden G, Ruiz J, Urbain JL, Chen X. Evidence for a circadian rhythm of insulin secretion. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):E246-52. Epub 1996/08/01. doi: 10.1152/ajpendo.1996.271.2.E246. PubMed PMID: 8770017.
117. Klerman EB. Clinical aspects of human circadian rhythms. *Journal of biological rhythms.* 2005;20(4):375-86. Epub 2005/08/04. doi: 10.1177/0748730405278353. PubMed PMID: 16077156.
118. Haus E. Chronobiology in the endocrine system. *Advanced drug delivery reviews.* 2007;59(9-10):985-1014. Epub 2007/09/07. doi: 10.1016/j.addr.2007.01.001. PubMed PMID: 17804113.
119. Papavasiliou SS, Brue T, Jaquet P, Castanas E. Pattern of prolactin diurnal secretion in normal humans: evidence for nonlinear dynamics. *Neuroendocrinology.* 1995;62(5):444-53. Epub 1995/11/01. doi: 10.1159/000127034. PubMed PMID: 8559276.
120. Plymate SR, Tenover JS, Bremner WJ. Circadian variation in testosterone, sex hormone-binding globulin, and calculated non-sex hormone-binding globulin bound testosterone in healthy young and elderly men. *J Androl.* 1989;10(5):366-71. Epub 1989/09/01. doi: 10.1002/j.1939-4640.1989.tb00120.x. PubMed PMID: 2592266.
121. Degaute JP, van de Borne P, Linkowski P, Van Cauter E. Quantitative analysis of the 24-hour blood pressure and heart rate patterns in young men. *Hypertension.* 1991;18(2):199-210. Epub 1991/08/01. doi: 10.1161/01.hyp.18.2.199. PubMed PMID: 1885228.
122. Johnson MP, Duffy JF, Dijk DJ, Ronda JM, Dyal CM, Czeisler CA. Short-term memory, alertness and performance: a reappraisal of their relationship to body temperature. *J Sleep Res.* 1992;1(1):24-9. Epub 1992/03/01. doi: 10.1111/j.1365-2869.1992.tb00004.x. PubMed PMID: 10607021.
123. Haus E, Smolensky MH. Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int.* 1999;16(5):581-622. Epub 1999/10/08. doi: 10.3109/07420529908998730. PubMed PMID: 10513884.
124. Sennels HP, Jorgensen HL, Hansen AL, Goetze JP, Fahrenkrug J. Diurnal variation of hematology parameters in healthy young males: the Bispebjerg study of diurnal variations. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* 2011;71(7):532-41. Epub 2011/10/13. doi: 10.3109/00365513.2011.602422. PubMed PMID: 21988588.
125. Dimitrov S, Benedict C, Heutling D, Westermann J, Born J, Lange T. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood.* 2009;113(21):5134-43. Epub 2009/03/19. doi: 10.1182/blood-2008-11-190769. PubMed PMID: 19293427; PubMed Central PMCID: PMC3428436.

126. Cao GY, Li Y, Jin PF, Hu X. Circadian rhythm in serum iron levels. *Biol Trace Elem Res*. 2012;147(1-3):63-6. Epub 2011/12/27. doi: 10.1007/s12011-011-9304-6. PubMed PMID: 22198869.
127. Roenneberg T, Wirz-Justice A, Mellow M. Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes. *Journal of biological rhythms*. 2003;18(1):80-90. Epub 2003/02/06. doi: 10.1177/0748730402239679. PubMed PMID: 12568247.
128. Hsu PK, Ptacek LJ, Fu YH. Genetics of human sleep behavioral phenotypes. *Methods in enzymology*. 2015;552:309-24. Epub 2015/02/25. doi: 10.1016/bs.mie.2014.10.046. PubMed PMID: 25707283.
129. Roenneberg T, Kuehnle T, Pramstaller PP, Ricken J, Havel M, Guth A, et al. A marker for the end of adolescence. *Curr Biol*. 2004;14(24):R1038-9. Epub 2004/12/29. doi: 10.1016/j.cub.2004.11.039. PubMed PMID: 15620633.
130. Roenneberg T, Kantermann T, Juda M, Vetter C, Allebrandt KV. Light and the human circadian clock. *Handbook of experimental pharmacology*. 2013(217):311-31. Epub 2013/04/23. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_13. PubMed PMID: 23604485.
131. Roenneberg T, Kumar CJ, Mellow M. The human circadian clock entrains to sun time. *Curr Biol*. 2007;17(2):R44-5. Epub 2007/01/24. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.011. PubMed PMID: 17240323.
132. Atkinson G, Batterham AM, Dowdall N, Thompson A, van Drongelen A. From animal cage to aircraft cabin: an overview of evidence translation in jet lag research. *Eur J Appl Physiol*. 2014;114(12):2459-68. Epub 2014/10/25. doi: 10.1007/s00421-014-3026-3. PubMed PMID: 25342081.
133. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. 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*. 2001;58(11):747-52. Epub 2001/10/16. doi: 10.1136/oem.58.11.747. PubMed PMID: 11600731; PubMed Central PMCID: PMCPMC1740071.
134. Rajaratnam SM, Arendt J. Health in a 24-h society. *Lancet*. 2001;358(9286):999-1005. Epub 2001/10/05. doi: 10.1016/S0140-6736(01)06108-6. PubMed PMID: 11583769.
135. Willyard C. Hungry for sleep. *Nat Med*. 2008;14(5):477-80. Epub 2008/05/09. doi: 10.1038/nm0508-477. PubMed PMID: 18463650.
136. Tenkanen L, Sjoblom T, Harma M. Joint effect of shift work and adverse life-style factors on the risk of coronary heart disease. *Scand J Work Environ Health*. 1998;24(5):351-7. Epub 1998/12/30. doi: 10.5271/sjweh.355. PubMed PMID: 9869306.
137. Feillet C, van der Horst GT, Levi F, Rand DA, Delaunay F. Coupling between the Circadian Clock and Cell Cycle Oscillators: Implication for Healthy Cells and Malignant Growth. *Front Neurol*. 2015;6:96. Epub 2015/06/02. doi: 10.3389/fneur.2015.00096. PubMed PMID: 26029155; PubMed Central PMCID: PMCPMC4426821.
138. Wittmann M, Dinich J, Mellow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int*. 2006;23(1-2):497-509. Epub 2006/05/12. doi: 10.1080/07420520500545979. PubMed PMID: 16687322.
139. Levandovski R, Dantas G, Fernandes LC, Caumo W, Torres I, Roenneberg T, et al. Depression scores associate with chronotype and social jetlag in a rural population. *Chronobiol Int*. 2011;28(9):771-8. Epub 2011/09/08. doi: 10.3109/07420528.2011.602445. PubMed PMID: 21895489.
140. Roenneberg T, Allebrandt KV, Mellow M, Vetter C. Social jetlag and obesity. *Curr Biol*. 2012;22(10):939-43. Epub 2012/05/15. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.038. PubMed PMID: 22578422.
141. Koopman ADM, Rauh SP, van 't Riet E, Groeneveld L, van der Heijden AA, Elders PJ, et al. The Association between Social Jetlag, the Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes Mellitus in the General Population: The New Hoorn Study. *Journal of biological rhythms*. 2017;32(4):359-68.

- Epub 2017/06/21. doi: 10.1177/0748730417713572. PubMed PMID: 28631524; PubMed Central PMCID: PMC5564947.
142. Parsons MJ, Moffitt TE, Gregory AM, Goldman-Mellor S, Nolan PM, Poulton R, et al. Social jetlag, obesity and metabolic disorder: investigation in a cohort study. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(5):842-8. Epub 2015/01/21. doi: 10.1038/ijo.2014.201. PubMed PMID: 25601363; PubMed Central PMCID: PMC4422765.
143. Wong PM, Hasler BP, Kamarck TW, Muldoon MF, Manuck SB. Social Jetlag, Chronotype, and Cardiometabolic Risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(12):4612-20. Epub 2015/11/19. doi: 10.1210/jc.2015-2923. PubMed PMID: 26580236; PubMed Central PMCID: PMC4667156.
144. Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE, Muller JE, Mittleman MA. Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol*. 1997;79(11):1512-6. Epub 1997/06/01. doi: 10.1016/s0002-9149(97)00181-1. PubMed PMID: 9185643.
145. Purcell H, Mulcahy D, Fox K. Circadian patterns of myocardial ischaemia and the effects of antianginal drugs. *Chronobiol Int*. 1991;8(5):309-20. Epub 1991/01/01. doi: 10.3109/07420529109059167. PubMed PMID: 1818781.
146. Mulcahy D, Purcell H, Fox K. Should we get up in the morning? Observations on circadian variations in cardiac events. *Br Heart J*. 1991;65(6):299-301. Epub 1991/06/01. doi: 10.1136/hrt.65.6.299. PubMed PMID: 1675866; PubMed Central PMCID: PMC41024669.
147. Gagnon B, Lawlor PG, Mancini IL, Pereira JL, Hanson J, Bruera ED. The impact of delirium on the circadian distribution of breakthrough analgesia in advanced cancer patients. *J Pain Symptom Manage*. 2001;22(4):826-33. Epub 2001/09/29. doi: 10.1016/s0885-3924(01)00339-6. PubMed PMID: 11576799.
148. Pollmann L, Harris PH. Rhythmic changes in pain sensitivity in teeth. *Int J Chronobiol*. 1978;5(3):459-64. Epub 1978/01/01. PubMed PMID: 567624.
149. Sutherland ER. Nocturnal asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2005;116(6):1179-86; quiz 87. Epub 2005/12/13. doi: 10.1016/j.jaci.2005.09.028. PubMed PMID: 16337443.
150. Straub RH, Cutolo M. Circadian rhythms in rheumatoid arthritis: implications for pathophysiology and therapeutic management. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(2):399-408. Epub 2007/02/01. doi: 10.1002/art.22368. PubMed PMID: 17265475.
151. Halberg F, Johnson EA, Brown BW, Bittner JJ. Susceptibility rhythm to *E. coli* endotoxin and bioassay. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960;103:142-4. Epub 1960/01/01. doi: 10.3181/00379727-103-25439. PubMed PMID: 14398944.
152. Edgar RS, Stangherlin A, Nagy AD, Nicoll MP, Efsthathiou S, O'Neill JS, et al. Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(36):10085-90. Epub 2016/08/17. doi: 10.1073/pnas.1601895113. PubMed PMID: 27528682; PubMed Central PMCID: PMC5018795.
153. Casanova-Acebes M, Pitaval C, Weiss LA, Nombela-Arrieta C, Chevre R, N AG, et al. Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell*. 2013;153(5):1025-35. Epub 2013/05/28. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040. PubMed PMID: 23706740; PubMed Central PMCID: PMC4128329.
154. Hand LE, Hopwood TW, Dickson SH, Walker AL, Loudon AS, Ray DW, et al. The circadian clock regulates inflammatory arthritis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(11):3759-70. Epub 2016/11/03. doi: 10.1096/fj.201600353R. PubMed PMID: 27488122; PubMed Central PMCID: PMC5067252.
155. He W, Holtkamp S, Hergenhan SM, Kraus K, de Juan A, Weber J, et al. Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity*. 2018;49(6):1175-90.e7. Epub 2018/12/12. doi:

- 10.1016/j.immuni.2018.10.007. PubMed PMID: 30527911; PubMed Central PMCID: PMCPMC6303219.
156. Petrovsky N, Harrison LC. The chronobiology of human cytokine production. *International reviews of immunology*. 1998;16(5-6):635-49. Epub 1998/07/01. doi: 10.3109/08830189809043012. PubMed PMID: 9646180.
157. Arvidson NG, Gudbjornsson B, Elfman L, Ryden AC, Totterman TH, Hallgren R. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1994;53(8):521-4. Epub 1994/08/01. doi: 10.1136/ard.53.8.521. PubMed PMID: 7944637; PubMed Central PMCID: PMCPMC1005392.
158. Perry MG, Kirwan JR, Jessop DS, Hunt LP. Overnight variations in cortisol, interleukin 6, tumour necrosis factor alpha and other cytokines in people with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(1):63-8. Epub 2008/04/01. doi: 10.1136/ard.2007.086561. PubMed PMID: 18375536; PubMed Central PMCID: PMCPMC2596304.
159. Hashiramoto A, Yamane T, Tsumiyama K, Yoshida K, Komai K, Yamada H, et al. Mammalian clock gene Cryptochrome regulates arthritis via proinflammatory cytokine TNF-alpha. *J Immunol*. 2010;184(3):1560-5. Epub 2010/01/01. doi: 10.4049/jimmunol.0903284. PubMed PMID: 20042581.
160. Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(31):12662-7. Epub 2012/07/11. doi: 10.1073/pnas.1209965109. PubMed PMID: 22778400; PubMed Central PMCID: PMCPMC3411996.
161. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science (New York, NY)*. 2013;341(6153):1483-8. Epub 2013/08/24. doi: 10.1126/science.1240636. PubMed PMID: 23970558; PubMed Central PMCID: PMCPMC3836670.
162. Spengler ML, Kuropatwinski KK, Comas M, Gasparian AV, Fedtsova N, Gleiberman AS, et al. Core circadian protein CLOCK is a positive regulator of NF-kappaB-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):E2457-65. Epub 2012/08/17. doi: 10.1073/pnas.1206274109. PubMed PMID: 22895791; PubMed Central PMCID: PMCPMC3443185.
163. Carter SJ, Durrington HJ, Gibbs JE, Blaikley J, Loudon AS, Ray DW, et al. A matter of time: study of circadian clocks and their role in inflammation. *J Leukoc Biol*. 2016;99(4):549-60. Epub 2016/02/10. doi: 10.1189/jlb.3RU1015-451R. PubMed PMID: 26856993.
164. Lam MT, Cho H, Lesch HP, Gosselin D, Heinz S, Tanaka-Oishi Y, et al. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature*. 2013;498(7455):511-5. Epub 2013/06/04. doi: 10.1038/nature12209. PubMed PMID: 23728303; PubMed Central PMCID: PMCPMC3839578.
165. Sato S, Sakurai T, Ogasawara J, Takahashi M, Izawa T, Imaizumi K, et al. A circadian clock gene, Rev-erbalpha, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *J Immunol*. 2014;192(1):407-17. Epub 2013/12/07. doi: 10.4049/jimmunol.1301982. PubMed PMID: 24307731.
166. Hrushesky WJ. Tumor chronobiology. *J Control Release*. 2001;74(1-3):27-30. Epub 2001/08/08. doi: 10.1016/s0168-3659(01)00307-8. PubMed PMID: 11489480.
167. Ella K, Mocsai A, Kaldi K. Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factors? *Eur J Clin Invest*. 2018;48 Suppl 2:e12965. Epub 2018/06/08. doi: 10.1111/eci.12965. PubMed PMID: 29877596.
168. Ballesta A, Innominato PF, Dallmann R, Rand DA, Levi FA. Systems Chronotherapeutics. *Pharmacol Rev*. 2017;69(2):161-99. Epub 2017/03/30. doi: 10.1124/pr.116.013441. PubMed PMID: 28351863; PubMed Central PMCID: PMCPMC5394920.
169. Vogel H. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbial Genetics Bulletin*. 1956;13:42-3.

170. Luo C, Loros JJ, Dunlap JC. Nuclear localization is required for function of the essential clock protein FRQ. *EMBO J.* 1998;17(5):1228-35. Epub 1998/04/18. doi: 10.1093/emboj/17.5.1228. PubMed PMID: 9482720; PubMed Central PMCID: PMCPMC1170471.
171. Schwartz J, Leidal KG, Femling JK, Weiss JP, Nauseef WM. Neutrophil bleaching of GFP-expressing staphylococci: probing the intraphagosomal fate of individual bacteria. *J Immunol.* 2009;183(4):2632-41. Epub 2009/07/22. doi: 10.4049/jimmunol.0804110. PubMed PMID: 19620311; PubMed Central PMCID: PMCPMC2881311.
172. Malik M. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation.* 1996;93(5):1043-65. Epub 1996/03/01. PubMed PMID: 8598068.
173. Laborde S, Mosley E, Thayer JF. Heart Rate Variability and Cardiac Vagal Tone in Psychophysiological Research - Recommendations for Experiment Planning, Data Analysis, and Data Reporting. *Front Psychol.* 2017;8:213. Epub 2017/03/08. doi: 10.3389/fpsyg.2017.00213. PubMed PMID: 28265249; PubMed Central PMCID: PMCPMC5316555.
174. Kaufmann T, Sutterlin S, Schulz SM, Voge C. ARTiiFACT: a tool for heart rate artifact processing and heart rate variability analysis. *Behav Res Methods.* 2011;43(4):1161-70. Epub 2011/05/17. doi: 10.3758/s13428-011-0107-7. PubMed PMID: 21573720.
175. Schwerdtfeger C, Linden H. Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *Eur J Biochem.* 2000;267(2):414-22. Epub 2000/01/13. doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01016.x. PubMed PMID: 10632711.
176. Cheng P, He Q, He Q, Wang L, Liu Y. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev.* 2005;19(2):234-41. Epub 2004/12/31. doi: 10.1101/gad.1266805. PubMed PMID: 15625191; PubMed Central PMCID: PMCPMC545885.
177. Aronson BD, Johnson KA, Dunlap JC. Circadian clock locus frequency: protein encoded by a single open reading frame defines period length and temperature compensation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(16):7683-7. Epub 1994/08/02. doi: 10.1073/pnas.91.16.7683. PubMed PMID: 8052643; PubMed Central PMCID: PMCPMC44466.
178. Cheng P, Yang Y, Liu Y. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13):7408-13. Epub 2001/06/21. doi: 10.1073/pnas.121170298. PubMed PMID: 11416214; PubMed Central PMCID: PMCPMC34682.
179. Ballario P, Vittorioso P, Magrelli A, Talora C, Cabibbo A, Macino G. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J.* 1996;15(7):1650-7. Epub 1996/04/01. PubMed PMID: 8612589; PubMed Central PMCID: PMCPMC450076.
180. Carattoli A, Cogoni C, Morelli G, Macino G. Molecular characterization of upstream regulatory sequences controlling the photoinduced expression of the albino-3 gene of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 1994;13(5):787-95. Epub 1994/09/01. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00471.x. PubMed PMID: 7815938.
181. Kodadek T, Sikder D, Nalley K. Keeping transcriptional activators under control. *Cell.* 2006;127(2):261-4. Epub 2006/10/24. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.002. PubMed PMID: 17055428.
182. Punga T, Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. Phosphorylation and ubiquitination of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein-1 in response to DNA binding. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25278-86. Epub 2006/07/11. doi: 10.1074/jbc.M604983200. PubMed PMID: 16825193.
183. Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, et al. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell.* 2009;139(4):757-

69. Epub 2009/11/17. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.035. PubMed PMID: 19914168; PubMed Central PMCID: PMCPMC2818353.
184. Gebauer F, Hentze MW. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(10):827-35. Epub 2004/10/02. doi: 10.1038/nrm1488. PubMed PMID: 15459663.
185. Zoltowski BD, Schwerdtfeger C, Widom J, Loros JJ, Bilwes AM, Dunlap JC, et al. Conformational switching in the fungal light sensor Vivid. *Science (New York, NY).* 2007;316(5827):1054-7. Epub 2007/05/19. doi: 10.1126/science.1137128. PubMed PMID: 17510367; PubMed Central PMCID: PMCPMC3682417.
186. Zoltowski BD, Vaccaro B, Crane BR. Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nat Chem Biol.* 2009;5(11):827-34. Epub 2009/09/01. doi: 10.1038/nchembio.210. PubMed PMID: 19718042; PubMed Central PMCID: PMCPMC2865183.
187. Zoltowski BD, Crane BR. Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry.* 2008;47(27):7012-9. Epub 2008/06/17. doi: 10.1021/bi8007017. PubMed PMID: 18553928; PubMed Central PMCID: PMCPMC2743001.
188. Schwerdtfeger C, Linden H. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol.* 2001;39(4):1080-7. Epub 2001/03/17. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02306.x. PubMed PMID: 11251826.
189. Schwerdtfeger C, Linden H. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J.* 2003;22(18):4846-55. Epub 2003/09/13. doi: 10.1093/emboj/cdg451. PubMed PMID: 12970196; PubMed Central PMCID: PMCPMC212719.
190. Schafmeier T, Diernfellner A, Schafer A, Dintsis O, Neiss A, Brunner M. Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleo-cytoplasmic shuttling. *Genes Dev.* 2008;22(24):3397-402. Epub 2009/01/15. doi: 10.1101/gad.507408. PubMed PMID: 19141472; PubMed Central PMCID: PMCPMC2607078.
191. Schafmeier T, Haase A, Kaldi K, Scholz J, Fuchs M, Brunner M. Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell.* 2005;122(2):235-46. Epub 2005/07/30. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.032. PubMed PMID: 16051148.
192. Kaldi K, Gonzalez BH, Brunner M. Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output. *EMBO Rep.* 2006;7(2):199-204. Epub 2005/12/24. doi: 10.1038/sj.embor.7400595. PubMed PMID: 16374510; PubMed Central PMCID: PMCPMC1369249.
193. Kasahara M, Swartz TE, Olney MA, Onodera A, Mochizuki N, Fukuzawa H, et al. Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from *Arabidopsis*, rice, and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 2002;129(2):762-73. Epub 2002/06/18. doi: 10.1104/pp.002410. PubMed PMID: 12068117; PubMed Central PMCID: PMCPMC161699.
194. Zayner JP, Antoniou C, French AR, Hause RJ, Jr., Sosnick TR. Investigating models of protein function and allostery with a widespread mutational analysis of a light-activated protein. *Biophys J.* 2013;105(4):1027-36. Epub 2013/08/27. doi: 10.1016/j.bpj.2013.07.010. PubMed PMID: 23972854; PubMed Central PMCID: PMCPMC3752136.
195. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(2):247-54. Epub 2003/03/22. doi: 10.1016/s0955-0674(03)00002-4. PubMed PMID: 12648682.
196. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):181-9. Epub 2004/03/25. doi: 10.1038/nri1312. PubMed PMID: 15039755.
197. Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(9):1239-53. Epub 2009/07/25. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.023. PubMed PMID: 19628035; PubMed Central PMCID: PMCPMC2763943.
198. Cano-Dominguez N, Alvarez-Delfin K, Hansberg W, Aguirre J. NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in

- Neurospora crassa*. Eukaryot Cell. 2008;7(8):1352-61. Epub 2008/06/24. doi: 10.1128/EC.00137-08. PubMed PMID: 18567788; PubMed Central PMCID: PMC2519770.
199. Yoshida Y, Hasunuma K. Reactive oxygen species affect photomorphogenesis in *Neurospora crassa*. J Biol Chem. 2004;279(8):6986-93. Epub 2003/11/20. doi: 10.1074/jbc.M310060200. PubMed PMID: 14625272.
200. Hirayama J, Cho S, Sassone-Corsi P. Circadian control by the reduction/oxidation pathway: catalase represses light-dependent clock gene expression in the zebrafish. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(40):15747-52. Epub 2007/09/28. doi: 10.1073/pnas.0705614104. PubMed PMID: 17898172; PubMed Central PMCID: PMC2000381.
201. Grover D, Ford D, Brown C, Hoe N, Erdem A, Tavaré S, et al. Hydrogen peroxide stimulates activity and alters behavior in *Drosophila melanogaster*. PLoS One. 2009;4(10):e7580. Epub 2009/10/29. doi: 10.1371/journal.pone.0007580. PubMed PMID: 19862323; PubMed Central PMCID: PMC2763216.
202. Belden WJ, Larrondo LF, Froehlich AC, Shi M, Chen CH, Loros JJ, et al. The band mutation in *Neurospora crassa* is a dominant allele of *ras-1* implicating RAS signaling in circadian output. Genes Dev. 2007;21(12):1494-505. Epub 2007/06/19. doi: 10.1101/gad.1551707. PubMed PMID: 17575051; PubMed Central PMCID: PMC21891427.
203. Yoshida Y, Iigusa H, Wang N, Hasunuma K. Cross-talk between the cellular redox state and the circadian system in *Neurospora*. PLoS One. 2011;6(12):e28227. Epub 2011/12/14. doi: 10.1371/journal.pone.0028227. PubMed PMID: 22164247; PubMed Central PMCID: PMC3229512.
204. Gyongyosi N, Kaldi K. Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa*. Antioxid Redox Signal. 2014;20(18):3007-23. Epub 2013/08/24. doi: 10.1089/ars.2013.5558. PubMed PMID: 23964982.
205. Lin WS, Kapoor M. Increase in superoxide production by heat-shocked cells of *Neurospora crassa*, demonstrated by a fluorometric assay. Int J Biochem. 1992;24(7):1081-6. Epub 1992/07/01. doi: 10.1016/0020-711x(92)90377-d. PubMed PMID: 1327889.
206. Gessler NN, Sokolov AV, Bykhovsky VY, Belozerskaya TA. Superoxide dismutase and catalase activities in carotenoid-synthesizing fungi *Blakeslea trispora* and *Neurospora crassa* fungi in oxidative stress. Appl Biochem Micro+. 2002;38(3):205-9. doi: 10.1023/A:1015454921023. PubMed PMID: WOS:000175781200002.
207. Wu F, Wilson JX. Peroxynitrite-dependent activation of protein phosphatase type 2A mediates microvascular endothelial barrier dysfunction. Cardiovasc Res. 2009;81(1):38-45. Epub 2008/09/16. doi: 10.1093/cvr/cvn246. PubMed PMID: 18791203; PubMed Central PMCID: PMC2605194.
208. Caraballo JC, Yshii C, Butti ML, Westphal W, Borchering JA, Allamargot C, et al. Hypoxia increases transepithelial electrical conductance and reduces occludin at the plasma membrane in alveolar epithelial cells via PKC-zeta and PP2A pathway. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2011;300(4):L569-78. Epub 2011/01/25. doi: 10.1152/ajplung.00109.2010. PubMed PMID: 21257729; PubMed Central PMCID: PMC3075095.
209. Sommer D, Coleman S, Swanson SA, Stemmer PM. Differential susceptibilities of serine/threonine phosphatases to oxidative and nitrosative stress. Arch Biochem Biophys. 2002;404(2):271-8. Epub 2002/07/31. doi: 10.1016/s0003-9861(02)00242-4. PubMed PMID: 12147265.
210. Cicchillitti L, Fasanaro P, Biglioli P, Capogrossi MC, Martelli F. Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. J Biol Chem. 2003;278(21):19509-17. Epub 2003/03/07. doi: 10.1074/jbc.M300511200. PubMed PMID: 12621062.
211. Chary P, Dillon D, Schroeder AL, Natvig DO. Superoxide dismutase (*sod-1*) null mutants of *Neurospora crassa*: oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to

- mutagens. *Genetics*. 1994;137(3):723-30. Epub 1994/07/01. PubMed PMID: 8088518; PubMed Central PMCID: PMCPMC1206032.
212. Yoshida Y, Ogura Y, Hasunuma K. Interaction of nucleoside diphosphate kinase and catalases for stress and light responses in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett*. 2006;580(13):3282-6. Epub 2006/05/16. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.096. PubMed PMID: 16697373.
213. Sancar G, Sancar C, Brunner M. Metabolic compensation of the *Neurospora* clock by a glucose-dependent feedback of the circadian repressor CSP1 on the core oscillator. *Genes Dev*. 2012;26(21):2435-42. Epub 2012/11/06. doi: 10.1101/gad.199547.112. PubMed PMID: 23124067; PubMed Central PMCID: PMCPMC3490001.
214. Buday L, Downward J. Many faces of Ras activation. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1786(2):178-87. Epub 2008/06/11. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.05.001. PubMed PMID: 18541156.
215. Weeks G, Spiegelman GB. Roles played by Ras subfamily proteins in the cell and developmental biology of microorganisms. *Cell Signal*. 2003;15(10):901-9. Epub 2003/07/23. doi: 10.1016/s0898-6568(03)00073-1. PubMed PMID: 12873703.
216. Duffield GE, Best JD, Meurers BH, Bittner A, Loros JJ, Dunlap JC. Circadian programs of transcriptional activation, signaling, and protein turnover revealed by microarray analysis of mammalian cells. *Curr Biol*. 2002;12(7):551-7. Epub 2002/04/09. doi: 10.1016/s0960-9822(02)00765-0. PubMed PMID: 11937023.
217. Gerstner JR, Vander Heyden WM, Lavaute TM, Landry CF. Profiles of novel diurnally regulated genes in mouse hypothalamus: expression analysis of the cysteine and histidine-rich domain-containing, zinc-binding protein 1, the fatty acid-binding protein 7 and the GTPase, ras-like family member 11b. *Neuroscience*. 2006;139(4):1435-48. Epub 2006/03/07. doi: 10.1016/j.neuroscience.2006.01.020. PubMed PMID: 16517089; PubMed Central PMCID: PMCPMC1602105.
218. Takahashi H, Umeda N, Tsutsumi Y, Fukumura R, Ohkaze H, Sujino M, et al. Mouse dexamethasone-induced RAS protein 1 gene is expressed in a circadian rhythmic manner in the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;110(1):1-6. Epub 2003/02/08. doi: 10.1016/s0169-328x(02)00543-0. PubMed PMID: 12573527.
219. Eckel-Mahan KL, Phan T, Han S, Wang H, Chan GC, Scheiner ZS, et al. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAMP: implications for memory persistence. *Nat Neurosci*. 2008;11(9):1074-82. Epub 2009/01/23. doi: 10.1038/nn.2174. PubMed PMID: 19160506; PubMed Central PMCID: PMCPMC2772165.
220. Hayashi Y, Sanada K, Fukada Y. Circadian and photic regulation of MAP kinase by Ras- and protein phosphatase-dependent pathways in the chick pineal gland. *FEBS Lett*. 2001;491(1-2):71-5. Epub 2001/02/28. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02153-6. PubMed PMID: 11226422.
221. Huang CC, Ko ML, Vernikovskaya DI, Ko GY. Calcineurin serves in the circadian output pathway to regulate the daily rhythm of L-type voltage-gated calcium channels in the retina. *J Cell Biochem*. 2012;113(3):911-22. Epub 2012/03/01. doi: 10.1002/jcb.23419. PubMed PMID: 22371971; PubMed Central PMCID: PMCPMC3296962.
222. Ko GY, Ko ML, Dryer SE. Circadian regulation of cGMP-gated channels of vertebrate cone photoreceptors: role of cAMP and Ras. *J Neurosci*. 2004;24(6):1296-304. Epub 2004/02/13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3560-03.2004. PubMed PMID: 14960600; PubMed Central PMCID: PMCPMC2667374.
223. Ko ML, Liu Y, Dryer SE, Ko GY. The expression of L-type voltage-gated calcium channels in retinal photoreceptors is under circadian control. *J Neurochem*. 2007;103(2):784-92. Epub 2007/08/09. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04816.x. PubMed PMID: 17683482; PubMed Central PMCID: PMCPMC2361098.
224. Ko ML, Liu Y, Shi L, Trump D, Ko GY. Circadian regulation of retinoschisin in the chick retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(4):1615-21. Epub 2008/04/04. doi: 10.1167/iovs.07-1189. PubMed PMID: 18385082; PubMed Central PMCID: PMCPMC2367121.

225. Shimizu K, Okada M, Nagai K, Fukada Y. Suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein, a novel binding partner of K-Ras in the membrane rafts, negatively regulates MAPK pathway. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14920-5. Epub 2003/02/21. doi: 10.1074/jbc.M213214200. PubMed PMID: 12594205.
226. Tsuchiya Y, Minami I, Kadotani H, Todo T, Nishida E. Circadian clock-controlled diurnal oscillation of Ras/ERK signaling in mouse liver. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2013;89(1):59-65. Epub 2013/01/16. doi: 10.2183/pjab.89.59. PubMed PMID: 23318682; PubMed Central PMCID: PMC3611956.
227. Williams JA, Su HS, Bernards A, Field J, Sehgal A. A circadian output in *Drosophila* mediated by neurofibromatosis-1 and Ras/MAPK. *Science (New York, NY).* 2001;293(5538):2251-6. Epub 2001/09/22. doi: 10.1126/science.1063097. PubMed PMID: 11567138.
228. Gyongyosi N, Nagy D, Makara K, Ella K, Kaldi K. Reactive oxygen species can modulate circadian phase and period in *Neurospora crassa*. *Free Radic Biol Med.* 2013;58:134-43. Epub 2013/01/02. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.016. PubMed PMID: 23277144.
229. Weber F, Hung HC, Maurer C, Kay SA. Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. *J Neurochem.* 2006;98(1):248-57. Epub 2006/06/30. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03865.x. PubMed PMID: 16805811.
230. Bouchard-Cannon P, Cheng HY. Scheduled feeding alters the timing of the suprachiasmatic nucleus circadian clock in *dexras1*-deficient mice. *Chronobiol Int.* 2012;29(8):965-81. Epub 2012/08/30. doi: 10.3109/07420528.2012.707264. PubMed PMID: 22928915; PubMed Central PMCID: PMC3707842.
231. Cheng HY, Dziema H, Papp J, Mathur DP, Koletar M, Ralph MR, et al. The molecular gatekeeper *Dexras1* sculpts the photic responsiveness of the mammalian circadian clock. *J Neurosci.* 2006;26(50):12984-95. Epub 2006/12/15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4253-06.2006. PubMed PMID: 17167088; PubMed Central PMCID: PMC36674968.
232. Cheng HY, Obrietan K. *Dexras1*: shaping the responsiveness of the circadian clock. *Semin Cell Dev Biol.* 2006;17(3):345-51. Epub 2006/06/13. doi: 10.1016/j.semcdb.2006.03.006. PubMed PMID: 16765612.
233. Koletar MM, Cheng HY, Penninger JM, Ralph MR. Loss of *dexras1* alters nonphotic circadian phase shifts and reveals a role for the intergeniculate leaflet (IGL) in gene-targeted mice. *Chronobiol Int.* 2011;28(7):553-62. Epub 2011/08/13. doi: 10.3109/07420528.2011.592235. PubMed PMID: 21834641.
234. Relogio A, Thomas P, Medina-Perez P, Reischl S, Bervoets S, Gloc E, et al. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer. *PLoS Genet.* 2014;10(5):e1004338. Epub 2014/05/31. doi: 10.1371/journal.pgen.1004338. PubMed PMID: 24875049; PubMed Central PMCID: PMC364038477.
235. Serchov T, Jilg A, Wolf CT, Radtke I, Stehle JH, Heumann R. Ras Activity Oscillates in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus and Modulates Circadian Clock Dynamics. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1843-55. Epub 2015/03/13. doi: 10.1007/s12035-015-9135-0. PubMed PMID: 25762011.
236. Kana-uchi A, Yamashiro CT, Tanabe S, Murayama T. A ras homologue of *Neurospora crassa* regulates morphology. *Mol Gen Genet.* 1997;254(4):427-32. Epub 1997/04/28. doi: 10.1007/s004380050435. PubMed PMID: 9180696.
237. Gai K, Cao X, Dong Q, Ding Z, Wei Y, Liu Y, et al. Transcriptional repression of frequency by the IEC-1-INO80 complex is required for normal *Neurospora* circadian clock function. *PLoS Genet.* 2017;13(4):e1006732. Epub 2017/04/14. doi: 10.1371/journal.pgen.1006732. PubMed PMID: 28403234; PubMed Central PMCID: PMC5406019.
238. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(2):300-72. Epub 2002/06/01. doi: 10.1128/mmbr.66.2.300-372.2002. PubMed PMID: 12040128; PubMed Central PMCID: PMC36120784.

239. Johnson C, Kweon HK, Sheidy D, Shively CA, Mellacheruvu D, Nesvizhskii AI, et al. The yeast Skslp kinase signaling network regulates pseudohyphal growth and glucose response. *PLoS Genet.* 2014;10(3):e1004183. Epub 2014/03/08. doi: 10.1371/journal.pgen.1004183. PubMed PMID: 24603354; PubMed Central PMCID: PMC43945295.
240. Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):746-85. Epub 2000/12/06. doi: 10.1128/mmbr.64.4.746-785.2000. PubMed PMID: 11104818; PubMed Central PMCID: PMC4399013.
241. Dettmann A, Heilig Y, Valerius O, Ludwig S, Seiler S. Fungal communication requires the MAK-2 pathway elements STE-20 and RAS-2, the NRC-1 adapter STE-50 and the MAP kinase scaffold HAM-5. *PLoS Genet.* 2014;10(11):e1004762. Epub 2014/11/21. doi: 10.1371/journal.pgen.1004762. PubMed PMID: 25411845; PubMed Central PMCID: PMC4239118.
242. Pandey A, Roca MG, Read ND, Glass NL. Role of a mitogen-activated protein kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell.* 2004;3(2):348-58. Epub 2004/04/13. doi: 10.1128/ec.3.2.348-358.2004. PubMed PMID: 15075265; PubMed Central PMCID: PMC4387641.
243. Larrondo LF, Olivares-Yanez C, Baker CL, Loros JJ, Dunlap JC. Circadian rhythms. Decoupling circadian clock protein turnover from circadian period determination. *Science (New York, NY).* 2015;347(6221):1257277. Epub 2015/01/31. doi: 10.1126/science.1257277. PubMed PMID: 25635104; PubMed Central PMCID: PMC4432837.
244. Adhvaryu K, Firoozi G, Motavaze K, Lakin-Thomas P. PRD-1, a Component of the Circadian System of *Neurospora crassa*, Is a Member of the DEAD-box RNA Helicase Family. *Journal of biological rhythms.* 2016;31(3):258-71. Epub 2016/04/01. doi: 10.1177/0748730416639717. PubMed PMID: 27029286.
245. Emerson JM, Bartholomai BM, Ringelberg CS, Baker SE, Loros JJ, Dunlap JC. period-1 encodes an ATP-dependent RNA helicase that influences nutritional compensation of the *Neurospora* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(51):15707-12. Epub 2015/12/10. doi: 10.1073/pnas.1521918112. PubMed PMID: 26647184; PubMed Central PMCID: PMC4697410.
246. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood.* 2012;120(15):e60-72. Epub 2012/08/21. doi: 10.1182/blood-2012-04-423525. PubMed PMID: 22904297; PubMed Central PMCID: PMC43471524.
247. Duarte TA, Noronha-Dutra AA, Nery JS, Ribeiro SB, Pitanga TN, Lapa ESJR, et al. Mycobacterium tuberculosis-induced neutrophil ectosomes decrease macrophage activation. *Tuberculosis (Edinb).* 2012;92(3):218-25. Epub 2012/03/07. doi: 10.1016/j.tube.2012.02.007. PubMed PMID: 22391089.
248. Pluskota E, Woody NM, Szpak D, Ballantyne CM, Soloviev DA, Simon DI, et al. Expression, activation, and function of integrin alphaMbeta2 (Mac-1) on neutrophil-derived microparticles. *Blood.* 2008;112(6):2327-35. Epub 2008/05/30. doi: 10.1182/blood-2007-12-127183. PubMed PMID: 18509085; PubMed Central PMCID: PMC42532806.
249. Watanabe J, Marathe GK, Neilsen PO, Weyrich AS, Harrison KA, Murphy RC, et al. Endotoxins stimulate neutrophil adhesion followed by synthesis and release of platelet-activating factor in microparticles. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33161-8. Epub 2003/06/18. doi: 10.1074/jbc.M305321200. PubMed PMID: 12810708.
250. Timar CI, Lorincz AM, Csepanyi-Komi R, Valyi-Nagy A, Nagy G, Buzas EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood.* 2013;121(3):510-8. Epub 2012/11/13. doi: 10.1182/blood-2012-05-431114. PubMed PMID: 23144171; PubMed Central PMCID: PMC43548170.

251. Ottonello L, Dapino P, Pastorino G, Dallegri F, Sacchetti C. Neutrophil dysfunction and increased susceptibility to infection. *Eur J Clin Invest.* 1995;25(9):687-92. Epub 1995/09/01. doi: 10.1111/j.1365-2362.1995.tb01987.x. PubMed PMID: 7498244.
252. Alavi A, Sajic D, Cerci FB, Ghazarian D, Rosenbach M, Jorizzo J. Neutrophilic dermatoses: an update. *Am J Clin Dermatol.* 2014;15(5):413-23. Epub 2014/08/27. doi: 10.1007/s40257-014-0092-6. PubMed PMID: 25154386.
253. Wright HL, Moots RJ, Edwards SW. The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(10):593-601. Epub 2014/06/11. doi: 10.1038/nrrheum.2014.80. PubMed PMID: 24914698.
254. Gibbs J, Ince L, Matthews L, Mei J, Bell T, Yang N, et al. An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med.* 2014;20(8):919-26. Epub 2014/07/30. doi: 10.1038/nm.3599. PubMed PMID: 25064128; PubMed Central PMCID: PMC4268501.
255. Hriscu ML. Modulatory factors of circadian phagocytic activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1057:403-30. Epub 2006/01/10. doi: 10.1196/annals.1356.032. PubMed PMID: 16399910.
256. Melchart D, Martin P, Hallek M, Holzmann M, Jurcic X, Wagner H. Circadian variation of the phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes and of various other parameters in 13 healthy male adults. *Chronobiol Int.* 1992;9(1):35-45. Epub 1992/01/01. doi: 10.3109/07420529209064514. PubMed PMID: 1555260.
257. Niehaus GD, Ervin E, Patel A, Khanna K, Vanek VW, Fagan DL. Circadian variation in cell-adhesion molecule expression by normal human leukocytes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002;80(10):935-40. Epub 2002/11/27. doi: 10.1139/y02-121. PubMed PMID: 12450059.
258. Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Eichler HG, Bauer P, Wagner OF. Circadian variation of granulocyte colony stimulating factor levels in man. *Br J Haematol.* 1999;106(2):368-70. Epub 1999/08/25. doi: 10.1046/j.1365-2141.1999.01543.x. PubMed PMID: 10460592.
259. Kusanagi H, Mishima K, Satoh K, Echizenya M, Katoh T, Shimizu T. Similar profiles in human period1 gene expression in peripheral mononuclear and polymorphonuclear cells. *Neurosci Lett.* 2004;365(2):124-7. Epub 2004/07/13. doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.065. PubMed PMID: 15245792.
260. Haimovich B, Calvano J, Haimovich AD, Calvano SE, Coyle SM, Lowry SF. In vivo endotoxin synchronizes and suppresses clock gene expression in human peripheral blood leukocytes. *Crit Care Med.* 2010;38(3):751-8. Epub 2010/01/19. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181cd131c. PubMed PMID: 20081528; PubMed Central PMCID: PMC2929957.
261. Arjona A, Sarkar DK. Evidence supporting a circadian control of natural killer cell function. *Brain Behav Immun.* 2006;20(5):469-76. Epub 2005/11/29. doi: 10.1016/j.bbi.2005.10.002. PubMed PMID: 16309885.
262. Baumann A, Gonnenwein S, Bischoff SC, Sherman H, Chapnik N, Froy O, et al. The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells. *Immunology.* 2013;140(4):465-74. Epub 2013/07/24. doi: 10.1111/imm.12157. PubMed PMID: 23876110; PubMed Central PMCID: PMC3839650.
263. Boivin DB, James FO, Wu A, Cho-Park PF, Xiong H, Sun ZS. Circadian clock genes oscillate in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood.* 2003;102(12):4143-5. Epub 2003/08/02. doi: 10.1182/blood-2003-03-0779. PubMed PMID: 12893774.
264. Bollinger T, Leutz A, Leliavski A, Skrum L, Kovac J, Bonacina L, et al. Circadian clocks in mouse and human CD4+ T cells. *PLoS One.* 2011;6(12):e29801. Epub 2012/01/05. doi: 10.1371/journal.pone.0029801. PubMed PMID: 22216357; PubMed Central PMCID: PMC3247291.
265. Hayashi M, Shimba S, Tezuka M. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2007;30(4):621-6. Epub 2007/04/06. doi: 10.1248/bpb.30.621. PubMed PMID: 17409491.

266. James FO, Boivin DB, Charbonneau S, Belanger V, Cermakian N. Expression of clock genes in human peripheral blood mononuclear cells throughout the sleep/wake and circadian cycles. *Chronobiol Int.* 2007;24(6):1009-34. Epub 2007/12/14. doi: 10.1080/07420520701800736. PubMed PMID: 18075796.
267. Kusanagi H, Hida A, Satoh K, Echizenya M, Shimizu T, Pendergast JS, et al. Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells. *Neurosci Res.* 2008;61(2):136-42. Epub 2008/03/14. doi: 10.1016/j.neures.2008.01.012. PubMed PMID: 18336944.
268. Silver AC, Arjona A, Hughes ME, Nitabach MN, Fikrig E. Circadian expression of clock genes in mouse macrophages, dendritic cells, and B cells. *Brain Behav Immun.* 2012;26(3):407-13. Epub 2011/10/25. doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.001. PubMed PMID: 22019350; PubMed Central PMCID: PMC3336152.
269. Archer SN, Viola AU, Kyriakopoulou V, von Schantz M, Dijk DJ. Inter-individual differences in habitual sleep timing and entrained phase of endogenous circadian rhythms of BMAL1, PER2 and PER3 mRNA in human leukocytes. *Sleep.* 2008;31(5):608-17. Epub 2008/06/04. doi: 10.1093/sleep/31.5.608. PubMed PMID: 18517031; PubMed Central PMCID: PMC2398752.
270. Ebisawa T, Numazawa K, Shimada H, Izutsu H, Sasaki T, Kato N, et al. Self-sustained circadian rhythm in cultured human mononuclear cells isolated from peripheral blood. *Neurosci Res.* 2010;66(2):223-7. Epub 2009/11/04. doi: 10.1016/j.neures.2009.10.007. PubMed PMID: 19883700.
271. Fukuya H, Emoto N, Nonaka H, Yagita K, Okamura H, Yokoyama M. Circadian expression of clock genes in human peripheral leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354(4):924-8. Epub 2007/02/06. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.063. PubMed PMID: 17274950.
272. Hida A, Kusanagi H, Satoh K, Kato T, Matsumoto Y, Echizenya M, et al. Expression profiles of PERIOD1, 2, and 3 in peripheral blood mononuclear cells from older subjects. *Life Sci.* 2009;84(1-2):33-7. Epub 2008/11/18. doi: 10.1016/j.lfs.2008.10.012. PubMed PMID: 19013183.
273. Tamaru T, Hirayama J, Isojima Y, Nagai K, Norioka S, Takamatsu K, et al. CK2alpha phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(4):446-8. Epub 2009/03/31. doi: 10.1038/nsmb.1578. PubMed PMID: 19330005; PubMed Central PMCID: PMC26501789.
274. Tamaru T, Isojima Y, van der Horst GT, Takei K, Nagai K, Takamatsu K. Nucleocytoplasmic shuttling and phosphorylation of BMAL1 are regulated by circadian clock in cultured fibroblasts. *Genes Cells.* 2003;8(12):973-83. Epub 2004/01/31. doi: 10.1046/j.1365-2443.2003.00686.x. PubMed PMID: 14750952.
275. Meyer WH, Howard TH. Changes in actin content during induced myeloid maturation of human promyelocytes. *Blood.* 1983;62(2):308-14. Epub 1983/08/01. PubMed PMID: 6871465.
276. Martin C, Burdon PC, Bridger G, Gutierrez-Ramos JC, Williams TJ, Rankin SM. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity.* 2003;19(4):583-93. Epub 2003/10/18. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00263-2. PubMed PMID: 14563322.
277. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503-21. Epub 1997/05/15. PubMed PMID: 9160655.
278. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000107562-CXCL12/tissue>.
279. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(6):2305-9. Epub 1994/03/15. doi: 10.1073/pnas.91.6.2305. PubMed PMID: 8134392; PubMed Central PMCID: PMC43359.
280. Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A. Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2003;69(1):81-91. Epub 2003/02/28. doi: 10.1095/biolreprod.102.011833. PubMed PMID: 12606319.

281. Alvarez JD, Sehgal A. The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *Journal of biological rhythms*. 2005;20(2):111-21. Epub 2005/04/19. doi: 10.1177/0748730404274078. PubMed PMID: 15834108.
282. Torra IP, Tsibulsky V, Delaunay F, Saladin R, Laudet V, Fruchart JC, et al. Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erbalpha expression in liver. *Endocrinology*. 2000;141(10):3799-806. Epub 2000/10/03. doi: 10.1210/endo.141.10.7708. PubMed PMID: 11014236.
283. Wuarin J, Schibler U. Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm. *Cell*. 1990;63(6):1257-66. Epub 1990/12/21. doi: 10.1016/0092-8674(90)90421-a. PubMed PMID: 2261643.
284. Burdon PC, Martin C, Rankin SM. The CXC chemokine MIP-2 stimulates neutrophil mobilization from the rat bone marrow in a CD49d-dependent manner. *Blood*. 2005;105(6):2543-8. Epub 2004/11/16. doi: 10.1182/blood-2004-08-3193. PubMed PMID: 15542579.
285. Day RB, Link DC. Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(9):1415-23. Epub 2011/11/03. doi: 10.1007/s00018-011-0870-8. PubMed PMID: 22045556.
286. Pena C, Rincon J, Pedreanez A, Viera N, Mosquera J. Chemotactic effect of melatonin on leukocytes. *J Pineal Res*. 2007;43(3):263-9. Epub 2007/09/07. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00471.x. PubMed PMID: 17803523.
287. Roenneberg T, Kuehnle T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep Med Rev*. 2007;11(6):429-38. Epub 2007/10/16. doi: 10.1016/j.smrv.2007.07.005. PubMed PMID: 17936039.
288. Beebe DW, Rose D, Amin R. Effect of chronic sleep restriction on adolescents' learning and brain activity in a simulated classroom: A pilot study. *Sleep*. 2008;31:A77-A8. PubMed PMID: WOS:000255419000235.
289. Estrada A, Killgore WD, Rouse T, Balkin TJ, Wildzunas RM. Total sleep time measured by actigraphy predicts academic performance during military training. *Sleep*. 2008;31:A134-A. PubMed PMID: WOS:000255419000404.
290. Gomes AA, Tavares J, de Azevedo MH. Sleep and academic performance in undergraduates: a multi-measure, multi-predictor approach. *Chronobiol Int*. 2011;28(9):786-801. Epub 2011/11/15. doi: 10.3109/07420528.2011.606518. PubMed PMID: 22080785.
291. Wolfson AR, Carskadon MA. Sleep schedules and daytime functioning in adolescents. *Child Dev*. 1998;69(4):875-87. doi: DOI 10.1111/j.1467-8624.1998.tb06149.x. PubMed PMID: WOS:000076070300002.
292. Eliasson AH, Lettieri CJ, Eliasson AH. Early to bed, early to rise! Sleep habits and academic performance in college students. *Sleep Breath*. 2010;14(1):71-5. Epub 2009/07/16. doi: 10.1007/s11325-009-0282-2. PubMed PMID: 19603214.
293. Genzel L, Ahrberg K, Roselli C, Niedermaier S, Steiger A, Dresler M, et al. Sleep timing is more important than sleep length or quality for medical school performance. *Chronobiol Int*. 2013;30(6):766-71. Epub 2013/06/12. doi: 10.3109/07420528.2012.763132. PubMed PMID: 23750895.
294. Besoluk S, Onder I, Deveci I. Morningness-Eveningness Preferences and Academic Achievement of University Students. *Chronobiology International*. 2011;28(2):118-25. doi: 10.3109/07420528.2010.540729. PubMed PMID: WOS:000286901900004.
295. Clarisse R, Le Floc'h N, Kindelberger C, Feunteun P. Daily Rhythmicity of Attention in Morning-Vs. Evening-Type Adolescents at Boarding School under Different Psychosociological Testing Conditions. *Chronobiology International*. 2010;27(4):826-41. doi: 10.3109/07420521003794051. PubMed PMID: WOS:000282027300008.
296. Rutters F, Lemmens SG, Adam TC, Bremmer MA, Elders PJ, Nijpels G, et al. Is social jetlag associated with an adverse endocrine, behavioral, and cardiovascular risk profile? *Journal of*

- biological rhythms. 2014;29(5):377-83. Epub 2014/09/26. doi: 10.1177/0748730414550199. PubMed PMID: 25252710.
297. Onyper SV, Thacher PV, Gilbert JW, Gradess SG. Class start times, sleep, and academic performance in college: a path analysis. *Chronobiol Int.* 2012;29(3):318-35. Epub 2012/03/07. doi: 10.3109/07420528.2012.655868. PubMed PMID: 22390245.
298. Preckel F, Lipnevich AA, Boehme K, Brandner L, Georgi K, Konen T, et al. Morningness-eveningness and educational outcomes: the lark has an advantage over the owl at high school. *Br J Educ Psychol.* 2013;83(Pt 1):114-34. Epub 2013/02/02. doi: 10.1111/j.2044-8279.2011.02059.x. PubMed PMID: 23369178.
299. Grimaldi D, Carter JR, Van Cauter E, Leproult R. Adverse Impact of Sleep Restriction and Circadian Misalignment on Autonomic Function in Healthy Young Adults. *Hypertension.* 2016;68(1):243-50. Epub 2016/06/09. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06847. PubMed PMID: 27271308; PubMed Central PMCID: PMC4902172.
300. Hulsege G, Gupta N, Proper KI, van Lobenstein N, W IJ, Hallman DM, et al. Shift work is associated with reduced heart rate variability among men but not women. *Int J Cardiol.* 2018;258:109-14. Epub 2018/02/13. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.01.089. PubMed PMID: 29433969.
301. Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occup Med (Lond).* 2003;53(2):103-8. Epub 2003/03/15. PubMed PMID: 12637594.
302. Morris CJ, Purvis TE, Hu K, Scheer FA. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(10):E1402-11. Epub 2016/02/10. doi: 10.1073/pnas.1516953113. PubMed PMID: 26858430; PubMed Central PMCID: PMC4790999.
303. Vetter C, Devore EE, Wegrzyn LR, Massa J, Speizer FE, Kawachi I, et al. Association Between Rotating Night Shift Work and Risk of Coronary Heart Disease Among Women. *JAMA.* 2016;315(16):1726-34. Epub 2016/04/27. doi: 10.1001/jama.2016.4454. PubMed PMID: 27115377; PubMed Central PMCID: PMC45102147.
304. Thayer JF, Yamamoto SS, Brosschot JF. The relationship of autonomic imbalance, heart rate variability and cardiovascular disease risk factors. *Int J Cardiol.* 2010;141(2):122-31. Epub 2009/11/17. doi: 10.1016/j.ijcard.2009.09.543. PubMed PMID: 19910061.
305. Chouchou F, Desseilles M. Heart rate variability: a tool to explore the sleeping brain? *Front Neurosci.* 2014;8:402. Epub 2015/01/08. doi: 10.3389/fnins.2014.00402. PubMed PMID: 25565936; PubMed Central PMCID: PMC4263095.
306. Elsenbruch S, Harnish MJ, Orr WC. Heart rate variability during waking and sleep in healthy males and females. *Sleep.* 1999;22(8):1067-71. Epub 2000/01/05. PubMed PMID: 10617167.
307. Tobaldini E, Nobili L, Strada S, Casali KR, Braghiroli A, Montano N. Heart rate variability in normal and pathological sleep. *Front Physiol.* 2013;4:294. Epub 2013/10/19. doi: 10.3389/fphys.2013.00294. PubMed PMID: 24137133; PubMed Central PMCID: PMC3797399.
308. Trinder J, Kleiman J, Carrington M, Smith S, Breen S, Tan N, et al. Autonomic activity during human sleep as a function of time and sleep stage. *J Sleep Res.* 2001;10(4):253-64. Epub 2002/03/21. PubMed PMID: 11903855.
309. Akerstedt T, Hume K, Minors D, Waterhouse J. Good sleep--its timing and physiological sleep characteristics. *J Sleep Res.* 1997;6(4):221-9. Epub 1998/03/11. PubMed PMID: 9493521.
310. Haraszi RA, Ella K, Gyongyosi N, Roenneberg T, Kaldi K. Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates. *Chronobiol Int.* 2014;31(5):603-12. Epub 2014/02/05. doi: 10.3109/07420528.2013.879164. PubMed PMID: 24491157.
311. Pilz LK, Keller LK, Lenssen D, Roenneberg T. Time to rethink sleep quality: PSQI scores reflect sleep quality on workdays. *Sleep.* 2018;41(5). Epub 2018/02/09. doi: 10.1093/sleep/zsy029. PubMed PMID: 29420828.

312. Montano N, Porta A, Cogliati C, Costantino G, Tobaldini E, Casali KR, et al. Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33(2):71-80. Epub 2008/08/19. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.07.006. PubMed PMID: 18706440.
313. Scholz UJ, Bianchi AM, Cerutti S, Kubicki S. Vegetative background of sleep: spectral analysis of the heart rate variability. *Physiol Behav.* 1997;62(5):1037-43. Epub 1997/10/23. PubMed PMID: 9333197.
314. Meijman TF dV-GA, de Vries G. The evaluation of the Groningen Sleep Quality Scale. Groningen: Heymans Bulletin. 1988;HB 88—13—EX.
315. Simor P KF, Bódizs R, Bárdos G. A szubjektív alvásminőség kérdőíves vizsgálata: a Groningen Alvásminőség Skála hazai validálása. *Mentálhigiéné és Pszichoszomatika.* 2009;10(3):249-61.
316. Goldberger JJ, Challapalli S, Tung R, Parker MA, Kadish AH. Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation.* 2001;103(15):1977-83. Epub 2001/04/18. doi: 10.1161/01.cir.103.15.1977. PubMed PMID: 11306527.
317. Kumral D, Schaare HL, Beyer F, Reinelt J, Uhlig M, Liem F, et al. The age-dependent relationship between resting heart rate variability and functional brain connectivity. *Neuroimage.* 2019;185:521-33. Epub 2018/10/13. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.10.027. PubMed PMID: 30312808.
318. Pinter A, Horvath T, Sarkozi A, Kollai M. Relationship between heart rate variability and endothelial function in healthy subjects. *Auton Neurosci.* 2012;169(2):107-12. Epub 2012/07/04. doi: 10.1016/j.autneu.2012.05.005. PubMed PMID: 22749462.
319. Hillebrand S, Gast KB, de Mutsert R, Swenne CA, Jukema JW, Middeldorp S, et al. Heart rate variability and first cardiovascular event in populations without known cardiovascular disease: meta-analysis and dose-response meta-regression. *Europace.* 2013;15(5):742-9. Epub 2013/02/02. doi: 10.1093/europace/eus341. PubMed PMID: 23370966.
320. Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res.* 2014;114(9):1500-15. Epub 2014/04/26. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303772. PubMed PMID: 24763467; PubMed Central PMCID: PMC4043633.
321. Colhoun HM, Francis DP, Rubens MB, Underwood SR, Fuller JH. The association of heart-rate variability with cardiovascular risk factors and coronary artery calcification: a study in type 1 diabetic patients and the general population. *Diabetes Care.* 2001;24(6):1108-14. Epub 2001/05/26. PubMed PMID: 11375379.
322. Schroeder EB, Liao D, Chambless LE, Prineas RJ, Evans GW, Heiss G. Hypertension, blood pressure, and heart rate variability: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Hypertension.* 2003;42(6):1106-11. Epub 2003/10/29. doi: 10.1161/01.HYP.0000100444.71069.73. PubMed PMID: 14581296.
323. Florea VG, Cohn JN. The autonomic nervous system and heart failure. *Circ Res.* 2014;114(11):1815-26. Epub 2014/05/24. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302589. PubMed PMID: 24855204.
324. Fukuda K, Kanazawa H, Aizawa Y, Ardell JL, Shivkumar K. Cardiac innervation and sudden cardiac death. *Circ Res.* 2015;116(12):2005-19. Epub 2015/06/06. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304679. PubMed PMID: 26044253; PubMed Central PMCID: PMC4465108.

8. Közleményjegyzék

8.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Összesített impakt faktor: 126,47

Hivatkozások száma: 618

1.

Schafmeier T., Haase A., **Káldi K. (megosztott első szerző)**, Scholz J., Fuchs M. and Brunner M.

Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor (2005)

Cell 122: 235-246

IF: 29,431

2.

Káldi K., Herreros González B. and Brunner M.

Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output (2006)

EMBO Reports 7: 199-204

IF: 8,175

3.

Schafmeier T., **Káldi K.**, Diernfellner A., Mohr C. and Brunner M.

Phosphorylation dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor towards a cytoplasmic activator (2006)

Genes Dev. 20: 297-306

IF: 15,050

4.

Brunner M. and **Káldi K.**

Interlocked feedback loops of the circadian clock of *Neurospora crassa* (2008)

Mol Microbiol. 68: 255-262

IF: 5,213

5.

Kozma-Bognár L. and **Káldi K.**

Always on time: synchronization of the fungal and the plant circadian clock by light (2008)

ChemBioChem 9: 2565-2573

IF: 3,322

6.

Malzahn E., Ciprianidis S., **Káldi K. (megosztott első szerző)**, Schafmeier T. and Brunner M.

Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains (2010)

Cell 142:762-72

IF: 32,401

7.

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

IF: 5,710

8.

Gyöngyösi N. and **Káldi K.**Interconnections of ROS homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa* (2014)*Antioxid Redox Signal*. 20: 3007-3023

IF: 7,407

9.

Haraszi R. Á., Ella K., Gyöngyösi N., Roenneberg T. and **Káldi K.**

Social jetlag negatively correlates with academic performance in undergraduates (2014)

Chronobiol Int. 31: 603-12

IF: 3,343

10.

Ella K., Csépanyi-Kömi R. and **Káldi K.**

Circadian regulation of human peripheral neutrophils (2016)

Brain Behavior and Immunity 57: 209-221

IF: 5,964

11.

Gyöngyösi N., Szöke A., Ella K. and **Káldi K.**The small G protein RAS2 is involved in the metabolic compensation of the circadian clock in the circadian model *Neurospora crassa* (2017)*J Biol Chem* 292: 14929-14939

IF: 4,010

12.

Ella K., Mócsai A. and **Káldi K.**

Circadian regulation of neutrophils: Control by a cell-autonomous clock or systemic factors? (2018)

Eur J Clin Invest. 2018;e12965.

IF: 2,784

13.

Südy Á. R., Ella K., Bódizs R. and **Káldi K.**

Association of Social Jetlag With Sleep Quality and Autonomic Cardiac Control During Sleep in Young Healthy Men (2019)

Front Neurosci. 2019 Sep 6;13:950.

IF: 3,648 (2018)

8.2. A PhD dolgozat elkészítését követően született további közlemények

Káldi K., Bauer M.F., Sirrenberg C., Neupert W. and Brunner M.

Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix targeted preproteins (1998)

EMBO J. 17:1569-76

IF: 13,171

Káldi K. and Neupert W.

Protein translocation into mitochondria (1998)

Biofactors 8: 221-224

IF: 1,852

Geiszt M., Szeberényi J., **Káldi K.** and Ligeti E.

Role of different Ca^{2+} sources in the superoxide production of human neutrophil granulocytes (1999)

Free Rad Biol Med 26:1092-1099

IF: 4,079

Donzeau M., **Káldi K. (megosztott első szerző)**, Adam A., Paschen S., Wanner G., Guiard B., Bauer M. F., Neupert W. and Brunner M.

The preprotein translocase component Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes (2000)

Cell 101: 401-412

IF: 32,440

Paschen S.A., Rothbauer U., **Káldi K.**, Bauer M.F., Neupert W. and Brunner M.

The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria (2000)

EMBO J. 19:6392-6400

IF: 13,999

Lacza Z., **Káldi K.**, Kövecs K., Görlach C., Nagy Z., Sándor P., Benyó Z. and Wahl M.

Involvement of prostanoid release in the mediation of UTP-induced cerebrovascular contraction in the rat (2001)

Brain Res. 896: 169-174

IF: 2,489

Káldi K., Szeberényi J., Rada B. K., Kovács P., Geiszt M., Mócsai A. and Ligeti E.

Contribution of phospholipase D and a brefeldin A sensitive ARF to chemoattractant induced superoxide production and secretion of human neutrophils (2002)

J. Leuk. Biol. 71: 695-700

IF: 4,132

Horváth B., Hrabák A., **Káldi K.**, Sándor P. and Benyó Z.

Contribution of the heme oxygenase pathway to the maintenance of the hypothalamic blood flow during diminished NO synthesis (2003)

J. Cereb. Blood Flow Metab. 23: 653-657

IF: 5,370

Lacza Z., Dézsi L., **Káldi K.**, Horváth E.M., Sándor P. and Benyó Z.

Prostacyclin-mediated compensatory mechanism in the coronary circulation during acute NO synthase blockade (2003)

Life Sci 73: 1141-1149

IF: 1,944

Káldi K., Kalocsai Á., Rada B. K., Mezö G., Molnár G., Báthori G.Z. and Ligeti E.
Degranulation and superoxide production depend on cholesterol in PLB-985 cells (2003)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 310:1241-1246

IF: 2,836

Rada B.K., Geiszt M., **Káldi K.**, Timar C. and Ligeti E.

Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing. (2004)

Blood 104: 2947-2953

IF: 9,782

Sirokmany G., Szidonya L., **Káldi K.**, Gaborik Z., Ligeti E. and Geiszt M.

Sec14 Homology Domain Targets p50RhoGAP to Endosomes and Provides a Link between Rab and Rho GTPases (2006)

J. Biol. Chem. 281: 6096-6105

IF: 5,808

Ruisanchez E., Cselenyák A., Papp R.S., Németh T., **Káldi K.**, Sándor P. and Benyó Z.

Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin a in cerebral arteries (2012)

PlosOne 7: e37798

IF: 3,730

8.3. A PhD dolgozat elkészültét megelőzően megjelent közlemények

Kapus A., Szászi K., **Káldi K.**, Ligeti E. and Fonyó A.

Ruthenium red inhibits mitochondrial Na⁺ and K⁺ uniports induced by magnesium removal (1990)

J. Biol. Chem. 265: 18063-18066

IF: 6,698

Kapus A., Szászi K., **Káldi K.**, Ligeti E. and Fonyó A.

Is the mitochondrial Ca²⁺ uniporter a voltage-modulated transport pathway? (1991)

FEBS Lett. 282: 61-64

IF: 3,479

Káldi K., Diestelkötter P., Stenbeck G., Auerbach S., Jäkle U., Mägert H.-J., Wieland F.T. and Just W.W.

Membrane topology of the 22 kDa integral peroxisomal membrane protein (1993)

FEBS Lett. 315:217-222

IF: 3,339

Káldi K., Szászi K., Suszták K., Kapus A. and Ligeti E.

Lymphocytes possess an electrogenic H⁺ transporting pathway in their plasma membrane (1994)

Biochem. J. 301:329-334

IF: 4,262

Geiszt M., **Káldi K.**, Szeberényi J. and Ligeti E.

Thapsigargin inhibits calcium entry into human neutrophil granulocytes (1995)

Biochem. J. 305:525-528

IF: 4,159

Suszták K., **Káldi K.**, Kapus A. and Ligeti E.

Ligands of purinergic receptors stimulate electrogenic H^+ -transport of neutrophils (1995)

FEBS Lett. 375:79-82

IF: 3,842

Káldi K., Szászi K., Koncz G., Suszták K. and Ligeti E.

Arachidonic acid activatable electrogenic H^+ transport in the absence of cytochrome b_{558} in human T lymphocytes (1996)

FEBS Lett. 381:156-160

IF: 3,750