

Válaszok Dr. Homolya László bírálatára

Hálás vagyok Dr. Homolya Lászlónak, hogy rendkívüli alapossággal értékelte és elismeréssel illette disszertációm. Kérdései a vizsgálatok és kísérleti rendszerek lényeges és kritikus pontjaira vonatkoznak, „együttgondolkodó”, a téma iránti érdeklődést kifejező észrevételei és megjegyzései igen megtisztelők számomra. Kérdéseire adott válaszaim a következők:

1) Mi a véleménye, hogy a foszforilált regulátoros fehérjéknél a foszforiláltság relatív szintje vagy a foszforilált (vagy éppen defoszforilált) fehérje abszolút mennyisége a meghatározó a downstream válaszokban? Milyen példával tudná alátámasztani a véleményét a *Neurospora crassa* óraműködése kapcsán?

A *Neurospora crassa* óráját szabályozó alapkivonensek közül a FRQ és a WCC foszforilációjának az oszcillátor szabályozásában betöltött szerepe került részletesebb jellemzésre. A WCC esetében végzett becsléseink arra utalnak, hogy a defoszforilált komplex abszolút mennyisége és nem aránya lehet meghatározó a transzkripciós aktivitás szempontjából (Schafmeier et al., 2005). Tekintettel arra, hogy a WC-2 foszforilációját tudtuk kétdimenziós gélen precízen elemezni, erre vonatkozó adataink vannak. A disszertáció 7.C ábrájának megfelelő kísérletben a WCC-et alacsony szinten, de döntően hipofoszforilált formában expresszálok *frq⁹*-es törzset hasonlítottuk össze a vadtypussal, amiben nagyobb a WC-2 teljes mennyisége, és ezen belül viszonylag nagy arányban vannak jelen a fehérje foszforilált formái. A *frq⁹*-es törzs funkcionálisan FRQ hiányos törzs, amelyben a *frq⁹* RNS mennyisége a WCC aktivitására utal. A WC-1-gyel komplexet alkotó WC-2 frakciót elemeztük a WC-1 elleni antitesttel végzett immunprecipitáció után. A kétdimenziós gél blotján, mint azt *in vitro* foszfatáz kezeléssel máshol bizonyítottuk, a bázikus (bal) oldalon elsőként megjelenő fehérje a nem foszforilált formának tekinthető. DD15 és DD25 időpontban végeztünk a nem foszforilált formára vonatkozó mennyiségi becslést, és mértük a WCC aktivitására utaló *frq* (ill. *frq⁹*) transzkripció mértékét. Eredményeink szerint a nem foszforilált WC-2 abszolút mennyisége arányos volt a transzkripciós aktivitással, függetlenül attól, hogy mekkora volt a WC-2 teljes mennyisége és azon belül a hipofoszforilált forma aránya.

A FRQ-kel kapcsolatban hasonló, közvetlen mérési adatról nem tudok. Közvetett adatok viszont arra utalnak, hogy a magban található hipofoszforilált fehérje abszolút mennyisége, és nem a teljes fehérjekészlethez viszonyított aránya határozza meg a szabályozásban való részvétel mértékét. Egy olyan munkáról van szó, amiben csak társszerzőként vettem részt, és ezért a disszertációban csak néhány adat szerepel belőle (Schafmeier et al., 2006), a kérdéshez kapcsolódó kísérlet nem. A kísérlethez a munkatársak egy olyan törzset használtak, amelyben a *frq* expresszióját a kinasavra érzékeny promóter szabályozza a *frq⁹*-es háttér mellett. Kinasav hozzáadását követően gyakori mintavétellel követhető volt a FRQ felhalmozódása és a transzkripcióra kifejtett gátló hatása. Annak ellenére, hogy a FRQ teljes mennyisége folyamatosan nőtt az indukciótól számítva, a magban a hipofoszforilált forma mennyisége csak

egy bizonyos szintig emelkedett, majd nagyjából állandó szinten stabilizálódott. Ezt a változást szorosan követte a *frq*⁹ RNS alakulása, szintje először csökkent, majd egyenletes maradt. A FRQ esetében tehát azt mondhatjuk, hogy a fehérje visszacsatolásban való aktivitása a magban lévő hipofoszforilált fehérje abszolút mennyiségével korrelál.

Érdekes a kérdéssel kapcsolatban azokat a viszonylag új eredményeket is megemlíteni, amik szerint bár a WC-1-ben 80, a FRQ-ben több mint 100 foszforilációs helyet sikerült kimutatni, ezek igen kis hányada esszenciális a ritmus generálása szempontjából (Diernfellner and Brunner, 2020; Wang et al., 2019). A FRQ-ben például egyes régiók megfelelő mértékű, de nem feltétlenül pontosan azonos helyeken történő foszforiláltsága előfeltétele a konformációs "fellazulásoknak", amik a további, funkcionális szempontból lényeges foszforilációkat lehetővé teszik, és ezért köthetők egyes funkciók bizonyos mértékű foszforiláltságához. Ugyanakkor sok olyan foszforilálódó aminosav is azonosításra került akár a FRQ-ben, akár a WC fehérjékben, amiknek alaninra történő cseréje semmilyen következménnyel nem jár.

2) Vajon mi lehet az oka, hogy a WC-2 feleslegben van a WC-1-hez képest? Lehet-e valamilyen puffer szerepe ennek a WC-2 rezervoárnak?

A *wc-2* expressziójának szabályozásáról egyelőre nincsen egészen pontos elképzelésünk, bár viszonylag régóta ismert, hogy transzkripcióját gátló módon befolyásolja a WCC (Cheng et al., 2003). Később, a *wc-2* promóterének részletes elemzése egy aktivátor és egy represszor régió szerepét azonosította. A modell szerint egy még nem karakterizált transzkripció aktivátor és a WCC szabályozása alatt álló represszor hatásának egyensúlya biztosíthatja a WC-2 viszonylag stabil expresszióját (Neiss et al., 2008).

Két munkacsoport eredményei szerint is a WC-2 minimum 5-szörös moláris mennyiségben van jelen a sejtben a WC-1-hez képest (Denault et al., 2001; Schafmeier et al., 2005). Ezek a vizsgálatok vagy sötét vagy állandó, mérsékelt fényben nőtt kultúrákon történtek. Elképzelhetőnek tartom, hogy a WC-2 feleslegnek szerepe lehet a WCC utánpótlás biztosításában például erős fényhatás esetén, amikor a nagymértékben megnövekvő WCC aktivitás a komplex intenzív bomlásával is jár. Míg a WC-1 kifejeződése fénnel indukálható, és így lépést tarthat az új szintézis a gyorsabb bomlással, addig a WC-2 esetében, aminek megjelenése fénytől független, ahogy a bíráló kérdése is utal rá, ez a felesleg működhet pufferként és biztosíthatja a fehérje utánpótlását a komplexben.

3) A 13.A ábrán bemutatott konidizációs ritmus fázis eltolódásában a vad típus esetében megjelenik egy váll, majd kétcsúcsúvá válik a görbe. Ez két különbözően viselkedő szubpopulációt jelent? Hogyan lehet ezt az eredményt értelmezni? Miért nem figyelhető meg ez a mutáns törzsben?

A jelenség hátterében valószínűleg a rövid fényhatás endogén ritmust maszkoló hatásáról van szó, ami jól ismert jelenség a cirkadián irodalomban, és különösen látványos lehet a futtató csöves vizsgálatokban (Remi et al., 2010; Roenneberg et al., 2005). A maszkoló hatás nem az endogén ritmus jele, hanem a környezeti hatásra adott direkt fényválasz lehet, ez okozhatja a konidizációs csúcsot megelőző vállképződést. A maszkoló hatás általában akkor válik erősebbé, amikor az endogén ritmus gyengül. Ez lehet az oka annak, hogy csak a 4. naptól látható a vállképződés az átlagolt denzitogrammon, ugyanis a cső vége felé a fokozatosan felszaporodó CO₂ konidizációt elnyomó hatása miatt sokszor látható a ritmus gyengülése, kevésbé kifejezetté válása. A maszkolás megjelenését az óra fázisa is befolyásolhatja, így a mutáns törzsben valószínűleg a vadtypusétól különböző (későbbi) fázis az oka annak, hogy a jelenség nem jelentkezik a cső vége felé sem. Technikailag a két törzs közötti fáziskülönbség megítélését a vállképződés nem zavarta.

4) A különböző WC-1 izoformák (pl. a WC-1-ORF) különböző méretű fehérjéket eredményezhetnek (14.C ábra), ez nem okozhat problémát a WC-1 foszforilációs fokának Western bloton történő, az elektroforetikus mobilitás különbségen alapuló vizsgálatában (9.A ábra)? Vajon a 9.A ábra nem tükrözheti a különböző izoformák relatív expressziójának változását?

A WC-1 foszforilációja jelentősen kisebb mobilitáskülönbséget okoz, mint amit az említett izoformák molekulatömeg különbségéből adódóan az SDS-gélen való eltolódás eredményez, így még egy hiperfoszforilált rövidebb izoforma sem keverhető össze egy hipofoszforilált teljes hosszúságú WC-1 jelével. Ennek ellenére egyetértek abban, hogy célszerű lett volna az izoformák bemutatásához egy nagyobb felbontású blotot mutatni a 14.C ábrán.

5) A RAS2-nek az óraműködésre gyakorolt hatásának vizsgálatánál megmutatta a cAMP szerepét, és az eredmények diszkussziójában a PKA szignalizációs útvonal fontosságát emeli ki. Van-e kísérleti bizonyíték arra, hogy a cAMP a PKA útvonalon továbbítja a jelet az endogén óra felé és nem más, cAMP-függő útvonalon, pl. az AMPK-n keresztül? Ez utóbbi azért is logikus feltételezés, mert így a glükóz-szinttel való összefüggéssel is összekapcsolható lenne.

*Neurospora crassa*ban még nem álltak rendelkezésre részletes adatok sem a glükóz érzékelésről, sem a RAS szignalizáció szerepéről, ezért a feltételezett hasonlóság miatt döntően az élesztőben leírtakra támaszkodtunk a kísérletek tervezésekor. Élesztőben a RAS útvonal aktivációjának egyik jellemző következménye a PKA aktivitás növekedése, a PKA-ról pedig ismert volt, hogy *Neurosporában* a molekuláris óra két alapelemtényezőjére, a FRQ-re és a WCC-re is hatással van, ezért tűnt különösen izgalmasnak az útvonal vizsgálata.

Bár élesztőben a cAMP szint befolyásolhatja az AMPK aktivitását, a hatás ismereteim szerint ebben az esetben is a PKA-n keresztül valósul meg (Shashkova et al., 2015). Az AMPK, bár különböző támadásponttal, de mind *Drosophilában*, mind emlős sejtekben hatással van a

molekuláris óra működésére (Cho et al., 2019; Lamia et al., 2009), ugyanakkor *Neurospora*-ban, bár az AMPK aktivitás itt is reagál a glükóz kínálatra, eddig nem írtak le órahatást. Mivel a tápanyag kínálat és az óraműködés kapcsolatának vizsgálata továbbra is munkacsoportunk egyik kutatási területe, a közelmúltban beszereztünk olyan genetikailag módosított *Neurospora* törzseket, amelyekben az AMPK egyik vagy másik regulátoros alegysége hiányzik. Bár a törzsek cirkadián működésének teljes vizsgálata még nem zárult le, eddig úgy tűnik, hogy az órakomponensek glükóz megvonásra adott válasza nem különbözik a kontrollétól, azaz az AMPK *Neurospora*-ban valószínűleg nem játszik fontos szerepet a cirkadián óra glükóz ellátottságtól függő szabályozásában.

6) A neutrofil granulociták vizsgálatakor rámutatott a CXCL12 kemokin szekréciójának, a CXCR4 receptor expressziójának és potenciálisan a kortizol szerepére. Lehet a melatoninnak is szerepe ebben?

A melatonin szerepéről a neutrofil granulociták érésének és aktivitásának szabályozásában egyelőre viszonylag kevés adat áll rendelkezésre, de egérmodellen mi is tervezünk olyan vizsgálatokat, amik a csontvelői sejtek melatonin receptor expressziójának vizsgálatára irányulnak különböző kezelések hatására. Különösen érdekes, hogy a csontvelőben megjelenő melatonin nemcsak a tobozmirigy terméke lehet, hanem helyben is termelődhet (Conti et al., 2000; Tan et al., 1999). Egérben, ahol őse- és progenitorsejtek nagyobb számban fordulnak elő a keringésben, a melatonin ezen sejtek csontvelőben való maradását segíti elő, míg a melatonin receptor antagonistá luzindole injektálásának hatására megnő a neutrofil granulociták és monociták csontvelőből való kiáramlása (Golan et al., 2018). Zebrahalban végzett vizsgálatok viszont arra utalnak, hogy melatonin hatására megnő az érett neutrofil granulociták migrációs készsége, nagyobb számban vándorolnak a sérülés helyére, ami valószínűleg összefügg a melatonin hatására megemelkedett TNF α és IL8 termeléssel (Ren et al., 2015). Az általunk tapasztalt sejtmegoszlás változás összefügg a melatonin csontvelőre kifejtett, egérmodellben leírt hatásával. A reggeli, nappali alacsony melatonin szint segítheti a csontvelőből a fiatal sejtek mobilizálását, így erősítheti a CXCL12 szint csökkenésének a hatását a csontvelői sejtészletre, és következményesen hozzájárulhat a *Cxcr4* expresszió csökkenéséhez a perifériás sejtészletben. Arra vonatkozó adatot sajnos nem ismerek, hogy a melatonin szint befolyásolná akár a CXCL12 termelését vagy a *Cxcr4* expresszióját.

7) Ezekben a vizsgálatokban leginkább egyidejűséget (vagy éppen ellenfázisú periodicitást) mutatott ki a különböző paraméterek között (pl. PER2 expresszió és CXCL12/CXCR4 szint között; vagy granuláltság és CXCL12/CXCR4 szint között). Mely eredmények támaszthatják alá az okozati összefüggést? Mivel a humán vizsgálatok az etikai szempontok miatt ilyen tekintetben korlátozottak, lehet-e ezeket az összefüggéseket állatmodellben vizsgálni?

Természetesen érdekes lenne annak részletesebb vizsgálata, hogy valóban a sejtek érése/öregedése okozza-e az óraműködés visszaszorulását, az óra komponensek RNS és fehérjeszintű kifejeződésének csökkenését. Egérmodell segítségével lehetséges ugyanabból az állatból származó csontvelői és keringő neutrofil granulocitákat preparálni, és azok óragén expresszióját (RNS és fehérje szinten), illetve annak időbeli mintázatát összehasonlítani. Feltételezve, hogy a csontvelői minta jelentősen nagyobb arányban tartalmaz éretlen sejteket, mint a vérminta, ez egy újabb, a disszertációban ismertetett vizsgálati körülményektől független lehetőség lenne a sejtek érettsége és az óraműködés változása közötti korreláció kimutatására.

Annak felderítéséhez, hogy milyen mechanizmussal vezethet a neutrofil sejtek érése/öregedése az óra komponensek megjelenésének változásához, az óra "downregulációjához", támpontként szolgálhat a különböző korú sejtpreparátumok (csontvelői/perifériás neutrofil preparátum vagy pl. kormarkerek szerint szétválasztott populációk) transzkriptom analízise. Elsősorban transzkripciót szabályozó faktorok, pl. transzkripciós represszorok eltérő expresszióját lenne érdemes elemezni a mintákban, ismert kötőhellyel rendelkező faktorok esetében pedig az óragén promóterekben esetleges kötőhelyeket lehetne keresni. Később természetesen szükség lenne további vizsgálatokra a promóterhez való in vivo kötődés igazolására.

Egy nemrégien megjelent közlemény egyésszt arra világít rá, hogy a neutrofil granulociták öregedését gyorsítja a CXCR2 receptor aktivációja a neutrofil sejtek által is termelt CXCL2 révén, másrészt úgy találja, hogy az óraműködés hiánya (neutrofil specifikus *Bmal1* génhiányos egerekben) a CXCL2 kifejeződés csökkenése következtében a neutrofil sejtek öregedésének/érésének mérséklődéséhez vezet (Adrover et al., 2019). Ezek alapján érdemes lenne csontvelőből preparált fiatal neutrofil sejteket sejtkultúrában tartani és vizsgálni, hogy különböző mértékű CXCL2 kezelés befolyásolja-e az óragének expresszióját. A CXCL2 által aktivált szignalizáció ugyanis egy regulációs útvonal lehetne a sejtek érésének és az óraműködés megváltozásának összekapcsolására.

Az oldalirányú fényszórást befolyásoló granuláltság, ami a neutrofil granulociták érésével csökken, és a sejtmembrán CXCR4 receptor sűrűsége közötti negatív összefüggést irodalmi adatok támasztják alá (Casanova-Acebes et al., 2013), de áramlási citometriás méréssel természetesen mind humán, mind egérből származó mintákon igazolható lenne.

Megjegyzések:

- 1. Elég sok (és néha fontos) adat szerepel, hogy "ábrán nem bemutatott" eredmény. Sokszor jó lett volna ezeket látni ábrán, bár valószínűleg az értekezés terjedelme ennek korlátot szab.**

Ahogy az Eredmények fejezet elején említettem, a megosztott első szerzős közlemények anyagából ábrákkal csak olyan eredményeket mutattam be, amikhez magam végeztem kísérletes munkát. A többi eredményt, ami a társszerzők munkájából származik, csak

szövegesen foglaltam össze, elsősorban azzal a céllal, hogy a kapott adatok a megfelelő kontextusban értelmezhetőek legyenek. Igyekeztem ezekben az esetekben is az információkat és a kísérlet lényegét úgy leírni, hogy a koncepció ábra hiányában is követhető legyen. Sajnálom, ha a fejezet elején nem sikerült egyértelművé tennem, miért választottam ezt a bemutatási megoldást.

2. Olykor egy bemutatott ábra egyik panelén lévő eredmények csak később kerülnek elő, visszautalás történik az ábrára (pl. 12.C ábra a 46. oldalon van tárgyalva). Ez valamelyest megnehezítette az olvasását.

Van olyan ábra, ábrarész, amire több utalás is történik a dolgozatban, ilyenkor ott helyeztem el az ábrát a dolgozatban, ahol a szövegben először írtam róla. A 12-es ábra az adott alfejezet első ábrája, ami egy összefoglaló ábra a WC-1 expressziójáról azokban a törzsekben, amiket a tanulmány során hoztam létre, és amikben a WC-1 kifejeződését nem a vad típusú promóter irányítja. Valóban kissé szerencsétlen megoldás volt, hogy két ilyen törzs ismertetése, a vizsgálatok logikus sorrendjének következtében, a szövegben csak több oldallal később található, és innen visszautalás történik az ábrára.

3. A "szint" kifejezés nem minden esetben világos, hogy RNS-re vagy fehérjére vonatkozik.

Igyekeztem az írásmóddal egyértelművé tenni, hogy RNS-ről vagy fehérjéről van-e szó. A *Neurospora* irodalmában alkalmazott szabály szerint jártam el, és ezt igyekeztem az emlős vizsgálatok leírásakor is következetesen tovább vinni. Amennyiben a génről, illetve RNS-ről volt szó, kicsi dőlt betűket használtam, míg ha fehérjéről, akkor csupa nagy álló betűt. Tekintettel arra, hogy az emlős gének jelölésénél az irodalomban inkább a nagy betűs kezdés terjedt el, itt én is ezt alkalmaztam. Belátom, hogy jobb lett volna a dolgozat elején röviden leírnom ezt a jelölési szabályt vagy a szövegben külön jelölni, hogy minek a szintjéről van szó. Reményeim szerint azáltal, hogy az ábrafeliratok mindig részletesen utaltak a mérés módjára, összességében követhető volt, hogy RNS vagy fehérje szintekről volt-e szó az adott vizsgálatban.

Ismételten megköszönöm Dr. Homolya Lászlónak a munkám iránti érdeklődését, elgondolkodtató kérdéseit és megjegyzéseit, valamint az értekezés elfogadását támogató meleg szavait. Bízom benne, hogy a kérdésekre adott válaszaimat megfelelőnek találja.

Budapest, 2021. július 27.

Dr. Káldi Krisztina

Irodalomjegyzék

- Adrover, J.M., Del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M.I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L.A., Huerga-Encabo, H., Silvestre-Roig, C., Rossaint, J., Cossio, I., *et al.* (2019). A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity* 51, 966-967.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L.A., Nombela-Arrieta, C., Chevre, R., N, A.G., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L.E., *et al.* (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. *Cell* 153, 1025-1035.
- Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., He, Q., and Liu, Y. (2003). WHITE COLLAR-1, a multifunctional neurospora protein involved in the circadian feedback loops, light sensing, and transcription repression of *wc-2*. *J Biol Chem* 278, 3801-3808.
- Cho, E., Kwon, M., Jung, J., Kang, D.H., Jin, S., Choi, S.E., Kang, Y., and Kim, E.Y. (2019). AMP-Activated Protein Kinase Regulates Circadian Rhythm by Affecting CLOCK in *Drosophila*. *J Neurosci* 39, 3537-3550.
- Conti, A., Conconi, S., Hertens, E., Skwarlo-Sonta, K., Markowska, M., and Maestroni, J.M. (2000). Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 28, 193-202.
- Denault, D.L., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2001). WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J* 20, 109-117.
- Diernfellner, A.C.R., and Brunner, M. (2020). Phosphorylation Timers in the *Neurospora crassa* Circadian Clock. *J Mol Biol* 432, 3449-3465.
- Golan, K., Kumari, A., Kollet, O., Khatib-Massalha, E., Subramaniam, M.D., Ferreira, Z.S., Avemaria, F., Rzeszotek, S., Garcia-Garcia, A., Xie, S., *et al.* (2018). Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell* 23, 572-585 e577.
- Lamia, K.A., Sachdeva, U.M., DiTacchio, L., Williams, E.C., Alvarez, J.G., Egan, D.F., Vasquez, D.S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R.J., *et al.* (2009). AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science (New York, N.Y.)* 326, 437-440.
- Neiss, A., Schafmeier, T., and Brunner, M. (2008). Transcriptional regulation and function of the *Neurospora* clock gene white collar 2 and its isoforms. *EMBO Rep* 9, 788-794.
- Remi, J., Merrow, M., and Roenneberg, T. (2010). A circadian surface of entrainment: varying T, tau, and photoperiod in *Neurospora crassa*. *Journal of biological rhythms* 25, 318-328.
- Ren, D.L., Li, Y.J., Hu, B.B., Wang, H., and Hu, B. (2015). Melatonin regulates the rhythmic migration of neutrophils in live zebrafish. *J Pineal Res* 58, 452-460.
- Roenneberg, T., Dragovic, Z., and Merrow, M. (2005). Demasking biological oscillators: properties and principles of entrainment exemplified by the *Neurospora* circadian clock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7742-7747.
- Schafmeier, T., Haase, A., Kaldi, K., Scholz, J., Fuchs, M., and Brunner, M. (2005). Transcriptional feedback of *Neurospora* circadian clock gene by phosphorylation-dependent inactivation of its transcription factor. *Cell* 122, 235-246.
- Schafmeier, T., Kaldi, K., Diernfellner, A., Mohr, C., and Brunner, M. (2006). Phosphorylation-dependent maturation of *Neurospora* circadian clock protein from a nuclear repressor toward a cytoplasmic activator. *Genes Dev* 20, 297-306.
- Shashkova, S., Welkenhuysen, N., and Hohmann, S. (2015). Molecular communication: crosstalk between the Snf1 and other signaling pathways. *FEMS Yeast Res* 15, fov026.

Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W.B., Zhang, M., Weintraub, S.T., Cabrera, J., Sainz, R.M., and Mayo, J.C. (1999). Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochim Biophys Acta* 1472, 206-214.

Wang, B., Kettenbach, A.N., Zhou, X., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2019). The Phospho-Code Determining Circadian Feedback Loop Closure and Output in *Neurospora*. *Mol Cell* 74, 771-784 e773.