

Válaszok Dr. Juhász Gábor bírálatára

Nagyon köszönöm Juhász Gábor professzor úrnak értekezésem alapos tanulmányozását, jószándékú kritikáját, és a vizsgálati eredményekhez kapcsolódó, de azokon egyben túlmutató és új szempontokat is felvető kérdéseit.

A megjegyzésekkel egyetértek. Valóban szerencsés lett volna az FRH doménstruktúráját is bemutatni, s ezzel teljessé tenni a visszacsatolásban résztvevő alaponensek szerkezeti ismertetését. Eredeti elgondolásom az volt, hogy a bevezető fejezetben csak azoknak az óraféhrjéknek a sematikus ábráját mutatom, amelyekkel a kísérletes munka leírása kapcsán is találkozhat majd az olvasó. A 2017-es Nobel díj kronobiológusoknak való odaítélése óriási elismerést jelentett a tudományterületnek, ezzel kapcsolatban munkatársammal, Dr. Ella Krisztinával írtunk is a Biokémia folyóiratban egy összefoglalót (XLI. évfolyam, 4. szám). Az értekezés bevezetőjében valóban csak egy rövid bekezdést szenteltem a Nobel díjas kutatások bemutatásának. Ennek oka részben az volt, hogy a részletesebb leíráshoz egy újabb, a saját kísérletes munkámban nem alkalmazott modell, az *ecetmuslica* órájának terminológiáját is be kellett volna vezetni.

A kérdésekre a következő válaszokat adom:

- 1. A korai stop kodont hordozó frq^9 allél egy nagyon hasznos eszköznek bizonyult több kulcskísérletben, mivel mutáns háttéren is vizsgálhatóvá tette a géntermék mennyiségét. Kérdésem, hogy vajon a korai stop kodonok esetén bekapcsoló NMD (nonsense-mediated mRNA decay) útvonal ebben az esetben is megfigyelhető volt-e, illetve befolyásolhatta-e az eredményeket?**

Irodalmi adatok szerint a frq^9 és a frq RNS transzkripciót gátló thiolutin jelenlétében mért bomlási sebessége megegyezik (Lauinger et al., 2014), azaz úgy tűnik, hogy a kétféle RNS stabilitásában nincsen különbség.

Más adatok is arra utalnak, hogy nem az RNS szint szabályozásában rejlik a frq^9 és a vad típus közötti különbség. A frq^9 törzset a *band* törzs mutagenézise révén sikerült izolálni, 1986-ban írták le (Loros and Feldman, 1986). 1994-ben hozták létre a frq^{10} törzset (Aronson et al., 1994), amiben a frq gént hygromycin-kazetta helyettesíti. Mivel a frq^9 viselkedése (csökkent konidiumképzés, stabil ritmus hiánya, hőmérséklet kompenzáció hiánya) ehhez a törzshöz teljesen hasonlóan bizonyult, elfogadottá vált, hogy a frq^9 funkcionális szempontból FRQ hiányosnak tekinthető. Western bloton egyébként a FRQ N-terminális közeli régióját felismerő monoklonális antitest halványan jelöli ezt a rövidebb FRQ fehérjét, a FRQ⁹-et. A fehérje azonban nem képez komplexet az FRH-val, az alacsony FRQ⁹ fehérje szintet az FRH stabilizáló hatásának hiányával magyarázzák (Guo et al., 2009).

Ugyanakkor érdemes a témával kapcsolatban megemlíteni, hogy az NMD komponens UPF1 fontos szabályozója a *Neurospora* órának, ugyanis részt vesz a frq RNS-t módosító splicing folyamatában. A faktor ritmust szabályozó szerepének jelentőségét jól mutatja, hogy a *upf1*^{KO}

Neurospora törzs periódusa több mint 4 órával rövidebb, mint a vad típusé (Wu et al., 2017).

2. A szociális jetlag vizsgálatok kapcsán érdekel, hogy a késői kronotípusok („baglyok”) esetén megfigyelt egyéni HRV változások vajon mennyivel növelhetik a kardiovaszkuláris és egyéb betegségek előfordulási gyakoriságát körükben?

A kérdés precíz megválaszolásához sokkal több, hosszú időtartamra kiterjedő követéses vizsgálat adataira lenne szükség, mint ami jelenleg az irodalomban rendelkezésre áll, ezért csak részleges választ tudok adni. Hillebrand és munkatársai 8 tanulmány alapján készült (összesen 21 988 vizsgált alany adatait figyelembe vevő) metaanalízisének eredményeiből indulhatunk ki (Hillebrand et al., 2013). A vizsgálat egyik fő megállapítása, hogy amennyiben kardiovaszkuláris szempontból egészségesnek tekinthető alanyokon belül alacsony vagy magas HRV-jű csoportot különböztettek meg, az alacsony HRV-jű csoportban 32-45 %-kal magasabb volt a kockázata annak, hogy 3,5-15 éven belül valamilyen kardiovaszkuláris esemény (pl. aritmia, mellkásfájdalom, agyvérzés, infarktus) lép föl. Természetesen ezek az értékek egy az egyben nem vihetők át a mi mintánkra, hiszen abban csak fiatal férfiak szerepeltek, a metaanalízis pedig szélesebb kortartomány csoportra vonatkozott, és egy kivétellel a mintákban nők is voltak. Ezen kívül a HRV kalkuláció a metanalízisben összefoglalt esetek egy részében rövid mérés (10 s - 3 min) alapján történt. A tanulmány másik következtetése szerint az SDNN 1%-kal való növekedése 1%-kal csökkenti a kardiovaszkuláris megbetegedés kialakulásának kockázatát. Ez az adat összekapcsolva az általunk tett megállapításokkal is arra hívja fel a figyelmet, hogy amennyiben az adott egyénben az alvás időzítésének megváltoztatásával előnyösen befolyásolható a HRV, mindenképpen érdemes erre törekedni, hiszen csökkenthető lehet a kardiovaszkuláris betegség kialakulásának valószínűsége.

A HRV adatok analízisére alkalmas mobil eszközök az utóbbi években egyre jobban terjednek a laikusok körében is, és bár egyelőre kevés a tudományos vizsgálatra alkalmas, validált és könnyen hozzáférhető műszer, a helyzet valószínűleg rohamosan változni fog, ami lehetőséget adhat nagy számban való adatgyűjtésre és ehhez kapcsolódóan követéses vizsgálatok elvégzésére is.

Végezetül ismét megköszönöm Professzor úrnak támogató opponensi bírálatát, munkám iránti érdeklődését, és bízom benne, hogy a kérdéseire adott válaszaimat megfelelőnek találja.

Budapest, 2021. július 27.

Dr. Káldi Krisztina

Irodalomjegyzék

Aronson, B.D., Johnson, K.A., and Dunlap, J.C. (1994). 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* *91*, 7683-7687.

Guo, J., Cheng, P., Yuan, H., and Liu, Y. (2009). The exosome regulates circadian gene expression in a posttranscriptional negative feedback loop. *Cell* *138*, 1236-1246.

Hillebrand, S., Gast, K.B., de Mutsert, R., Swenne, C.A., Jukema, J.W., Middeldorp, S., Rosendaal, F.R., and Dekkers, O.M. (2013). Heart rate variability and first cardiovascular event in populations without known cardiovascular disease: meta-analysis and dose-response meta-regression. *Europace* *15*, 742-749.

Lauinger, L., Diernfellner, A., Falk, S., and Brunner, M. (2014). The RNA helicase FRH is an ATP-dependent regulator of CK1a in the circadian clock of *Neurospora crassa*. *Nat Commun* *5*, 3598.

Loros, J.J., and Feldman, J.F. (1986). Loss of temperature compensation of circadian period length in the *frq-9* mutant of *Neurospora crassa*. *Journal of biological rhythms* *1*, 187-198.

Wu, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Yu, J., Wang, P., Ma, H., Chen, S., Ma, L., Zhang, D., He, Q., *et al.* (2017). Up-Frameshift Protein UPF1 Regulates *Neurospora crassa* Circadian and Diurnal Growth Rhythms. *Genetics* *206*, 1881-1893.