

BÍRÁLAT

Káldi Krisztina “A cirkadián ritmus sejt- és szervezetszintű vizsgálata” című MTA doktori értekezéséről

Nagy örömmel szolgált, amikor felkérést kaptam Káldi Krisztina az MTA doktori cím elnyerésére benyújtott értekezésének bírálatára, mivel a jelöltet régóta ismerem, és munkásságát évek óta figyelemmel kísérhettem különböző konferenciákon tartott előadásain keresztül. A disszertáció egy olyan, a kívülálló számára is érdekes kutatási területtel foglalkozik, amely a mindennapjainkat alapvetően meghatározza: a napi ritmust szabályozó belső órával, illetve annak a külső (fény, tápanyag, szociális) ingerekkel való kapcsolódásával. A dolgozat alapvető értékének tartom, hogy a molekuláris szintű szabályozóktól kiindulva a sejt-, szöveti, szervezeti szintű elemeken keresztül egészen a szociális vetületeket is érintve taglalja a kérdéskört.

A benyújtott disszertáció egy hagyományos szerkezetű, 150 oldal terjedelmű értekezés, melynek alapját 13 db neves, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemény adja (közte két Cell, egy EMBO Reports és egy Genes & Development cikkel), melyeknek összesített impakt faktora 126,5. A jelölt - a Ph.D. fokozat megszerzését követő időszakát tekintve - további 13 közleménynek szerzője, melyeknek az eredményeit nem fűzte bele a jelen értekezésbe. Fontosnak tartom kiemelni, hogy a benyújtott disszertáció egy rendkívül letisztult logikával felépülő (probléma felvetésekkel induló és konklúziókkal záródó alfejezetekből álló), igen igényesen megírt mű. Szerkezetét tekintve a 15 oldalas bevezetést követi a kétoldalas „Célkitűzések” fejezet, majd egy viszonylag rövid, 6 oldal terjedelmű metodikai rész következik. A jelölt ezután 91 oldalon 11 táblázattal és 51 ábrával illusztrálva mutatja be részletesen a kísérleti eredményeit két nagyobb fejezetben, külön tárgyalva a *Neurospora crassa* modellszervezetben végzett elemzéseket, illetve a humán óraműködéssel kapcsolatos vizsgálatokat. Mindegyik alfejezet, amely egy vagy két közlemény eredményeit ismerteti, egy diszkussziós résszel zárul. Ez a szerkezet kifejezetten olvasmányossá teszi az értekezést. Érdeemes a dolgozat erényeként azt is kiemelni, hogy a diszkussziós fejezetekben a jelölt általában kitér a bemutatott eredmények korlátainak tárgyalására is. Az értekezés végül a legfőbb eredmények 2 oldalon történő összegzésével, irodalomjegyzékkel, valamint

köszönetnyilvánítással zárul. A benyújtott dolgozat formailag megfelel az MTA doktori értekezéssel szemben támasztott követelményeknek, melyet már korábban részletesen megvizsgáltak és megfelelőnek találtak.

Káldi Krisztina az MTA doktori cím elnyerésére benyújtott értekezésében a következőket tartom új eredménynek:

- 1.) A *Neurospora crassa* modellszervezetben a jelölt részletesen feltérképezte a cirkadián óra legfontosabb szabályozó elemeinek: a pozitív visszacsatolást biztosító WCC-nek és a negatív visszacsatolásért felelős FRQ kapcsolódási pontjait. Megmutatta a WCC transzkripció faktor foszforilációs állapotának jelentőségét a target gének – többek között az *frq* – transzkripciójában; az FRQ-nak és a PP2A foszfatáznak a WCC foszforilációs állapotára gyakorolt hatását; valamint a WCC limitáló komponensének, a WC-1 transzkripció szintű szabályozását és ennek a kimentí ritmus fázisában betöltött szerepét. Feltárta a környezeti fényinger az óra működésére gyakorolt hatásának, a fényadaptációnak a molekuláris alapjait: a WCC-nek – mint fényreceptornak – a fényingerre bekövetkező dimerizációjának jelentőségét, valamint egy másik fényreceptornak, a VVD-nek a WCC-vel történő heterodimerizációját és az előbbinek „zajszűrő” funkcióját.
- 2.) Feltérképezte, hogy a reaktív oxigén gyökök (ROS) szintje milyen molekuláris mechanizmus révén képes hatást gyakorolni az endogén óra működésére. E tekintetben a szuperoxid dizmutáz-1 (SOD-1) enzim és az általa befolyásolt O_2^- szint bizonyult meghatározó jelentőségűnek, valamint a ROS szint $\rightarrow$ PP2A aktiválás $\rightarrow$ WCC defoszforiláció és aktiválás szabályozó folyamat körvonalazódott a mechanizmus hátterében.
- 3.) A metabolizmus és cirkadián óra kapcsolódását vizsgálva a jelölt megmutatta a RAS2 kis G-fehérje jelentőségét az óraműködés stabilitásának biztosításában, valamint ennek hátterében meghúzódó molekuláris mechanizmust: a RAS2 hatással van az FRQ mennyiségére, foszforilációjára és lokalizációjára, valamint az adenilát-cikláz révén a cAMP szinten keresztül befolyásolja az óraműködést.
- 4.) Az óraműködést humán rendszerben vizsgálva megállapította, hogy a periférián keringő neutrofil granulocitákkal kapcsolatban megfigyelt cirkadián ingadozás alapvetően nem a sejtek belső órájából fakad, hanem azt külső faktorok okozzák. Ennek kapcsán kimutatta a CXCL12 kemokin és annak receptorának, a CXCR4 napszaki változásának fontosságát.

- 5.) A humán vizsgálatok kapcsán feltárta a szociális jetlag negatív hatását a tanulmányi teljesítményre, a szívritmus variabilitásra (HRV) és az alvásminőségre.

A fent felsoroltakat mind új és jelentős tudományos eredményeknek ítélem.

Az értekezéssel kapcsolatos kérdéseim a következők:

- 1.) Mi a véleménye, hogy a foszforilált regulátoros fehérjéknél a foszforiláltság relatív szintje vagy a foszforilált (vagy éppen a defoszforilált) fehérje abszolút mennyisége a meghatározó a downstream válaszokban? Milyen példával tudná alátámasztani véleményét a *Neurospora crassa* molekuláris óraműködése kapcsán?
- 2.) Vajon mi lehet az oka, hogy a WC-2 feleslegben van a WC-1-hez képest? Lehet-e valamiféle puffer szerepe ennek a WC-2 rezervoárnak?
- 3.) A 13.A ábrán bemutatott konidizációs ritmus fázis eltolódásában a vadtípus esetében megjelenik egy váll, majd kétsúcsúvá válik a görbe. Ez két különbözően viselkedő szubpopulációt jelent? Hogyan lehet ezt az eredményt értelmezni? Miért nem figyelhető meg ez a mutáns törzsben?
- 4.) A különböző WC-1 izoformák (pl. a wc-1-ORF) különböző méretű fehérjét eredményez (14.C ábra), ez nem okozhat problémát a WC-1 foszforiláltsági fokának Western bloton történő, az elektroforetikus mobilitás különbségén alapuló vizsgálatában (9.A ábra)? Vajon a 9A ábra nem tükrözheti a különböző izoformák relatív expressziójának változását?
- 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 vonatkozóan, 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.
- 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?
- 7.) Ezekben a vizsgálatokban leginkább egyidejűséget (vagy éppen ellenfázisú periodicitást) mutatott ki a különböző paraméterek között (pl. PER2 expresszió és CXCL12 szint/CXCR4 szint között; vagy granuláltság és CXCL12 szint /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?

Hangsúlyozva, hogy a disszertáció rendkívüli igényességgel van megírva, nagyon jól követhető, tiszta logikájú és olvasmányos, pár apróbb kritikai észrevételem is lenne a szerkesztéssel kapcsolatban:

- 1.) Elég sok (és néha fontos) adat úgy szerepel, hogy „ábrán nem bemutatott” eredmény. Sokszor jó lett volna ezeket látni ábrán, bár valószínűleg az értekezés terjedelme ennek korlátot szab.
- 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 olvasást.
- 3.) A „szint” kifejezés nem minden esetben volt világos, hogy RNS-re vagy fehérjére vonatkozik.

Véleményemet összefoglalva, Káldi Krisztina elért eredményeit és tudományos teljesítményét messzemenőig elismerem, a disszertáció alapját képező publikációk minősége és mennyisége magukért beszélnek. Ezek alapján a dolgozat nyilvános vitára bocsátását és a jelölt számára az MTA doktori fokozat odaítélését teljes mértékben támogatom.

Budapest, 2021. április 22.



Homolya László
az MTA doktora