



Università degli Studi della Calabria

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE
(XIX CICLO)**

**Regolazione dell'Orologio Circadiano nei
Mammiferi mediante SUMOylazione
dell'Attivatore Trascrizionale BMAL1**

Dott.ssa Francesca Giordano

Francesca Giordano

Tutor UNICAL

Prof. ssa Maria Luisa Panno

Maria Luisa Panno

Tutor IGBMC

Prof. Paolo Sassone-Corsi

Paolo Sassone-Corsi

Coordinatore del Dottorato

Ch.mo Prof. Bruno Tota

Bruno Tota

Co-Tutor IGBMC

Dott. Luca Cardone

Luca Cardone

Codice materia: MED04

Anno Accademico 2005-2006

Indice

ABSTRACT	4
SOMMARIO	5
INTRODUZIONE	6
CAPITOLO I: Regolazione del clock circadiano	9
I.1. Proprietà strutturali e funzionali dei fattori di trascrizione che controllano il clock circadiano	19
- Le proteineCLOCK e BMAL1	19
- Le proteine CRY	21
- Le proteine PERIOD	22
I.2.- Mutazioni nei geni del clock dei mammiferi	25
CAPITOLO II: Modificazioni post-traduzionali: SUMOylazione	28
II.1.- Enzimi coinvolti nella coniugazione e deconiugazione di SUMO.....	31
II.2.- Ruoli biologici della SUMOylazione	35

- Ruolo di SUMO nella traslocazione delle proteine.....	36
- Ruolo di SUMO nella formazione della struttura subnucleare	37
- SUMO-1 ed i membri NF-kB/IkB	39
- Meccanismi di regolazione trascrizionale SUMO-dipendenti	41
MATERIALI E METODI	43
- Analisi dei siti consenso per SUMO	43
- Topi, colture cellulari, trasfezioni ed esperimenti di shock da siero	43
- Plasmidi e reagenti	44
- Anticorpi	44
- Estratti proteici, Immunoprecipitazioni e Western blotting	45
- Saggio di clivaggio delle proteasi SUMO-specifiche	46
- Quantitative Real time PCR (RT-PCR)	46
- Infezione retrovirale delle cellule NIH3T3 e MEF	46
- Reazione di SUMOylazione <i>in vivo</i>	47
RISULTATI E DISCUSSIONE	48
- La proteina mBMAL1 è modificata da SUMO1 <i>in vivo</i>	48
- La SUMOylazione di BMAL1 <i>in vivo</i> è regolata in modo circadiano	52
- La proteina CLOCK induce la SUMOylazione di BMAL1 <i>in vivo</i>	57
- La SUMOylazione di BMAL1 controlla l'orologio circadiano	61
- Figure supplementari	68
BIBLIOGRAFIA	78

Abstract

The molecular machinery that governs circadian rhythmicity is based on clock proteins organized in regulatory feedback loops. Although posttranslational modification of clock proteins is likely to finely control their circadian functions, only limited information is available to date. Here, we show that BMAL1, an essential transcription factor component of the clock mechanism, is SUMOylated on a highly conserved lysine residue (Lys²⁵⁹) *in vivo*. BMAL1 shows a circadian pattern of SUMOylation that parallels its activation in the mouse liver. SUMOylation of BMAL1 requires and is induced by CLOCK, the heterodimerization partner of BMAL1. Ectopic expression of a SUMO-deficient BMAL1 demonstrates that SUMOylation plays an important role in BMAL1 circadian expression and clock rhythmicity. This reveals an additional level of regulation within the core mechanism of the circadian clock.

Sommario

Molti processi fisiologici e comportamentali di quasi tutti gli organismi viventi presentano ritmi circadiani con oscillazioni periodiche di 24 ore. Questi ritmi sono generati in maniera endogena da un orologio biologico che funziona sotto controllo genetico.

Da un punto di vista molecolare l'orologio circadiano è costituito dai cosiddetti "geni dell'orologio". L'oscillazione periodica di questi geni e dei loro prodotti proteici rappresenta il meccanismo attraverso il quale le cellule codificano la progressione circadiana del tempo.

La generazione e la modulazione di tali oscillazioni è finemente controllata a livello trascrizionale, mediante fasi di attivazione e repressione di trascrizione, interconnesse tra loro e generanti un meccanismo di feedback negativo in grado di autoregolarsi durante le 24 ore.

In aggiunta, l'oscillazione circadiana delle proteine dell'orologio dipende da livelli di regolazione post-trascrizionali e post-traduzionali, che controllano l'espressione dei geni dell'orologio, la stabilità, l'interazione con altre proteine regolatrici e la localizzazione intracellulare delle proteine.

In questo lavoro di tesi, dimostriamo che la proteina BMAL1 (Brain and Muscle Arant-like protein 1), essenziale componente dell'orologio, è post-traduzionalmente modificato dal peptide SUMO (Small Ubiquitin-related Modifier protein). Il residuo di lisina, situato in posizione 259, costituisce il sito accettore della proteina SUMO. *In vivo*, BMAL1 mostra una regolazione circadiana della SUMOylazione. I nostri dati mostrano che la SUMOylazione di BMAL1 è indotta dal fattore trascrizionale CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) e che la SUMOylazione svolge un importante ruolo nell'espressione circadiana di BMAL1, nonché nel funzionamento dell'orologio circadiano a livello cellulare.

Introduzione

Molti processi fisiologici e comportamentali di quasi tutti gli organismi viventi presentano ritmi circadiani con oscillazioni periodiche di 24 ore. Questi ritmi sono generati in maniera endogena da un orologio biologico che funziona sotto controllo genetico.

I ritmi circadiani sono essenzialmente regolati da tre componenti:

- gli stimoli ambientali che programmano l'orologio circadiano (detti anche Inputs circadiani);
- l'orologio circadiano o "clock", in grado di fungere da pacemaker molecolare;
- l'insieme dei processi fisiologici e comportamentali che sono regolati secondo ritmi circadiani e che rappresentano pertanto gli "outputs circadiani" (Cermakian N. et al., 2000).

Tali ritmi circadiani persistono persino durante condizioni ambientali particolari o in assenza di inputs circadiani, grazie al controllo dell'orologio molecolare ed alle sue caratteristiche di "pacemaker".

Nei mammiferi, il principale orologio circadiano, perciò detto "Master Clock", risiede nel nucleo Soprachiasmatico (SCN), alla base dell'ipotalamo, anche se recentemente orologi circadiani sono stati ritrovati in molti tessuti non neuronali. Il master clock nel SCN sincronizza molti «clock» periferici, che funzionano in differenti tessuti, presumibilmente attraverso la combinazione di segnali neuronali ed umorali (Hastings M.H., 1997; Moore R.Y. & Silver R., 1998).

Il meccanismo molecolare che costituisce l'orologio circadiano è fondamentalmente conservato in tutti gli organismi viventi sensibili alla luce. Gli "ingranaggi" dell'orologio sono costituiti da fattori trascrizionali detti "geni dell'orologio", appartenenti alla famiglia dei fattori di trascrizione (bHLH)-PAS (basic Helix-Loop-Helix) (Period-ArnSingle-Minded), che includono le proteine PERIOD (PER1, PER2, PER3), CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycle Kaput) e BMAL

(Brain and Muscle ArnL-Like protein) ed alla famiglia delle proteine del riparo del DNA attivate da fotoni (fotoliasi) ed alla famiglia dei criptocromi, (proteine CRY1 e CRY2) (Hirayama J. et al., 2005).

L'oscillazione periodica di questi geni e dei loro prodotti proteici rappresenta il meccanismo attraverso il quale le cellule codificano la progressione circadiana del tempo.

La generazione e la modulazione di tali oscillazioni è finemente controllata a livello trascrizionale, mediante fasi di attivazione e repressione di trascrizione, interconnesse tra loro e generanti un meccanismo di feedback negativo in grado di autoregolarsi durante le 24 ore.

Le proteine CLOCK e BMAL1, costituiscono un anello fondamentale nel mantenimento dei cicli circadiani di trascrizione. Specificatamente, tali proteine formano degli eterodimeri, dei complessi attivi trascrizionalmente che si legano ed attivano i promotori di altri geni, che controllano l'orologio, come *Period* e *Cryptochrome*. A loro volta, le proteine PER e CRY, una volta tradotte, formano un complesso che trasloca nel nucleo in maniera tale da inibire la trascrizione mediata dall'eterodimero CLOCK:BMAL1, attraverso un'interazione diretta proteina-proteina (Cermakian N. et al., 2000).

Inoltre, è importante sottolineare che l'eterodimero CLOCK:BMAL1 è in grado di stimolare la trascrizione di altri geni controllati dal clock centrale (ccgs), che, a loro volta, influenzano funzioni esterne al meccanismo oscillatorio stesso e mediano l'output del clock.

Questo è importante per la ritmicità circadiana di molti processi fisiologici, come l'intake del cibo, la sintesi ed il rilascio ormonale, il mantenimento della temperatura corporea ed altri aspetti del metabolismo (Gekakis N. et al., 1998; Jin X. et al., 1999; Ripperger J.A. et al., 2000).

In aggiunta ai feedback trascrizionali positivi e negativi, l'orologio circadiano è regolato da meccanismi supplementari. Questi includono

regolazione post-trascrizionale (Kojima S. et al., 2003; Baggs J.E. et al., 2003), modificazioni post-traduzionali (Lee C. et al., 2001), rimodellamento della cromatina (Etchegaray J.P. et al., 2003; Crosio C. et al., 2000), disponibilità e stabilità delle proteine del “clock” (Yagita K. et al., 2002; Akashi M. et al., 2002) e regolazione della loro localizzazione intracellulare (Lee C. et al., 2001; Yagita K. et al., 2002; Akashi M. et al., 2002; Kondratov R.V. et al., 2003).

Le modificazioni post-traduzionali delle proteine del clock comprendono l’ubiquitinazione, l’acetilazione, la fosforilazione e la SUMOylazione.

La SUMOylazione è una modificazione basata sul legame covalente della proteina SUMO (Small Ubiqutin-related MOdifier protein) a residui aminoacidici di lisina. Tale modificazione è reversibile ed è controllata da un pathway enzimatico simile a quello dell’ubiquitinazione (Gill G., 2003; Muller S. et al., 2001; Gill G., 2004). La SUMOylazione dei fattori di trascrizione può regolarne l’attività trascrizionale, la localizzazione cellulare e sub-nucleare e la stabilità. (Gill G., 2004; Desterro J.M. et al., 1998; Matunis M.J. et al., 1998; Salinas S. et al., 2004). La SUMOylazione è resa reversibile da proteasi SUMO-specifiche, come l’enzima ULP1 (Ubiqutin-Like Protein Processing 1) nel lievito e la proteasi SENP1 (SENtrin Protease) nei mammiferi (Li S.J. et al., 1999; Bailey D. et al., 2004).

Dato che la SUMOylazione ha una notevole importanza nel controllo dell’espressione genica, nel nostro lavoro di tesi abbiamo investigato il suo possibile coinvolgimento nella regolazione dell’attività trascrizionale delle proteine che compongono l’orologio circadiano. Lo scopo della tesi è stato quello di investigare se i fattori trascrizionali dell’orologio fossero covalentemente modificati dal peptide SUMO, la sua regolazione *in vivo* e l’eventuale ruolo funzionale nel mantenimento dell’attività circadiana di tali proteine.

Capitolo I. Regolazione del clock circadiano

La maggior parte degli organismi viventi hanno degli orologi endogeni, che permettono loro di adattarsi alle condizioni ambientali cicliche, come ad esempio variazioni giorno/notte, variazioni annuali della luce e della temperatura (Menaker M. et al., 1997). I ritmi circadiani sono delle oscillazioni dei parametri fisiologici, che presentano un ciclo con un periodo di lunghezza di circa 24 ore (dal latino “circa diem”).

Il sistema circadiano è responsabile della regolazione di un’ampia varietà di ritmi fisiologici e comportamentali (Lowrey P.L. et al., 2004; Reppert S.M. et al., 2002).

In particolare, i ritmi circadiani sono regolati da tre componenti:

- gli stimoli ambientali che programmano l’orologio circadiano (detti anche Inputs circadiani);
- l’orologio circadiano o “clock”, in grado di fungere da pacemaker molecolare;
- l’insieme dei processi fisiologici e comportamentali che sono regolati secondo ritmi circadiani e che rappresentano pertanto gli “outputs circadiani”.

Tali ritmi circadiani persistono persino durante condizioni ambientali particolari o in assenza di inputs circadiani, grazie al controllo dell’orologio molecolare ed alle sue caratteristiche di “pacemaker”.

Nei mammiferi, il principale orologio circadiano, perciò detto “Master Clock”, risiede nel nucleo Soprachiasmatico (SCN), (Hastings M.H., 1997; Moore R.Y. & Silver R., 1998) alla base dell’Ipotalamo, anche se recentemente orologi circadiani sono stati ritrovati in molti tessuti non neuronali. Il meccanismo del clock nel SCN e nei tessuti periferici è stato dimostrato essere simile a livello molecolare (Balsalobre A. et al., 2000; Nagoshi E. et al., 2004; Welsh D.K. et al., 2004; Brown S.A. et al., 2005).

Il master clock nel SCN sincronizza molti “clocks” periferici, che funzionano in differenti tessuti, presumibilmente attraverso la combinazione di segnali neuronali ed umorali (Yamazaki S. et al., 2000; Yoo S.H. et al., 2004).

Il meccanismo molecolare che costituisce l’orologio circadiano è fondamentalmente conservato in tutti gli organismi viventi sensibili alla luce. Gli “ingranaggi” dell’orologio sono costituiti da fattori trascrizionali detti “geni dell’orologio”. L’oscillazione periodica di questi geni e dei loro prodotti proteici rappresenta il meccanismo attraverso il quale le cellule codificano la progressione circadiana del tempo (Ko C.H. et al., 2006).

La generazione e la modulazione di tali oscillazioni è finemente controllata a livello trascrizionale mediante fasi di attivazione e repressione di trascrizione, interconnesse tra loro e generanti un meccanismo di feedback negativo in grado di autoregolarsi durante le 24 ore (Lowrey P.L. et al., 2004; Reppert S.M. et al., 2002).

I geni circadiani sono essenziali nel creare e sostenere i ritmi in condizioni costanti; infatti, la loro inattivazione generalmente porta ad aritmicità oppure a periodi più corti o più lunghi. Molti di questi geni codificano per fattori di trascrizione o proteine che funzionano in qualche modo nella regolazione dei geni stessi, enfatizzando l’idea che la generazione e la modulazione dei ritmi dipendono principalmente dai loops di feedback trascrizionali e dall’attivazione e repressione dell’espressione genica.

Il loop trascrizionale positivo dell’orologio è regolata da membri della famiglia dei fattori di trascrizione (bHLH)-PAS (basic Helix-Loop-Helix) (Period-Arint-Single-minded), CLOCK e BMAL1. Queste due proteine eterodimerizzano ed iniziano la trascrizione di geni bersaglio, quali i geni *Period* (nei topi, *Per1*, *Per2* e *Per3*) ed i *criptocromi* (*Cry1* e *Cry2*), contenenti sequenze enhancer di tipo “E-box” nel promotore (King D.P. et al., 1997; Gekakis N. et al., 1998; Kume K. et al., 1999;

Bunger M.K. et al., 2000; Zheng B. et al., 2001). A sua volta, la fase di repressione trascrizionale o “feedback negativo” è dato dagli eterodimeri PER:CRY, che traslocano nel nucleo ed inibiscono la loro stessa trascrizione agendo sul complesso CLOCK:BMAL1 (Kume K. et al., 1999; Lee C. et al., 2001; Okamura H. et al., 1999; Shearman L.P. et al., 2000; Sato T.K. et al., 2006).

Un altro loop regolatorio è indotto dagli eterodimeri CLOCK:BMAL1, che attivano la trascrizione dei recettori nucleari orfani relativi all'acido retinoico, Rev-erba e Rora (Preitner N. et al., 2002; Sato T.K. et al., 2004; Triqueneaux G. et al., 2004; Akashi M. et al., 2005). Questi ultimi, di conseguenza, competono per i siti di legame del recettore orfano relativo all'acido retinoico (ROREs) presenti nel promotore del gene *Bmall*. E' stato, infatti, dimostrato che membri di ROR (α , β e γ) e REV-ERB (α e β) sono capaci di regolare *Bmall* attraverso ROREs (Guillaumond F. et al., 2005). Più precisamente, i RORs attivano la trascrizione di *Bmall* (Sato T.K. et al., 2004; Akashi M. et al., 2005; Guillaumond F. et al., 2005), mentre i REV-ERBs reprimono il processo della trascrizione (Preitner N. et al., 2002; Guillaumond F. et al., 2005). Questi cicli autoregolatori trascrizionali, descritti in figura 1, durano circa 24 ore per completare un ciclo e costituiscono il clock molecolare circadiano. In aggiunta a tali cicli, i ritmi circadiani sono mantenuti da supplementari livelli di regolazione e complessità. Questi includono regolazione post-trascrizionale (Kojima S. et al., 2003; Baggs J.E. et al., 2003), modificazioni post-traduzionali (Lee C. et al., 2001), rimodellamento della cromatina (Etchegaray J.P. et al., 2003; Crosio C. et al., 2000), stabilità delle proteine dell'orologio (Yagita K. et al., 2002; Akashi M. et al., 2002) e regolazione della loro localizzazione intracellulare (Lee C. et al., 2001; Yagita K. et al., 2002; Akashi M. et al., 2002; Kondratov R.V. et al., 2003). Questi processi contribuiscono significativamente alla precisione del meccanismo dell'orologio nei mammiferi (Lowrey P.L. et al., 2000; Toh K.L. et al., 2001; Akashi M.

et al., 2002; Eide E.J. et al., 2002, 2005; Xu Y. et al., 2005). Un accumulo di tali proteine, infatti, potrebbe portare ad un equilibrio nell'attivazione trascrizionale dei geni del clock e quindi, a perdita di ritmicità nell'espressione genica. Inoltre, altri fattori critici che contribuiscono alla regolazione della stabilità delle proteine dell'orologio circadiano sono la caseina chinasi I ϵ (CKI ϵ) e la caseina chinasi I δ (CKI δ) (Lowrey P.L. et al., 2000; Akashi M. et al., 2002; Eide E.J. et al., 2002; Xu Y. Et al., 2005).

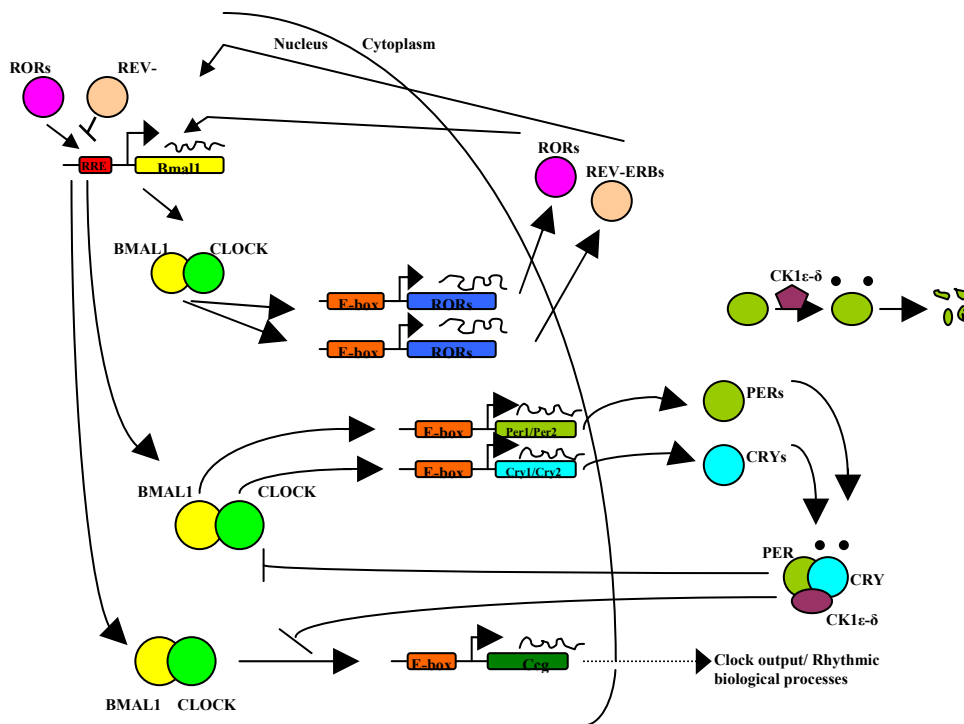


Fig.1: Il clock circadiano dei mammiferi è regolato da una serie di interconnessi “loops” trascrizionali e traduzionali.

Occorre precisare che alcuni segnali ambientali possono resettare giornalmente la fase dei ritmi molecolari interni, in maniera tale che il comportamento degli organismi rimanga legato ai ritmi nel suo

ambiente. Il principale segnale di resetting per gli animali è la luce, fornita dai cicli giorno-notte (Cermakian N. et al., 2000, 2002; Reppert S.M. et al., 2001; Young M.W. et al., 2001). I segnali luminosi sono percepiti dalla retina e l'informazione è convogliata al SCN attraverso il tratto retino-ipotalamico (RHT) (Moore R.Y. et al., 1995) ed inducono nei neuroni del SCN una cascata di eventi. Più precisamente si osserva, a livello dei neuroni delle sinapsi del SCN ventrolaterale il rilascio del glutammato.

L'attivazione dei recettori ionotropici del glutammato nelle cellule del SCN inizia una cascata di eventi che porta al cambiamento di fase o "fase shift" del clock, che porta all'induzione di geni a risposta immediata, come *c-fos*, *fos B* o *NGF1-A* (Kornhauser J.M. et al., 1990) e geni del clock, come *Per1* e *Per2* (Albrecht U. et al., 1997; Shearman L.P. et al., 1997), il rimodellamento specifico della cromatina, come la fosforilazione dell'istone H3. L'induzione dei geni *Per1* e *c-fos* è dipendente dall'attivazione delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Obrietan K. et al., 1998), di ERK (Extracellular Signal-Regulated Kinase) e dal fattore di trascrizione CREB (cAMP-Responsive Element Binding protein) (Gau D. et al., 2002; Travnichova-Bedova Z. et al., 2002) (fig.2).

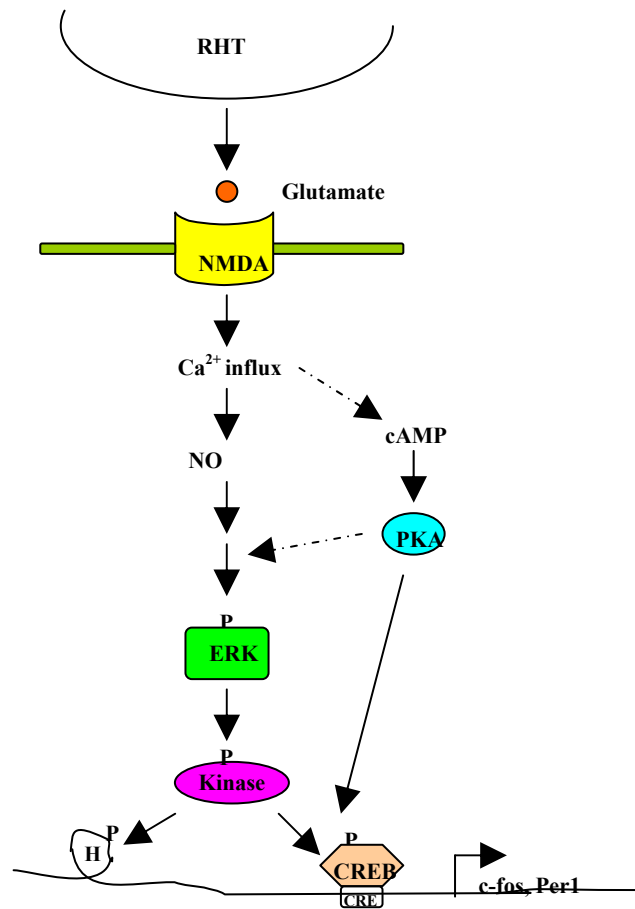


Fig.2: Vie di traduzione dei segnali luminosi nei neuroni del SCN.

La proteina CREB, nel SCN dei topi, è attivata dalla fosforilazione dopo stimolazione alla luce. Questo stimolo produce una variazione del periodo del ciclo circadiano (Ginty D.D. et al., 1993). La proteina CREB, a sua volta, è un importante punto finale di convergenza di diverse vie di traduzione del segnale (de Cesare D. et al., 1999). In particolare, l'attivazione del pathway MAPK/ERK risulta in una potente attivazione di CREB, mediante fosforilazione nel residuo di serina 133. Le MAPK sono attivate nel SCN di topo in risposta agli impulsi luminosi durante la fase "buia" del ciclo e richiede la fosforilazione di ERKs e CREB (Obrietan K. et al., 1998).

Il legame tra il recettore glutammato e l'attivazione delle MAPK e CREB è dato da un precoce step, in cui si ha l'attivazione dell'ossido nitrico sintasi ed il conseguente influsso di Ca^{2+} nelle cellule del SCN. Questo indica che l'ossido nitrico diffonde tra le cellule del SCN, forse contribuendo alla sincronizzazione tra le cellule del clock ed all'amplificazione del segnale (Ding J.M. et al., 1994).

I cambiamenti intracellulari dei livelli di calcio potrebbero portare anche all'attivazione della PKA (cAMP-activated protein kinase), della PKC (protein kinase c) e della CaMK (Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase).

Altri tipi di neurotrasmettitori sono coinvolti nella trasmissione di segnali non-fotici del SCN (Hastings M.H. et al., 1997; Maywood E.S. et al., 1999), nella comunicazione tra le cellule del SCN e nel modulare la risposta alla luce (Shinohara K. et al., 2000; Welsh D.K. et al., 1995; Pickard G.E. et al., 1997). Questi includono il GABA (acido γ -aminobutirrico), dopamina, serotonina, neuropeptide Y e l'ormone melatonina.

La fotorecezione circadiana coinvolge vie di trasmissione che sono distinte da quelle usate per la formazione dell'immagine. Il principale fotopigmento coinvolto nella ricezione dei segnali luminosi è la melanopsina, una nuova opsina presente nell'occhio ed in altre strutture fotorecettive degli anfibi ed esclusivamente nell'occhio dei primati e dei roditori (Provencio I. et al., 2000). La sua distribuzione è ristretta ad un piccolo subset di cellule gangliari retinali (RGCs). E' ancora in dubbio, il ruolo svolto dalle due proteine CRY nella fotorecezione nei mammiferi.

Non è stata dimostrata invece l'esistenza di una fotorecezione nei tessuti periferici nei mammiferi. La luce ha effetto sugli oscillatori periferici dei mammiferi in maniera indiretta. Il SCN integra i segnali fotici dalla retina e dal RHT ed allora sincronizza gli oscillatori periferici attraverso

produzione circadiana di ormoni e neurotrasmettitori (Yamazaki S. et al., 2000; Abe M. et al., 2002) (Fig.3).

In assenza dei segnali nel SCN, le oscillazioni si attenuano rapidamente negli oscillatori periferici (Yamazaki S. et al., 2000; Abe M. et al., 2002; Balsalobre A. et al., 1998).

La generazione di ritmi circadiani in tessuti periferici richiede l'attivazione di nervi efferenti, sia da varie aree del cervello (LeSauter J. et al., 1998) che da tessuti, che si connettono attraverso il sistema nervoso autonomo (Ueyama T. et al., 1999). E' comunque chiaro che la trasmissione dell'informazione ritmica, richiede anche segnali diffusibili (Lowrey P. et al., 2000). Alcune molecole di questo tipo sono peptidi; infatti, una proteina ben caratterizzata, presente nel clock del topo, è il DBP (D-site albumin promoter-binding protein), che funziona come un fattore di trascrizione (Mueller C.R. et al., 1990). Esso è espresso ritmicamente in vari tessuti e guida l'espressione di parecchi geni, in particolare nel fegato. Dato che l'espressione di DBP è controllata dall'eterodimero CLOCK-BMAL1 (Ripperger J.A. et al., 2000), questo fattore di trascrizione potrebbe essere coinvolto nella generazione di output del clock, guidando l'espressione ritmica di altri geni controllati dal clock.

Un altro fattore di trascrizione coinvolto nella funzione di output del clock è il modulatore CREM (cAMP-Responsive Element Modulator), un membro della famiglia CREB. Una delle isoforme generate dal gene CREM, l'ICER (Inducibile cAMP Early Repressor) modula, nel topo, la sintesi della melatonina, regolando direttamente l'espressione del gene serotonina N-acetiltransferasi, che contiene un dominio CRE (cAMP Responsive Element) nella sua regione promotrice (Foulkes N.S. et al., 1997).

I clocks periferici possono essere controllati o sincronizzati dal clock centrale anche attraverso segnali ormonali che oscillano in modo circadiano (Balsalobre A. et al., 1998) oppure da restrizioni di cibo.

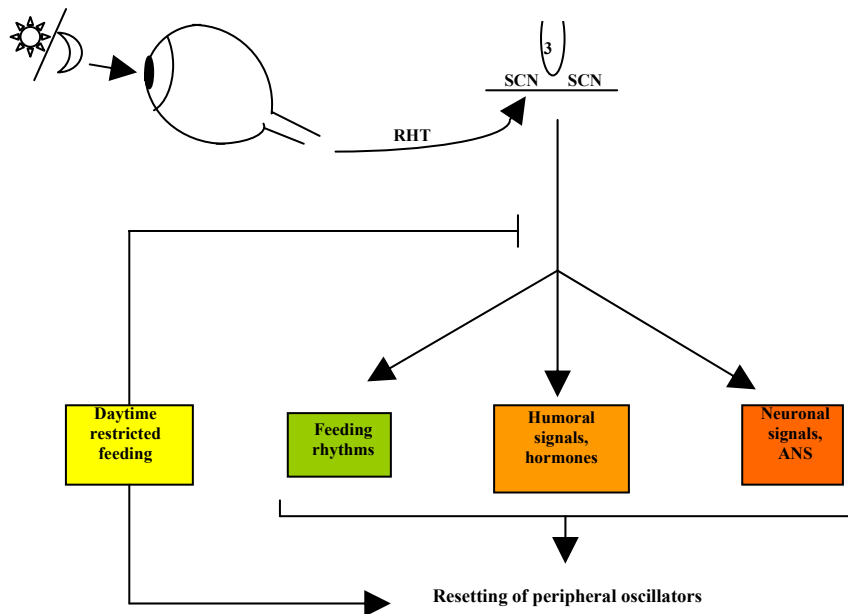


Fig.3: La regolazione degli orologi circadiani nei tessuti periferici dei mammiferi

E' stato dimostrato che i glucocorticoidi, ormoni secreti nel sangue in cicli circadiani, possono resettare l'orologio, cambiando l'espressione del gene *Per* nei tessuti periferici senza influenzare l'orologio centrale nel SCN (Balsalobre A. et al., 2000). Al contrario della luce, che attiva l'espressione del gene *Per* solamente di notte, il segnale dei glucocorticoidi può indurre l'espressione del gene *Per* sempre durante il giorno.

Il promotore umano del gene *Per1*, in aggiunta al pathway dell'cAMP ed in maniera indipendente dalla fosforilazione di CREB e dall'attivazione delle MAPKs, può essere attivato anche dall'interleuchina 6 (Motzkus D. et al., 2002).

Inoltre, l'interferone- α può distruggere il ritmo dell'attività locomotoria, la temperatura corporea e l'espressione dei geni del clock nei topi (Ohdo S. et al., 2001).

I.1. Proprietà strutturali e funzionali dei fattori di trascrizione che controllano il clock circadiano.

Le proteine CLOCK e BMAL1

Le proteine CLOCK e BMAL1 sono caratterizzate da un dominio bHLH e due domini PAS, che sono richiesti, rispettivamente, per il legame al DNA e l'eterodimerizzazione. Il dominio C-terminale della proteina CLOCK ha un repeat di poli-glutamina (aminoacidi 751-769), caratteristico dei domini di attivazione in molti fattori di trascrizione. Inoltre, entrambe le proteine presentano dei domini putativi altamente conservati che controllano la traslocazione al di fuori (Nuclear Export Signal) (NES) e verso l'interno del nucleo (Nuclear Localization Signal) (NLS), rispettivamente adiacenti ai domini PAS A ed bHLH.

Tali proteine presentano oscillazione circadiana nel loro stato fosforilativo e nella loro distribuzione cellulare, sia a livello del fegato di topo che del nucleo soprachiasmatico, in cui è situato il pacemaker centrale dei mammiferi (Schibler U., Sassone-Corsi P., 2002). Le forme fosforilate di entrambe le proteine sono principalmente nucleari (Lee C. et al., 2001; Kondratov R.V., et al., 2003; Tamaru T. et al., 2003). Inoltre, la dimerizzazione CLOCK-BMAL1 induce la fosforilazione di ciascuna proteina e facilita la loro localizzazione nucleare (Kondratov R.V., et al., 2003). I cambiamenti circadiani nella distribuzione cellulare e nella fosforilazione di entrambe le proteine sono, a loro volta, associati con la loro attività trascrizionale. Precedenti dati di letteratura hanno mostrato che le proteine CRY sono coinvolte in queste modificazioni post-traduzionali. In effetti, in cellule deficienti per CRY, i livelli della proteina BMAL1 fosforilati risultano aumentati, mentre, la proteina CLOCK non fosforilata, che normalmente è localizzata principalmente nel citoplasma, si trova nel nucleo (Lee C. et al., 2001;

Kondratov R.V., et al., 2003). Non sono ancora del tutto noti, in che modo le proteine CRY possano influenzare le modificazioni post-traduzionali delle due proteine.

E' stato anche dimostrato che le due chinasi, CKI (Casein Kinase I) e MAPK, sono capaci di fosforilare, *in vitro*, la proteina BMAL1 (Eide E.J. et al., 2002; Sanada K. et al., 2002). In particolare le MAPK fosforilano il residuo di serina in posizione 527, il residuo di treonina in posizione 534 ed il residuo di serina in posizione 599, che sono altamente conservati tra le proteine BMAL1 dei vertebrati (Sanada K. et al., 2002). I siti di fosforilazione della CKI sulla proteina BMAL1 non sono stati ancora identificati, ma c'è una sequenza consenso nel dominio C-terminale delle proteine BMAL1 dei vertebrati, che sembrerebbe coincidere in parte con la sequenza consenso delle MAPK, suggerendo, quindi, una competizione tra le due chinasi per quanto riguarda la regolazione funzionale della proteina BMAL1 (Eide E.J. et al., 2002).

Anche la proteina CLOCK contiene nella sua regione centrale una sequenza altamente conservata di fosforilazione per la caseina chinasi I. Tuttavia, la CKI non sembra fosforilare CLOCK, *in vitro* (Eide E.J. et al., 2002). Nel fegato di topo, la CKI forma un complesso trimetrico con CRY-PER, che trasloca nel nucleo per associarsi con il dimero CLOCK-BMAL1 e così, downregolare la transattivazione CLOCK-BMAL1 dipendente (Lee C. et al., 2001). E' possibile che la CKI possa fosforilare in tale complesso multimerico sia la proteina CLOCK, che la proteina BMAL1, modulando la trascrizione mediata dall'eterodimero CLOCK-BMAL1.

Le proteine CRY

Nei mammiferi sono state identificate due proteine CRY: CRY1 e CRY2 (Kobayashi Y. Et al., 2000; Cermakian N. et al., 2002), appartenenti alla famiglia delle proteine del riparo del DNA attivate da fotoni (fotoliasi) e alla famiglia dei criptocromi. Esse presentano un dominio N-terminale di legame per il cromoforo, altamente conservato tra tutte le proteine CRY ed un dominio C-terminale, piuttosto divergente (Todo T., 1999). Funzionalmente, nei mammiferi le due proteine CRY1 e CRY2 sembrano esercitare opposte funzioni nell'oscillatore circadiano, dato che i topi, che mancano dei geni *Cry1* e *Cry2* presentano, rispettivamente, accelerata o ritardata periodicità "free-running" dell'attività locomotoria (Vitaterna M.H. et al., 1999). Tuttavia, entrambe le proteine agiscono come forti repressori trascrizionali, interagendo direttamente con l'eterodimero CLOCK-BMAL1, a livello nucleare (Lee C. et al., 2001; Griffin E.A. et al., 1999). Per svolgere la loro attività trascrizionale repressiva sono essenziali sia la traslocazione nucleare che l'interazione con l'eterodimero. Lo studio dei geni *Cry* in zebrafish ha permesso l'identificazione di tre domini, che corrispondono ai residui 126-196, 197-263 e 264-293 (indicati, rispettivamente, come RD-1, RD-2a e RD-2b) (Hirajama J. et al., 2003). Questi domini sono conservati in tutti i repressori CRY di differenti specie. I due domini RD-1 e RD-2a sono richiesti per l'interazione con l'eterodimero CLOCK-BMAL1, invece, i domini RD-1 e RD-2b sono richiesti per la localizzazione nucleare, in quanto in quest'ultimo dominio è presente una sequenza simile a NLS (Nuclear Localization Signal) ed è conservato tra le proteine CRY dei vertebrati (Hirajama J. et al., 2003). In realtà, anche l'estensione C-terminale delle proteine CRY dei vertebrati sembra essere essenziale per la localizzazione nucleare (Zhu H. et al., 2003). È stato identificato nell'estensione C-terminale di mCRY2 un dominio NLS, altamente

conservato nei mammiferi, che media l'entrata nucleare di CRY2 attraverso il sistema dell'importina α/β .

Nel fegato di topo, le proteine CRY sono state trovate principalmente nel citoplasma, dove dimerizzano con le proteine PER e di conseguenza, traslocano nel nucleo, nello stesso tempo quando viene downregolata la trascrizione dell'eterodimero CLOCK:BMAL1 (Lee C. et al., 2001). Non è ancora chiaro come sia regolata la traslocazione nucleare delle proteine CRY (Kume K. et al., 1999).

Inoltre, le proteine PER sembrano essere importanti per la fosforilazione delle proteine CRY, da parte della CKI. In effetti, la caseina chinasi I e le proteine CRY non interagiscono direttamente, ma entrambe possono legarsi contemporaneamente alle proteine PER (Akashi M. et al., 2002; Eide E.J. et al., 2002). Queste ultime sembrano funzionare da adattatori che portano entrambe le proteine nello stesso complesso ternario, in cui la CKI può, quindi, accedere e fosforilare le proteine CRY (Eide E.J. et al., 2002). Studi recenti hanno dimostrato che anche la chinasi MAP può interagire direttamente e quindi fosforilare CRY1 e CRY2, rispettivamente nel residuo di serina 247 e nel residuo di serina 265, altamente conservati (Sanada K. et al., 2004). La fosforilazione di questi residui riduce l'attività repressoria di CRY. Inoltre, la MAPK fosforila il residuo di serina 557, localizzato all'estremità C-terminale di CRY2. Le fosforilazioni mediate dalla CKI e dalle MAPK potrebbero regolare la funzione delle proteine CRY in differenti modi, causando l'opposto fenotipo comportamentale, che si osserva nei topi mutanti.

Le proteine PERIOD

Le proteine PERIOD sono componenti centrali del clock circadiano. Esse presentano due domini PAS, attraverso i quali essi dimerizzano. Tali domini sono stati descritti per la prima volta in tre proteine di

Drosophila, PER (PERiod), ARNT (Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) e SIM (Single-Minded) ed in seguito, sono stati scoperti essere presenti in varie proteine circadiane ed in molti fattori di trascrizione (Yildiz O. et al., 2005).

Tutte le proteine PER contengono nella regione centrale siti di legame per la caseina chinasi I (CKI), anche se ciascuna proteina presenta una differente affinità di legame. Questi domini nelle proteine PER1 e PER2 di topo sono altamente conservati, mentre nella proteina PER3 di topo sono piuttosto divergenti, con una più debole affinità di legame per CKI (Akashi M. et al., 2002; Lee C. et al., 2004).

Studi genetici hanno rivelato che, mentre PER1 e PER2 svolgono un ruolo cruciale nella ritmicità circadiana, PER3 non è necessario per la funzione del clock (Bae K. et al., 2001; Zheng B. et al., 2001). In particolare, la mancanza di una stabile interazione della CKI con PER3 è associata alla sua incapacità a sostenere la funzione del clock circadiano (Lee C. et al., 2004).

E' importante notare che i domini di legame per la CKI di tutte le proteine PER in differenti specie contengono un motivo di fosforilazione per CKI altamente conservato (aminoacidi 613-626 in mPER3). La fosforilazione mediata da CKI di mPER3 attraverso la sua ubiquitinazione e degradazione mediante proteosoma, supporta il ruolo della fosforilazione nella destabilizzazione delle proteine PER (Akashi M. et al., 2002).

La CKI ϵ può anche fosforilare il residuo di serina presente nel motivo di riconoscimento mPER2 per β -TrCP (β -Transducin repeat-containing protein), la proteina adattatrice che agisce come ligasi di tipo E2 per il legame dell'ubiquitina su mPER2 (Eide E.J. et al., 2005). Dato che l'instabilità delle proteine è un prerequisito essenziale per l'oscillazione dei livelli di proteine dell'orologio, questi domini altamente conservati costituiscono una componente essenziale nel meccanismo circadiano delle proteine PER.

La CKI, oltre a regolare la stabilità delle proteine PER, controlla specificatamente anche la loro localizzazione intracellulare, mascherando o meno le loro sequenze di localizzazione (Akashi M. et al., 2002; Vielhaber E. et al., 2001; Miyazaki K. et al., 2001; Takano A. et al., 2004) E' importante anche sottolineare che la distribuzione e le modificazioni post-traduzionali delle proteine PER sono influenzate dalla loro associazione con le proteine CRY. In effetti, i due domini PAS e le regioni altamente conservate C-terminale delle proteine PER sono richieste, rispettivamente per la dimerizzazione PER-PER e PER-CRY. In particolare, le diverse possibilità di associazioni delle proteine PER generano effetti distinti sulla loro localizzazione subcellulare e sulle modificazioni post-traduzionali. Ad esempio, in modelli cellulari, l'interazione PER1-PER2 induce una rilocalizzazione subcellulare di PER1 dal nucleo al citoplasma (Vielhaber E. et al., 2000). Inoltre l'eterodimerizzazione di PER1 o PER2 con PER3 facilita la traslocazione nucleare delle due proteine (Yagita K. et al., 2000).

La dimerizzazione PER-CRY sembra essere essenziale per l'accumulo di entrambe le proteine, dato che sono stati osservati un più basso accumulo di CRY1/2 e PER1/2, rispettivamente, nei nuclei di fegato di topi doppi mutanti *Per1/2* e *Cry1/2* (Lee C. et al., 2001). La natura cooperativa delle interazioni PER-CRY è ulteriormente sostenuta dall'osservazione che tale dimerizzazione stabilizza entrambe le proteine, prevenendo la loro degradazione (Yagita K. et al., 2002).

I.2. Mutazioni nei geni del clock dei mammiferi

La perdita o la mutazione di specifici geni del clock può portare a periodi di oscillazioni con periodo alterato (come ad esempio in topi deficienti per i geni *Cry1*, *Cry2*, *Per1*, *Per3*, *CK1ε*), rallentato (come ad esempio in topi deficienti *clock*, *Per2*) oppure distruzione (come ad esempio in topi deficienti *Bmal1*) della ritmicità circadiana in condizioni costanti (Albrecht U., 2002).

In particolare, i topi doppi mutanti *Cry1/Cry2* (van der Horst G.T.J. et al., 1999; Vitaterna M.H. et al., 1999) e *Per1/Per2* (Bae K. et al., 2001; Zheng B. et al., 2001) perdono immediatamente la ritmicità circadiana, confermando l'importanza di questi geni nel meccanismo del clock.

Il solo gene non ridondante nel clock finora identificato è *Bmal1* (*Mop3*).

La delezione di questo gene, infatti, porta, in condizione di buio costante, ad immediata aritmicità. A livello molecolare, non c'è espressione di *Per1* e *Per2* nel SCN, il che sta ad indicare che *Bmal1* regola positivamente l'espressione dei geni *Per* (Bunger M.K. et al., 2000).

I topi con distruzione di entrambi i geni *Cry1* e *Cry2* hanno un comportamento aritmico (van der Horst G.T.J. et al., 1999; Vitaterna M.H. et al., 1999) e mostrano espressione costante non ciclica dei geni *Per1* e *Per2* nel SCN e nei tessuti periferici. Questo indica che i geni *Cry* agiscono come regolatori negativi dell'espressione del gene *Per*. I topi che mancano del gene *Cry1* o del gene *Cry2* sono ritmici, ma presentano un alterato periodo. In particolare, i topi *Cry1^{-/-}* hanno un periodo più corto di 24 ore, mentre il periodo dei topi *Cry2^{-/-}* è più lungo di 24 ore.

In condizione di buio costante, i clocks di questi topi procedono, rispettivamente, più veloci o più lenti, supportando l'idea che il clock

consiste di due oscillatori, che agiscono in maniera opposta (Daan S. et al., 2001; Pittendrigh C.S. et al., 1976).

I topi con mutazioni nel gene *Per2* presentano una graduale perdita dell'attività locomotoria circadiana ed una ridotta espressione di *Per1* e *Cry1*, così come uno shift del picco di espressione di *Bmal1* (Bae K. et al., 2001; Shearman L.P. et al., 2000; Zheng B. et al., 1999, 2001), mentre l'espressione di *Per3* e *Clock* non è influenzata (Zheng B. et al., 1999). Questo dimostra che *Per2* ha un ruolo di regolatore positivo dell'espressione dei geni circadiani (Zheng B. et al., 1999). I topi *Per1*^{-/-} mostrano ritmi di mRNA inalterati per *Per2*, *Cry1* e *Bmal1* (Shearman L.P. et al., 2000; Zheng B. et al., 2001). Nei tessuti periferici, la proteina PER2 totale si accumula nel nucleo delle cellule del fegato (Zheng B. et al., 2001); al contrario, di quanto succede nelle cellule del SCN (Bae K. et al., 2001). Dato che il meccanismo del clock è lo stesso nel SCN e nel fegato, PER1 svolge un ruolo importante nel regolare post-trascrizionalmente PER2, influenzandone così, il trasporto nucleare. Una riduzione o una perdita della proteina PER2 nel nucleo porta ad una variazione nella trascrizione di *Bmal1* (Shearman L.P. et al., 2000) e determina l'espressione non sincrona dei componenti del clock, con conseguente instabilità della durata del periodo (Zheng B. et al., 2001) o perdita della ritmicità circadiana (Bae K. et al., 2001) nei topi mutanti per *Per1*. In condizioni di luce costante, la lunghezza del periodo dei mutanti di *Per1* è più lungo di 24 ore, mentre per i mutanti di *Per2* è più corto e non è stata osservata perdita di ritmicità.

I topi *clk/clk*, caratterizzati dal gene *Clock* deletato nell'istone 19, esprimono una proteina CLOCK mutata, la quale può ancora legarsi agli elementi regolatori dei suoi geni target insieme con BMAL1, ma non ne attiva la loro trascrizione (Gekakis N. et al., 1998). Inoltre, tali topi presentano un periodo estremamente più lungo ed in condizioni di buio costanti, un comportamento aritmico (Vitamerna M.H. et al., 1994).

Recentemente, Debruyne e collaboratori hanno prodotto ed analizzato topi omozigoti, mancanti del gene *Clock*. Questi animali, sorprendentemente, mostrano ancora, in condizioni di buio costante, una normale ritmicità dell'attività locomotoria circadiana, anche se la lunghezza del periodo è alquanto più corta di quella misurata nei topi wild-type. A livello molecolare, questi topi continuano a presentare ritmicità circadiana nell'espressione dei geni del clock, anche se con ampiezza ridotta, sia a livello del SCN che del fegato (Debruyne J.P. et al., 2006).

Capitolo II. Modificazioni post-traduzionali:

SUMOylazione

Le modificazioni post-traduzionali delle proteine permettono alla cellula di organizzare una rapida risposta a vari cambiamenti esterni ed a differenti tipi di stimoli. Tali modificazioni, essenziali per la crescita e lo sviluppo di tutti gli organismi, permettono di regolare l'attività, la funzione, la stabilità e la localizzazione intracellulare delle proteine. I tipi di modificazione post-traduzionali meglio caratterizzati sono quelli che coinvolgono la coniugazione di piccoli gruppi chimici alle proteine bersaglio, come per es., la fosforilazione, l'acetilazione, la metilazione (Kim K.I., et al., 2002). Negli ultimi anni, però, sono state studiate con maggiore attenzione le modificazioni post-traduzionali basate sul legame covalente di piccoli peptidi che possono influenzare la funzione della proteina stessa. Questo tipo di modificazione è maggiormente esemplificato dal sistema dell'ubiquitina. La coniugazione dell'ubiquitina alle proteine bersaglio è un processo estremamente complesso, che richiede molteplici step, ognuno caratterizzato da specifici enzimi (Hochstrasser M., 1996; Varshavsky A., 1997). Nel primo step, l'ubiquitina è attivata dall'enzima attivante-l'ubiquitina, detto E1. In particolare, tale enzima adenila l'estremità carbossi-terminale dell'ubiquitina, che mediante un legame tioestere ad alta energia, si lega ad un residuo di cisteina di E1. Successivamente, l'ubiquitina viene trasferita ad un residuo di cisteina dell'enzima coniugante l'ubiquitina, E2. Questo, a sua volta, catalizza la formazione del legame isopeptidico tra l'estremità carbossi-terminale dell'ubiquitina e l' ϵ -amino gruppo di un residuo di lisina della proteina bersaglio.

Generalmente, quando le proteine sono coniugate a catene di poliubiquitina, l'ubiquitinazione generalmente induce la degradazione

delle proteine modificate a livello del proteosoma 26S (Hochstrasser M., 1996). Quando, invece, le proteine sono legate ad una singola molecola di ubiquitina, monoubiquitinazione, tale pathway sembra essere principalmente coinvolto in altri processi, quali endocitosi, regolazione trascrizionale, riparazione del DNA, progressione del ciclo cellulare, differenziazione cellulare, risposte da stress.

Recentemente, sono state identificate parecchie proteine, simili per struttura primaria all'ubiquitina (Johnson P.R. et al., 1997; Saitoh H. et al., 1997). Queste proteine possono essere divise in due gruppi, quelle che sono strettamente connesse all'ubiquitina con identità maggiore del 35% e quelle che sono debolmente identiche all'ubiquitina con identità minore del 20%. Al primo gruppo appartengono proteine come, il nucleotide Rad23p (excision repair protein) (Watkins J.F., 1993), Dsk2p, che è coinvolto nella duplicazione del fuso polare (Biggins S., 1996) e l'interferon-inducibile UCRP (ubiquitin cross-reactive protein) (Loeb K.R. et al., 1992). Al secondo gruppo appartengono proteine come, Smt3p (Meluh P.B. et al., 1995), SUMO1 (Matunis M.J. et al., 1996; Mahajan R. et al., 1997) ed i suoi relativi (Mannen H. et al., 1996.). Fra questi due gruppi, solamente UCRP, Smt3p e SUMO-1 possono essere coniugati ad altre proteine in maniera simile, ma non identica all'ubiquitina (Loeb K.R. et al., 1994; Johnson P.R. et al., 1997; Mahajan R. et al., 1997).

Per quanto riguarda la proteina SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier), nei mammiferi ne sono state identificate tre diverse isoforme: SUMO-1, -2 e -3.

Nell' uomo, SUMO-1 è un polipeptide di 101 aminoacidi, che presenta un 18% di identità rispetto alla sequenza aminoacidica dell'ubiquitina. Al contrario, le due proteine presentano una struttura tridimensionale molto simile, caratterizzata da un tightly packed $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ fold (Bayer et al., 1998). Inoltre, SUMO-1 presenta un 48% di identità con SUMO-2 ed un 46% di identità con SUMO-3. A loro volta, SUMO-2 e SUMO-3

presentano il 95% di identità tra loro e possono essere raggruppati in una sottofamiglia distinta da SUMO-1.

Come l'ubiquitina, SUMO-1 è sintetizzata sotto forma di un precursore con l'estremità carbossi-terminale, che deve essere processata in maniera tale da esporre il residuo di glicina C-terminale, essenziale per la coniugazione alle proteine bersaglio. Una caratteristica peculiare di tale proteina è la presenza di una lunga e flessibile estensione N-terminale, la cui funzione non è ancora nota, che è assente nell'ubiquitina. Inoltre, è interessante notare che SUMO-1 manca del residuo di lisina corrispondente a quello situato in posizione 48 nell'ubiquitina, che è richiesto per la formazione delle catene di poli-ubiquitina. Questo spiega perché SUMO-1 non presenta forme di poli-catene (Bayer et al., 1998).

Al contrario, SUMO-2/-3 possiedono nella loro regione N-terminale, una sequenza consenso, ϕ KXE, in cui ϕ è un aminoacido idrofobico e X un qualunque aminoacido, responsabile della formazione delle catene poli-SUMO, il cui significato funzionale non è ancora noto (Tatham et al., 2001).

II.1. Enzimi coinvolti nella coniugazione e deconiugazione di SUMO

Sia la SUMOylazione che l'ubiquitinazione sono modificazioni reversibili, catalizzate da un pathway enzimatico simile.

In generale, entrambe le proteine, SUMO ed ubiquitina sono sintetizzate come molecole inattive che devono essere processate in maniera tale da esporre il residuo di glicina usato per la coniugazione. Dopo il clivaggio, il gruppo carbossilico della glicina terminale delle due proteine viene dapprima unito al gruppo tiolico di un enzima attivante (E1), in un processo ATP-dipendente. Al contrario del sistema dell'ubiquitinazione, in cui l'enzima E1 (Uba1) è costituito da un singolo polipeptide, l'enzima SUMO-attivante è un complesso eterodimerico, formato dalle subunità Aos1 (o SAE2) e Uba2 (o SAE1) (Johnson E.S. et al., 1997; Okuma T. et al., 1999). Nell'uomo, la subunità Aos1 è per il 28% identica e per il 56% simile alla metà N-terminale dell'enzima E1 per l'ubiquitina, invece, la subunità Uba2, che è simile alla metà C-terminale, contiene il residuo di cisteina attivo, richiesto per la formazione del legame tioestere. Dobbiamo, però, precisare che questa subunità da sola non è sufficiente per la formazione del legame; infatti, la subunità Aos1 si assembla con Uba2 in maniera tale da formare un enzima E1 attivo per la SUMOylazione, *in vitro*. Inoltre, entrambe le subunità sono localizzate a livello nucleare, anche se sono esclusi dai nucleoli. Questo tipo di distribuzione subcellulare fa pensare che la maggior parte della SUMOylazione proteica avvenga nel nucleo (Muller S. et al., 2001)

Successivamente, SUMO e l'ubiquitina vengono cedute dagli enzimi E1 ad una famiglia di enzimi, detti coniuganti (E2), che nel caso specifico di SUMO si tratta dell'enzima Ubc9 (ubiquitin conjugating enzyme 9), omologo funzionale degli enzimi E2 del pathway dell'ubiquitina

(Desterro J.M. et al., 1997; Johnson E.S. et al., 1997; Schwarz S.E. et al., 1998). Questi enzimi presentano sulla loro superficie, una differente distribuzione di cariche. In effetti, l'enzima Ubc9 presenta sulla sua superficie carica positiva, al contrario gli enzimi E2 per l'ubiquitina, quali Ubc4 e Ubc7, hanno, rispettivamente, carica negativa o neutra. Allo stesso modo, anche le superfici elettrostatiche di SUMO-1 e della molecola di ubiquitina sono differenti (Bayer P. et al., 1998), nonostante la loro struttura terziaria sia altamente conservata. La superficie di SUMO-1, infatti, è carica negativamente e può, quindi, legarsi all'enzima Ubc9, carico positivamente; invece, l'ubiquitina non può legarsi a questo enzima, in quanto carica positivamente. Questo sta a significare che la differenza di cariche sulla superficie degli enzimi E2, può svolgere un ruolo importante nel modificare la selettività.

Nel sistema dell'ubiquitina, le ligasi E3, coadiuvano la formazione del legame isopeptidico tra il residuo di glicina del carbossile terminale dell'ubiquitina ed un residuo di lisina della proteina bersaglio. Al contrario, nel pathway di SUMOylazione, solo recentemente sono state identificate alcune ligasi, tra cui PIAS1, presente nei mammiferi, che interagisce con p53 ed Ubc9. Le proteine E3 ligasi possono servire per aumentare l'affinità tra l'enzima Ubc9 ed i substrati, portandoli più vicini, con l'orientazione cataliticamente più favorevole, permettendo, così, alla SUMOylazione di avvenire alla massima velocità (Kim K.I. et al., 2002) (Fig.4).

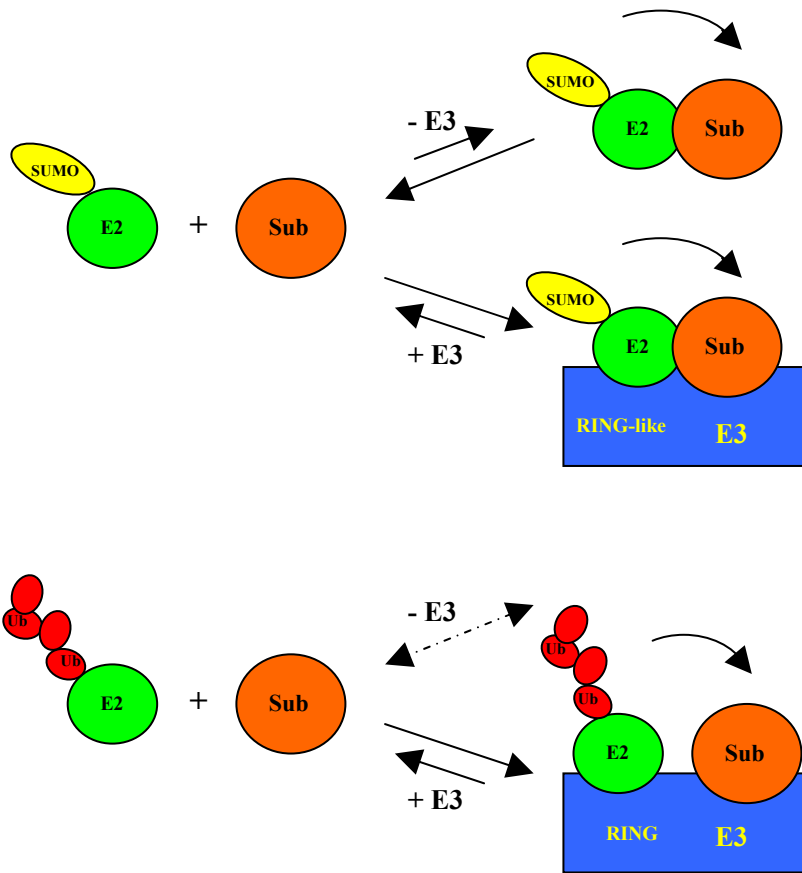


Fig.4: Modificazione delle proteine mediante SUMO ed ubiquitina

Come succede nella deubiquitinazione, anche SUMO-1 può essere processato proteoliticamente dalle sue proteine target coniugate. A tal proposito, sono stati identificati numerose proteasi SUMO-specifiche, come SUSP1, SENP1, SMT3IP1 e SMT3IP2 nei mammiferi ed Ulp1 ed Ulp2 in *S.cerevisiae* (Li S.J. et al., 1999, 2000; Gong L. et al., 2000; Kim K.I. et al., 2000; Nishida T. et al., 2000, 2001; Schwienhorst I. et al., 2000).

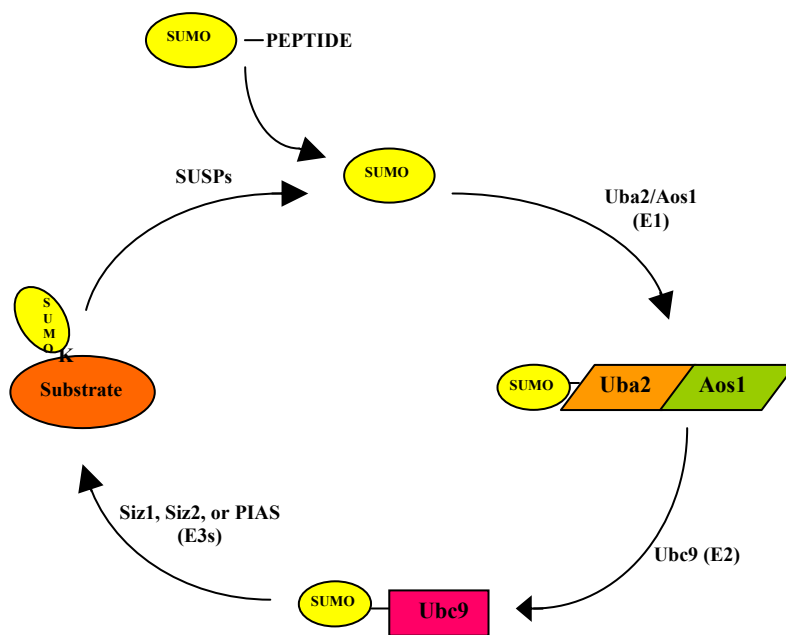


Fig.5: Ciclo di Sumoylazione e desumoylazione

II.2. Ruoli biologici della SUMOylazione

La SUMOylazione esercita sui suoi bersagli una gran varietà di effetti, alterandone la loro localizzazione cellulare, la loro stabilità e la loro attività, che può essere stimolata o repressa. Inoltre, sono noti un gran numero di processi cellulari, regolati dalla SUMOylazione, come l'organizzazione e la funzione dei cromosomi, la riparazione del DNA, il trasporto nucleare ed i pathways di traduzione del segnale (Kretz-Remy C. et al., 1999).

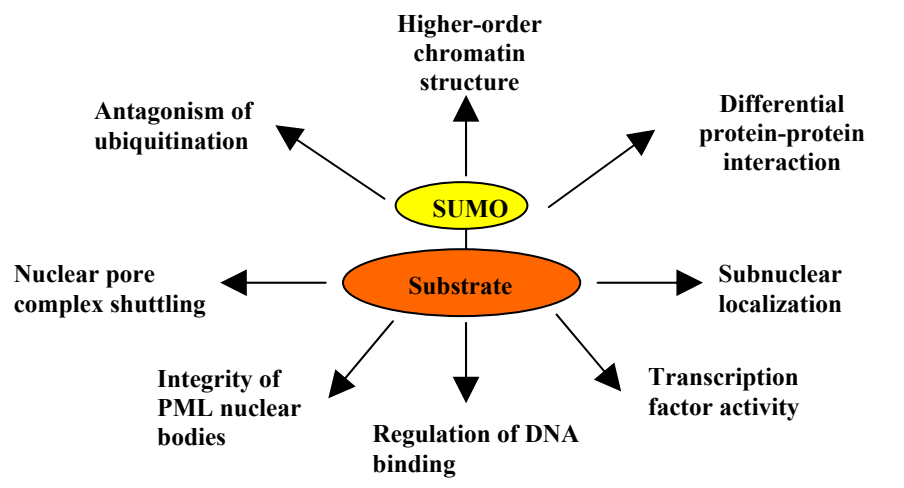


Fig.6: Funzioni di signalling della proteina SUMO.

Ruolo di SUMO nella traslocazione delle proteine.

Il trasporto delle proteine all'interno ed all'esterno del nucleo è un processo finemente regolato, che coinvolge segnali target intrinseci, come il segnale di localizzazione nucleare (NLS) ed il segnale di esporto nucleare (NES) nelle proteine shuttling, così come complessi strutturali, localizzati a livello del complesso del poro nucleare (NPC). Tra le differenti proteine coinvolte nel trasporto nucleo-citoplasma, è stata maggiormente studiata la RanGTPasi. Ran è una piccola GTPasi, nucleare, altamente conservata, importante per il trasporto nucleare attivo. Gli stati alternanti GTP/GDP di Ran sono controllati da RCC1, un fattore nucleotidico di scambio e RanGAP1 (RanGTPase-Activating Protein), una proteina attivante (Dasso M. et al., 1998).

La proteina RanGAP1 è stata identificata come il primo substrato della proteina SUMO-1 (Matunis M.J. et al., 1996; Mahajan R. et al., 1997). Questa proteina è specifica per la piccola proteina GTP-asi Ran, la cui funzione è essenziale per il trasporto delle proteine nel nucleo attraverso il complesso del poro nucleare (Melchior F. et al., 1993; Moore M.S. et al., 1993). RanGAP1 è altamente concentrata a livello del complesso del poro nucleare e forma un complesso stabile con RanBP2, un componente dei filamenti citoplasmatici provenienti dal complesso del poro nucleare (Wu J. et al., 1995; Yokoyama N. et al., 1995; Matunis et al., 1996; Mahajan et al., 1997). L'interazione di RanGAP1 con RanBP2 richiede la SUMOylazione di RanGAP1. Essa è presente in due differenti forme dal peso molecolare di 65 e 88 kDa. Quest'ultima è una forma modificata da SUMO di p65, che è stata scoperta principalmente associata con il complesso RanBP2. Più precisamente, l'estremità C-terminale del residuo di glicina in posizione 97 di SUMO-1 forma un isopeptide legato con l' ϵ -ammino gruppo del residuo di lisina in posizione 526 di RanGAP1. La localizzazione di RanGAP1 con RanBP2 è importante per l'importo delle proteine.

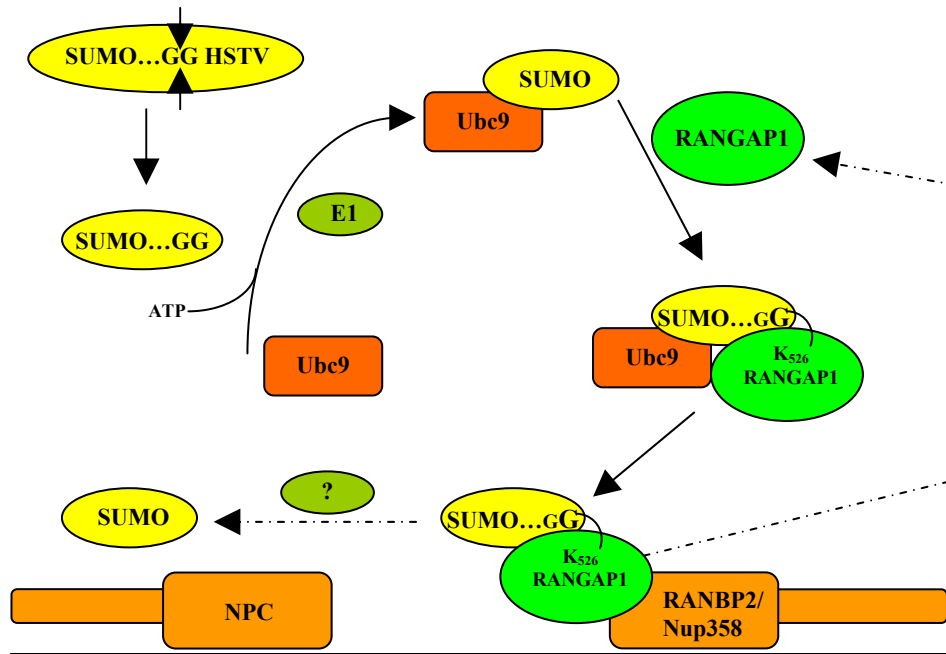


Fig.7: SUMOylazione di RanGAP1 ed importo delle proteine attraverso il sistema Ran.

Ruolo di SUMO nella formazione della struttura subnucleare.

La fosfoproteina nucleare PML (promyelocytic leukemia) (Hodges M. et al., 1998) è costituita da un dominio ricco in prolina nell'estremità NH₂-terminale, un RING finger (zinc binding motif), due B-box, un dominio α -elica, responsabile dell'omo- ed etero-dimerizzazione, un NLS ed un dominio ricco in prolina-serina nell'estremità COOH-terminale. Sono state identificate due isoforme della proteina di 97 e 69 KDa, che differiscono nella sequenza e nella lunghezza dell'estremità COOH-terminale. Questa proteina si trova in distinte strutture subnucleari, chiamate PML nuclear bodies (Nbs), ND10 o PML oncogenic domains (PODS) (Dyck J.A. et al., 1994; Koken M.H. et al.,

1994; Weis K. et al., 1994). Queste strutture sferoidali, dal diametro di 0.3-0.5 μ m sono strettamente associate con la matrice nucleare e sono in numero di 10-30 per nucleo.

La fosfoproteina PML è un importante target della proteina SUMO-1. Studi indipendenti compiuti da Kamitani T. e collaboratori e Duprez E. e collaboratori, hanno permesso di identificare i domini ed i residui di lisina, richiesti per la modificazione di PML da parte di SUMO-1. In particolare, nell'isoforma 97 kDa di PML, il dominio RING finger, il box B1 ed il dominio carbossi-terminale (contenente NLS) sono indispensabili per la coniugazione di SUMO-1. Il dominio C-terminale è anche necessario per la coniugazione all'isoforma di 69 KDa. Inoltre, il dominio RING finger è anche coinvolto nell'interazione di Ubc9 con PML (Kamitani T. et al., 1998b; Duprez E. et al., 1999). La delezione del dominio NH₂-terminale aumenta l'interazione di PML-SUMO, suggerendo che questa regione può regolare negativamente la coniugazione di SUMO. Questo è estremamente interessante, dato che la regione N-terminale contiene potenziali siti di fosforilazione ed è noto che la fosforilazione di PML inibisce l'interazione con SUMO-1 (Muller S. et al., 1998). Più precisamente, i residui di lisina 65, 160 e 490 rappresentano dei siti accettori di SUMO nell'isoforma di 97 KDa, invece, il residuo di lisina 490 rappresenta il principale sito accettore di SUMO-1 nell'isoforma di 69 KDa.

La coniugazione di SUMO a PML sembra essere importante per il targeting dei corpi nucleari ed in condizioni normali, coesistono nella cellula sia la forma non modificata nucleoplasmatica di PML che i coniugati SUMO-1/PML associati ai corpi nucleari. Questo suggerisce che entrambe le forme siano mantenute in equilibrio dinamico e che la fosforilazione potrebbe influenzare la quantità tra forme modificate e non. I PODs potrebbero allora rappresentare dei siti di "storage" per PML ed altri fattori nucleari, che potrebbero essere rilasciati nel

nucleoplasma per processi cellulari, come trascrizione e divisione cellulare.

Un altro componente dei PODs è la proteina SP100, che viene anch'essa modificata da SUMO nel residuo di lisina 297. Tale modificazione promuove la sua interazione con i membri delle proteine cromosomali non istoniche della famiglia HP1, suggerendo un suo ruolo regolatorio nell'organizzazione della cromatina e nell'interazione funzionale tra i corpi nucleari e la cromatina (Lehming N. et al., 1998; Seeler J.S. et al., 1998, 2001).

SUMO-1 ed i membri NF- κ B/I κ B.

NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) è un fattore di trascrizione eterodimerico inducibile, coinvolto nella regolazione dell'espressione di numerosi geni immunomodulatori, infiammatori, virali e da stress (Baeuerle P.A. et al., 1996; Baldwin jr A.S., 1996). In condizioni normali, esso si trova in forma latente nel citoplasma di cellule non stimolate, legato al suo inibitore I- κ B (Inhibitor protein kappa B). In seguito a stress, si ha l'attivazione della chinasi I κ B, che catalizza la fosforilazione di I κ B α ai residui di serina 32 e 36 (Regnier C.H. et al., 1997; Zandi E. et al., 1997; Rothwarf D.M. et al., 1998; Scheidereit C., 1998). Questo step porta alla poli-ubiquitinazione di I κ B α ai residui di lisina 21 e 22, con conseguente degradazione da parte del proteosoma 26S ed il rilascio del fattore di trascrizione NF- κ B, che trasloca nel nucleo, e induce la trascrizione dei suoi geni bersaglio.

Studi indipendenti condotti ad opera di Desterro J.M. e collaboratori e Tashiro K. e collaboratori, hanno dimostrato che l'enzima Ubc9, responsabile della coniugazione di SUMO-1 alle proteine bersaglio, sembrerebbe svolgere un duplice ruolo nel pathway di attivazione di NF- κ B. Da una parte, esso svolge un ruolo di proteina adattatrice per attivare la trasmissione del segnale al fattore di trascrizione NF- κ B.

Dall'altra, esso può coniugare SUMO-1 alla proteina IκBα. Questa coniugazione è inibita dalla fosforilazione di IκBα ed accade al residuo di lisina 21, sito anche di ubiquitinazione. Di conseguenza, la coniugazione di SUMO-1 a IκBα ne ibisce la sua ubiquitinazione, creando, così, un pool di NF-κB non inducibile. In questo modo, SUMO-1 agisce in maniera antagonista all'ubiquitinazione. Dato che, l'equilibrio tra la forma di IκBα modificata da SUMO-1 e la forma IκBα ubiquitinata varia in differenti tipi cellulari, questo può fornire un meccanismo attraverso il quale la cellula può regolare la quantità di NF-κB disponibile per l'attivazione trascrizionale (Desterro J.M. et al., 1997; Tashiro K. et al., 1997).

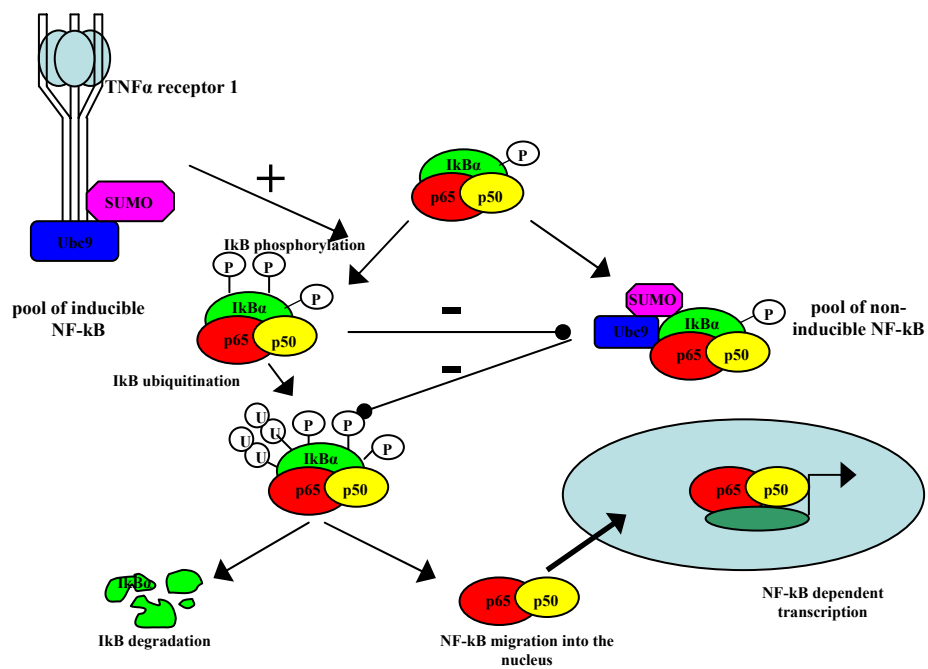


Fig.8: Ruolo di SUMO-1 ed Ubc9 nel pathway di traduzione del segnale NF-κB

Meccanismi di regolazione trascrizionale SUMO-dipendenti

Come le altre modificazioni post-traduzionali, gli effetti della SUMOylazione sull'attività dei fattori di trascrizione è piuttosto varia. Nella maggior parte dei casi, la SUMOylazione svolge un ruolo prominente nel reprimere l'attività trascrizionale (Gill G., 2003).

Un esempio è dato dal recettore nucleare androgenico (AR). In effetti, nella sua regione N-terminale sono stati identificati tre residui di lisina, localizzati in posizione 347, 386 e 520, che vengono modificati dal peptide SUMO (Poukka H. et al., 2000). Più precisamente, tali siti di SUMOylazione sono localizzati nella regione coinvolta nell'interazione con il ligando, il che porta ad una perturbazione della capacità del recettore androgenico a stabilire dei contatti intramolecolari (Ikonen T. et al., 1997).

La SUMOylazione del recettore androgenico molto probabilmente rappresenta un meccanismo per una rapida e reversibile attenuazione della sua funzionalità in differenti modelli cellulari. La SUMOylazione del recettore androgenico potrebbe essere implicata nella regolazione di vari processi fisiologici e patologici (Poukka H. et al., 2000).

Sebbene la SUMOylazione della maggior parte dei fattori di trascrizione abbia come conseguenza una repressione della loro attività, tale modificazione sembra avere effetti positivi sull'attivazione trascrizionale dell'heat shock factor 1 e 2 (HSF1 e HSF2), le quali vengono prodotte in condizioni di stress (Goodson M.L., et al., 2001; Hong Y. et al., 2001).

Un altro esempio di regolazione positiva da parte del peptide SUMO è dato dalla proteina p53, considerata "il guardiano del genoma" a causa del suo ruolo cruciale nel coordinare le risposte cellulari agli stress genotossici (Gostissa M. et al., 1999; Rodriguez M.S. et al., 1999; Müller Set al., 2000). In seguito ad esposizione delle cellule ad irraggiamento con UV, il peptide SUMO si lega al residuo di lisina 386, localizzato nella regione C-terminale della proteina p53, aumentandone

la sua attività trascrizionale (Kubbutat M.H. et al., 1998; Honda R. et al., 1999). Tale aumento potrebbe essere dovuto sia ad un aumento nella stabilità della proteina che ad alterazioni della sua localizzazione subcellulare. La SUMOylazione di p53 potrebbe causare un cambiamento conformazionale della struttura della stessa, con conseguente aumento dell'attività di legame al DNA oppure potrebbe stimolare il reclutamento di co-attivatori, come CBP/p300. Inoltre, è anche possibile che tale modificazione avvenga a livello nucleare, aumentando il contenuto nucleare di p53 in distinti domini subnucleari, che rappresentano siti attivi di trascrizione (Gostissa M. et al., 1999; Rodriguez M.S. et al., 1999; Müller Set al., 2000).

Materiali e Metodi

Analisi dei siti consenso per SUMO

I motivi consenso per la modificazione delle proteine da parte di SUMO sono stati ricavati usando il seguente programma Bio-informatico: <http://www.abgent.com/doc/sumoplot>.

Topi, colture cellulari, trasfezioni ed esperimenti di shock da siero.

I topi wild-type, clock/clock, Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-} e Per1^{-/-}, prima di essere posti in condizioni di buio costante, sono stati esposti a 12 ore di luce e 12 ore di buio, per 14 giorni. Dopo un primo ciclo di buio costante, a tempi selezionati, gli animali sono stati uccisi per dislocazione cervicale ed i fegati sono stati dissezionati e congelati in ghiaccio secco (Matsuo T. et al., 2003). La cronologia sperimentale è stata misurata in Zeitgeber Time (ZT), con fase luminosa con inizio alle 7AM (ZT0) e fase buia con inizio alle 7PM (ZT12).

Le cellule COS-1, coltivate in mezzo DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), contenente il 5% di FBS (fetal bovine serum), sono state trasfettate mediante CaCl₂-Fosfato e raccolte dopo 48 ore dalla trasfezione. Le cellule MEF sono state preparate, come precedentemente descritto da Pando M.P. et al., 2002, coltivate nel DMEM, contenente il 10% di FBS e trasfettate con il reagente Jet Pi (Polyplus), come da protocollo allegato.

Le cellule MEF (mouse embryo fibroblasts) da topi Bmal1^{-/-} sono state donate da C. Bradfield (University of Wisconsin).

I fibroblasti NIH-3T3, invece, sono stati cresciuti in DMEM, contenente il 10% di NCS (new calf serum). Dopo 4 giorni dall'infezione, i fibroblasti sono stati tenuti per 2 giorni nel mezzo, contenente l'0,5% di siero. Al tempo zero (t=0), al mezzo è stato aggiunto il 50% di HS (horse serum), il quale dopo 2 ore è stato sostituito con del DMEM, contenente l' 0,5% di siero (Balsalobre A. et al., 1998). A tempi

stabiliti, sono stati estratti sia l'RNA totale che le proteine (Pando M.P. et al., 2002).

Plasmidi e reagenti

Il plasmide pCS2/Myc-mBMAL1 è ottenuto da pCS2 tramite l'aggiunta di 5 sequenze Myc-Tag all'estremità 5' del cDNA-; il plasmide pSG5/Flag-mCLOCK è stato preparato come descritto da Travnickova-Bendova Z. et al., 2002. I plasmidi pFLAG-Ubc9 e pGFP-SUMO1 sono stati preparati come descritto da Pokka H. et al., 2000. I mutanti pSG5/6xHis-hSUMO1 (G97A) ed i mutanti di mBMAL1 Lys→Arg sono stati ottenuti utilizzando il kit di mutagenesi QuickChange (Stratagene), ed ulteriormente confermati dal sequenziamento del DNA plasmidico. I vettori pCLNCX (IMGENEX), esprimenti la proteina Myc-mBMAL1 sotto il controllo del promotore di *mBmal1*, sono stati ottenuti sostituendo l'intera sequenza del promotore CMV con la sequenza del promotore *mBmal1*, compresa tra -816 e +99 (Yu W. et al. 2002). Il promotore di *mBmal1* è stato ottenuto dal DNA genomico di topo, tramite PCR, usando i seguenti oligo: 5'-GAGATCTCCCTGCCTCAGCTTCTTGAG-3' e 5'-CAAGCTTCCGCACTCGGATCCCGCTGC-3'. L'inibitore N-ethylmaleimide (NEM) è stato comprato alla ditta SIGMA e preparato fresco prima di ogni esperimento. Le sostanze MG132 e la Leptomicina B sono stati acquistati, rispettivamente, alla Calbiochem e alla SIGMA.

Anticorpi

L'anticorpo anti-Myc 9E10 è stato acquistato dalla Transduction Laboratories. L' anticorpo policlonale specifico anti-mBMAL1 è stato già descritto da Tamaru T. et al., 2003. Abbiamo anche prodotto un altro anticorpo policlonale anti-BMAL1, immunizzando conigli con dei KLH-coniugati del peptide NH₂-TDKDDPHGRLEYAEHQGRC-, che

corrisponde alla sequenza BMAL1 di topo. L'antisiero è stato purificato per affinità ed è stata testata la sua specificità.

L'anticorpo anti-SUMO (clone: 21C7) è stato acquistato alla Zymed Laboratories Inc.. L'anticorpo anti-RanGAP1 è stato gentilmente donato da F. Melchior (Max-Planck Institute for Biochemistry, Germany). L'anticorpo anti-PER1 è stato ottenuto come riportato in Cermakian N. et al., 2001. L'anticorpo anti- α -Tubulin è stato acquistato dalla SIGMA. L'anticorpo anti-TBP 3G3 è stato fornito dalla "facility" degli anticorpi dell'IGBMC, Strasbourg, France.

Estratti proteici, Immunoprecipitazioni e Western blotting

Le cellule COS-1, raccolte in PBS 1X (phosphate-buffered saline 1X), contenente N-ethylmaleimide (NEM) 20mM, inibitori di proteasi 1X, PMSF 1mM, sono state lisate nel buffer RIPA-1 (radioimmunoprecipitation assay-1), contenente Tris-HCL [pH 7.8] 50nM, NaCl 150mM, EDTA 5mM, MgCl₂ 15mM, Nonidet P-40 1%, sodium deoxycolate (DOC) 0,5%, dithiothreitol (DTT) 1mM, inibitori di proteasi 1X, NEM 10nM e PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride) 1mM e poi immediatamente congelate in azoto liquido. I campioni di fegato (0,3g) sono stati omogenati manualmente con pestello in PBS 1X fredda, contenente N-ethylmaleimide (NEM), inibitori di proteasi 1X ed PMSF 1 mM. I pellet delle cellule di fegato sono stati lavati con PBS 1X e lisati con il buffer RIPA-1. Gli esperimenti di immunoprecipitazione sono stati condotti nel buffer RIPA-1 con i seguenti anticorpi: anti-Myc 9E10 (1:1000), anti-mBMAL1 (1:250) e anti-RanGAP1 (1:250). Le analisi di Western blot sono state eseguite come descritto da Cermakian N. et al., 2001. I campioni proteici sono stati analizzati mediante un gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) all'8% ed al 6% (per PER1) ed immunoblottati con i seguenti anticorpi: anti-Myc 9E10 (1:4000), anti-BMAL1 (0,5 μ g/ml), anti-RanGAP1 (1:7000), anti-SUMO-1 (1:200), anti-PER1 (1:1000) ed anti-TBP (1:5000).

Saggio di clivaggio delle proteasi SUMO-specifiche

I saggi di clivaggio delle proteine SUMO-coniugate, in vitro, sono stati eseguiti come descritto (Li S.J. et al., 2000) con qualche modifica. In breve, gli estratti proteici di fegato di topo sono stati immunoprecipitati nel buffer RIPA-1 come descritto in precedenza. Gli immuno complessi sono stati lavati due volte con il buffer RIPA-1 senza NEM, poi incubati per 10' a temperatura ambiente nel buffer di digestione (Tris-HCL 50mM [pH 8.0], NaCL 150mM, dithiothreitol (DTT) 1mM, NP-40 0.2%), a cui sono stati aggiunti L-cisteina 2mM e mercaptoetanololo, allo scopo di consumare il NEM residuo. Le proteine immunoprecipitate sono state risospese in 100µl del buffer di digestione 1X, contenente 2 unità dell'enzima ricombinante ULP-1 (Invitrogen) ed incubati per 45' a 30°C in agitazione. La reazione è stata bloccata aggiungendo il "sample buffer" SDS 2X e gli immunoprecipitati sono stati analizzati tramite Western blotting.

Quantitative Real time PCR (RT-PCR)

L'estrazione di RNA totale è stata fatta usando RNA-solv (Omega Biotek), come da protocollo fornito dalla ditta. L'RNA totale è stato allora trascritto in cDNA usando M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL), con oligo esameri random. I cDNA preparati sono stati purificati e sottoposti ad analisi di PCR quantitativa usando Light Cycler (Roche Diagnostics), con il kit SYBR Green PCR (Qiagen).

Infezione retrovirale delle cellule NIH3T3 e MEF

Per produrre il retrovirus è stato utilizzato il sistema di espressione RetroMax (IMGENEX). In breve, i vettori retrovirali pCLNCX-*Bmal1*, e il vettore pMD.G/vsv-g, sono stati trasfettati in cellule HEK293-gag/pol per la produzione delle particelle virali. Dopo 48 ore dalla trasfezione, il mezzo contenente le particelle virali è stato recuperato, addizionato con 1ml di FCS (Fetal Calf Serum) e 10µl di polybrene

(4mg/ml) e filtrato (soluzione virale). Per ottenere l'infezione, le cellule NIH3T3 sono state incubate con la soluzione virale per 4h e la stessa procedura è stata ripetuta per 4 volte. Condizioni simili sono state usate per infettare le cellule MEF WT e *Bmal1* *-/-*. Dopo incubazione finale, le cellule sono state coltivate in mezzo completo ed usate per le successive analisi.

Reazione di SUMOylazione *in vitro*

Le proteine di fusione GST-SUMO_{GG}-1, GST-Ubc-9, GST-SAE2/SAE1 sono state prodotte in ceppo batterico di E. Coli, purificate con glutathione Sepharose 4B ed eluite in un buffer contenente HEPES 50mM (pH 7.8), NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM, glicerolo 10% e glutathione 20mM. La reazione di coniugazione, *in vitro*, è stata condotta come descritto da Kotaja N. et al., 2002.

Risultati e discussione

La proteina mBMAL1 è modificata da SUMO1 *in vivo*

La proteina BMAL1 è un fattore di trascrizione bHLH-PAS, contenente due domini denominati bHLH-PAS, che mediano la sua dimerizzazione con la proteina CLOCK (Dunlap J.C., 1999; Huang Z.J. et al., 1993). Tra questi due domini si trova una regione con funzioni non ancora determinate. Alcuni specifici residui di lisina contenuti in questa regione sono conservati sia evolutivamente, che tra le differenti isoforme della famiglia di BMAL1 (Fig. 1a).

Dal momento che i residui di lisina spesso possono essere oggetto di differenti modificazioni post-traduzionali (Freiman R.N. et al., 2003), abbiamo investigato se questi residui potessero costituire importanti siti regolatori. Analisi bio-informatiche della struttura primaria di BMAL1, attraverso l'uso del programma "SUMO PLOT" (<http://www.abgent.com/doc/sumoplot>) hanno rilevato che i residui di lisina, localizzati nelle posizioni 223, 229, 259 e 272 (K²²³, K²²⁹, K²⁵⁹ e K²⁷²), corrispondono ad una putativa sequenza consenso di SUMOylazione ψ KxE/D (Gill G., 2004), in cui ψ è un residuo idrofobico, x può essere un qualunque aminoacido, E e D indicano, rispettivamente, l'amminoacido Glutammato ed Aspartato (Fig.1a).

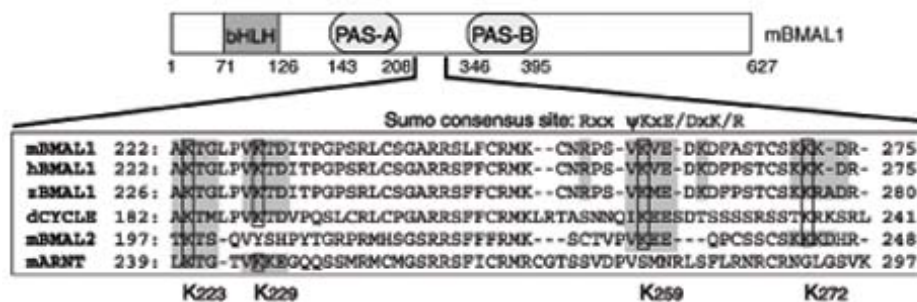


Fig.1a. Rappresentazione schematica della proteina mBMAL1 e conservazione dei residui di lisina nella regione tra i domini PAS. I residui di lisina conservati sono riportati nei riquadri. In figura sono stati messi in evidenza le potenziali sequenze consenso di SUMO. dCYCLE indica l'omologo in *Drosophila* di BMAL1. mARNT è membro della famiglia bHLH/PAS.

Allo scopo di determinare se la proteina BMAL1 potesse essere modificata da SUMO *in vivo*, abbiamo trasfettato le cellule COS1, in modo transiente, con i vettori di espressione per le proteine Myc-BMAL1, His-SUMO1, GFP-SUMO1 e His-SUMO1 (G97A).

Quando il vettore di espressione Myc-BMAL1 era co-espresso con i vettori di espressione per His-SUMO-1 o GFP-SUMO1, i dati di Western blot hanno messo in evidenza una forma di Myc-BMAL1 ad alto peso molecolare, proporzionale alla taglia della modificazione aggiunta. Al contrario, non è stata osservata nessuna modificazione quando Myc-BMAL1 era co-espresso con His-SUMO1(G97A), in cui il residuo di glicina in posizione 97 è stato mutato in alanina, impedendo, così il legame del peptide SUMO ai substrati specifici (Kamitani T. et al., 1997).

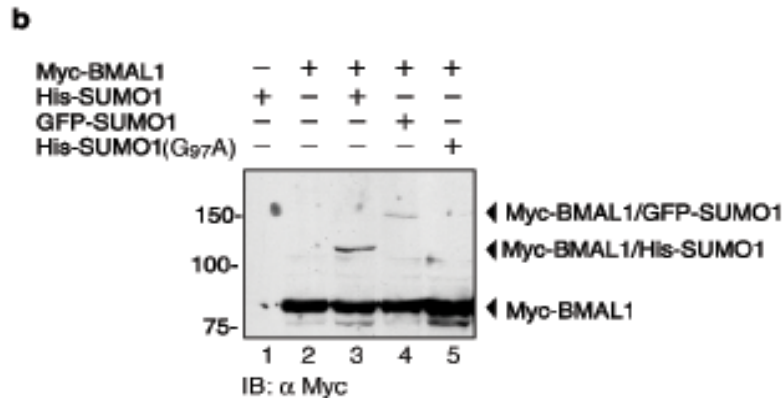


Fig.1b: Le cellule COS1 sono state trasfettate con vettori di espressione per Myc-Bmal1, His-SUMO1, GFP-SUMO1 e His-SUMO1(G97A). Gli stessi estratti cellulari sono stati immunoblottati (IB) con un Ab anti- α Myc.

La SUMOylazione è stata, altresì, confermata quando i lisati cellulari, esprimenti Myc-BMAL1 e His-SUMO1, sono stati immunoprecipitati con l'Ab anti-Myc e successivamente, rilevati, mediante Western blot con l'Ab anti-SUMO1 (Fig.1c).

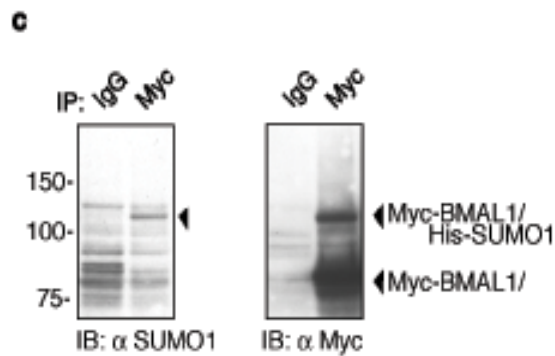


Fig.1c: Pannello a sinistra. I lisati cellulari esprimenti Myc-Bmal1 ed His-SUMO1 sono stati immunoprecipitati con l'Ab anti-Myc e delle IgG di controllo e poi rilevati mediante Western blotting con l'Ab anti-SUMO1.

Pannello a destra. La stessa membrana è stata strippata e trattata con l'Ab anti-Myc.

Il passo successivo è stato quello di verificare se la SUMOylazione di BMAL1 venisse influenzata, *in vivo*, da enzimi specifici che controllano tale modificazione. A tale scopo abbiamo espresso transientemente in cellule COS-1 l'enzima UBC-9 (ubiquitin-like conjugating enzyme 9), una ligasi di tipo E2, che attiva il trasferimento del peptide SUMO su substrati specifici (Gill G., 2004). I dati riportati in Fig. 1d hanno messo in evidenza che la SUMOylazione di BMAL1 aumenta in presenza dell'enzima UBC-9. Al contrario, la co-espressione della proteasi SUMO-specifica SENP1 (Bailey D. et al., 2004) riduce drasticamente i livelli (Fig. 1d; Fig. S1a) di proteina modificata.

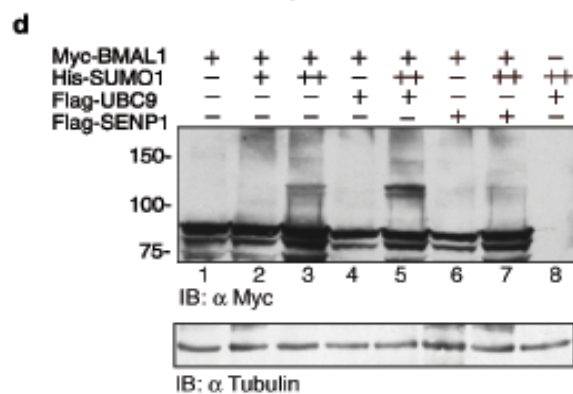


Fig.1d: Le cellule COS1 sono state trasfettate con vettori di espressione per Myc-BMAL1 (0.25 μ g), His-SUMO1 (+, 0.5 μ g; ++, 1 μ g), Flag-UBC9 (1 μ g) e Flag-SENP1 (1 μ g) e gli estratti proteici sono stati immunoblottati con l'Ab anti-Myc.

Il pannello in basso mostra un immunoblot con l'Ab anti- α -tubulina, che proviene dalla parte inferiore della stessa membrana.

Esperimenti di mutagenesi sito-diretta dei residui di lisina in arginina, hanno dimostrato che la lisina in posizione 259 è il maggiore sito di SUMOylazione, *in vivo* (Fig. 1a e 1e; Fig. S1b). E' importante notare, che il residuo K259 si trova nella sequenza RxxVKVExK (Fig. 1a) (Sternsdorf T. et al., 1999).

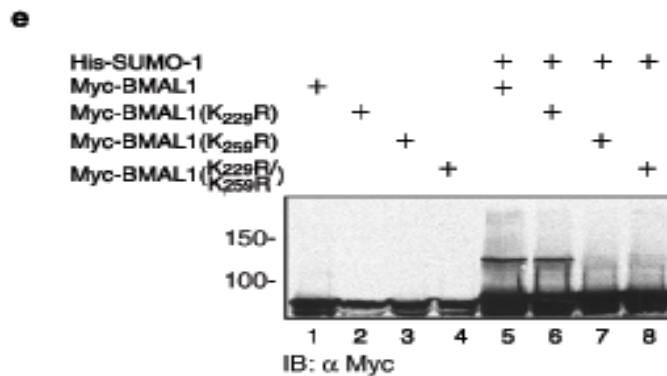


Fig. 1e: Gli estratti proteici delle cellule COS1, esprimenti le proteine His-SUMO1 con BMAL1 wild type o i mutanti Lys→Arg di BMAL1 sono stati immunoblottati con l'Ab anti-Myc.

Inoltre, saggi di SUMOylazione, *in vitro*, hanno confermato che BMAL1 è modificato da SUMO-1 specificatamente a livello del residuo K259 (Fig. S1c). In accordo con questi dati, abbiamo verificato che BMAL1, *in vivo*, può anche essere modificato da SUMO-2 nello stesso residuo, in misura comparabile a SUMO-1 (Fig. S2).

La SUMOylazione di BMAL1 *in vivo* è regolata in modo circadiano

Al fine di stabilire l'importanza della SUMOylazione, *in vivo*, abbiamo investigato la regolazione della SUMOylazione di BMAL1 in tessuti dell'orologio periferico e specificatamente in estratti proteici di fegato di topi (Young M.W. et al., 2001; Lowrey P.L. et al., 2000; Schibler U. et al., 2002). Dopo aver sottoposto per due settimane i topi ad un regime di fotoperiodo controllato in specifici isolatori (12h luce-12h buio), abbiamo sacrificato gli animali a differenti tempi "zeitgeber (ZT)" e prelevato il fegato. Gli estratti proteici dal tessuto sono stati preparati in presenza ed in assenza di N-Ethylmaleimide (NEM), un inibitore delle

proteasi di SUMO, in maniera tale da stabilizzare le proteine modificate da SUMO (Suzuki T. et al., 1999) (Fig. 2). Le proteine sono state quindi analizzate mediante immunoblot con l'anticorpo anti-BMAL1.

L'analisi mostra che la proteina BMAL1 presenta ritmicità sia nei livelli di proteina che nella fosforilazione, con forme iperfosforilate a ZT9 e a ZT15, che anticipano i più bassi livelli proteici a ZT21 (Fig. 2a, pannello superiore). Tali dati sono congruenti con precedenti dati di letteratura (Lee C. et al., 2001; Tamaru T. et al., 2003).

Una lunga esposizione della membrana di immunoblot, rivela che l'inibitore NEM stabilizza una forma ad alto peso molecolare di BMAL1 (circa 100 Kda), congruente con una possibile forma SUMOylata della proteina, la cui quantità oscilla in maniera circadiana, con un picco a ZT9 (Fig. 2a, pannello intermedio). Non sono state individuate forme di BMAL1 stabilizzate da NEM a ZT15 e ZT21 (Fig. 2a, linee 3-4; Fig. S3). Non sono state rilevate forme SUMOylate di BMAL1 in assenza di NEM (Fig. 2a, linee 5-8). Come controllo della periodicità circadiana, negli stessi estratti, sono stati valutati i livelli della proteina PERIOD 1 (PER1) (Fig. 2a, pannello inferiore).

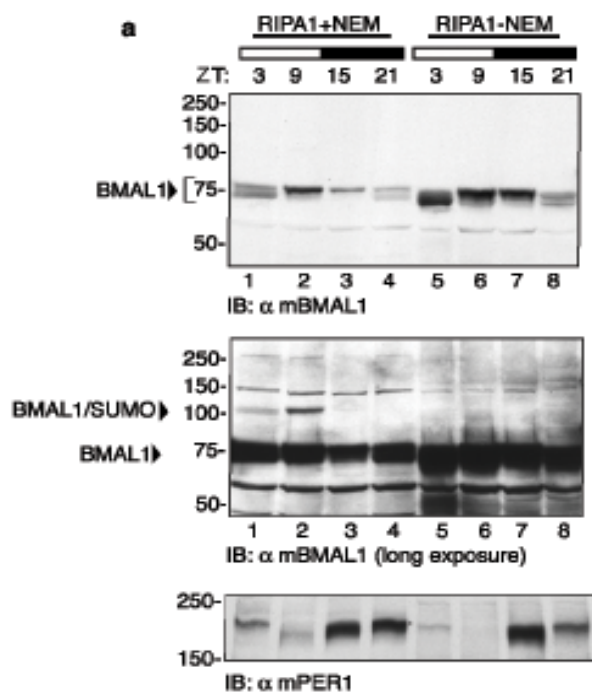


Fig. 2a: Pannello superiore: Immunoblot con l'Ab anti- α mBMAL1 degli estratti proteici di fegato di topo ai tempi Zeitgeber (ZT) indicati, preparati con il buffer RIPA1, in presenza o in assenza dell'inibitore NEM. Le barre bianche e nere indicano il regime di fotoperiodo applicato.

Pannello intermedio: Una più lunga esposizione della stessa membrana mostra una forma di BMAL1 di 100 KDa (BMAL1-SUMO) stabilizzata dal NEM.

Pannello inferiore: Immunoblot degli stessi estratti di fegato con l'Ab anti-mPER1.

L'identità della proteina di 100 KDa stabilizzata dal NEM è stata ulteriormente confermata da un'esperienza di immunoprecipitazione con anticorpo anti-mBMAL1 (Fig. 2b).

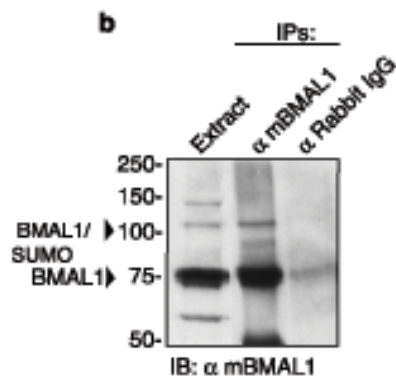


Fig. 2b: Immunoprecipitazione degli estratti di fegato, in presenza di NEM, al tempo ZT9 con l'Ab anti-BMAL1 ed delle IgG di controllo e successiva rilevazione, mediante Western blot, della proteina nativa BMAL1.

L'effetto dell'inibitore NEM è stato verificato analizzando, negli stessi estratti, i livelli della proteina RanGAP1 (Fig. S4). Inoltre, negli estratti di fegato, la forma SUMOylata di BMAL1 di 100 KDa, risulta essere clivata dalla proteasi SUMO-specifica ULP1 (Li S.J. et al., 1999) (Fig. 2c, linee 4-5).

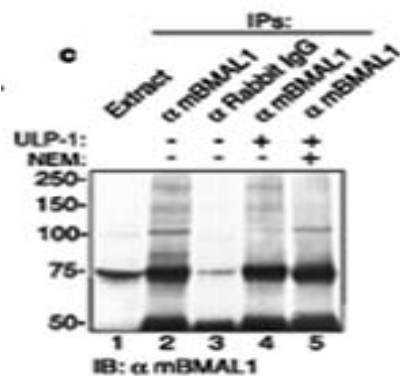


Fig. 2c: Gli immunocomplessi ottenuti come in (b) sono stati incubati con 2 unità di proteasi ricombinante ULP1 ed analizzati mediante immunoblot con l'Ab anti-

BMAL1. L' inibizione con il NEM (5mM) è stata ottenuta mediante preincubazione di ULP1 prima del saggio di clivaggio. Una più bassa esposizione di questo immunoblot mostra che sono state immunoprecipitate per ogni campione quantità equivalenti di BMAL1 (Fig. S8).

Simili risultati sono stati ottenuti quando l'enzima ULP1 è stato testato su SUMO-RanGAP1 (Fig. S5).

La SUMOylazione in vivo è stata, altresì, confermata dal momento che la forma immunoprecipitata di BMAL1 di 100 KDa reagisce con l'anticorpo anti-SUMO-1 (Fig. 2d).

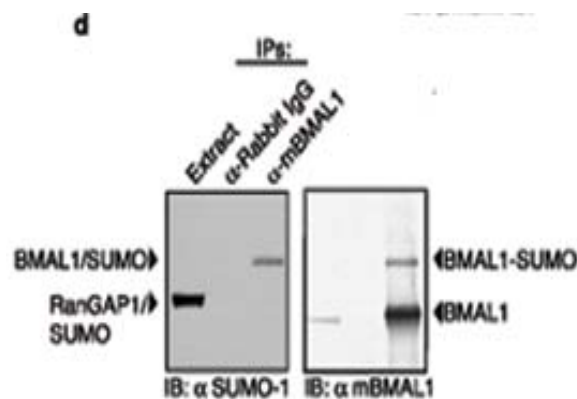


Fig. 2d: Gli immunoprecipitati ottenuti come in (b) con l'anticorpo anti-BMAL1 o con delle IgG di controllo sono stati analizzati mediante Western blot con l'Ab anti-SUMO1 (**sinistra**). La stessa membrana è stata strippata ed analizzata mediante immunoblot con l'Ab anti-BMAL1 (**destra**).

Dal momento che l'espressione genica di SUMO non subisce oscillazioni di rilievo (Fig. S6), possiamo affermare che la SUMOylazione ritmica di BMAL1 dipende unicamente dalla attivazione circadiana della stessa proteina.

La proteina CLOCK induce la SUMOylazione di BMAL1 in vivo

Per indurre la trascrizione dei geni bersaglio, ad esempio i geni *Periods*, BMAL1 deve eterodimerizzare con la proteina CLOCK (Dunlap J.C., 1999; Young M.W. et al., 2001; Lowrey P.L. et al., 2000; Cermakian N. et al., 2000). D'altra parte, CLOCK, attraverso un meccanismo non ancora noto, può, a sua volta, indurre la fosforilazione di BMAL1 (Kondratov R.V. et al., 2003). I dati precedenti hanno messo in evidenza che la fosforilazione e la SUMOylazione della proteina BMAL1 aumentano in parallelo al tempo ZT9, in concomitanza all'induzione dell'espressione dei geni *Period*, a loro volta coinvolti nella regolazione dei ritmi circadiani (Fig. S7). Ciò potrebbe indicare che la formazione dell'eterodimero CLOCK:BMAL1 controllerebbe sia la fosforilazione che la SUMOylazione di BMAL1.

A tal proposito, per meglio chiarire il ruolo di CLOCK nel processo di SUMOylazione che coinvolge BMAL1, abbiamo co-espresso in cellule COS-1, i vettori di espressione Myc-BMAL1 o il suo mutante Myc-BMAL1 (K259R) in presenza di quantità crescenti di Flag-CLOCK. I risultati ottenuti, mediante western blot, hanno messo in evidenza che la proteina CLOCK induce la SUMOylazione di BMAL1 in maniera dose-dipendente. Al contrario, il mutante Myc-BMAL1(K259R) risultava essere refrattario all'effetto di CLOCK (Fig. 3a; Fig. S9).

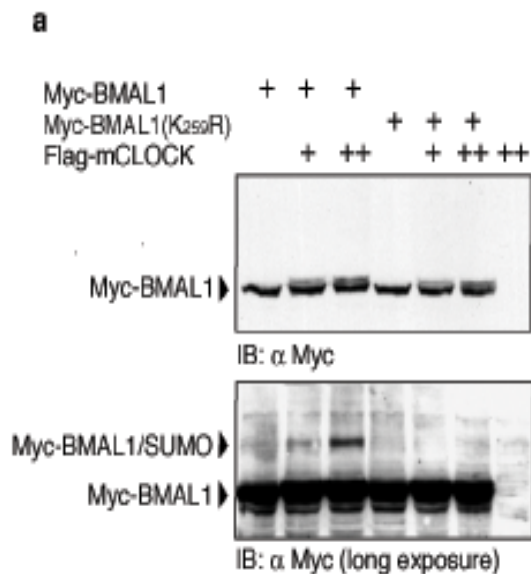


Fig. 3a: Pannello superiore: Le cellule COS-1 sono state trasfettate con vettori di espressione per Myc-BMAL1, il mutante Myc-BMAL1 (K259R) e Flag-mCLOCK e gli estratti cellulari sono stati immunoblottati (IB) con l'Ab anti- α Myc.

Pannello inferiore: Una più lunga esposizione della stessa membrana.

Un analogo esperimento è stato riproposto su estratti epatici di topi wild-type e di topi portatori di mutazioni delle proteine clock [topi *Cry1^{-/-}/Cry2^{-/-}* (*Crys^{-/-}*), *Clock/Clock* (*Clk/Clk*) e *Per1^{-/-}*] (Fig. 3b; Fig. S10).

Per valutare i risultati ottenuti in tal senso, è bene ricordare brevemente che l'omeostasi funzionale del clock biologico viene mantenuto da molteplici fattori (Cermakian N. et al., 2000; Okamura H., 2004), tra cui quelli di natura proteica, che includono i prodotti dei geni *Period*, regolati positivamente dall'eterodimero CLOCK:BMAL1 (Darlington T.K. et al., 1998) e dei geni Cryptochrome (*Cry1* e *Cry2*), i cui prodotti agiscono da repressori trascrizionali (Griffin E.A. et al., 1999).

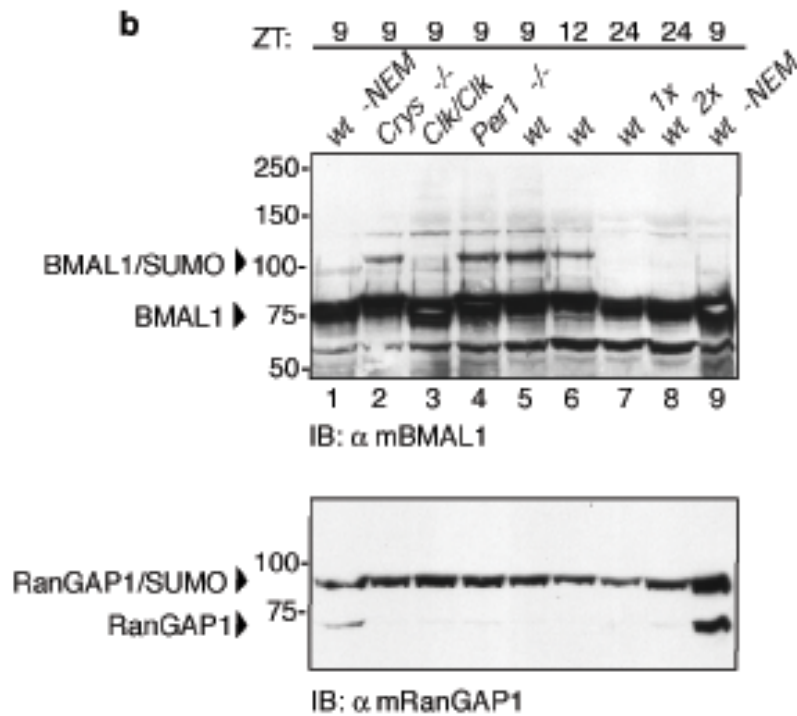


Fig. 3b: Pannello superiore: Immunoblot degli estratti proteici totali di fegato derivati dai topi wild-type (wt), *Crys*^{-/-}, *Clk/Clk* e *Per1*^{-/-}, prelevati e lisati con il buffer RIPA1 ai tempi zeitgeber indicati (ZT). Come controlli, gli estratti proteici preparati senza detergente forte e NEM (linea 1) o senza NEM (linea 9). Nella linea 8, è stata caricata due volte la quantità della proteina.

Pannello inferiore: La stessa membrana è stata strappata ed immunoblottata con l'Ab anti-RanGAP1. Inoltre, l'immunoprecipitazione con l'Ab anti-BMAL1 conferma che SUMO-BMAL1 non è individuabile negli estratti di fegato prelevati dai topi *Clk/Clk* (Fig. S11).

Come mostrato in Fig. 3b (pannello superiore), non si osserva nessuna riduzione nei livelli di SUMO-BMAL1, sia negli estratti di fegato di topi *Per1*^{-/-} (Cermakian N. et al., 2001), che in quelli *Cry1*^{-/-}/*Cry2*^{-/-} (van der Horst G.T. et al., 1999), ma bensì si osserva un drammatico effetto sulla SUMOylazione di BMAL1 nei topi *Clk/Clk* (Antoch M.P. et al., 1997). La riduzione di SUMOylazione sembra essere specifica per

BMAL1, in quanto non è stata individuata negli stessi estratti nessuna differenza nei livelli della proteina RanGAP1 modificata da SUMO (Fig. 3b, pannello inferiore). Inoltre, non è stata individuata nessuna forma di BMAL1 SUMOylata nei fibroblasti embrionali di topo (MEFs), derivati dai topi *Clk/Clk* (Fig. 3c), mostrando, così che l'effetto esercitato da CLOCK non è circoscritto al fegato.

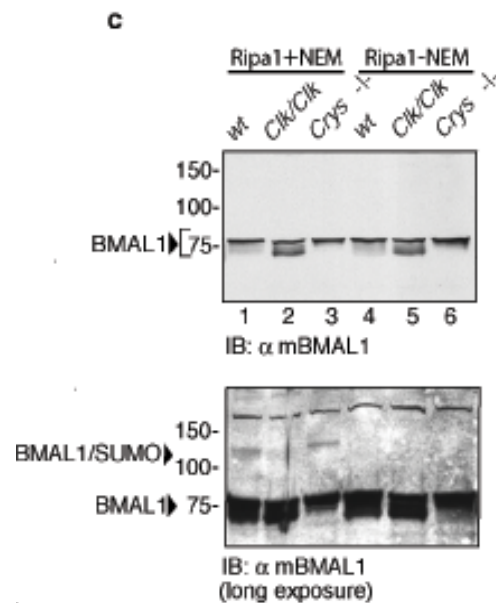


Fig. 3c: Pannello superiore: Western blot degli estratti proteici di cellule MEF, derivate dai topi wild-type, *Clk/Clk* e *Crys*^{-/-}, in presenza ed in assenza di NEM, con l'Ab anti-BMAL1.

Pannello inferiore: Una più lunga esposizione dello stesso filtro rileva la forma SUMOylata di BMAL1.

Allo scopo di definire un ruolo causale della proteina CLOCK nella SUMOylazione di BMAL1, abbiamo ripristinato l'espressione transiente del gene wild type *Clock* nelle cellule MEF *Clk/Clk* (Fig. 3d, linea). Tale esperimento mostra che la SUMOylazione di BMAL1 può essere ripristinata e conferma, quindi, che per la SUMOylazione di BMAL1 è essenziale la presenza di una proteina CLOCK funzionale.

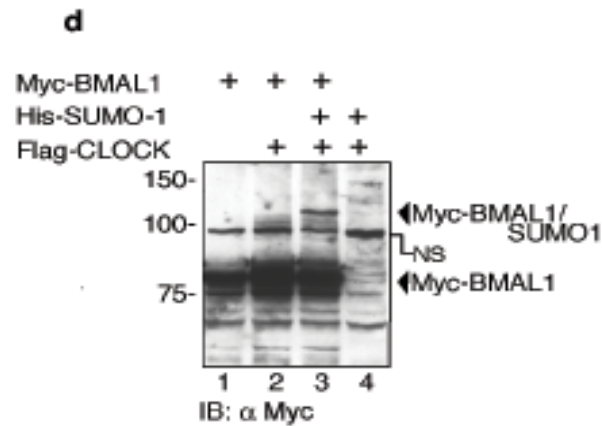


Fig. 3d: Western blot degli estratti proteici di cellule MEF *Clk/Clk* con l'Ab anti- α Myc. Le cellule MEF sono state trasfettate transientemente con vettori di espressione per Myc-BMAL1, His-SUMO1 e Flag-CLOCK. NS, non specifico. E' indicata la forma SUMOylata di BMAL1.

E' interessante notare, dal momento che il mutante della proteina CLOCK presente nei topi *Clk/Clk* è ancora capace di eterodimerizzare con BMAL1 e di legare il DNA (Antoch M.P. et al., 1997), è possibile ipotizzare che la SUMOylazione possa essere un evento «a valle» all'attivazione trascrizionale.

La SUMOylazione di BMAL1 controlla l'orologio circadiano

Al fine di verificare se la SUMOylazione potesse regolare il comportamento circadiano di BMAL1, abbiamo prodotto un sistema di espressione retrovirale per Myc-BMAL1 e per il suo mutante Myc-BMAL1(K259R) sotto il controllo del promotore *Bmal1*. Le cellule

scelte per questo tipo di esperimento sono state le cellule NIH3T3, sottoposte, dopo infezione, a serum-shock, in modo da analizzare l'oscillazione ritmica dell'espressione della proteina BMAL1. Questo approccio permette di analizzare l'oscillazione dei geni e delle proteine dell'orologio circadiano mediante un modello cellulare (Balsalobre A. et al., 1998). Dopo serum-shock, mentre l'espressione di BMAL1 wild type presenta un primo picco a 20 ore ed un secondo picco di minore ampiezza a 44 ore, l'espressione del mutante Myc-BMAL1(K259R) non ha mostrato nessuna oscillazione (Fig. 4a).

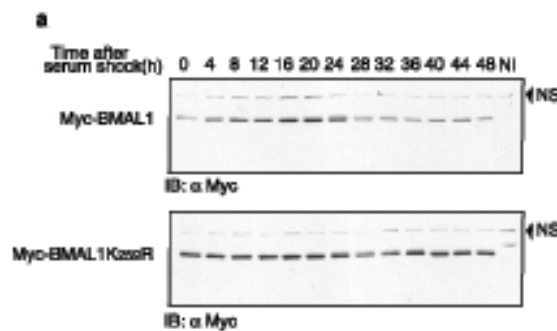


Fig. 4a: Immunoblot con l'Ab anti- α Myc dei lisati totali di cellule NIH3T3 infettate con vettori retrovirali, esprimenti Myc-mBMAL1 wild-type (**pannello superiore**) o il mutato Myc-mBMAL1 K259R (**pannello inferiore**) sotto il controllo del promotore *Bmal1*. Uguali efficienze di infezione sono state ottenute per entrambi i virus, come rilevato dall'analisi quantitativa dell'espressione del gene neomicina-resistente (NEO^r). Al tempo T=0, le cellule private di siero sono state messe in un mezzo contenente il 50% di siero di cavallo e raccolte dopo serum shock ai tempi sopra indicati. NI: cellule non infettate; NS: banda non specifica.

I risultati sono stati quantificati e normalizzati mediante un immunoblot con l'Ab anti-TATA binding protein (TBP). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, che hanno dato risultati equivalenti.

Questi risultati supportano ulteriormente l'ipotesi che la SUMOylazione conferisce di per sè la ritmicità alla proteina BMAL1. Nel contempo, i

risultati hanno dimostrato che sotto la regolazione del promotore *Bmal1* o di un promotore eterologo, la proteina Myc-BMAL1 (K259R) è circa due volte più abbondante della proteina Myc-BMAL1 (Fig. S1b), ad indicare che la mancanza di SUMOylazione può influenzare la stabilità della proteina.

Per meglio investigare questo aspetto, abbiamo eseguito un'analisi di stabilità delle proteine, in cellule NIH3T3, trasfettate con uguali quantità di Flag-CLOCK con Myc-BMAL1 o Myc-BMAL1 (K259R) e trattate successivamente con cicloesimide, un inibitore della traduzione. Tali esperimenti hanno rilevato un aumento della stabilità di Myc-BMAL1 (K259R), di circa il 50% rispetto a quella del BMAL1 wild type (Fig. 4b).

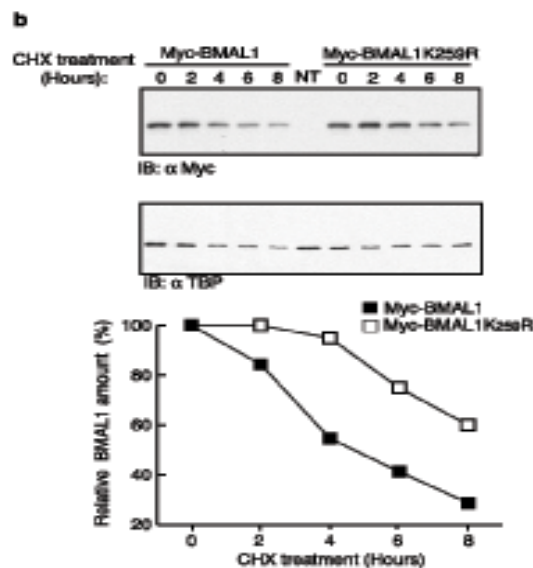


Fig. 4b: Le cellule NIH3T3 sono state trasfettate con uguali quantità di Flag-CLOCK con Myc-BMAL1 o Myc-BMAL1 (K259R). Dopo 36h di trasfezione le cellule sono state trattate con cicloesimide (CHX) a 50 μ g/ml. Ai tempi sopra indicati, le cellule sono state lisate e gli estratti proteici sono stati immunoblottati con l'Ab anti-Myc (**pannello superiore**) e l'Ab anti-TBP (**pannello intermedio**), usato come controllo di loading. NT: cellule non trasfettate. Risultati analoghi sono stati ottenuti nelle cellule COS1 (Fig. S12).

Pannello inferiore: Gli immunoblot sono stati quantificati mediante analisi densitometrica. Il grafico mostra la percentuale della quantità di proteina relativa al tempo T=0 (100%). I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti che hanno dato risultati analoghi.

Al fine di stabilire un'eventuale funzione della SUMOylazione di BMAL1 nel controllo dell'orologio circadiano, abbiamo eseguito degli esperimenti di «riattivazione di BMAL1», in cellule MEF derivate da topi *Bmal1*^{-/-} (Bunger M.K. et al., 2000). Queste cellule non presentano espressione di BMAL1 (Fig. 4c, linea 1). Le cellule MEF *Bmal1*^{-/-} sono state successivamente infettate con dei vettori retrovirali, già menzionati in precedenza (Fig. 4a), per consentire l'espressione di BMAL1 (Fig. 4c, linee 2-4) o del suo mutante BMAL1 (K259R) sotto il controllo del proprio promotore (Fig. 4c, linee 8-10).

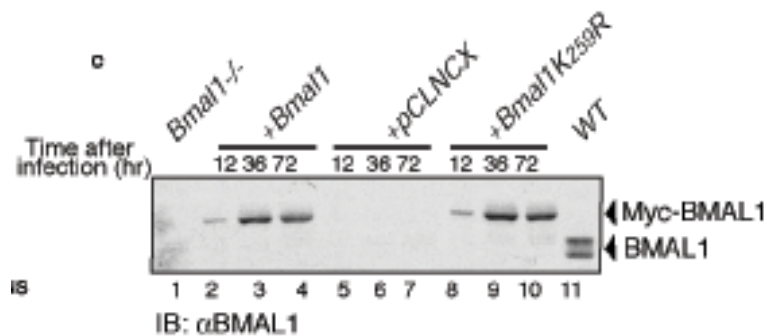


Fig. 4c: Espressione ectopica di BMAL1 (linea 2-4) ed il mutante BMAL1 (K259R) (linee 8-10) nelle cellule MEFs *Bmal1*^{-/-}. I livelli di espressione della proteina BMAL1 sono stati valutati mediante immunoblot con l'Ab anti-BMAL1 ai tempi indicati dopo infezione con vettori retrovirali. Gli estratti proteici delle cellule MEFs infettate con un vettore vuoto (linee 5-7), wild-type MEFs (linea 11) e MEFs *Bmal1*^{-/-} (linea 1) sono stati analizzati come controllo.

Per studiare la funzionalità dell'orologio circadiano in queste linee cellulari così ottenute, abbiamo misurato l'espressione, indotta da serum shock, del gene *Dbp* (D-site albumin promotor-binding protein), un gene regolato dall'eterodimero CLOCK:BMAL1 (Balsalobre A. et al., 1998). Le cellule MEF wild type mostrano una consistente oscillazione circadiana del gene *Dbp*. Al contrario, le cellule MEF *Bmal1*^{-/-} presentano un'alterazione dell'oscillazione (Fig. 4d).

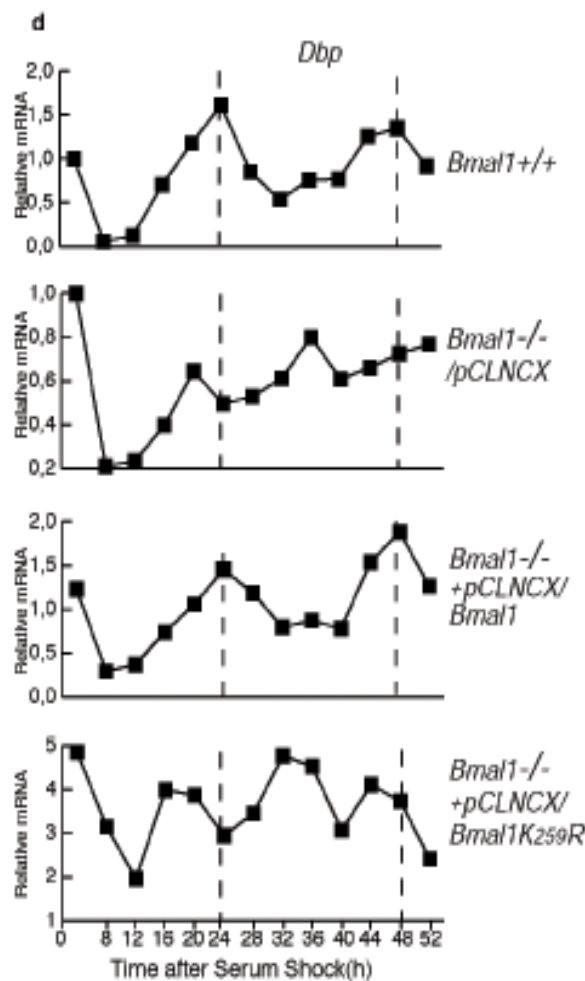


Fig. 4d: Le cellule MEFs wild-type e *Bmal1*^{-/-} sono sottoposte a serum shock dopo due giorni dall'infezione con i vettori retrovirali sopra indicati. Ai tempi indicati, le cellule sono state lisate e i livelli di espressione del *Dbp* sono stati stimati mediante analisi di real-time PCR. I valori sono stati normalizzati rispetto l'espressione di *Sumo-3*, un

gene non oscillante (Fig. S6) e graficati come quantità relativa dell'espressione *Dbp* al tempo ZT0, riferito come 1, nelle MEFs wild-type.

L'infezione delle cellule MEF *Bmal1*^{-/-} con il vettore retrovirale per BMAL1 induce una significativa "riattivazione" dell'espressione circadiana del gene *Dbp*, mentre il mutante BMAL1 (K259R) genera una ritmicità alterata. Le oscillazioni più frequenti e ravvicinate nel tempo registrate con il mutante BMAL1 (K259R) sembrerebbero riflettere un'intrinseca funzione della modificazione indotta da SUMO.

I nostri risultati forniscono dati unici ed innovativi sui meccanismi che controllano i livelli circadiani di BMAL1. Diversi meccanismi potrebbero essere proposti per spiegare le differenti oscillazioni di espressione della proteina BMAL1, come una diretta interazione tra la modificazione SUMO ed il non ancora identificato pathway di degradazione di BMAL1 oppure un'interazione SUMO-dipendente con partners che controllano la stabilità di BMAL1, tra cui lo stesso CLOCK. Dal momento che non abbiamo individuato nessuna differenza significativa nel potenziale di transattivazione di BMAL1 rispetto alla proteina mutante BMAL1 (K259R) su promotori guidati da E-box e poichè la SUMOylazione è implicata nel controllo della localizzazione cellulare dei fattori di trascrizione (Salinas S. et al., 2004), abbiamo anche verificato se il trasporto intracellulare di BMAL1 potesse essere regolato dalla sua SUMOylazione. A tal proposito, abbiamo visto che la localizzazione nucleare della proteina Myc-BMAL1 (K259R) è essenzialmente equivalente a quella della proteina BMAL1.

I risultati ottenuti con gli esperimenti di «riattivazione» (Fig. 4c, d) indicano che la SUMOylazione di BMAL1 costituisce un nuovo livello di controllo nel cuore del meccanismo dell'orologio circadiano. Sebbene la proteina BMAL1 sembri occupare una posizione privilegiata fra le proteine del clock rispetto alla SUMOylazione (Fig. 1a), si

potrebbe altresì pensare che altre proteine del clock possano essere sottoposte a modificazione da parte della proteina SUMO in differenti domini.

Studi futuri potrebbero essere mirati a delucidare quali elementi del pathway di SUMO sono selettivi per il meccanismo del clock circadiano. La recente scoperta e caratterizzazione delle ligasi di tipo E3 SUMO- specifiche può fornire degli strumenti chiave per indirizzare queste appassionanti domande biologiche.

Figure supplementari.

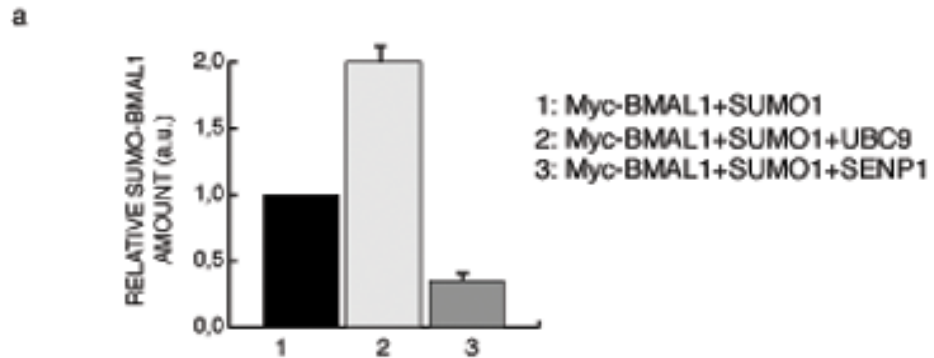


Fig.S1a: I risultati della Fig.1d sono stati quantificati mediante analisi densitometrica e graficati. Il grafico mostra i livelli della proteina BMAL1 modificato da SUMO e BMAL1 non modificato mediante le trasfezioni indicate. I valori sono relativi al grafico 1, riferito come 1. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, che hanno dato risultati equivalenti.

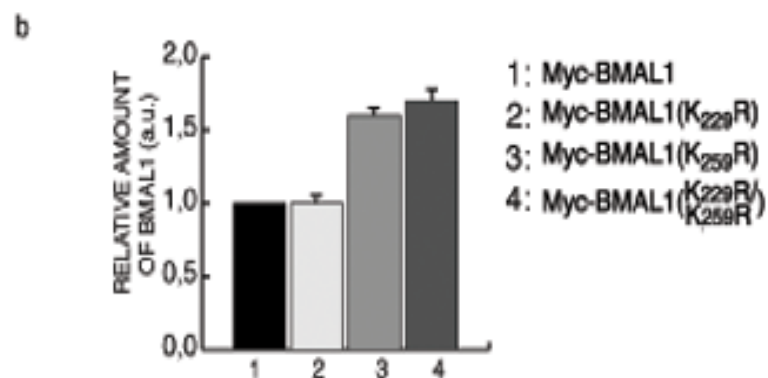


Fig. S1b: L'analisi di Western blot è stata fatta come indicato in Fig. 1e. I risultati di 8 esperimenti indipendenti sono stati quantificati mediante analisi di densitometria e graficati come livelli di proteina relativi alla proteina BMAL1, indicata come 1.

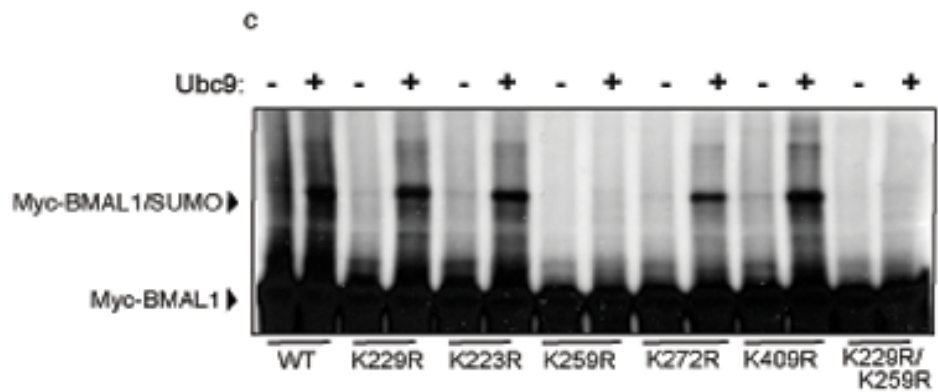


Fig. S1c: BMAL1 Wilde-Type ed gli indicati mutanti sono stati trascritti e tradotti in vitro mediante sistema di reticolociti, marcati con ^{35}S ed incubati con il ricombinante GST-SUMO1 e GST-SAE1/SAE2 in presenza (+) o assenza (-) di GST-Ubc9. Le reazioni sono state risolte in SDS-PAGE e visualizzate mediante autoradiografia. In accordo alle analisi in vivo, il residuo K259 è il principale sito di SUMOylazione.

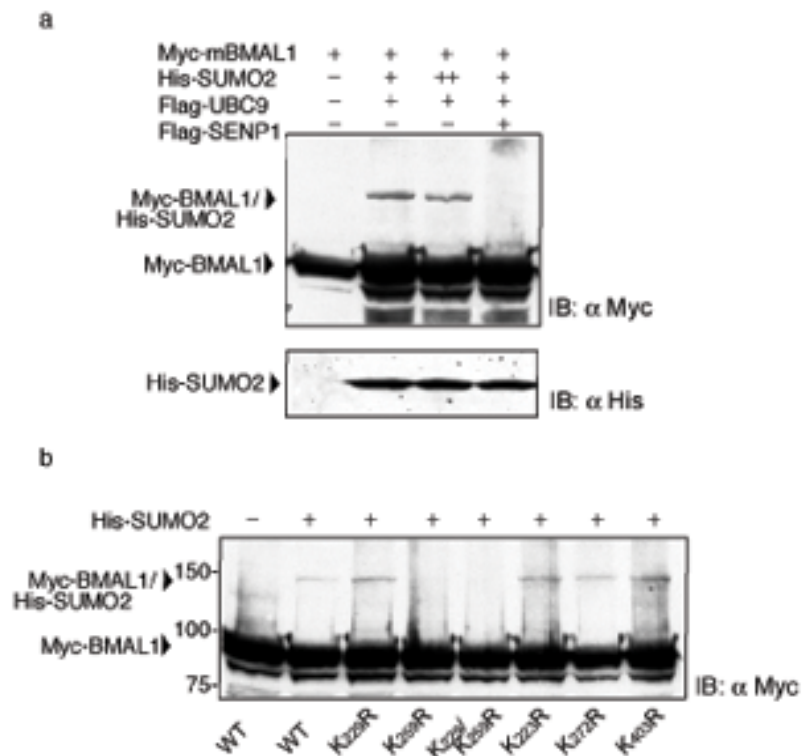


Fig. S2: (a) Cellule COS-1 sono state trasfettate con vettori di espressione per le proteine indicate e gli estratti cellulari sono stati immunoblottati con l'Ab anti-Myc. E' individuata una forma di BMAL1 modificata da SUMO-2.

(b) Identificazione del residuo K259 come principale sito di modificazione di SUMO-2. Immunoblot con l'Ab anti-Myc degli estratti proteici di cellule COS-1, esprimenti BMAL1 wild type o i mutanti Lys→Arg ed His-SUMO2.

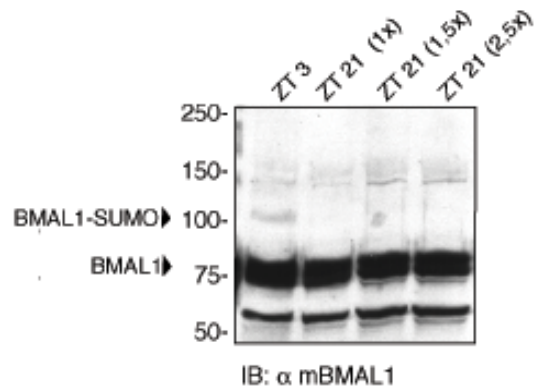


Fig. S3: Immunoblot con l'Ab anti-mBMAL1 degli estratti proteici di fegato al tempo Zeitgeber indicato. Quantità crescenti degli estratti di fegato al tempo ZT21 sono stati comparati con estratti al tempo ZT3, per escludere che una riduzione circadiana nel livello totale di BMAL1 potesse determinare una riduzione della banda di 100KDa.

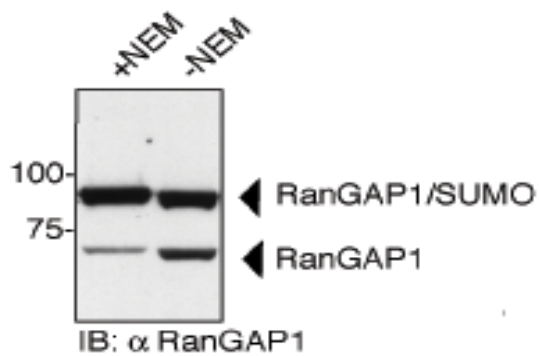


Fig. S4: Immunoblot con l'Ab anti-RanGAP1 degli estratti totali di fegato al tempo ZT9, in presenza o in assenza dell'inibitore NEM.

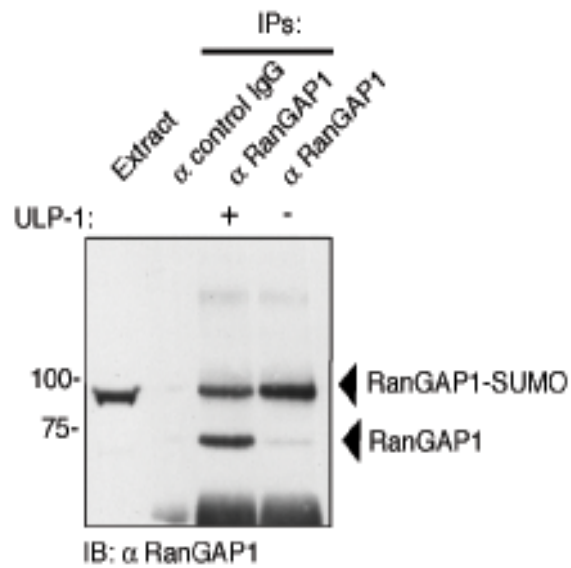


Fig. S5: Saggio di clivaggio delle proteasi SUMO-specifiche, *in vitro*. Immunoprecipitazione degli estratti di fegato al tempo ZT9, in presenza dell'inibitore NEM mediante delle IgG di controllo e l'Ab anti-RanGAP1. Gli immunoprecipitati sono stati incubati con la proteasi ricombinante ULP-1 ed analizzati mediante immunoblot con l'Ab anti-RanGAP1. RanGAP1-SUMO è clivato in maniera specifica ed aumenta il livello di RanGAP1 non modificato.

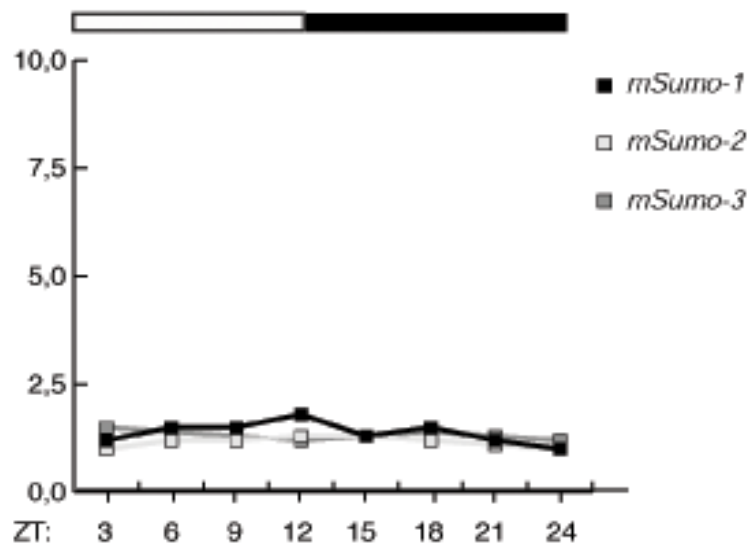


Fig. S6: I geni di SUMO non mostrano oscillazione circadiana nel fegato di topo. Analisi dell'RNA di *Sumo-1*, *Sumo-2* e *Sumo-3*, estratto dal fegato di topo, mediante Quantitative Real Time PCRs. I livelli di RNA sono stati esaminati a 3 ore di intervallo. I valori sono stati normalizzati al valore della β -Actina e riportati come incremento relativo del valore di Sumo-1 al tempo ZT3, indicato come 1. I risultati mostrati sono i valori medi di tre esperimenti indipendenti.

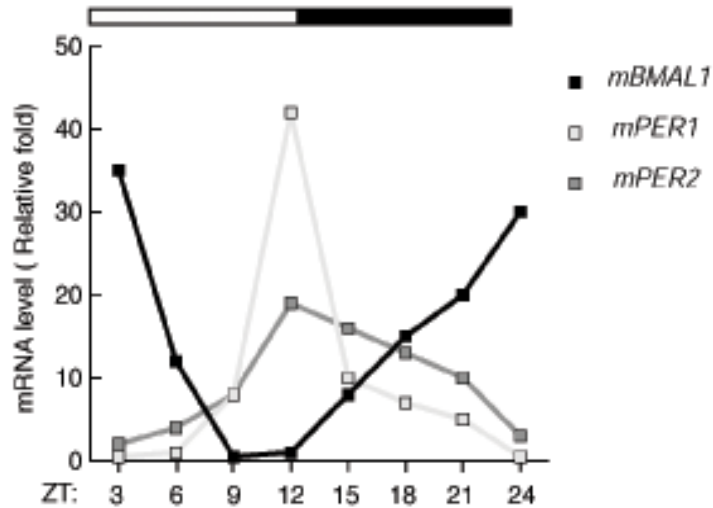


Fig. S7: Analisi dell'RNA di *mBmal1*, *mPer1* e *mPer2*, estratto dal fegato di topo, mediante Quantitative Real Time Pcrs. I livelli di RNA sono stati esaminati a 3 ore di intervallo. I valori sono stati normalizzati al valore della β -Actina e graficati come incremento relativo del valore di *Per1* al tempo ZT3, indicato come 1. I risultati mostrati sono i valori medi di tre esperimenti indipendenti.

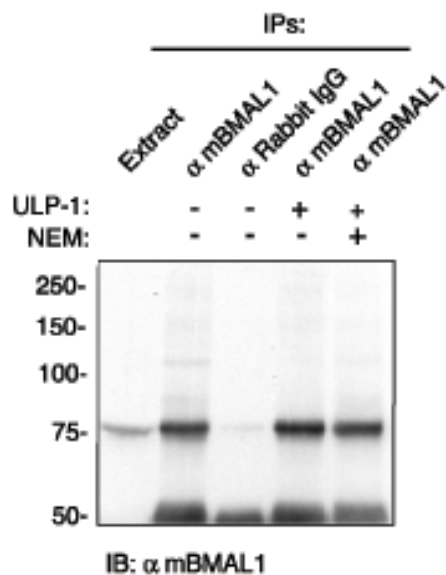


Fig. S8: Saggio di clivaggio in vitro fatto come in Fig. 2c. Una più bassa esposizione dell'immunoblot mostra che in ogni linea sono state immunoprecipitate quantità simili di BMAL1.

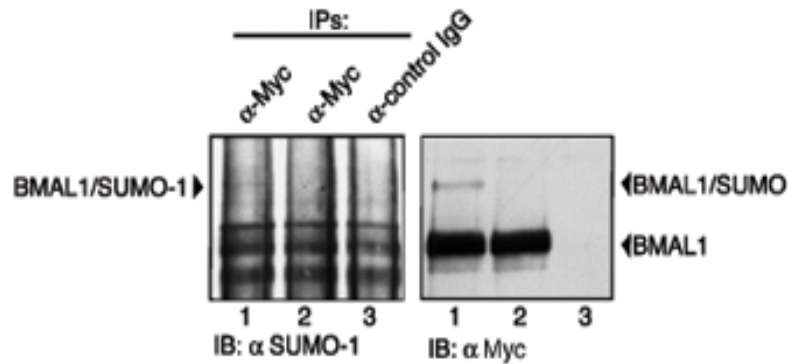


Fig. S9: CLOCK induce la SUMOylazione di BMAL1 nelle cellule COS-1.

Pannello a sinistra. I lisati delle cellule esprimenti Myc-BMAL1 e Flag-CLOCK (linea 1 e 3) o Myc-BMAL1 K259R e Flag-CLOCK (linea 2) sono stati immunoprecipitati, come indicato e poi rilevati mediante Western blot con l'Ab anti-SUMO1.

Pannello a destra. La stessa membrana è stata strappata e analizzata con l'Ab anti-Myc.

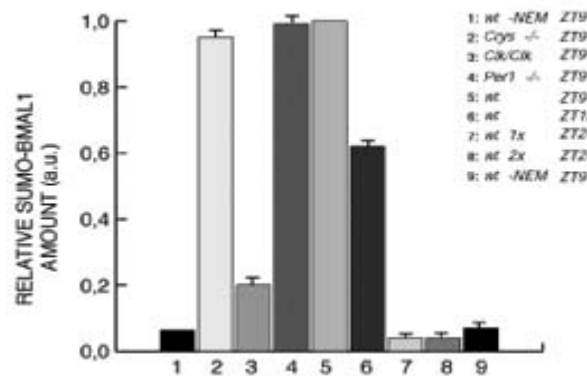


Fig. S10: La SUMOylazione di BMAL1 è ridotta nei topi *clk/clk*. I risultati della figura 3b sono stati quantificati mediante analisi densitometrica e graficati. Il grafico mostra la quantità tra la banda di BMAL1 modificata da SUMO di 100KDa e quella non modificata, in estratti di fegato. I valori sono relativi al punto 5, indicato come 1. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti, che hanno dato risultati simili.

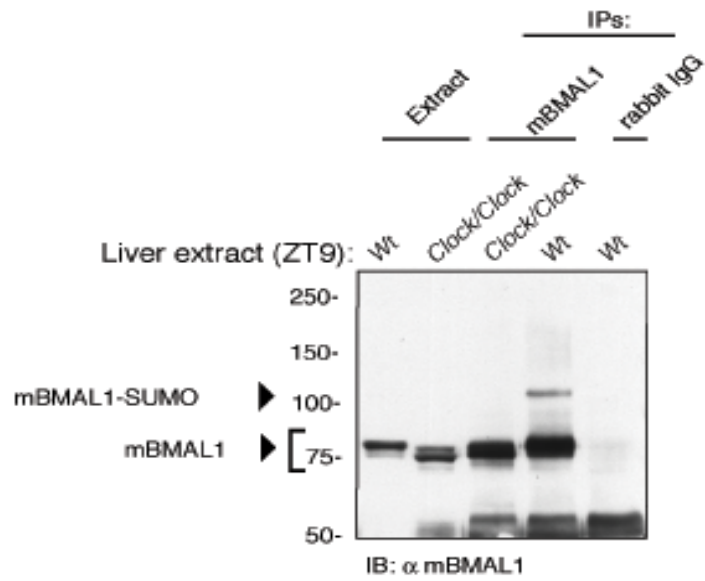


Fig. S11: Assenza di SUMO-BMAL1 nei topi *Clk/Clk*. Immunoprecipitazione degli estratti di fegato di topi *Clk/Clk* al tempo ZT9, in presenza di NEM, con l'Ab anti-BMAL1 e le IgG di controllo, analizzata mediante western blot con l'Ab anti-BMAL1.

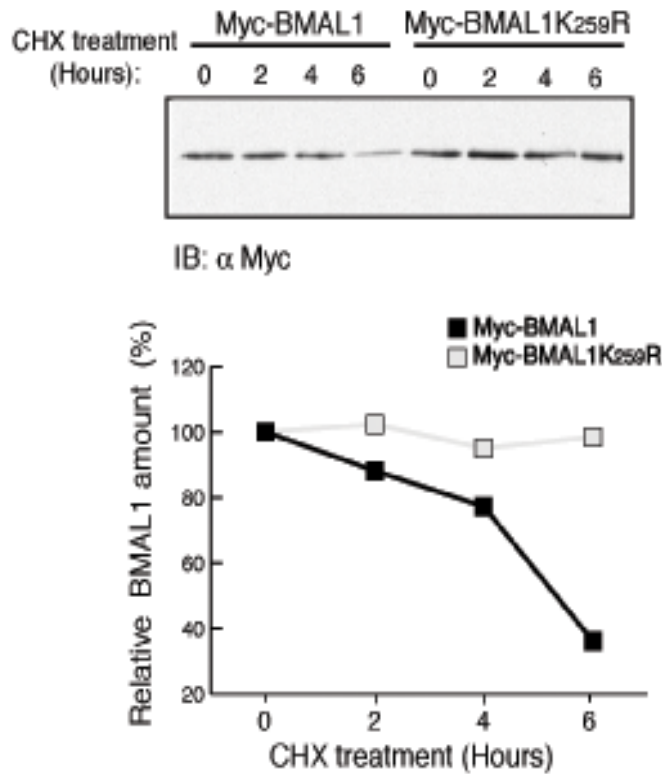


Fig. S12: Il mutante Myc-BMAL1 K259R mostra aumentata stabilità proteica.

Le cellule COS-1 sono state trasfettate con uguali quantità di Flag-CLOCK insieme con Myc-BMAL1 o Myc-BMAL1 K259R. Dopo 36h di trasfezione le cellule sono state trattate con l'inibitore cicloesimide, alla concentrazione di 50 μ g/ml. Ai tempi indicati, le cellule sono state lisate e gli estratti proteici sono stati immunoblottati con l'Ab anti-Myc e con l'Ab anti-TBP, come controllo di loading.

I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica. Il grafico mostra la percentuale della quantità di proteina relativa al tempo T=0 (100%). I risultati sono rappresentativi di otto esperimenti indipendenti, che hanno dato risultati simili.

Bibliografia

- Abe M., Herzog E.D., Yamazaki S., Straume M., Tei H., Sakaki Y., Menaker M., Block G.D. Circadian rhythms in isolated brain regions. **J Neurosci 22: 350-356 (2002)**
- Akashi M., Tsuchiya Y., Yoshino T., Nishida E. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I ϵ (CKI ϵ) and CKI δ in cultured cells. **Mol Cell Biol 22: 1693-1703 (2002)**
- Akashi M. and Takumi T. The orphan nuclear receptor ROR α regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nat Struct Mol Biol 12: 441-448 (2005)**
- Albrecht U., Sun Z.S., Eichele G. & Lee C.C. A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. **Cell 91: 1055-1064 (1997)**
- Albrecht U. Functional Genomics of Sleep and Circadian Rhythm
Invited Review: Regulation of mammalian circadian clock genes. **J Appl Physiol 92: 1348-1355 (2002)**
- Antoch M.P., Song E.J., Chang A.M., Vitaterna M.H., Zhao Y., Wilsbacher L.D., Sangoram A.M., King D.P., Pinto L.H., Takahashi J.S. Functional identification of the mouse circadian Clock gene by transgenic BAC rescue. **Cell 89 (4), 655-667 (1997)**
- Bae K., Jin X., Maywood E.S., Hastings M.H., Reppert S.M., Weaver D.R. Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. **Neuron 30: 525-536 (2001)**
- Baeuerle P.A., and Baltimore D. NF-kB: ten years after. **Cell 87: 13-20 (1996)**
- Baggs J.E., Green C.B. Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. **Curr Biol 13: 189-198 (2003)**

- Bailey D., O'Hare P. Characterization of the localization and proteolytic activity of the SUMO-specific protease, SENP1. **J. Biol. Chem.** **279** (1), **692-703** (2004)
- Baldwin Jr. A.S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. **Annu Rev Immunol** **14**: **649-683** (1996)
- Balsalobre A., Damiola F., Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. **Cell** **93** (6), **929-937** (1998)
- Balsalobre A., Marcacci L. and Schibler U. Multiple signalling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. **Curr Biol** **10**: **1291-1294** (2000)
- Balsalobre A., Brown S.A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H.M., Schutz G., Schibler U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signalling. **Science** **289**: **2344-2347** (2000)
- Bayer P., Arndt A., Metzger S., Mahajan R., Melchior F., Jaenicke R., and Becker J. Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1. **J Mol Biol** **280**: **275-286** (1998)
- Biggins S., Ivanovska I., and Rose M.D. Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. **J Cell Biol** **133**: **1331-1346** (1996)
- Brown S.A., Fleury-Olela F., Nagoshi E., Hauser C., Juge C., Meier C.A., Chicheportiche R., Dayer J.M., Albrecht U. and Schibler U. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. **PLoS Biol** **3**: **e338** (2005)
- Bunger M.K., Wilsbacher L.D., Moran S.M., Clendenin C., Radcliffe L.A., Hogenesch J.B., Simon M.C., Takahashi J.S., Bradfield C.A. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. **Cell** **103** (7), **1009-1017** (2000)
- Cermakian N., Sassone-Corsi P. Multilevel regulation of the circadian clock. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** **1** (1), **59-67** (2000)

- Cermakian N., Monaco L., Pando M.P., Dierich A., Sassone-Corsi P. Altered behavioral rhythms and clock gene expression in mice with a targeted mutation in the *Period1* gene. **EMBO J. 20 (15), 3967-3974 (2001)**
- Cermakian N., Pando M.P., Thompson C.L., Pinchak A., Selby C.P., Gutierrez L., Wells D., Cahill G.M., Sancar A., Sassone-Corsi P. Light induction of a vertebrate clock gene involves signalling through blue-light receptors and MAP kinases. **Curr Biol 12: 844-848 (2002)**
- Cermakian N. and Sassone-Corsi P. Environmental stimulus perception and control of circadian clocks. **Curr Opin Neurob 12: 359-365 (2002)**
- Crosio C., Cermakian N., Allis C.D., Sassone-Corsi P. Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. **Nat Neurosci 3: 1241-1247 (2000)**
- Daan S., Albrecht U., van der Horst G.T.J., Illnerová H., Roenneberg T., Wehr T.A. and Schwartz W.J. Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? **J Biol Rhythms 16: 105-116 (2001)**
- Darlington T.K., Wager-Smith K., Ceriani M.F., Staknis D., Gekakis N., Steeves T.D., Weitz C.J., Takahashi J.S., Kay S.A. Closing the circadian loop: CLOCK- induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. **Science 280 (5369), 1599-1603 (1998)**
- Dasso M., Pu R.T. Nuclear transport: run by Ran. **Am J Hum Genet 63 (2): 311-316 (1998)**
- Debruyne J.P., Noton E., Lambert C.M., Maywood E.S., Weaver D.R., Reppert S.M. A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. **Neuron 50: 465-477 (2006)**
- de Cesare D., Fimia G.M. & Sassone-Corsi P. Signaling route to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation. **Trends Biochem Sci 24: 281-285 (1999)**
- Desterro J.M., Thomson J., Hay R.T. Ubc9 conjugates SUMO but not ubiquitin. **FEBS Lett 417 (3): 297-300 (1997)**

- Desterro J.M., Rodriguez M.S., Hay R.T. SUMO-1 modification of I kappa B alpha inhibits NF-kappa B activation. **Mol. Cell. 2 (2), 233-239 (1998)**
- Ding J.M., Chen D., Weber E.T., Faiman L.E., Rea M.A., Gillette M.U. Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO. **Science 266: 1713-1717 (1994)**
- Dunlap J. C. Molecular bases for circadian clocks. **Cell 96 (2), 271-290 (1999)**
- Duprez E., Saurin A.J., Desterro J.M., Lallemand-Breitenbach V., Howe K., Boddy M.N., Solomon E., de The H., Hay R.T., and Freemont P.S. SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation. **J Cell Sci 112: 381-393 (1999)**
- Dyck J.A., Maul G.G., Miller Jr., W.H., Chen J.D., Kakizuka A., and Evans R.M. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. **Cell 76: 333-343 (1994)**
- Eide E.J., Vielhaber E.L., Hinz W.A. and Virshup D.M. The circadian regulatory proteins BMAL1 and Cryptochromes are substrates of casein kinase I ϵ . **J Biol Chem 277: 17248-17254 (2002)**
- Eide E.J., Woolf M.F., Kang H., Woolf P., Hurst W., Camacho F., Vielhaber E.L., Giovanni A. and Virshup D.M. Control of mammalian circadian rhythm by CKI ϵ -regulated proteasome-mediated PER2 degradation. **Mol Cell Biol 25: 2795-2807 (2005)**
- Etchegaray J.P., Lee C., Wade P.A., Reppert S.M. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. **Nature 421: 177-182 (2003)**
- Foulkes N.S., Borjigin J., Snyder S.H. & Sassone-Corsi P. Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. **Trends Neurosci 20: 487-492 (1997)**

- Freiman R.N., Tjian R. Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. **Cell** **112** (1), 11-17 (2003)
- Gau D., Lemberger T., von Gall C., Kretz O., Le Minh N., Gass P., Schmid W., Schibler U., Korf H.W., Schutz G. Phosphorylation of CREB Ser 142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. **Neuron** **34**: 245-253 (2002)
- Gekakis N., Staknis D., Nguyen H.B., Davis F.C., Wilsbacher L.D., King D.P., Takahashi J.S., Weitz C.J. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science** **280**: 1564-1569 (1998)
- Gill G. Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **13**, 108 (2003)
- Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? **Genes Dev.** **18** (17), 2046-2059 (2004)
- Ginty D.D., Kornhauser J.M., Thompson M.A., Bading H., Mayo K.E., Takahashi J.S., Greenberg M.E. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. **Science** **260**: 238-241 (1993)
- Gong L., Millas S., Maul G.G., Yeh E.T. Differential regulation of sentrinized proteins by a novel sentrin-specific protease. **J Biol Chem** **275** (5): 3355-3359 (2000)
- Goodson M.L., Hong Y., Rogers R., Matunis M.J., Park-Sarge O.K., Sarge K.D. SUMO-1 modification regulates the DNA binding activity of heat shock transcription factor 2, a promyelocytic leukaemia nuclear body associated transcription factor. **J Biol Chem** **276** (21): 18513-18518 (2001)
- Gostissa M., Hengestermann A., Fogal V., Sandy P., Schwarz S.E., Scheffner M., Del Sal G. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. **EMBO J** **18** (22): 6462-6471 (1999)

- Griffin E. A. Jr, Staknis D., Weitz C.J. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. **Science** **286 (5440)**, 768-771 (1999)
- Guillaumond F., Dardente H., Giguere V. and Cermakian N. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. **J Biol Rhythms** **20**: 391-403 (2005)
- Hastings M.H. Central clocking. **Trends Neurosci** **20**: 459-464 (1997)
- Hastings M.H., Duffield G.E., Ebling F.J., Kidd A., Maywood E.S., Schurov I. Non-photoc signalling in the suprachiasmatic nucleus. **Biol Cell** **89**: 495-503 (1997)
- Hirayama J., Nakamura H., Ishikawa T., Kobayashi Y., Todo T. Functional and structural analyses of cryptochrome. Vertebrate CRY regions responsible for interaction with the CLOCK:BMAL1 heterodimer and its nuclear localization. **J Biol Chem** **278**: 35620-35628 (2003)
- Hirayama J. and Sassone-Corsi P. Structural and function features of transcription factors controlling the circadian clock. **Curr Opin Genet & Develop** **15**: 548-556 (2005)
- Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. **Annu Rev Genet** **30**: 405-439 (1996)
- Hodges M., Tissot C., Howe K., Grimwade D., Freemont P.S. Structure, organization and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. **Am J Hum Genet** **63 (2)**: 297-304 (1998)
- Honda R., Yasuda H. Association of p19 (ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. **EMBO J** **18 (1)**: 22-27 (1999)
- Hong Y., Rogers R., Matunis M.J., Mayhew C.N., Goodson M.L., Park-Sarge O.K., Sarge K.D. Regulation of HSF1 by stress-induced SUMO-1 modification. **J Biol Chem** **276 (43)**: 40263-40267 (2001)

- Huang Z.J., Edery I., Rosbash M. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. **Nature** **364 (6434)**, 259-262 (1993)
- Ikonen T., Palvimo J.J. & Jänne O.A. Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators. **J Biol Chem** **272**: 29821-29828 (1997)
- Jin X., Shearman L.P., Weaver D.R., Zylka M.J., de Vries G.J., Reppert S.M. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. **Cell** **96**; 57-68 (1999)
- Johnson P.R., and Hochstrasser M. SUMO-1: ubiquitin gains weight. **Trends Cell Biol** **7**: 408-413 (1997)
- Johnson E.S., Blobel G. Ubc9p is the conjugating enzyme for the ubiquitin-like protein Smt3p. **J Biol Chem** **272 (43)**: 26799-26802 (1997)
- Kamitani T., Nguyen H.P., Yeh E.T. Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. **J. Biol. Chem.** **272 (22)**, 14001-14004 (1997)
- Kamitani T., Kito K., Nguyen H.P., Wada H., Fukuda-Kamitani T., and Yeh E.T. Identification of three major sumoylation sites in PML. **J Biol Chem** **273**: 26675-26682 (1998b)
- Kim K.I., Baek S.H., Jeon Y.J., Nishimori S., Suzuki T., Uchida S., Shimbara N., Saitoh H., Tanaka K., Chung C.H. A new SUMO-1 specific protease, SUSP1, that is highly expressed in reproductive organs. **J Biol Chem** **275 (19)**: 14102-14106 (2000)
- Kim K.I., Baek S.H., and Chung C.H. Versatile protein Tag, SUMO: its enzymology and biological function. **J Cell Physiol** **191**: 257-268 (2002)
- King D.P., Zhao Y., Sangoram A.M., Wilsbacher L.D., Tanaka M., Antoch M.P., Steeves T.D., Vitaterna M.H., Kornhauser J.M., Lowrey

- P.L. et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. **Cell** **89**: 641-653 (1997)
- Ko C.H. and Takahashi J.S. Molecular components of the mammalian circadian clock. **Human Mol Genet** **15**: R271-R277 (2006)
 - Kobayashi Y., Ishikawa T., Hirayama J., Daiyasu H., Kanai S., Toh H., Fukuda I., Tsujimura T., Terada N., Kamei Y. et al. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. **Genes Cells** **5**: 725-738 (2000)
 - Kojima S., Hirose M., Tokunaga K., Sakaki Y., Tei H. Structural and functional analysis of 3' untranslated region of mouse Period1 mRNA. **Biochem Biophys Res Commun** **301**: 1-7 (2003)
 - Koken M.H., Puvion-Dutilleul F., Guillemin M.C., Viron A., Linares-Cruz G., Stuurman N., de Long L., Szosteki C., Calvo F., Chomienne C., Degos L., Puvion E., and de Thé H. The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. **EMBO J.** **13**: 1073-1083 (1994)
 - Kondratov R.V., Chernov M.V., Kondratova A.A., Gorbacheva V.Y., Gudkov A.V., Antoch M.P. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. **Genes Dev.** **17** (15), 1921-1932 (2003)
 - Kornhauser J.M., Nelson D.E., Mayo K.E. & Takahashi J.S. Photic and circadian regulation of c-fos gene expression in the hamster suprachiasmatic nucleus. **Neuron** **5**: 127-134 (1990)
 - Kotaja N., Karvonen U., Jänne O.A., and Palvimo J.J. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. **Mol. Cell Biol.** **22**, 5222 (2002)
 - Kretz-Remy C. and Tanguay R.M. SUMO/sentrin: protein modifiers regulating important cellular functions. **Biochem Cell Biol** **77**: 299-309 (1999)

- Kubbutat M.H., Ludwig R.L., Ashcroft M., Vousden K.H. Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. **Mol Cell Biol** **18 (10): 5690-5698 (1998)**
- Kume K., Zylka M.J., Sriram S., Shearman L.P., Weaver D.R., Jin X., Maywood E.S., Hastings M.H. and Reppert S.M. mCry1 and mCry2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. **Cell** **98: 193-205 (1999)**
- Lee C., Etchegaray J.P., Cagampang F.R., Loudon A.S., Reppert S.M. Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. **Cell** **107 (7), 855-867 (2001)**
- Lee C., Weaver D.R., Reppert S.M. Direct association between mouse PERIOD and CKI ϵ is critical for a functioning circadian clock. **Mol Cell Biol** **24: 584-594 (2004)**
- Lehming N., Le Saux A., Schuller J., Ptashne M. Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex. **Proc Natl Acad Sci USA** **95: 7322-7326 (1998)**
- LeSauter J., Silver R. Output signals of the SCN. **Chronobiol Int** **15: 535-550 (1998)**
- Li S.J., Hochstrasser M. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. **Nature** **398 (6724), 246-251 (1999)**
- Li S.J., Hochstrasser M. The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein. **Mol. Cell Biol.** **20 (7): 2367-2377 (2000)**
- Loeb K.R., and Haas A.L. The interferon-inducible 15-KDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. **J Biol Chem** **267: 7806-7813 (1992)**
- Loeb K.R., and Haas A.L. Conjugates of ubiquitin crossreactive protein distribute in a cytoskeletal pattern. **Mol Cell Biol** **14: 8408-8419 (1994)**
- Lowrey P.L., Shimomura K., Antoch M.P., Yamazaki S., Zemenides P.D., Ralph M.R., Menaker M. and Takahashi J.S. Positional syntentic

cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. **Science 288: 483-492 (2000)**

- Lowrey P.L., Takahashi J.S. Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. **Annu. Rev. Genet. 34, 533-562 (2000)**
- Lowrey P.L. and Takahashi J.S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annu Rev Genomics Hum Genet 5: 407-441 (2004)**
- Mahajan R., Delphin C., Guan T., Gerace L., and Melchior F. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. **Cell 88: 97-107 (1997)**
- Mannen H., Tseng H.M., Cho C.L., Li S.S. Cloning and expression of human homolog HSMT3 to yeast SMT3 suppressor of MIF2 mutations in a centromere protein gene. **Biochem Biophys Res Commun 222(1): 178-180 (1996)**
- Matsuo T, Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F., Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. **Science 302: 255-259 (2003)**
- Matunis M.J., Coutavas E., and Blobel G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTP-ase activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. **J Cell Biol 135: 1457-1470 (1996)**
- Matunis M.J., Wu J., Blobel G. SUMO-1 modification and its role in targeting the Ran GTPase-activating protein, RanGAP1, to the nuclear pore complex. **J. Cell Biol. 140 (3), 499-509 (1998)**
- Maywood E.S., Mrosovsky N., Field M.D. & Hastings M.H. Rapid down-regulation of mammalian period genes during behavioural resetting of the circadian clock. **Proc Natl Acad Sci USA 96: 15211-15216 (1999)**
- Melchior F., Paschal B., Evans J., Gerace L. Inhibition of nuclear protein import by non hydrolyzable analogues of GTP and identification of the

small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. **J Cell Biol 123 (6): 1649-1659 (1993)**

- Meluh P.B., and Koshland D. Evidence that the MIF2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. **Mol Biol Cell 6: 793-807 (1995)**
- Menaker M., Moreira L.F.& Tosini G. Evolution of circadian organization in vertebrates. **Braz J Med Biol Res 30: 305-313 (1997)**
- Miyazaki K., Mesaki M., Ishida N. Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. **Mol Cell Biol 21: 6651-6659 (2001)**
- Moore M.S., Blobel G. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. **Nature 365 (6447): 661-663 (1993)**
- Moore R.Y., Speh J.C., Card J.P. The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. **J. Comp Neurol 352: 351-366 (1995)**
- Moore R.Y. & Silver R. Suprachiasmatic nucleus organization. **Chronobiol Int 15: 475-487 (1998)**
- Motzkus D., Albrecht U., Maronde E. The human PER1 gene is inducible by interleukin-6. **J Mol Neurosci 18 (1-2): 105-109 (2002)**
- Mueller C.R., Maire P. & Schibler U. DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined posttranscriptionally. **Cell 61: 279-291 (1990)**
- Muller S., Matunis M.J., and Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. **EMBO J 17: 61-70 (1998)**
- Müller S., Berger M., Lehembre F., Seeler J.S., Haupt Y., Dejean A. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. **J Biol Chem 275 (18): 13321-13329 (2000)**

- Muller S., Hoege C., Pyrowolakis G., Jentsch S. SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** **2 (3), 202-210 (2001)**
- Nagoshi E., Saini C., Bauer C., Laroche T., Naef F. and Schibler U. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. **Cell** **119: 693-705 (2004)**
- Nishida T., Tanaka H., Yasuda H. A novel mammalian Smt3-specific isopeptidase 1 (SMT3IP1) localized in the nucleolus at interphase. **Eur J Biochem** **267 (21): 6423-6427 (2000)**
- Nishida T., Kaneko F., Kitagawa M., Yasuda H. Characterization of a novel mammalian SUMO-1/Smt3-specific isopeptidase, a homologue of rat Axam, which is an Axin-binding protein promoting β -catenin degradation. **J Biol Chem** **276 (42): 39060-39066 (2001)**
- Obrietan K., Impey S., Storm D.R. Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. **Nat Neurosci** **1: 693-700 (1998)**
- Ohdo S., Koyanagi S., Suyama H., Higuchi S., Aramaki H. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. **Nat Med** **7 (3): 356-360 (2001)**
- Okamura H., Miyake S., Sumi Y., Yamaguchi S., Yasui A., Muijtjens M., Hoeijmakers J.H. and van der Horst G.T. Photoc induction of mPer1 and mPer2 in Cry-deficient mice lacking a biological clock. **Science** **286: 2531-2534 (1999)**
- Okamura H. Clock genes in cell clocks: roles, actions, and mysteries. **J. Biol. Rhythms** **19 (5), 388-399 (2004)**
- Okuma T., Honda R., Ichikawa G., Tsumagari N., Yasuda H. In vitro SUMO-1 modification requires two enzymatic steps, E1 and E2. **Biochem Biophys Res Commun** **254 (3): 693-698 (1999)**
- Pando M.P., Morse D., Cermakian N., Sassone-Corsi P. Phenotypic rescue of a peripheral clock genetic defect via SCN hierarchical dominance. **Cell** **110, 107 (2002)**

- Pickard G.E. & Rea M.A. Serotonergic innervation of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and photic regulation of circadian rhythms. **Biol Cell 89: 513-523 (1997)**
- Pittendrigh C.S. and Daan S. A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. Pacemaker structure: a clock for all seasons. **J Comp Physiol [A] 106: 333-355 (1976)**
- Pittendrigh C.S. Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher. **Annu Rev Physiol 55: 16-54 (1993)**
- Pokka H., Karvonen U., Jänne O.A., Palvimo J.J. Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) **Proc. Natl. Acad. Sci. 97: 14145-14150 (2000)**
- Preitner N., Damiola F., Lopez-Molina L., Zakany J., Duboule D., Albrecht U. and Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. **Cell 110: 251-260 (2002)**
- Provencio I., Rodriguez I.R., Jiang G., Hayes W.P., Moreira E.F., Rollag M.D. A novel human opsin in the inner retina. **J Neurosci 20: 600-605 (2000)**
- Regnier C.H., Song H.Y., Gao X., Goeddel D.V., Cao Z., and Rothe M. Identification and characterization of an I κ B kinase. **Cell 90: 373-383 (1997)**
- Reppert S.M., Weaver D.R. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. **Annu Rev Physiol 63: 647-676 (2001)**
- Reppert S.M. and Weaver D.R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature 418: 935-941 (2002)**
- Ripperger J.A., Shearman L.P., Reppert S.M., Schibler U. CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP. **Genes Dev 14: 679-689 (2000)**

- Rodriguez M.S., Desterro J.M., Lain S., Midgley C.A., Lane D.P., Hay R.T. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. **EMBO J 18 (22): 6455-6461 (1999)**
- Rothwarf D.M., Zandi E., Natoli G., and Karin M. IKK-g is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. **Nature (London) 395: 297-300 (1998)**
- Saitoh H., Pu R., Cavenagh M., and Dasso M. RanBP2 associates with Ubc9 and a modified form of RanGAP1. **Proc Natl Acad Sci USA 94: 3736-3741 (1997)**
- Salinas S., Briancon-Marjollet A., Bossis G., Lopez M.A., Piechaczyk M., Jariel-Encontre I., Debant A., Hipskind R.A. SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. **J. Cell Biol. 165 (6), 767-773 (2004)**
- Sanada K., Okano T., Fukada Y. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and negatively regulates basic helix-loop-helix-PAS transcription factor BMAL1. **J Biol Chem 277: 267-271 (2002)**
- Sanada K., Harada Y., Sakai M., Todo T., Fukada Y. Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. **Genes Cells 9: 697-708 (2004)**
- Sato T.K., Panda S., Miraglia L.J., Reyes T.M., Rudic R.D., McNamara P., Naik K.A., FitzGerald G.A., Kay S.A. and Hogenesch J.B. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. **Neuron 43: 527-537 (2004)**
- Sato T.K., Yamada R.G., Ukai H., Baggs J.E., Miraglia L.J., Kobayashi T.J., Welsh D.K., Kay S.A., Ueda H.R. and Hogenesch J.B. Feedback repression is required for mammalian circadian clock function. **Nat Genet 38: 312-319 (2006)**
- Scheidereit C. Signal transduction. Docking I κ B kinases. **Nature (London) 395: 225-226 (1998)**
- Schibler U., Sassone-Corsi P. A web of circadian pacemakers. **Cell 111 (7), 919-922 (2002)**

- Schwarz S.E., Matuschewski K., Liakopoulos D., Scheffner M., Jentsch S. The ubiquitin-like proteins SMT3 and SUMO-1 are conjugated by the UBC9 E2 enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA 95 (2): 560-564 (1998)**
- Schwienhorst I., Johnson E.S., Dohmen R.J. SUMO conjugation and deconjugation. **Mol Gen Genet 263 (5): 771-786 (2000)**
- Seeler J.S., Marchio A., Sitterlin D., Transy C., Dejean A. Interaction of Sp100 protein with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukaemia-associated nuclear bodies and chromatin component. **Proc Natl Acad Sci USA 95: 7316-7321 (1998)**
- Seeler J.S., Marchio A., Losson R., Desterro J.M.P., Hay R.T., Chambon P., Dejean A. Common properties of nuclear body protein Sp100 and TIF1 α chromatin factor: role of SUMO modification. **Mol Cell Biol 21 (10): 3314-3324 (2001)**
- Shearman L.P., Zylka M.J., Weaver D.R., Kolakowski L.F., Jr & Reppert S.M. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. **Neuron 19: 1261-1269 (1997)**
- Shearman L.P., Sriram S., Weaver D.R., Maywood E.S., Chaves I., Zheng B., Kume K., Lee C.C., van der Horst G.T., Hastings M.H. et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. **Science 288: 1013-1019 (2000)**
- Shinohara K., Hiruma H., Funabashi T. & Kimura F. GABAergic modulation of gap junction communication in slice cultures of the rat suprachiasmatic nucleus. **Neuroscience 96: 591-596 (2000)**
- Sternsdorf T., Jensen K., reich B., Will H. The nuclear dot protein sp 100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. **J. Biol. Chem.. 274 (18), 12555-12566 (1999)**
- Suzuki T., Ichiyama a., Saitoh H., Kawakami T., Omata M., chung C.H., Kimura M., Shimbara N., Tanaka K. A new 30-kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain. **J. Biol. Chem.. 274 (44), 31131-31134 (1999)**

- Takano A., Isojima Y., Nagai K. Identification of mPER1 phosphorylation sites responsible for the nuclear entry. **J Biol Chem** **279**: 32578-32585 (2004)
- Tamaru T., Isojima Y., van der Horst G.T., takei K., Nagai K., Takamatsu K. Nucleocytoplasmic shuttling and phosphorylation of BMAL1 are regulated by circadian clock in cultured fibroblasts. **Genes Cells** **8** (12), 973-983 (2003)
- Tashiro K., Pando M.P., Kanegae Y., Wamsley P.M., Inoue S., and Verma I.M. Direct involvement of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc9/Hus5 in the degradation of I κ B α . **Proc Natl Acad Sci USA** **94**:7862-7867 (1997)
- Tatham M.H., Jaffray E., Vaughan O.A., Desterro J.M., Botting C.H., Naismith J.H., Hay R.T. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. **J Biol Chem** **276** (38): 35368-35374 (2001)
- Todo T. Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. **Mutat Res** **434**: 89-97 (1999)
- Toh K.L., Jones C.R., He Y., Eide E.J., Hinz W.A., Virshup D.M., Ptacek L.J. and Fu Y.H. An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. **Science** **291**: 1040-1043 (2001)
- Travnickova-Bendova Z., Cermakian N., Reppert S.M., Sassone-Corsi P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signalling and CLOCK:BMAL1 activity. **Proc Natl Acad Sci USA** **99**: 7728-7733 (2002)
- Triqueneaux G., Thenot S., Kakizawa T., Antoch M.P., Safi R., Takahashi J.S., Delaunay F. and Laudet V. The orphan receptor Rev-erb α gene is a target of the circadian clock pacemaker. **J Mol Endocrinol** **33**: 585-608 (2004)

- Ueyama T., Krout K.E., Nguyen X.V., Karpitskiy V., Kollert A., Mettenleiter T.C., Loewy A.D. Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. **Nat Neurosci 2: 1051-1053 (1999)**
- van der Horst G.T., Muijtjens M., Kobayashi K., Takano R., Kanno S., Takao M., de Wit J., Verkerk A., Eker A.P., van Leenen D., Buijs R., Bootsma D., Hoeijmakers J.H. Yasui A. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. **Nature 398 (6728), 627-630 (1999)**
- Varshavsky A. The ubiquitin system. **Trends Biochem Sci 22: 383-387 (1997)**
- Vielhaber E., Eide E., Rivers A., Gao Z.H., Virshup D.M. Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I ϵ . **Mol Cell Biol 20: 4888-4899 (2000)**
- Vielhaber E.L., Duricka D., Ullman K.S., Virshup D.M. Nuclear export of mammalian PERIOD proteins. **J Biol Chem 276: 45921-45927 (2001)**
- Vitaterna M.H., King D.P., Chang A.M., Kornhauser J.M., Lowrey P.L., McDonald J.D., Dove W.F., Pinto L.H., Turek F.W., Takahashi J.S. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. **Science 264: 719-725 (1994)**
- Vitaterna M.H., Selby C.P., Todo T., Niwa H., Thompson C., Fruechte E.M., Hitomi K., Thresher R.J., Ishikawa T., Miyazaki J. et al. Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2. **Proc Natl Acad Sci USA 96: 12114-12119 (1999)**
- Watkins J.F., Sung P., Prakash L., and Prakash S. The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function. **Mol Cell Biol 13: 7757-7765 (1993)**
- Weis K., Rambaud S., Lavau C., Jansen J., Carvalho T., Carmo-Fonseca M., Lamond A., and Dejean A. Retinoic acid regulates aberrant nuclear

localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells.
Cell 76: 345-356 (1994)

- Welsh D.K., Logothetis D.E., Meister M. & Reppert S.M. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. **Neuron 14: 697-706 (1995)**
- Welsh D.K., Yoo S.H., Liu A.C., Takahashi J.S. and Kay S.A. Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. **Curr Biol 14: 2289-2295 (2004)**
- Wu J., Matunis M.J., Kraemer D., Blobel G., Coutavas E. Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region. **J Biol Chem 270 (23): 14209-14213 (1995)**
- Xu Y., Padiath Q.S., Shapiro R.E., Jones C.R., Wu S.C., Saigoh N., Saigoh K., Ptacek L.J. and Fu Y.H. Functional consequences of a CK1 δ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. **Nature 434: 640-644 (2005)**
- Yagita K., Yamaguchi S., Tamanini F., van der Horst G.T., Hoeijmakers J.H., Yasui A., Loros J.J., Dunlap J.C., Okamura H. Dimerization and nuclear entry of mPER2 proteins in mammalian cells. **Genes Dev 14: 1353-1363 (2000)**
- Yagita K., Tamanini F., Yasuda M., Hoeijmakers J.H., van der Horst G.T., Okamura H. Nucleocytoplasmic shuttling and mCRY-dependent inhibition of ubiquitylation of the mPER2 clock. **EMBO J 21: 1301-1314 (2002)**
- Yamazaki S., Numano R., Abe M., Hida A., Takahashi R., Ueda M., Block G.D., Sakaki Y., Menaker M. and Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. **Science 288: 682-685 (2000)**

- Yildiz O., Doi M., Yujnovsky I., Cardone L., Berndt A., Hennig S., Schulze S., Urbanke C., Sassone-Corsi P., Wolf E. Crystal structure and interactions of the PAS repeat region of the Drosophila clock protein PERIOD. **Mol Cell** **17**: 69-82 (2005)
- Yokoyama N., Hayashi N., Seki T., Pante N., Ohba T., Nishii K., Kuma K., Hayashida T., Miyata T., Aebi U., Fukui M., Nishimoto T. A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4. **Nature** **376 (6536)**: 184-188 (1995)
- Yoo S.H., Yamazaki S., Lowrey P.L., Shimomurn K., Ko C.H., Buhr E.D., Siepkas S.M., Hong H.K., Oh W.J., Yoo O.J. et al. PERIOD2:LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** **101**: 5339-5346 (2004)
- Young M.W., Kay S.A. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. **Nat. Rev. Genet.** **2 (9)**, 702-715 (2001)
- Yu W., Nomura M., Ikeda M. Interactivating feedback loops within the mammalian clock: BMAL1 is negatively autoregulated and upregulated by CRY1, CRY2, and PER2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **290**: 933-940 (2002)
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakawa M., Karin M. The Ikappa B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK alpha and IKK beta, necessary for Ikappa B phosphorylation and NF-kappa B activation. **Cell** **288 (17)**: 2123-2129 (1997)
- Zheng B., Larkin D.W., Albrecht U., Sun Z.S., Sage M., Eichele G., Lee C.C., and Bradley A. The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock. **Nature** **400**: 169-173 (1999)
- Zheng B., Albrecht U., Kaasik K., Sage M., Lu W., Vaishnav S., Li Q., Sun Z.S., Eichele G., Bradley A. et al. Non redundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. **Cell** **105**: 683-694 (2001)

- Zhu H., Conte F., Green C.B. Nuclear localization and transcriptional repression are confined to separable domains in the circadian protein CRYPTOCHROME. **Curr Biol** 13: 1653-1658 (2003)