Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Klára Janáčová

Úloha posttranslačních modifikací v molekulárním mechanismu cirkadiánních hodin

The role of posttranslational modifications in the molecular mechanism of the circadian clock

Bakalářská práce

Školitelka: Prof. PharmDr. Alena Sumová, DSc.

Praha, 2022

Děkuji své školitelce Prof. PharmDr. Aleně Sumové, DSc. za ochotu a cenné rady při psaní bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4.5.2022

Klára Janáčová

Abstrakt

Načasování biologických procesů organismů je řízeno endogenními cirkadiánními hodinami. Molekulární hodiny se nacházejí téměř v každé buňce a jsou synchronizovány s vnějším prostředím. Hlavním mechanismem cirkadiánních hodin je zpětnovazebná transkripčně-translační smyčka. 24h-perioda cirkadiánního rytmu je zajištěna reverzibilními posttranslačními modifikacemi (PTM) hodinových proteinů a dalších regulátorů cirkadiánních hodin. PTM jsou dále důležité pro synchronizaci hodin s vnějším prostředím, jejich ovlivnění změnou metabolického stavu v buňce a vzájemnou regulaci cirkadiánních hodin a buněčného cyklu. Zásadní roli mají fosforylace, PTM histonů, acetylace, SUMOylace, ubikvitinace, O-vázaná N-acetylglukosaminace a polyADP-ribosylace. Molekulární mechanismus biologických hodin je evolučně konzervovaný mechanismus vyskytující se u většiny organismů. Tato práce shrnuje poznatky o roli PTM v molekulárním mechanismu cirkadiánních hodin savců a člověka.

Klíčová slova: cirkadiánní hodiny, hodinové geny, hodinové proteiny, posttranslační modifikace

Abstract

The timing of the biological processes of organism is controlled by an endogenous circadian clock. The molecular clock is present in almost every cell and is synchronized with the external environment. The main mechanism of the clock is a transcription-translation feedback loop. The 24-hour circadian rhythm period is provided by reversible posttranslational modifications (PTMs) of the clock proteins and another regulators of the circadian clock. PTMs are further important for clock entrainment, their regulation by metabolic state in the cell, and reciprocal regulation of the circadian clock end cell cycle. Phosphorylation, histones PTMs, acetylation, SUMOylation, ubiquitination, O-linked N-acetylglucosamination and polyADP-ribosylation play a crucial role. The molecular mechanism of the biological clock is an evolutionarily conserved mechanism found in most organisms. This bachelor thesis summarizes the knowledge about the role of PTMs in the molecular mechanism of the mammalian and human circadian clocks.

Key words: circadian clock, clock genes, clock proteins, posttranslational modifications

Seznam zkratek

AKT/PKB	proteinkináza B
Ala	alanin
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	AMP-aktivovaná proteinkináza
Arg	arginin
ATP	adenosintrifosfát
bHLH	basic helix-loop-helix
BMAL1	brain and muscle ARNT-like protein 1
CaMK	kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkináza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBP	CREB-vazebný protein
CDK	cyklin-dependentní kináza
cGMP	cyklický guanosylmonofosfát
CKBD	casein kinase binding domain
CK1	kasein kináza 1
CK2	kasein kináza 2
CLOCK	circadin locomotor output cycles kaput
CRE	cAMP responzivní element
CREB	cAMP responzivní element-vázající protein
CRY	cryptochrome
Cys	cystein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DYRK1A	dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A
ERK1/2	kináza regulovaná extracelulárním signálem
Erα	receptor pro estrogen α
FASPS	familial advanced sleep phase syndrome
FBXL3	F-box and leucine rich repeat protein 3
FBXL21	F-box and leucine rich repeat protein 21
FBXW7	F-box and WD repeat-containing protein 7
Gly	glycin

GSK3	glykogensyntáza kináza 3
H3, H4	histon 3, histon 4
HAT	histon acetyltransferáza
HDAC	histon deacetyláza
JNK	c-Jun N-terminální kináza
Lys	lysin
LSD1	lysin specifická demetyláza 1
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MLL1	mixed-lineage leukemia
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAD	nikotinadenindinukleotid
NAMPT	nikotinamid fosforibosyltransferáza
NO	oxid dusnatý
OGA	acetylglukosaminidáza
OGT	acetylglukosaminyltransferáza
PARP-1	poly(ADP-ribóza) polymeráza 1
PAS	Per-Art-Sim
PER	period
PGC-1α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1α
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PKG	proteinkináza G
PolII	polymeráza II
PPP	fosfoprotein fosfatáza
PTM	posttranslační modifikace
RACK-1	receptor pro aktivovanou proteinkinázu C 1
REV-ERB	orphan receptor
ROR	příbuzný orphan receptor
RORE	ROR responzivní element

SCF	Skp1, Cullin, F-box protein obsahující komplex
SCN	suprachiasmatické jádro
Ser	serin
Sirt1	sirtuin 1
SUMO	small ubiquitin-like modifier
Thr	threonin
TTFL	zpětnovazebná transkripčně-translační smyčka
UBR4	ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin 4
USP2	ubikvitin C-terminální hydroláza 2
β-TrCP	protein obsahují β-transducinovou repetici

Obsah

1 Úvod ... 1
1.1 Cirkadiánní rytmus ... 1
1.2 Biologické hodiny ... 1
1.3 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin ... 1
2 Úloha posttranslačních modifikací při regulaci cirkadiálního rytmu ... 3
2.1 Fosforylace/Defosforylace ... 3
2.1.1 Úloha fosforylace v TTFL ... 3
2.1.1.1 CK1, CK2 ... 3
2.1.1.2 GSK3β ... 7
2.1.2 Úloha fosforylace při synchronizaci periferních cirkadiánních hodin ... 8
2.1.2.1 AMPK ... 8
2.1.2.2 mTOR, AKT/PKB, PI3K ... 9
2.1.3 Úloha fosforylace při světelné synchronizaci hodin v SCN ... 9
2.1.3.1 CaMK, PKC, MAPK, PKA, PKG ... 10
2.1.4 Úloha fosforylace při cirkadiánní regulaci buněčného cyklu ... 12
2.1.4.1 CDK1, CDK5, CDK9 ... 12
2.1.5 Defosforylace ... 13
2.1.5.1 PP1, PP2A, PP4, PP5 ... 13
2.2 PTM a remodelace chromatinu ... 14
2.2.1 Acetylace ... 14
2.2.2 Metylace ... 14
2.2.3 Fosforylace ... 15
2.3 Acetylace/Deacetylace ... 15
2.3.1 CLOCK ... 15
2.3.2 Sirt1 ... 16
2.3.3 HDAC3 ... 16
2.4 SUMOylace ... 17
2.4.1 Regulace transkripční aktivity CLOCK::BMAL1 ... 17
2.4.2 Duální efekt SUMOylace PER2 ... 18
2.5 Ubikvitinace/Deubikvitinace ... 18
2.5.1 Degradace PER, CRY ... 18
2.5.2 Deubikvitinace ... 19
2.6 O-vázaná N-acetylglukosoaminace ... 19
2.6.1 N-acetylglukosoaminace PER, BMAL1 ... 20
2.7 PolyADP-ribosylace ... 20
2.7.1 PolyADP-ribosylace CLOCK ... 20
3 Závěr ... 22

1 Úvod

1.1 Cirkadiánní rytmus

Biologický rytmus je pravidelné opakovaní biologických procesů řízené vnitřními hodinami organismu. Rytmické opakování metabolických a fyziologických dějů usnadňuje organismu adaptaci na pravidelné změny ve vnějším prostředí. Rytmus s periodou přibližně 24 hodin se nazývá cirkadiánní. Tento rytmus reguluje načasování metabolických a behaviorálních procesů během střídání dne a noci. Jedná se například o řízení cyklu spánek/bdění, tělesné teploty, sekrece hormonů, glukozové homeostázy a metabolismu lipidů. Vrozená endogenní rytmicita buněk je nezávislá na vnějším prostředí a pokračuje v absenci vnějších faktorů (ve stálé tmě). Endogenní hodiny jsou synchronizovány s vnějším prostředím (angl. termín „entrainment“) na základě střídání světla a tmy. Další faktory ovlivňující cirkadiánní rytmus jsou metabolické a humorální signály. Narušení hodin a jimi řízených procesů může vést k rozvoji poruch spánku a dalších civilizačních chorob.

1.2 Biologické hodiny

Cirkadiánní rytmus organismu je řízen vrozenými biologickými hodinami. Ty se skládají ze vstupní dráhy, pacemakeru a výstupní dráhy. Biologické hodiny se vyskytují téměř v každé buňce a v organismu jsou hierarchicky uspořádány. Centrální pacemaker u savců se nachází v párovém suprachiasmatickém jádře (SCN) umístěném v hypotalamu (Pittendrigh, 1960). Obě SCN jsou u laboratorních hlodavců tvořena zhruba 20 000 neurony oscilujícími ve stejné fázi a rytmu. Umístěny jsou nad křížením očních nervů, což umožňuje vnímání světla a tmy (Pickard, 1982). SCN řídí systémové rytmy a také hodiny v periferních tkáních. Nejedná se ale o výhradní kontrolu, periferní hodiny jsou ovlivňovány dalšími faktory, jako jsou například signály z metabolismu a humorální signály (shrnuto v Dibner et al., 2010).

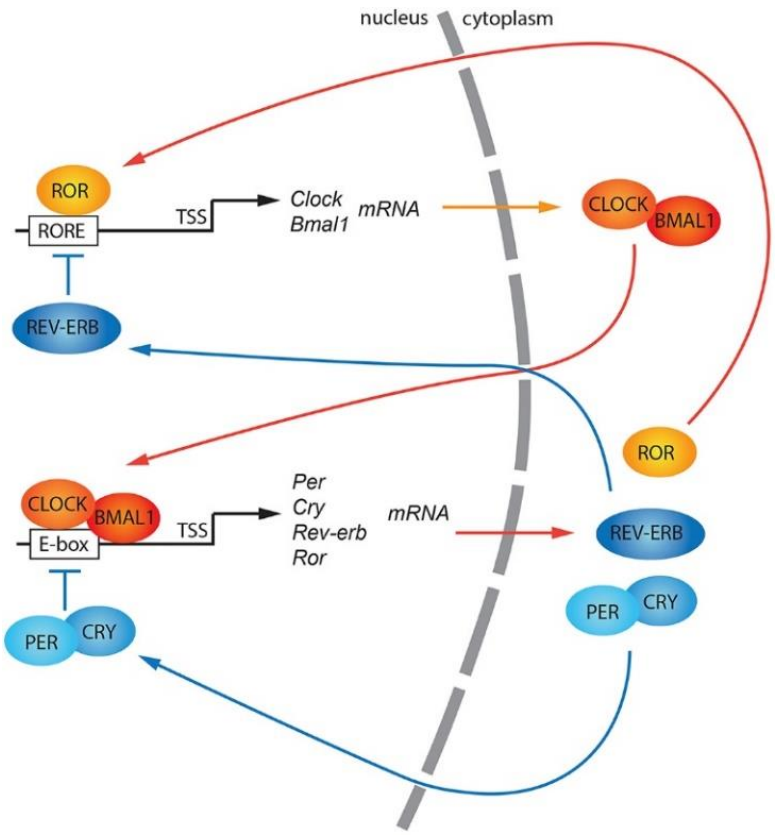
1.3 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin

Zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky

Cirkadiánní periodu biologických hodin savců udržují zpětnovazebné transkripčně-transkripční smyčky (TTFL) hodinových genů (Obr.1). Transkripční faktory CLOCK a BMAL1 v průběhu dne nasedají na E-box v promotorové oblasti genů kódujících proteiny PERIOD (*Per1*, *Per2*, *Per3*) a CRYPTOCHROME *(Cry1*, *Cry2*) a zahajují jejich transkripci (Gekakis et al., 1998). Nově syntetizované proteiny PER1,2,3 a CRY1,2 se během dne akumulují v cytoplazmě a po překročení kritické hladiny, zhruba po 12 hodinách

od začátku přepisu jejich genů, spolu utvářejí proteinové komplexy a společně s kinázou CK1 se přesouvají do jádra. V jádře komplex PER/CRY/CK1 interaguje s heterodiméry CLOCK::BMAL1 a inhibuje jejich transkripční aktivitu. Proteiny PER a CRY tak v druhé části dne inhibují expresi svých vlastních genů (C. Lee et al., 2001). Na konci subjektivní noci je inhibiční vliv proteinů PER a CRY na CLOCK::BMAL1 ukončen a celý mechanismus obnoven (Shearman et al., 2000).

Heterodimér CLOCK::BMAL1 iniciuje také transkripci jaderných receptorů REV-ERBα, REV-ERBβ a ROR. Jaderné receptory se váží na ROR responzivní element (RORE) v promotoru proteinu BMAL1, a tím regulují jeho transkripci. Při navázání ROR na RORE je transkripce *Bmal1* aktivována, navázáním REV-ERB naopak potlačena. Jaderné receptory tak zpětnovazebně regulují expresi proteinu BMAL1 a tvorbu heterodimérů CLOCK::BMAL1 (Guillaumond et al., 2005).



Obr.1 Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin. Schématické zobrazení vzájemné regulace transkripčně-translační pozitivních a negativních zpětnovazebných smyček (Brenna & Albrecht, 2020).

2 Úloha posttranslačních modifikací při regulaci cirkadiálního rytmu

Posttranslační modifikace (PTM) tvoří nezbytnou součást molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin. Jedná se o hlavní mechanismus zajišťující 24h-periodu transkripčně-translačních pozitivních a negativních zpětnovazebných smyček (C. Lee et al., 2001). Význam PTM pro hodinový mechanismus byl nejprve prokázán při regulaci stability proteinu PER u *Drosophily* (Edery et al., 1994) a následně u dalších hodinových proteinů u savců (Akashi et al., 2002; C. Lee et al., 2001) a člověka (Camacho et al., 2001; Keesler et al., 2000). Kromě zachování správné délky biologického dne mají PTM význam v synchronizaci (angl. termín „entrainment“) edogenních hodin s vnějším prostředím a přenosu extracelulárních podmětů k jádru buněčných cirkadiánních hodin. Kovalentní modifikace proteinů ovlivňují jejich stabilitu (Keesler et al., 2000), subcelulární lokalizaci (Akashi et al., 2002), transkripční aktivitu (Eide et al., 2002) i vazebné vlastnosti (Yin et al., 2006). Mezi nejvýznamnější PTM v cirkadiánním rytmu savců a člověka patří fosforylace, PTM histonů, acetylace, SUMOylace a ubikvitinace. Pro interakci cirkadiánních hodin s metabolismem jsou důležité zejména O-vázaná N-acetylglukosoaminace a polyADP-ribosylace.

2.1 Fosforylace/Defosforylace

Fosforylace patří mezi nejběžnější a nejdůležitější PTM proteinů zapojené do velkého množství buněčných procesů. Hlavními enzymy jsou zde proteinkinázy, katalyzující přenos zbytku kyseliny fosforečné z makroergní molekuly ATP na cílový protein (Burnett & Kennedy, 1954). Největší zastoupení mají serin/threonin kinázy a tyrosin kinázy (Edelman et al., 1987; Ullrich & Schlessinger, 1990). Hydrolytického štěpení fosfátové skupiny katalyzují proteinové fosfatázy (Barford et al., 1998).

2.1.1 Úloha fosforylace v TTFL

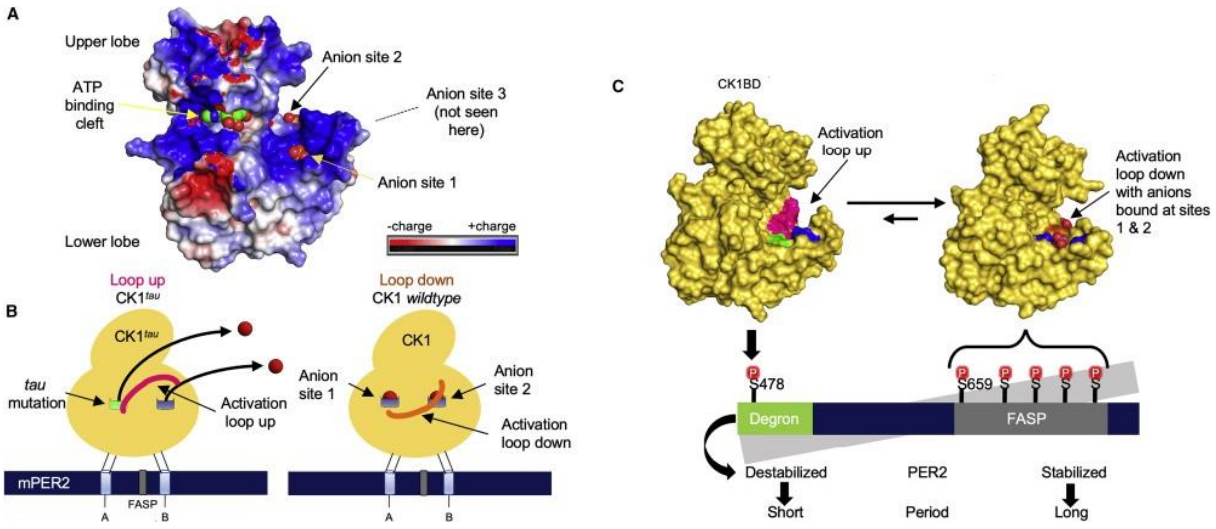
2.1.1.1 CK1, CK2

Kasein kinázy (CK) jsou stěžejními kinázami cirkadiánního rytmu. Jedná se o první popsané proteinkinázy vůbec (Bingham & Farrell, 1974). Tyto serin/threonin kinázy mají kromě regulace cirkadiánních hodin významnou roli například ve Wnt signalizační dráze, apoptóze a nádorové suprimaci (shrnuto v Cheong & Virshup, 2011).

Hlavní roli v molekulárním mechanismu biologických hodin má CK1. Tato monomerní kináza je u savců zastoupena minimálně v sedmi izoformách: α, β, γ1, γ2, γ3, δ a ϵ. Jednotlivé

izoformy mají silně konzervovanou kinázovou doménu a liší se převážně v délce a primární struktuře svého C-konce, což moduluje jejich enzymatickou aktivitu ((Narasimamurthy et al., 2018). V cirkadiánním rytmu jsou nejdůležitější sekvenčně podobné izoformy CK1ϵ a CK1δ (Hirano et al., 2016; C. Lee et al., 2001). Další významnou charakteristikou kaseinináz je jejich relativní teplotní rezistence, v čemž se významně odlišují od většiny ostatních enzymů. Rezistence vůči teplotním změnám se uplatňuje v mechanismu teplotní kompenzace, kdy i při změnách vnější teploty zůstává endogenní rytmus zachován (Isojima et al., 2009; Zhou et al., 2015). CK1ϵ a CK1δ obsahují na svém C-konci inhibiční autofosforylační doménu, jejímž odštěpením je kináza aktivována (Rivers et al., 1998).

Na povrchu kinázy CK1 byla definována tři rozdílná vazebná místa pro anion, jejichž vzájemná interakce je důležitá pro regulaci konformace aktivační smyčky kinázy a její vazbu na substrát. Koordinovanou vazbou aniontů v místech 1 a 2 je aktivační smyčka udržována v konformaci „loop down“. Tato konformace umožňuje přístup k aktivnímu místu kinázy pouze určitému typu substrátu. Naproti tomu druhá z možných konformací smyčky, „loop up“, je nezbytná pro fosforylaci odlišného typu substrátu (Obr.2). Konformace aktivační smyčky CK1 je rozhodující faktor pro výběr fosforylačního místa na cílovém proteinu (Philpott et al., 2020).



Obr.2 A) Povrch CK1 s vyznačenými vazebnými místy pro anion; B) Konformační stavy aktivační smyčky CK1: „loop down“ a „loop up“ konformace při vazbě aniontu ve vazebných místech 1 a 2; C) Znázornění selektivity substrátu v závislosti na konformačním stavu aktivační smyčky CK1 (Narasimamurthy & Virshup, 2021).

Izoformy CK1δ/ϵ jsou konstitutivně exprimovány v SCN i periferních pacemakerech (Camacho et al., 2001; Shirogane et al., 2005). Na konci biologického dne je CK1ϵ/δ v komplexu s PER a CRY translokována do jádra (C. Lee et al., 2001). Kináza zůstává v komplexu navázána po celou dobu cyklu skrze vazebnou doménu CKBD (Eide et al., 2005; C. Lee et al., 2004).

Fosforylace hodinových proteinů je centrální a evolučně konzervovaný mechanismus cirkadiánního rytmu. Význam fosforylace pro periodu cirkadiánních hodin byl pozorován například u *tau* mutantního křečka, který vykazoval výrazné zkrácení periody rytmu v lokomoci z 24 hodin na 20 hodin u homozygotů a na 22 hodin u heterozygotů (Ralph & Menaker, 1988). Zkrácení biologického dne zvířete bylo způsobeno jednobodovou Arg178→Cys mutací v hlavní kináze cirkadiánního rytmu, CK1 (Lowrey et al., 2000). Později byla objevena další z genetických mutací CK1, substituce Thr44→Ala, způsobující FASPS (z angl. „familial advanced sleep phase syndrome“). Vedle mutace v samotné kináze je FASPS zapříčiněný také mutací ve fosforylačním místě pro CK1 na proteinu PER2. U člověka se jedná o mutaci Ser662→Gly, u myši o Ser659 (Jones et al., 1999; Toh et al., 2001; Xu et al., 2005).

CK2 se skládá ze dvou regulačních podjednotek β a dvou katalytických α a narozdíl od CK1 je stále aktivní (Sarno et al., 2002). CK2 specificky fosforyluje Ser53 PER2 a pravděpodobně tak spolupracuje s CK1ϵ na jeho proteozomální degradaci (Tsuchiya et al., 2009). Dalším ze substrátů CK2 je protein BMAL1, u něhož fosforylace Ser90 reguluje subcelulární lokalizaci. Fosforylace BMAL1 během dne indukuje jeho transport do jádra, kde společně s CLOCK iniciují transkripci hodinových genů (Tamaru et al., 2009).

Regulace stability PER1 a PER2

Hlavní úlohou CK1 je regulace stability proteinu PER. Kinázy CK1ε a CK1δ v průběhu biologického dne PER postupně fosforylují, a tím ho označují k proteozomální degradaci (Camacho et al., 2001; Keesler et al., 2000; C. Lee et al., 2001). Proteiny PER1 a PER2 jsou fosforylovány v odlišných regionech, což umožňuje nezávislou regulaci jejich stability. Degradace PER1 je indukována fosforylací aminokyselin 121-126 na N-konci, zatímco pro degradaci proteinu PER2 je zásadní fosforylace v regionu Ser477-Ser479, nacházející se několik set aminokyselin proti směru od CKBD (Shirogane et al., 2005; Vanselow et al., 2006). Fosforylace regionu Ser477-Ser479 proteinu PER2 vytváří vazebné místo pro SCF/β-TrCP E3 ubikvitin ligázový komplex. Rozpoznání fosforylovaného PER ligázou β-TrCP1/2 má za následek na ubikvitinu závislou degradaci proteinu v proteazomu 26S (Eide et al., 2005).

U proteinu PER bylo identifikováno celkem 20 možných fosforylačních míst (Vanselow et al., 2006). Fosforylace v odlišném fosforylačním regionu než je vazebné místo pro β-TrCP neoznačuje PER2 k okamžité proteolýze, ale naopak ho stabilizuje (angl.termín „phosphoswitch“). Jako stabilizační slouží předem fosforylovaná oblast FASP, neboli série pěti serinů začínajících Ser662 (Shanware et al., 2011). Tato oblast se nachází přímo v CKBD. Poločas života nově syntetizovaného proteinu PER2 tak závisí na konkrétním místě, ve kterém je fosforylován (Narasimamurthy et al., 2018).

Destabilizace proteinu PER2 probíhá ve třech degradačních stupních. Během prvního stupně je PER2 fosforylován ve vazebném místě pro β-TrCP a rychle degradován. Ve druhém stupni, neboli fázi plató, jsou fosforylovány FASP regiony a degradace je zpomalena. Třetí fáze je na kináze CK1 nezávislá. Fosforylace v jednom fosforylačním místě inhibuje fosforylaci v místě druhém (Zhou et al., 2015). Rychlá degradace proteinu indukovaná fosforylací v β-TrCP vazebném místě automaticky zamezuje další fosforylaci. Tato regulace je vzájemná, fosforylace FASP naopak inhibuje vyvázáním aktivního místa kinázy fosforylaci v β-TrCP vazebném místě (Narasimamurthy et al., 2018).

Mutace CK1ε*tau* způsobuje změnu konformace aktivační smyčky kinázy z pozice „loop down“ do „loop up“. „Loop up“ konformace upřednostňuje fosforylaci vazebného místa pro β-TrCP a snižuje fosforylaci FASP (Philpott et al., 2020). V celkové kinetice je degradace PER2 výrazně efektivnější u mutantní formy kinázy, než u běžné formy kinázy (Zhou et al., 2015). *Tau* mutace tak není „loss of function“, jak se dlouho předpokládalo, ale naopak „gain of function“ (Gallego, Eide, et al., 2006). Balance ve fosforylaci těchto dvou míst je nezbytná pro správné načasování celého cyklu (Philpott et al., 2020). Při inhibici kinázy CK1 dochází ke zpomalení degradace proteinu PER2 a prodloužení celého cyklu (Zhou et al., 2015).

Subcelulární lokalizace PER1 a PER3

Kromě stability proteinu PER, regulují CK1ϵ/δ také jeho subcelulární lokalizaci a transport do jádra. Fosforylace Ser661 a Ser663 PER1 způsobuje konformační změnu proteinu, a tím je odhalena nukleární lokalizační sekvence nezbytná pro transport do jádra (Akashi et al., 2002; Takano et al., 2004). Jaderný import proteinu PER3 je indukován fosforylací Ser613. Fosforylace navíc zvyšuje inhibiční vliv PER3 na heterodimér CLOCK::BMAL1 v transkripčně represivní fázi cyklu (Akashi et al., 2002).

Degradace proteinu CRY

Proteiny CRY1 a CRY2 jsou kinázou CK1ε fosforylovány pouze pokud je kináza navázána v komplexu s proteinem PER (Eide et al., 2002). Fosforylace CRY zapříčiňuje jeho proteolýzu, stejně jako v případě PER (H. Lee et al., 2009).

Regulace transkripční aktivity CLOCK::BMAl1

Odlišný význam má fosforylace u proteinu BMAL1. Fosforylace zde nemá vliv na stabilitu ani na subcelulární lokalizaci proteinu, ale na míru transkripční aktivity heterodiméru CLOCK::BMAL1. Fosforylací BMAL1 je zvýšena jeho transkripční aktivita v průběhu subjektivního dne a inhibice obou izoforem CK1ε a CK1δ má za následek sníženou transkripci hodinových genů *Per* a *Cry* (Eide et al., 2002). Během subjektivní noci je transkripční aktivita heterodiméru CLOC::BMAL1 aktivitou kinázy CK1 naopak inhibována. CK1ε v inhibičním komplexu s PER/CRY fosforyluje CLOCK a způsobuje jeho disociaci z DNA, což vede k inhibici transkripce hodinových genů (Aryal et al., 2017).

2.1.1.2 GSK3β

Ubikvitně aktivovaná glykogensyntáza kináza 3 (GSK3) kináza je u savců zastoupena ve dvou izoformách: α a β. V cirkadiánním rytmu je důležitá právě izoforma GSK3β, vykazující v savčím SCN a dalších metabolicky aktivních orgánech cirkadiánní rytmus ve své enzymatické aktivitě. (Iitaka et al., 2005). GSK3β je inaktivována fosforylací Ser9 na svém N-konci, a to například kinázami PKB/AKT, PKA nebo CDK (Feng et al., 2011; Matsuo et al., 2003; Stambolic & Woodgett, 1994). Při farmakologické inhibici kinázy lithiem dochází u savců k prodloužení periody cirkadiánního rytmu (Abe et al., 2000). Farmakologická inhibice GSK3β jinými inhibitory, jako je například kenpaullone, stejně jako inaktivace genu *GSK3β* naopak celý cyklus zkracuje (Hirota et al., 2008). Zkrácení cyklu v přítomnosti lithia je tak pravděpodobně způsobeno i jinými mechanismy, než pouze inhibicí GSK3β (J. Li et al., 2012).

Jaderný import PER2

Narozdíl od PER1 a PER3 je subcelulární lokalizace proteinu PER2 regulována GSK3β. Fosforylační místo této kinázy se nachází v PAS doméně na aminokyselinách 1-372 a svou lokalizací se tak odlišuje od vazebných míst pro kinázu CK1 a CRY. GSK3β na přechodu subjektivního dne a noci interaguje s proteinem PER2 a způsobuje jeho translokaci do jádra. Nukleární import PER2 je nezávislý na proteinu CRY. Inhibicí GSK3 β je jaderný transport

znemožněn (Iitaka et al., 2005). Kináza GSK3 β reguluje pouze subcelulární lokalizaci PER2 a na jeho stabilitu nemá vliv (Zhou et al., 2015).

Regulace stability nukleárního receptoru REV-ERBα a proteinu CRY2

Fosforylace na serin bohaté oblasti na N-konci jaderného receptoru REV-ERBα vede k jeho stabilizaci. Inhibice kinázy má za následek degradaci REV-ERBα, a tím je zvýšena exprese *Bmal1* (Yin et al., 2006). Inhibice GSK3β dále zapříčiňuje sníženou degradaci proteinu CRY2. Na konci subjektivní noci fosforylace Ser553 indukuje jeho proteolýzu a inhibiční vliv na heterodimér CLOC::BMAL1 je uvolněn (Harada et al., 2005; Iitaka et al., 2005). Pro fosforylaci CRY2 GSK3β je nezbytné, aby byl CRY2 předem fosforylován na svém Ser557 kinázou DYRK1A (Kurabayashi et al., 2010).

Degradace CLOCK a BMAL1

GSK3 dále reguluju stabilitu proteinu BMAL1. Fosforylací Ser12 a Thr21 ho označuje pro ubikvitin protein ligázu E3A (UBE3A). Protein BMAL1 je následně degradován v proteazomu (Sahar et al., 2010). Ve stejné době je kinázou GSK3β fosforylován na Ser427 také protein CLOCK a společně s BMAL1 je v cytoplazmě degradován (Spengler et al., 2009).

2.1.2 Úloha fosforylace při synchronizaci periferních cirkadiánních hodin

2.1.2.1 AMPK

AMP-aktivovaná proteinkináza (AMPK) je vysoce konzervovaná, tkáňově specifická kináza, zapojena do regulace hladiny buněčné energie. Je aktivována při snížené hladině ATP v buňce (shrnuto v Hardie, 2007). U živočichů s denní aktivitou je enzymatická aktivita AMPK nejvyšší během subjektivní noci a naopak nejnižší v době příjmu potravy v aktivní fázi biologického dne (Minokoshi et al., 2004). AMPK hraje důležitou roli při přenosu metabolických signálů do periferních hodin, kam nepronikají světelné signály (Um et al., 2011).

Degradace proteinu CRY

V periferních hodinách v játrech bylo zjištěno, že AMPK fosforyluje Ser71 a Ser280 CRY, a tím reguluje jeho stabilitu. Fosforylace Ser71 zesiluje vazbu CRY s FXBL3 a zvyšuje degradaci CRY. Destabilizací CRY je uvolněn inhibiční efekt na heterodimér CLOCK::BMAL1 na konci subjektivní noci, což umožňuje obnovení jeho transkripční aktivity (Lamia et al., 2009).

Degradace proteinu PER pomocí fosforylace CK1

AMPK zároveň reguluje také stabilitu proteinu PER. AMPK fosforyluje Ser389 CK1ϵ, a tím zvyšuje její enzymatickou aktivitu. Aktivovaná kináza fosforyluje vazebné místo pro β-TrCP na proteinu PER a označuje ho k ubikvitinaci a následné proteozomální degradaci (H.-m. Lee et al., 2011).

AMPK reguluje stabilitu obou proteinů CRY i PER a synchronizuje jejich degradaci (Obr.5). Inhibicí AMPK jsou proteiny CRY a PER stabilizovány a cirkadiánní perioda prodloužena. Její nadměrnou aktivitou je naopak celý cyklus zkrácen (Lamia et al., 2009; H.-m. Lee et al., 2011).

2.1.2.2 mTOR, AKT/PKB, PI3K

mTOR je nutričně senzitivní kináza aktivovaná v periferních hodinách v odpovědi na insulin kinázou AKT. Ve fibroblastech inhibice mTOR prodlužuje periodu a zmenšuje amplitudu cirkadiánního rytmu, zatímco její nadměrná aktivace periodu zkracuje a zvětšuje amplitudu (Ramanathan et al., 2018). mTOR je také důležitá v jaderném importu proteinu PER1 (Y. Liu et al., 2020). AKT je dále zapojena do PI3K-AKT signální dráhy důležité v regulaci transkripční aktivity CLOCK::BMAL1. Inhibicí PI3K je znemožněna tvorba heterodimérů CLOCK::BMAL1 a vazba těchto transkripčních faktorů na E-box cílových genů (Beker et al., 2019).

2.1.3 Úloha fosforylace při světelné synchronizaci hodin v SCN

V závislosti na extracelulárních signálech, jako je například světlo, se v SCN v průběhu biologického dne mění hladina intracelulárních vápenatých iontů a signálních molekul cAMP a cGMP. Jimi aktivované signální dráhy vedou k fosforylaci transkripčního faktoru CREB a fázovému posunu v SCN (Ding et al., 1998; Obrietan et al., 1999). Fosforylací aktivovaný CREB se váže na cAMP responzivní element (CRE), vyskytující se v promotorech cAMP responzivních genů, mimo jiné v promotoru proteinu PER1 a PER 2. Vazba CREB na CRE vede k zahájení transkripce proteinu PER (Travnickova-Bendova et al., 2002). Světelný signál během brzké noci vyvolává fázové zpoždění a signál na konci subjektivní noci fázový posun hodin vpřed. Sumace jednotlivých fázových posunů synchronizuje centrální pacemaker s vnějším prostředím (Ding et al., 1998; Obrietan et al., 1999). Signalizace je recipročně regulována cirkadiánními hodinami. Protein CRY1 může snižovat hladinu cAMP skrze svou vazbu na adenylcyklasu, a tím inaktivovat Ca+/cAMP-dependentní signalizaci (Narasimamurthy et al., 2012).

2.1.3.1 CaMK, PKC, MAPK, PKA, PKG

Kalcium/kalmodulin-dependentní kináza (CaMK)

Zvýšenou intracelulární hladinou Ca+ iontů je aktivována kalcium/kalmodulin-dependentní kináza (CaMK). Aktivovaná CaMPKII fosforyluje Ser142 transkripčního faktoru CREB (Tischkau et al., 2003). Inhibice CaMKII vede k potlačení světlem indukované exprese proteinu PER1 a narušení synchronizace centrálních hodin (Yokota et al., 2001). CaMK dále reguluje aktivitu NO syntázy, a tím moduluje hladinu cGMP v buňce a aktivitu proteinkinázy G (Agostino et al., 2004). CaMKII také přímo fosforyluje jeden z hodinových genů, transkripční faktor CLOCK, čímž zvyšuje jeho transkripční aktivitu (Obr.3) (Weber et al., 2006).

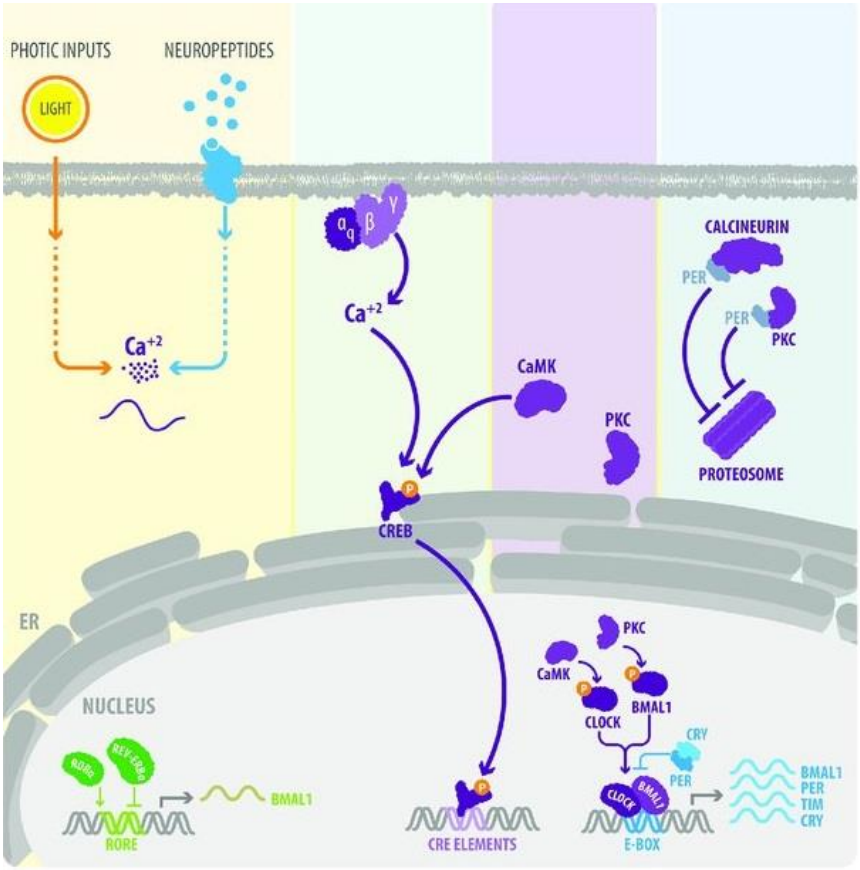
Protein kináza C (PKC)

Protein kináza C (PKC), stejně jako CaMPKII a PKA, fosforyluje a aktivuje transkripční faktor CREB. PKC je důležitá ve světelné synchronizaci centrálních hodin (Jakubcakova et al., 2007). Její aktivita není regulována pouze endogenními signály. V průběhu transkripčně represivní části dne asociují PKCα a její receptor RACK-1 s proteinem BMAL1 (Obr.3). Fosforylací Ser440, Ser441 a Ser446 negativně ovlivňuje jeho transkripční aktivitu (Robles et al., 2010). PKC má důležitou roli při synchronizaci buněk při náhlé změně extracelulárních podmínek, například při výměně média. V reakci na změnu extracelulárních signálů PKC fosforyluje Ser9 CLOCK, což způsobuje jeho translokaci do jádra a aktivaci transkripce hodinových genů. PKC má význam také v remodelaci chromatinu, kdy fosforylací demetylázy LSD1 indukuje její vazbu s heterodimérem CLOCK::BMAL, a pozitivně tak reguluje transkripci hodinových genů (Nam et al., 2014).

MAP kinázy (MAPK)

Nezbytnou součástí Ca+ aktivované signální dráhy vedoucí k fosforylaci CREB a expresi *Per* jsou ERK/MAP kinázy (Impey et al., 1998). MAPK kromě transkripčního faktoru CREB přímo fosforyluje proteiny TTFL. Proteinkinázy JNK v odpovědi na světelný stimul fosforylují Ser 520, Ser 592 a Thr527 proteinu BMAL1, a tím aktivují jeho transkripční aktivitu. Inaktivace genů pro kinázy JNK1 a JNK2 vede k prodloužení periody periferních cirkadiánních hodin ve fibroblastech. K fázovému posunu SCN vede vyřazení genu pro neuronálně specifickou kinázu JNK3 (Yoshitane et al., 2012). Thr534 na C-koncové aktivační doméně proteinu BMAL1 je dále fosforylován kinázou p42, což vede ke snížené vazby s proteinem CLOCK a snížení jeho transkripční aktivity. V průběhu subjektivní noci MAP kinázy dále fosforylují

Ser265 proteinu CRY1 a Ser247 proteinu CRY2. Fosforylace v těchto serinech pozitivně reguluje inhibiční vliv proteinu CRY (Sanada et al., 2004).



Obr.3 Aktivace PKC a CaMK Ca+inoty a jejich role ve světelné synchronizaci savčích centrálních hodin. Aktivované Ca+ a cAMP-dependentí kinázy fosforylují transkripční faktor CREB, který následně translokuje do jádra, nasedá na CRE a iniciuje expresi proteinu Per. CaMK a PKC také přímo fosforylují transkripční faktory CLOCK a BMAL1 (Cavieres-Lepe & Ewer, 2021).

Proteinkináza A (PKA)

Na začátku subjektivní noci je signálními molekulami cAMP aktivovaná proteinkináza A (PAK) (Ding et al., 1998). Vazba cAMP na regulační podjednotku PKA vede k disociaci a translokaci její katalytické podjednotky. Takto aktivovaná PKA fosforyluje Ser133 transkripčního faktoru CREB. Fosforylovaný CREB interaguje s deacetylázami CBP a p300. Navázáním PolII na komplex CREB/CBP/p300 je zahájena transkripce PER1 (Balsalobre et al., 2000). Dalším substrátem PKA je v cirkadiánním rytmu například GSK3β, kterou inaktivuje fosforylací Ser9 (Fang et al., 2000). PKA je dále důležitá v Ca+ aktivované signální dráze pro translokaci kinázy ERK jádra (Impey et al., 1998).

Protein kináza G (PKG)

Vtokem Ca+ iontů během světelné signalizace v SCN je aktivována NO syntáza. Zvýšená hladina NO dále aktivuje guanylátcyklázu, která následně syntetizuje signální molekuly cGMP. cGMP se váže na proteinkinázu G (PKG), a tím ji aktivuje (Ding et al., 1998). V savčích SCN vykazuje cirkadiánní oscilaci ve své aktivitě cGMP II (Oster et al., 2003). Fosforylací transkripčního faktoru CREB aktivuje expresi proteinu PER. Tato kináza je aktivována na konci subjektivní noci a je důležitá pro fázový posun vpřed a přechod subjektivní noci v den (Prosser et al., 1989).

2.1.4 Úloha fosforylace při cirkadiánní regulaci buněčného cyklu

2.1.4.1 CDK1, CDK5, CDK9

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) propojují cirkadiánní rytmus s buněčným cyklem. Role cirkadiánních hodin v řízení buněčného cyklu je zkoumána například ve spojitosti s nádorovou transformací. Transkripční faktory CLOCK a BMAL1 regulují expresi regulátorů buněčného cyklu. Hetodimér CLOCK::BMAL1 cirkadiánně aktivuje například transkripci serin/threonin kinázy Wee1, důležité pro inhibici přechodu buněk z G2 do M fáze (Matsuo et al., 2003). Regulace je obousměrná, aktivita CDK recipročně ovlivňuje jádro cirkadiánních hodiny**.**

CDK1 fosforylací moduluje stabilitu jaderného receptoru REV-ERBα. Fosforylace probíhá v průběhu subjektivního dne. Fosforylovaný REV-ERBα je rozpoznán E3 ubikvitin ligázou FBXW7 a následně degradován v proteazomu. Jeho degradací je zvýšena exprese *Bmal1*, a tím regulována hodinová amplituda cirkadiánního rytmu (Zhao et al., 2016).

CDK5 během subjektivního dne fosforyluje Thr451-Thr461 proteinu CLOCK, což způsobuje jeho transport do jádra. Společně s CLOCK se do jádra přesouvá také BMAL1 fosforylovaný CK2, a tím je umožněno zahájení jejich společné transkripční aktivity (Kwak et al., 2013). V SCN je CDK5 důležitá pro jaderný import proteinu PER. Fosforylace Ser394 usnadňuje jeho interakci s CRY a indukuje transport komplexu PER2/CRY1 do jádra (Brenna et al., 2019).

Další z CDK regulující molekulární mechanismus cirkadiánních hodin je CDK9. Tato kináza se váže s jaderným receptorem REV-ERBα. Interakce CDK9 s REV-ERBα snižuje jeho vazbu na RORE. CDK9 tak snižuje expresi *Bmal1* (Ou et al., 2019).

2.1.5 Defosforylace

2.1.5.1 PP1, PP2A, PP4, PP5

Opozitní působení proteinových kináz a fosfatáz je nezbytná pro zachování 24h-periody cyklu. Do regulace cirkadiánního rytmu savců jsou zapojeny především fosfoprotein fosfatázy (PPP) 1, 2A , 4 a 5. Fosfatázy regulují stabilitu hodinových proteinů i aktivitu samotných kináz.

Dynamická rovnováha mezi CK1 a PP1 reguluje hladinu proteinu PER v cytoplazmě (H.-m. Lee et al., 2011). Zatímco fosforylovaný PER je degradován, defosforylace vede k jeho stabilizaci (Gallego, Kang, et al., 2006). V PP1 deficientních buňkách bylo pozorováno zvýšené množství fosforylované formy PER2, což mělo za následek vyšší míru jeho degradace (H. -m. Lee et al., 2011). V závislosti na struktuře své katalytické podjednotky PP1 odštěpuje fosfátovou skupinu z vazebného místa pro β-TrCP nebo FASP (Shanware et al., 2011). Defosforylace FASP oblasti prodlužuje délku degradační fáze plató, a tím celkově prodlužuje periodu cirkadiánního rytmu (Zhou et al., 2015). PP1 dále defosforyluje CREB, a tím ukončuje jeho transkripční aktivitu (Mauna et al., 2011).

Další z fosfatáz defosforylující transkripční faktor CREB je PP2A. PP2A defosforyluje Ser133 CREB a ukončuje transkripci proteinu PER (Wadzinski et al., 1993). Přestože u *Drosophily* a *Neurospory* PP2A defosforyluje také protein PER, u savců tato fosfatáza nevykazuje ve své aktivitě cirkadiánní rytmus (Sathyanarayanan et al., 2004; Z. Yang & Sehgal, 2001). Její inhibice nepřinesla u savců žádné změny v poměru fosforylovaného a nefosforylovaného PER (H. -m. Lee et al., 2011).

Význam PP4 byl v savčím mechanismu cirkadiánních hodinách pozorován teprve nedávno. PP4 defosforylací proteinu BMAL1 zvyšuje vazbu heterodiméru CLOCK::BMAL1 na DNA, a tím ho chrání před příliš brzkou transaktivací. Defosforylace proteinu BMAL1 dále přispívá k oddálení inhibičního vlivu komplexu PER/CRY/CK1 a prodloužení transkripčně aktivní části dne. Genetická nedostatečnost v PP4 zkracuje cirkadiánní periodu, zatímco její nadměrná exprese prodlužuje (Klemz et al., 2021).

Další významnou fosfatázou v cirkadiánním rytmu savců je PP5, exprimovaná v centrálních i periferních hodinách. Substrátem PP5 je CK1ε. Odštěpením autofosforylační domény se kináza stává aktivní. Tento aktivační proces může být inhibován proteiny CRY1 a CRY2, které mohou PP5 deaktivovat. Přestože *in vitro* mohou CKI defosforylovat také PP1, PP2A a PP2B, ve fyziologických podmínkách je aktivace schopná pouze PP5. Její inhibice snižuje fosforylaci proteinu PER, a ten je tím stabilizován (Partch et al., 2006).

2.2 PTM a remodelace chromatinu

Přestavba chromatinu z kondenzovaného do transkripčně aktivního je zcela zásadní mechanismus v regulaci genové exprese. Stěžejní modifikace chromatinu jsou acetylace, metylace a fosforylace (shrnuto v Clapier & Cairns, 2009). PTM histonů hrají důležitou roli v mnoha dalších buněčných systémech, a proto byl jejich význam zkoumán také v molekulárním mechanismu cirkadiánních hodin.

2.2.1 Acetylace

Acetylázy p300 a CBP v jádře interagují s transkripčním faktorem CLOCK a společně s ním rytmicky připojují acetylovou funkční skupinu na volné -NH2 skupiny lysinů na N-koncích histonů (viz kapitola 2.3.1). Acetylací histonů je zrušen jejich pozitivní náboj a v dané oblasti dochází k rozvolnění chromatinu a zahájení transkripce (Grimaldi et al., 2007; Hirayama et al., 2007). V transkripčně aktivní části dne jsou acetylovány histony v promotorových oblastech hodinových genů PER1,2 a CRY1 na Lys9H3 a Lys14H4. K aktivaci transkripce dochází pouze v přítomnosti koaktivačního transkripčního faktoru pCAF. Histonová deacetyláza 3 (HDAC3) transkripci inhibuje (Hosoda et al., 2009). Antagonisticky acetylázám p300/CBP a CLOCK dále působí v regulaci exprese hodinových genů deacetyláza sirtuin 1 (Sirt1) (viz kapitola 2.3.2) (Nakahata et al., 2008). Sirt1 negativně reguluje expresi hodinových genů deacetylací H3K9 a H4K14 v E-boxech jejich promotorů (Bellet et al., 2013). Vedle Sirt1 se na deacetylaci histonů a inhibici transkripce v SCN i periferních hodinách dále podílejí Sirt3 a Sirt6 (Masri et al., 2014; Peek et al., 2013). Cirkadiánní rytmus v acetylaci H3 byl pozorován v játrech, kardiovaskulárním systému a SCN (Curtis et al., 2004; Etchegaray et al., 2003; Naruse et al., 2004).

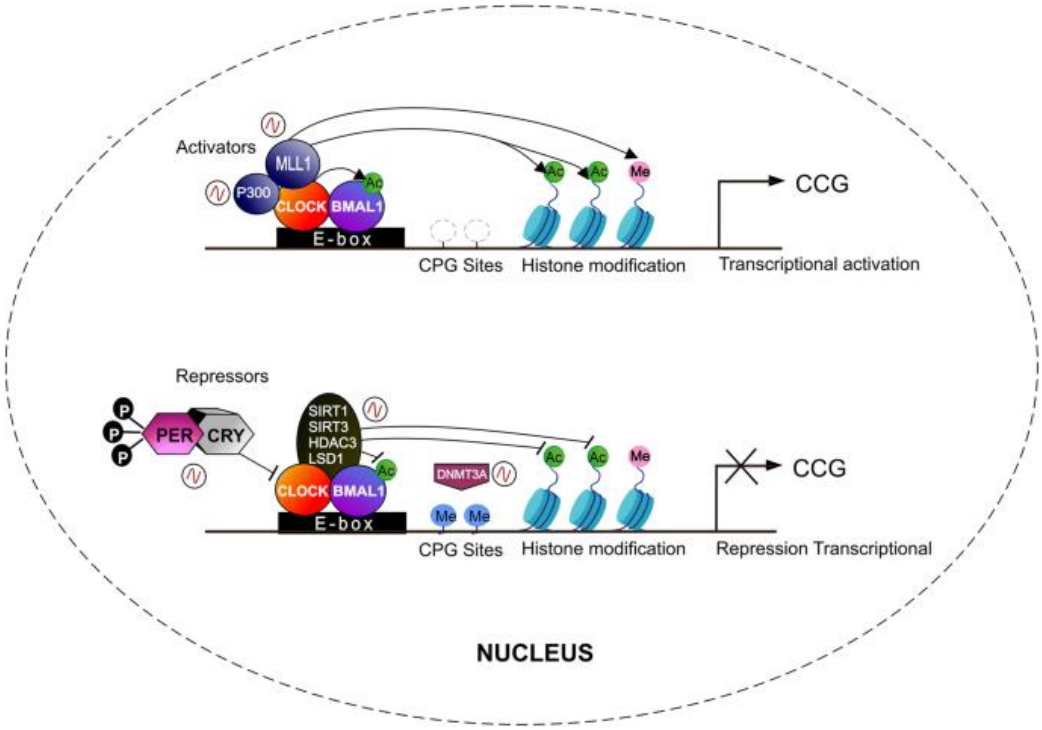
2.2.2 Metylace

Ve stejném rytmu s acetylací probíhá histonová metylace. Metyltransferáza MLL1 cirkadiánně asociuje s CLOCK a trimetyluje Lys4H3 (Katada & Sassone-Corsi, 2010). Pro zahájení transkripce je důležitá také demetylása Jarid1, která blokuje histon deacetylázu 1 (DiTacchio et al., 2011). V transkripčně represivní části biologického dne je Lys4 demetylován demetylázou LSD1 (Nam et al., 2014). V transkripčně neaktivních oblastech byla pozorována rytmická metylace Lys9 a Lys27 (Katada & Sassone-Corsi, 2010). Cirkadiánně dimetylovaný Lys79H3 a trimetylovaný Lys36H3 jsou důležité elongační značky PolII a celkově je tak histonová metylace důležitý mechanismus v regulaci exprese hodinových genů (Koike et al., 2012; Xia et al., 2015).

2.2.3 Fosforylace

Další z PTM H3 je fosforylace Ser10. Fosforylace histonů v SCN probíhá na základě světelného stimulu, a to ve stejné době jako jejich acetylace. Rozvolnění chromatinu umožňuje v odpovědi na světelný signál zahájení transkripce PER (Crosio et al., 2000).

PTM histonů jsou důležitým mechanismem v regulaci transkripce hodinových genů (Obr.4). Kromě centrálních cirkadiánních hodin jsou rytmické změny ve struktuře chromatinu ovlivňovány také metabolismem skrze poskytování základních substrátů, jako je Acetyl-CoA a S-adenosyl methionin (Mauvoisin et al., 2017; Xia et al., 2015).



Obr.4 PTM a remodelace chromatinu v regulaci exprese hodinových genů. Acetylázy CLOCK a p300 společně s metylázou MLL1 rozvolňují chromatin a přispívají k aktivaci transkripci hodinových genů. Ve druhé části dne deacetylázy HDAC3, Sirt1, Sirt3 a demetyláza LSD1 transkripci inhibují (Hernández-Rosas et al., 2020).

2.3 Acetylace/Deacetylace

2.3.1 CLOCK

Vnitřní acetyl transferázová aktivita byla objevena také u transkripčního faktoru CLOCK. Tento protein na svém C-konci obsahuje konzervovanou doménu pěti aminokyselin shodnou s doménou lidského acetyl-COA vazebného proteinu (Doi et al., 2006).

Pro enzymatickou aktivitu CLOCK je nezbytná přítomnost jeho vazebného partnera BMAL1. Jejich vzájemná vazba pravděpodobně vede ke změně struktury proteinu CLOCK, a tím je aktivována jeho acetyl transferázová aktivita (Etchegaray et al., 2003). BMAL1 je CLOCK acetylován v inhibiční části cyklu na Lys253 proteinu BMAL1 (Hirayama et al., 2007). Acetylací BMAL1 je podpořena jeho interakce s proteinem CRY. Zvýšenou vazbou CRY na heterodimér CLOCK::BMAL1 je umocněn jeho inhibiční vliv. Protein CLOCK tak během dne působí střídavě jako aktivátor a inhibitor transkripce (viz kapitola 2.2.1). Dalším ze substrátů CLOCK je protein PER2, u něhož acetylace inhibuje jeho proteozomální degradaci a zamezuje tak předčasnému uvolnění jeho inhibičního vlivu (Asher et al., 2008). HAT aktivita proteinu CLOCK závisí na hladině energie v buňce a je pozitivně regulována redukovaným kofaktorem NADH (Doi et al., 2006).

2.3.2 Sirt1

NAD+-dependentní deacetyláza sirtuin 1 (Sirt1) v jádře asociuje s heterodimérem CLOCK::BMAL1 a reguluje transkripci hodinových genů (viz kapitola 2.2.1) (Nakahata et al., 2008). Hladina NAD+ v průběhu dne je řízena cirkadiánními hodinami. Transkripce NAMPT, limitního enzymu pro syntézu NAD+, je regulována heterodimérem CLOCK::BMAL1. Sirt1 reguluje syntézu svého vlastního kofaktoru kompeticí s CLOCK::BMAL1 o vazebné místo na promotor enzymu NAMPT (Ramsey et al., 2009). Tato transkripčně enzymatická smyčka tvoří důležitou součást propojení mezi cirkadiánním systémem a metabolismem (Imai & Yoshino, 2013).

V transkripčně aktivní části dne Sirt1 reguluje transkripci hodinových genů skrze expresi *Bmal1*. V neuronálních buňkách SCN se Sirt1 společně s PGC-1α váže na promotor BMAL1 a zvyšuje jeho expresi (Chang & Guarente, 2013). Sirt1 dále reguluje stabilitu proteinu PER2 navázaného na heterodimér CLOCK::BMAL1. Deacetylovaný PER je proteozomálně degradován, a tím je uvolněn jeho inhibiční vliv na CLOCK::BMAL1 (Asher et al., 2008). Regulace PER2 a Sirt1 je vzájemná. Protein PER2 se váže promotor Sirt1 ve vazebném místě pro CLOCK::BMAL1 a negativně reguluje expresi *Sirt1*. Ve stáří je množství Sirt1 redukováno, což má za následek zvýšenou hladinu proteinu PER2 a desynchronizaci celého rytmu (Wang et al., 2016).

2.3.3 HDAC3

HDAC3 udržuje homeostázu mezi cirkadiánním rytmem a metabolismem. Tato deacetyláza interaguje s jaderným receptorem REV-ERBα, a podílí se tak například

na rytmickém řízení exprese genů zapojených do metabolismu lipidů a glukoneogeneze (Feng et al., 2011; Sun et al., 2012). HDAC3 je dále důležitá pro rytmickou acetylaci a deacetylaci histonů (viz kapitola 2.2.1). HDAC3 deacetyluje také protein BMAL1, a ovlivňuje jeho stabilitu. Začátkem subjektivního dne HDAC3 stabilizuje protein BMAL1, a přispívá tak k expresi hodinových genů. V průběhu subjektivní noci naopak blokací vazebného místa pro FBXL3 stabilizuje protein CRY1 a pozitivně reguluje jeho interakci s proteinem BMAL1 (Shi et al., 2016).

2.4 SUMOylace

V procesu SUMOylace jsou na substrát kovalentně připojovány proteiny z rodiny SUMO (angl. termín „small ubiquitin like-modifier“) (Meluh & Koshland, 1995) Cílový protein může být polysumoylován sekvenčně podobnými izoformami SUMO2/3 (Saitoh & Hinchey, 2000). U některých proteinů může být polysumoylace kritická pro rozeznání ubikvitin ligázu, což může vést k proteozomální degradaci proteinu (Uzunova et al., 2007). SUMOylace může dále indukovat například fosforylaci proteinu (Luo et al., 2014). SUMOylace je významná PTM při vystavení buněk zvýšené teplotě, tlaku nebo oxidačním stresu (Bossis & Melchior, 2006).

2.4.1 Regulace transkripční aktivity CLOCK::BMAL1

BMAL1 je polysumoylován na Lys259 ve své PAS doméně. Tato PTM je nezbytná pro jeho transaktivaci a následnou degradaci (Cardone et al., 2005). SUMOylace BMAL1 indukuje tvorbu komplexů CLOCK/BMAL1/CBP v jaderných tělíscích, a tím je zahájená transkripce proteinu PER (Y. Lee et al., 2015). Polysumoylovaný Lys259 dále slouží jako molekulární značka pro jeho ubikvitinaci. Po ukončení své transkripční aktivity je BMAL1 degradován na ubikvitinu závislou proteolýzou (J. Lee et al., 2008). SUMOylace BMAL1 je důležitá v synchronizaci jednotlivých buněk v reakci na změnu extracelulárních podmínek. Po přidání proteázy do média je BMAL1 velmi rychle sumoylován a translokován do jádra, a tím jsou hodiny synchronizovány (Y. Lee et al., 2015). Prvotní studie předpokládala, že degradace BMAL1 je zprostředkována připojením SUMO1 (Cardone et al., 2005). Pozdější studie přikládají hlavní význam SUMO2/3, které jsou schopny cílový protein polysumoylovat, a tím ho označit pro připojení molekuly ubikvitinu (J. Lee et al., 2008).

SUMOylace CLOCK byla zpozorována v souvislosti cirkadiánního rytmu a vzniku nádorového bujení. CLOCK je cirkadiánně sumoylován na dvou různých lysinových zbytcích, Lys67 a Lys851 na C-konci své bHLH/PAS domény. SUMOylace CLOCK zvyšuje jeho transkripční aktivitu a také transkripční aktivitu receptoru pro estrogen α (ERα), stimulujícího

buněčnou proliferaci (S. Li et al., 2013). Jedná se o reverzibilní modifikaci, sentrin-specifická proteasa 1 protein desumoyluje, a tím inhibuje jeho transkripční aktivitu (S. Li et al., 2013).

2.4.2 Duální efekt SUMOylace PER2

Protein PER2 je SUMOylován SUMO1 i SUMO2 na Lys736. Polysumoylace SUMO2 usnadňuje proteinu PER2 interkaci s β-TrCP vedoucí k proteazomální degradaci. Naproti tomu připojení SUMO1 slouží jako signál pro CK1 k fosforylaci Ser662. Fosforylací Se662 je PER stabilizován a je prodloužen jeho inhibiční vliv na heterodimér CLOCK::BMAL1 (viz kapitola 2.1.1.1). SUMOylace SUMO1 je dále důležitá pro vytvoření PER2/CRY/CK1 komplexu a jeho transport do jádra (Chen et al., 2019).

2.5 Ubikvitinace/Deubikvitinace

Při ubikvitinaci dochází ke kovalentnímu připojení molekuly ubikvitinu na N-konec cílového proteinu (Goldknopf et al., 1977). Tato modifikace označuje protein k degradaci v proteazomu, mění jeho subcelulární lokalizaci, případně moduluje jeho aktivitu nebo vazebné vlastnosti. K proteozomální degradaci vede polyubikvitinace Lys48 a Lys29 (Johnson et al., 1995). Ubikvitinace se odehrává ve třech krocích. V prvním kroku je ubikvitin vázán ubikvitin aktivujícím enzymem E1 a následně je přenesen na ubikvitin konjugující enzym E2. Připojení ubikvitinu na cílový protein zajišťuje specifická E3 ubikvitin ligáza (shrnuto v Pickart, 2001).

2.5.1 Degradace PER, CRY

Hlavním mediátorem degradace proteinu CRY je F-box protien FBXL3. FBXL3 vytváří společně s SCF E3 ubikvitin ligázový komplex označující CRY1,2 k degradaci v proteazomu. Vazba na FXBL3 dále zamezuje interakci CRY s PER (Luo et al., 2014). Mutace v FBXL3 vede ke snížení degradace CRY a prodloužení periody (Busino et al., 2007; Siepka et al., 2007). Stabilita CRY je dále regulována paralogem proteinu FBXL3, FBXL21. FBXL21 se narozdíl od FBXl3 vyskytuje jak v jádře, tak v cytoplazmě. V průběhu subjektivního dne FBXL21 degraduje protein CRY, a zamezuje tak jeho nadměrné akumulaci v cytoplazmě. Během subjektivní noci naopak v jádře FBXL21 chrání CRY před příliš rychlou FBXL3 závislou degradací a předčasnému uvolnění jeho inhibičního vlivu na CLOCK::BMAL1. Oddělené role a buněčná kompartmentace FBXL3 a FBXL21 jsou nezbytné pro regulaci proteinu CRY, a s tím související délku cyklu (Yoo et al., 2013). Ubikvitinace proteinu CRY je snížena v přítomnosti PER2. Protein PER vyvazuje vazebné místo pro FBXL3 a chrání CRY před proteolýzou (Xing et al., 2013).

Ubikvitinace proteinu PER β-TrCP1 a β-TrCP2 je závislá na primární fosforylaci proteinu CK1. β-TrCP1 a β-TrCP2 jsou vzájemně redundantní. Při inaktivaci genu pro jednu z E3 ubikvitin ligáz nedochází k žádné změně v délce periody. Vyřazení genu pro obě ligázy sice prodlužuje cirkadiánní periodu, degradace PER však zůstává v určité míře zachována. E3 ubikvitin ligázy β-TrCP tedy nejsou v cirkadiánním systému nenahraditelné, ale PER mohou značit k proteozomální degradaci i jiné E3 ubikvitin ligázy (Ohsaki et al., 2008).

V molekulárním mechanismu cirkadiánních hodin byla dále objevena ubikvitin protein ligáza E3A ubikvitinující transkripční faktor BMAL1 (Gossan et al., 2014; Chen et al., 2019). Degradaci jaderného receptoru REV-ERBα zprostředkovává FBXW7. Primární fosforylace REV-ERBα kinázou CDK1 vede k připojení SUMO2 a následné FBXW7 dependentní degradaci (viz kapitola 2.1.4.1) (Zhao et al., 2016).

2.5.2 Deubikvitinace

Mezi významné deubikvitinázy cirkadiánního rytmu patří ubikvitin C-terminální hydroláza 2 (USP2). USP2 deubikvitinací stabilizuje proteiny BMAL1, PER a CRY (Scoma et al., 2011; Tong et al., 2012; Y. Yang et al., 2012). Další důležitou deubikvitinázou je UBR4 stabilizující v SCN protein PER (Ling et al., 2014).

2.6 O-vázaná N-acetylglukosoaminace

O-vázaná N-acetylglukosoaminace je NAD+-dependentní, nutričně senzitivní PTM důležitá pro metabolickou synchronizaci periferních hodin. Při této modifikaci je monosacharid β-*N*-acetylglukosamin z UDP-N-acetylglucosaminu připojován na hydroxylovou skupinu serinu a threoninu cílového proteinu (Torres & Hart, 1984). Přenos monosacharidu katalyzují acetylglukosaminyltransferázy (OGT), hydrolýzu acetylglukosaminidázy (OGA) (Haltiwanger et al., 1992). O-vázaná N-acetylglukosaminace je regulována množstvím dostupné glukózy skrze hexoaminovou biosystetickou dráhu. Extracelulární hladina glukózy moduluje intracelulární hladinu UDP-N-acetylglukosaminu zdroje β-*N*-acetylglukosaminu (Obr.5) (Taylor et al., 2008).

Aktivita OGT a OGA je během dne regulována cirkadiánními hodinami (Kaasik et al., 2013). OGT je rytmicky aktivována fosforylací Ser3 a Ser4 zbytků kinázami GSK3β, AMPK a CaMKII (Kaasik et al., 2013; Lubas & Hanover, 2000; Ong et al., 2018). Narušení exprese OGT vedla v myších játrech k narušení cirkadiánního rytmu glukozové homeostázy (M.-D. Li

et al., 2013). Pro udržení rovnováhy mezi aktivitou OGT a OGA a cirkadiánními hodinami je nezbytné přijímat potravu v přirozené době (X. Liu et al., 2021).

2.6.1 N-acetylglukosoaminace PER, BMAL1

V metabolicky aktivních orgánech je v aktivní části dne kinázou AMPK zvyšován glukózový příjem. Zvýšená hladina glukózy má za následek N-acetylglukosaminaci proteinu PER1. Nadměrná N-acetylglukosaminace způsobená inhibicí OGA vede ke snížení hladiny proteinu PER během temnostní fáze a fázovému posunu SCN (Durgan et al., 2011). Snížená hladina proteinu PER je zapříčiněna snížením jeho stability. V přítomnosti zvýšené hladiny glukózy blokuje N-acetylglukosaminace fosforylaci PER kinázou CK1 v oblasti FASP Tato hypofosforylovaná forma PER má nižší stabilitu (Kaasik et al., 2013). U *Drosophily* N-acetylglukosaminace proteinu PER moduluje také jeho interakci s ostatními proteiny. O-vázaná N-acetylglukosaminace Ser945 brání vazbě PER2 na protein CLOCK, a tím brání předčasnému nástupu transkripčně represivní fáze cyklu. Tento efekt však u savců zatím nebyl potvrzen (Y. H. Li et al., 2019).

Dalším z proteinu podléhající N-acetylglukosaminaci při zvýšené hladině glukózy je transkripční faktor BMAL1 (Durgan et al., 2011). V periferních hodinách připojení N-acetylglukosaminu stabilizuje heterodimér CLOCK::BMAL1 inhibicí jeho na ubikvitinu závislé proteolýzy. Nadměrná exprese OGT zvyšuje amplitudu v oscilaci hodinových genů, zatímco její inaktivace jejího genu snižuje N-acetylglukosaminaci CLOCK i BMAL1 a celkovou oscilaci v hladině BMAL1 během dne (M.-D. Li et al., 2013).

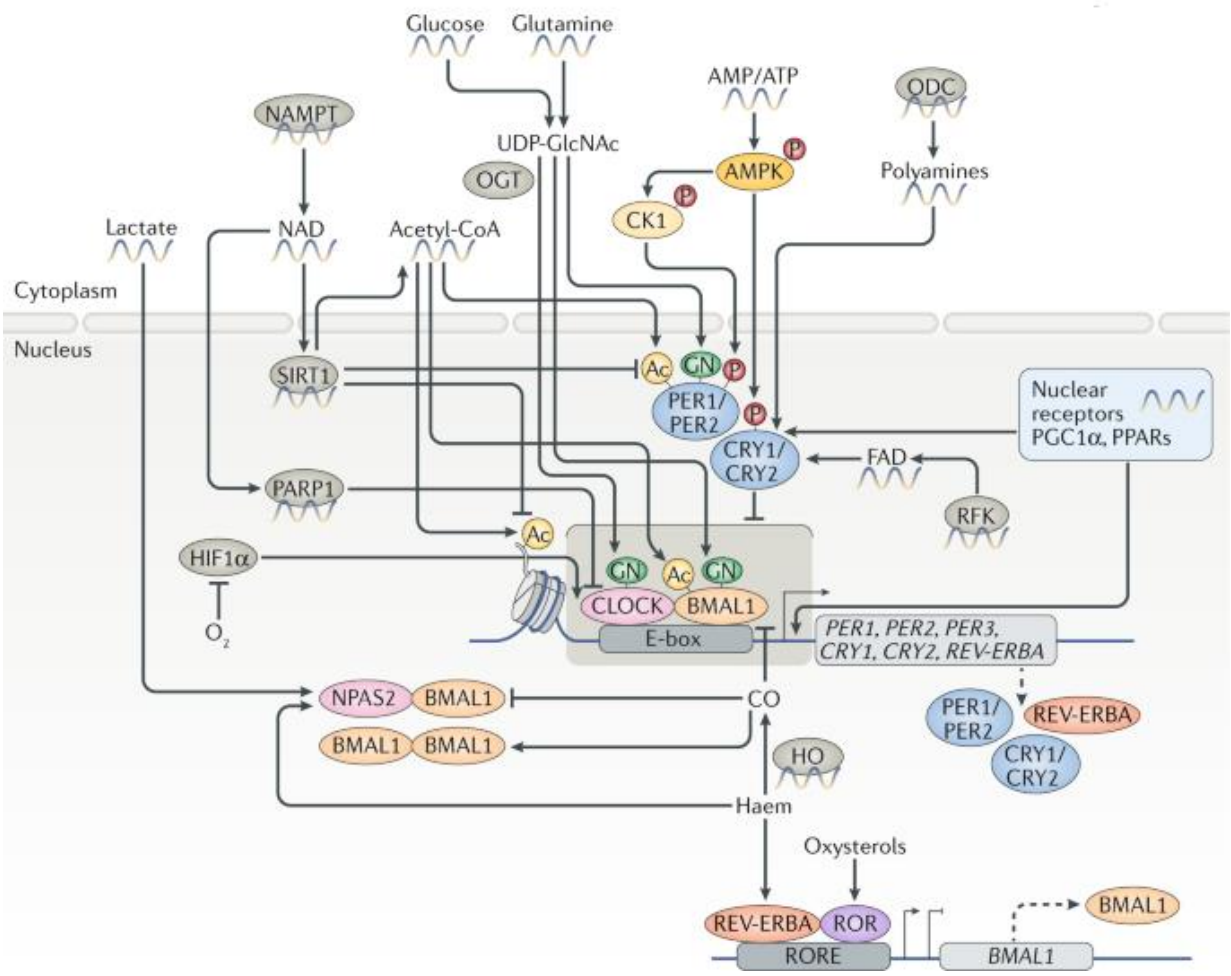
2.7 PolyADP-ribosylace

PolyADP-ribosylace je NAD+-dependentní PTM, při které je na cílový protein kovalentně připojováno několik podjednotek ADP-ribózy (Hayaishi & Veda, 1977). Přenos ADP-ribózy z NAD na substrát katalyzují enzymy zvané poly(ADP-ribóza) polymerázy (PARP). V ovlivnění cirkadiánních hodin metabolickým stavem v buňce je důležitá zejména PARP1, vykazující ve své enzymatické aktivitě pravidelný rytmus. PARP1 je nezávislá na centrálních hodinách a její aktivita je regulována příjmem potravy (Stokkan et al., 2001). Enzymatická aktivita v játrech osciluje s cirkadiánní periodou. Nejnižší aktivitou byla naměřena v době příjmu potravy (Asher et al., 2010).

2.7.1 PolyADP-ribosylace CLOCK

V průběhu subjektivní noci se PARP1 váže na protein CLOCK a následně ho polyribosyluje (Obr.5). PolyADP-ribosylace významně ovlivňuje sílu vazby komplexu

CLOCK::BMAL1 na DNA. U PARP1 deficientní myši je výrazně zvýšena sílu vazby CLOCK::BMAL1 na DNA, a tím snížena transkripční aktivita heterodiméru CLOCK::BMAL1. Deficience vede k celkovému fázovému posunu centrálního pacemakeru v SCN. PolyADP-ribosylace nebyla pozorován u žádných dalších hodinových genů (Asher et al., 2010).



Obr.5 Ovlivnění cirkadiánních hodin změnou metabolického stavu v buňce. Zvýšený poměr AMP/AKT aktivuje AMPK, která následně fosforyluje CKI a CRY, což vede k degradaci PER a CRY. Hladina dostupné glukózy reguluje aktivitu OGT a transkripční aktivitu BMAL1. NAD+-dependentní Sirt1 a PARP1 inhibují transkripci hodinových genů v represivní části biologického dne (Reinke &Asher, 2019).

3 Závěr

Biologické hodiny jsou důležitým regulačním mechanismem organismu. Současné výzkumy se zaměřují jak na prohloubení poznatků o regulaci molekulárního mechanismu cirkadiánních hodin, tak na interakci cirkadiánních hodin s dalšími buněčnými systémy. Jednou z významných otázek je například způsob regulace změny konformace aktivační smyčky CK1, degradace proteinu PER a ovlivnění délky cirkadiánní periody. Další výzkumy se zabývají možností využití cirkadiánních hodin jako potencionálního terapeutického cíle při léčbě civilizačních onemocnění.

Farmakologická regulace biologického rytmu, úprava cyklů spánku/bdění a přijímání potravy by mohla podpořit terapeutický účinek ostatních léčebných metod. Možnými farmakologickými cíli jsou jak samotné hodinové proteiny, tak další regulátory cirkadiánních hodin. Proteinkinázy jsou vzhledem ke svému zapojení do velkého množství specifických signálních drah velkým objektem zájmu. CK1ϵ/δ jsou možným chronoterapeutickým cílem například při léčbě rakoviny. Tato kináza je vysoce exprimovaná v transformovaných buňkách při leukemii, rakovině prsu, slinivky a vaječníků a modulace její enzymatické aktivity by mohla přispět k úspěšné léčbě (Rosenberg et al., 2015). Výzkum zabývající terapií rakoviny slinivky navrhují zacílení na Sirt1 (Masri et al., 2014). Farmakologická modulace aktivity další z významných kináz, GSK3β, by mohla pomoci pacientům trpícími bipolární poruchou a Alzheimerovou chorobou (Griebel et al., 2019; Kaladchibachi et al., 2007; McCarthy et al., 2013). Cirkadiánní hodiny jsou dále potenciálním cílem při léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Podpora enzymatické aktivity Sirt1 by mohla být využita při léčbě aterosklerózy (Man et al., 2021). Vzhledem ke své roli v regulaci sekrece inzulinu a metabolismu glukózy a lipidů je na Sirt1 možné zacílit také při léčbě diabetu 2.typu (Kitada et al., 2013).

V prevenci výše vyjmenovaných i dalších onemocnění je důležité dbát na správnou životosprávu. V současné době je přirozený biorytmus narušován umělým osvětlením, přijímáním potravy v nepřirozenou denní dobu a prací na směny. Zkracování délky spánku a celková desynchronizace může vést nejen ke spánkovým poruchám, ale i k dalším vážným zdravotním problémům.

Seznam literatury

Abe, M., Herzog, E. D., & Block, G. D. (2000). Lithium lengthens the circadian period of individual suprachiasmatic nucleus neurons: *NeuroReport*, *11*(14), 3261–3264. https://doi.org/10.1097/00001756-200009280-00042

Agostino, P. V., Ferreyra, G. A., Murad, A. D., Watanabe, Y., & Golombek, D. A. (2004). Diurnal, circadian and photic regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase II and neuronal nitric oxide synthase in the hamster suprachiasmatic nuclei. *Neurochemistry International*, *44*(8), 617–625. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.09.005

Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T., & Nishida, E. (2002). Control of Intracellular Dynamics of Mammalian Period Proteins by Casein Kinase I ε (CKIε) and CKIδ in Cultured Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(6), 1693–1703. https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1693-1703.2002

Aryal, R. P., Kwak, P. B., Tamayo, A. G., Gebert, M., Chiu, P.-L., Walz, T., & Weitz, C. J. (2017). Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Molecular Cell*, *67*(5), 770-782.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.017

Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., & Schibler, U. (2008). SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell*, *134*(2), 317–328. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050

Asher, G., Reinke, H., Altmeyer, M., Gutierrez-Arcelus, M., Hottiger, M. O., & Schibler, U. (2010). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Participates in the Phase Entrainment of Circadian Clocks to Feeding. *Cell*, *142*(6), 943–953. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.016

Balsalobre, A., Marcacci, L., & Schibler, U. (2000). Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts. *Current Biology*, *10*(20), 1291–1294. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00758-2

Barford, D., Das, A. K., & Egloff, M.-P. (1998). THE STRUCTURE AND MECHANISM OF PROTEIN PHOSPHATASES: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, *27*(1), 133–164. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.27.1.133

Beker, M. C., Caglayan, B., Caglayan, A. B., Kelestemur, T., Yalcin, E., Caglayan, A., Kilic, U., Baykal, A. T., Reiter, R. J., & Kilic, E. (2019). Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Scientific Reports*, *9*(1), 19082. https://doi.org/10.1038/s41598-019-55663-0

Bellet, M. M., Nakahata, Y., Boudjelal, M., Watts, E., Mossakowska, D. E., Edwards, K. A., Cervantes, M., Astarita, G., Loh, C., Ellis, J. L., Vlasuk, G. P., & Sassone-Corsi, P. (2013). Pharmacological modulation of circadian rhythms by synthetic activators of the deacetylase SIRT1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(9), 3333–3338. https://doi.org/10.1073/pnas.1214266110

Bingham, E. W., & Farrell, H. M. (1974). Casein Kinase from the Golgi Apparatus of Lactating Mammary Gland. *Journal of Biological Chemistry*, *249*(11), 3647–3651. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42622-7

Bossis, G., & Melchior, F. (2006). Regulation of SUMOylation by Reversible Oxidation of SUMO Conjugating Enzymes. *Molecular Cell*, *21*(3), 349–357. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.12.019

Brenna, A., & Albrecht, U. (2020). Phosphorylation and Circadian Molecular Timing. *Frontiers in Physiology*, *11*, 612510. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.612510

Brenna, A., Olejniczak, I., Chavan, R., Ripperger, J. A., Langmesser, S., Cameroni, E., Hu, Z., De Virgilio, C., Dengjel, J., & Albrecht, U. (2019). Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) regulates the circadian clock. *ELife*, *8*, e50925. https://doi.org/10.7554/eLife.50925

Burnett, G., & Kennedy, E. P. (1954). The enzymatic phosphorylation of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, *211*(2), 969–980.

Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., Draetta, G. F., & Pagano, M. (2007). SCF ^{Fbxl3} Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Science*, *316*(5826), 900–904. https://doi.org/10.1126/science.1141194

Camacho, F., Cilio, M., Guo, Y., Virshup, D. M., Patel, K., Khorkova, O., Styren, S., Morse, B., Yao, Z., & Keesler, G. A. (2001). Human casein kinase Iδ phosphorylation of human circadian clock

proteins period 1 and 2. *FEBS Letters*, *489*(2–3), 159–165. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02434-0

Cardone, L., Hirayama, J., Giordano, F., Tamaru, T., Palvimo, J. J., & Sassone-Corsi, P. (2005). Circadian Clock Control by SUMOylation of BMAL1. *Science*, *309*(5739), 1390–1394. https://doi.org/10.1126/science.1110689

Cavieres-Lepe, J., & Ewer, J. (2021). Reciprocal Relationship Between Calcium Signaling and Circadian Clocks: Implications for Calcium Homeostasis, Clock Function, and Therapeutics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *14*, 666673. https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.666673

Clapier, C. R., & Cairns, B. R. (2009). The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 273–304. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223

Crosio, C., Cermakian, N., Allis, C. D., & Sassone-Corsi, P. (2000). Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nature Neuroscience*, *3*(12), 1241–1247. https://doi.org/10.1038/81767

Curtis, A. M., Seo, S., Westgate, E. J., Rudic, R. D., Smyth, E. M., Chakravarti, D., FitzGerald, G. A., & McNamara, P. (2004). Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Remodeling and the Vascular Clock. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(8), 7091–7097. https://doi.org/10.1074/jbc.M311973200

Dibner, C., Schibler, U., & Albrecht, U. (2010). The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annual Review of Physiology*, *72*(1), 517–549. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821

Ding, J. M., Buchanan, G. F., Tischkau, S. A., Chen, D., Kuriashkina, L., Faiman, L. E., Alster, J. M., McPherson, P. S., Campbell, K. P., & Gillette, M. U. (1998). A neuronal ryanodine receptor mediates light-induced phase delays of the circadian clock. *Nature*, *394*(6691), 381–384. https://doi.org/10.1038/28639

DiTacchio, L., Le, H. D., Vollmers, C., Hatori, M., Witcher, M., Secombe, J., & Panda, S. (2011). Histone Lysine Demethylase JARID1a Activates CLOCK-BMAL1 and Influences the Circadian Clock. *Science*, *333*(6051), 1881–1885. https://doi.org/10.1126/science.1206022

Doi, M., Hirayama, J., & Sassone-Corsi, P. (2006). Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell*, *125*(3), 497–508. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033

Durgan, D. J., Pat, B. M., Laczy, B., Bradley, J. A., Tsai, J.-Y., Grenett, M. H., Ratcliffe, W. F., Brewer, R. A., Nagendran, J., Villegas-Montoya, C., Zou, C., Zou, L., Johnson, R. L., Dyck, J. R. B., Bray, M. S., Gamble, K. L., Chatham, J. C., & Young, M. E. (2011). O-GlcNAcylation, Novel Post-Translational Modification Linking Myocardial Metabolism and Cardiomyocyte Circadian Clock. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(52), 44606–44619. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278903

Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., & Krebs, E. G. (1987). PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES. *Annual Review of Biochemistry*, *56*(1), 567–613. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.003031

Edery, I., Zwiebel, L. J., Dembinska, M. E., & Rosbash, M. (1994). Temporal phosphorylation of the Drosophila period protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(6), 2260–2264. https://doi.org/10.1073/pnas.91.6.2260

Eide, E. J., Vielhaber, E. L., Hinz, W. A., & Virshup, D. M. (2002). The Circadian Regulatory Proteins BMAL1 and Cryptochromes Are Substrates of Casein Kinase Iε. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 17248–17254. https://doi.org/10.1074/jbc.M111466200

Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H., Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., & Virshup, D. M. (2005). Control of Mammalian Circadian Rhythm by CKIε-Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(7), 2795–2807. https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005

Etchegaray, J.-P., Lee, C., Wade, P. A., & Reppert, S. M. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*, *421*(6919), 177–182. https://doi.org/10.1038/nature01314

Fang, X., Yu, S. X., Lu, Y., Bast, R. C., Woodgett, J. R., & Mills, G. B. (2000). Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(22), 11960–11965. https://doi.org/10.1073/pnas.220413597

Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S. E., Alenghat, T., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2011). A Circadian Rhythm Orchestrated by Histone Deacetylase 3 Controls Hepatic Lipid Metabolism. *Science*, *331*(6022), 1315–1319. https://doi.org/10.1126/science.1198125

Gallego, M., Eide, E. J., Woolf, M. F., Virshup, D. M., & Forger, D. B. (2006). An opposite role for *tau* in circadian rhythms revealed by mathematical modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(28), 10618–10623. https://doi.org/10.1073/pnas.0604511103

Gallego, M., Kang, H., & Virshup, D. M. (2006). Protein phosphatase 1 regulates the stability of the circadian protein PER2. *Biochemical Journal*, *399*(1), 169–175. https://doi.org/10.1042/BJ20060678

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, *280*(5369), 1564–1569. https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1564

Goldknopf, I. L., French, M. F., Musso, R., & Busch, H. (1977). Presence of protein A24 in rat liver nucleosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5492–5495. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5492

Gossan, N. C., Zhang, F., Guo, B., Jin, D., Yoshitane, H., Yao, A., Glossop, N., Zhang, Y. Q., Fukada, Y., & Meng, Q.-J. (2014). The E3 ubiquitin ligase UBE3A is an integral component of the molecular circadian clock through regulating the BMAL1 transcription factor. *Nucleic Acids Research*, *42*(9), 5765–5775. https://doi.org/10.1093/nar/gku225

Griebel, G., Stemmelin, J., Lopez-Grancha, M., Boulay, D., Boquet, G., Slowinski, F., Pichat, P., Beeské, S., Tanaka, S., Mori, A., Fujimura, M., & Eguchi, J. (2019). The selective GSK3 inhibitor, SAR502250, displays neuroprotective activity and attenuates behavioral impairments in models of neuropsychiatric symptoms of Alzheimer's disease in rodents. *Scientific Reports*, *9*(1), 18045. https://doi.org/10.1038/s41598-019-54557-5

Grimaldi, B., Nakahata, Y., Sahar, S., Kaluzova, M., Gauthier, D., Pham, K., Patel, N., Hirayama, J., & Sassone-Corsi, P. (2007). Chromatin Remodeling and Circadian Control: Master Regulator CLOCK Is an Enzyme. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *72*(1), 105–112. https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.049

Gudi, T., Casteel, D. E., Vinson, C., Boss, G. R., & Pilz, R. B. (2000). NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation. *Oncogene*, *19*(54), 6324–6333. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204007

Guillaumond, F., Dardente, H., Giguère, V., & Cermakian, N. (2005). Differential Control of Bmal1 Circadian Transcription by REV-ERB and ROR Nuclear Receptors. *Journal of Biological Rhythms*, *20*(5), 391–403. https://doi.org/10.1177/0748730405277232

Haltiwanger, R. S., Blomberg, M. A., & Hart, G. W. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(13), 9005–9013.

Harada, Y., Sakai, M., Kurabayashi, N., Hirota, T., & Fukada, Y. (2005). Ser-557-phosphorylated mCRY2 Is Degraded upon Synergistic Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3β. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(36), 31714–31721. https://doi.org/10.1074/jbc.M506225200

Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: Conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(10), 774–785. https://doi.org/10.1038/nrm2249

Hayaishi, O., & Veda, K. (1977). Poly (ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, *46*(1), 95–116. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.000523

Hernández-Rosas, F., López-Rosas, C. A., & Saavedra-Vélez, M. V. (2020). Disruption of the Molecular Circadian Clock and Cancer: An Epigenetic Link. *Biochemical Genetics*, *58*(1), 189–209. https://doi.org/10.1007/s10528-019-09938-w

Hirano, A., Fu, Y.-H., & Ptáček, L. J. (2016). The intricate dance of post-translational modifications in the rhythm of life. *Nature Structural & Molecular Biology*, *23*(12), 1053–1060. https://doi.org/10.1038/nsmb.3326

Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., & Sassone-Corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, *450*(7172), 1086–1090. https://doi.org/10.1038/nature06394

Hirota, T., Lewis, W. G., Liu, A. C., Lee, J. W., Schultz, P. G., & Kay, S. A. (2008). A chemical biology approach reveals period shortening of the mammalian circadian clock by specific inhibition of GSK-3β. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(52), 20746–20751. https://doi.org/10.1073/pnas.0811410106

Hosoda, H., kato, K., Asano, H., Ito, M., Kato, H., Iwamoto, T., Suzuki, A., Masushige, S., & Kida, S. (2009). CBP/p300 is a cell type-specific modulator of CLOCK/BMAL1-mediated transcription. *Molecular Brain*, *2*(1), 34. https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-34

Chang, H.-C., & Guarente, L. (2013). SIRT1 Mediates Central Circadian Control in the SCN by a Mechanism that Decays with Aging. *Cell*, *153*(7), 1448–1460. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.027

Chen, L.-C., Hsieh, Y.-L., Kuo, T.-Y., Chou, Y.-C., Hsu, P.-H., & Hwang-Verslues, W. W. (2019). *Differential Effects of SUMO1/2 on Circadian Protein PER2 Stability and Function* [Preprint]. Molecular Biology. https://doi.org/10.1101/789222

Cheong, J. K., & Virshup, D. M. (2011). Casein kinase 1: Complexity in the family. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *43*(4), 465–469. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.004

Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., & Ishida, N. (2005). A Role for Glycogen Synthase Kinase-3β in the Mammalian Circadian Clock. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(33), 29397–29402. https://doi.org/10.1074/jbc.M503526200

Imai, S., & Yoshino, J. (2013). The importance of NAMPT/NAD/SIRT1 in the systemic regulation of metabolism and ageing. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *15*(s3), 26–33. https://doi.org/10.1111/dom.12171

Impey, S., Obrietan, K., Wong, S. T., Poser, S., Yano, S., Wayman, G., Deloulme, J. C., Chan, G., & Storm, D. R. (1998). Cross Talk between ERK and PKA Is Required for Ca2+ Stimulation of CREB-Dependent Transcription and ERK Nuclear Translocation. *Neuron*, *21*(4), 869–883. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80602-9

Isojima, Y., Nakajima, M., Ukai, H., Fujishima, H., Yamada, R. G., Masumoto, K., Kiuchi, R., Ishida, M., Ukai-Tadenuma, M., Minami, Y., Kito, R., Nakao, K., Kishimoto, W., Yoo, S.-H., Shimomura, K., Takao, T., Takano, A., Kojima, T., Nagai, K., … Ueda, H. R. (2009). CKIε/δ-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(37), 15744–15749. https://doi.org/10.1073/pnas.0908733106

Jakubcakova, V., Oster, H., Tamanini, F., Cadenas, C., Leitges, M., van der Horst, G. T. J., & Eichele, G. (2007). Light Entrainment of the Mammalian Circadian Clock by a PRKCA-Dependent Posttranslational Mechanism. *Neuron*, *54*(5), 831–843. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.031

Johnson, E. S., Ma, P. C. M., Ota, I. M., & Varshavsky, A. (1995). A Proteolytic Pathway That Recognizes Ubiquitin as a Degradation Signal. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(29), 17442–17456. https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17442

Jones, C. R., Campbell, S. S., Zone, S. E., Cooper, F., DeSano, A., Murphy, P. J., Jones, B., Czajkowski, L., & Ptček, L. J. (1999). Familial advanced sleep-phase syndrome: A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nature Medicine*, *5*(9), 1062–1065. https://doi.org/10.1038/12502

Kaasik, K., Kivimäe, S., Allen, J. J., Chalkley, R. J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, A. L., Shokat, K. M., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2013). Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock. *Cell Metabolism*, *17*(2), 291–302. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.017

Kaladchibachi, S. A., Doble, B., Anthopoulos, N., Woodgett, J. R., & Manoukian, A. S. (2007). Glycogen synthase kinase 3, circadian rhythms, and bipolar disorder: A molecular link in the therapeutic action of lithium. *Journal of Circadian Rhythms*, *5*(0), 3. https://doi.org/10.1186/1740-3391-5-3

Katada, S., & Sassone-Corsi, P. (2010). The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17*(12), 1414–1421. https://doi.org/10.1038/nsmb.1961

Keesler, G. A., Camacho, F., Guo, Y., Virshup, D., Mondadori, C., & Yao, Z. (2000). Phosphorylation and destabilization of human period I clock protein by human casein kinase Iε: *NeuroReport*, *11*(5), 951–955. https://doi.org/10.1097/00001756-200004070-00011

Kitada, M., Kume, S., Kanasaki, K., Takeda-Watanabe, A., & Koya, D. (2013). Sirtuins as Possible Drug Targets in Type 2 Diabetes. *Current Drug Targets*, *14*(6), 622–636. https://doi.org/10.2174/1389450111314060002

Klemz, S., Wallach, T., Korge, S., Rosing, M., Klemz, R., Maier, B., Fiorenza, N. C., Kaymak, I., Fritzsche, A. K., Herzog, E. D., Stanewsky, R., & Kramer, A. (2021). Protein phosphatase 4 controls circadian clock dynamics by modulating CLOCK/BMAL1 activity. *Genes & Development*, *35*(15–16), 1161–1174. https://doi.org/10.1101/gad.348622.121

Koike, N., Yoo, S.-H., Huang, H.-C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T.-K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science*, *338*(6105), 349–354. https://doi.org/10.1126/science.1226339

Kurabayashi, N., Hirota, T., Sakai, M., Sanada, K., & Fukada, Y. (2010). DYRK1A and Glycogen Synthase Kinase 3β, a Dual-Kinase Mechanism Directing Proteasomal Degradation of CRY2 for Circadian Timekeeping. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(7), 1757–1768. https://doi.org/10.1128/MCB.01047-09

Kwak, Y., Jeong, J., Lee, S., Park, Y.-U., Lee, S.-A., Han, D.-H., Kim, J.-H., Ohshima, T., Mikoshiba, K., Suh, Y.-H., Cho, S., & Park, S. K. (2013). Cyclin-dependent Kinase 5 (Cdk5) Regulates the Function of CLOCK Protein by Direct Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(52), 36878–36889. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494856

Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., DiTacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., & Evans, R. M. (2009). AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science*, *326*(5951), 437–440. https://doi.org/10.1126/science.1172156

Lee, C., Etchegaray, J.-P., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, *107*(7), 855–867. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00610-9

Lee, C., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (2004). Direct Association between Mouse PERIOD and CKIε Is Critical for a Functioning Circadian Clock. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(2), 584–594. https://doi.org/10.1128/MCB.24.2.584-594.2004

Lee, H., Chen, R., Lee, Y., Yoo, S., & Lee, C. (2009). Essential roles of CKIδ and CKIε in the mammalian circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(50), 21359–21364. https://doi.org/10.1073/pnas.0906651106

Lee, H. -m., Chen, R., Kim, H., Etchegaray, J.-P., Weaver, D. R., & Lee, C. (2011). The period of the circadian oscillator is primarily determined by the balance between casein kinase 1 and protein phosphatase 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(39), 16451–16456. https://doi.org/10.1073/pnas.1107178108

Lee, J., Lee, Y., Lee, M. J., Park, E., Kang, S. H., Chung, C. H., Lee, K. H., & Kim, K. (2008). Dual Modification of BMAL1 by SUMO2/3 and Ubiquitin Promotes Circadian Activation of the CLOCK/BMAL1 Complex. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(19), 6056–6065. https://doi.org/10.1128/MCB.00583-08

Lee, Y., Chun, S. K., & Kim, K. (2015). Sumoylation controls CLOCK-BMAL1-mediated clock resetting via CBP recruitment in nuclear transcriptional foci. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1853*(10), 2697–2708. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.07.005

Li, J., Lu, W.-Q., Beesley, S., Loudon, A. S. I., & Meng, Q.-J. (2012). Lithium Impacts on the Amplitude and Period of the Molecular Circadian Clockwork. *PLoS ONE*, *7*(3), e33292. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033292

Li, M.-D., Ruan, H.-B., Hughes, M. E., Lee, J.-S., Singh, J. P., Jones, S. P., Nitabach, M. N., & Yang, X. (2013). O-GlcNAc Signaling Entrains the Circadian Clock by Inhibiting BMAL1/CLOCK Ubiquitination. *Cell Metabolism*, *17*(2), 303–310. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.015

Li, S., Wang, M., Ao, X., Chang, A. K., Yang, C., Zhao, F., Bi, H., Liu, Y., Xiao, L., & Wu, H. (2013). CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor-α. *Oncogene*, *32*(41), 4883–4891. https://doi.org/10.1038/onc.2012.518

Li, Y. H., Liu, X., Vanselow, J. T., Zheng, H., Schlosser, A., & Chiu, J. C. (2019). O-GlcNAcylation of PERIOD regulates its interaction with CLOCK and timing of circadian transcriptional repression. *PLOS Genetics*, *15*(1), e1007953. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007953

Ling, H. H., Beaulé, C., Chiang, C.-K., Tian, R., Figeys, D., & Cheng, H.-Y. M. (2014). Time-of-Day- and Light-Dependent Expression of Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 4 (UBR4) in the Suprachiasmatic Nucleus Circadian Clock. *PLoS ONE*, *9*(8), e103103. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103103

Liu, X., Blaženović, I., Contreras, A. J., Pham, T. M., Tabuloc, C. A., Li, Y. H., Ji, J., Fiehn, O., & Chiu, J. C. (2021). Hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAc-processing enzymes regulate daily rhythms in protein O-GlcNAcylation. *Nature Communications*, *12*(1), 4173. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24301-7

Liu, Y., Zhang, Y., Li, T., Han, J., & Wang, Y. (2020). The tight junction protein TJP1 regulates the feeding-modulated hepatic circadian clock. *Nature Communications*, *11*(1), 589. https://doi.org/10.1038/s41467-020-14470-2

Lowrey, P. L., Shimomura, K., Antoch, M. P., Yamazaki, S., Zemenides, P. D., Ralph, M. R., Menaker, M., & Takahashi, J. S. (2000). Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science (New York, N.Y.)*, *288*(5465), 483–492. https://doi.org/10.1126/science.288.5465.483

Lubas, W. A., & Hanover, J. A. (2000). Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(15), 10983–10988. https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.10983

Luo, H.-B., Xia, Y.-Y., Shu, X.-J., Liu, Z.-C., Feng, Y., Liu, X.-H., Yu, G., Yin, G., Xiong, Y.-S., Zeng, K., Jiang, J., Ye, K., Wang, X.-C., & Wang, J.-Z. (2014). SUMOylation at K340 inhibits tau degradation through deregulating its phosphorylation and ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(46), 16586–16591. https://doi.org/10.1073/pnas.1417548111

Man, A. W. C., Li, H., & Xia, N. (2021). Circadian Rhythm: Potential Therapeutic Target for Atherosclerosis and Thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 676. https://doi.org/10.3390/ijms22020676

Masri, S., Rigor, P., Cervantes, M., Ceglia, N., Sebastian, C., Xiao, C., Roqueta-Rivera, M., Deng, C., Osborne, T. F., Mostoslavsky, R., Baldi, P., & Sassone-Corsi, P. (2014). Partitioning Circadian Transcription by SIRT6 Leads to Segregated Control of Cellular Metabolism. *Cell*, *158*(3), 659–672. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.050

Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control Mechanism of the Circadian Clock for Timing of Cell Division in Vivo. *Science*, *302*(5643), 255–259. https://doi.org/10.1126/science.1086271

Mauna, J. C., Miyamae, T., Pulli, B., & Thiels, E. (2011). Protein phosphatases 1 and 2A are both required for long-term depression and associated dephosphorylation of cAMP response element binding protein in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus*, *21*(10), 1093–1104. https://doi.org/10.1002/hipo.20823

Mauvoisin, D., Atger, F., Dayon, L., Núñez Galindo, A., Wang, J., Martin, E., Da Silva, L., Montoliu, I., Collino, S., Martin, F.-P., Ratajczak, J., Cantó, C., Kussmann, M., Naef, F., & Gachon, F. (2017). Circadian and Feeding Rhythms Orchestrate the Diurnal Liver Acetylome. *Cell Reports*, *20*(7), 1729–1743. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.065

McCarthy, M. J., Wei, H., Marnoy, Z., Darvish, R. M., McPhie, D. L., Cohen, B. M., & Welsh, D. K. (2013). Genetic and clinical factors predict lithium's effects on PER2 gene expression rhythms in cells from bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry*, *3*(10), e318–e318. https://doi.org/10.1038/tp.2013.90

Meluh, P. B., & Koshland, D. (1995). Evidence that the MIF2 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a centromere protein with homology to the mammalian centromere protein CENP-C. *Molecular Biology of the Cell*, *6*(7), 793–807. https://doi.org/10.1091/mbc.6.7.793

Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foufelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M. J., Stuck, B. J., & Kahn, B. B. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, *428*(6982), 569–574. https://doi.org/10.1038/nature02440

Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L. P., & Sassone-Corsi, P. (2008). The NAD+-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK-Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell*, *134*(2), 329–340. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.002

Nam, H. J., Boo, K., Kim, D., Han, D.-H., Choe, H. K., Kim, C. R., Sun, W., Kim, H., Kim, K., Lee, H., Metzger, E., Schuele, R., Yoo, S.-H., Takahashi, J. S., Cho, S., Son, G. H., & Baek, S. H. (2014). Phosphorylation of LSD1 by PKCα Is Crucial for Circadian Rhythmicity and Phase Resetting. *Molecular Cell*, *53*(5), 791–805. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.028

Narasimamurthy, R., Hatori, M., Nayak, S. K., Liu, F., Panda, S., & Verma, I. M. (2012). Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(31), 12662–12667. https://doi.org/10.1073/pnas.1209965109

Narasimamurthy, R., Hunt, S. R., Lu, Y., Fustin, J.-M., Okamura, H., Partch, C. L., Forger, D. B., Kim, J. K., & Virshup, D. M. (2018). CK1δ/ε protein kinase primes the PER2 circadian phosphoswitch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(23), 5986–5991. https://doi.org/10.1073/pnas.1721076115

Narasimamurthy, R., & Virshup, D. M. (2021). The phosphorylation switch that regulates ticking of the circadian clock. *Molecular Cell*, *81*(6), 1133–1146. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.006

Naruse, Y., Oh-hashi, K., Iijima, N., Naruse, M., Yoshioka, H., & Tanaka, M. (2004). Circadian and Light-Induced Transcription of Clock Gene *Per1* Depends on Histone Acetylation and Deacetylation. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(14), 6278–6287. https://doi.org/10.1128/MCB.24.14.6278-6287.2004

Obrietan, K., Impey, S., Smith, D., Athos, J., & Storm, D. R. (1999). Circadian Regulation of cAMP Response Element-mediated Gene Expression in the Suprachiasmatic Nuclei. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(25), 17748–17756. https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17748

Ohsaki, K., Oishi, K., Kozono, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I., & Ishida, N. (2008). The Role of β-TrCP1 and β-TrCP2 in Circadian Rhythm Generation by Mediating Degradation of Clock Protein PER2. *The Journal of Biochemistry*, *144*(5), 609–618. https://doi.org/10.1093/jb/mvn112

Ong, Q., Han, W., & Yang, X. (2018). O-GlcNAc as an Integrator of Signaling Pathways. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 599. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00599

Oster, H., Werner, C., Magnone, M. C., Mayser, H., Feil, R., Seeliger, M. W., Hofmann, F., & Albrecht, U. (2003). CGMP-Dependent Protein Kinase II Modulates mPer1 and mPer2 Gene Induction and Influences Phase Shifts of the Circadian Clock. *Current Biology*, *13*(9), 725–733. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00252-5

Ou, J., Li, H., Qiu, P., Li, Q., Chang, H.-C., & Tang, Y.-C. (2019). CDK9 modulates circadian clock by attenuating REV-ERBα activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *513*(4), 967–973. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.04.043

Partch, C. L., Shields, K. F., Thompson, C. L., Selby, C. P., & Sancar, A. (2006). Posttranslational regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome and protein phosphatase 5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(27), 10467–10472. https://doi.org/10.1073/pnas.0604138103

Peek, C. B., Affinati, A. H., Ramsey, K. M., Kuo, H.-Y., Yu, W., Sena, L. A., Ilkayeva, O., Marcheva, B., Kobayashi, Y., Omura, C., Levine, D. C., Bacsik, D. J., Gius, D., Newgard, C. B., Goetzman, E., Chandel, N. S., Denu, J. M., Mrksich, M., & Bass, J. (2013). Circadian Clock NAD^+ Cycle Drives Mitochondrial Oxidative Metabolism in Mice. *Science*, *342*(6158), 1243417. https://doi.org/10.1126/science.1243417

Philpott, J. M., Narasimamurthy, R., Ricci, C. G., Freeberg, A. M., Hunt, S. R., Yee, L. E., Pelofsky, R. S., Tripathi, S., Virshup, D. M., & Partch, C. L. (2020). Casein kinase 1 dynamics underlie

substrate selectivity and the PER2 circadian phosphoswitch. *ELife*, *9*, e52343. https://doi.org/10.7554/eLife.52343

Pickard, G. E. (1982). The afferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the golden hamster with emphasis on the retinohypothalamic projection. *The Journal of Comparative Neurology*, *211*(1), 65–83. https://doi.org/10.1002/cne.902110107

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*, *70*(1), 503–533. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.503

Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian Rhythms and the Circadian Organization of Living Systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *25*(0), 159–184. https://doi.org/10.1101/SQB.1960.025.01.015

Prosser, R. A., McArthur, A. J., & Gillette, M. U. (1989). CGMP induces phase shifts of a mammalian circadian pacemaker at night, in antiphase to cAMP effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(17), 6812–6815. https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6812

Ralph, M. R., & Menaker, M. (1988). A Mutation of the Circadian System in Golden Hamsters. *Science*, *241*(4870), 1225–1227. https://doi.org/10.1126/science.3413487

Ramanathan, C., Kathale, N. D., Liu, D., Lee, C., Freeman, D. A., Hogenesch, J. B., Cao, R., & Liu, A. C. (2018). MTOR signaling regulates central and peripheral circadian clock function. *PLOS Genetics*, *14*(5), e1007369. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007369

Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H.-K., Chong, J. L., Buhr, E. D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S., & Bass, J. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD $^{+}$ Biosynthesis. *Science*, *324*(5927), 651–654. https://doi.org/10.1126/science.1171641

Reinke, H., & Asher, G. (2019). Crosstalk between metabolism and circadian clocks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *20*(4), 227–241. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0096-9

Rivers, A., Gietzen, K. F., Vielhaber, E., & Virshup, D. M. (1998). Regulation of Casein Kinase I ε and Casein Kinase I δ by anin Vivo Futile Phosphorylation Cycle. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(26), 15980–15984. https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15980

Robles, M. S., Boyault, C., Knutti, D., Padmanabhan, K., & Weitz, C. J. (2010). Identification of RACK1 and Protein Kinase Cα as Integral Components of the Mammalian Circadian Clock. *Science*, *327*(5964), 463–466. https://doi.org/10.1126/science.1180067

Rosenberg, L. H., Lafitte, M., Quereda, V., Grant, W., Chen, W., Bibian, M., Noguchi, Y., Fallahi, M., Yang, C., Chang, J. C., Roush, W. R., Cleveland, J. L., & Duckett, D. R. (2015). Therapeutic targeting of casein kinase 1δ in breast cancer. *Science Translational Medicine*, *7*(318). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac8773

Sahar, S., Zocchi, L., Kinoshita, C., Borrelli, E., & Sassone-Corsi, P. (2010). Regulation of BMAL1 Protein Stability and Circadian Function by GSK3β-Mediated Phosphorylation. *PLoS ONE*, *5*(1), e8561. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008561

Saitoh, H., & Hinchey, J. (2000). Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(9), 6252–6258. https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6252

Sanada, K., Harada, Y., Sakai, M., Todo, T., & Fukada, Y. (2004). Serine phosphorylation of mCRY1 and mCRY2 by mitogen-activated protein kinase. *Genes to Cells*, *9*(8), 697–708. https://doi.org/10.1111/j.1356-9597.2004.00758.x

Sarno, S., Ghisellini, P., & Pinna, L. A. (2002). Unique Activation Mechanism of Protein Kinase CK2. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(25), 22509–22514. https://doi.org/10.1074/jbc.M200486200

Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R., & Sehgal, A. (2004). Posttranslational Regulation of Drosophila PERIOD Protein by Protein Phosphatase 2A. *Cell*, *116*(4), 603–615. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00128-X

Scoma, H. D., Humby, M., Yadav, G., Zhang, Q., Fogerty, J., & Besharse, J. C. (2011). The De-Ubiquitinylating Enzyme, USP2, Is Associated with the Circadian Clockwork and Regulates Its Sensitivity to Light. *PLoS ONE*, *6*(9), e25382. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025382

Shanware, N. P., Hutchinson, J. A., Kim, S. H., Zhan, L., Bowler, M. J., & Tibbetts, R. S. (2011). Casein Kinase 1-dependent Phosphorylation of Familial Advanced Sleep Phase Syndrome-associated

Residues Controls PERIOD 2 Stability. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(14), 12766–12774. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.224014

Shearman, L. P., Sriram, S., Weaver, D. R., Maywood, E. S., Chaves, I., Zheng, B., Kume, K., Lee, C. C., van der, G. T. J., Horst, Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (2000). Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science*, *288*(5468), 1013–1019. https://doi.org/10.1126/science.288.5468.1013

Shi, G., Xie, P., Qu, Z., Zhang, Z., Dong, Z., An, Y., Xing, L., Liu, Z., Dong, Y., Xu, G., Yang, L., Liu, Y., & Xu, Y. (2016). Distinct Roles of HDAC3 in the Core Circadian Negative Feedback Loop Are Critical for Clock Function. *Cell Reports*, *14*(4), 823–834. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.076

Shirogane, T., Jin, J., Ang, X. L., & Harper, J. W. (2005). SCFβ-TRCP Controls Clock-dependent Transcription via Casein Kinase 1-dependent Degradation of the Mammalian Period-1 (Per1) Proteinm. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29), 26863–26872. https://doi.org/10.1074/jbc.M502862200

Siepka, S. M., Yoo, S.-H., Park, J., Song, W., Kumar, V., Hu, Y., Lee, C., & Takahashi, J. S. (2007). Circadian Mutant Overtime Reveals F-box Protein FBXL3 Regulation of Cryptochrome and Period Gene Expression. *Cell*, *129*(5), 1011–1023. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.030

Spengler, M. L., Kuropatwinski, K. K., Schumer, M., & Antoch, M. (2009). A serine cluster mediates BMAL1-dependent CLOCK phosphorylation and degradation. *Cell Cycle*, *8*(24), 4138–4146. https://doi.org/10.4161/cc.8.24.10273

Stambolic, V., & Woodgett, J. R. (1994). Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 *β* in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochemical Journal*, *303*(3), 701–704. https://doi.org/10.1042/bj3030701

Stokkan, K.-A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., & Menaker, M. (2001). Entrainment of the Circadian Clock in the Liver by Feeding. *Science*, *291*(5503), 490–493. https://doi.org/10.1126/science.291.5503.490

Sun, Z., Miller, R. A., Patel, R. T., Chen, J., Dhir, R., Wang, H., Zhang, D., Graham, M. J., Unterman, T. G., Shulman, G. I., Sztalryd, C., Bennett, M. J., Ahima, R. S., Birnbaum, M. J., & Lazar, M. A. (2012). Hepatic Hdac3 promotes gluconeogenesis by repressing lipid synthesis and sequestration. *Nature Medicine*, *18*(6), 934–942. https://doi.org/10.1038/nm.2744

Takano, A., Isojima, Y., & Nagai, K. (2004). Identification of mPer1 Phosphorylation Sites Responsible for the Nuclear Entry. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(31), 32578–32585. https://doi.org/10.1074/jbc.M403433200

Tamaru, T., Hirayama, J., Isojima, Y., Nagai, K., Norioka, S., Takamatsu, K., & Sassone-Corsi, P. (2009). CK2α phosphorylates BMAL1 to regulate the mammalian clock. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(4), 446–448. https://doi.org/10.1038/nsmb.1578

Taylor, R. P., Parker, G. J., Hazel, M. W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M. J., & McClain, D. A. (2008). Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through Up-regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(10), 6050–6057. https://doi.org/10.1074/jbc.M707328200

Tischkau, S. A., Mitchell, J. W., Tyan, S.-H., Buchanan, G. F., & Gillette, M. U. (2003). Ca2+/cAMP Response Element-binding Protein (CREB)-dependent Activation of Per1 Is Required for Light-induced Signaling in the Suprachiasmatic Nucleus Circadian Clock. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(2), 718–723. https://doi.org/10.1074/jbc.M209241200

Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2001). An h *Per2* Phosphorylation Site Mutation in Familial Advanced Sleep Phase Syndrome. *Science*, *291*(5506), 1040–1043. https://doi.org/10.1126/science.1057499

Tong, X., Buelow, K., Guha, A., Rausch, R., & Yin, L. (2012). USP2a Protein Deubiquitinates and Stabilizes the Circadian Protein CRY1 in Response to Inflammatory Signals. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(30), 25280–25291. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340786

Torres, C. R., & Hart, G. W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *Journal of Biological Chemistry*, *259*(5), 3308–3317. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43295-9

Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S. M., & Sassone-Corsi, P. (2002). Bimodal regulation of *mPeriod* promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(11), 7728–7733. https://doi.org/10.1073/pnas.102075599

Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K., & Nishida, E. (2009). Involvement of the Protein Kinase CK2 in the Regulation of Mammalian Circadian Rhythms. *Science Signaling*, *2*(73). https://doi.org/10.1126/scisignal.2000305

Ullrich, A., & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, *61*(2), 203–212. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90801-K

Um, J.-H., Pendergast, J. S., Springer, D. A., Foretz, M., Viollet, B., Brown, A., Kim, M. K., Yamazaki, S., & Chung, J. H. (2011). AMPK Regulates Circadian Rhythms in a Tissue- and Isoform-Specific Manner. *PLoS ONE*, *6*(3), e18450. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018450

Uzunova, K., Göttsche, K., Miteva, M., Weisshaar, S. R., Glanemann, C., Schnellhardt, M., Niessen, M., Scheel, H., Hofmann, K., Johnson, E. S., Praefcke, G. J. K., & Dohmen, R. J. (2007). Ubiquitin-dependent Proteolytic Control of SUMO Conjugates. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(47), 34167–34175. https://doi.org/10.1074/jbc.M706505200

Vanselow, K., Vanselow, J. T., Westermark, P. O., Reischl, S., Maier, B., Korte, T., Herrmann, A., Herzel, H., Schlosser, A., & Kramer, A. (2006). Differential effects of PER2 phosphorylation: Molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS). *Genes & Development*, *20*(19), 2660–2672. https://doi.org/10.1101/gad.397006

Wadzinski, B. E., Wheat, W. H., Jaspers, S., Peruski, L. F., Lickteig, R. L., Johnson, G. L., & Klemm, D. J. (1993). Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(5), 2822–2834. https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.2822-2834.1993

Wang, R.-H., Zhao, T., Cui, K., Hu, G., Chen, Q., Chen, W., Wang, X.-W., Soto-Gutierrez, A., Zhao, K., & Deng, C.-X. (2016). Negative reciprocal regulation between Sirt1 and Per2 modulates the circadian clock and aging. *Scientific Reports*, *6*(1), 28633. https://doi.org/10.1038/srep28633

Weber, F., Hung, H.-C., Maurer, C., & Kay, S. A. (2006). Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. *Journal of Neurochemistry*, *98*(1), 248–257. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03865.x

Xia, L., Ma, S., Zhang, Y., Wang, T., Zhou, M., Wang, Z., & Zhang, J. (2015). Daily Variation in Global and Local DNA Methylation in Mouse Livers. *PLOS ONE*, *10*(2), e0118101. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118101

Xing, W., Busino, L., Hinds, T. R., Marionni, S. T., Saifee, N. H., Bush, M. F., Pagano, M., & Zheng, N. (2013). SCFFBXL3 ubiquitin ligase targets cryptochromes at their cofactor pocket. *Nature*, *496*(7443), 64–68. https://doi.org/10.1038/nature11964

Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., Jones, C. R., Wu, S. C., Saigoh, N., Saigoh, K., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2005). Functional consequences of a CKIδ mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, *434*(7033), 640–644. https://doi.org/10.1038/nature03453

Yang, Y., Duguay, D., Bédard, N., Rachalski, A., Baquiran, G., Na, C. H., Fahrenkrug, J., Storch, K.-F., Peng, J., Wing, S. S., & Cermakian, N. (2012). Regulation of behavioral circadian rhythms and clock protein PER1 by the deubiquitinating enzyme USP2. *Biology Open*, *1*(8), 789–801. https://doi.org/10.1242/bio.20121990

Yang, Z., & Sehgal, A. (2001). Role of Molecular Oscillations in Generating Behavioral Rhythms in Drosophila. *Neuron*, *29*(2), 453–467. https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00218-5

Yin, L., Wang, J., Klein, P. S., & Lazar, M. A. (2006). Nuclear Receptor Rev-erbα Is a Critical Lithium-Sensitive Component of the Circadian Clock. *Science*, *311*(5763), 1002–1005. https://doi.org/10.1126/science.1121613

Yokota, S., Yamamoto, M., Moriya, T., Akiyama, M., Fukunaga, K., Miyamoto, E., & Shibata, S. (2001). Involvement of calcium-calmodulin protein kinase but not mitogen-activated protein kinase in light-induced phase delays and Per gene expression in the suprachiasmatic nucleus of the hamster: Calcium-calmodulin kinase and Per gene expression. *Journal of Neurochemistry*, *77*(2), 618–627. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00270.x

Yoo, S.-H., Mohawk, J. A., Siepka, S. M., Shan, Y., Huh, S. K., Hong, H.-K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., Nussbaum, J., Liu, X., Chen, Z., Chen, Z. J., Green, C. B., & Takahashi, J.

S. (2013). Competing E3 Ubiquitin Ligases Govern Circadian Periodicity by Degradation of CRY in Nucleus and Cytoplasm. *Cell*, *152*(5), 1091–1105. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.055

Yoshitane, H., Honma, S., Imamura, K., Nakajima, H., Nishide, S., Ono, D., Kiyota, H., Shinozaki, N., Matsuki, H., Wada, N., Doi, H., Hamada, T., Honma, K., & Fukada, Y. (2012). JNK regulates the photic response of the mammalian circadian clock. *EMBO Reports*, *13*(5), 455–461. https://doi.org/10.1038/embor.2012.37

Zhao, X., Hirota, T., Han, X., Cho, H., Chong, L.-W., Lamia, K., Liu, S., Atkins, A. R., Banayo, E., Liddle, C., Yu, R. T., Yates, J. R., Kay, S. A., Downes, M., & Evans, R. M. (2016). Circadian Amplitude Regulation via FBXW7-Targeted REV-ERBα Degradation. *Cell*, *165*(7), 1644–1657. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.012

Zhou, M., Kim, J. K., Eng, G. W. L., Forger, D. B., & Virshup, D. M. (2015). A Period2 Phosphoswitch Regulates and Temperature Compensates Circadian Period. *Molecular Cell*, *60*(1), 77–88. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.022