



HAL
open science

FONCTIONS UBIQUITINE-DEPENDANTES DE LA DEACETYLASE HDAC6

Cyril Boyault

► **To cite this version:**

Cyril Boyault. FONCTIONS UBIQUITINE-DEPENDANTES DE LA DEACETYLASE HDAC6.
Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00345784

HAL Id: tel-00345784

<https://theses.hal.science/tel-00345784>

Submitted on 10 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier-Grenoble I
Chimie et Sciences du Vivant

THESE

Pour obtenir leTitre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

(Arrêté ministériel du 25 Avril 2002)

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Cyril BOYAULT

Le 1er Décembre 2006

FONCTIONS UBIQUITINE-DEPENDANTES DE LA DEACETYLASE HDAC6

COMPOSITION DU JURY :

Pr. Stéfan NONCHEV
Pr. Marc PIECHACZYK
Dr. Olivier COUX
Dr. Christoph MUELLER
Dr. Saadi KHOCHBIN

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de Thèse

Thèse préparée au sein du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation
(Unité INSERM 309), Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier-Grenoble I

*A la gnac de mon père,
A la créativité de ma mère.*

Remerciements

Je remercie le Professeur Marc Piechaczyk et le Docteur Olivier Coux pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse, ainsi que le Docteur Christoph Mueller et le Professeur Stefan Nonchev pour avoir accepté de juger et d'assister à la soutenance de cette thèse.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Saadi Khochbin pour son accueil au sein de son laboratoire. Je réalise chaque jour la chance que j'ai eu de pouvoir travailler et recevoir ses conseils pendant ces années d'apprentissage. Sa patience sans limites pour répondre à mes questions, son esprit critique, ainsi que la pleine liberté qu'il m'a offert, m'ont fourni la meilleure des formations. Merci beaucoup Saadi.

Je tiens à remercier le Dr. Christoph Müller pour sa gentillesse et toute l'aide qu'il m'a apporté pendant mon séjour à l'EMBL. C'est l'endroit où j'ai compris énormément. De la science. De moi-même. Merci beaucoup Christoph.

Je remercie également « Vaincre la mucoviscidose » pour son soutien. Je n'ai pu réaliser cette thèse que grâce à son aide. J'espère profondément avoir été à la hauteur des espérances des anonymes qui soutiennent cette association.

Un grand merci, également, à Fabienne, Cécile C. et à Sophie. Votre aide et votre gentillesse m'ont été précieuses lorsque j'en avais le plus besoin. Merci.

Merci à Aude pour sa gentillesse, sa patience, et sa réactivité pour faire face aux imprévus qui m'accompagnent.

Dans la vie, nous avons le bonheur de rencontrer des gens d'exception. Ceux-là mêmes que l'on prend comme exemple à suivre. Lorsque ces personnes vous enrichissent, scientifiquement ou non, la providence fait place à la chance. J'ai eu la chance incroyable de rencontrer celle qui m'a appris à marcher : Coach (Daphné) et bien sûr Chris, Lionel, PYP et André. Je mesure cette chance. Je savoure chacune de nos discussions. Merci.

Je n'aurais pas eu autant d'énergie, de motivation et d'optimisme, si je n'avais pas travaillé avec des gens qui sont devenus mes amis. Merci du fond du cœur à Sandy (ma grande sœur), Charrette (Ferrero for ever), Kara (Sa Lourdeur), Yannick (Père Fougasse), Tic (Angeline) et tac (Sab, stagiaire du mois), Junior (Luke, je suis ton père), Jé (25 en force), Ben (Je crois en diot), Carlitos (El guapito) et les Thibault de l'EMBL. C'est un peu de vous que j'emmène là-bas.

Merci aux ptits savoyards qui m'ont récupéré à la petite cuillère quand les manips ne marchaient pas (souvent donc). Les soirées thématiques farine/Shannon avec Surt, Lilian et mon ptit Johnny (ta brosse à dent sera toujours chez moi, tu le sais), vont me manquer.

Merci à tous mes amis et à mes proches qui, bien conscients de mon aptitude prononcée à être en retard et du caractère aggravant de la thèse, n'ont jamais cherché à me nuire physiquement. J'ai une lourde dette envers vous, mais je sais aussi que la maison fait crédit.

Merci enfin à toi, Cécile. Si j'ai pu travailler sans compter, c'est grâce à toi. Si j'ai pu travailler sans (trop) paniquer, c'est grâce à tes mots rassurants. Ton aide a beaucoup compté. A chaque instant.

Table des matières

REMERCIEMENTS	- 5 -
TABLE DES MATIERES	- 7 -
RESUME	- 11 -
LISTE DES ABREVIATIONS	- 12 -
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	- 13 -
CONTRIBUTIONS AUX TRAVAUX	- 15 -
AVANT-PROPOS	- 17 -
INTRODUCTION	- 19 -
CHAPITRE I : LES HISTONES DEACETYLASES	- 23 -
A. PRESENTATION DES HDACs	- 23 -
B. LES HDACs DE CLASSE I	- 24 -
1- ORGANISATION DES HDACs DE CLASSE I	- 24 -
2- MECANISME DE DEACETYLATION DES HDACs DE CLASSE I	- 25 -
C. LES HDACs DE CLASSE III	- 27 -
1- ORGANISATION DES HDACs DE CLASSE III.....	- 27 -
2- MECANISME DE DEACETYLATION DES HDACs DE CLASSE III	- 27 -
3- FONCTIONS ET REGULATIONS DES SIRTUINES	- 28 -
D. LES HDACs DE CLASSE II	- 29 -
1- ORGANISATION DES HDACs DE CLASSE II :	- 29 -
2- MECANISME DE DEACETYLATION DES HDACs DE CLASSE II.....	- 30 -
3- LES HDACs DE LA SOUS-CLASSE IIA	- 30 -
4- LES HDACs DE LA SOUS-CLASSE IIB	- 32 -
CHAPITRE II : LA DEACETYLASE HDAC6	- 35 -
A. PRESENTATION DE HDAC6	- 35 -
B. HDAC6 ET LA NAVETTE NUCLEO-CYTOPLASMIQUE	- 35 -
C. SUBSTRATS ET PARTENAIRES DE HDAC6	- 37 -
1- HDAC6 EN TANT QUE TUBULINE DEACETYLASE	- 37 -
2- HDAC6 ET INFECTION DU VIH-1	- 40 -
3- HDAC6 ET HSP90.....	- 41 -
4- HDAC6 ET P97/VCP	- 41 -
5- SUBSTRATS ET PARTENAIRES NUCLEAIRES DE HDAC6.....	- 44 -
E. PRISE EN CHARGE DES PROTEINES UBIQUITINEES PAR HDAC6	- 46 -
CHAPITRE III : LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME	- 51 -
A. PRESENTATION DU SYSTEME D'UBIQUITINATION DES PROTEINES	- 51 -
B. LES ENZYMES DE LIGATION D'UBIQUITINE	- 55 -
1- LES ENZYMES DE TYPE E2	- 55 -

2- LES ENZYMES DE TYPE E3	- 55 -
3- LES ENZYMES DE TYPE E4	- 56 -
C. SIGNAUX D'UBIQUITINATION ET DE DEGRADATION DANS LES PROTEINES	- 57 -
D. DEGRADATION DES PROTEINES POLY-UBIQUITINEES	- 60 -
1- DEGRADATION PAR LE PROTEASOME 26S	- 60 -
E- ISOPEPTIDASES ET UCHS	- 63 -
1- LA SUPER FAMILLE DES DUBS (DEUBIQUITINATING ENZYMES)	- 63 -
2- LE ROLE DES DUBS	- 63 -
3- LES AUTRES FONCTIONS DES DUBS	- 66 -
F- EXEMPLES DE PROTEINES DEGRADEES PAR LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME	- 66 -
1- REGULATEURS DU CYCLE CELLULAIRE.....	- 66 -
2- FACTEURS DE TRANSCRIPTION, SUPPRESSEURS DE TUMEURS ET ONCOPROTEINES	- 67 -
3- PROTEINES MEMBRANAIRES.....	- 69 -
G. UBDS : DOMAINES DE LIAISON A L'UBIQUITINE ET AUX CHAINES D'UBIQUITINE.....	- 71 -
1- PRESENTATION	- 71 -
2. UIM ET UBA	- 71 -
3- LES AUTRES UBDS	- 73 -
4- CARACTERISTIQUES DES UBDS	- 73 -
5- AVANTAGES DES FAIBLES AFFINITES DES UBDS POUR L'UBIQUITINE.....	- 74 -
6- STRUCTURE DES DIFFERENTS TYPES D'UBDS, SURFACES D'INTERACTION AVEC L'UBIQUITINE .	- 75 -
7- UBIQUITINATION DES UBDS	- 76 -
8- ROLES PHYSIOLOGIQUES DES UBDS	- 76 -

CHAPITRE IV : LA REPONSE CELLULAIRE AU STRESS..... - 79 -

A. LES EFFETS D'UN STRESS CELLULAIRE.....	- 79 -
B. LES CHAPERONNES HSPs.....	- 79 -
1- INTRODUCTION	- 79 -
2- LES PRINCIPALES HSPs	- 81 -
C. MECANISMES DE CONTROLE DE LA REPONSE CELLULAIRE AU STRESS	- 89 -
1- ACTIVATION DE LA REPONSE CELLULAIRE AU STRESS.....	- 89 -
2. REGULATION DE L'ACTIVATION DE LA REPONSE CELLULAIRE AU STRESS.....	- 91 -

RESULTATS - 97 -

A. LE COMPLEXE HDAC6-p97/VCP CONTROLE LE RECYCLAGE DES CHAINES DE POLY-UBIQUITINE	- 97 -
1- PRESENTATION DE L'ARTICLE 1	- 97 -
2- ARTICLE 1.....	- 99 -
B. HDAC6 RELIE L'ACTIVITE PROTEASOMALE A LA REPONSE CELLULAIRE AU STRESS	- 113 -
1- PRESENTATION DE L'ARTICLE 2	- 113 -
2- ARTICLE 2.....	- 115 -

CONCLUSION..... - 149 -

A. LE RECYCLAGE DES CHAINES DE POLY-UBIQUITINE EST CONTROLE PAR LE COMPLEXE HDAC6-p97/VCP.....	- 149 -
1- HDAC6 ZNF-UBP : LE DOMAINE UBD LE PLUS AVIDE POUR L'UBIQUITINE	- 149 -
2- LE DOMAINE ZNF-UBP MASQUE LES CHAINES DE POLY-UBIQUITINE	- 149 -
3- HDAC6-UBIQUITINE : UNE INTERACTION REGULEE PAR P97/VCP.....	- 150 -
4- HDAC6-p97/VCP : SYSTEME CLEF DE LA GESTION DES PROTEINES POLY-UBIQUITINEES	- 151 -

B. L'ACTIVITE PROTEASOMALE ET LA REPOSE CELLULAIRE A L'ACCUMULATION DES PROTEINES POLY-UBIQUITINEES SONT RELIEES PAR HDAC6.....	- 152 -
1- CONTRE L'ACCUMULATION DES PROTEINES MAL REPLIEES ET UBIQUITINEES	- 152 -
2- UNE NOUVELLE FONCTION POUR LA SEGREGASE P97/VCP	- 153 -
3- DYSFONCTIONNEMENT DU PROTEASOME ET COMPLEXES HDAC6-HSP90-HSF1-P97/VCP	- 154 -
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>- 157 -</u>
<u>PERSPECTIVES.....</u>	<u>- 161 -</u>
A. MALADIES D'AGREGATION DES PROTEINES, QUEL ROLE POUR HDAC6-P97/VCP ?.....	- 161 -
B. CAS DE LA MUCOVISCIDOSE, QUEL ROLE POUR HDAC6-P97/VCP ?	- 162 -
C. HDAC6 ET CONTROLE DES PHENOMENES REPOSANT SUR LA MONO UBIQUITINATION DE FACTEURS.	- 162 -
D. HDAC6 ET IMMUNITE.....	- 164 -
E. HDAC6 : ENTRE L'ACETYLATION ET L'UBIQUITINATION DES PROTEINES.....	- 164 -
F. EXISTE-T-IL UNE INTERACTION DE HDAC6 AVEC DES PROTEINES DE TYPE UBIQUITINE OU AVEC DES DOMAINES DE TYPE UBIQUITINE ?	- 165 -
G. EXISTE-T-IL UN SYSTEME SIMILAIRE A L'UBIQUITINATION CHEZ LES PROCARYOTES ?	- 167 -
H. DANS UN AUTRE CONTEXTE, LE DOMAINE ZNF-UBP, MAIS POUR QUELLES FONCTIONS ? .-	- 169 -
<u>ANNEXE</u>	<u>- 177 -</u>
<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	<u>- 195 -</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>- 219 -</u>
<u>RESUME</u>	<u>- 220 -</u>

RESUME

Avant le début de ma thèse, le laboratoire avait découvert et caractérisé HDAC6, une Histone Déacétylase atypique qui possède deux domaines déacétylases et peut interagir directement avec l'ubiquitine, grâce à son domaine ZnF-UBP. De plus, le laboratoire avait montré que HDAC6 interagit avec UFD3/PLAP, un régulateur du recyclage de l'ubiquitine, et p97/VCP, un homologue murin de la chaperonne de levure Cdc48p. Cependant, aucune fonction biologique n'était connue pour HDAC6, notamment dans la voie d'ubiquitination des protéines.

Nous avons tout d'abord observé que la surexpression de HDAC6 ralentit la dégradation des protéines poly-ubiquitinées, via le ZnF-UBP, son domaine de liaison à l'ubiquitine. Grâce à une série d'expériences, nous avons pu montrer que les complexes HDAC6-p97/VCP régulent directement la stabilité des protéines poly-ubiquitinées.

L'accumulation intracellulaire de protéines poly-ubiquitinées peut être toxique pour les cellules si aucune réponse cellulaire n'est engagée. En réalité, une telle accumulation active le facteur de transcription Heat Shock Factor 1 (HSF1) afin de promouvoir la survie de la cellule. Grâce à ces considérations, nous avons découvert que HDAC6 contrôle la réponse cellulaire à l'accumulation de protéines polyubiquitinées et avons disséqué les mécanismes impliqués dans ce contrôle. Nous avons trouvé qu'en l'absence de stress, HDAC6 et HSF1 sont en complexes avec p97/VCP et HSP90. Cependant, lorsque la concentrations intracellulaire en protéines poly-ubiquitinées augmente, comme lors d'une inhibition du protéasome, HDAC6 est re-larguée du complexe de manière ubiquitine et ZnF-UBP dépendante. Un tel re-largage permet ensuite à p97/VCP d'activer HSF1 et d'engager la cellule dans la réponse au stress.

Mots clefs : acétylation, ubiquitination, protéasome, stress cellulaire, Histone Déacétylase, HDAC6, ZnF-UBP, p97/VCP, HSF1.

Liste des abréviations

ATP : Adénosine TriPhosphate

CaMK : Calcium/Calmodulin Kinase

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator

CFTR δ F508 : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator muté en position F508.

CRM1 : Chromosom Region Maintenance

ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

HAT : Histone Acetyl-Transferase

Hda1 : Histone deacetylase 1

HDAC : Histone DeACetylase

HSF1 : Heat Shock Factor 1

HSP : Heat Shock Protein

NAD : Nicotin Adenine Dinucleotide

NES : Nuclear Export Signal

NLS : Nuclear Localisation Signal

NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylating

PKC α : Protein Kinase C alpha

PKD1 : Protein Kinase D1

PLAP : Phospholipase A2-activating Protein

PML : Promyelocytic bodies

PP1 : Protein Phosphatase type 1

PP5 : Protein Phosphatase type 5

RPD3 : Reduced potassium dependency 3

SIR2 : Silent information regulator 2

SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier

TSA : Trichostatin A

Ubl : Ubiquitin like protein

UBDs : Ubiquitin Binding Domains

UCH : Ubiquitin C-terminal Hydrolase

UFD : Ubiquitin Fusion Degradation

USP : Ubiquitin Specific Protease

VCP : Valosin Containing Protein

Znf-UBP : Zinc Finger in Ubiquitin specific Protease

Liste des tableaux et figures

Partie I : Les HDACs

p.22... **Figure I.1** Les différents niveaux de compaction de la chromatine.

p.22... **Figure I.2** Contrôle de l'acétylation des lysines des histones par les HATs et les HDACs.

p.22... **Figure I.3** Phylogénie des 3 classes de HDACs chez les eucaryotes supérieurs.

p.26... **Figure I.4** Structure primaire et modifications des HDACs de classe I chez la levure et chez l'Homme.

p.26... **Figure I.5** Structure primaire et modifications des HDACs de classe III chez la levure et chez l'Homme.

p.26... **Figure I.6** Structure primaire et modifications des HDACs de classe II chez la levure et chez l'Homme.

Partie II : HDAC6

p.36... **Figure II.1** Le domaine ZnF-UBP de HDAC6 est un domaine hautement conservé chez les USPs.

p.36... **Figure II.2** HDAC6 est une HDAC majoritairement cytoplasmique.

p.38, 39 **Tableau II.1** Les partenaires de HDAC6.

Partie III: Le système Ubiquitine-Protéasome

p.52... **Figure III.1** Présentation du système Ubiquitine-Protéasome.

p.59... **Figure III.2** Modulation de la reconnaissance des substrats par les E3s.

p.68... **Figure III.3** Dégradation protéasomale des cibles de l'ERAD.

p.70... **Figure III.4** Structure des différents domaines connus pour interagir avec l'ubiquitine (UBDs).

p.72... **Figure III.5** Les surfaces de contact de l'ubiquitine avec les UBDs.

p.62, 64 **Tableau III.1** Les fonctions de certaines dé-ubiquitinases.

p.72... **Tableau III.2** Caractéristiques des différents UBDs.

Partie IV: La réponse cellulaire au stress

p.82... **Figure IV.1** Structure primaire de HSP90.

p.82... **Figure IV.2** Structure tridimensionnelle de HSP90 et modèle de pince moléculaire.

p.88... **Figure IV.3** Structure primaire de HSP70.

p.88... **Figure IV.4** Structure primaire de HSP27.

p.90... **Figure IV.5** Structure primaire et modifications potentielles de HSF1.

p.92... **Figure IV.6** Mécanisme d'activation de HSF1.

Conclusion générale

p.156.. **Figure V.** HDAC6 contrôle la stabilité des protéines et la réponse cellulaire à l'accumulation de protéines polyubiquitinées.

Perspectives

p.166.. **Figure VI.1** Conservation du ZnF-UBP au cours de l'évolution.

p.168.. **Figure VI.2.** Diversité des protéines à domaine ZnF-UBP.

p.170.. **Tableaux VI.1.** Associations diverses du domaine ZnF-UBP au sein des protéines.

Contributions aux travaux

Dans les travaux présentés au cours de cette thèse, les expériences suivantes ont été réalisées par nos collaborateurs.

A. LE COMPLEXE HDAC6-p97/VCP CONTROLE LE RECYCLAGE DES CHAINES DE POLY-UBIQUITINE.

- AUC et ITC : Dr. Vladimir Rybin,
- EXAFs : Dr. Wolfram Meyer-Klaucke,
- microPIXE : Dr. Elspeth Garman,
- Modélisation du ZnF-UBP de mHDAC6 : Dr. Christoph Müller,
- Etablissement de lignées murines transfectées stablement avec mHDAC6 : Dr. Yu Zhang et Dr. Patrick Matthias,
- Constructions CFTR : Dr. Benoît Gilquin.

B. HDAC6 RELIE L'ACTIVITE DU PROTEASOME AU STRESS CELLULAIRE.

- Etablissement de lignées murines transfectées stablement avec mHDAC6 : Dr. Yu Zhang et Dr. Patrick Matthias,
- Lignées HSF1 et HSF1 -/- : Pr. Claire Vourc'h et Dr. Caroline Jolly,
- Lignées humaines HDAC6 et Knock-Down HDAC6 : Dr. Tso-Pang Yao.

AVANT-PROPOS

La dégradation des protéines est un phénomène étroitement régulé au cours de la vie d'une cellule. Un système élaboré, ATP dépendant, qui permet la reconnaissance, le marquage, la prise en charge et la destruction des protéines à éliminer a été mis à jour voilà près de 25 ans. En effet, Avram Hershko, Irwin Rose et Aaron Ciechanover ont découvert le système Ubiquitine-Protéasome chargé du contrôle qualité des protéines, qui par la suite se révéla être un processus puissant, contrôlant notamment la division, la différenciation et la mort cellulaire.

Aussi fin soit-il, le système de modification des protéines par l'ubiquitine ne finit pas de surprendre de par sa complexité et l'étendue des variations qu'il décline. De nombreuses formes de mono et poly-ubiquitination furent découvertes, régulant en fait des phénomènes divers : internalisation de récepteurs, trafic vésiculaire, remodelage des organelles, autophagie, réparation de l'ADN, activité transcriptionnelle de la chromatine, bourgeonnement viral ou encore réponse immunitaire. De plus, les recherches montrent qu'une multitude de domaines récepteurs spécifiques des différentes formes de chaînes d'ubiquitine existe, ajoutant ainsi à l'interprétation des signaux et à la diversité du système.

De ce fait, 25 ans après sa découverte, l'ubiquitination des protéines ne semble plus être un phénomène aussi limité.

Découverte en 1999 au laboratoire par André Verdel et Saadi Khochbin, l'histone déacétylase HDAC6 se révéla rapidement atypique. Majoritairement cytoplasmique, elle possède un domaine de liaison à l'ubiquitine de type ZnF-UBP (Zinc Finger in Ubiquitin Specific Protease), très conservé chez les protéases spécifiques des chaînes d'ubiquitine. De plus, les travaux de Daphné Seigneurin-Berny et collègues, ont montré que HDAC6 est en complexe avec PLAP (Phospholipase A2-activating Protein) et p97/VCP (Valosin Containing Protein), deux facteurs impliqués dans l'ubiquitination et la dégradation des protéines par le protéasome. Ces découvertes ont rapproché HDAC6 du système d'ubiquitination des protéines.

Mes travaux de recherche ont porté sur la caractérisation des fonctions ubiquitine-dépendantes de HDAC6. La première partie de mon introduction présentera l'état des connaissances sur les HDACs. J'appuierai mon développement sur HDAC6, ses substrats connus ainsi que les mécanismes auxquels cette enzyme prend part. Dans la seconde partie de mon introduction, après une brève présentation du système ubiquitine-protéasome, et des domaines de liaison à l'ubiquitine et aux chaînes d'ubiquitine, nous verrons comment la cellule est capable de survivre à un stress protéotoxique entraînant l'accumulation des protéines polyubiquitinées. Il m'a paru pertinent d'incorporer l'ensemble de ces données au manuscrit afin de faciliter la présentation de nos résultats.

Les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis de découvrir que le domaine ZnF-UBP est un domaine de très haute affinité pour l'ubiquitine. De plus, ils montrent que les complexes HDAC6-p97/VCP contrôlent le recyclage des protéines polyubiquitinées. Enfin, nous verrons que lors de l'accumulation toxique de telles protéines, HDAC6 déclenche une réponse cellulaire de survie, grâce à son domaine ZnF-UBP, et de manière ubiquitine dépendante.

Introduction

Chapitre I
Les Histones Déacétylases

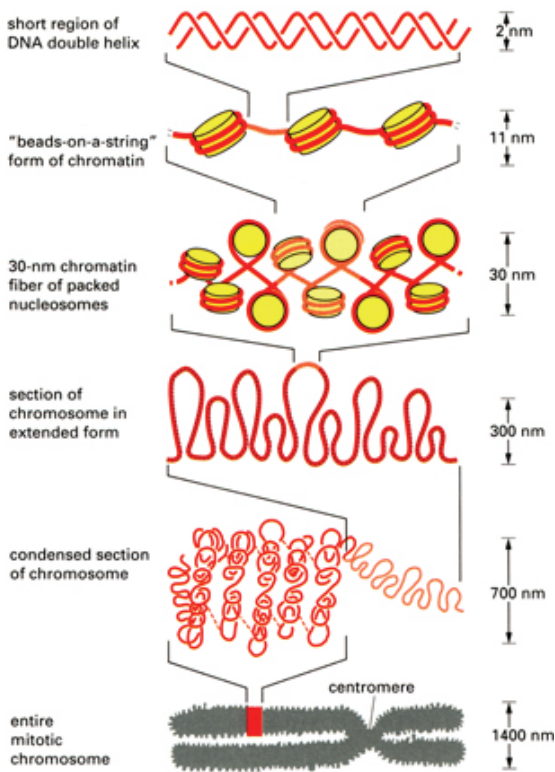


Figure I.1
Les différents niveaux de compaction de la chromatine (tiré de Alberts et al., 1998).

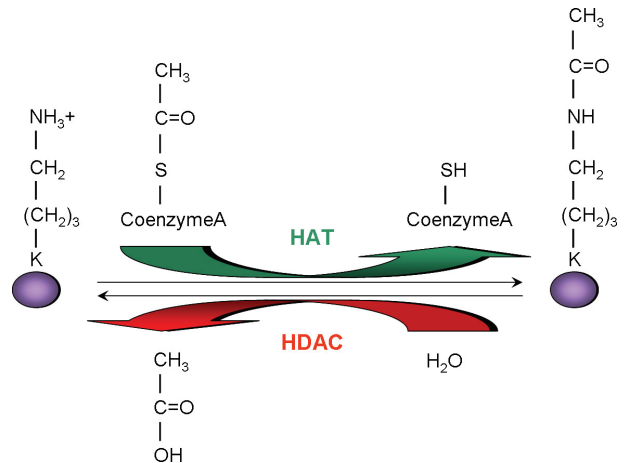
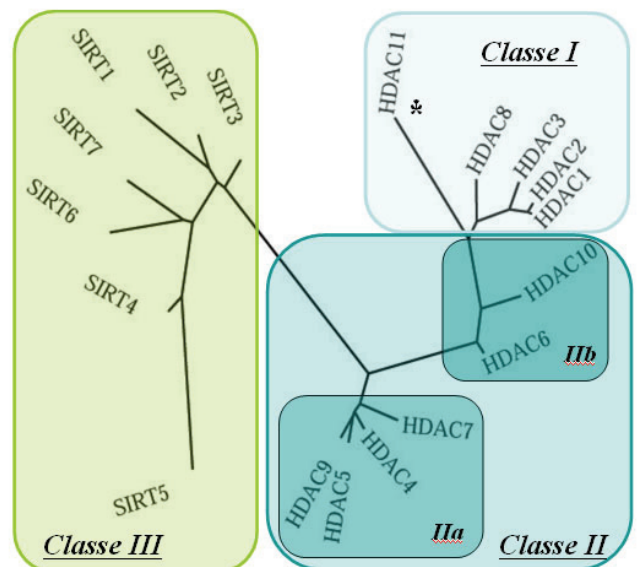


Figure I.2
Contrôle de l'acétylation des lysines des histones par les Histone Acétyl-Transférases (HATs) et les Histones DéAcétylases (HDACs).

Figure I.3
Phylogénie des 3 classes de HDACs chez les eucaryotes supérieurs. Chacune des séquences des HDACs humaines de classe I, II et III ont été alignées avec multalin. L'arbre phylogénétique a été réalisé grâce au logiciel PHYLIP. Les classes I, II et III sont indiquées, ainsi que les sous classes IIa et IIb. L'astérisque indique la position de HDAC11 dont certains travaux laissent penser qu'elle serait le membre fondateur d'une 4ème classe de HDACs.



Chapitre 1 : Les Histones Déacétylases

Dans les cellules eucaryotes, l'unité fondamentale de la chromatine est le nucléosome, composé d'ADN et d'histones. Il constitue le premier niveau de compaction de l'ADN dans le noyau. Régulièrement répétée, cette structure forme un nucléofilament, qui en se compactant en de successifs niveaux d'organisation, permet d'atteindre le niveau de compaction le plus élevé : celui de chromosome métaphasique (**Figure I.1**).

Ces états de chromatine ne servent pas seulement d'éléments structuraux essentiels pour préserver l'information génétique, mais gouvernent également l'accessibilité des séquences d'ADN aux facteurs de transcriptions et à toutes leurs machineries.

Trois mécanismes connus régulent cette structure : les facteurs de remodelage ATP dépendants, le remplacement d'histones ou de variants d'histones, et les modifications covalentes de la chromatine.

Les modifications covalentes de la chromatine peuvent avoir lieu aussi bien sur l'ADN que sur les histones. Les histones sont notamment des cibles de l'acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitination et ADP-ribosylation (Berger, 2001 ; Cosgrove et *al.*, 2004). Ce type de modifications covalentes a été pour la première fois décrit en 1964 (Allfrey et *al.*, 1964) et fait toujours l'objet d'une recherche active.

De nombreuses études se sont focalisées sur ces modifications post-traductionnelles des queues N-Terminales flexibles des histones qui régulent les différents états de compaction de la chromatine. En effet, l'acétylation des queues des histones est contrôlée par des actions antagonistes de deux familles d'enzymes : les HATs (histone acétyl-transférases) et les HDACs (histones déacétylases). Les HATs transfèrent spécifiquement un groupement acétyl de l'acétyl co-enzyme A sur un groupe ϵ -amine d'un résidu lysine. Au contraire, les HDACs hydrolysent cet acétamide (**Figure I.2**).

A. Présentation des HDACs

Les HDACs ont pour la première fois été décrites chez la levure comme étant des régulateurs transcriptionnels tels que RPD3 (pour reduced potassium dependency 3), Hda1

(Rundlett et *al.*, 1996) et Sir2 (pour silent information regulator 2, Imai et *al.*, 2000 ; Landry et *al.*, 2000).

On compte aujourd'hui 11 HDACs réparties en 3 classes chez *S.cerevisiae*. Les protéines Rpd3, Hos1 et Hos2 forment la classe I. Dans la seconde classe, on retrouve les protéines Hda1 et Hos3, d'après une étude phylogénique récente (Gregoretta et *al.*, 2004 ; Rundlett et *al.*, 1996). Enfin, la troisième classe est constituée des protéines Sir2 et les 4 protéines Hst.

Dans les autres organismes, les HDACs sont également regroupées en 3 classes, en fonction de leur degré d'homologie avec le domaine catalytique des HDACs précédemment citées (**Figure I.3**) :

- Classe I homologue à Rpd3: HDAC1, 2, 3, 8 et 11,
- Classe II homologue à Hda1 : HDAC4, 5,6, 7, 9, 10,
- Classe III homologue à Sir2 : SIRT1 à 7.

Les HDACs des deux premières classes sont structurellement très proches et utilisent comme cofacteur l'acétyl co-enzymeA. En revanche, les protéines SIRT on une activité déacétylase dépendante du NAD.

B. Les HDACs de classe I

1- Organisation des HDACs de classe I

La **Figure I.4** résume les différentes structures primaires ainsi que les modifications des HDACs de classe I.

1.1- HDAC1 et 2

HDAC1 et 2 sont des enzymes fortement homologues (82% de similarité, Cress and Seto, 2000 ; Kao et *al.*, 2000 ; Li et *al.*, 2002 ; Wade et *al.*, 2001). Il semble nécessaire que ces protéines soient en présence de cofacteurs pour moduler leur activité enzymatique, leur fixation sur l'ADN et leur ciblage sur le promoteur des gènes (Zhang et *al.*, 1999).

Brièvement, trois complexes protéiques contenant ces deux HDACs ont été caractérisés (Galasinski et *al.*, 2002 ; Heinz et *al.*, 1997 ; Kao et *al.*, 2000 ; You et *al.*, 2001) :

- le complexe Sin3A contenant mSin3ARbAp46/48 et SAP18/30

- le complexe NuRD (pour nuclear remodeling and deacetylating) complexe de CHD3/4, RbAp46/48 et MTA2,
- le complexe CoREST contenant CoREST et p110.

L'activité et l'assemblage de tels complexes répresseurs transcriptionnels est modulé par phosphorylation (Galasinsky *et al.*, 2002 ; Pflum *et al.*, 2001).

1.2- HDAC3

Plus proche structurellement de HDAC8 (34% de similarité) que de HDAC1 et HDAC2, il n'en reste pas moins que HDAC3 à aussi besoin de cofacteurs pour avoir une activité optimale. Notamment, des travaux ont montré que les protéines SMRT, N-COR, HDAC4, 5 et 7 forment un complexe régulant l'activité de HDAC3 (Fischle *et al.*, 2001 ; Guenther *et al.*, 2001 ; Yang *et al.*, 2002).

1.3- HDAC8

Contrairement aux autres HDACs, la participation de HDAC8 dans un complexe protéique co-répressif n'a pas encore été démontré. De façon surprenante, les travaux de Waltregny et collègues montrent que HDAC8 est détectable dans le cytosol des cellules musculaires lisses en différenciation, et s'associe avec le cytosquelette d'actine. Dans les mêmes travaux, une extinction de HDAC8 par SiRNA a montré que sa présence est nécessaire à la contraction des fibres de collagène de type I (Waltregny *et al.*, 2005).

1.4- HDAC11

Malheureusement, il existe peu de données à propos de HDAC11. Clonée et caractérisée en 2002, elle ne semble appartenir à aucun complexe répresseur transcriptionnel connu. Les travaux de Gao et collègues ont décrit cependant une interaction nucléaire prometteuse avec HDAC6 (Gao *et al.*, 2002).

2- Mécanisme de déacétylation des HDACs de classe I

Les domaines catalytiques des HDACs de classe I et II sont formés d'environ 400 acides aminés. Le site actif est constitué d'une poche tubulaire courbée. Le retrait du groupement acétyl, lors de la déacétylation du substrat, s'opère via un système de transfert de charge constitué de deux histidines adjacentes, deux acides aspartiques et d'une tyrosine.

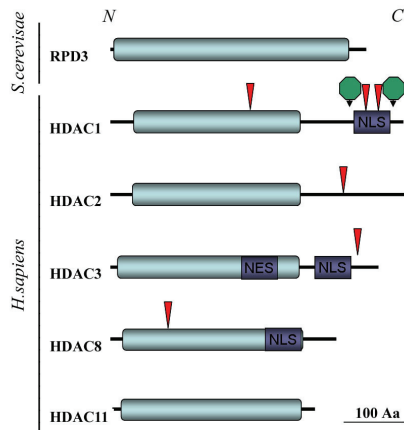


Figure I.4
Structures primaires et modifications des HDACs de classe I chez la levure et chez l'Homme.

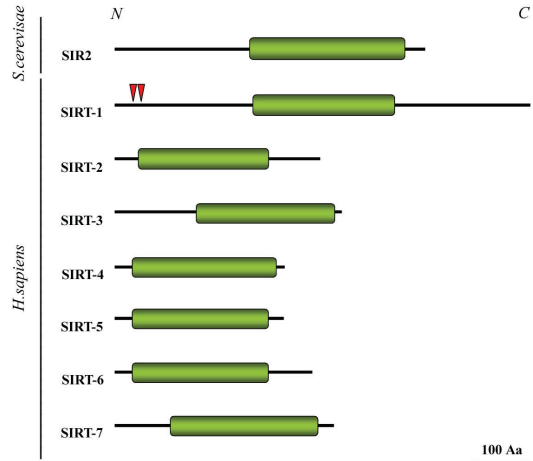


Figure I.5
Structures primaires et modifications des HDACs de classe III chez la levure et chez l'Homme.

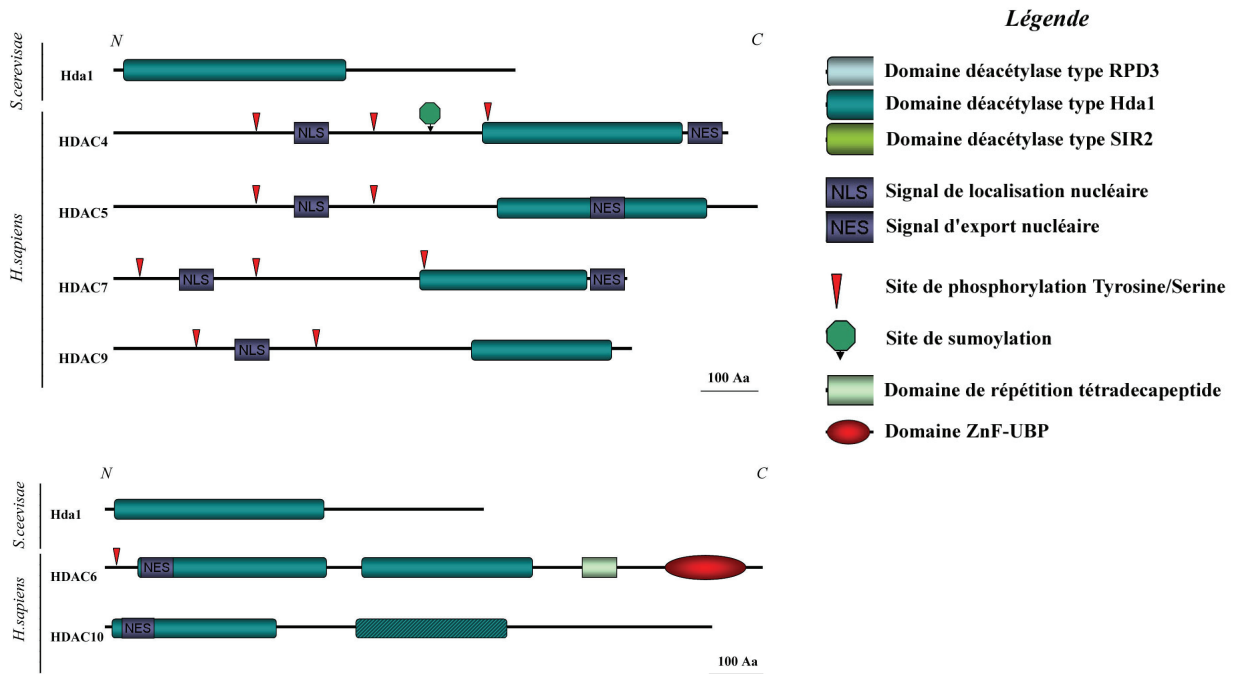


Figure I.6
Structures primaires et modifications des HDACs de classe II chez la levure et chez l'Homme (sous classe IIa panneau du haut, IIb en bas). Les HDACs de classe IIb sont les seules HDACs connues à posséder 2 domaines déacétylase. Néanmoins, chez HDAC10, seul le domaine déacétylase N-Terminal est fonctionnel alors que les 2 domaines sont actifs chez HDAC6.

Le composant essentiel du système de transfert de charge est la présence d'un atome de Zinc, immobilisé dans la poche catalytique (Finnin et *al.*, 1999 ; Buggy et *al.*, 2000). La TSA (Trichostatine A), déplace l'atome de zinc loin de la poche catalytique. Cette poche étant extrêmement conservée, ceci explique pourquoi toutes les HDACs de classe I et II sont inhibées par la TSA (Johnstone, 2002 ; Marks et *al.*, 2001 ; Marmorstein et *al.*, 2001 ; Yoshida et *al.*, 2001).

De façon extrêmement intéressante, dans le seul cas de HDAC8, il a été démontré que la phosphorylation d'un résidu sérine du domaine catalytique de HDAC8 permet de réguler son activité déacétylase (Somoza et *al.*, 2004).

C. Les HDACs de classe III

La **Figure I.5** résume les différentes structures primaires ainsi que les modifications des HDACs de classe III.

1- Organisation des HDACs de classe III

Cette classe regroupe les HDACs homologues de la protéine Sir2 de *S.cerevisiae*, appelées aussi Sirtuines. Cette protéine a été découverte à la suite d'une recherche de mutant empêchant la répression transcriptionnelle du loci HM (Homothallic Mating) chez la levure.

2- Mécanisme de déacétylation des HDACs de classe III

La famille des HDACs de class III contient un domaine catalytique de 275 acides aminés sans aucune homologie avec celui des HDACs des classes I et II. En effet, pour la classe III, la réaction de déacétylation de la lysine du substrat est couplée à la rupture d'une liaison de haute énergie du NAD (Nicotine adénine dinucléotide) (Moazed, 2001). Le produit d'une telle réaction est l'acétyl-ADP-ribose (Avalos et *al.*, 2005 ; Tanner et *al.*, 2000).

La structure de 4 sirtuines (Sir2-Af1 et Sir2-Af2 d'*Archaeoglobus fulgidus*, SirT2 humaine et Hst2 de levure) ont été obtenues à une résolution atomique. Différents travaux ont mis en évidence de nombreux points intéressants (Avalos et *al.*, 2002 ; Finnin et *al.*, 2001 ; Min et *al.*, 2001 ; Zhao et *al.*, 2004). Brièvement, chacune des sirtuines est organisée en deux

domaines globulaires. Le domaine de fixation du NADH fait face à un plus petit domaine où se situe le site catalytique contenant le zinc responsable de la rupture de liaison de haute énergie du NAD (Sherman et *al.*, 1999). L'organisation de cette poche à NADH prédit qu'à haute concentration, le nicotinamide peut inhiber la réaction de déacétylation (Bitterman et *al.*, 2002).

Les études menées jusqu'à ce jour laissent penser que les sirtuines possèdent une certaine spécificité de substrat (Avalos et *al.*, 2002 ; Min et *al.*, 2001 ; North et *al.*, 2003).

3- Fonctions et régulations des sirtuines

Chez la levure, Sir2 est retrouvée dans 2 complexes majeurs :

- contenant Sir3 et 4 : ce complexe est responsable du « silencing » du télomère et du loci HM.
- comprenant Net1 et cdc14 : ce complexe supprime les recombinaisons génétiques au sein du locus de l'ADNr.

De façon très excitante, puisque le niveau de NAD est directement dépendant de l'activité cellulaire, les travaux de Lin et collègues décrivent que Sir2 est régulée par des voies métaboliques (Lin et *al.*, 2000). Lors de la croissance en conditions riches en glucose, l'augmentation du métabolisme induit une réduction massive de NAD en NADH. Cette réduction du taux de NAD supprime l'activité déacétylase de Sir2 et augmente le taux de recombinaison. Certains auteurs pensent donc à l'inverse que la diminution du métabolisme chez la levure provoquerait une augmentation de la durée de vie, dans un phénomène Sir2 dépendant (Defossez et *al.*, 2001 ; Guarente et *al.*, 2000). Cependant ces conclusions restent très controversées, notamment chez l'Homme (Michishita et *al.*, 2005).

Chez l'Homme, on ne dénombre pas moins de 7 sirtuines (Frye, 2000). Nous ne parlerons ici que des SIRT1 et 2 car elles sont très largement étudiées.

3.1- SIRT1

Le facteur de transcription TAF_I68, nécessaire à la régulation du complexe transcriptionnel comprenant l'ARN polymérase I, a été le premier substrat identifié de SIRT1 (Muth et *al.*, 2001). Depuis le travail de Takata et Ishikawa, on note aussi que SIRT1 interagit avec de nombreux répresseurs transcriptionnels à domaine Hélice-Tour-Hélice

(Takata and Ishikawa, 2003). De plus, Fulco et collègues (Fulco et *al.*, 2003) ont montré que SIRT1 inhibe la HAT PCAF et le facteur de transcription MyoD en les déacétylant.

Enfin, de nombreuses études suggèrent que SIRT1 est capable de déacétyler p53, et que cette déacétylase régulerait donc étroitement l'apoptose (Gu and Roeder, 1997 ; Langley et *al.*, 2002 ; Liu et *al.*, 1999 ; Luo et *al.*, 2001 ; Sakaguchi et *al.*, 1998).

3.2- SIRT2

Tout comme son homologue de levure Hst2, SIRT2 est localisée dans le cytoplasme (Afshar and Murnane, 1999 ; Perrod et *al.*, 2001). Chez la levure, Hst2 affecte le « silencing » de la chromatine par un mécanisme inconnu.

Comme nous le verrons plus tard pour HDAC6, SIRT2 co-localise avec le réseau de microtubules et déacétyle l' α -tubuline, en position K40 (North et *al.*, 2003). De plus, il semblerait que SIRT2 et HDAC6 soient capables de former un complexe endogène, bien que la fonction de tels complexes n'ait jamais été décrite (North et *al.*, 2003).

Enfin, certains travaux laissent penser que SIRT2 pourrait être un suppresseur de tumeur (Hiratsuka et *al.*, 2003).

D. Les HDACs de classe II

La **Figure I.6** résume les différentes structures primaires ainsi que les modifications des HDACs de classe II.

1- Organisation des HDACs de classe II :

Les HDACs de classe II existent dans de nombreux organismes eucaryotes. Ces enzymes possèdent un domaine déacétylase ayant des identités de séquences très fortes avec le domaine déacétylase de Hda1 de levure.

Chez les mammifères, 6 HDACs composent la classe II des HDACs, et sont divisées en 2 sous-classes :

- classe IIa : HDAC4, 5, 7 et 9,
- classe IIb : HDAC6 et 10.

(Fischle et *al.*, 1999 ; Fischle et *al.*, 2001; Guardiola and Yao, 2002 ; Grozinger et *al.*, 1999 ; Kao et *al.*, 2000 ; Miska et *al.*, 1999 ; Tong et *al.*, 2002 ; Verdel and Khochbin, 1999 ; Wang et *al.*, 1999).

2- Mécanisme de déacétylation des HDACs de classe II

Comme nous l'avons vu plus haut, le mécanisme de déacétylation de la classe II des HDACs est le même que celui de la classe I (Cf. paragraphe **B.2**).

3- Les HDACs de la sous-classe IIa

3.1. Fonctions et régulation des HDACs de la sous-classe IIa

Comme leur homologue Hda1 chez la levure, les HDACs de classe IIa ont principalement une fonction de co-répresseurs transcriptionnels. En effet, en plus de leurs domaines déacétylase, ces enzymes agissent avec d'autres co-répresseurs ou se fixent directement sur des facteurs de transcriptions comme MEF2, NF-AT3c, BCoR et Runx3 (Kao et *al.*, 2000 ; Lemercier et *al.*, 2000 ; Sparrow et *al.*, 1999 ; Wang et *al.*, 1999 ; Zhou et *al.*, 2000).

La régulation de l'expression des HDACs de classe IIa est tissu-spécifique. On note que la plupart sont fortement exprimées dans le muscle squelettique, le cœur, le cerveau et le thymus avec des rôles capitaux lors de la différenciation cellulaire (Verdin et *al.*, 2003 ; Sengupta and Seto, 2004)).

A la régulation de l'expression tissu spécifique, nous pouvons ajouter un second mode contrôle des HDACs, l'exemple typique étant l'épissage alternatif de HDAC9. Les différentes isoformes générées sont alors soit cytoplasmiques, soit nucléaires comme dans le cas de MITR (Petrie et *al.*, 2003, Sparrow et *al.*, 1999 ; Zhang et *al.*, 2001). Les travaux de Zeremski et collègues montrent qu'au moins une autre HDAC de classe IIa subit le même type de régulation : HDAC4 (Zeremski et *al.*, 2003).

3.2. Compartimentalisation sub-cellulaire des HDACs de la sous-classe IIa

Les déacétylases de la sous-classe IIa ont une localisation aussi bien nucléaire que cytoplasmique (Grozinger and Shreiber, 2000 ; Khochbin et *al.*, 2001 ; Miska et *al.*, 1999).

De plus, ces HDACs possèdent un signal d'import ou d'export nucléaire nécessaire au trafic nucléo-cytoplasmique (McKinsey *et al.*, 2000a ; McKinsey *et al.*, 2001 ; Wang and Yang, 2001).

La localisation subcellulaire des HDACs de classe IIa est affectée par la privation de sérum (Dressel *et al.*, 2001), la dépolarisation membranaire (Chawla *et al.*, 2003) et l'hypoxie. Ce dernier cas de figure est illustré par HDAC7, transloquée dans le noyau à la suite d'une hypoxie, tandis que cette HDAC réside dans la mitochondrie en conditions physiologiques (Bakin and Jung, 2004 ; Kato *et al.*, 2004).

D'autre part, les travaux précurseurs de Borghi et d'autres équipes ont montré que MEF2 et HIF1 α participent à la relocalisation nucléaire de la sous-classe IIa (Borghi *et al.*, 2001 ; Chan *et al.*, 2003 ; Kato *et al.*, 2004). Au contraire, l'export nucléaire des HDACs de la sous-classe IIa est dépendant de la protéine CRM1 (Fischle *et al.*, 1999 ; Grozinger and Shreiber, 2000 ; Kao *et al.*, 2001).

La protéine 14-3-3, comme de nombreuses protéines, joue un rôle important dans la rétention cytoplasmique des HDACs de classe IIa (Grozinger and Shreiber, 2000 ; Kao *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2000). La fixation de la protéine 14-3-3 affecterait notamment la localisation sub-cellulaire de MITR, et son association avec HDAC7, empêcherait sa dégradation protéasomale, contribuant ainsi à son accumulation cytoplasmique (Li *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2001b).

Les CAMKs I, II, IV phosphorylent les HDACs sur leurs sites de fixation de la protéine 14-3-3. Elles interviennent dans leur export nucléaire (Kao *et al.*, 2001 ; Linseman *et al.*, 2003). Il semblerait que des kinases, distinctes des CAMKs, puissent aussi réguler ces HDACs sur des sites identiques (Zhang *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2001). Parmi elles, la PKD1 qui phosphoryle HDAC5 et 7 a récemment été découverte (protéine kinase D1 - Parra *et al.*, 2005 ; Vega *et al.*, 2004). Dans le cas de HDAC4, à la suite d'un signal extracellulaire, la protéine oncogénique Ras accroît sa localisation nucléaire en stimulant sa phosphorylation par la kinase 1 et 2 e (Zhou *et al.*, 2000b).

Au contraire, d'autres modifications, comme la monoubiquitination et la sumoylation de HDAC4, 5 et 9 ne semblent pas avoir d'impact sur leur localisation sub-cellulaire. (Hook *et al.*, 2002 ; Kirsh *et al.*, 2002 ; Petrie *et al.*, 2003 ; Tatham *et al.*, 2001).

4- Les HDACs de la sous-classe IIb

4.1. Fonctions et régulations des HDACs de la sous-classe IIb :

La sous-classe IIb des HDACs comporte à l'heure actuelle deux membres : HDAC6 et HDAC10. La protéine HDAC6 fera l'objet d'une analyse bibliographique exhaustive dans les prochaines pages.

HDAC10 est le membre découvert le plus récemment dans la sous-classe IIb. Deux espèces d'ARNm de tailles différentes ont été découvertes, suggérant l'existence de deux variants d'HDAC10 (Fischer et *al.*, 2002). L'analyse des séquences protéiques montre que HDAC10 est homologue à HDAC6 (37% de similarités – Guardiola and Yao, 2002).

HDAC10 renferme une séquence NES et deux domaines déacétylase. Cependant, le domaine catalytique N-Terminal est le seul fonctionnel. De plus, deux domaines putatifs de fixation de la protéine RB ont été découverts sur HDAC10, suggérant un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire.

Il a de plus été montré que HDAC10 interagit avec HDAC1, 2, 3, 4, 5 et 7 et SMRT. Bien que cela reste controversé, il semblerait que HDAC10 ne puisse pas interagir avec HDAC6. Quoiqu'il en soit, ces associations possibles avec d'autres HDACs nous indiquent que cette protéine aurait plus un rôle de recruteur d'autres HDACs qu'une fonction de déacétylase (Fischer et *al.*, 2002 ; Guardiola and Yao, 2002 ; Kao et *al.*, 2002 ; Tong et *al.*, 2002).

Chapitre II
La Déacétylase HDAC6

Chapitre II : La déacétylase HDAC6

A. Présentation de HDAC6

Découverte en 1999 chez la souris (Verdel and Khochbin, 1999), HDAC6 est une enzyme atypique : c'est la seule déacétylase à posséder deux domaines déacétylases fonctionnels. De plus, ces domaines sont associés à un domaine ZnF-UBP (Zinc Finger in specific Proteases, **Figure II.1**). Enfin, cette protéine est localisée exclusivement dans le cytoplasme grâce à un mécanisme actif (**Figure II.2**).

Comme les autres HDACs de la classe II, HDAC6 est exprimée de façon tissu spécifique : testicules, cœur, foie, reins et pancréas (Grozingier et *al.*, 1999 ; Verdel and Khochbin, 1999).

De façon intéressante, l'activité déacétylase de HDAC6 est résistante à la trapoxine B, une toxine fongique qui inhibe toutes les HDACs de classe I et II (Furumai et *al.*, 2001). En revanche, comme les HDACs de classe I et II, l'activité déacétylase de HDAC6 est inhibée par la TSA. Une analyse attentive de ses domaines déacétylase nous montre qu'ils sont hautement conservés chez HDAC6 depuis le nématode et la drosophile jusqu'aux mammifères. Il semblerait que ces deux domaines déacétylase coopèrent pour que HDAC6 aient une activité déacétylase (Zhang et *al.*, 2003).

B. HDAC6 et la navette nucléo-cytoplasmique

Comme la plupart des HDACs de classe II, HDAC6 transite entre le noyau et le cytoplasme (Verdel et *al.*, 2000). Bien que HDAC6 ne se fixe pas à la protéine 14-3-3, sa localisation subcellulaire est activement régulée.

Premièrement, trois séquences NES indépendantes ont été identifiées. Ces séquences sont similaires à celles initialement décrites pour l'export nucléaire de la protéine Rev du VIH-1 et de la protéine Rex de HTLV (human T-cell leukemia virus type1), contrôlé par la protéine CRM1 (Bogerd et *al.*, 1996). Seule la séquence NES côté N-terminal est essentielle pour maintenir mHDAC6 dans le cytoplasme.

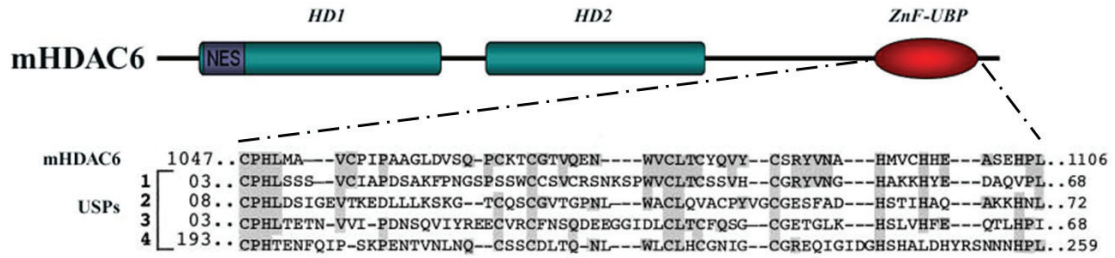


Figure II.1

Le domaine ZnF-UBP de HDAC6 murine est un domaine hautement conservé chez les USPs. Abréviations : USPs : Ubiquitin Specific Proteases; HD : domaine Histone Déacétylase; ZnF-UBP : Zinc Finger in Ubiquitin specific protease. Les USPs 1,2, 3 et 4 sont respectivement USP3 humaine (AF073344), USP20 humaine (AB023220), USP de *S.pombe* (AL021838), USP de *S.cerevisiae* (P38237). Adapté de Verdel and Khochbin, 1999.

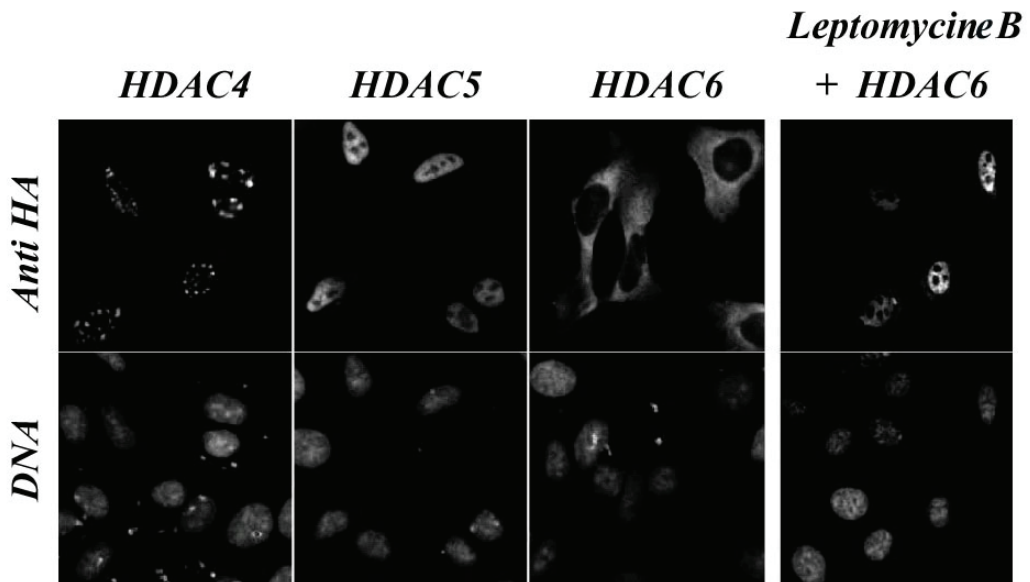


Figure II.2

HDAC6 est une HDAC majoritairement cytoplasmique. La localisation sub-cellulaire de HDAC6 murine est différente des autres HDACs. L'utilisation de leptomycine B permet en fait de constater que l'enzyme est activement expulsée du noyau (tiré de Verdel and Khochbin, 1999).

Deuxièmement, le blocage de l'activité CRM1 par la leptomycine B entraîne une redistribution et une relocalisation nucléaire de mHDAC6.

Chez la souris, en l'absence de stimulus, la majorité de mHDAC6 (HDAC6 murine) est localisée dans le cytoplasme. Pourtant, un arrêt du cycle cellulaire est associé à une translocation partielle de la protéine dans le noyau (Verdel *et al.*, 2000).

En revanche, chez l'Homme, le contrôle de la localisation subcellulaire de HDAC6 semble différent. Ainsi, contrairement à ses orthologues, hHDAC6 possède un domaine supplémentaire appelé SE14 (Bertos *et al.*, 2005). Placé entre le deuxième domaine déacétylase et le domaine ZnF-UBP, ce tetradecapeptide provoque la rétention cytoplasmique de hHDAC6, toutefois le mécanisme d'action reste encore obscur.

La localisation de HDAC6 dans la cellule est primordiale, car elle contribue directement à ses interactions avec ses substrats.

C. Substrats et partenaires de HDAC6

L'ensemble des substrats et partenaires de HDAC6 sont répertoriés dans le **tableau II.1**.

1- HDAC6 en tant que tubuline déacétylase

Les microtubules sont des structures cylindriques du cytosquelette retrouvées dans toutes les cellules eucaryotes et impliquées dans de nombreux processus cellulaires, comme la mitose, le transport vésiculaire ou d'organites et la mobilité des flagelles (Ludueno *et al.*, 1998). La sous unité structurale des microtubules est un complexe heterodimérique d'environ 100kDa, composé d' α et de β -tubuline. Les fonctions de la tubuline sont affectées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la polyglutamination, la polyglycylation, la détyrosination et l'acétylation (MacRae, 1997).

Bien que la dénomination « histone déacétylase » soit utilisée dans la nomenclature, le premier substrat physiologique découvert de HDAC6 fut l' α -tubuline et non les histones (Hubbert *et al.*, 2002).

Tableau II.1

Les partenaires de HDAC6. Interactions directes ou complexes décrits dans la littérature.

Partenaires connus de HDAC6		Citation
Facteurs associés à l'ubiquitine et chaperonnes	HSP90alpha	Kovacs et al., 2005
	PLAP	Siegnieurin-Berny et al., 2001
	VCP	Siegnieurin-Berny et al., 2001
	Ubiquitin	Burger and Seth, 2004; Pickart and Tushman, 2004.
	USP11	Bouwmeester et al., 2004
	Ataxin 3	Burnett and Pittman 2005
	LAMP 2	Iwata et al., 2005
	Atg8/LC3	Iwata et al., 2005
	TPMT*3A	Wang et al., 2005
	Die2	Descaing et al., 2005
	alpha Tubulin	Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003
	Dynein/dynactine	Kawaguchi et al., 2003; Hubbert et al., 2002
	Cytosquelette et protéines associées	Die1
EB1		Zilberman et al., 2004
Ap1		Zilberman et al., 2004
SIRT2		North et al., 2003
BRG1 associated factor1		Bouwmeester et al., 2004
KPN/A6		Bouwmeester et al., 2004
		NAD-dependent deacetylase sirtuin 2
		Actin related protein Baf53
		Importin alpha 7 subunit
		Thiopurine S-methyltransferase*3A

Tableau II.1

Les partenaires de HDAC6. Interactions directes ou complexes décrits dans la littérature.

Partenaires connus de HDAC6		Citation
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	Westendorff et al., 2002
BCOR	BCR-6 interacting corepressor isoform 1	Hayakawa et al., 2000
RANGAP1	Ras GTPase-activating protein 1	Kirsch et al., 2005; Kierstka et al., 2001; Miyashita et al., 2002
RAN	GTP-binding nuclear protein RAN	Kirsch et al., 2005; Kierstka et al., 2001; Miyashita et al., 2002
HDAC1	Histone deacetylase 1	Gao et al., 2002
BCL3	B-cell lymphoma 3-related protein	Viatorri et al., 2004
ZNF145 or PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger protein	Chakrabarti et al., 2004
RELB	Transcription factor RelB	Bowmeester et al., 2004
BCL7A	B-cell CLL/lymphoma 7A	Bowmeester et al., 2004
SWI/SNF complex 1701D subunit		Bowmeester et al., 2004
E1A associated protein p300		Grindwood et al., 2003
CREB binding protein		Grindwood et al., 2003
Rho-GTPase-activating protein 1		Liang and Lohse, 2004
MEIO-2		Amaki et al., 2001
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	Liang and Lohse, 2004
HIF1alpha	Hypoxia-inducible factor 1 alpha	Qin et al., 2006
BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1	Hu et al., 2006
CNOT-2		Jayne et al., 2006; Alberts et al., 2002
PML	Promyelocytic leukemia	Ma et al., 2005

1.1- Déacétylation de la tubuline et formation des ostéoclastes

L'os est composé de cellules et d'une matrice extracellulaire minéralisée. Il se renouvelle grâce à ses deux composants cellulaires, à savoir l'ostéoblaste qui construit la matrice osseuse et l'ostéoclaste qui la détruit.

L'ostéoclaste est une cellule hématopoïétique dérivant de la lignée monocyttaire (Boyle *et al.*, 2003). Pour permettre leur fixation au substrat ou bien leur migration, les ostéoclastes se reposent sur une structure d'adhésion particulière : le podosome. Il semble que ces structures définissent une zone de résorption de la matrice osseuse (Vaananen *et al.*, 2000). Une étude a élucidé les questions posées par la dynamique interne des podosomes lors de la différenciation ostéoclastique (Destaing *et al.*, 2005). Grâce à ces travaux, on peut constater qu'une inhibition de l'activité déacétylase de HDAC6 stabilise les podosomes par hyperacétylation du cytosquelette de tubuline. Au contraire, mDia2, un effecteur de RhoGTPase augmente l'activité déacétylase de HDAC6 et accroît la dynamique des microtubules. Ces résultats indiquent que le niveau d'acétylation des microtubules est contrôlé par HDAC6, et demeure crucial dans la fonction et la différenciation ostéoclastique.

1.2- Déacétylation de la tubuline et organisation de la synapse immunitaire

La synapse immunitaire est une jonction spécialisée entre lymphocytes T et CPAs (cellules présentatrices d'antigènes). Elle est capitale pour l'activation des cellules T (Blanchard and Hivroz, 2002). Lors de la formation d'une telle synapse, HDAC6 se concentre rapidement au niveau de la synapse immunitaire, déplacement corrélé avec une déacétylation des microtubules. Dès lors, il semblerait que HDAC6 puisse jouer un rôle dans le réarrangement de la membrane et du cytosquelette ainsi que dans la synthèse d'interleukine 2 (Serrador *et al.*, 2003).

2- HDAC6 et infection du VIH-1

La fixation du VIH-1 sur des lymphocytes T provoque une hyperacétylation de l' α -tubuline des lymphocytes T (Iyengar *et al.*, 1998 ; Jernigan *et al.*, 2000). Mécanistiquement, il semble que l'état d'acétylation de l' α -tubuline régisse la tension dynamique de la membrane plasmique, affecte le phénomène de fusion et d'infection du VIH-1 enveloppé. Des expériences d'ARN interférence ont permis de montrer que l'activité tubuline spécifique de

HDAC6 freine l'infection virale en augmentant très fortement le contact entre l' α -tubuline et la membrane plasmique, grâce à une déacétylation spécifique de l' α -tubuline (Valenzuela-Fernandez et *al.*, 2005).

3- HDAC6 et HSP90

Des études portant sur le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ont montré qu'à l'état non stimulé, ce récepteur est séquestré dans des hétéro complexes formés de HSP90, HSP70, des co-chaperonnes HSP40, P23, HOP et des immunophilines FKBP52 et Cyp40. Dès lors, le GR est maintenu dans une conformation optimale pour fixer le glucocorticoïde (Pratt, 1993). Une fois lié à son ligand, le GR est alors transloqué dans le noyau pour activer la transcription de ses gènes cibles (Rajapandi et *al.*, 2000).

Dans deux études indépendantes, HSP90 a été identifié comme étant un substrat de HDAC6 (Bali et *al.*, 2005 ; Kovacs et *al.*, 2005). Ainsi, en l'absence d'activité spécifique de HDAC6, HSP90 est hyper acétylée, phénomène abolissant son activité chaperonne. La fixation du glucocorticoïde par le GR est alors compromise. Via un contrôle de l'état d'acétylation de HSP90, HDAC6 semble donc nécessaire à l'activation transcriptionnelle des cibles de GR (Aoyagi and Archer, 2005 ; Kovacs et *al.*, 2005 ; Murphy et *al.*, 2005).

4- HDAC6 et p97/VCP

4.1- Présentation de p97/VCP

La AAA-ATPase p97/VCP est l'un des membres les plus étudiés de cette famille de protéines, comme étant présente dans de nombreux processus cellulaires. Des découvertes récentes ont néanmoins souligné son rôle de protéine « purgatoire » dans le système ubiquitine-protéasome, plus spécialement de par son rôle dans l'adressage des protéines polyubiquitinées.

p97 (aussi appelée VCP chez les mammifères et Cdc48p chez la levure *S.cerevisiae*) est un membre important des AAA-Atpases magnésium dépendantes à boucle Walker P. Elle fonctionne en tant qu'homo hexamère avec 2 cassettes AAA formant des anneaux superposés, qui couplent des cycles d'hydrolyse de l'ATP avec des changements

conformationnels de ces hexamères (Pie et al., 2006). Originellement identifiée comme une protéine requise dans l'assemblage des organelles par fusion grâce à des méthodes de biochimie, p97 a rapidement émergé comme composant biochimique et génétique dans des voies de signalisation additionnelles, incluant l'âpreté des précurseurs de facteurs de transcription, de la dégradation des protéines associée au réticulum endoplasmique (ERAD), dans la régulation du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN (Wang et al., 2004). Le rôle nécessaire et bien établi de p97 dans la rétro translocation des substrats de l'ERAD souligne fortement son impact dans l'extraction des substrats ubiquitinés et leur adressage consécutif au protéasome. Cependant, ces différents résultats contrastent avec ses rôles apparents dans la fusion membranaire des organelles, qui implique p97 dans la dé-ubiquitination des substrats plutôt que dans leur dégradation (Uchiyama and Kondo, 2005). De nombreuses études récentes ont maintenant établies un nouveau paradigme dans lequel p97 joue un rôle purgatoire (décideur) dans la régulation du niveau d'ubiquitination des substrats, qui est corrélé avec les différentes fonctions observées précédemment.

4.2- Coopérativité fonctionnelle avec les E3s ligases

p97 emploie un mécanisme bipartite dans le recrutement des substrats impliquant une reconnaissance directe des domaines mal repliés des protéines et une interaction indirecte avec les résidus d'ubiquitine (Ye et al., 2003). Une notion communément admise est que les substrats doivent être d'abord âpretés par la machinerie de conjugaison d'ubiquitine avant leur reconnaissance et leur recrutement par les adaptateurs dépendants de l'ubiquitine. Cependant, des données récentes ont montré un rôle actif de p97 dans la reconnaissance des substrats et leur présentation aux E3s ligases. Cdc48p, la protéine de levure orthologue de p97, fonctionne dans une nouvelle voie de fusion dégradation des protéines, en coordination avec son partenaire Ufd1p/Npl4p, et la E4 Ufd2p. Ces protéines forment un complexe stable qui catalyse l'extension des chaînes de poly-ubiquitine. De façon importante, la stabilité d'un tel complexe est contingent de l'assemblage simultané des composants, soulignant ainsi le fait que p97/Cdc48p pourrait médier la présentation du substrat à la machinerie d'ubiquitination des protéines (Richly et al., 2005). En corrélation, de nombreux résultats récents ont souligné l'association de p97 avec diverses E3, incluant les Protéines d'ERAD SCF^{fb1,2} ligases (Skp1p/cullin/F Box protein), et la Dorfine, une E3 ligase surexprimée en conditions neurodégénératives de type RING-IBR (Ishigaki et al., 2004 ; Yoshida et al., 2005). De façon surprenante, dans chaque cas observé, il semble nécessaire que les substrats soient accessibles à p97 pour que l'activité E3 ligase soit couplée à ces substrats.

Le mécanisme par lequel p97 participe à l'ubiquitination des substrats reste cependant à éclaircir. Le fait que l'interaction de Cdc48p avec les protéines ubiquitinées et Ufd2p soit réduite de façon concomitante chez les souches mutantes *ufd1-2* et *npl4-1*, indique que les protéines cibles doivent être recrutées par une protéine adaptatrice avant l'assemblage du complexe E3 (Richly et al., 2005). Puisque Ufd2p a un rôle inhabituel dans l'élongation des chaînes de poly-ubiquitine, il est possible que pour s'assurer la dégradation rapide des protéines, p97 couple l'étape d'extraction des protéines avec leur poly-ubiquitination. Remarquablement, Cdc48p semble restreindre l'élongation des chaînes de poly-ubiquitine dépendante de Ufd2p. Une fois poly-ubiquitinées, les substrats sont ensuite dirigés vers le système trimérique Ufd2p/Dsk2p/Rad23p qui va, à son tour, provoquer le transfert des substrats poly-ubiquitinés au protéasome (Richly et al., 2005).

4.3- Au carrefour des systèmes de sauvetage et de dégradation des protéines

De la même façon que p97 est capable d'interagir avec la machinerie de conjugaison d'ubiquitine, Cdc48p a aussi été identifié en tant que constituant de complexes qui inhibent directement l'activité E3 ou qui dé-ubiquitinent activement le substrat. De façon surprenante, Ufd2p et le motif WD-40 de la protéine Ufd3p sont en compétition pour la liaison à Cdc48p et partagent le même site d'accrochage sur son domaine C-Terminal (Rumpf and Jentsch, 2006). Conséquemment, en fonction de l'association avec le cofacteur, Cdc48p peut soit promouvoir ou inhiber l'ubiquitination d'un seul et même substrat. Il a notamment été montré qu'un excès de Ufd2p provoque la dégradation d'Ub-proline- β -galactosidase tandis qu'un excès de Ufd3p permet sa stabilisation. De plus, même en présence d'un substrat déjà ubiquitiné, Cdc48p^{Ufd1/Npl4} est capable de former un complexe de dé-ubiquitination à la fois avec Otu1p (membre de la famille Ovarian Tumor family et qui possède une activité dé-ubiquitinase), et Ufd3p. En retour, ce complexe entre en compétition avec Ufd2p pour l'apprêtement du facteur de transcription transmembranaire Spt23p impliqué dans la voie de signalisation OLE. De ce fait, en fonction de la demande métabolique, Cdc48p est capable de participer à cet apprêtement avec des conséquences opposées (ubiquitination et activation de Spt23p ou dé-ubiquitination et stabilisation du facteur de transcription sur la membrane du réticulum endoplasmique). De façon intéressante, en plus de l'activité de Cdc48p, le dénominateur commun dans ce processus est la nécessité de l'hétérodimère Ufd1p/Npl4, qui permet à Cdc48p d'interagir avec son substrat (Rumpf and Jentsch, 2006).

Ces découvertes ont établi un nouveau rôle pour p97/Cdc48p dans la régulation de la stabilité des protéines substrat et soulèvent de nombreuses questions autour de la base

biochimique de ce mécanisme. Le fait que p97 est considérablement plus abondant que ses partenaires suggèrent que l'expression, la stabilité ou la localisation de ses cofacteurs puissent être des déterminants importants de l'identité des complexes assemblés. Alternativement, p97 et ses cofacteurs pourraient être sujets à des modifications post-traductionnelles dynamiques qui déterminent l'identité des complexes assemblés au sein de localisations sub-cellulaires et en fonction de la demande métabolique. Il ne serait pas surprenant de considérer que la phosphorylation de p47 dépendante par Cdc2 au cours du cycle cellulaire régule sa localisation au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi, et puisse affecter son association avec p97 (Uchiyama and Kondo, 2005). De façon similaire, la phosphorylation AKT-dépendante de p97 régule l'interaction de p97 avec ses substrats ubiquitinés, bien qu'il ne soit pas clair si cela est dû à un effet direct sur l'interaction avec le substrat ou à l'abolition des interactions de p97 avec ses cofacteurs (Klein et al., 2005). Qui plus est, p97 pourrait aussi être considérée comme une chaperonne coordonnant la pression métabolique de synthèse ou de dégradation protéique. En fonction de l'état de repliement de la protéine, p97 semble pouvoir choisir de chaperonner la protéine substrat et la recycler ou au contraire de promouvoir son ubiquitination puis sa dégradation. En considérant que p97 intervient dans de nombreux processus cellulaires et possède des liens très forts avec la machinerie d'ubiquitination, il est logique de penser que les études de p97 vont être poursuivies à l'avenir.

5- Substrats et partenaires nucléaires de HDAC6

HDAC6 est capable de déacétyler *in vitro* un peptide acétylé de la queue N-Terminale de l'histone H4 (Verdel and Khochbin, 1999 ; Seigneurin-Berny et al., 2001), et bien que localisée majoritairement dans le cytoplasme par un mécanisme actif qui l'expulse du noyau, HDAC6 interagit aussi avec des protéines nucléaires, *in vivo*. Ainsi, des expériences de transfections transitoires ont montré que le recrutement de HDAC6 sur un promoteur réprime la transcription, ceci suggérant que la présence de HDAC6 dans le noyau aurait un impact, sur l'activité transcriptionnelle de certains gènes (Girdwood et al., 2003 ; Westendorf et al., 2002 ; Zhang et al., 2003). Comme nous allons le voir, HDAC6 possède en fait de nombreux partenaires nucléaires, bien que la majorité des études sur l'enzyme portent sur ses fonctions cytoplasmiques.

5.1. Le facteur de transcription runx2

Runx2 est un facteur de transcription impliqué dans la formation de l'os (Ogawa et *al.*, 1993 ; Westendorf and Hiebert, 1999 ; Zaidi et *al.*, 2001). Dans des lignées ostéoblastiques, HDAC6 est capable d'interagir avec Runx2. Elle est alors recrutée sur la chromatine et réprime le promoteur de p21WAF (Westendorf et *al.*, 2002).

5.2. Le co-répresseur LCoR

LCoR (ligand dependent corepressor) est un co-répresseur transcriptionnel localisé exclusivement dans le noyau, intervenant lors du développement foetal de façon HDAC dépendante. HDAC6 est capable d'interagir avec LCoR *in vitro* et *in vivo* dans des cellules MCF-7 et semble permettre une répression transcriptionnelle des cibles de LCoR (Fernandes et *al.*, 2003).

5.3. La HAT P300

Une étude de Ma et collègues a montré que l'histone acétyl transférase p300 peut recruter HDAC6 au niveau du noyau. En retour HDAC6 contrôle sa fonction HAT et réprime son activité transcriptionnelle (Ma et *al.*, 2005).

5.4. HDAC6 et sumoylation

La sumoylation est la modification covalente d'une protéine par une protéine de type ubiquitine (Ubiquitin like protein ou Ubl) nommée SUMO (Small Ubiquitin like MODifier). La sumoylation est un processus réversible permettant la régulation de divers processus cellulaires, notamment en contrôlant le transport nucléaire, l'intégrité du génome ou la transduction de signaux (Johnson, 2004).

Certains facteurs de transcription tels que c-jun, HSF1 et HSF2 (Heat Shock Factor 1 et 2) mais aussi p300 sont également des cibles pour la sumoylation (Kim et *al.*, 2002 ; Ross et *al.*, 2002). Cette modification permet de contrôler leur activité transcriptionnelle.

Comme nous l'avons vu plus haut, HDAC6 est recruté par p300, mais ce recrutement semble être finement régulé. D'après une étude de Girdwood et collègues, il semble que seul p300 modifié par SUMO-1 puisse recruter HDAC6. On passerait alors d'un système d'activation transcriptionnelle par la HAT p300 à une répression transcriptionnelle par un complexe HAT/HDAC6 (Girdwood et *al.*, 2003). Le mécanisme d'un tel recrutement reste

vraiment obscur, et le fait qu'un facteur sumoylé puisse attirer HDAC6 reste quand à lui intrigant.

D. HDAC6 et cancer

Il est bien établi que les œstrogènes jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et la progression des cancers du sein hormono-dépendants. En clinique, l'expression des récepteurs aux œstrogènes des patients atteints de cancer du sein est largement utilisée en tant que marqueur pronostique ou comme indicateur lors d'une thérapie endocrine. L'analyse par technologie de puces à ADN du profil d'expression des gènes, a été utilisée pour élucider le système de signalisation des œstrogènes dans les cellules MCF-7. Les résultats indiquent que le gène HDAC6 est un gène surexprimé à la suite d'un traitement aux œstrogènes (Hayashi et *al.*, 2003 ; Inoue et *al.*, 2002). On note par ailleurs que les ARNm de HDAC6 sont exprimés à un niveau significatif dans des petites tumeurs de patients atteints d'un cancer du sein et que les patients avec un haut niveau d'expression d'ARNm de HDAC6 ont un meilleur pronostic de survie. De ce fait le niveau d'expression des ARNm de HDAC6 est un nouvel indicateur pronostic et indicateur de bonne réaction de thérapie endocrine dans le cancer du sein (Zhang et *al.*, 2004).

E. Prise en charge des protéines ubiquitinées par HDAC6

1- HDAC6 : une déacétylase dans la voie d'ubiquitination des protéines

HDAC6 a rapidement été décrite comme une protéine capable d'interagir avec l'ubiquitine et des protéines du système ubiquitine-protéasome (Seigneurin-Berny et *al.*, 2001).

HDAC6 possède dans sa partie C-Terminale un domaine d'interaction avec l'ubiquitine. Ce domaine est très conservé chez certaines USPs (Ubiquitin Specific Protease). Néanmoins, chez HDAC6, il ne possède pas d'activité enzymatique de type isopeptidasique (Seigneurin-Berny et *al.*, 2001, **Figure II.1**). La présence de nombreuses cystéines et histidines dans ce domaine de liaison à l'ubiquitine, suggère qu'il pourrait s'agir d'un domaine à doigt de zinc. Parmi les différents noms attribués à ce motif dans la littérature

(DAUP pour deacetylase ubiquitin specific protease - Amerik et *al.*, 2000 ; HUB pour HDAC6, USP3, BRCA1 related - Bertos et *al.*, 2001 ; PAZ pour polyubiquitin associated zinc finger - Hook et *al.*, 2002 ; BUZ pour bound to ubiquitin zinc finger - Hubbert et *al.*, 2002 ; Kawaguchi et *al.*, 2003), nous retiendrons celui de ZnF-UBP (zinc finger in ubiquitin specific proteases – Seigneurin-Berny et *al.*, 2001), dans la suite de ce manuscrit..

Il ne semble pas que l'interaction avec l'ubiquitine ait une quelconque conséquence sur l'activité déacétylase de HDAC6 (Seigneurin-Berny et *al.*, 2001). Il est notable que chez *A.thaliana* et *D.melanogaster*, HDAC6 ne possède pas de domaine ZnF-UBP. Plus intrigant encore reste que *C.elegans* possède 2 isoformes de HDAC6, avec ou sans ZnF-UBP (Gilquin and Khochbin, données non publiées).

HDAC6 peut être ubiquitinée *in vitro* et *in vivo* mais cette protéine ne semble pas être la cible d'une dégradation par le protéasome (Hook et *al.*, 2002).

Dans les testicules, où son expression protéique est la plus forte, HDAC6 forme un complexe avec VCP (valosin containing protein) et PLAP (pour phospholipase A2-activating protein). Ces protéines, orthologues de Cdc48 et UFD3 de *S.cerevisiae* sont des acteurs de la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine pour la première (Ghislain et *al.*, 1996) et de la régulation de la concentration d'ubiquitine libre pour la seconde (Johnson et *al.*, 1995). De façon intéressante, le complexe HDAC6-VCP est dissocié après fixation de l'ubiquitine par HDAC6, suggérant que cette dernière intervient dans des voies de régulation de l'ubiquitine. Cependant, la conséquence de cette libération n'est pas claire et reste à définir (Seigneurin-Berny et *al.*, 2001).

2- HDAC6 relie le réseau microtubulaire aux protéines poly-ubiquitinées

L'accumulation d'agrégats protéiques dans les corps d'inclusions cellulaires est un trait pathologique commun à de nombreuses maladies neurodégénératives (Taylor et *al.*, 2002). La formation de telles structures pourrait faire partie d'une réponse cytoprotectrice servant à séquestrer et à faciliter l'élimination d'agrégats protéiques toxiques pour la cellule (Kopito, 2000 ; Taylor et *al.*, 2002). Une hypothèse émise par Ron Kopito, suggère que les corps d'inclusions dans les cellules eucaryotes seraient formés par la déposition d'agrégats de protéines mal repliées dans des structures péricentriolaires, appelées agrésomes. Dans ce

modèle, les agrégats de protéines seraient transportés de façon rétrograde le long des microtubules (Kopito, 2000).

Expérimentalement, les agrésomes sont formés en réponse à l'inhibition du protéasome, principal mécanisme connu pour éliminer les protéines mal repliées avant leur agrégation. Les agrésomes sont des structures riches en chaperonnes moléculaires, en composés généralement polyubiquitinés et en protéasome. Ces structures sont enserrées dans des cages de vimentine (Kopito, 2000).

Les travaux de Kawaguchi et Wang et collègues ont permis de montrer que HDAC6 a un rôle crucial dans la formation de ces agrésomes. Lors d'un traitement provoquant la formation des agrésomes, HDAC6 agirait en tant qu'adaptateur capable de fixer simultanément le moteur rétrograde dynéine/dynactine grâce à ses domaines déacétylases, et les chaînes poly-ubiquitinées des protéines mal repliées via son domaine ZnF-UBP. HDAC6 permettrait alors le trafic rétrograde des protéines poly-ubiquitinées mal repliées, vers le centre d'organisation des microtubules (MTOC) et favoriserait donc la formation d'agrésomes (Kawaguchi et *al.*, 2003 ; Wang et *al.*, 2005).

Chapitre III
Le système ubiquitine-protéasome

Chapitre III : Le système ubiquitine-protéasome

A. Présentation du système d'ubiquitination des protéines

Dans la cellule, le système ubiquitine-protéasome permet la dégradation de la plupart des protéines. Néanmoins, certaines protéines échappent à cette règle, et n'ont pas toujours besoin d'être modifiées par ubiquitination pour être dégradées, ce qui ajoute à la complexité du système. C'est notamment le cas de c-fos (Acquaviva et *al.*, 2002 ; Bossis et *al.*, 2003 ; Ferrara et *al.*, 2003).

Le système ubiquitine-protéasome est vital dans la cellule, eut égard aux nombreux phénomènes qu'il module. Ce système tient aussi une place prépondérante dans le développement de cancer, des maladies neurodégénératives, ou lors d'infections virales. Certains auteurs en font donc une cible thérapeutique de choix pour combattre ces pathologies (Farras et *al.*, 2005).

Le rôle de l'ubiquitine dans la dégradation des protéines ainsi que les principales réactions enzymatiques qui gouvernent ce système, ont été mis en évidence grâce à des approches de biochimie, dans des systèmes acellulaires reconstitués à partir de réticulocytes (Hershko et *al.*, 1996). Dans ce système, une cascade enzymatique permet de lier covalamment une protéine de 76 acides aminés, à la protéine cible. Cette protéine peut alors être dégradée par le protéasome (Hershko and Ciechanover, 1992 ; Ciechanover et *al.*, 1994 ; Hershko, 1998). Nous allons en décrire brièvement les étapes biochimiques (**Figure III.1**).

La conjugaison de l'ubiquitine à une protéine requiert l'action séquentielle de 3 enzymes. La Glycine C-Terminale de l'ubiquitine est activée de façon ATP-dépendante par une enzyme d'activation spécifique, E1. Un intermédiaire ubiquitine adénylate est ensuite formé, avec re-largage de P_{Pi}. Une liaison thiol ester est établie entre l'ubiquitine et un résidu Cystéine de la E1, avec re-largage d'AMP. L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur le site actif d'une E2 (ubiquitin carrier protein). Dans la troisième étape catalysée par une enzyme E3 (ubiquitin protein ligase), l'ubiquitine est liée par sa partie C-Terminale au groupement ϵ -amine de la lysine de la protéine cible. La liaison est de type amide isopeptide (**Figure III.1**).

En règle générale, il n'existe qu'une seule E1 mais de nombreuses espèces de E2 et de nombreuses familles de E3 ou de complexes E3. Les E3s sont spécifiques d'un ou plusieurs

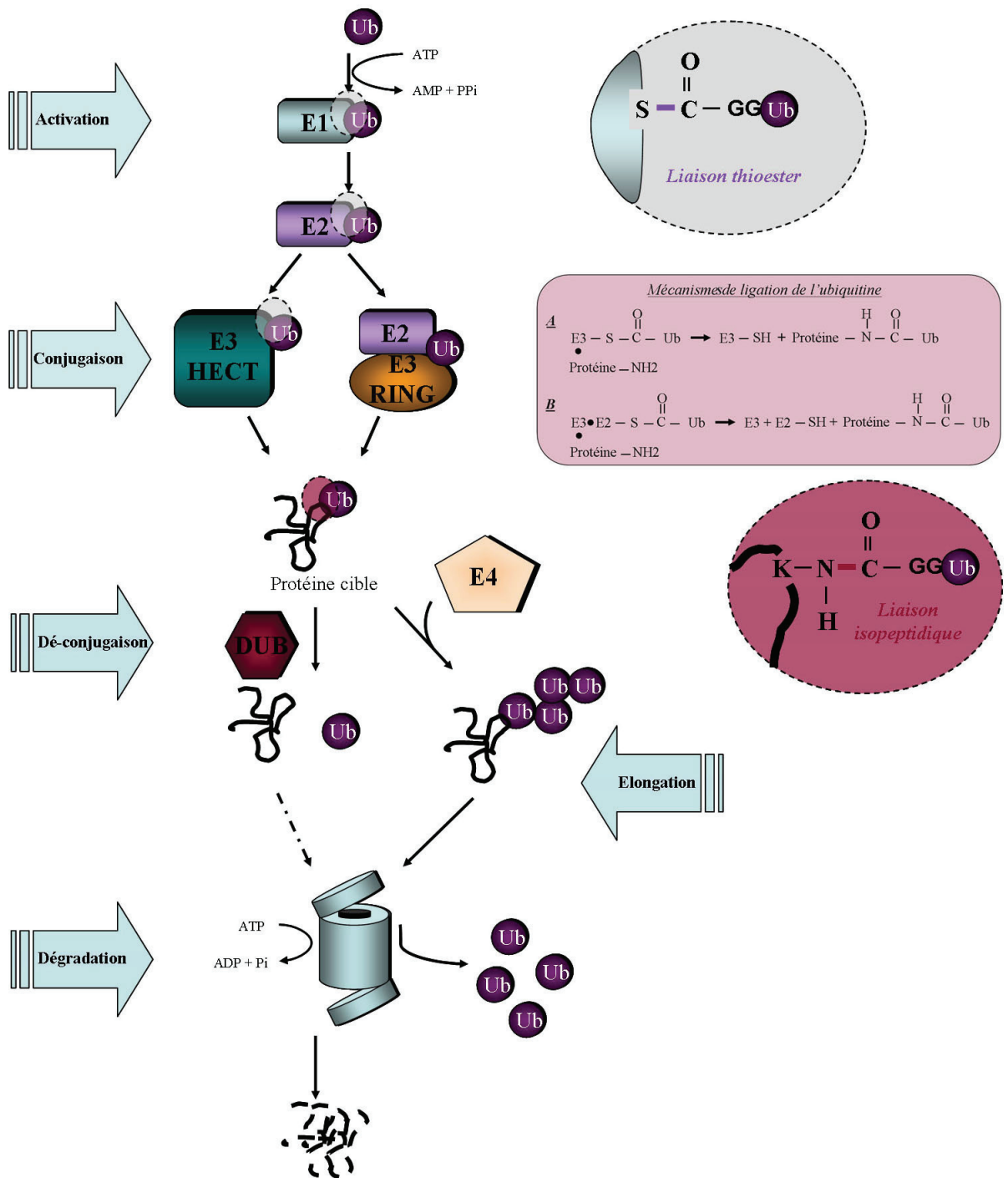


Figure III.1
Présentation du système Ubiquitine-Protéasome. Les explications sont reportées sur la page suivante.

Figure III.1

Présentation du système Ubiquitine-Protéasome. Une enzyme E1 permet l'activation de l'ubiquitine par un mécanisme ATP-dépendant, au cours duquel la E1 se lie à l'ubiquitine grâce à une liaison thioester avant de la transmettre à une E2 puis à une E3 spécifique de la protéine cible. Dans le cas des E2s, ou des E3 à domaine HECT, la liaison à l'ubiquitine est, là encore, covalente, médiée par une liaison thioester. En revanche, les E3s à domaine RING interagissent avec l'ubiquitine de façon non covalente. Dans tous les cas, les E3s conjuguent l'ubiquitine à une protéine cible sur un résidu lysine (voir encart pour les mécanismes proposés; Hershko and Ciechanover, 1998). La liaison créée est alors de type isopeptidique, engageant le motif C-Terminal di-glycine de l'ubiquitine.

Les DUBs peuvent dé-ubiquitiner les protéines ciblées par l'ubiquitination. Au contraire, une enzyme E4 peut allonger la chaîne de poly-ubiquitine sur le substrat, en liant les résidus di-glycine d'une seconde ubiquitine sur un résidu lysine de l'ubiquitine précédemment conjuguée à la protéine cible. Le protéasome 26S est capable de reconnaître de telles protéines poly-ubiquitinées, de les déplier par un mécanisme ATP-dépendant, et des les dégrader en peptides. Les DUBs associées au protéasome provoquent la dé-ubiquitination des protéines cibles au cours de leur dégradation, permettant alors le recyclage de l'ubiquitine.

Certains facteurs, comme Rad23p et Dsk2p recrutent et délivrent les protéines poly-ubiquitinées au protéasome 26S afin d'augmenter la prise en charge de ses substrats. Cependant, il est notable que certaines protéines n'aient pas besoin d'être ubiquitinées pour être reconnues et dégradées par le protéasome.

Abréviations : Ub : ubiquitine; E1: enzyme d'activation de l'ubiquitine; E2 : enzyme porteuse de l'ubiquitine; E3 : enzyme de ligation de l'ubiquitine à domaine HECT ou à domaine RING; E4 : enzyme d'élongation des chaînes de poly-ubiquitine; DUB : enzyme de dé-ubiquitination des protéines; RING : Really Interesting New Gene; HECT : Homologous to E6AP carboxyl terminus.

substrats à ubiquitiner. Ceci est dû à la présence de signaux de reconnaissance spécifiques sur les protéines cibles, reconnus par les E3s (voir plus bas). Différents types de E3s peuvent transférer l'ubiquitine sur la protéine substrat par deux mécanismes différents. Dans certains cas, comme dans le cas des membres de la famille de E3 à domaine HECT, l'ubiquitine est d'abord transférée à partir d'une E2 appropriée sur une cystéine d'un site actif de l'enzyme E3. Ce conjugué E3-ubiquitine thiol ester est donneur pour la formation d'une liaison amide sur la protéine substrat. Dans d'autres familles de E3, la formation d'un conjugué E3-ubiquitine thiol ester ne peut pas être démontrée. Dans ce cas, puisque la E3 est liée à la fois à la E2 et au substrat, l'ubiquitine est transférée directement de la E2 sur la protéine substrat (Cf. encart « mécanismes proposés », **Figure III.1**). Il semblerait que cela soit le cas de Hdm2 (Double minute 2), une E3 à domaine RING qui provoque l'ubiquitination de Tat (protéine transactivatrice du HIV-1 ; Bres et *al.*, 2003).

Enfin, après liaison de la première ubiquitine sur la protéine substrat, une chaîne de poly-ubiquitine peut être formée, dans laquelle la partie C-Terminale de chaque ubiquitine est liée à un résidu lysine spécifique de l'ubiquitine précédente, avec intervention ou non d'une E4 (enzyme d'élongation des chaînes de poly-ubiquitine).

Les protéines marquées par des chaînes de poly-ubiquitine sont généralement dégradées par le complexe protéasome 26S (Coux et *al.*, 1996). Ce dernier requiert l'hydrolyse de l'ATP pour déplier la protéine substrat à dégrader.

Le protéasome 26S est formé lors de l'assemblage ATP dépendant du protéasome 20S (contenant les sites catalytiques de la protéase) avec un complexe de régulation 19S (Coux et *al.*, 1996). Le détail de son fonctionnement sera présenté plus loin.

L'activité du protéasome 26S génère plusieurs types de produits : des peptides libres, des petits peptides toujours liés à l'ubiquitine par leur résidu lysine, et des chaînes poly-ubiquitine. Les deux derniers produits sont convertis en ubiquitines libres et ré-utilisables par l'action des hydrolases spécifiques de la partie C-Terminale de l'ubiquitine ou isopeptidases. Certaines isopeptidases peuvent aussi désassembler les conjugués ubiquitine-protéine et donc prévenir leur protéolyse par le protéasome 26S. Ce dernier type d'activité des isopeptidases pourrait être une fonction de correction pour préserver les protéines malencontreusement ubiquitinées, ou alors une fonction régulatrice de l'ubiquitination. Les petits peptides formés par les processus décrit plus haut peuvent être dégradés en acides aminés par des peptidases cytosoliques (**Figure III.1**).

B. Les enzymes de ligation d'ubiquitine

1- Les enzymes de type E2

Un grand nombre de E2s (appelées aussi enzymes de conjugaison de l'ubiquitine ou Ubc) a été identifié. Dans le génome relativement petit de *S.cerevisiae*, 13 gènes codent pour des protéines de type E2 (Hochstrasser, 1996). Chez les eucaryotes supérieurs, il en existe beaucoup plus (Pickart et al., 2004). Certaines E2s ont des fonctions similaires, tandis que d'autres ont des rôles plus spécifiques. Par exemple, chez *S.cerevisiae*, Ubc2/Rad6 est requise pour la réparation de l'ADN et la protéolyse de certains substrats répondant à la loi « N-end rule ». En revanche, Ubc3/Cdc34 est requise lors de la transition de la phase G1 à la phase S au cours du cycle cellulaire, tandis que Ubc4 et 5 sont nécessaires à la dégradation de nombreuses protéines mal repliées ou de protéines à durée de vie courte (Hochstrasser, 1996 ; Jentsch, 1998). D'une manière générale, il semble que les fonctions spécifiques de certaines E2s soient le résultat de leurs associations avec des E3s spécifiques d'une protéine substrat. Enfin, l'astringence des interactions E2-E3 dépend de l'identité des enzymes E2 et E3.

2- Les enzymes de type E3

Bien que les E3 aient des rôles centraux dans la détermination de la sélectivité des substrats de la voie ubiquitine-protéasome, notre connaissance de ces enzymes reste limitée. La difficulté de l'identification de nouvelles E3 est due, en partie, au manque d'identité de séquences entre les différents types de E3s, exception faite des similarités de séquence entre membres d'une même famille de E3. Qui plus est, certaines E3s sont associées avec de gros complexes protéiques, dont on ignore quelles sous unités sont responsables de leur activité ubiquitine ligase.

Les enzymes de type E3 interagissent, directement ou indirectement, avec une protéine substrat spécifique. Elles favorisent le transfert direct ou indirect de l'ubiquitine, à partir d'un intermédiaire thiol ester, sur des protéines ou des chaînes de poly-ubiquitine. La liaison résultante est de type amide. La littérature décrit 4 types de E3s.

Tout d'abord, les E3s de type E3 α (orthologue de Ubr1p chez *S.cerevisiae*), la E3 principale de la voie d'ubiquitination N-terminale (Bachmair et al., 1986 ; Varshavsky, 1986 ;

Varshavsky, 1997 ; Varshavsky, 2003) qui reste une des E3s les mieux caractérisées (Hershko and Ciechanover, 1992).

Une seconde famille de E3 est la famille des E3s à domaine HECT (Homologue à la partie C-Terminale de E6-AP). Le premier membre de cette famille, E6-AP (E6 associated protein) est requise, avec l'oncoprotéine E6 de papillomavirus, pour l'ubiquitination et la dégradation de p53 dans les lysats de réticulocytes (Scheffner *et al.*, 1993). Contrairement à E3a, E6-AP n'interagit pas directement avec p53 mais indirectement via E6, qui se lie à la fois à p53 et à E6-AP.

Une troisième famille de E3 a des homologies de séquence avec un complexe de haut poids moléculaire, appelé le cyclosome (Sudakin *et al.*, 1995) ou APC (anaphase promoting complex – King *et al.*, 1995 ; Peters, 2006). Cette famille particulière de E3s possède une activité ubiquitine ligase spécifique des régulateurs du cycle cellulaire qui contiennent un motif dégénéré de 9 acides aminés ou boîte de destruction (voir plus loin).

Enfin, une dernière famille de E3 est désignée sous le terme de PULCs (phosphoprotein-ubiquitin ligase complexes – Hershko et Ciechanover, 1998). Les E3s de cette famille sont composées de plusieurs sous unités. Elles sont impliquées dans la dégradation de certains régulateurs du cycle cellulaire, comme l'inhibiteur de Cdk Sic1p ou la cycline de phase G1 : Cln2p. Dans ces cas, la phosphorylation du substrat le convertit en une forme susceptible d'être modifiée par le complexe E3.

3- Les enzymes de type E4

3.1- Ufd2, élément fondateur de la famille d'enzyme de type E4

Les enzymes de type E4 constituent un quatrième groupe d'enzyme. Le représentant type est Ufd2 de levure, caractérisé pour reconnaître de courtes chaînes d'ubiquitine et catalyser leur extension. Ce représentant a été découvert dans le laboratoire de Stefan Jentsch (Koegl *et al.*, 1999). Des travaux complémentaires, dont ceux de Michaël Richly (Kim *et al.*, 2004, Richly *et al.*, 2005) ont montré que Ufd2 interagit avec Cdc48 (orthologue de p97/VCP de levure) pour effectuer son travail d'élongation des chaînes de poly-ubiquitine. Il semblerait que Ufd1 et Npl4, deux cofacteurs de Cdc48 soient nécessaires à ce processus. Qui plus est, Ufd2 interagit avec Rad23, un facteur délivrant les protéines poly-ubiquitinées au protéasome. De ce fait, Ufd2, favoriserait la prise en charge des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome (Richly *et al.*, 2005).

3.2- Les autres familles de E4s

Par la suite, les travaux sur les E4s mirent en évidence 2 autres types de E4 : de type U-box ou non. Seules ou complexées à des E3s, ces E4s ont toutes en commun la possibilité de catalyser l'élongation des chaînes d'ubiquitine sur un substrat reconnu par la E3 ligase (Hoppe, 2005).

C. Signaux d'ubiquitination et de dégradation dans les protéines

La découverte que la majorité des protéines à temps de vie court, sont dégradées par le système ubiquitine/protéasome, soulève la question de la spécificité d'un tel phénomène (Ciechanover et al., 1984). Se pourrait-il que les substrats partagent un déterminant commun de reconnaissance ? A priori ceci n'était pas possible. L'existence de nombreuses E3s résout, en principe, ce problème. Cependant, elle ne réussit pas à expliquer comment la reconnaissance sélective est opérée. La compréhension des interactions E3/substrat a donc été un but majeur depuis le début des années 1990.

Comme nous l'avons vu, la première E3 à avoir été caractérisée est appelée E3 α . Il semblait que cette enzyme nécessite la présence d'un groupement α -amine libre (Hershko et al., 1984). En 1986, des études de Varshavsky et collaborateurs chez la levure, ont mis en évidence une relation étroite entre l'identité de l'acide aminé en position N-Terminale d'un substrat et sa stabilité. Cette relation a été appelée « N-End Rule » (Bachmair et al., 1986). Les recherches qui s'en suivirent, permirent d'incriminer aussi la E3 ligase de levure Ubr1. Cette E3 est en fait capable de reconnaître ce déterminant. Un tel déterminant, qui avec un résidu lysine sujet à l'ubiquitination, a été appelé N-dégron (Varshavsky et al., 1997). Ces études ont permis de définir le terme dégron (élément nécessaire et suffisant à la dégradation d'un substrat) et d'établir l'organisation modulaire s'appliquant à toutes les E3s. Bine que controversée, la loi du résidu N-Terminal est biologiquement très importante, notamment dans le développement cardio-vasculaire de la souris (Kwon et al., 2002).

De nouveaux dégrons sont découverts régulièrement. Dans un exemple très intéressant, la spécificité d'une sous unité d'un complexe E3 SCF cytosolique reconnaît les oligosaccharides de mannose branchés de façon N sur les substrats (Yoshida et al., 2002). Si on considère que les protéines ne peuvent acquérir ces sucres que dans la lumière du

réticulum endoplasmique, avoir un glycanes composant son dégron est une façon intelligente pour détruire une fraction des protéines provenant de cette organelle.

Nous ne comprenons toujours pas le seul exemple de ciblage sélectif découvert en 1984, celui des protéines mal repliées. Certaines E3s reconnaissent directement les surfaces hydrophobes exposées des substrats (Johnson et al., 1998), tandis que d'autres E3s nécessitent la présence de chaperonnes afin d'apporter plus de spécificité (Cyr et al., 2002). A ce jour, de nombreuses études suggèrent que l'élimination incomplète des protéines mal repliées par le système ubiquitine/protéasome pourrait être un élément aggravant de certains désordres neuro-dégénératifs comme dans le cas des maladies de Parkinson et de Huntington (Berke and Paulson, 2003 ; Giasson and Lee, 2003).

L'étude de la reconnaissance des dégrons sur des substrats physiologiques, a révélé un niveau complexe de régulation. Parmi de nombreux mécanismes, les interactions dégron/E3 peuvent ainsi être modulées par des modifications post traductionnelles. Ces mécanismes permettent de relier l'ubiquitination à d'autres événements cellulaires (Deshaies, 1999 ; Deshaies and Ferrell, 2001 ; Laney and Hoschstrasser, 1999 ; Peters, 2002) (**voir figure III.2**).

Un de ces mécanismes est opéré par la CDK. La phosphorylation par CDK provoque la protéolyse des régulateurs de CDK, à un moment approprié du cycle (Deshaies and Ferrell, 2001 ; Peters, 2002 ; Murray, 2004). Afin de remettre ceci dans un contexte historique, nous allons nous intéresser à quelques jalons déjà décrits par Avram Hershko (Hershko, 1996). Il a déjà été observé que de nombreuses protéines rapidement dégradées contiennent des éléments PEST. Ces régions sont riches en Pro, Glu, Ser et Thr (Dragnev et al., 2001 ; Rogers et al., 1986 ; Rechsteiner et Rogers, 1996). Des phosphorylations multiples à l'intérieur des éléments PEST sont requis pour l'ubiquitination et la dégradation des cyclines de la phase G1 chez la levure, Cln3 et Cln2 (Yaglom et al., 1995 ; Lanker et al., 1996), ou encore l'activateur transcriptionnel Gcn4. D'autres protéines, comme les régulateurs de la phase G1 chez les mammifères, les cyclines E et D1, sont ciblées pour ubiquitination après phosphorylation de sites ponctuels et spécifiques (Won et al., 1996). Dans le cas de I κ B α , inhibiteur du régulateur transcriptionnel NF κ B, la phosphorylation de 2 sites spécifiques, Ser32 et 36, est requise pour son ubiquitination. De façon intéressante, la β -caténine, ciblée également pour la dégradation médiée par l'ubiquitine après phosphorylation, possède une séquence similaire à celui de I κ B α autour de ses sites de phosphorylation (Aberle et al., 1997).

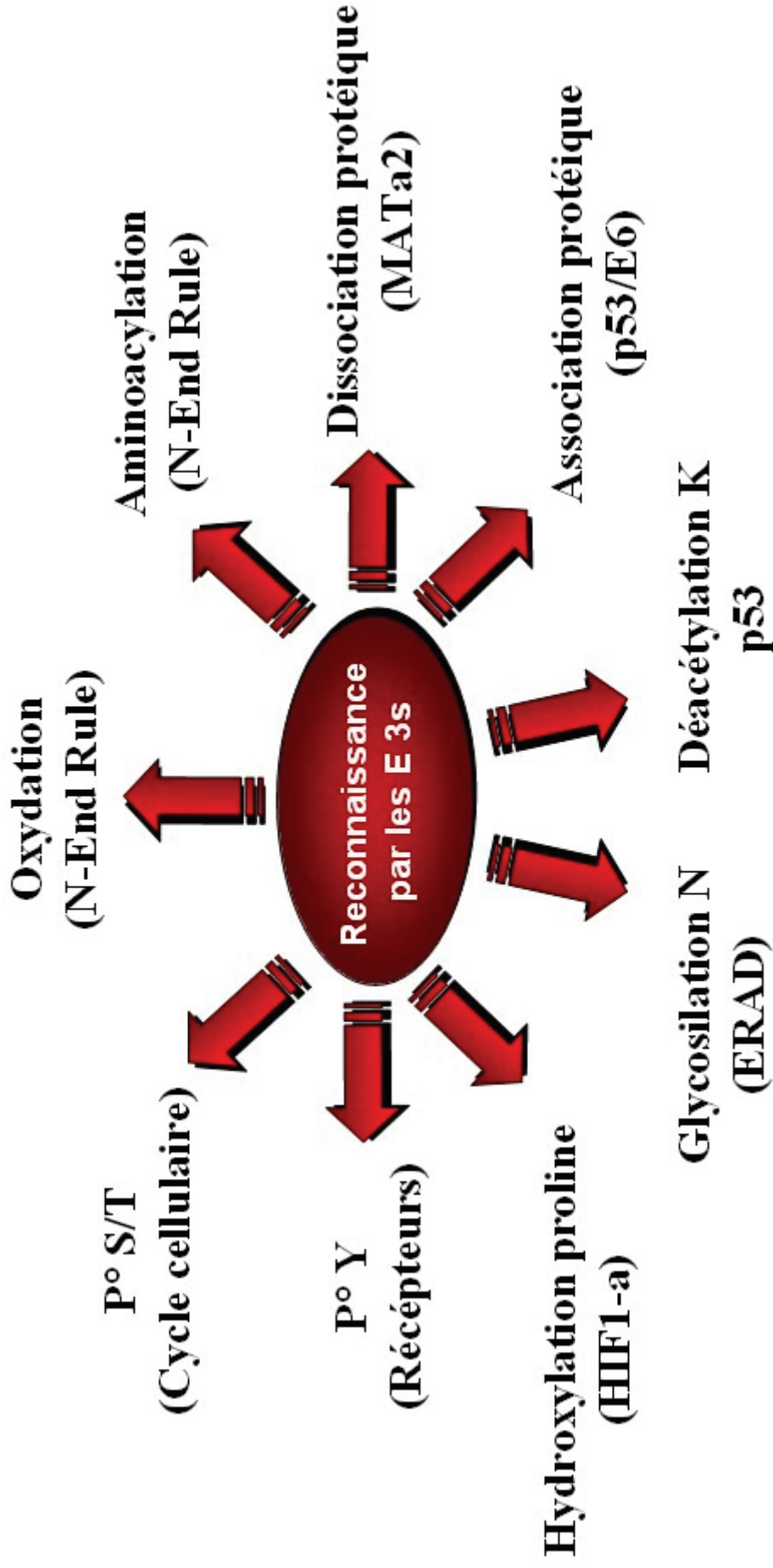


Figure III.2

Modulation de la reconnaissance des substrats par les E3s. Les modifications post traductionnelles ainsi que les mécanismes régulant la reconnaissance des substrats par différentes E3s sont résumés. Pour la phosphorylation, voir Deshaies, 1999; Jackson et al., 2000; Joazeiro and Weissman, 2000; Murray, 2004; pour la déacétylation, voir Brooks and Gu, 2003; pour l' aminoacylation, voir Kwon et al., 2002; Varshavsky, 1997; pour l'oxydation, voir Kwon et al., 2002.

Un autre exemple est celui de l'hydroxylation dépendante de l'oxygène d'un résidu proline de HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α). Cette hydroxylation provoque la reconnaissance de HIF-1 α par VHL, et sa dégradation (Von Hippel Lindau, une E3 de type culline).

D. Dégradation des protéines poly-ubiquitinées

A ce jour, 3 types de dégradation des protéines sont connus : la dégradation lysosomale, la dégradation par autophagie, et la dégradation par le protéasome. La dégradation des protéines par le protéasome concerne la majeure partie des protéines cellulaire, nous allons donc développer ce sujet.

1- Dégradation par le protéasome 26S

Le protéasome 26S est l'assemblage du protéasome 20S (partie catalytique) et du protéasome 19S (partie régulatrice contenant l'activité ATPase). La structure et les fonctions du protéasome 20S et 26S ont fait l'objet d'investigations intensives (Coux et *al.*, 1996 ; Coux, 2003 ; Davy et *al.*, 2001 ; Glickman et *al.*, 1999 ; Wilkinson, 1995a ; Hochstrasser et *al.*, 1996 ; Baumeister et *al.*, 1997 ; Hilt et *al.*, 1996 ; Rubin et *al.*, 1995 ; Stock et *al.*, 1996, Pickart and vanDemark, 2000).

Le protéasome 19S est en fait formé de deux sous complexes. Tout d'abord, les sous complexes de la base, responsables du contact avec le protéasome 20S, capable de déplier les substrats grâce à son activité ATPase. D'autre part, les sous complexes du couvercle, qui sont responsables de l'interaction du protéasome avec les protéines poly-ubiquitinées. Le travail de Michaël Glickman et collègues, a montré que ce sous complexe présente de fortes homologies de séquence avec le complexe COP9/signalosome et eIF3 (Constitutive Photomorphogenic 9 et Eukaryotic translation initiation factor 3 - Glickman et *al.*, 1998)

Le protéasome 20S est composé de 14 paires de sous unités protéiques, 7 sous unités α différentes et 7 sous unités différentes β organisées en $\alpha_{1-7}\beta_{1-7}\beta_{1-7}\alpha_{1-7}$. Ces observations sont aussi bien corroborées de façons indépendantes par des analyses génétiques (Arendt et *al.*, 1997), que par immuno-microscopie électronique et pontage chimique de sous unités adjacentes (Kopp et *al.*, 1997). La structure obtenue par diffraction des rayons X a aussi

montré que les chaînes α , bien que catalytiquement inactives, jouent un rôle essentiel dans la stabilisation de la structure des deux anneaux de chaînes β (Groll et *al.*, 1997). Elles jouent aussi certainement un rôle dans l'association avec les complexes régulateur 19S. De plus, il est notable que l'entrée des protéines dans le 20S n'est seulement possible qu'après association du 20S avec cette particule régulatrice 19S. Ces ouvertures de chaque côté du 20S conduisent directement aux sites actifs à thréonine. Elles sont constituées de résidus polaires qui peuvent potentiellement se réarranger en ouvertures de 10 Angström environ, par lequel les substrats dépliés peuvent entrer.

La reconnaissance du substrat par le protéasome 26S est médiée par l'interaction de sous unités spécifiques du complexe régulateur 19S avec les chaînes de poly-ubiquitine. A ce jour, de telles sous unités ont été découvertes chez l'Homme et les Plantes (respectivement S5A/RPN10 – Deveraux et *al.*, 1994 ; MBP1 – van Nocker et *al.*, 1996a et 1996b). De plus, des facteurs de transit prenant en charge les protéines poly-ubiquitinées pour les amener au protéasome ont été découverts. Ces protéines, telles que Rad23, dsk2 ou ddi1 tire avantage de leur domaine de liaison aux chaînes poly-ubiquitine (UBA pour ubiquitin associated domain) et de leur domaine mimétique de l'ubiquitine (Ubl Ubiquitin like domain). Ce dernier leur permet de se lier au protéasome. On notera aussi qu'il a déjà été rapporté que le protéasome puisse reconnaître des substrats non polyubiquitinés (Murakami et *al.*, 1992).

Des inhibiteurs spécifiques du protéasome ont permis d'explorer la fonction et la structure du protéasome et d'incriminer la voie ubiquitine-protéasome dans la dégradation de protéines données. Initialement, ces inhibiteurs étaient des dérivés d'inhibiteur de calpaïne I [N-acetyl-Leu-Leu-norleucinal (ALLN)] et II (N-acetyl-Leu-Leu-methioninal (ALLM)]. Ces inhibiteurs bloquent la dégradation de la plupart des protéines dans la cellule (Rock et *al.*, 1994). Ils modifient de façon covalente et irréversiblement la thréonine dans les sous unités β repliées actives. Contrairement à ces deux inhibiteurs, la lactacystine, un métabolite de *Streptomyces*, est un inhibiteur spécifique du protéasome (Fenteany et *al.*, 1995). Il modifie covalamment les résidus thréonine et inhibe très fortement l'activité trypsine et chymotrypsine du complexe.

Table 1. Mammalian DUBs and Their Reported Functions

Name	Substrate(s)	Process	Remarks	References
UCHs				
UCH-L1	Unknown	Parkinson's disease	Homodimer has E3 activity; mutant mice display ataxia	Leroy et al. (1998); Liu et al. (2002); Saigoh et al. (1999)
BAP1	Unknown	Unknown	Binds to BRCA1	Jensen et al. (1998)
UCH-L5	Unknown	Ubiquitin editing, TGF- β signaling?	Binds to proteasome	Lam et al. (1997); Wicks et al. (2005)
USPs				
CYLD	TRAF2/6, NEMO	NF- κ B and JNK signaling	Familial tumor suppressor (cylindromatosis)	Brummelkamp et al. (2003); Kovalenko et al. (2003); Trompouki et al. (2003); Reiley et al. (2004)
USP1	FANCD2	DNA repair		Nijman et al. (2005)
USP2	Fatty acid synthase	Androgen signaling	Circadian-regulated	Graner et al. (2004); Oishi et al. (2003)
USP4	Unknown	Unknown	Transforming activity	Gupta et al. (1994)
USP5	Unknown	Unknown	Binds K29 chains, binds ISG15 and Ub	Hemelaar et al. (2004); Russell and Wilkinson (2004)
USP6	Unknown	Putative oncogene, actin remodeling	Transforming activity; rearrangements and fusions found in cancer	Masuda-Robens et al. (2003); Oliveira et al. (2005); Paulding et al. (2003)
USP7	HDM2, p53, H2B	p53 signaling, Polycomb silencing	Binds herpes virus protein Vmw110	Cummins et al. (2004); Everett et al. (1997); Li et al. (2004); van der Knaap et al. (2005)
USP8	NRDP1	Endocytosis	Oncogenic fusion with p85-PI3K	Janssen et al. (1998); Kato et al. (2000); Wu et al. (2004)
USP9X	β -catenin, epsins, AF-6	Wnt-, Notch signaling, endocytosis		Murray et al. (2004); Overstreet et al. (2004)
USP9Y	Unknown	Spermatogenesis	Mutants associated with azoospermia	Sun et al. (1999)
USP11	BRCA2	DNA repair?	Interacts with RanBPM	Ideguchi et al. (2002); Schoenfeld et al. (2004)
USP14	Unknown	Synapse function	Mutant mice develop ataxia; binds to proteasome	Borodovsky et al. (2001); Wilson et al. (2002)
USP15	RBX1	COP9 signalosome		Heffeld et al. (2005)
USP16	H2A?	Chromosome condensation?		Mimnaugh et al. (2001)
USP18	Unknown	JAK-STAT signaling, immunity, brain function	ISG15-specific; mRNA is induced by IFN- α and IFN- β	Malakhova et al. (2003); Ritchie et al. (2004); Ritchie et al. (2002)
USP20	DIO2?	Thyroid hormone metabolism, hypoxia signaling	Interacts with pVHL	Curcio-Morelli et al. (2003); Li et al. (2002b)
USP21	Unknown	Unknown	Cleaves Ub and NEDD8 but not SUMO	Gong et al. (2000)
USP26	Unknown	Spermatogenesis	mUsp26 is testis specific	Paduch et al. (2005); Stouffs et al. (2005); Wang et al. (2001)
USP33	HIF1- α DIO2?	Hypoxia signaling	Interacts with pVHL	Curcio-Morelli et al. (2003); Li et al. (2002b); Li et al. (2005)

E- Isopeptidases et UCHs

1- La super famille des DUBs (DeUBiquitinating enzymes)

Le sujet des hydrolases spécifiques de la partie C-Terminale de l'ubiquitine (UCHs) et des protéases spécifiques de l'ubiquitine (UBPs) (appelées aussi isopeptidases et enzymes de dé-ubiquitination) a fait l'objet de très longues investigations (Wilkinson, 1995 ; Hochstrasser et *al.*, 1996 ; Amerik et Hochstrasser, 2004 ; Nijman et *al.*, 2005a et 2005b). On peut regrouper ces enzymes dans la super famille des dé-ubiquitinases, qui compte à l'heure actuelle 5 types de sous-classes de (Amerik and Hochstrasser, 2004 ; Nijman et *al.*, 2005a, **Tableau III.1**) :

- les UCHs (Ubiquitin Carboxy terminal Hydrolases),
- les USPs (Ubiquitin Specific Proteases),
- les MJDs (Machado-Joseph Disease protein domain protease),
- les OTUs (Ovarian Tumor proteases),
- les JAMM.

2- Le rôle des DUBs

Chez l'homme, une étude de Nijman et collègues (Nijman et *al.*, 2005a) a dénombré 95 dé-ubiquitinases dans cette superfamille. Ce grand nombre d'hydrolases suggère que certaines d'entre elles pourraient avoir des fonctions bien spécifiques, comme la reconnaissance de différents types de conjugués protéine-ubiquitine. Ainsi, l'isopeptidase-T (IsoT), agit préférentiellement sur des chaînes de poly-ubiquitine non conjuguées, libres, et module le recyclage des protéines en désassemblant de telles chaînes qui inhibent l'action du protéasome 26S (Hadari et *al.*, 1992). IsoT agit de façon séquentielle par un mécanisme de type exo, commençant depuis la fin de la chaîne de poly-ubiquitine qui contient la partie libre C-Terminale de l'ubiquitine (Amerik et *al.*, 1997 ; Amerik et Hochstrasser, 2004). Cette partie C-Terminale peut être exposée après l'action du protéasome 26S sur la chaîne de poly-ubiquitine de la protéine conjuguée. Des travaux décrivent la caractérisation de Ubp14, un homologue de levure de IsoT (Amerik et *al.*, 1997). Comme IsoT, Ubp14 est impliquée dans le désassemblage des chaînes libres et non conjuguées de poly-ubiquitine. Une souche mutante dans laquelle l'expression de Ubp14 est abolie, mais aussi une souche de levure

MJDs				
Ataxin-3	Unknown	MJD disease	Sequence has CAG repeats	Burnett et al. (2003); Scheel et al. (2003)
OTUs				
A20	RIP	NF- κ B signaling	Also E3 ligase	Wertz et al. (2004)
VCIP135	Unknown	Golgi disassembly		Wang et al. (2004)
JAMMs				
POH1	Unknown	Proteasome		Verma et al. (2002); Yao and Cohen (2002)
AMSH	EGFR?	Endocytosis		McCullough et al. (2004)
CSN5	Cullins	CSN function	Mainly NEDD8 as substrate	Cope et al. (2002); Groisman et al. (2003)
BRCC36	Unknown	G2/M checkpoint signaling	Enhances BRCA1/BARD1 E3 ligase activity	Dong et al. (2003)

Tableau III.1

Fonctions de certaines dé-ubiquitinases. Ce tableau répertorie l'ensemble des DUBs de mammifères, classées selon leur type de domaine catalytique, les voies de signalisation dans lesquelles elles interviennent, ainsi que les processus dans lesquels elles sont impliquées. Abréviations : UCHs : Ubiquitin Carboxyl terminal Hydrolase; USPs : Ubiquitin Specific Proteases; MJDs : Machado Joseph Disease; OTUs : OTUbain; JAMMs : Jab1/Pad1/MPN domain containing Metallo-enzymes D'après Nijman *et al.*, 2005.

exprimant une forme mutante dominant négatif de l'enzyme, a un taux beaucoup plus faible de dégradation des protéines, accompagné par une accumulation de chaînes de poly-ubiquitine. Ces chaînes sont certainement liées au protéasome. De manière inattendue, la surexpression de la forme sauvage de la protéine provoque aussi l'inhibition de la protéolyse de certaines protéines. Il est possible que certains substrats soient étiquetés par un transfert direct avec des chaînes de poly-ubiquitine, et que la faible concentration intracellulaire de ces chaînes conduise à une inhibition de leur dégradation. Des expériences de complémentation ont révélé que Ubp14 et IsoT sont des homologues fonctionnels.

L'action des UCHs et d'IsoT stimule le recyclage des protéines en éliminant les chaînes de poly-ubiquitine inhibitrices et en les régénérant en ubiquitine libre et réutilisable. Dans d'autres cas, l'action d'une isopeptidase peut ralentir le recyclage des protéines. Par exemple, une mutation dans le gène *faf* (*Drosophila fat facet*), qui code pour une isopeptidase contrôlant le développement de l'œil chez la Drosophile, est supprimée par une autre mutation dans une sous unité du protéasome (Huang et *al.*, 1995). Ces résultats indiquent que l'isopeptidase *faf* stabilise une protéine non identifiée, qui est aussi stabilisée par une mutation dans le protéasome. Il est possible que certaines isopeptidases puissent stabiliser une protéine en particulier en éliminant l'ubiquitine du conjugué qui serait dans le cas contraire ciblé pour la dégradation par le protéasome 26S. Cette fonction d'édition pour quelques isopeptidases a été proposée depuis longtemps (Hershko et *al.*, 1980). Les travaux de Lam et collègues (Lam et *al.*, 1997) rapportent que le complexe 19S du protéasome 26S contient une isopeptidase ubiquitine-aldehyde-sensible mais ATP indépendante qui enlève les molécules d'ubiquitine une par une, à partir de l'extrémité distale des courtes chaînes de poly-ubiquitine. Lam et collègues proposent que cette isopeptidase soit impliquée dans l'édition et dans le sauvetage des protéines faiblement ubiquitinées ou dégradées très lentement. Ceci diffère de la fonction d'une autre isopeptidase, Doa4 (Papa and Hochstrasser, 1993) et de celle de l'isopeptidase ATP-dépendante mais Ubal-insensible (Eytan et *al.*, 1993), impliquée principalement dans le recyclage de l'ubiquitine et la maintenance du taux d'ubiquitine libre dans la cellule.

Les isopeptidases contrôlent aussi une variété d'autres processus basiques, notamment le développement, la répression transcriptionnelle (Moazed et *al.*, 1996) et la mémoire à long terme (Hegde et *al.*, 1997). Comme nous allons le voir, une autre fonction intéressante d'isopeptidases spécifiques est le contrôle de la prolifération cellulaire.

Il a été observé que les cytokines induisent l'expression de DUBs spécifiques des cellules T, comme DUB-1 (Zhu et *al.*, 1996) ou DUB-2 (Zhu et *al.*, 1997). DUB-1 est induite par stimulation des récepteurs à l'IL-3 et 5 et au GM-CSF, suggérant ainsi un rôle dans son induction pour la sous unité commune des récepteurs aux interleukines, le β c. La sur-expression d'un mutant dominant négatif de JAK2 inhibe l'induction après traitement par cytokine de DUB-1 (Jaster et *al.*, 1997), suggérant que la régulation de cette enzyme fait partie de la réponse cellulaire à la voie de signalisation JAK/STAT. Une expression continue de DUB-1 arrête les cellules en phase G1. De ce fait, l'enzyme semble réguler la division cellulaire par un contrôle de la transition G0-G1. Le résidu catalytique cystéine très conservé de l'enzyme est requis pour son activité. DUB-2 est induite par l'IL-2 en tant que gène immédiat précoce (Immediate early, IE gene) et dont l'expression est diminuée peu de temps après initiation de la stimulation. La fonction de cette enzyme est également obscure. Elle pourrait stimuler ou inhiber la dégradation d'un régulateur critique du cycle cellulaire.

3- Les autres fonctions des DUBs

Les autres fonctions de certains membres bien étudiés de la super famille des DUBs sont rapportées dans le **Tableau III.1**.

F- Exemples de protéines dégradées par le système ubiquitine-protéasome

1- Régulateurs du cycle cellulaire

La progression dans le cycle cellulaire eucaryote est régulée par des oscillations dans les activités des Cdks. L'activité des Cdks est notamment contrôlée par des synthèses périodiques et la dégradation de sous unités régulatrices positives, les cyclines (Bravo et *al.*, 1982 ; Evans et *al.*, 1983 ; Nigg, 1995). Il semblerait que toutes ces protéines soient dégradées par la voie ubiquitine protéasome (Devoy et *al.*, 2005 ; Hershko, 1997).

2- Facteurs de transcription, suppresseurs de tumeurs et oncoprotéines

Le suppresseur de tumeur p53 a certainement été la première protéine majeure connue pour être dégradé par le système ubiquitine-protéasome à la fois *in vitro* et *in vivo* (Ciechanover et *al.*, 1991 ; Maki et *al.*, 1996). Néanmoins, d'autres protéines clefs sont aussi prises en charge par ce système.

C'est notamment le cas pour la dégradation dépendante du système ubiquitine-protéasome du facteur de régulation de la myogenèse Myf5. En effet, celle-ci serait régulée par un jeu complexe de phosphorylations et de déphosphorylations au cours du cycle cellulaire des myoblastes en prolifération. Cette dégradation ne dépendrait pas du complexe APC (Doucet et *al.*, 2005).

NFκB (nuclear factor κB) est un facteur de transcription ubiquitaire, impliqué dans la réponse immunitaire, l'inflammation, le stress et le développement (Baeuerle et *al.*, 1996 ; Baldwin, 1996). Le cas de NFκB2, hétérodimère de sous unités p52 et p65, est un cas intéressant. Comme dans le cas de NFκB1 (ou p52 est p50), p50 est le produit d'une protéolyse ménagée d'un précurseur plus grand, p105, dont la partie C-Terminale subit cette dégradation. Les travaux de Fan et Maniatis (Fan and Maniatis, 1991), Palombella et collègues (Palombella et *al.*, 1994), ainsi que ceux d'Olivier Coux (Coux and Golberg, 1998) rapportent que cette préparation de p105 et la dégradation de IκBα et β sont l'oeuvre du système ubiquitine protéasome. De façon très élégante, Lin et Gosh (Lin and Ghosh, 1996) ont montré qu'une région de p105 riche en glycines (GRR) constitue un signal interne d'arrêt de la dégradation de p105. Dans un second temps, le facteur de transcription ainsi préparé est retenu sous une forme latente dans le cytoplasme des cellules non stimulées, de par leur association avec des molécules inhibitrices IκBs (inhibitors of κB) (Baeuerle et *al.*, 1996 ; Baldwin, 1996).

La β-caténine est une protéine impliquée dans les complexes d'adhérence cellule-cellule, dans la transduction du signal au travers de la voie de signalisation wingless/Wnt-1 (respectivement chez *D. melanogaster* et les mammifères), ainsi que dans la régulation de la transcription. En absence de signalisation par wingless/Wnt-1, la β-caténine est dégradée par la voie ubiquitine-protéasome (Aberle et *al.*, 1997). Au contraire, en présence de cette

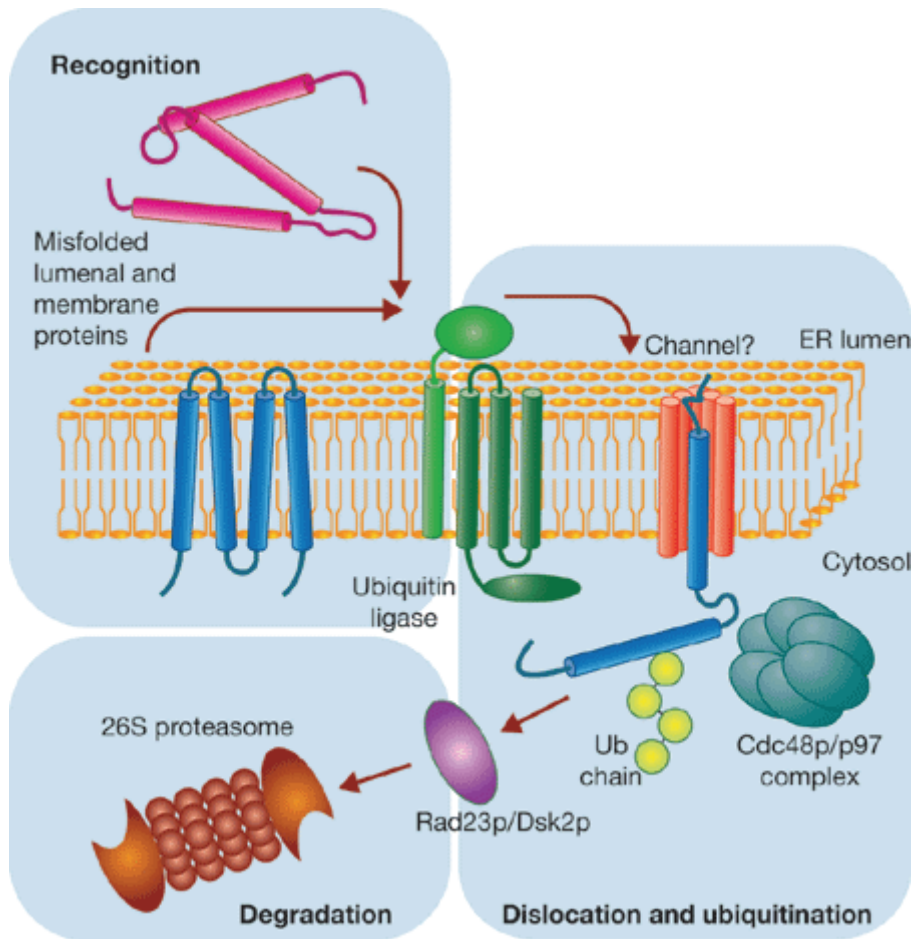


Figure III.3
Dégradation protéasomale des cibles de l'ERAD.

Les protéines mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) ainsi que les protéines membranaire endommagées de cet organel sont reconnues à l'intérieur du RE par différents mécanismes de contrôle qualité. Ces mécanismes assurent l'escorte et l'export de ces protéines vers le cytoplasme. Dès lors, les lysines exposées dans le cytoplasme sont poly-ubiquitinées. L'export est achevé grâce à l'aide du complexe p97/VCP. Les substrats ainsi extraits sont escortés au protéasome par des facteurs accessoires comme Rad23p et Dsk2p, puis dégradés. C'est donc une Dégradation des protéines Associée au RE (ERAD). Figure tirée de Meusser *et al.*, 2005.

signalisation, la β -caténine est stabilisée. Elle permet alors la transcription de gènes ciblés par l'activation de cette voie.

3- Protéines membranaires

Il est généralement accepté que le système d'ubiquitination soit impliqué dans la dégradation de protéines cytosoliques ou nucléaires. Cependant, il est clair maintenant que ce système est aussi impliqué dans deux voies de dégradation distinctes des protéines membranaires. Les récepteurs membranaires et transporteurs vésiculaires sont ciblés pour la dégradation (ou la vacuole chez la levure). D'un autre côté, les protéines natives ou mal repliées dans le réticulum endoplasmique sont ciblées au protéasome et dégradées dans le cytosol (ou à la surface cytosolique de la membrane), avec ou sans ubiquitination préalable.

Le réticulum endoplasmique est la porte d'entrée de nombreuses protéines compartimentalisées, ancrées à la membrane ou encore secrétées. C'est aussi le site de repliement et de modifications des chaînes naissantes. Les protéines qui ne parviennent pas à se replier subissent alors un contrôle qualité drastique. Ces protéines ne sont pas dégradées par le lysosome mais de façon cytoplasmique, par le protéasome 26S, dans un mécanisme associé au réticulum endoplasmique ou ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation - Kopito, 1997 ; Meusser et *al.*, 2005 ; Werner et *al.*, 1997 ; voir **figure III.3**). C'est notamment le cas de la protéine membranaire HMG-R (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA), un régulateur clef de la synthèse des stérols (Hampton et *al.*, 1994).

La protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) est un autre substrat d'ERAD. Cette protéine est associée à la chaperonne du réticulum endoplasmique calnexine. Seulement 25% de la protéine sauvage achève sa maturation vers la surface cellulaire, alors que la majorité de la protéine est dégradée au niveau du réticulum endoplasmique (Lukacs et *al.*, 1994 ; Ward et *al.*, 1994). La mutation Phe508 de CFTR est responsable de la majorité des cas de mucoviscidose, car très peu de cette protéine mutante est capable d'être adressée à la membrane, subissant une dégradation très forte. Cette dégradation est médiée par le système ubiquitine-protéasome (Ward et *al.*, 1995 ; Jensen et *al.*, 1995).

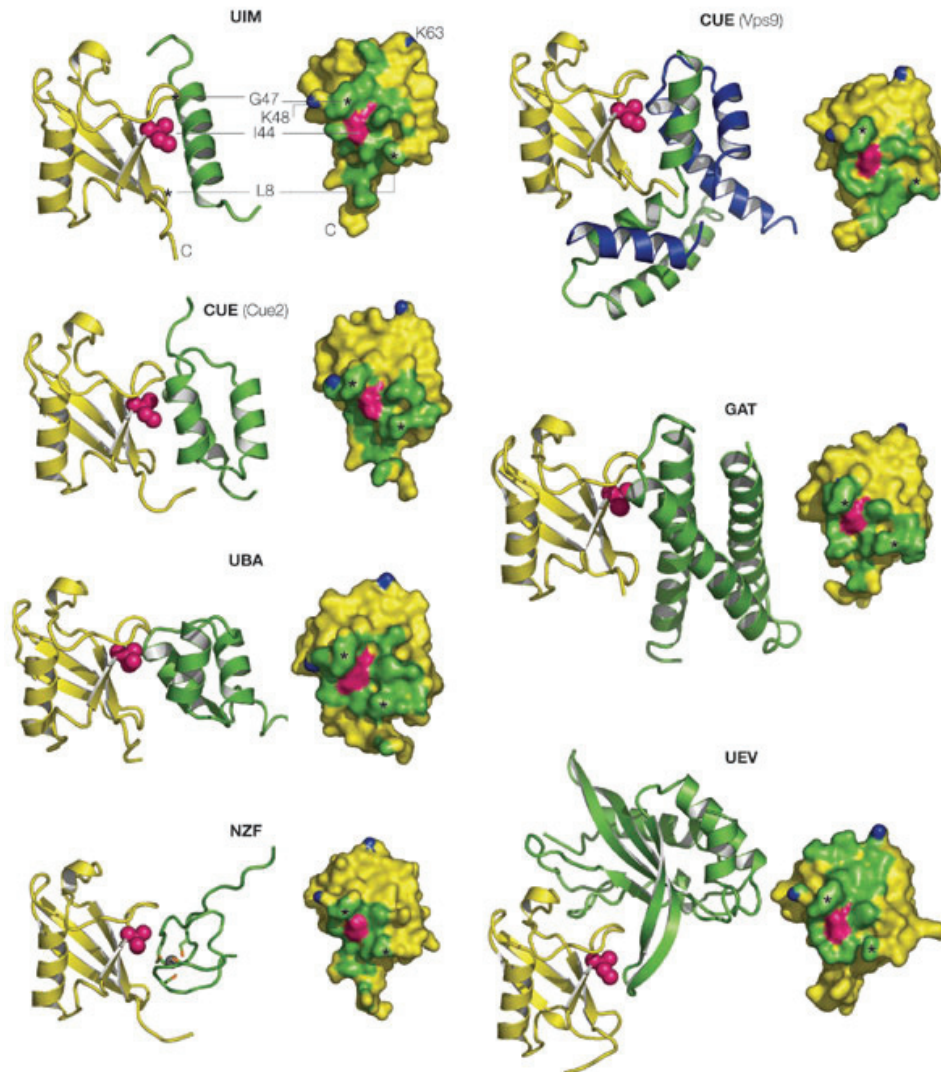


Figure III.4

Structure des différents domaines connus pour interagir avec l'ubiquitine (UBDs). Ces structures ont été déterminées par cristallographie aux rayons X ou par RMN. Pour chacun des UBDs, le panneau de gauche montre les diagrammes en ruban dans lesquels l'ubiquitine est en jaune et les UBDs en vert (bleu et vert pour le dimère de Cue). L'isoleucine 44 de l'ubiquitine est représentée en rouge. De façon complémentaire, le panneau de droite montre une représentation de l'ubiquitine avec les surfaces de contact des UBDs en vert. Les résidus lysine 48 et 63, deux sites clés lors de la formation de chaînes de poly-ubiquitine, sont indiqués en bleu. Les résidus leucine 8 et glycine 47 qui se déplacent pour interagir au mieux avec des différents UBDs, sont indiqués par des astérisques. Les accès PDB de ces structures utilisées pour cette figure sont : UIM (1Q0W); Cue2 (1OTR); UBA (1WR1); NZF (1Q5W); CueVps9 (1P3Q); GAT (1YDB); UEV (1S1Q). Abréviations : Cue : Coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation; GAT : Gga and Tom1; NZF : Npl4 Zinc Finger; UBA : Ubiquitin Associated domain; UEV : Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant; UIM : Ubiquitin Interacting Motif; Vps9 : Vacuolar protein sorting 9. Figure tirée de Hicke *et al.*, 2005.

G. UBDs : Domaines de liaison à l'ubiquitine et aux chaînes d'ubiquitine

1- Présentation

Les domaines d'interaction avec l'ubiquitine (Ubiquitin Binding Domain UBDs) sont capables « d'interpréter » et de transmettre l'information conférée par l'ubiquitination d'une protéine, afin de contrôler de nombreux événements cellulaires. Depuis quelques années, les structures tertiaires de quelques uns de ces domaines sont connues, mais pour comprendre leur mécanisme d'action, nous allons discuter brièvement de leurs affinités pour l'ubiquitine et les chaînes d'ubiquitine, leur fonction dans un contexte de protéine entière, ainsi que des façons connues pour réguler leur liaison à l'ubiquitine.

Les UBDs sont généralement de petits domaines de 20 à 160 acides aminés que l'on peut retrouver dans les enzymes qui catalysent l'ubiquitination ou la dé-ubiquitination des protéines. On note aussi leur présence dans les protéines dites réceptrices d'ubiquitine, chargées de reconnaître et d'interpréter les différents signaux d'ubiquitination des protéines (**Figure III.4 et Tableau III.2**).

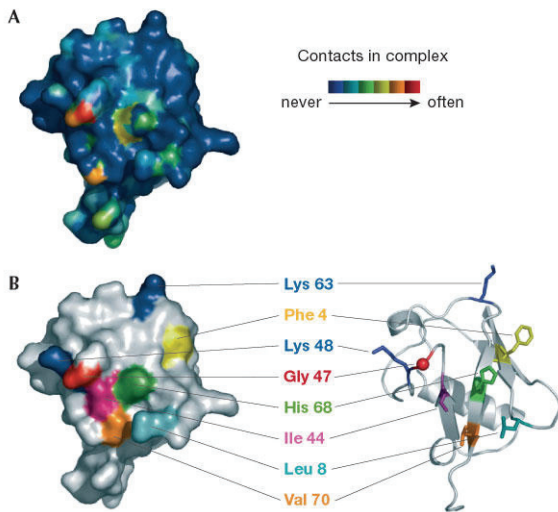
Les UBDs sont différents les uns des autres d'un point de vue structural et possèdent des fonctions biologiques très différentes. La présence d'un UBD au sein d'une protéine indique qu'elle interagit avec l'ubiquitine, des chaînes d'ubiquitine ou encore des protéines ubiquitinées ou poly-ubiquitinées.

2. UIM et UBA

Les protéines poly-ubiquitinées sont adressées au protéasome qui les reconnaîtra directement par l'intermédiaire d'une protéine qui possède un UBD reconnaissant les chaînes d'ubiquitine. La première protéine à UBD caractérisée est une des sous unités du protéasome, S5A/RPN10 (Young *et al.*, 1998). Par homologie de séquence et utilisation de recherche par bioinformatique, un motif a pu être identifié : UIM (Ubiquitin-Interacting Motif : Hofmann and Falquet, 2001 ; Donaldson *et al.*, 2003). Les travaux de Bilodeau, Raiborg, Polo, Shih et collègues ont montré que les protéines possédant une telle séquence peuvent interagir avec l'ubiquitine (Bilodeau *et al.*, 2002 ; Raiborg *et al.*, 2002 ; Polo *et al.*, 2002 ; Shih *et al.*, 2002).

Figure III.5

Surface de contact de l'ubiquitine avec les différents UBDs. Le panneau A décrit la fréquence d'interaction des résidus de l'ubiquitine avec les UBDs. Le panneau B nous permet de localiser les résidus clés de l'ubiquitine et de les replacer sur les surfaces de contact. Nous pouvons constater que les résidus lysine 48 et 63, capitaux pour l'élongation des chaînes de poly-ubiquitine, ne sont jamais masqués par les UBDs. Les UBDs réfèrent ici aux domaines UIM (Ubiquitin Interacting Motif), Cue (Coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation), GAT (Gga and Tom1), UEV (Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant), UBA (Ubiquitin Associated domain), NZF (Npl4 Zinc Finger). Abréviation : UBDs : Ubiquitin Binding Domain. Cette figure est tirée de Wilkinson et al., 2005.



Domaine	Nombre de protéine dans le protéome	Longueur (Acides aminés)	Affinité pour l'ubiquitine (Kd)	Références
CUE	S. cerevisiae 7 H. sapiens 21	40	2-160µM (mono-ubiquitine)	Donaldson et al., 2003; Shih et al., 2003
GAT	S. cerevisiae 2 H. sapiens 14	135	180µM (mono-ubiquitine)	Scott et al., 2004; Shiba et al., 2004
GLUE	S. cerevisiae ? H. sapiens ?	135	460µM (mono-ubiquitine)	Slagsvold et al., 2005
NZF	S. cerevisiae 1 H. sapiens 25	35	100-400µM (mono-ubiquitine)	Alam et al., 2004
ZnF-UBP	S. cerevisiae 5 H. sapiens 16	58	Inconnu	Seigneurin-Berny et al., 2001; Hook et al., 2002
UBA	S. cerevisiae 10 H. sapiens 98	45-55	10-500µM (mono-ubiquitine) 0.03-9µM (poly-ubiquitine)	Bertolaet et al., 2001; Wilkinson et al., 2001
UEV	S. cerevisiae 2 H. sapiens ?	145	100-500µM (mono-ubiquitine)	Katzmann et al. 2001; Pornillos et al., 2002
UIM	S. cerevisiae 8 H. sapiens 71	20	100-400µM (mono-ubiquitine ou poly-ubiquitine)	Bilodeau et al., 2002; Shih et al., 2002
VHS	S. cerevisiae 4 H. sapiens 28	150	Inconnu	Yamakami et al., 2003; Mizuno et al., 2003

Tableau III.2

Caractéristiques des différents UBDs. L'occurrence, la taille et l'affinité des différents UBDs pour l'ubiquitine ou les chaînes de poly-ubiquitine sont rapportées. Il est notable que ces domaines ont une affinité relativement faible pour l'ubiquitine ou les chaînes d'ubiquitine. Ceci constitue une donnée importante pour notre travail. Abréviation : Cue : Coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation; GAT : Gga and Tom1; GLUE : GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45; NZF : Npl4 Zinc Finger; UBA : Ubiquitin Associated domain; UBDs : Ubiquitin Binding Domain; UEV : Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant; UIM : Ubiquitin Interacting Motif; VHS : 'Vps27, HRS, STAM'; ZnF-UBP : Zinc Finger in Ubiquitin specific Protease. Adapté d'après Hicke et al., 2005.

Un autre domaine, identifié également par une approche bioinformatique, a été découvert lors de comparaison de séquences de facteurs impliqués dans l'ubiquitination et la dé-ubiquitination des protéines. Ce domaine UBA (pour Ubiquitin-Associated) interagit directement avec l'ubiquitine (Bertolaet et *al.*, 2001 ; Wilkinson et *al.*, 2001).

De nombreuses protéines présentant des fonctions et des localisations subcellulaires différentes possèdent des UIMs et UBAs. Ces domaines sont capables d'interagir à la fois avec l'ubiquitine et les chaînes de poly-ubiquitine.

3- Les autres UBDs

Les autres types d'UBD ont pu être identifiés par criblage double hybride chez la levure en utilisant différentes formes d'ubiquitine comme appât.

L'analyse des protéines interagissant avec la mono-ubiquitine a permis de découvrir le domaine CUE (Coupling of Ubiquitin conjugation to Endogenous reticulum degradation, Donaldson et *al.*, 2003 ; Shih et *al.*, 2003). Les domaines de type GAT (GgA and Tom1) et PAZ ou ZnF-UBP (Polyubiquitin-Associated Zinc finger) ont été découverts de façon accidentelle en utilisant des protéines contenant ces domaines en tant qu'appât lors d'expériences de double hybride chez la levure (Hook et *al.*, 2002 ; Yamakami et *al.*, 2003 ; Scott et *al.*, 2004 ; Shiba et *al.*, 2004).

NZF (Npl4 Zinc Finger), quand à lui, a été découvert à la suite d'expériences de biochimie (Meyer et *al.*, 2002 ; Kanayama et *al.*, 2004). Il en fut de même pour les domaines de type VHS (Vps27, HRS, STAM, Mizuno et *al.*, 2003) et GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in Eap45, Slagsvold et *al.*, 2005). Le dernier en date est le domaine UEV (Ubiquitin-conjugating Enzyme Variant) qui ressemble à un domaine catalytique de E2, mais qui ne possède pas la cystéine du site actif. Malgré cette ressemblance structurale, le domaine UEV ne se lie pas de façon covalente à l'ubiquitine (Pornillos et *al.*, 2002 ; Lindquist et *al.*, 2004).

4- Caractéristiques des UBDs

Les caractéristiques des UBDs décrits plus haut sont résumées dans le **Tableau III.2**. Leurs constantes de dissociation, K_d , sont aussi reportées dans ce tableau. Il est frappant de

constater que les affinités de ces UBDS pour l'ubiquitine sont faibles (Kd compris entre 10 et 500 μ M, Hicke et *al.*, 2005).

Certains UBDs, semblent également pouvoir interagir avec la protéine de type ubiquitine Nedd8 (Ubiquitin like protein, Ubl). En effet Nedd8 possède un motif de reconnaissance identique à celui de l'ubiquitine (résidu Isoleucine 44). Enfin, certains UBDs peuvent interagir avec des protéines Ubl, en plus de pouvoir interagir avec l'ubiquitine (Hicke et *al.*, 2005).

Enfin, la plupart des UBDs sont capables d'interagir à la fois avec l'ubiquitine et les chaînes de poly-ubiquitine, cependant pas avec la même affinité. On note aussi des préférences pour les chaînes d'ubiquitine branchées en K63 plutôt qu'en K48 pour certains UBDs (Kanayama et *al.*, 2004 ; Seibenhener et *al.*, 2004). De façon intrigante, on trouve dans de nombreuses protéines des tandems de domaines UBD. Cette observation reste à ce jour sans explication satisfaisante, bien que l'on puisse penser que les constantes d'affinité résultantes de la présence de deux domaines UBDs au sein de la même protéine soient plus fortes que dans le cas où un seul domaine UBD serait présent (Hicke et *al.*, 2005).

5- Avantages des faibles affinités des UBDs pour l'ubiquitine

Les différents types d'UBDs sont extrêmement bien représentés dans le phénomène d'endocytose où l'ubiquitination prend une part maîtresse. L'avantage majeur d'avoir un ensemble de protéine à UBD peu avide pour l'ubiquitine, au sein réseau de signalisation par ubiquitination, est qu'un tel réseau contient des connections facilement réversibles, dynamiques et donc très fluides (Hicke et *al.*, 2005, **Tableau III.2**). Un autre avantage est que les protéines à UBDs doivent coopérer les unes avec les autres pour augmenter leur affinité pour un substrat ubiquitiné (Hicke et *al.*, 2005).

Ce système permet aussi d'apporter plus de spécificité, notamment lorsque l'on prend l'exemple de la protéine TSG101 (Tumour Susceptibility Gene 101). Cette protéine contient une UBD de type UEV, qui possède une affinité très faible pour l'ubiquitine. TSG101 peut interagir avec la protéine virale gag, mais là encore avec une très faible affinité. Lorsque la protéine virale gag est ubiquitinée, alors TSG101 a une très forte affinité et donc une très grande spécificité d'interaction avec elle (Pornillos et *al.*, 2002).

Les domaines UBDs au sein des protéines semblent être régulés de façon importante. De nombreux éléments d'observation laissent penser que les contacts inter et intra moléculaires impliquant les UBDs, des modifications post-traductionnelles ou encore qu'une structure quaternaire différente affectent l'affinité des domaines UBDs pour l'ubiquitine et leur spécificité (Meyer et *al.*, 2002 ; Shih et *al.*, 2003). L'exemple le plus frappant est donné par le facteur RAD23. Un repliement intra moléculaire entre un domaine UBA et un domaine de type ubiquitine diminue son affinité pour l'ubiquitine (Walters et *al.*, 2003 ; Raasi et *al.*, 2004). Certains chercheurs pensent aussi que le contrôle de la localisation sub-cellulaire serait un moyen de contrôler la spécificité d'interaction des protéines à domaine UBD pour des substrats ubiquitinés (Hicke et *al.*, 2005).

6- Structure des différents types d'UBDs, surfaces d'interaction avec l'ubiquitine

La très haute conservation de séquence et de structure de l'ubiquitine au cours de l'évolution peut résulter des nombreuses interactions avec des UBDs structurellement différents qu'elle doit lier (Hicke et *al.*, 2005). Afin d'étayer ces propos, j'ai décidé de montrer ces différentes structures dans la **Figure III.4**. UIM forme une simple hélice alpha qui interagit avec l'ubiquitine, le motif NZF interagit avec l'ubiquitine grâce à trois résidus stablement maintenus dans une structure à zinc, tandis que les domaines CUE, UBA et GAT contiennent 3 hélices alpha dont deux d'entre elles contactent l'ubiquitine. Enfin, le domaine UEV contient à la fois hélices alpha et feuillet bêta, et interagit avec l'ubiquitine grâce à deux boucles et une partie du feuillet bêta.

Les études structurales ont montré que l'ubiquitine est contactée différemment par les différents types d'UBD. Néanmoins, le résidu I44 de l'ubiquitine est impliqué systématiquement dans l'interaction avec les différents types d'UBDs (Hamilton et *al.*, 2001 ; Hu et *al.*, 2002 ; Johnston et *al.*, 1999 ; Walden et *al.*, 2003). Chacun des différents UBDs semble ainsi pouvoir pivoter sur ce résidu d'ubiquitine (Hicke et *al.*, 2005, voir **Figure III.4 et III.5**). Ceci permet d'expliquer rationnellement pourquoi certains UBDs interagissent plus avec certains types de chaînes de poly-ubiquitine plutôt qu'avec d'autres.

7- Ubiquitination des UBDs

A ce jour, l'ubiquitination des motifs VHS, UEV, ZnF-UBP, GLUE et UBA n'a pas été observée. En revanche, les UBDs de type UIM, CUE et GAT et NZF sont généralement mono ubiquitinés (Polo *et al.*, 2002 ; Shih *et al.*, 2003 ; Shiba *et al.*, 2004 ; Kanayama *et al.*, 2004 ; Klapisz *et al.*, 2002, Oldham *et al.*, 2002 ; Davies *et al.*, 2003 ; Katz *et al.*, 2002). Brièvement, il semblerait que cette modification module l'affinité d'un UBD pour l'ubiquitine (en favorisant le repliement intra moléculaire notamment). Elle pourrait aussi faire varier l'éventail des interactions avec d'autres protéines à UBD.

8- Rôles physiologiques des UBDs

On peut dégager trois grands rôles pour les UBDs. Premièrement, les UBDs interviennent régulièrement dans les processus d'ubiquitination et de dé-ubiquitination (vanDemark *et al.*, 2001 ; Davies *et al.*, 2003). On note aussi leur importance dans la dégradation des protéines par le protéasome (Deveraux *et al.*, 1994 ; Schaubert *et al.*, 1998). Enfin, comme nous l'avons déjà évoqué, de nombreuses protéines à domaines UBD interviennent tout au long de l'endocytose (Katzmann *et al.*, 2001 ; Katzmann *et al.*, 2002).

Chapitre IV
La réponse cellulaire au stress

Chapitre IV : La réponse cellulaire au stress

A. Les effets d'un stress cellulaire

Lors d'une infection virale ou bactérienne, l'organisme réagit en augmentant la température corporelle. Cette hyperthermie contrôlée est un mécanisme de défense immunitaire innée. Il n'en reste pas moins qu'elle provoque de nombreux changements dans la cellule. Pour la plupart des types cellulaires étudiés, la transcription et la traduction d'une majorité de protéines sont arrêtées (Cuesta et *al.*, 2000 ; Duncan et Hershey, 1989 ; Kuhl and Rensing, 2000a). Les ADN polymérases sont inactivées (Spiro et *al.*, 1982). Le cycle et la prolifération cellulaire sont arrêtés (Kuhl et *al.*, 2000b) et la morphologie des cellules apparaît différente car la polymérisation des micro filaments d'actine est perturbée (Han et *al.*, 2000).

Une hyperthermie affecte une majorité de protéines et seulement une faible proportion de ces facteurs est insensible à ce stress. De plus, le taux intracellulaire des HSPs s'accroît rapidement en réponse à une augmentation brutale des protéines déstructurées. Cette induction participe à la protection de la cellule (Samali and Orrenius, 1998) et empêche l'accumulation de protéines mal repliées et leur agrégation en favorisant leur repliement ou leur dégradation par le protéasome (Connell et *al.*, 2001 ; Parcellier et *al.*, 2003). Lorsque le stress thermique est extrême, il semble que le système de dégradation protéique lui-même soit bloqué, ce qui provoque des complexes des cellules (Westwood and Steinhardt, 1989).

B. Les chaperonnes HSPs

1- Introduction

Lorsqu'une cellule se trouve dans des conditions particulièrement nocives pour elle, une réponse spécifique et adaptée est mise en place afin de promouvoir la survie cellulaire. Cette réponse cellulaire à divers stress est bien étudiée. Ainsi, on peut constater que ces différents stress ont tous en commun de promouvoir la sur expression des HSPs (heat shock

proteins) pour lutter contre les effets délétères de températures élevées (Hahn and li, 1982), l'irradiation par les UV (Simon et *al.*, 1995), l'infection virale (Stewart and Young, 2004), la présence de métaux lourds (Levinson et *al.*, 1980) ou le stress oxydatif (Lindquist and Craig, 1988).

Les HSPs sont localisées dans différents sites intracellulaires et organelles. Elles possèdent parfois des degrés d'expression variable et tissus dépendantes (Tanguay et *al.*, 1993). Ces HSPs ne sont pas seulement induites par le stress, elles participent aussi à la régulation de processus physiologiques comme le cycle, la prolifération et la différenciation cellulaire (Milarski and Morimoto, 1986). De plus, leur expression est également liée à différents états pathologiques et en particulier au cancer (Fuller et *al.*, 1994).

Les protéines chaperonnes ont un grand nombre de fonctions cellulaires. Comme les HSPs ont une affinité pour les parties hydrophobes exposées des protéines, elles sont impliquées, après hydrolyse de l'ATP, dans la conformation des protéines naissantes et des protéines dénaturées. Elles participent à la prévention de l'agrégation protéique, ont un rôle dans l'apoptose, assistent les protéines dans la dégradation par le protéasome (Ballinger et *al.*, 1999 ; Connell et *al.*, 2001 ; Luders et *al.*, 2000 ; Parcellier et *al.*, 2003) et contribuent à la modulation du signal pour la réponse immunitaire ou inflammatoire (Castelli et *al.*, 2001 ; Kuppner et *al.*, 2001). De plus, 15% des protéines néo-synthétisées sont associées à des chaperonnes (Wickner et *al.*, 1999). Par exemple, la machinerie de HSP70 se fixe sur une séquence d'acides amines hydrophobes avant même que la protéine naissante ne quitte le ribosome.

A la suite de différents stress environnementaux, les protéines peuvent se déstructurer. Il semblerait qu'elles exposent alors des surfaces hydrophobes, s'agrègent par contact intra et inter moléculaires aberrants, pour finalement devenir insolubles. Certaines protéines chaperonnes préviennent de cette agrégation et sont aussi capable d'éliminer les agrégats formés. Elles se fixent sur les surfaces hydrophobes des protéines déstructurées, et les aident à se replier ou augmentent leur vitesse de prise en charge par le protéasome (Glover and Lindquist, 1998).

2- Les principales HSPs

2.1. HSP90

2.1.1. Présentation de HSP90

C'est la protéine cytosolique la plus abondante chez les eucaryotes (2% des protéines cytosoliques). Des homologues sont retrouvés dans le réticulum endoplasmique des eucaryotes supérieurs et chez les procaryotes.

Chez les eucaryotes supérieurs, HSP90 est exprimée sous deux isoformes homologues : les formes α et β . Dans toutes les espèces étudiées, les différents complexes de HSP90 ont une structure commune et fonctionnent probablement selon un mécanisme d'action identique. HSP90 est un homo dimère constitutif avec un domaine d'interaction de 190 acides aminés localisés du côté C-Terminal de la protéine (Nemoto et al., 1995, **Figure IV.1**). Côté N-terminal, un domaine hautement conservé de 25kDa est le site de fixation de l'ATP et de la geldanamycine, une drogue qui cible le domaine ATPase d'HSP90 (Whitesell et al., 1994).

Selon les conditions physiologiques, HSP90 est associée avec de nombreuses protéines comme HSF1 (heat shock factor 1), l'actine, la tubuline, des kinases et des récepteurs d'hormones (Jakob and Buchner, 1994).

Les protéines de choc thermique de 90 KDa (HSP90s) constituent une très grande famille de chaperonnes moléculaires présentes chez les bactéries et les eucaryotes, mais apparemment absentes chez les archaebactéries. Les eucaryotes possèdent de multiples homologues de HSP90, incluant des isoformes dans le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, et le chloroplaste. Bien que la version bactérienne HtpG est typiquement non essentielle (Versteeg et al., 1999), les eucaryotes requièrent une HSP90 cytoplasmique pour survivre dans toutes les conditions de croissance testées (Borkovich et al., 1989). Cette nécessité a permis l'utilisation de levure pour analyser précisément structure et fonction de HSP90 elle-même (Meyer et al., 2003 ; Obermann et al., 1998 ; Panaretou et al., 1998 ; Prodromou et al., 2000), aussi bien que pour identifier et caractériser une pléthore de protéines co-chaperonnes avec lesquelles HSP90 collabore (Dey et al., 1996 ; Duina et al., 1996 ; Chang et al., 1997 ; Fang et al., 1998 ; Panaretou et al., 2002)

Contrairement aux autres chaperonnes comme GroEL et HSP70, HSP90 semble avoir un certain éclectisme pour ses protéines « clientes ». En effet, sa clientèle inclue des protéines structurellement et fonctionnellement aussi différentes que la télomérase (Holt et al., 1999), l'organisateur d'actine N-WASP (Park et al., 2005), la nitric oxyde synthase (Garcia-Cardena

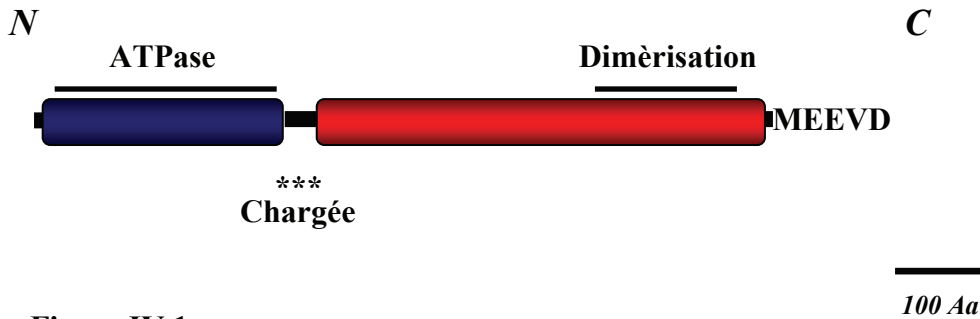


Figure IV.1

Structure primaire de HSP90. Le domaine ATPase-chaperonne ainsi que celui de dimèrisation sont indiqués. Comme nous le verrons dans le texte, la partie chargée joue un rôle important dans le contrôle de l'activité ATPase-chaperonne de HSP90.

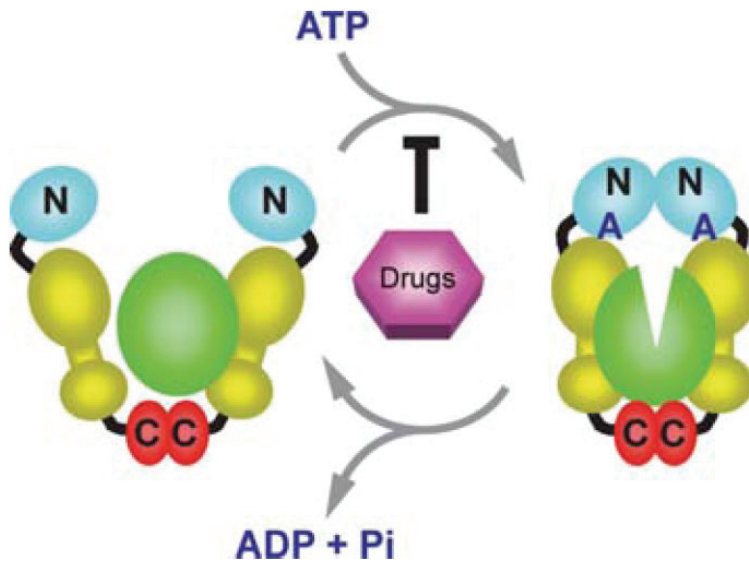


Figure IV.2

Modèle de changement conformationnel de HSP90 couplé à son activité ATPase sur la base d'études structurales et biochimiques. La partie N-Terminale, médiane et C-Terminale de HSP90 sont représentées (respectivement en cyan, jaune et rouge). Une protéine cliente (vert est capable de se lier en l'absence d'ATP et subit quelques changements d'état lorsque HSP90 hydrolyse l'ATP (activation). Les drogues inhibant cette hydrolyse, comme la geldanamycine, bloquent cette activation des protéines clientes. D'après Pearl and Prodromou, 2006.

et al., 1998) ainsi qu'un tas de récepteurs d'hormone nucléaires (Pratt and Toft, 2003) ou encore un nombre croissant de protéines kinases (Pearl, 2005). La base moléculaire de la spécificité de HSP90 pour ses protéines clientes est encore mal connue. En ce qui concerne les récepteurs d'hormone nucléaires, qui sont probablement les plus étudiés, le recrutement sur le système HSP90 requiert l'interaction préalable avec le système HSP70/HSP40 qui est ensuite connecté à HSP90 via Hop/Sti1 (Pratt and Toft, 2003 ; Kimmins and MacRae, 2000). En ce qui concerne les protéines kinases, qui constituent la plus grande fraction des protéines clientes de HSP90, la spécificité réside probablement non pas dans HSP90 mais plutôt dans la protéine adaptatrice Cdc37, capable de ponter HSP90 et ses protéines kinases clientes (Pearl, 2005). Cette spécificité pour une protéine adaptatrice a déjà été observée avec WISp39 pour d'autres protéines clientes comme l'inhibiteur de cdk p21^{WAF/CIP1} (Jascur et al., 2005). L'aspect le moins clair du système HSP90 est certainement de comprendre comment HSP90 puisse maintenir ses protéines clientes dans une conformation qui facilite leurs fonctions biologiques et les discrimine des protéines mal repliées. En effet, bien que HSP90 puisse se lier aux protéines dénaturées *in vitro* (Wiech et al., 1992), ce phénomène ne semble pas avoir de points communs avec l'interaction d'authentiques protéines clientes *in vivo*. Cependant, l'interaction des protéines clientes p53 et de p21WAF/CIP1 avec HSP90, fait intervenir des domaines mal-repliés de ces protéines (Rudiger et al., 2002).

2.1.2. Structure de HSP90

La cristallisation de HSP90 a été réalisée il y a dix ans environ (Prodromou et al., 1996). Cependant, à ce jour, il n'existe aucune donnée de très basse résolution pour la protéine entière.

La première avancée significative vers la structure de HSP90 est venue de la cristallisation d'un petit fragment de 25 KDa obtenu après protéolyse ménagée : le domaine N-Terminal. Sa structure est de type sandwich α/β . La véritable fonction ATPase de ce domaine fut découverte grâce à des homologues de séquences avec deux classes de protéines ATP-dépendantes manipulant l'ADN : les topo-isomères et la protéine de réparation de l'ADN MutL (Bergerat et al., 1997), ainsi que de la cristallisation du domaine N-Terminal de HSP90 de *S.cerevisae*. Il est notable que la geldanamycine, un inhibiteur de l'activité ATPase de HSP90 et dont certains dérivés sont actuellement en phases d'essais cliniques, entre en compétition avec l'ATP pour la liaison au domaine N-Terminal.

Le segment central a aussi été isolé et cristallisé après protéolyse ménagée de HSP90 de levure. Il contient en fait un grand et un petit domaine de type $\alpha\beta\alpha$ connectés par une série de petites hélices qui forment une partie plus flexible. Alors que le repliement du grand domaine est du même type que le domaine de liaison à l'ADN de MutL et GyrB (Gyrase B), le petit domaine possède un nouveau type de repliement (Meyer et al., 2003). Le segment central semble jouer deux rôles critiques pour HSP90. Cette partie est responsable de l'activité ATPase de HSP90, et permet aussi sa liaison aux protéines clientes.

Très récemment, la structure du domaine C-Terminal de HtpG (homologue de HSP90 chez E.coli) a été résolue (Harris et al., 2004). Bien que cette protéine présente de nombreuses homologues de séquence avec HSP90, elle ne possède pas le motif MEEVD responsable de la liaison de HSP90 avec les co-chaperonnes à domaine tetradecapeptide. En accord avec les études biochimiques, bien que ce domaine soit nécessaire à la dimérisation de HSP90, à sa liaison aux protéines clientes (Minami et al., 1994), il n'est pas requis pour l'activité ATPase de la chaperonne.

La démonstration formelle que l'accrochage et l'hydrolyse de l'ATP sont des clefs dans la fonction de HSP90, laisse penser que les cycles ATPasiques de HSP90 pourraient coordonner l'activation des protéines clientes. Des changements conformationnels de HSP90 en présence d'ATP ont déjà été observés, et généralement interprétés en terme de transition structurale d'une conformation hydrophobe ouverte vers une conformation plus fermée (Csermely et al., 1993 ; Grenert et al., 1997 ; Sullivan et al., 1997). Des approches structurales et de mutagenèse dirigée de HSP90 ont mis en évidence que les domaines N-Terminaux sont transitoirement associés lorsque la chaperonne est liée à l'ATP. De ce fait, le cycle d'hydrolyse de l'ATP est parfaitement associé avec l'ouverture et la fermeture d'une pince moléculaire des dimères de HSP90 (Prodromou et al., 2000 ; Chadli et al., 2000). Ce mécanisme biochimique est partagé avec l'ATPase GyrB (Kampranis et al., 1999), (voir **figure IV.2**).

2.1.3. Co-chaperonnes et fonctions de HSP90

In vivo, HSP90 fonctionne avec une pléthore de co-chaperonnes. A ce jour, en effet, plus d'une douzaine de co-chaperonnes ont été identifiées et semblent pouvoir moduler la structure et la fonction de HSP90. A l'heure actuelle, les recherches s'orientent sur les différentes combinaisons possibles de ces co-chaperonnes et visent à déterminer leurs rôles.

Les co-chaperonnes à domaine tetratricopeptide (TPR) ont été les premières à être identifiées. Elles constituent la plus grande famille des co-chaperonnes de HSP90. Le domaine TPR est un domaine à hélices concaténées d'environ 34 acides aminés (Das et al., 1998). Il interagit généralement avec le motif MEEVD de la partie C-Terminale de HSP90 (Chen et al., 1998 ; Young et al., 1998 ; Radanyi et al., 1994 ; Owens-Grillo et al., 1996 ; Ratajczak and Carrello, 1996). Le domaine TPR de certaines co-chaperonnes peut aussi interagir avec le motif IEEVD de la partie C-Terminale de HSP70.

Les co-chaperonnes à domaine TPR ont des rôles éclectiques et partagent peu de similarités biochimiques. Par exemple, WISp39 semble promouvoir le recrutement de protéines clientes de HSP90 (Jascur et al., 2005), tandis que Hop/Sti1/p60 ou le récepteur membranaire mitochondrial Tom70, facilitent le recrutement de HSP90 (Smith et al., 1993 ; Young et al., 2003).

Certaines co-chaperonnes à domaine TPR possèdent des activités catalytiques spécifiques. Ainsi, les immunophilines Cyp40 et les FKBP sont des peptidyl-prolyl isoméras (Dolinski et al., 1997), PP5 est une Ser/Thr phosphatase (Silverstein et al., 1997), et CHIP est une E3/E4-ubiquitine-ligase (Jiang et al., 2001). Mis à part CHIP, dont l'activité ubiquitine-ligase est requise pour la dégradation protéasomale des protéines clientes (Murata et al., 2001), le rôle biologique des activités enzymatiques associées à un domaine TPR reste obscur.

Bien que la présence de plusieurs domaine TPR permette à la co-chaperonne Hop/Sti1 de se lier simultanément à HSP90 et à HSP70, dans d'autres cas comme celui de CHIP, la présence d'un seul domaine TPR assure l'exclusivité de la liaison à HSP90 ou à HSP70 (Ballinger et al., 1999 ; Connell et al., 2001). Il est aussi intéressant de constater que HSP90, en tant que dimère, possède deux motifs MEEVD. HSP90 pourrait donc être théoriquement liée à deux co-chaperonnes différentes. Néanmoins, de nombreuses co-chaperonnes comme CHIP ou Hop/Sti1 sont aussi des dimères (Prodromou et al., 1999 ; Nikolay et al., 2004) et peuvent donc exclure d'autres co-chaperonnes (Owens-Grillo et al., 1996 ; Silverstein et al., 1997 ; Ratajczak et al., 1990).

La régulation de l'activité ATPase de HSP90 est un phénomène très étudié, puisqu'il est responsable de l'activation des protéines clientes de HSP90. A ce jour, les rôles des co-chaperonnes de HSP90 restent encore à définir. Néanmoins, on peut en dégager les grandes lignes.

Trois co-chaperonnes différentes, Hop/Sti1, Cdc37 ainsi que p23, sont des inhibiteurs de l'activité ATPase de HSP90 (Panaretou et al., 2002 ; Prodromou et al., 1999 ; Siligardi et al., 2002). En revanche, Aha1 et Cpr6 ont un effet activateur (Panaretou et al., 2002 ; McLaughlin et al., 2002). Par une approche biochimique très fine, Prodromou et collaborateurs ont mis en évidence un mécanisme séquentiel d'activation des protéines clientes. Lors d'une première étape, les co-chaperonnes Hop/Sti1 ou Cdc37 se lient à HSP90 et la bloquent dans une conformation hydrophobe ouverte, dépourvue d'activité ATPase. La protéine cliente peut alors être chargée sur les dimères de HSP90. Lors d'une seconde étape, Cpr6 exclue Hop/Sti1 ou Cdc37. HSP90 peut alors hydrolyser l'ATP et activer la protéine cliente (Prodromou et al., 1999).

A la différence de chaperonnes comme GroEl ou HSP70, HSP90 ne semble pas impliquée dans le repliement ou dépliement de ses protéines clientes. En revanche, HSP90 jouerait subtilement sur la conformation ou le repliement de certains domaines de celles-ci. De ce fait, HSP90 faciliterait souvent, mais pas toujours, l'interaction de ces protéines avec leur ligand. Les récepteurs aux hormones stéroïdiennes sont certainement les meilleurs exemples que l'on puisse trouver pour illustrer cela. Leurs interactions avec le système HSP90/HSP70, les convertit d'un état de faible affinité en une structure qui peut se lier à son ligand, et se dimériser (Pratt et al., 2004).

L'activation des protéines kinases par le système HSP90 est beaucoup moins bien caractérisée. Néanmoins, l'utilisation de systèmes acellulaires et l'isolement de complexes endogènes ont permis d'explorer le phénomène de liaison des kinases aux complexes HSP90-Cdc37 (Stancato et al., 1993 ; Zhao et al., 2004). De façon très intéressante, la majorité des protéines kinases clientes sont plus facilement activables si elles sont en complexe avec HSP90, qu'en l'état dissocié. En fait, il semblerait que HSP90 provoque un changement subtil de conformation de ces protéines kinases, exposant leurs régions phosphorylables d'activation. Qui plus est, HSP90 semble protéger certaines kinases phosphorylées d'une déphosphorylation, comme c'est le cas pour PKB/Akt (Sato et al., 2000). Le rôle de HSP90 serait alors de maintenir dans la cellule un réservoir de kinases actives.

2.2. HSP70

HSP70 est une protéine très conservée (50% d'homologies de séquence avec DnaK procaryote, et structure très voisine – Lindquist and Craig, 1988).

Contrairement à HSC70 qui représente la protéine constitutive non inductible, HSP70 est une enzyme inductible par des stress chimiques, physiologiques ou physiopathologiques. Elle est constituée de 3 domaines de 44, 18 et 10 kDa. Cote N-terminal, le domaine de 44 kDa possède une activité ATPase à très forte homologie avec les domaines ATP ase des hexokinases et de l'actine (Flaherty et *al.*, 1990 ; Flaherty et *al.*, 1991, **Figure IV.3**). Le domaine de 18 kDa représente la partie de la molécule capable de fixer les peptides. Le domaine C-terminal de 10 kDa d'oligomérisation est contigu au motif EEVD. Ce motif est retrouvé chez HSP90.

Les membres de la famille HSP70 sont des chaperonnes moléculaires. Elles fixent transitoirement et stabilisent des protéines mal repliées. Elles contrôlent le repliement correct (Frydman et *al.*, 1994), l'oligomérisation et semblent accompagner les protéines à la dégradation par le système ubiquitine/protéasome (Bukau and Horwich, 1998 ; Fink and 1999 ; Georgopoulos and Welch, 1993).

2.3. HSP27

Elle fait partie de la famille des petites protéines du choc thermique, et montre une forte induction à la suite d'un stress cellulaire (environ 15 fois). A la différence de son orthologue murin HSP25, HSP27 possède de nombreuses sérines cibles de phosphorylation par MK2 en cas de stress (Ciocca et *al.*, 1993 ; Freshney et *al.*, 1994, **Figure IV.4**) ce qui provoquerait sa translocation nucléaire. Dans les cellules non stressées, HSP27 est sous forme d'oligomères de 200-800 kDa pour atteindre près de 2000 kDa après choc thermique (Arrigo et *al.*, 1988). Il semblerait que ces structures oligomériques soient très dynamiques. Elles permettraient de disposer en permanence de la protéine de façon à exercer rapidement ses fonctions cellulaires (Ehrnsperger et *al.*, 1999). De plus, HSP27 est fortement exprimée dans le muscle squelettique (Gernold et *al.*, 1993) et dans un nombre important de lignées cellulaires tumorales (Garrido et *al.*, 2001).

Trois voies d'actions de HSP27 ont fait l'objet d'investigations aboutissant à des observations très intéressantes. Premièrement, il semble que HSP27 puisse inhiber le déclenchement des voies complexes en bloquant les caspases 3 et 9 et le cytochrome c, actives en conditions de stress (Beere, 2004 ; Garrido et *al.*, 1999 ; Garrido et *al.*, 2001 ; Paul

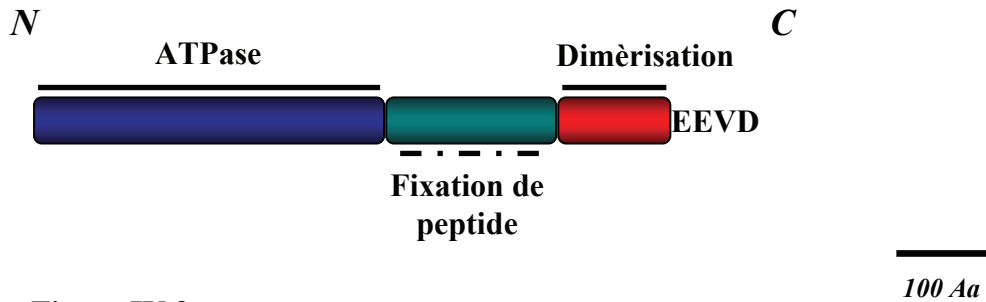


Figure IV.3

Structure primaire de HSP70. Le domaine ATPase-chaperonne ainsi que celui de dimérisation sont indiqués. Le motif EEVD est un motif important dans le recrutement de partenaire. Cependant la région de fixation de peptide reste nécessaire à l'interaction avec la plupart des partenaires de HSP70.

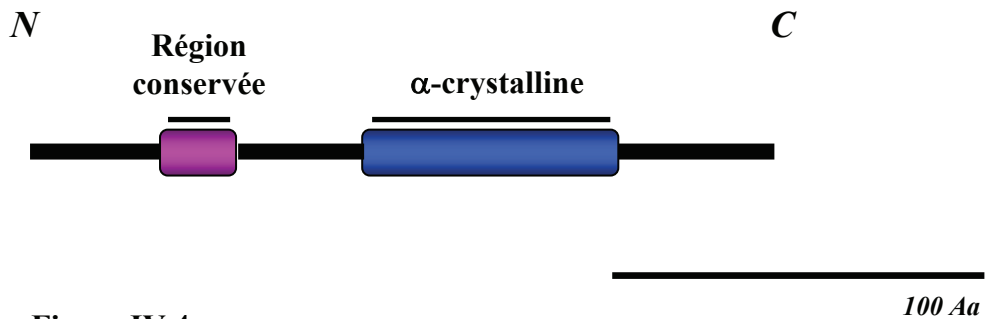


Figure IV.4

Structure primaire de HSP27. Le domaine d'homologie avec l' α -crystalline ainsi que la région N-Terminale très conservée chez les eucaryotes supérieurs sont indiqués.

et *al.*, 2002). De façon concomitante, HSP27 contribue à l'activation de la voie NF- κ B car il escorte I κ B unités jusqu'au spécifique 26S (Parcellier et *al.*, 2003). De plus, les études de Benndorf, Huot et collègues montrent que HSP27 unités pendant la récupération après un stress promeut la polymérisation de l'actine et sa protection (Benndorf et *al.*, 1994 ; Huot et *al.*, 1996). Enfin, HSP25 inhibe la synthèse protéique durant une hyperthermie sévère en séquestrant eIF4 (Cuesta et *al.*, 2000).

C. Mécanismes de contrôle de la réponse cellulaire au stress

1- Activation de la réponse cellulaire au stress

Un stress cellulaire provoque une induction de la quantité des HSPs. Nous allons en décortiquer rapidement le mécanisme.

1.1. Chez les procaryotes

Les premières informations sur la transcription des gènes HSPs ont été obtenues à partir d'études utilisant la bactérie *E.coli*. En 1993, une approche par électrophorèse bidimensionnelle (Yura et *al.*, 1993) a montré que 20 HSPs sont induites suite à un choc thermique. Cette induction est contrôlée par les facteurs de transcriptions sigma 24 et sigma 32 (Fujita and Ishihama, 1987 ; Laskowska et *al.*, 1996 ; Storz, 1999 ; Straus et *al.*, 1987 ; Straus et *al.*, 1990). La quantité de sigma 32 est modulée par un rétrocontrôle négatif de DnaK, DnaJ et GrpE, dont la transcription dépend de sigma 32 (Storz, 1999).

1.2. Chez les eucaryotes

Les gènes des HSPs sont ici généralement contrôlés par des motifs dans leurs régions promotrices nommées HSE (Heat Shock response Element). Ces régions sont capables de fixer spécifiquement des facteurs de transcription impliqués la mise en place de la réponse cellulaire au stress : les HSFs (Heat Shock Factors).

Dans la réponse au stress, HSF1 est le principal activateur transcriptionnel chez les mammifères (McMillan et *al.*, 1998 ; Xiao et *al.*, 1999). A l'état non activé, HSF1 a une répartition nucléaire diffuse et très faiblement cytoplasmique (Mercier et *al.*, 1999).

Ce facteur est divisé en plusieurs domaines importants (**Figure IV.5**). Premièrement, du côté N-Terminal, un domaine de liaison à l'ADN permet sa fixation spécifique sur les

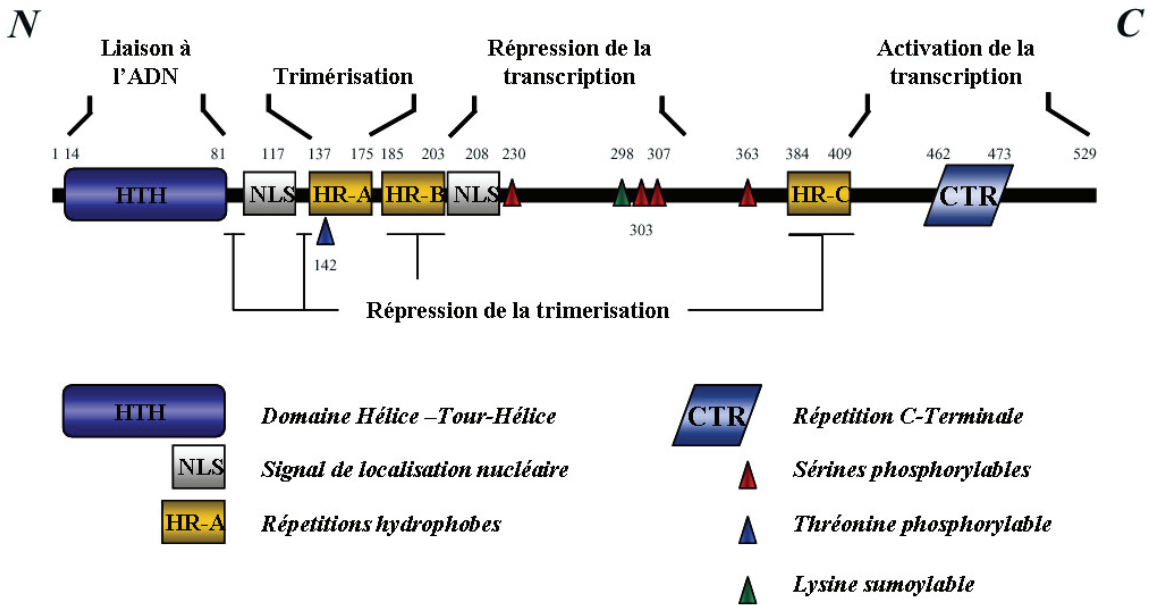
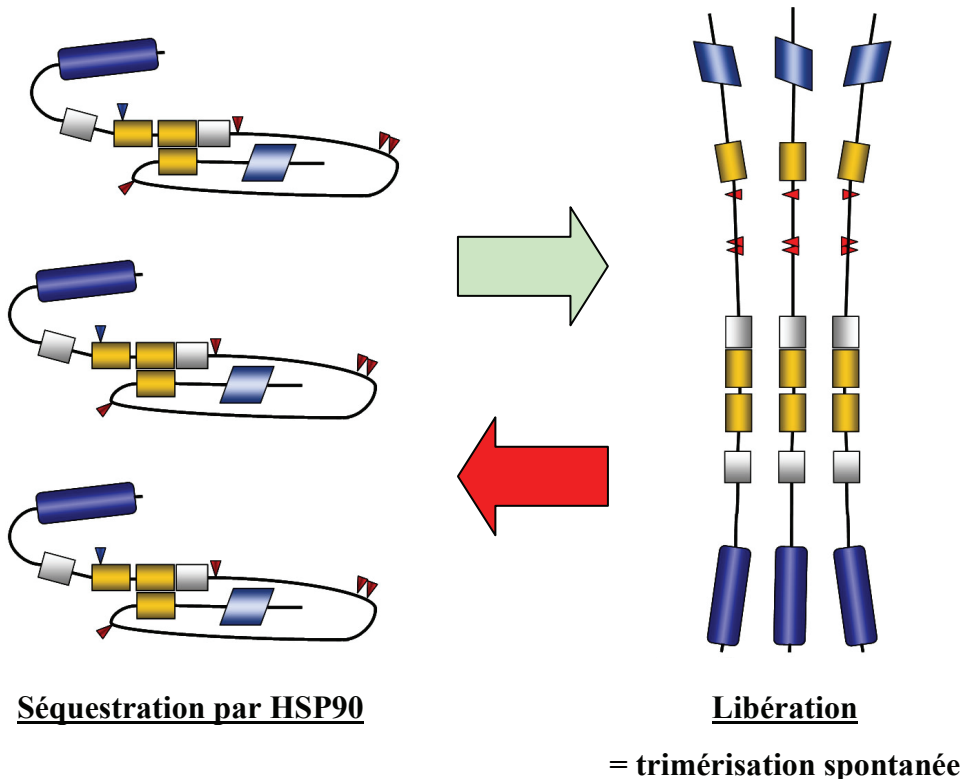


Figure IV.5

Structure primaire et modifications potentielles de HSF1. Sur ce schéma, il est notable que les répétitions hydrophobes régulant la répression de HSF1, se trouvent réparties le long de la protéine. Le repliement de HSF1, grâce à certaines de ces répétitions, permet donc de moduler l'accessibilité du domaine de liaison HTH à l'ADN, mais aussi les signaux de localisation nucléaire. Ce repliement est d'une importance capitale pour réguler l'activation de HSF1. Il est notamment régulé par HSP90 et ses co-facteurs associés.

Le panneau du bas montre comment le relargage de HSF1 par HSP90 provoque sa trimérisation spontanée, phénomène qui tend vers l'activation de HSF1. La recapture par HSP90 provoque la répression de HSF1.



régions HSE. De plus, HSF1 contient deux domaines d'activation du cote C-terminal (CTR) sous le contrôle d'un domaine de régulation (RD) placé dans la partie centrale de la protéine (Green *et al.*, 1995). Comme le domaine CTR n'est pas régulé lui-même par la température, le domaine RD est proposé comme le détecteur du choc thermique (Newton *et al.*, 1996). Deux régions conservées HRA/B et HRC semblent impliquées dans la trimérisation de HSF1 (Peteranderl and Nelson, 1992 ; Sorger and Nelson, 1989). Enfin, contigu au domaine de liaison à l'ADN, un NLS est dévoilé après choc thermique, et cible le facteur de transcription dans le noyau (**Figure IV.5 et Figure IV.6**).

Le modèle de la régulation de HSF1 dans l'activation des gènes HSPs fait intervenir des acteurs qui participent à la fixation de HSF1 sur l'ADN, l'activité transcriptionnelle, la désactivation et le désassemblage des trimères de HSF1 (Bharadwaj *et al.*, 1999 ; Guo *et al.*, 2001 ; Marchler and Wu, 2001 ; Shi *et al.*, 1998 ; Voellmy, 2004 ; Zou *et al.*, 1998). Dans ce modèle, HSF1 est monomérique dans les cellules non stressées, séquestré sous forme inactive par un complexe composé de HSP90, P23 et d'immunophilines (FKBP52). Pendant un stress, le complexe se dissocie (**Figure IV.5 et Figure IV.6**). Dans cette première étape, HSF1 peut se trimériser. L'hypothèse émise est que l'augmentation de la concentration en protéines déstructurées titre les chaperonne du complexe, et libère les monomères de HSF1, rendant alors possible sa trimérisation. Dans une seconde étape, HSF1 est transloqué dans le noyau et peut se lier aux HSE en amont des gènes des HSPs. Dès lors, HSF1 subit des phosphorylations activatrices qui prennent l'ascendant sur ses phosphorylations inhibitrices. Cette dernière étape est une étape de transactivation, nécessaire pour initier la transcription de ses gènes cibles (**Figure IV.5 et Figure IV.6**). Pendant l'activation de la transcription, HSF1 favorise l'initiation et l'élongation en recrutant des facteurs de remodelage de la chromatine et ceux de la machinerie transcriptionnelle.

2. Régulation de l'activation de la réponse cellulaire au stress

Il est important de réguler le déclenchement de la réponse cellulaire au stress, les HSPs étant des régulateurs de nombreux processus cellulaires ((**Figure IV.5 et Figure IV.6**).

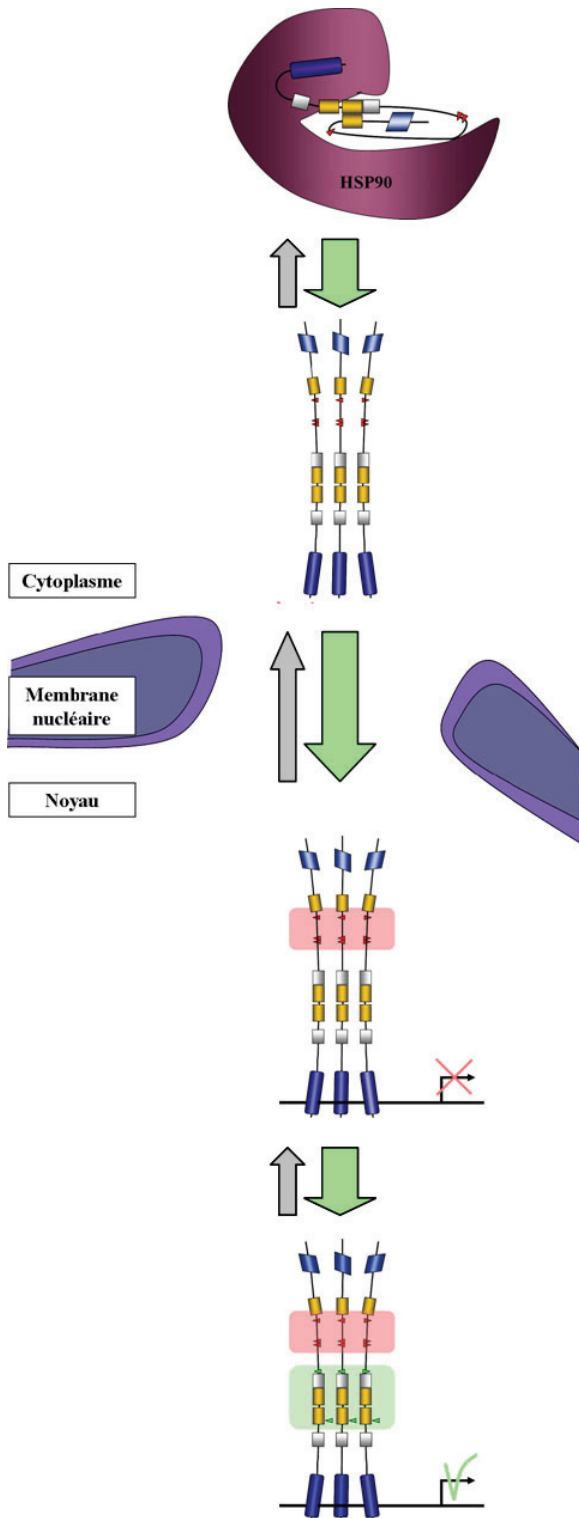


Figure IV.5

Mécanisme d'activation de HSF1. Au cours d'un stress chimique ou thermique, HSF1 est relâché par les complexes HSP90 et se trimérise spontanément. Les signaux de localisation nucléaires sont donc exposés et accessibles aux protéines d'import nucléaire. Les trimères d'HSF1 sont alors transloqués dans le noyau, et peuvent alors se fixer sur les régions HSE (Heat Shock response Element) au sein de régions promotrices des gènes cibles de HSF1. Dans une dernière étape, les phosphorylations activatrices que HSF1 subit (résidu sérine 230 et thréonine 242), contre balancent ses phosphorylations inhibitrices (résidus sérine 303, 307 et 363). D'autre part, il semblerait que la sumoylation transitoire de HSF1 (résidu lysine 298) favorise aussi son activation. HSF1 possède dès lors une activité transactivatrice, et peut alors recruter l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle permettant la surexpression de ses gènes cibles.

Le contrôle de l'activation de HSF1 est donc spatial (séquestration cytoplasmique) et temporel (contrôle par les kinases et les phosphatases dont l'activité ou la localisation varie au cours du stress; rétrocontrôle par le produit de ses gènes cibles comme HSP70 via CHIP).

2.1. Avant un stress

En plus de l'inhibition de HSF1 par sa prise en charge par HSP90 (Zou et al., 1998), des phosphorylations inhibitrices sur les résidus S303, 307 et 363 maintiennent HSF1 sous forme inactive. Ceci est réalisé par certaines MAP kinases (Chu et al., 1998 ; Kline and Morimoto, 1997). Un troisième niveau de régulation fait intervenir la protéine CHIP interagissant avec HSP90 et HSP70, agissant sur leur domaine ATPase (Ballinger et al., 1999). CHIP participerait à la dissociation de P23 du complexe HSP90-HSF1, étape nécessaire à la libération de HSF1 (McDonough and Patterson, 2003).

2.2. Après un stress

Les HSPs, notamment HSP70 opèrent un rétrocontrôle négatif sur l'activation de HSF1 (Boorstein and Craig, 1990 ; Wu, 1995). Ce mécanisme a aussi été observé chez les procaryotes (Craig and Gross, 1991). Le mécanisme de désactivation de HSF1 par les chaperonnes est expliqué par leur participation au désassemblage des trimères de HSF1 (Shi et al., 1998).

En plus du rétrocontrôle par les HSPs, d'autres protéines sont connues pour fixer et inhiber HSF1. De façon très intéressante, les travaux de Satyal et collègues (Satyal et al., 1998), ont permis de montrer que HSPB1 (heat shock factor binding protein 1 ou HSP27) est capable de se fixer sur les répétitions hydrophobes du domaine de trimérisation de HSF1. HSPB1/HSP27 est une protéine nucléaire de 205 acides aminés. HSPB1/HSP27 inhibe la fixation de HSF1 sur l'ADN.

Enfin, la régulation de l'activation de HSF1 passe aussi par un contrôle de sa phosphorylation (Voellmy, 2004 ; Xia and Voellmy, 1997 ; Zuo et al., 1995). L'hyper phosphorylation est généralement associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle. Plus précisément, certaines kinases phosphorylent HSF1 sur des résidus spécifiques pour induire ou réprimer son activité, comme la CAMKII (Ca²⁺ calmodulin dependent protein kinase II - Holmberg et al., 2001), la CK2 (casein kinase 2 - Soncin et al., 2003), la PKC α (protein kinase C alpha - Yang et al., 2004), la GSK3 (glycogen synthase kinase 3 - Chu et al., 1998 ; Xavier et al., 2000) et ERK1 (extracellular signal regulated kinase 1 - Chu et al., 1996 ; Wang et al., 2004). Les phosphatases responsables de la déphosphorylation de HSF1

peuvent être inactivées durant le choc thermique et HSP70 peut faciliter leur retour à une forme active.

Résultats

Résultats

A. Le complexe HDAC6-p97/VCP contrôle le recyclage des chaînes de poly-ubiquitine

1- Présentation de l'article 1

HDAC6 est une histone déacétylase atypique puisque sa localisation sub-cellulaire est majoritairement cytoplasmique (Verdel and Khochbin, 1999). Des travaux précurseurs de recherche de partenaires de HDAC6, conduits dans le laboratoire, ont pu montrer que chez la souris HDAC6 est retrouvé en complexe avec PLAP (Phospholipase A2-activating protein, orthologue de UFD3 de *S.cerevisiae*) et p97/VCP (Valosin Containing Protein). Ces deux protéines sont respectivement les orthologues murin de deux protéines de *S.cerevisiae*, UFD3 et Cdc48p, qui sont des régulateurs positifs de la dégradation des protéines par le système ubiquitine/protéasome. De plus, HDAC6 possède dans sa partie C-Terminale, un domaine de liaison à l'ubiquitine fonctionnel, ZnF-UBP (Zinc Finger in Ubiquitin specific Proteases). Ce domaine est très conservé chez certaines protéases spécifiques de l'ubiquitine, mais sans activité catalytique (Seigneurin-Berny et al., 2001 ; Boyault and Khochbin, résultats non publiés).

Deux considérations sont à tirer de ces études. Premièrement, HDAC6 est potentiellement une protéine impliquée dans la voie d'ubiquitination des protéines. Deuxièmement, le domaine ZnF-UBP de HDAC6 s'ajoute à la longue liste de domaines connus pour interagir avec l'ubiquitine (Harper and Schulman, 2006). Cependant, alors que les autres domaines d'interaction ont fait l'objet de caractérisations intensives, aucune donnée n'était disponible pour le domaine ZnF-UBP.

Lorsque j'ai débuté mes travaux de recherche, il nous paraissait évident que la caractérisation des fonctions ubiquitine-dépendantes de HDAC6 passait obligatoirement par la caractérisation structurale et fonctionnelle de son domaine ZnF-UBP, avant de passer à l'étude fonctionnelle de la protéine entière.

Le papier qui suit répond à ces interrogations. En effet, nous avons pu montrer que le domaine ZnF-UBP de HDAC6 est un domaine structuré à 3 doigts de zinc, en coordination mixte cystéines et histidines. A notre connaissance, ce domaine est celui qui a la plus haute

affinité pour les monomères d'ubiquitine, ce qui lui permet de diminuer le recyclage des chaînes de poly-ubiquitine, ainsi que celui des protéines poly-ubiquitinées, *in vitro* et *in vivo*.

La stabilisation des protéines poly-ubiquitinées est un phénomène qui doit être hautement contrôlé par la cellule. Après cette observation, il devenait clair pour nous que la liaison de HDAC6 aux chaînes d'ubiquitine des protéines à dégrader ne devait pas échapper à cette règle. Nous avons pu montrer dès lors que la chaperonne p97/VCP contrecarre l'action de HDAC6, en dissociant les complexes HDAC6-ubiquitine. Nous proposons donc un modèle dans lequel le complexe HDAC6-p97/VCP tiendrait une place clef dans la dégradation des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome. Un excès de p97/VCP provoquerait une prise en charge et une dégradation plus rapide des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome. Au contraire, un excès de HDAC6 stabiliserait ces mêmes protéines qui tendraient alors à s'agréger. De plus, les complexes HDAC6-p97/VCP semblent moduler le recyclage des chaînes de poly-ubiquitine.

HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover

Cyril Boyault, Benoit Gilquin, Yu Zhang, Vladimir Rybin, Elspeth Garman, Wolfram Meyer-Klaucke, Patrick Matthias, Christoph W Müller, and Saadi Khochbin (2006)
EMBO J. 25(14):3357-66

HDAC6–p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover

Cyril Boyault¹, Benoit Gilquin¹, Yu Zhang², Vladimir Rybin³, Elspeth Garman⁴, Wolfram Meyer-Klaucke⁵, Patrick Matthias², Christoph W Müller^{6,*} and Saadi Khochbin^{1,*}

¹INSERM U309, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, Equipe chromatine et expression des gènes, Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, La Tronche, France, ²Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Novartis Research Foundation, Basel, Switzerland, ³European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany, ⁴Laboratory of Molecular Biophysics, Department of Biochemistry, Oxford University, Oxford, UK, ⁵European Molecular Biology Laboratory, Hamburg, Germany and ⁶European Molecular Biology Laboratory, Grenoble, France

HDAC6 is a unique cytoplasmic deacetylase capable of interacting with ubiquitin. Using a combination of biophysical, biochemical and biological approaches, we have characterized the ubiquitin-binding domain of HDAC6, named ZnF-UBP, and investigated its biological functions. These studies show that the three Zn ion-containing HDAC6 ZnF-UBP domain presents the highest known affinity for ubiquitin monomers and mediates the ability of HDAC6 to negatively control the cellular polyubiquitin chain turnover. We further show that HDAC6-interacting chaperone, p97/VCP, dissociates the HDAC6–ubiquitin complexes and counteracts the ability of HDAC6 to promote the accumulation of polyubiquitinated proteins. We propose that a finely tuned balance of HDAC6 and p97/VCP concentrations determines the fate of ubiquitinated misfolded proteins: p97/VCP would promote protein degradation and ubiquitin turnover, whereas HDAC6 would favour the accumulation of ubiquitinated protein aggregates and inclusion body formation.

The EMBO Journal (2006) 25, 3357–3366. doi:10.1038/sj.emboj.7601210; Published online 29 June 2006

Subject Categories: proteins; molecular biology of disease

Keywords: CFTR; E4; neurodegenerative diseases; USP; zinc-finger

*Corresponding authors. S Khochbin, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, de la Différenciation, INSERM U309, Equipe chromatine et expression des gènes, Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France. Tel.: +33 4 76 54 95 83; Fax: +33 4 76 54 95 95; E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr or CW Müller, European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, BP 181, 38042 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: +33 476 20 75 61; Fax: +33 476 20 71 99; E-mail: mueller@embl-grenoble.fr

Received: 8 December 2005; accepted: 31 May 2006; published online: 29 June 2006

Introduction

HDAC6, a member of class II HDACs, was first identified in the mouse (Verdel *et al*, 1999), and both the mouse and its human orthologue were shown to deacetylate histones *in vitro* (Grozinger *et al*, 1999; Verdel *et al*, 1999). Its first identified physiological substrate was however the cytoplasmic protein α -tubulin (Hubbert *et al*, 2002; Matsuyama *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2003). In agreement with this finding, the early functional studies of mouse HDAC6 showed that it is actively maintained in the cytoplasm (Verdel *et al*, 2000). Moreover, its human orthologue contains an additional domain responsible for a stable maintenance of HDAC6 in the cytoplasm (Bertos *et al*, 2004), suggesting that the protein functions primarily in this compartment. HDAC6 contains a region of homology with the non-catalytic domain of several ubiquitin-specific proteases (USPs) known as ZnF-UBP (Amerik *et al*, 2000). HDAC6 ZnF-UBP domain interacts efficiently with free or bound monomeric ubiquitin (Seigneurin-Berny *et al*, 2001), as well as with polyubiquitin chains (Hook *et al*, 2002). The purification of an HDAC6-containing complex from mouse testis cytosolic extracts showed that HDAC6 is associated with at least two proteins homologous to yeast proteins involved in the ubiquitin fusion and degradation (UFD) pathway (Seigneurin-Berny *et al*, 2001). One of these proteins is the phospholipase A2 activating protein, a mouse orthologue of the yeast UFD3 involved in cellular ubiquitin turnover (Johnson *et al*, 1995). The other is the well-known AAA-ATPase chaperone, p97/VCP, which also interacts with UFD3 (Ghislain *et al*, 1996; Mullally *et al*, 2006; Rumpf and Jentsch, 2006).

HDAC6 deacetylase activity may control the stability of the dynamic pool of microtubules through an unknown mechanism (Matsuyama *et al*, 2002). It may also coordinate microtubules and actin networks (Destaing *et al*, 2005) and finally, by deacetylating its second known substrate, HSP90, it may also control the chaperone activity of this protein (Kovacs *et al*, 2005).

Less is known about the function of HDAC6 ubiquitin-binding activity. HDAC6, through its simultaneous binding to minus end-directed dynein motors and to ubiquitinated protein aggregates, is thought to act as an adaptor, linking these aggregates to the moving microtubules in order to achieve the formation of the so-called cellular aggresomes (Kawaguchi *et al*, 2003).

Here, using a series of biophysical approaches, we first characterized the ZnF-UBP domain of HDAC6. These experiments showed that HDAC6 ZnF-UBP binds one ubiquitin molecule with the highest known affinity. The combination of particle-induced X-ray emission (PIXE) and extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) revealed the presence of three zinc atoms per molecule of HDAC6 ZnF-UBP ligated on average by one histidine and three cysteine residues. Biochemical and biological studies, including the use of cell lines from HDAC6^{-/-} mice re-expressing wild type or a non-

ubiquitin-binding HDAC6 mutant, showed that the high-affinity binding of ubiquitin by HDAC6 stabilizes poly-ubiquitin chains and favours the formation of aggresomes containing cystic fibrosis transmembrane conducting regulator (CFTR). Interestingly, the HDAC6 partner, p97/VCP, dissociates HDAC6-ubiquitin complexes and hence regulates the ubiquitin-dependent functions of HDAC6. This work shows for the first time that a finely tuned balance of HDAC6 and p97/VCP concentrations defines the stability of the pool of ubiquitinated proteins and determines their fate.

Results

HDAC6 ZnF-UBP binds ubiquitin with high affinity

In order to better characterize HDAC6 ZnF-UBP domain, we first selected a portion of the HDAC6 C-terminal region spanning residues 1000–1149, which includes the entire USP homology region (Figure 1A, see also Figure 2B). The corresponding encoding sequence was cloned in an expression vector and the protein expressed and purified (data not shown).

Gel filtration (Pharmacia Superdex 75) analysis showed that the ZnF-UBP domain eluted at a volume of 11.9 ml

compatible with the ZnF-UBP domain being an elongated monomer or forming dimers. ZnF-UBP and ubiquitin co-eluted at 11.4 ml, suggesting that both components associate at an equimolar ratio (Figure 1B). Sedimentation equilibrium experiments of ubiquitin, HDAC6 ZnF-UBP domain and HDAC6 ZnF-UBP domain/ubiquitin complex yielded masses of 11.3, 17.5 and 28.3 kDa, respectively, which is in excellent agreement with their molecular weights (His-ubiquitin: 11.5 kDa; HDAC6 ZnF-UBP domain: 17.0 kDa; HDAC6 ZnF-UBP domain/ubiquitin complex: 28.5 kDa) (Figure 1C). Similar results were obtained in sedimentation velocity experiments (data not shown). Our results demonstrate that the ZnF-UBP domain and ubiquitin are monomeric in solution and that they associate in a 1:1 complex.

The binding of ubiquitin to the HDAC6 ZnF-UBP domain was studied quantitatively using isothermal titration calorimetry (ITC; Figure 1D). The affinity of the HDAC6 ZnF-UBP domain to ubiquitin is high with a calculated equilibrium constant (K_D) of 60 nM and a stoichiometry of 1:1 ($N = 1.071 \pm 0.004$). The ΔH for the binding of ubiquitin to the HDAC6 ZnF-UBP domain is $\Delta H = -17.9 \pm 0.1$ kcal/mol, suggesting a substantial number of non-covalent interactions between both partners. In comparison, the USP5 ZnF-UBP

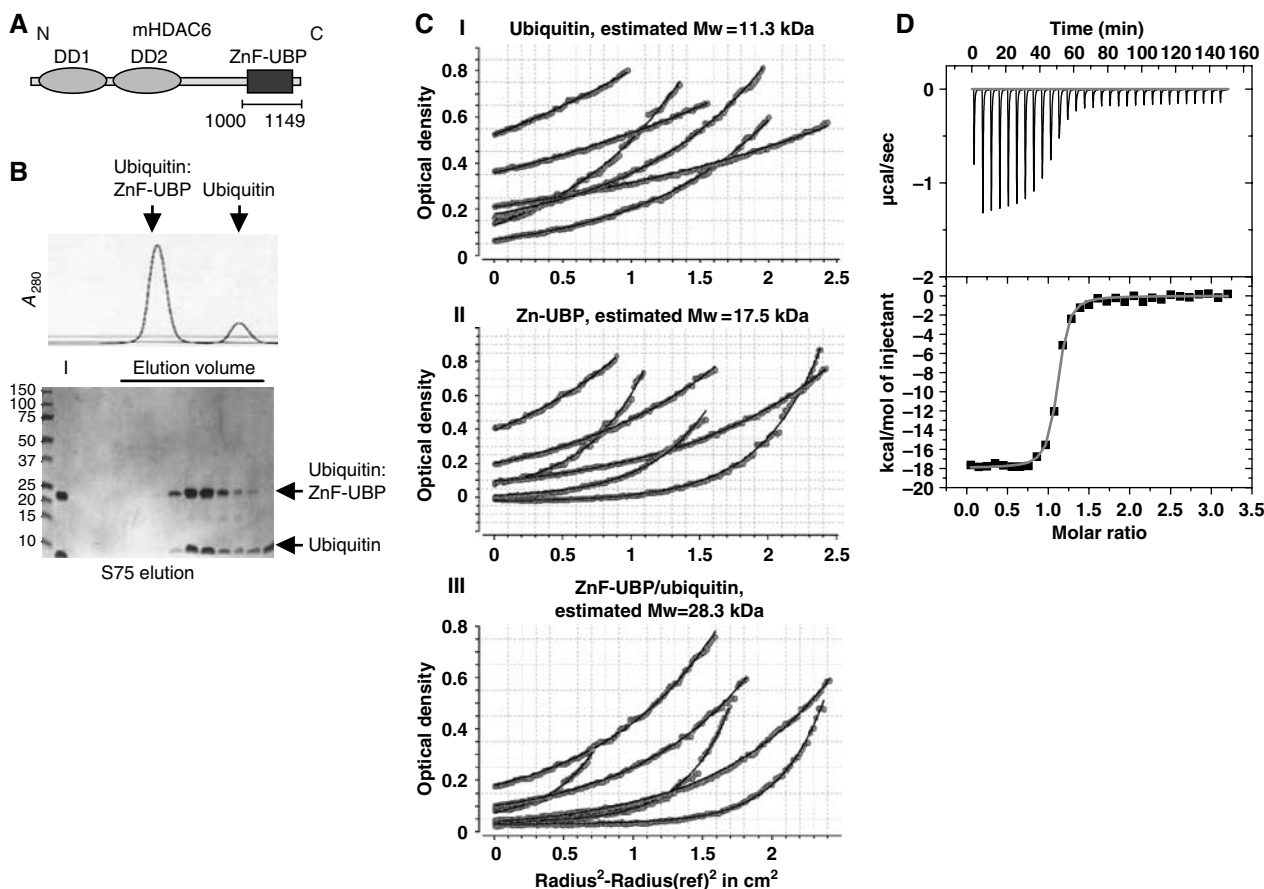


Figure 1 Characterization of the HDAC6 ZnF-UBP-ubiquitin interaction. (A) Schematic representation of HDAC6 functional domains. The two catalytic domains, DD1 and DD2, as well as the ubiquitin-binding domain, ZnF-UBP, of mouse HDAC6 are indicated. (B) HDAC6 ZnF-UBP forms a stable 1:1 complex with ubiquitin. Size-exclusion chromatography shows the formation of the HDAC6 ZnF-UBP/ubiquitin complex (upper panel). The lower panel shows the peak fractions analysed by SDS-PAGE. I stands for input. (C) Overlay of data (points) and fitted curves (lines) for a global analysis of equilibrium sedimentation data. The scans taken at multiple loading concentrations and multiple speeds are fit to single-component models: ubiquitin (I); HDAC6 ZnF-UBP (II); HDAC6 ZnF-UBP/ubiquitin complex (III). (D) ITC profile for the binding of ubiquitin to HDAC6 ZnF-UBP. Data were fitted to a one-site model. Values obtained for the binding were as follows: $K_D = 60$ nM; $\Delta H = -17.9$ kcal/mol; $-T^*\Delta S = 8.3$ kcal/mol. The stoichiometry of binding was 1:1.

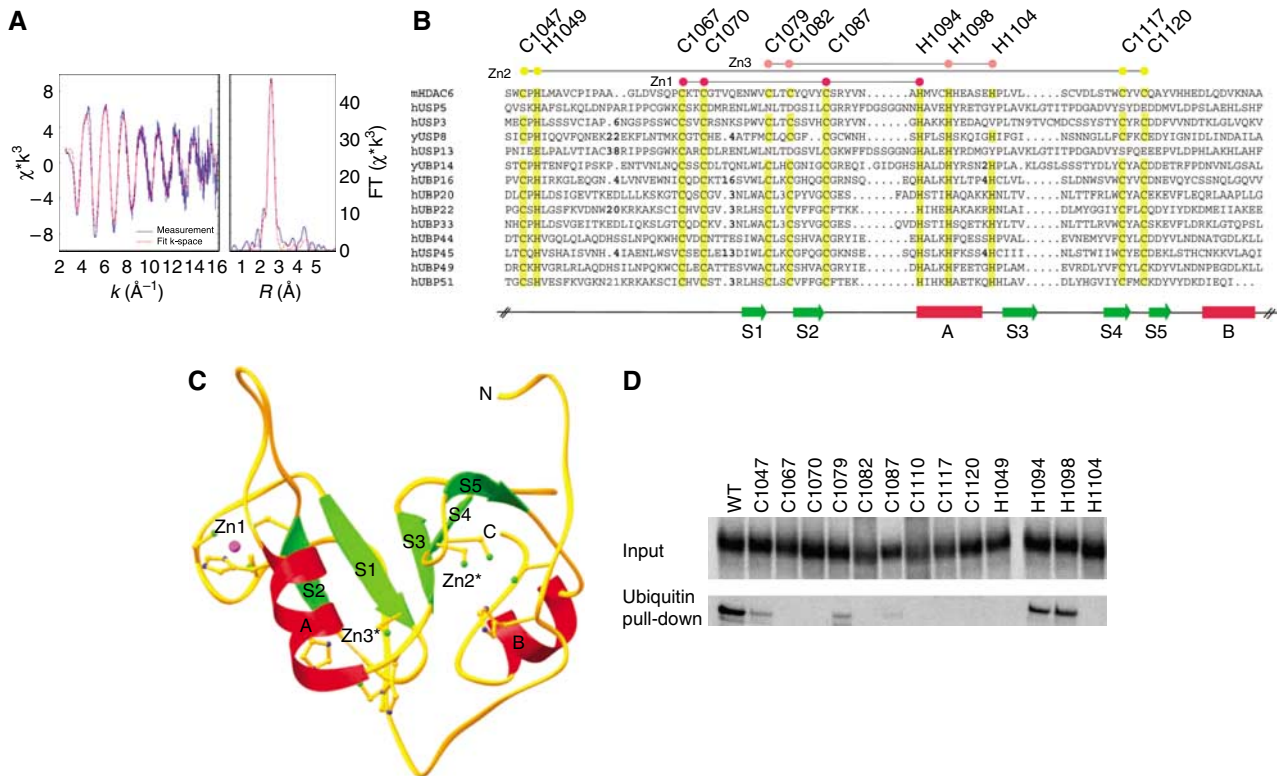


Figure 2 The HDAC6 ZnF-UBP domain contains three Zn atoms critical for ubiquitin binding. **(A)** EXAFS analysis of the HDAC6 ZnF-UBP domain was performed. Left panel: EXAFS spectrum; right panel: Fourier transformation. Experimental and theoretical spectra are represented as solid and dashed lines, respectively. The refinement resulted in an average Zn environment with 1.1 (± 0.3) imidazole unit at 2.01(1) Å and 2.9 (± 0.3) sulphur ligands at 2.31(1) Å. The Debye–Waller factors ($2\sigma^2 = 0.006(1) \text{ \AA}^2$) and the energy shift $\Delta E_F = -9(1) \text{ eV}$ with $EF = 9660 \text{ eV}$ were refined jointly for both shells. **(B)** Alignment of ZnF-UBP domains from the indicated proteins based on the crystal structure of the ZnF-UBP domain of USP5 (Reyes-Turcu *et al*, 2006). Conserved cysteine and histidine residues are highlighted. These residues cluster in positions Zn1, Zn2 and Zn3. In insertions, the number of omitted residues is marked in bold. SwissProt Database entries shown are as follows: HDAC6 (*Mus musculus*; SW: Q9Z2V5), USP5 (human; SW: P45974), UBP3 (human; SW: Q9Y614), UBP8 (*Saccharomyces cerevisiae*; SW: P50102), UBP13 (human; SW: Q92995), UBP14 (*S. cerevisiae*; SW: P38237), UBP16 (human; SW: Q9Y5T5), UBP20 (human; SW: Q9Y2K6), UBP22 (human; SW: Q9UPT9), UBP33 (human; SW: Q8TEY7), UBP44 (human; SW: Q9H0E7), USP45 (human; SW: Q9BRU1), UBP49 (human; SW: Q70CQ1) and UBP51 (human; SW: Q70EK9). **(C)** Ribbon representation of the USP5 ZnF-UBP domain. Zn1 corresponds to the Zn site observed in the crystal structure of USP5. Cys/His residues conserved in most ZNF-UBP domains cluster at two additional sites Zn2 and Zn3. For the ribbon diagram, USP5 residues were mutated to the corresponding Cys/His residues present in HDAC6. Asterisks indicate the predicted Zn positions. **(D)** The indicated cysteines and histidines in the ZnF-UBP domain of HDAC6 were replaced by alanine and the corresponding coding sequence (1047–1121 region of HDAC6) cloned in an expression vector. These constructs were then used to obtain ^{35}S -labelled proteins. A ubiquitin pull-down experiment was performed to evaluate the ubiquitin-binding activity of the *in vitro*-translated proteins. The input panel show 20% of the material used in the pull-down assays. Proteins retained on the ubiquitin beads are shown in the lower panel.

domain binds ubiquitin with a K_D of 3 μM (Reyes-Turcu *et al*, 2006), which roughly falls into the range of affinities for ubiquitin observed for other known ubiquitin-binding domains with K_D values ranging from 10 to 500 μM (Hicke *et al*, 2005). Interestingly, these affinities are substantially weaker than the affinity observed for the HDAC6 ZnF-UBP domain, which binds with the highest known affinity to ubiquitin.

Structural organization of the ZnF-UBP domain

In total, our construct contains 11 cysteine and 10 histidine residues. The large number of conserved cysteine and histidine residues had led to the classification of this domain as a Zn-finger-containing domain in the Conserved Domain Database (Marchler-Bauer *et al*, 2005). We used micro-focussed beam PIXE to determine the exact number of Zn atoms present in the HDAC6 ZnF-UBP domain. X-ray emission of the Zn atoms was calibrated against the relative concentration of sulphur atoms present in the HDAC6 ZnF-UBP domain (11 cysteines + 5 methionines). Several indepen-

dent measurements yielded a total of 2.6 (± 0.3) Zn atoms, corresponding to either two fully occupied and one partially occupied Zn-binding sites or, alternatively, to three partially occupied sites (Supplementary Table 1). We then analysed the coordination of the three Zn atoms using EXAFS (Figure 2A). EXAFS data analysis revealed an average Zn coordination by 2.9 (± 0.3) cysteines and 1.1 (± 0.3) histidines.

The presence of three Zn ions in the structure of the HDAC6 ZnF-UBP domain coordinated by conserved cysteine and histidine residues is supported by the crystal structure of the USP5 ZnF-UBP domain (Reyes-Turcu *et al*, 2006). Structural alignment of 14 different ZnF-UBP domains with the USP5 ZnF-UBP domain as a reference reveals conservation of eight cysteines and four histidines in most ZnF-UBP domains, but not in the USP5 ZnF-UBP domain, where eight Cys/His residues are poorly conserved (Figure 2B). Four of these 12 conserved Cys/His residues coordinate one Zn atom in a 3Cys/1His coordination (Zn1) in the USP5 ZnF-UBP

domain structure. The other eight Cys/His residues, not conserved in USP5, cluster in two regions with 3Cys/1His and 2Cys/2His coordination and tetrahedral geometry (Figure 2C). In the case of HDAC6 ZnF-UBP, the two additional Zn ions are predicted to stabilize the overall structure of the domain. In particular, Zn site 2 connects residues at the N- and C-terminal end of the domain and therefore might be particularly important for stabilization.

To further confirm the importance of the conserved Cys/His residues, we systematically mutated histidines and cysteines present in the HDAC6 ZnF-UBP domain and generally conserved in all USPs, to alanine (Figure 2B). Wild-type ZnF-UBP and its mutated versions were translated *in vitro* in a reticulocyte lysate in the presence of [³⁵S]methionine and the *in vitro*-labelled proteins were pulled down using ubiquitin-sepharose beads. Figure 2D shows that mutating all these cysteines and histidines strongly reduces efficient ubiquitin binding. However, seven cysteines and two histidines (C1067, C1070, C1082, C1087, C1110, C1117, C1120, and H1049 and H1104) were found to play an absolutely critical role in the ZnF-UBP-ubiquitin interaction. According to our structural model, all these residues (except C1110) are directly involved in Zn binding. Our results emphasize the functional importance of the Zn ions for the structural organization and stability of the HDAC6 ZnF-UBP domain as a requirement for ubiquitin binding. C1110, which does not directly coordinate Zn, corresponds to a leucine in the USP5 ZnF-UBP domain, which stabilizes the hydrophobic core. It is likely that C1110 in HDAC6 plays a similar role and mutating it into

alanine would also destabilize the overall structure of the protein.

The ZnF-UBP domain controls polyubiquitin chain disassembly after induced cellular protein ubiquitination

Taking into account the extraordinary affinity of HDAC6 ZnF-UBP domain for ubiquitin, we reasoned that the HDAC6-ubiquitin complex would be unlikely to be displaced by other ubiquitin-binding proteins.

In order to test this hypothesis, we compared HDAC6 to another polyubiquitin-binding factor, RPN10, which is a polyubiquitin-binding component of the 19S proteasomal subunit.

Flag-tagged HDAC6 and RPN10 were overexpressed in Cos cells and purified (Figure 5A). Penta-ubiquitin chains (K48 5 + 1) were preincubated with equal concentrations of purified HDAC6, or purified RPN10, and then treated with the same amounts of recombinant UBPY, a ubiquitin isopeptidase (Naviglio *et al*, 1998) presenting a remarkable *in vitro* activity (Hartmann-Petersen *et al*, 2003). Figure 3 shows that HDAC6 efficiently hindered the action of UBPY and polyubiquitin chain degradation, whereas RPN10 only partially delayed the action of the protease. This experiment strongly suggests that the high-affinity ubiquitin binding by HDAC6 has the potential to stabilize the pool of cellular ubiquitinated proteins.

Accordingly, we then tested the action of HDAC6 on polyubiquitin chain turnover *in vivo*. For this purpose, 3T3 cell lines were established from HDAC6^{-/-} (Zhang *et al*,

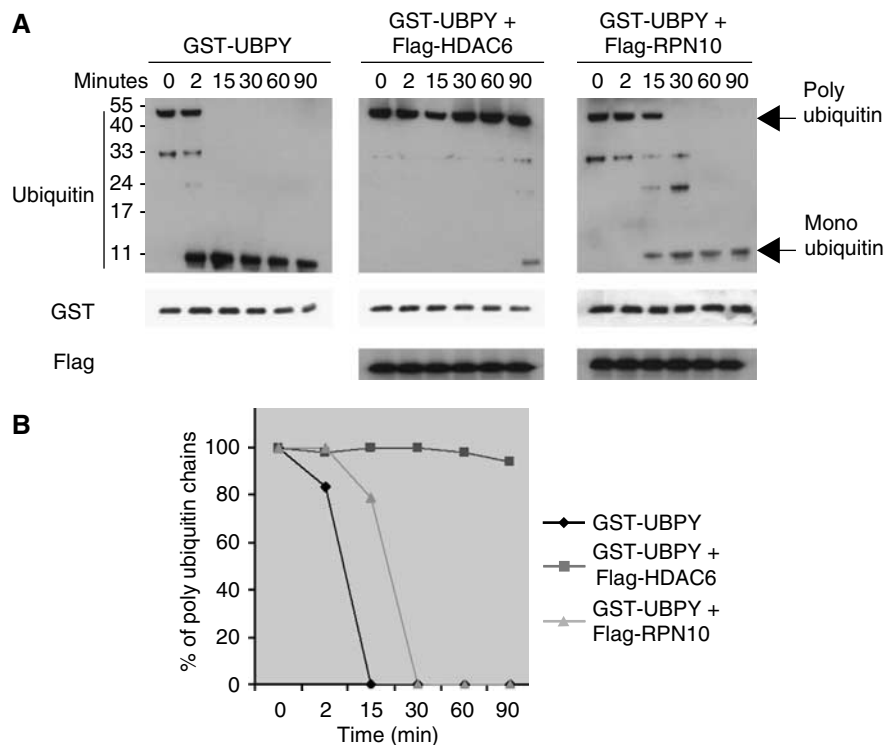


Figure 3 HDAC6 polyubiquitin masking effect. A 1 μ M portion of purified penta-ubiquitin chains was pre-incubated with 6 μ M of purified HDAC6 or 6 μ M of purified RPN10 (see also Figure 5A). (A) Equivalent amounts of purified UBPY were then added and the reactions stopped at the indicated times, and the ubiquitin cleavage was visualized using an anti-ubiquitin antibody (ubiquitin panel). Anti-GST and anti-Flag antibodies were used to show the amounts of GST-UBPY and Flag-tagged proteins in each condition (indicated). (B) Depolymerization of polyubiquitin chain into ubiquitin monomers was monitored by Western blot and quantified and shown. 100% represents the amount of polyubiquitin at time 0.

2003; Zhang and Matthias, in preparation) or from parental HDAC6^{+/+} mice. The HDAC6^{-/-} cell line was also used to generate two derivatives stably re-expressing either wild-type HDAC6 or an HDAC6 mutant with an inactive ZnF-UBP domain (H1094 and H1098 changed to A). This particular HDAC6 mutant was previously shown to have completely lost its ubiquitin-binding activity (Seigneurin-Berny *et al*, 2001; Bertos *et al*, 2004). Figure 4A shows that these cells express equivalent amounts of wild-type and mutant HDAC6 at a level comparable to that of the HDAC6^{+/+} 3T3 cell line (Figure 4A). As expected, the knockout of HDAC6 led to an accumulation of acetylated tubulin (Figure 4A, lane KO) and, interestingly, the re-expression of wild-type HDAC6, as well as the non ubiquitin-binding mutant of the protein (ZnF^m), downregulated tubulin acetylation, showing that inactivation of the ZnF-UBP domain has no effect on HDAC6 tubulin-deacetylase activity (Figure 4A, lane ZnF^m).

The accumulation of heavily ubiquitinated cellular proteins was induced by cell treatment with the proteasome inhibitor MG132. Cells were washed (0 h) and incubated in MG132-free medium for the indicated periods of time. Figure 4B and C shows that, compared to the HDAC6^{+/+} cells, the absence of HDAC6 led to an accelerated disappearance of polyubiquitin chains. The re-expression of wild-type HDAC6 in the KO cells delayed the polyubiquitin chain decay and restored the parental cell line situation (Figure 4B and C). Remarkably, when HDAC6^{-/-} cells expressed an inactive ZnF-UBP HDAC6 mutant, polyubiquitin chains rapidly disappeared, even faster than in the HDAC6^{-/-} cells (Figure 4B and C). This could be owing to a dominant negative activity of this mutant titrating out other factors involved in the protection of polyubiquitin chains.

These blots were also probed with an antibody recognizing a major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain whose folding and assembly is subjected to quality control mechanisms leading to the degradation of defective proteins via the proteasome-ubiquitin system (Farmery and Bulleid, 2001). Figure 4B shows that MHC heavy chains, undetectable in control cells, accumulated after MG132 treatment and their degradation paralleled that of polyubiquitin chains upon MG132 removal and was dependent on HDAC6. The use of this specific proteasome substrate further confirmed our conclusions on the role of HDAC6 as a negative regulator of polyubiquitin chain turnover.

Altogether, these results show that HDAC6, through its ubiquitin-binding activity, controls the stability of the cellular pool of ubiquitinated proteins.

The chaperone-like enzyme AAA-ATPase p97/VCP is a modulator of HDAC6 ubiquitin-dependent functions

We reasoned that, owing to the high-affinity binding of HDAC6 to ubiquitin, specific cellular factors/chaperones could be required to mediate the release of HDAC6 from ubiquitin and regulate ubiquitin-dependent functions of HDAC6. The chaperone p97/VCP appeared as a very good candidate for several reasons: it interacts with HDAC6 (Seigneurin-Berny *et al*, 2001), it possesses a segregase activity, it is a positive regulator of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation and it negatively regulates excessive polyubiquitin chain assembly (Braun *et al*, 2002; Wang *et al*, 2003; Richly *et al*, 2005).

In order to test this hypothesis, Flag-tagged HDAC6, p97/VCP and RPN10 were expressed in Cos cells and purified as described above (Figure 5A). His-tagged penta-ubiquitin

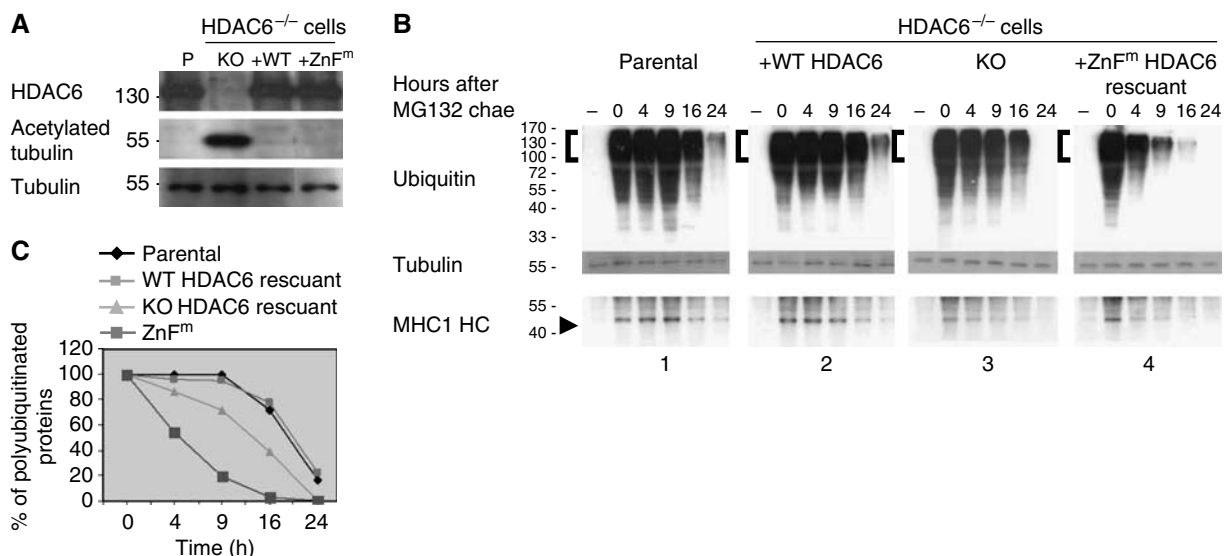


Figure 4 HDAC6 controls the turnover of polyubiquitin chains. (A) 3T3 cells were derived from parental HDAC6^{+/+} or HDAC6^{-/-} mice (KO cells). KO cells were used to establish cell lines expressing either wild-type HDAC6 (WT) or a non-ubiquitin-binding mutant of HDAC6 (ZnF^m). Extracts from these cells were used to monitor HDAC6 expression (HDAC6 panel). The amounts of acetylated tubulin and tubulin in the extracts were also visualized by appropriate antibodies (AcTubulin and Tubulin panels, respectively). (B) The accumulation of heavily ubiquitinated proteins was induced after treating cells described in panel A by the proteasome inhibitor MG132 (10 μM) for 16 h. At time *t* = 0, cells were washed and cultured in a fresh drug-free medium for the indicated times. Extracts were prepared, and ubiquitinated proteins were visualized by an anti-ubiquitin antibody. An antibody raised against an MHC class I heavy chain was also used to monitor its abundance in the same experiments (MHC HC panel). (C) The intensity of signals from ubiquitinated proteins in the indicated regions (brackets) was measured using the densitometric signals from the Western blots (right panel) and the values were normalized with respect to that of tubulin and plotted as a % of time 0.

chains (K48 5+1) were immobilized on Ni beads and first preincubated with an excess molar ratio of purified HDAC6. After the removal of unbound HDAC6, the beads were incubated with equal amounts of purified RPN10, p97/VCP or both (Figure 5B, input panel). The incubations were carried out in the presence or absence of ATP (Figure 5B, indicated). Following the pull-down of the beads, interactions between different proteins were detected by Western blotting. This experiments confirmed that the three studied components, HDAC6, p97/VCP and RPN10, are individually capable of polyubiquitin chain binding (lanes 2, 3 and 4). In the absence or presence of ATP, RPN10 binding was dominant over that of p97/VCP (lanes 6 and 11) and preincubation with HDAC6 prevented the binding of RPN10 to polyubiquitin (lanes 7 and 12). In the absence of ATP, ubiquitin-bound HDAC6 could also retain p97/VCP but did not allow the interaction of RPN10 with ubiquitin (compare lanes 5–8). Interestingly, in the presence of ATP, p97/VCP displaced HDAC6 and remained associated with polyubiquitin (lane 10). The addition of RPN10 to this mixture allowed the release of p97/VCP (lane 13), which formed a complex with HDAC6 in solution (Figure 5C).

These experiments suggest a mechanism through which cells may regulate the inhibitory effect of HDAC6 on polyubiquitin chain turnover. p97/VCP allows the removal of HDAC6 from polyubiquitin chains and can itself be removed by RPN10. By releasing p97/VCP from polyubiquitin chains,

RPN10 actually allows the capture of p97/VCP by free HDAC6 (Figure 5C), and this could allow the recognition of ubiquitinated protein substrates by polyubiquitin-binding proteins such as RPN10.

A finely tuned balance of HDAC6 and p97/VCP concentrations determines the fate of ubiquitinated misfolded proteins

According to our data, a molar excess of HDAC6 or a decrease in p97/VCP concentration should favour protein polyubiquitination. CFTR-ΔF508, a mutant form of CFTR, which is prone to misfolding and ubiquitination, provides an appropriate model to monitor misfolded proteins aggregation (Johnston *et al*, 1998). To better visualize high molecular weight ubiquitinated forms of the protein, a truncated form of CFTR-ΔF508 (CFTR3M) was generated and its ubiquitination monitored after 6 histidine-tagged ubiquitin coexpression and capture of ubiquitinated proteins on Ni beads. Figure 6 shows that the expression of HDAC6 significantly increases the accumulation of high molecular weight CFTR3M derivatives (lane 5). Interestingly, the downregulation of p97/VCP using specific siRNA led to the same observation (lane 4). An additive effect was observed in cells treated with p97/VCP siRNA and overexpressing HDAC6 (lane 6). Ni capture approach showed that these high molecular weight CFTR3M-related proteins are indeed ubiquitinated forms. In

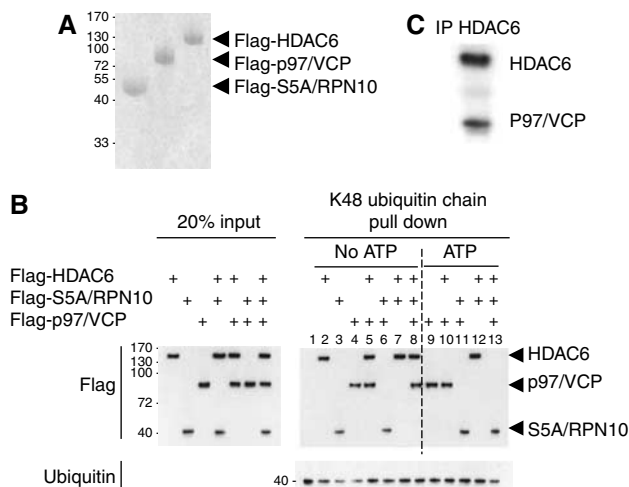


Figure 5 HDAC6–ubiquitin interaction hinders ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding 19S protein, RPN10, and p97/VCP reverts the effect of HDAC6. (A) Cos cells were massively transfected with expression vectors encoding Flag-tagged HDAC6, p97/VCP and RPN10. Flag-tagged proteins were immunoprecipitated and eluted using an excess of Flag peptides and then concentrated. (B) His-tagged K48 5+1 ubiquitin chains were immobilized on Ni beads and incubated with an excess of purified HDAC6, RPN10 and p97/VCP. In each experiment involving HDAC6, an excess of HDAC6 was preincubated with the ubiquitin chains and, after removal of the unbound proteins, the beads were incubated with purified p97/VCP and/or RPN10 (indicated by +). After washing the beads, the proteins retained on ubiquitin were denatured and detected by the anti-Flag antibody. The experiments were performed in parallel in the absence and presence of ATP (indicated). The left panel shows the input materials. (C) The supernatant corresponding to the experiment shown in lane 13 was used to immunoprecipitate HDAC6 (using an anti-HDAC6 antibody) and the immunoprecipitated proteins were analysed by probing the blot with an anti-Flag antibody.

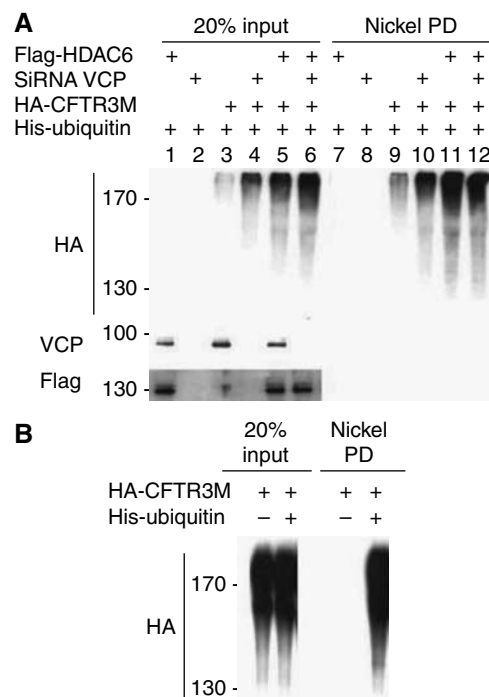


Figure 6 HDAC6–p97/VCP controlled protein polyubiquitination. (A) Cos cells were transfected with control siRNA or p97/VCP-specific siRNA and also with the indicated expression vectors. At 48 h post-transfection, the cells were lysed. A fraction of the lysate was kept aside (input panel) and the rest was used to capture ubiquitinated proteins on Ni beads. Input and captured materials were analysed by an anti-HA antibody. p97/VCP and Flag-HDAC6 were revealed in the input materials, and are shown at the bottom of the input panel. (B) CFTR3M was expressed with and without 6 His-ubiquitin (+ and –, respectively), and input and captured materials are shown.

the absence of 6 histidine-tagged ubiquitin expression, no CFTR3M could be captured by Ni beads (Figure 6B).

It had previously been shown that, owing to its ubiquitin-binding activity and its interaction with dynein motors, HDAC6 transports misfolded and ubiquitinated CFTR aggregates to aggresomes (Kawaguchi *et al*, 2003). We reasoned that by interfering with HDAC6-ubiquitin binding activity, p97/VCP should also decrease the efficiency of HDAC6 in inducing CFTR aggresome formation.

In order to test this hypothesis, HA-CFTR3M was expressed in cells alone or together with p97/VCP and the % of CFTR3M-expressing cells presenting aggresomes was determined. Ubiquitin and vimentin, known markers of aggresomes (Kawaguchi *et al*, 2003), were also detected to better identify these structures (Figure 7A). As previously reported (Kawaguchi *et al*, 2003), the expression of HDAC6 led to a marked increase in the proportion of cells forming aggresomes and the coexpression of p97/VCP significantly decreased the efficiency of aggresome formation (Figure 7B). In our hands, the treatment of cells with p97/VCP siRNA also increased the efficiency of CFTR aggresome formation (not shown). The effect of p97/VCP downregulation on aggresome formation should however be considered with caution, as, at least in yeast, Cdc48 (p97/VCP homologue) is required for normal microtubule organization (Moir *et al*, 1982) and p97/VCP downregulation may indirectly affect aggresome formation through its action on microtubules.

Altogether, our data strongly suggest that the steady-state pool of cellular polyubiquitin chains depends on a finely tuned equilibrium between the concentration of HDAC6 and p97/VCP. An imbalance of HDAC6-p97/VCP molar ratio in favour of HDAC6 would enhance the formation of ubiquitinated protein aggregates and ultimately aggresome formation.

Discussion

Using a range of biophysical approaches, we have characterized the ubiquitin-binding domain ZnF-UBP of HDAC6. MicroPIXE and EXAFS data combined with our mutational and binding analysis strongly suggest that three Zn ions organize the overall structure of the HDAC6 ZnF-UBP domain and are therefore critical for the interaction of HDAC6 ZnF-UBP with one ubiquitin molecule. Among the 10 ubiquitin-binding domains identified so far, only two ubiquitin-binding domains, the Np14 zinc-finger (NZF) and a ZnF-UBP from USP5/IsoT, also contain a Zn-binding module. However, both NZF and USP5/IsoT ZnF-UBP only contain one Zn atom ligated by four cysteine residues in the case of NZF (Alam *et al*, 2004) and by three cysteines and one histidine in the case of USP5 ZnF-UBP (Reyes-Turcu *et al*, 2006).

The particular structural organization of the HDAC6 ZnF-UBP stabilized by three Zn ions might explain the fact that it presents the highest affinity for ubiquitin among the known ubiquitin-binding domains (Hicke *et al*, 2005; Reyes-Turcu *et al*, 2006). For most ubiquitin-interacting factors, a low-affinity ubiquitin binding probably has important functional implications, as the complexes are able to rapidly undergo assembly and disassembly. Our data suggest that the HDAC6-ubiquitin interaction falls into a new functional category. In fact, the high affinity of ubiquitin binding by HDAC6 raises the issue of the regulation of the HDAC6-ubiquitin complex

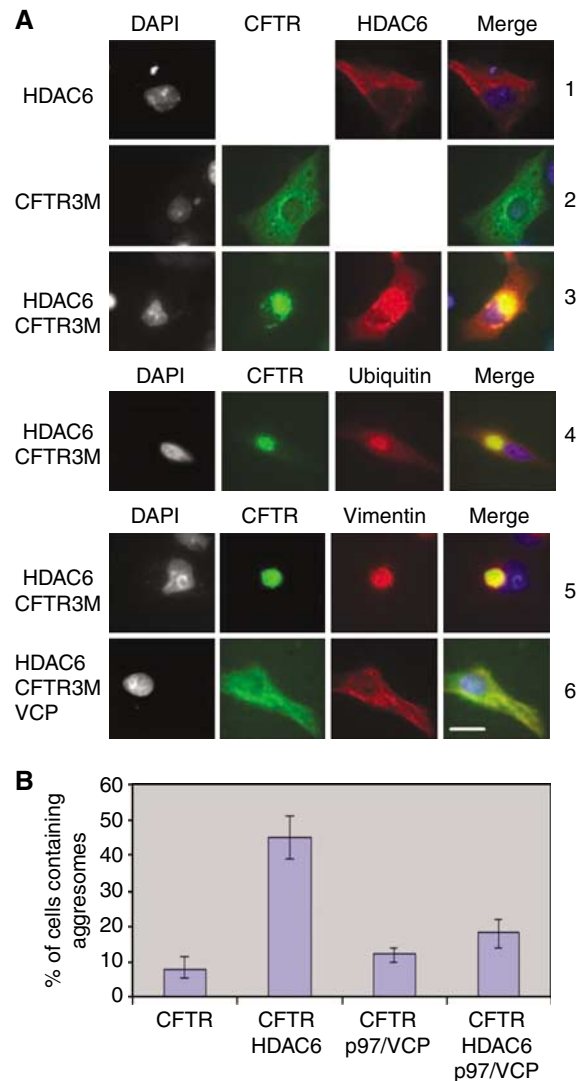


Figure 7 p97/VCP expression reduces the efficiency of HDAC6-dependent aggresome formation. (A) Cos cells were transfected with vectors expressing CFTR3M alone or together with HDAC6, p97/VCP or both. Cells were fixed 24 h post-transfection and different proteins were visualized. The upper panel shows the detection of HDAC6 (1), CFTR3M (2) or both (3). In the latter case, different combinations of immunodetection were used. CFTR3M was co-detected with HDAC6 (3), ubiquitin (4) or vimentin (5). The lower panels (5 and 6) show the cellular distribution of CFTR3M and vimentin in HDAC6-expressing cells, in the absence (5) or presence (6) of p97/VCP expression. (B) The % of cells forming CFTR3M aggresomes in each condition was determined as judged by cells containing vimentin cages and represented as a histogram. (C) Extracts were prepared from cells transfected in the same experiments as described above and CFTR3M, HDAC6 and p97/VCP were visualized (indicated).

dissociation. In particular, we show here that the HDAC6–polyubiquitin interaction possesses a ‘masking function’, preventing the action of other ubiquitin-binding factors such as USPs and ubiquitin-binding proteasomal subunits. The functional consequence of this activity of HDAC6 is a reduction of polyubiquitin turnover. It should therefore be of pivotal importance for a cell to be able to reverse this particular activity of HDAC6, in order to process polyubiquitinated proteins.

The p97/VCP chaperone was considered as an excellent candidate regulatory factor, because (i) it had previously been identified as a partner of HDAC6 (Seigneurin-Berny *et al*, 2001), and (ii) it is a chaperone involved in the control of a variety of cellular functions, many of them relying on its ‘segregate’ activity disassembling various complexes, including those containing ubiquitinated proteins (Wang *et al*, 2003; Romisch, 2005).

Recently, a detailed study in yeast suggested a molecular model for p97/VCP activity in the ubiquitin–proteasome protein degradation pathway. p97/VCP is proposed to restrict the ubiquitin chain elongation of a substrate protein mediated by a yeast E4, Ufd2p (Richly *et al*, 2005). Another study suggested that p97/VCP could also be involved in the control of the activity of the mammalian Ufd2p orthologue, E4B, which mediates ataxin-3 polyubiquitination. p97/VCP is thought to dissociate E4B from the polyubiquitinated ataxin-3.

Here we identify another aspect of p97/VCP function, which would also restrict an excessive accumulation of polyubiquitinated protein aggregates. Indeed, p97/VCP by dissociating HDAC6–polyubiquitin complexes favours either the action of USPs or the binding of RPN10 to the polyubiquitin chain. This suggests a novel mechanism for p97/VCP in preventing the formation of cellular inclusion bodies and acceleration of protein degradation by the proteasome.

The work of Kawaguchi *et al* (2003) shows that HDAC6 is capable of transporting ubiquitinated aggregates to the aggresome compartment. We were able to confirm these findings by showing a positive role of HDAC6 in aggresome formation. We additionally showed that this occurs under an excess of HDAC6 with respect to p97/VCP. Indeed, according to the data presented here, p97/VCP is able to recycle HDAC6 and deliver ubiquitinated proteins to the proteasome. It is expected that, under either a pathological excess of HDAC6 or a dysfunction of p97/VCP, these aggregates accumulate as aggresomes owing to irreversible binding of HDAC6 to polyubiquitin chains and to its escort activity.

In agreement with this model, the disruption of p97/VCP activities has been shown to lead to aggregate formation in various systems (Hirabayashi *et al*, 2001; Kobayashi *et al*, 2002; Nagahama *et al*, 2003; Wojcik *et al*, 2004). More interestingly, p97/VCP mutations have been identified as causing ‘inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia’ (Watts *et al*, 2004). HDAC6 and p97/VCP therefore appear as excellent target molecules in fighting neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease, Huntington’s disease, amyotrophic lateral sclerosis and prion diseases, which are increasingly recognized as having common molecular mechanisms, including protein aggregation and inclusion body formation.

Although this work emphasizes the function of HDAC6 as a factor negatively regulating proteasomal protein degradation, we believe that, under physiological concentrations of HDAC6 and p97/VCP, HDAC6 may also accelerate protein degradation. Indeed, HDAC6 by favouring protein polyubiquitination and p97/VCP by allowing the delivery of the ubiquitinated substrates should facilitate efficient protein ubiquitination and degradation.

In conclusion, we propose here that HDAC6–p97/VCP constitutes a key cellular management system, which decides the fate of ubiquitinated cellular proteins.

Materials and methods

Methods for analytical ultracentrifugation, ITC, EXAFS experiments and microPIXE analysis are accessible in Supplementary data.

HDAC6^{-/-} cell line and the re-expression of HDAC6

Mice with invalidated HDAC6 gene were generated (Zhang *et al*, 2003; Zhang and Matthias, data not shown) and mouse embryo fibroblasts were isolated from E13.5 embryos. 3T3 cell lines were established following a standard 3T3 protocol. Wild-type and mutant HDAC6 cDNAs were cloned into a pMSCV.EGFP vector. The retrovirus was made from Phoenix cells following standard protocols. The HDAC6^{-/-} 3T3 cells were infected and kept in culture for 2 weeks and single GFP-positive cells were sorted into 96-well plates.

Cell culture, transfection assays, siRNA treatment and in situ immunodetection procedure

Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and seeded in appropriate plates and grown to 60–70% confluence on the day of transfection. Transfections were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen), using 5 µl Lipofectamine and various quantities of expression vectors or empty vectors for a total of 5 µg DNA.

p97/VCP siRNAs were designed as previously described (Wojcik *et al*, 2004) and purchased from Eurogentec. Control siRNAs were inactive siRNAs against HAT1 (not shown). HeLa cells were seeded in six-well plates at 10⁵ cells/well 24 h before siRNA treatment. *In situ* immunofluorescence analysis was carried out as described previously (Matsuyama *et al*, 2002).

Plasmids and antibodies

HDAC6 expression vectors were previously described (Verdel *et al*, 2000; Seigneurin-Berny *et al*, 2001). HA- and Flag-p97/VCP were cloned in pcDNA.3 vectors after PCR amplification of its coding sequence from a mouse embryo bank (Clontech). GFP-CFTR-ΔF508 expression vector was kindly provided by Dr Kopito. Flag-RPN10 expression vector was a kind gift of Dr Minoru Yoshida. pSG His-ubiquitin was a gift of Dr Bohman. pGEXKG-UBPY plasmid was a kind gift of Dr Hartmann-Petersen. CFTR-ΔF508 mutant lacked its C-terminal ATPase domain (deletion of 1057–1480 region). GST-C-terminal part of HDAC6 was cloned in pGEX4-T1 vector (Amersham) after a PCR amplification of the corresponding sequence with the following primers: 5’ccc ctt cgg cga cct cca gtc ctg tac ttg3’ and 5’gtg tga gtg ggg cat gtc ctc ccc aaa3’. p97/VCP antibody was a gift of Dr Tonks. Anti-HDAC6 was described previously (Seigneurin-Berny *et al*, 2001). Anti-MHC class I heavy chain was a monoclonal antibody against haplotype H2Dd (Cedarlane Labs, CL9009B).

Purification of HDAC6 C-terminal part and ubiquitin

GST-Cter was expressed in BL21 (DE3)pLysS strain (Stratagene), and after purification on glutathione sepharose resin (Sigma), the GST tag was removed with thrombin (Sigma) and the HDAC6 part was purified to homogeneity after phenyl sepharose column and S75 gel filtration (Amersham). The ubiquitin sequence was amplified by PCR and cloned in pETM13, as His-tagged fusion and expressed in BL21(DE3) strain (Stratagene) and purified on nickel probond resin (Invitrogen) and purified to homogeneity by S75 gel filtration (Amersham).

Site-directed mutagenesis, protein purification and ubiquitin binding assays

HDAC6 C-terminal part cloned in pET28a+ (Novagen) and mutagenized using the QuickChange site-directed PCR mutagenesis (Stratagene) and the resulting mutations were controlled after sequencing. The corresponding ³⁵S-labelled proteins were generated in a reticulocyte lysate (Promega) and pull-downs were performed as described previously (Seigneurin-Berny *et al*, 2001).

Flag-tagged HDAC6, p97/VCP and RPN10 were overexpressed in Cos7 cells after massive transfection and the tagged proteins were immunoprecipitated using M2 coupled beads and purified using a Flag-peptide elution procedure (Sigma). Proteins were eluted in ubiquitin-binding buffer and then concentrated using Centricon concentrator (Millipore).

Penta-ubiquitin binding assays were performed as follows: 1 μM of purified His-tagged penta-ubiquitin (ubiquitin₅⁻¹ from Affinity) was immobilized on Ni beads and preincubated with 6 μM Flag-HDAC6 for 30 min at room temperature. A 6 μM portion of Flag-p97/VCP or Flag-RPN10 or both was then added. Binding reactions were performed in 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM β-mercaptoethanol, 2% of glycerol, anti-protease inhibitor (Roche) with or without 200 μM ATP and 200 μM MgCl₂, during 30 min at room temperature.

Unbound proteins were removed by centrifugation. Proteins retained were eluted by electrophoresis sample buffer. Unbound HDAC6-p97/VCP complex, after the ATP-dependent action of p97/VCP, was immunoprecipitated using an anti-HDAC6

antibody (Seigneurin-Berny *et al*, 2001) and the proteins detected by Western.

Polyubiquitin chain depolymerization assays

A 1 μM portion of ubiquitin chains in ubiquitin-binding buffer was preincubated at 37°C with 6 μM of purified Flag-HDAC6 or 6 μM of purified Flag-RPN10. GST-UBPY (6 μM) was then added for different times. Reactions were blocked by SDS-PAGE loading buffer, and ubiquitin, GST and Flag-tagged proteins were detected.

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal Online*.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the association 'vaincre la mucoviscidose' for supporting CB with PhD fellowship for 4 years. BG was supported by 'association pour la recherche sur le cancer' for his fourth year of PhD fellowship. SK laboratory was supported by 'region Rhône Alpes theme prioritaire Cancer' programme and CLARA Cancéropôle. We gratefully acknowledge the expert assistance of Sandrine Benitski in tissue culture work. The work in PM laboratory was supported by the Novartis Research Foundation. We thank the Ion Beam Centre at the University of Surrey, Guildford, UK for facilities access and Dr I Gomez-Morilla for beamline assistance there.

References

- Alam SL, Sun J, Payne M, Welch BD, Blake BK, Davis DR, Meyer HH, Emr SD, Sundquist WI (2004) Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J* **23**: 1411–1421
- Amerik AY, Li SJ, Hochstrasser M (2000) Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **381**: 981–992
- Bertos NR, Gilquin B, Chan GK, Yen TJ, Khochbin S, Yang XJ (2004) Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem* **279**: 48246–48254
- Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S (2002) Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates. *EMBO J* **21**: 615–621
- Destaing O, Saltel F, Gilquin B, Chabadel A, Khochbin S, Ory S, Jurdic P (2005) A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci* **118**: 2901–2911
- Farmery MR, Bulleid NJ (2001) Major histocompatibility class I folding, assembly, and degradation: a paradigm for two-stage quality control in the endoplasmic reticulum. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **67**: 235–268
- Ghislain M, Dohmen RJ, Levy F, Varshavsky A (1996) Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 4884–4899
- Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4868–4873
- Hartmann-Petersen R, Hendil KB, Gordon C (2003) Ubiquitin binding proteins protect ubiquitin conjugates from disassembly. *FEBS Lett* **535**: 77–81
- Hicke L, Schubert HL, Hill CP (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 610–621
- Hirabayashi M, Inoue K, Tanaka K, Nakadate K, Ohsawa Y, Kamei Y, Popiel AH, Sinohara A, Iwamatsu A, Kimura Y, Uchiyama Y, Hori S, Kakizuka A (2001) VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ* **8**: 977–984
- Hook SS, Orian A, Cowley SM, Eisenman RN (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 13425–13430
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**: 455–458
- Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* **270**: 17442–17456
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**: 1883–1898
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**: 727–738
- Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A (2002) Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem* **277**: 47358–47365
- Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* **18**: 601–607
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2005) CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**: D192–D196
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M (2002) *In vivo* destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J* **21**: 6820–6831
- Moir D, Stewart SE, Osmond BC, Botstein D (1982) Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics* **100**: 547–563
- Mullally JE, Chernova T, Wilkinson KD (2006) Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain. *Mol Cell Biol* **26**: 822–830
- Nagahama M, Suzuki M, Hamada Y, Hatsuzawa K, Tani K, Yamamoto A, Tagaya M (2003) SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. *Mol Biol Cell* **14**: 262–273
- Naviglio S, Matteucci C, Matoskova B, Nagase T, Nomura N, Di Fiore PP, Draetta GF (1998) UBPY: a growth-regulated human ubiquitin isopeptidase. *EMBO J* **17**: 3241–3250
- Reyes-Turcu FE, Horton JR, Mullally JE, Heroux A, Cheng X, Wilkinson KD (2006) The ubiquitin binding domain ZnF UBP

- recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell* **124**: 1197–1208
- Richly H, Rape M, Braun S, Rumpf S, Hoege C, Jentsch S (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**: 73–84
- Rumpf S, Jentsch S (2006) Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* **21**: 261–269
- Romisch K (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 435–456
- Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* **21**: 8035–8044
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemerrier C, Yoshida M, Khochbin S (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* **274**: 2440–2445
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemerrier C, Yoshida M, Khochbin S (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* **10**: 747–749
- Wang B, Alam SL, Meyer HH, Payne M, Stemmler TL, Davis DR, Sundquist WI (2003) Structure and ubiquitin interactions of the conserved zinc finger domain of Npl4. *J Biol Chem* **278**: 20225–20234
- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, Mehta SG, Mumm S, Darvish D, Pestronk A, Whyte MP, Kimonis VE (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* **36**: 377–381
- Wojcik C, Yano M, DeMartino GN (2004) RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* **117**: 281–292
- Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules *in vivo*. *EMBO J* **22**: 1168–1179

B. HDAC6 relie l'activité protéasomale à la réponse cellulaire au stress

1- Présentation de l'article 2

Comme nous l'avons vu dans le premier article, HDAC6-p97/VCP est un complexe clef de la gestion des protéines ubiquitinées dans la cellule, en contrôlant leur dégradation. La dégradation des protéines poly-ubiquitinées est importante, mais devient vitale lorsque la concentration en protéines à dégrader devient trop élevée. En effet, cette augmentation favorise l'apparition de formes protéiques toxiques.

Ce phénomène est observable lors d'un stress cellulaire, comme dans le cas d'un stress thermique ou d'un stress chimique. Afin de survivre, la cellule doit mettre en place une réponse adaptée. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la réponse cellulaire au stress est déclenchée par l'activation de HSF1. Cette activation provoque la surexpression de nombreuses chaperonnes, augmentant ainsi la prise en charge et l'élimination des protéines mal repliées par le système ubiquitine/protéasome. Ces observations nous ont laissé penser que HDAC6 et p97/VCP pouvaient avoir un rôle dans la réponse cellulaire consécutive à l'accumulation en protéines mal repliées et poly-ubiquitinées.

Afin de répondre à cette question, nous avons inhibé le protéasome afin d'augmenter la concentration intracellulaire en protéines poly-ubiquitinées.

Dans une première phase, nous avons pu montrer que HDAC6 est nécessaire à la mise en place de la réponse au stress induite par une concentration élevée en protéines poly-ubiquitinées. De façon surprenante, le domaine ZnF-UBP de HDAC6 est capital dans la mise en place de ce phénomène.

Dans une seconde phase, nous avons disséqué ce processus. Nous avons pu montrer que HDAC6, p97/VCP, HSF1 et HSP90 forme un complexe qui réprime HSF1. Lors d'un blocage du protéasome, la concentration en protéine poly-ubiquitinées augmente. Ces complexes se dissocient alors dans un mécanisme HDAC6 et p97/VCP dépendant. Dans nos observations, HDAC6 a un rôle de senseur de ce stress, grâce à son domaine de forte affinité pour l'ubiquitine : ZnF-UBP. HDAC6 permet dès lors l'activation de HSF1 par p97/VCP.

Dans ce second travail, nous montrons que HDAC6 est un régulateur obligatoire de la réponse cellulaire au stress provoqué par une accumulation de la concentration en protéines poly-ubiquitinées.

HDAC6 links proteasome activity to cellular stress response

Cyril Boyault, Yu Zhang, Sabrina Fritah, Caroline Jolly, Tso-Pang Yao, Claire Vourc'h,
Patrick Matthias, Saadi Khochbin.

Article en préparation

HDAC6 links proteasome activity to cellular stress response

Cyril Boyault^{1*}, Yu Zhang^{2*}, Sabrina Fritah³, Caroline Jolly³, Tso-Pang Yao⁴, Claire Vourc'h³, Patrick Matthias², Saadi Khochbin^{1#}

1 - INSERM U309 - Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation.
Equipe chromatine et expression des gènes.

Institut Albert Bonniot - Faculté de Médecine, Domaine de la Merci

38706 La Tronche Cedex – France

2 - Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Novartis Research Foundation,
Maulbeerstrasse 66, 4058 Basel, Switzerland.

3 - INSERM U309, Equipe DyoGen

4 - Department of Pharmacology and Cancer Biology, Duke University, Durham, North
Carolina 27710, USA.

*Contributed equally to this work.

Corresponding author:

Mail : Khochbin@ujf-grenoble.fr

Tel : (33) 4 76 54 95 83 ; Fax : (33) 4 76 54 95 95

Abstract

A cellular defence mechanism counteracts the deleterious effects of mis-folded protein accumulation by eliciting a stress response. Here, for the first time, the molecular basis of a mechanism, which senses ubiquitinated cellular aggregates and triggers an induced expression of major cellular chaperons, is unravelled. Our data show that ubiquitin-binding by the cytoplasmic deacetylase, HDAC6, through the dissociation of a repressive VCP/HDAC6/HSF1/HSP90 complex, mediates the activation of HSF1 and the subsequent HSF1-dependent gene response. HDAC6 therefore appears as a master regulator of the cell protective response to cytotoxic protein aggregate formation.

Introduction

HDAC6 was first discovered in the mouse as a specific member of a new family of HDACs in higher eukaryotes (Verdel and Khochbin, 1999) now known as class II (Yang, 2005). Later, studies have shown that HDAC6 is actively maintained in the cytoplasm (Verdel et al., 2000, Bertos et al., 2004), is a major cytoplasmic tubulin-deacetylase (Hubert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003), and efficiently binds mono- and poly-ubiquitin (Seigneurin-Berny et al., 2001, Hook et al., 2002, Boyault et al., 2006).

Furthermore, the identification of a HDAC6-containing complex showed that it associates with two proteins, both involved in the control of the ubiquitin/proteasome system, p97/VCP and UFD3/PLAP (Seigneurin-Berny et al., 2001). Most interestingly, p97/VCP, a chaperon-like AAA ATPase, is an essential element in the degradation of mis-folded proteins by the proteasome (Römisch, 2005 ; Rumpf and Jentsch, 2006) and is able to dissociate HDAC6-ubiquitin complexes and to modulate the HDAC6-dependent poly-ubiquitin chain turnover (Boyault et al., 2006). In yeast, Ufd3p, known to interact with the yeast homolog of p97/VCP, Cdc48p (Ghislain et al., 1996), is a modulator of its ubiquitin-dependent functions (Mullally et al., 2006 ; Rumpf and Jentsch, 2006).

HDAC6 therefore has the potential to link protein ubiquitination not only to cellular functions depending on microtubule cytoskeleton, but also to the proteasome-dependent protein degradation. One of these functions has recently been evidenced. Indeed, through its simultaneous interaction with ubiquitin and dynein motors, HDAC6 mediates the clearance of cytotoxic mis-folded proteins and favours their accumulation into cellular aggregates (Kawaguchi et al., 2003). Moreover, recently we were able to show that the cellular HDAC6-p97/VCP ratio controls the fate of cellular mis-folded ubiquitinated proteins. Indeed, an excess of HDAC6 favours the accumulation of poly-ubiquitinated protein aggregates, while that of p97/VCP limits the formation of aggregates (Boyault et al., 2006). These data provided the first evidence for the involvement of HDAC6 in the management of ubiquitinated cellular protein aggregates. HDAC6 has also been shown to deacetylate HSP90 and modulate its chaperon activity (Kovacs et al., 2005 ; Murphy et al., 2005 ; Bali et al., 2005). HSP90, through its diverse actions on its client proteins, appears as a critical modulator of various cell signalling pathways including the control of heat shock cell response (Zhao and Houry, 2005). In fact, HSF1, a transcription factor essential in the activation of the heat shock protein encoding genes (HSPs), is maintained in an inactive form through its association with HSP90, and HSP90-HSF1 dissociation is an obligatory step in the activation of HSF1.

Phosphorylation and trimerization of HSF1, following its release from HSP90, lead to its full activation (Voellmy, 2004 ; Westerheide and Morimoto, 2005).

Interestingly, proteasome inhibition and the accumulation of highly ubiquitinated proteins were shown to induce HSF1 activation and the subsequent HSP gene response (Goldberg, 2003). Since HDAC6 had already been involved in the protective clearance of mis-folded protein aggregates (Kawaguchi et al., 2003), we reasoned that it could also signal their presence within the cell to the HSF1 activation machinery, including HSP90. Accordingly, we hypothesized that ubiquitin-binding by HDAC6 could act as a sensor of mis-folded protein accumulation and elicit HSF1 activation and heat shock gene response through a mechanism involving HSP90.

Using fibroblasts isolated from HDAC6^{-/-} mice, we were able to confirm this hypothesis and unravel its molecular basis, demonstrating a key role for HDAC6 in controlling HSP genes activation. Our data show that ubiquitin-binding by HDAC6 is a critical event in the dissociation of the repressive HSF1-containing complex. In unstressed cells, this complex also contains the HDAC6-interacting chaperon, p97/VCP. Ubiquitin-binding by HDAC6, as we had previously shown (Seigneurin-Berny et al., 2001; Boyault et al., 2006), leads to the dissociation of HDAC6-p97/VCP, which in turn would use its segregase activity to induce the dissociation of HSP90-HSF1. HSF1 could then be activated and induce the expression of HSP70 and HSP25/27 encoding genes.

We now show that HDAC6 is in the heart of a very important and yet unknown cell machinery, dedicated to respond to the accumulation of cytotoxic protein aggregates. It first senses abnormal accumulation of poly-ubiquitinated proteins and triggers HSF1 activation, and then participates in the clearance of these aggregates.

Results

HDAC6 and its ubiquitin-binding functions are important to induce the expression of HSP genes

Fibroblasts were isolated from HDAC6^{-/-} or parental wild type mouse embryos and used to establish 3T3 cell lines. A retroviral gene transfer system was then used to re-introduce wild type HDAC6 (WT) or HDAC6 bearing inactivating mutations in its catalytic domains (HD^m) or in its ubiquitin-binding domain, ZnF-UBP (Ub^m), in one of the established HDAC6^{-/-} lines.

Figure 1A shows that, as expected, the cellular amount of acetylated tubulin was clearly increased in HDAC6^{-/-} cells (KO), compared to the parental cells. The re-introduction of WT HDAC6 restored the basal level of tubulin acetylation. The tubulin acetylation levels of the cells expressing the Ub^m HDAC6 mutant was comparable to that of the cells expressing WT HDAC6, while the level of tubulin acetylation in cells expressing the HD^m HDAC6 mutant was equivalent to that of the KO cells. These cells therefore provide valuable tools to investigate HDAC6 functions related to its catalytic and ubiquitin-binding activities.

These cell lines were first used to evaluate the role of HDAC6 in controlling the cell response to the induced accumulation of ubiquitinated proteins after proteasome inhibition by MG132. The five cell lines described above were treated for different times with MG132 and the expression of HSP70 and HSP25 was analysed. As shown on Figure 1B, the presence of HDAC6 is absolutely required to observe a significant accumulation of HSP70 and HSP25, six hours after MG132 treatment (compare KO and parental panels). Interestingly, the re-expression of WT HDAC6 completely restores the heat shock protein (HSP) accumulation in response to proteasome inhibition (WT panel). Strikingly, this activity of HDAC6 is dependent on its ability to bind ubiquitin, since the re-expression of the HDAC6 Ub^m mutant did not restore the HSP gene response after MG132 treatment. This activity of HDAC6 was however independent of its deacetylase catalytic activity, since cells expressing this mutant answered efficiently to the treatment (HD^m panel).

HDAC6 and its ubiquitin-binding functions mediate HSF1 activation

It then appeared important to know whether HDAC6 could control the activation of HSF1 after MG132 treatment.

We first confirmed that HSF1 is in fact required to observe a HSP cell response to MG132 treatment and that proteasome inhibition indeed activates HSF1. Fibroblasts from HSF1^{-/-} and the corresponding parental mice (Pirkkala et al., 2000) were treated with MG132, and the activation of HSF1 and accumulation HSP70 and HSP25 were monitored. Figure 2A shows that in the absence of HSF1, MG132 treatment was ineffective in inducing an HSP genes response. The activation of HSF1 was evidenced by a shift in its migration, visualized on SDS-PAGE after its phosphorylation in the parental cell line following MG132 treatment.

We then evaluated the role of HDAC6 in HSF1 activation by following its mobility shift after MG132 treatment. The five cell lines described above were treated with MG132 and the data obtained evidenced an absolute requirement of HDAC6 for HSF1 activation (Fig. 2B). No HSF1 migration shift was observed in HDAC6^{-/-} cells after MG132 treatment (KO panel).

This MG132-dependent HSF1 activation was restored upon the re-expression of WT HDAC6, but not upon expression of the non-ubiquitin-binding mutant (compare WT and Ub^m panels). Here again, HSF1 activation was not dependent on HDAC6 catalytic activity (panel HD^m).

Ubiquitin-binding by HDAC6 mediates the dissociation of the repressive HSP90-HSF1 containing complex.

Since HDAC6 was previously shown to interact with and deacetylate HSP90 (Kovacs et al., 2005), HSP90 was the best candidate for mediating HDAC6-dependent activation of HSF1 after proteasome inhibition. The five established cell lines described above were left untreated or were treated for 6 hours with MG132. The results shown in Figure 3 (input panels) confirmed that HSF1 activation following MG132 treatment was strictly dependent on the presence of HDAC6 and required its ubiquitin-binding activity.

Since the dissociation of the HSP90-HSF1 complex was previously shown to be required for HSF1 activation (Zou et al., 1998), we used HSP90 immunoprecipitation to investigate the association of HSF1 and HDAC6 with HSP90 before and after 6 hours of MG132 treatment.

Figure 3 shows that the MG132 treatment induces the dissociation of HSF1 and HDAC6 from HSP90, only when cells express WT or catalytically dead HDAC6 (IP panel, column P, WT and HD^m, lanes HSF1 and HDAC6 respectively). Interestingly, no dissociation of HSF1 and HDAC6 could be observed when the complex contained a HDAC6 mutant unable to bind ubiquitin. Moreover, these data also show that, in the total absence of HDAC6 (KO cells), HSP90-HSF1 complex remained stable after the MG132 treatment (KO column).

These data strongly suggested that ubiquitin-binding by HDAC6 could trigger the HSP90 complex disassembly. To test this hypothesis, the following experiments were performed.

HSP90 was immunoprecipitated from non-stressed 3T3 parental or HDAC6^{-/-} cells, expressing or not WT or mutated HDAC6, as described above. The immunoprecipitated materials were then incubated with purified penta-ubiquitin chains in the presence or not of ATP, and the proteins remaining in the immunocomplexes were analysed. This *in vitro* assay perfectly mimicked the *in vivo* situation. Indeed, penta-ubiquitin efficiently dissociated the complex only when WT or catalytically inactive HDAC6 was present (Fig. 3B, IP HSP90 panel, column 1, 3 and 4). In the absence of HDAC6, or in the presence of the non-ubiquitin-binding mutant of HDAC6, penta-ubiquitin did not dissociate the HSP90-HSF1 containing complexes (column 2 and 5).

Interestingly, this experiment also showed that the ubiquitin-dependent complex disassembly is an active process, which requires ATP hydrolysis (no complex dissociation was observed in the absence of ATP, not shown).

A mechanism for ubiquitin-dependent complex disassembly and HSF1 activation

According to the data obtained so far, we hypothesized that, after proteasome inhibition and accumulation of ubiquitinated proteins, ubiquitin-binding by HDAC6 could trigger its dissociation from the HSP90-HSF1 complex. However, we also observed that this process requires an active participation of HDAC6 (no complex disassembly was detected in the absence of HDAC6) as well as an ATPase activity.

One HDAC6 partner, the AAA ATPase p97/VCP, which we had previously purified from an endogenous HDAC6 complex (Seigneurin-Berny et al., 2001), appeared as a good candidate to mediate the HDAC6-dependent HSP90 complex dissociating activity. Indeed we have recently observed that p97/VCP is able to dissociate the HDAC6-ubiquitin complex (Boyault et al., 2006). Moreover, p97/VCP is well-known for its “segregase” activity (Romisch, 2005 ; Wang et al., 2003) and, as shown earlier, ubiquitin-binding by HDAC6 induces a HDAC6-p97/VCP complex dissociation (Seigneurin-Berny et al., 2001).

Accordingly, the presence of p97/VCP was checked in the HSP90 immunoprecipitated materials. Interestingly, we found that not only p97/VCP was present in a complex with HSP90 but also that the complex formation needed the presence of HDAC6 (Fig. 3A, IP HSP90 panel, compare, in non-stressed cells, columns “ 11 or 15” with “13”). Indeed, p97/VCP was not found associated with HSP90 when the latter was immunoprecipitated from HDAC6^{-/-} cells (panel KO, column 13).

Based on our previous data (Seigneurin-Berny et al., 2001), we proposed that HDAC6 could mediate the recruitment of p97/VCP in the repressive HSP90-HSF1 complex. Ubiquitin-binding by HDAC6 would then lead to the dissociation of the HDAC6-p97/VCP complex and p97/VCP would use its ATPase activity to dissociate the HSP90-HSF1 complex.

This hypothesis was investigated thanks to a established HDAC6 knocked-down human cell line already used to evidence some of the most important functions of HDAC6 (Kawaguchi et al., 2003 ; Kovacs et al., 2005).

HDAC6 knock-down cells and a control cell line were first used to monitor the HSF1 activation and HSP70 and accumulation after MG132 treatment. The use of this human system therefore allowed establishing, beyond any doubt, the role of HDAC6 in the activation

of HSP genes in response to the inhibition of the proteasome activity and the accumulation of mis-folded ubiquitinated proteins (Fig. 4A).

We then used this same system to investigate the role of p97/VCP in the HDAC6-dependent HSP response to MG132 treatment. Cells were transfected with specific anti-p97/VCP or control siRNAs to monitor HSF1 activation in response to the inhibition of the proteasome. Figure 4B shows that the down-regulation of p97/VCP completely abolished HSF1 activation in response to MG132 treatment (WT HDAC6 panel, lane 7).

Altogether these data allowed to complete our model and to describe in details the molecular events leading to the ubiquitin-dependent HSP90 complex dissociation.

Is there a role for HDAC6-dependent HSP90 acetylation in HSF1 activation in response to MG132 treatment?

We also monitored the state of HSP90 acetylation in the five established cell lines described above before and after MG132 treatment. HSP90 acetylation was detected after its immunoprecipitation (shown in Fig. 3A) by an anti-acetylated lysine antibody. As expected, HSP90 was found acetylated in KO cells as well as in cells expressing the catalytically dead HDAC6, confirming that HDAC6 is a major HSP90 deacetylase (Fig. 3, IP HSP90 panel, lane AcHSP90, columns 13 and 17). This Figure also shows that, in parental or in KO cells re-expressing WT HDAC6, proteasome inhibition leads to a clear increase in HSP90 acetylation, which very well correlates with the HDAC6-HSP90 complex dissociation observed in these cells (columns 12 and 16).

In cells expressing the Ub^m HDAC6 mutant, HSP90 remained underacetylated before and after MG132 treatment in perfect agreement with the inability of this HDAC6 mutant to be released from HSP90 after MG132 treatment (Fig. 3A, columns, 19 and 20).

However an intriguing situation was observed in cells expressing the catalytically dead HDAC6 mutant (HD^m). In these cells, as expected, HSP90 was found acetylated before MG132 treatment (column 17) but curiously, the acetylation signal disappeared six hours after the treatment (column 18) in the total absence of active HDAC6. This could be due to the intervention of another HDAC, which could become activated only when the HD^m HDAC6 mutant is released.

These data show that no clear relationship can be established between HSP90 acetylation and HSF1 activation and HSP gene response. This conclusion is also supported by the fact that a catalytically dead mutant of HDAC6 is as active as the WT protein in inducing HSP genes

activation in response to a treatment with MG132 (Fig. 1B and 2B), as well as in HSP90 complex disassembly (Fig. 3A).

The impairment of proteasome activity is essential to trigger the HDAC6-dependent cell response

In all the experiments presented here MG132 was used as a mean to inhibit the proteasome activity and to induce the HDAC6-dependent cell response. MG132 may however have uncontrolled effects on various cellular functions. In order to convincingly show that the impairment of proteasome function elicits the HDAC6-mediated response, we used siRNA against PAC1, a factor recently shown to be critical in the assembly of the active 20S proteasome (Hirano et al., 2005). Down-regulation of PAC1 in control cells, as expected, leads to an accumulation of ubiquitinated proteins indicative of proteasome function impairment and HSP70 and HSP27 accumulation (Fig. 5). In HDAC6 knock-down cells, after PAC1 down-regulation, despite the accumulation of ubiquitinated proteins, no HSF1 activation or heat shock gene response were observed. These data confirmed our conclusions based on the role of HDAC6 in sensing the proteasome dysfunction.

Involvement of HDAC6 in protecting cells against the toxic effects of mis-folded protein accumulation.

The data presented here point to HDAC6 as an essential cell survival element after the accumulation of misfolded ubiquitinated proteins. In order to confirm this hypothesis, we monitored cell apoptosis after treatment of cells with MG132. Figure 6 shows that sub-lethal doses of MG132 become significantly toxic in the absence of HDAC6 or when cells express a mutated version of HDAC6.

Our data also show that cells expressing a catalytically dead HDAC6 are also hypersensitive to an MG132 treatment, despite the fact that they are still capable of inducing the HSP gene response. This could be explained by involvement of HDAC6 catalytic activity in the formation of protective aggresomes through a yet unknown mechanism (Kawaguchi et al., 2003). The most dramatic effect, as expected, was observed in cells expressing the non-ubiquitin binding mutant of HDAC6.

Discussion

The proteasome/ubiquitin system clears the important mass of cellular mis-folded proteins,

which are continuously generated. These non-functional proteins can arise by mutations, excess in subunit synthesis and various denaturing stresses (Goldberg, 2003). Moreover, an important portion of newly synthesised proteins consists of mis-folded products, which also contribute to increase the mass of non-functional cellular proteins (Schubert et al., 2000). These defective proteins have a tendency to assemble into cytotoxic aggregates (Sherman and Goldberg, 2001) and different cellular defence mechanisms operate to counteract their deleterious effects.

First, a cellular clearance mechanism has been proposed to take in charge the aggregates and concentrate them into a single juxta-nuclear inclusion body named “aggresome” (Johnston et al., 1998). This process is thought to reduce the cytotoxic effects of scattered cellular protein aggregates (Kopito, 2000). HDAC6 was recently shown to be a key player in this clearance mechanism by functioning as an adaptor that, through its ubiquitin-binding activity, links aggregated protein cargos to the dynein motor, thus mediating their transport to the aggresome (Kawaguchi et al., 2003).

The appearance of the aggresome or inclusion body in cells however induces dramatic impairments of many cellular functions including a global inactivation of the ubiquitin/proteasome system (Bennett et al., 2005), which collectively paralyse vital cellular activities and induce cell death.

Another cellular mechanism helps facing protein aggregate toxicity by activating a heat shock gene response circuit leading to the accumulation of major cellular chaperons (Lee and Goldberg, 1998; Kawazoe et al., 1998; Mathew et al., 1998; Kim et al., 1999; Mathew et al., 2001). These chaperones decrease aggregate toxicity and facilitate their resorption (Goldberg, 2003). They possess indeed the potential to prevent aggregate formation either by helping protein refolding or by assisting their delivery to the ubiquitin/proteasome degradation system (Höhfeld et al., 2001).

Here we show that HDAC6 is also a major player in the latter mechanism, and is involved in signalling the abnormal accumulation of ubiquitinated proteins to the stress-response transcriptional machinery. The use of HDAC6^{-/-} cells re-expressing WT or mutated HDAC6, allowed to precisely dissect the underlying mechanism.

In the absence of cellular aggregates, like HSF1, both HDAC6 and p97/VCP remain in a dormant complex with HSP90. The accumulation of ubiquitinated proteins following the impairment of proteasome activity is sensed by HDAC6, via its ubiquitin-binding activity. HDAC6-ubiquitin interaction is the initiator of a chain of events evidenced here, inducing the dissociation of the HDAC6-p97/VCP complex. According to our model, the whole

mechanism of this complex dissociation is built around this ubiquitin-dependent HDAC6-p97/VCP dissociation. Indeed, we have previously shown that ubiquitin-binding by HDAC6 led to a HDAC6-p97/VCP complex dissociation (Seigneurin-Berny et al., 2001). More recently, we were able to show that free p97/VCP can also extract ubiquitin-bound HDAC6 and reform the complex (Boyault et al., 2006). Ubiquitin is therefore a strong regulator of HDAC6-p97/VCP interaction. Hence, our model proposes that after the ubiquitin-dependent dissociation of HDAC6-p97/VCP, the latter uses its segregase activity to dissociate the repressive HSP90 complex eventually leading to the release of HSF1. Alternatively, it is also possible that p97/VCP, directly or indirectly, stimulates HSP90's own ATPase activity.

The sensing of ubiquitinated protein aggregates by HDAC6 therefore frees three critical components of the cell response to their accumulation. HSF1, which will induce the accumulation of major HSPs, HDAC6, which will mediate protein aggregate clearance as reported previously (Kawaguchi et al., 2003), and p97/VCP which is a well known regulator of mis-folded protein degradation (Woodman, 2003). Indeed, p97/VCP has a well-documented role in the control of degradation, by ubiquitin/proteasome system, of a variety of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates (Romisch, 2005). According to our recent data (Boyault et al., 2006), p97/VCP may also play an important role in the post-stress recovery stages by extracting the ubiquitin-bound HDAC6. The reformation of p97/VCP-HDAC6 would then give the signal for the re-association of HSP90 and HSF1 and re-establishment of the basal non-stressed state.

During these investigations, no evidence was found for a role of HSP90 acetylation in the stability of HSF1-HSP90 complex or in the process of HSF1 activation in response to the impairment of proteasome activity. In agreement with the previously published data (Kawaguchi et al., 2003), a role of HDAC6 catalytic activity was however found in protecting cells against the toxic effect of MG132. This probably reflects a need for the deacetylase activity of HDAC6 after its release from the HSP90 complex, in the transport and clearance of cellular aggregates (Kawaguchi et al., 2003).

It is also important to mention that we did not observe a convincing role for HDAC6 in HSF1 activation in response to heat shock (not shown).

We can therefore conclude that the obligatory step of HSF1-HSP90 dissociation, in the stress-dependent HSF1 activation, is controlled by distinct mechanisms depending on the nature of the stressful stimuli. In the case of heat shock, the release of HSF1 may be controlled by stimuli, which occur earlier than, and not directly dependent on the accumulation of mis-folded ubiquitinated proteins.

The mechanism described here places HDAC6 in the heart of a response system specifically activated after the impairment of proteasome activity, when mis-folded protein aggregates accumulate. The beauty of the model is that, in the repressive HSP90 complex, HDAC6 and p97/VCP first serve respectively as a trigger and a responsive dissociating spring, and then, after their release, they both individually behave as actors of the aggregate management, while HSF1 follows its activation route to elicit additional help by inducing a massive synthesis of chaperons.

Bibliography

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., *et al.* (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280, 26729-26734.

Bennett, E. J., Bence, N. F., Jayakumar, R., and Kopito, R. R. (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17, 351-365.

Bertos, N. R., Gilquin, B., Chan, G. K., Yen, T. J., Khochbin, S., and Yang, X. J. (2004). Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem* 279, 48246-48254.

Boyault, C., Gilquin, B., Zhang, Y., Rybin, V., Garman, E., Meyer-Klaucke, W., Matthias, P., Muller, C. W., and Khochbin, S. (2006). HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *Embo J* 25, 3357-3366.

Christians, E., Michel, E., Adenot, P., Mezger, V., Rallu, M., Morange, M., and Renard, J. P. (1997). Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the HSP70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. *Mol Cell Biol* 17, 778-788.

Ghislain, M., Dohmen, R. J., Levy, F., and Varshavsky, A. (1996). Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 15, 4884-4899.

Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895-899.

Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T.,

Tanaka, K., and Murata, S. (2005). A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. *Nature* *437*, 1381-1385.

Hohfeld, J., Cyr, D. M., and Patterson, C. (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Rep* *2*, 885-890.

Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M., and Eisenman, R. N. (2002). Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 13425-13430.

Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., and Yao, T. P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* *417*, 455-458.

Johnston, J. A., Ward, C. L., and Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* *143*, 1883-1898.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., and Yao, T. P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* *115*, 727-738.

Kawazoe, Y., Nakai, A., Tanabe, M., and Nagata, K. (1998). Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur J Biochem* *255*, 356-362.

Kim, D., Kim, S. H., and Li, G. C. (1999). Proteasome inhibitors MG132 and lactacystin hyperphosphorylate HSF1 and induce hsp70 and hsp27 expression. *Biochem Biophys Res Commun* *254*, 264-268.

Kopito, R. R., and Sitia, R. (2000). Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep* *1*, 225-231.

Kovacs, J. J., Murphy, P. J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J. T., Nicchitta, C. V., Yoshida, M., Toft, D. O., Pratt, W. B., and Yao, T. P. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* *18*, 601-607.

Lee, D. H., and Goldberg, A. L. (1998). Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18, 30-38.

Mathew, A., Mathur, S. K., Jolly, C., Fox, S. G., Kim, S., and Morimoto, R. I. (2001). Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21, 7163-7171.

Mathew, A., and Morimoto, R. I. (1998). Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann N Y Acad Sci* 851, 99-111.

Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., *et al.* (2002). In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21, 6820-6831.

Mullally, J. E., Chernova, T., and Wilkinson, K. D. (2006). Doa1 is a Cdc48 adapter that possesses a novel ubiquitin binding domain. *Mol Cell Biol* 26, 822-830.

Murphy, P. J., Morishima, Y., Kovacs, J. J., Yao, T. P., and Pratt, W. B. (2005). Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem* 280, 33792-33799.

Pirkkala, L., Alastalo, T. P., Zuo, X., Benjamin, I. J., and Sistonen, L. (2000). Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. *Mol Cell Biol* 20, 2670-2675.

Romisch, K. (2005). Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 435-456.

Rumpf, S., and Jentsch, S. (2006). Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell* 21, 261-269.

Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.

Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001). Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 21, 8035-8044.

Sherman, M. Y., and Goldberg, A. L. (2001). Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15-32.

Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M. P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000). Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* 10, 747-749.

Verdel, A., and Khochbin, S. (1999). Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* 274, 2440-2445.

Voellmy, R. (2004). On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones* 9, 122-133.

Wang, Q., Song, C., and Li, C. C. (2003). Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 253-260.

Westerheide, S. D., and Morimoto, R. I. (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem* 280, 33097-33100.

Woodman, P. G. (2003). p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci* 116, 4283-4290.

Wojcik, C., Yano, M., and DeMartino, G. N. (2004). RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 117, 281-292.

Woodman, P. G. (2003). p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci* 116, 4283-4290.

Yang, X. J., and Gregoire, S. (2005). Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol* 25, 2873-2884.

Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003). HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* 22, 1168-1179.

Zhao, R., and Houry, W. A. (2005). Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem Cell Biol* 83, 703-710.

Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F., and Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480.

Material and methods

Cell lines

Mice with invalidated HDAC6 gene were generated (Zhang et al., 2003; Zhang and Matthias unpublished data) and mouse embryo fibroblasts were isolated from E13.5 embryos. Sex genotyping was used to select only male embryos. HDAC6-knockout and wild type lines were further identified by PCR genotyping and western blots. 3T3 cell lines were established following standard 3T3 protocol. The cells were plated at density of 3×10^5 cells per 5cm plate and spited every 3 days for about 20 passages.

Wild type and mutant HDAC6 cDNAs (Verdel et al., seigneurin-Berny et al., 2001) were cloned into pMSCV.EGFP vector. The retrovirus was made from Pheonix cells following a standard protocol. After the infection, HDAC6^{-/-} 3T3 cells were kept in culture for two weeks and single GFP-positive cells were sorted into 96-well plates. The positives clones were identified by western blot and PCR.

HSF1^{-/-} and parental cells have been already described (Christians et al., 1997). A549 cells stably expressing anti-HDAC6 and control shRNAs have been previously described (Kawaguchi et al., 2003; and Kovacs et al., 2005).

Plasmids, siRNAs and treatments

Mouse HDAC6 cDNA, wild type or harbouring inactivating mutations in both catalytic domains or in the ubiquitin-binding ZnF-UBP domain, were described and characterized previously (Verdel et al., 2000; Seigneurin-Berny et al., 2001). These cDNAs were used to generate all the HDAC6 pMSCV.EGFP vectors employed to establish the stable cell lines described above.

Anti-PAC1 and anti-p97/VCP siRNAs were designed as previously described (Wojcik et al., 2003 ; Hirano et al., 2005) and purchased from Eurogentec. A549 cells were seeded in 6 wells plates at 10⁵ cells per well, 24h before siRNA treatment. In each experiment HAT1 siRNA was used as a control. siRNA transfections were performed using oligofectamine reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Proteasome inhibitor MG132 was purchased from Calbiochem (474790). MG132 was used as 5µM treatment except for FACS analysis, cells were treated during 24h with 2µM MG132.

Antibodies, immunoprecipitation and FACS analysis

Antibodies used are as follows: p97/VCP antibody was a gift of Dr. Tonks. Anti-HDAC6 was described previously (Seigneurin-Berny et al., 2001). Anti-ubiquitin, anti-HSF1 and anti-tubulin were purchased from Santa Cruz (SC-8017), Stressgen (SPA-901) and Sigma (T5168) respectively. Anti-Acetylated αTubulin, anti-HSP70, anti-HSP25, anti-HSP27 and anti-HSP90 were from SIGMA (T6793), Abcam (3A3 ab5439) and Stressgen (SPA-801, SPA-803 and SPA-830) respectively. Anti-acetylated lysines was purchased from Cell Signaling (9441), anti-Flag epitope from SIGMA (M2), anti-HA from SantaCruz (Y11), anti-Myc from Roche (9E10).

Immunoprecipitations were performed on cytosolic extracts. Cytosolic extracts were prepared as described (Seigneurin-Berny et al., 2001) using buffer of following composition : 50 mM Hepes pH 7.4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.65 mM Spermidine, 0.34 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5mM DTT, 0.05% Triton, antiprotease cocktail (Complete tabs, Roche), antiphosphatase cocktail 1 (SIGMA P2850, 1/100e), B-Glycerophosphate (SIGMA G6251, 25mM), NaF (SIGMA S7920, 5mM), Trichostatine A (SIGMA, 100ng/ml). On cytosolic extract, 0.5% CHAPS, 50 mM MgCl₂, 5mM CaCl₂, were added.

For immunoprecipitation of HSP90, 200 µg of cytosoluble cell extract were incubated with 2µg of HSP90 antibody for 12 hours, and captured on protein G sepharose 4 fast flow beads (Amersham Biosciences) for 2 hour. After washing, beads were boiled in loading buffer and analysed by western blot. Antiphosphatase cocktail 1, B-Glycerophosphate (SIGMA G6251, 25mM), NaF (SIGMA S7920, 5mM) and Trichostatine A (SIGMA, 100ng/ml), complete tabs (Roche), 0.5% CHAPS, 50 mM MgCl₂ and 5mM CaCl₂ were used during each step of HSP90 immunoprecipitation. This final buffer is referred as buffer A.

Ubiquitin-dependent immunocomplex dissociation assays were performed by incubating HSP90 immunocomplexes obtained after HSP90 immunoprecipitation with 10 µg of penta-ubiquitin (ubiquitin₅⁺¹ from Affinity) in buffer 50 mM Hepes pH 7.4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.65 mM Spermidine, 0.34 M Saccharose, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5mM DTT, 0.05% Triton, antiprotease cocktail (Complete tabs, Roche), antiphosphatase cocktail 1 (SIGMA P2850, 1/100e), B-Glycerophosphate (SIGMA G6251, 25mM), NaF (SIGMA S7920, 5mM), Trichostatine A (SIGMA, 100ng/ml). containing 2mM ATP and 2mM MgCl₂ or not for 2 hours at room temperature. After centrifugation and washing the beads, proteins present in the immunocomplexes were analyzed by western blot procedure.

Apoptotic cells were visualised by FACS after the detection of active caspase 3 using a BD Pharmingen kit, according to the vendor's instructions.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the association "vaincre la mucoviscidose" for supporting C. B. Ph.D. fellowship for 4 years. S. K. laboratory was supported by "Region Rhône Alpes theme prioritaire Cancer" program and EpiMed and EpiPro (CLARA/INCa) as well as ARECA (ARC) programs. We gratefully acknowledge the expert assistance of Sandrine Benitski in tissue culture work and Sophie Rousseaux for critical reading of the manuscript. The work in P. M. laboratory was supported by the Novartis Research Foundation.

Legend to figures

Figure 1: HDAC6 and its ubiquitin-binding activity is required to activate a heat shock cell response to the proteasome inhibition

A) 3T3 cell lines were established from mouse embryo fibroblasts isolated from parental (P) or HDAC6^{-/-} (KO) mice. A HDAC6^{-/-} clone was then used to establish new lines re-expressing wild type HDAC6 (wt) or HDAC6 bearing mutations either in their two catalytic deacetylase domains (HD^m) or in the ZnF-UBP ubiquitin binding domain (Ub^m). Equivalent amounts of extracts from these cell lines were used to compare their levels of HDAC6 expression. The blot was then successively probed with the indicated antibodies. P corresponds to a 3T3 cell line established from a parental HDAC6^{+/+} mouse.

B) The cell lines described above, treated with 5 µg/ml MG132 for the indicated periods of time, were lysed and extracts prepared. Equivalent amounts of extracts were loaded and ubiquitin, HSP25, HSP70 and tubulin were visualized on Western Blots.

Figure 2: The activation of HSF1 in response to MG132 depends on the integrity of the HDAC6 ZnF-UBP domain.

A) Embryonic MEF cells from parental (WT) and HSF1^{-/-} cells were treated with MG132 for the indicated periods of time and ubiquitin, HSF1, HSP70 and HSP25 and tubulin were analysed as above.

B) Extracts from the experiment described in Fig. 1B were probed with anti-HSF1 and anti-tubulin antibodies.

Figure 3. A treatment with MG132 leads to an HDAC6-dependent dissociation of the repressive HSP90-HSF1 complex.

A) Extracts from the different cell lines described in Fig. 1B and treated for 6 hours (+) with MG132 or non-treated (-) were used to immunoprecipitate HSP90 and the co-immunoprecipitation of HSF1, p97/VCP and HDAC6 was monitored. The acetylation of the immunoprecipitated HSP90 was also detected using an anti-acetylated lysin antibody. The “input” panel shows the presence of the studied proteins before immunoprecipitation in the extracts.

B) HSP90 immuno-complexes obtained after the immunoprecipitation of HSP90, as described in A, were incubated with 10 µg of penta-ubiquitin chain in the presence of 2mM ATP/2mM

MgCl₂ or not. After the elimination of the supernatant, the proteins remaining associated with the HSP90 immunocomplex were analysed by western blot.

Figure 4 : p97/VCP mediates the HDAC6-dependent HSF1 activation.

A) HSF1 activation and heat shock response are strictly dependent on HDAC6 in human cells. Human A549 cells stably expressing an anti-HDAC6 shRNA (KD) or the control cell lines (WT) (Kawaguchi et al., 2003 ; Kovacs et al., 2005) were treated with MG132 (5 μM, up to 16 hours) and extracts were prepared after each indicated period of time. The corresponding blots were then probed with the anti-HSF1, HSP70 and tubulin antibodies.

B) p97/VCP is required for the HDAC6-dependent activation of HSF1. HDAC6 knocked-down A549 (KD) and the control (WT) cell lines, were treated with control siRNA or siRNA designed against p97/VCP, and cells were treated with 5μM MG132 during 6 hours as indicated. Extracts were prepared and probed with antibodies against HSF1, ubiquitin, p97/VCP and tubulin.

Figure 5: Impairment of the proteasome activity leads to a HDAC6-dependent activation of HSF1.

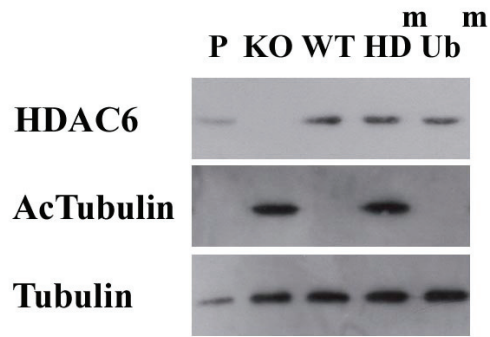
Human A549 KD (HDAC6 knock-down) and control cells were treated with a control or an anti-PAC1 siRNAs, and the activation of HSF1 and HSP70 accumulation were monitored.

Figure 6: HDAC6 and its ubiquitin-binding activity protect cells against the cytotoxic effects of proteasome dysfunction.

The indicated cells (as in Fig. 1A) were treated with 2μM MG132 for 16 hours and the apoptotic cells visualised by the detection of the active caspase 3 and FACS analysis. The histogram indicates the % of cells containing active caspase 3 with respect to the total number of analysed cells. The histograms represent three independent experiments (variations around the mean values are indicated).

Fig. 1

A



B

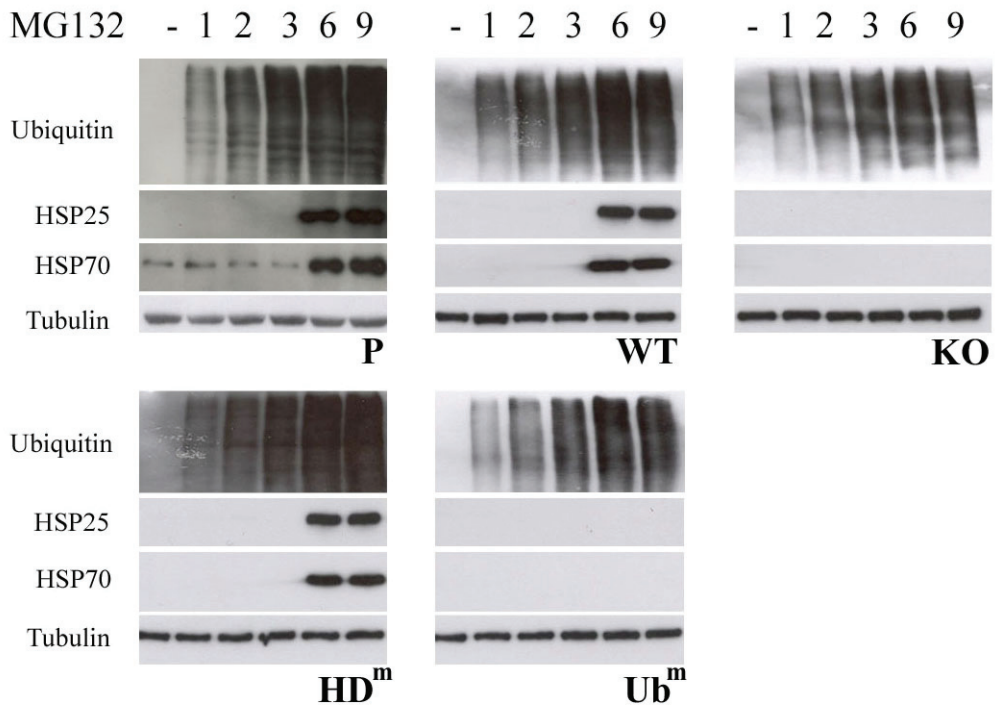
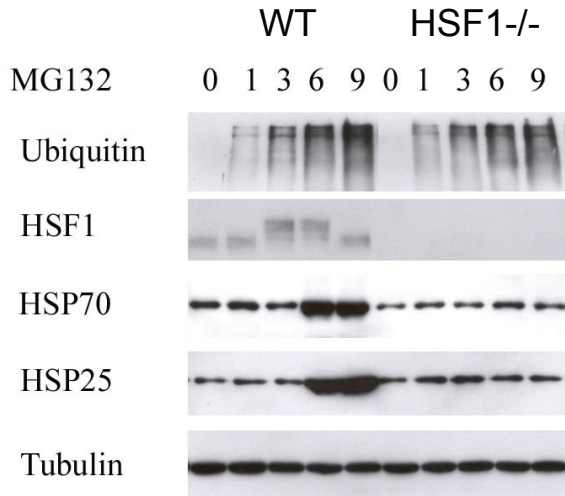


Fig. 2

A



B

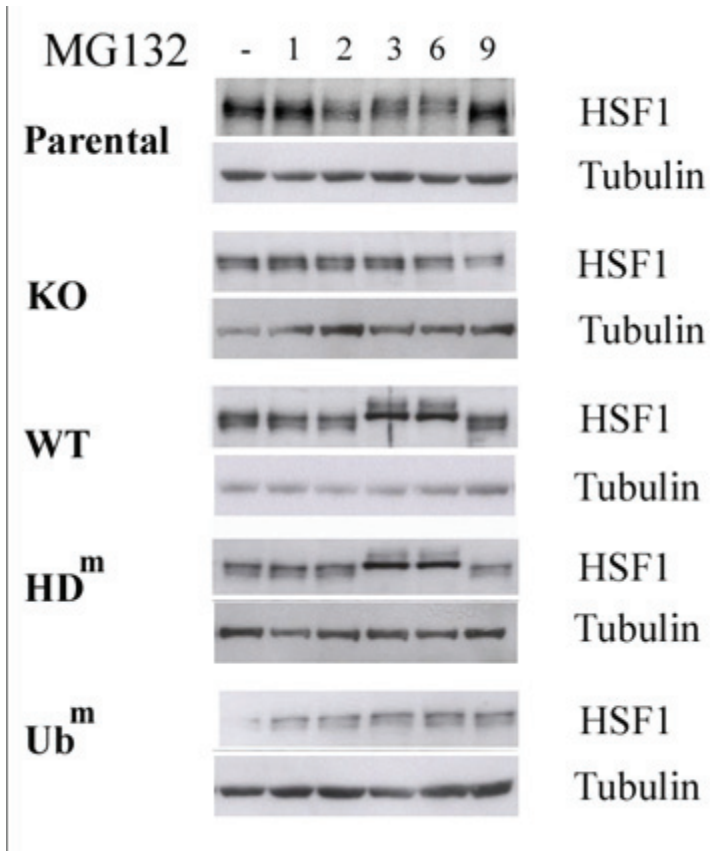
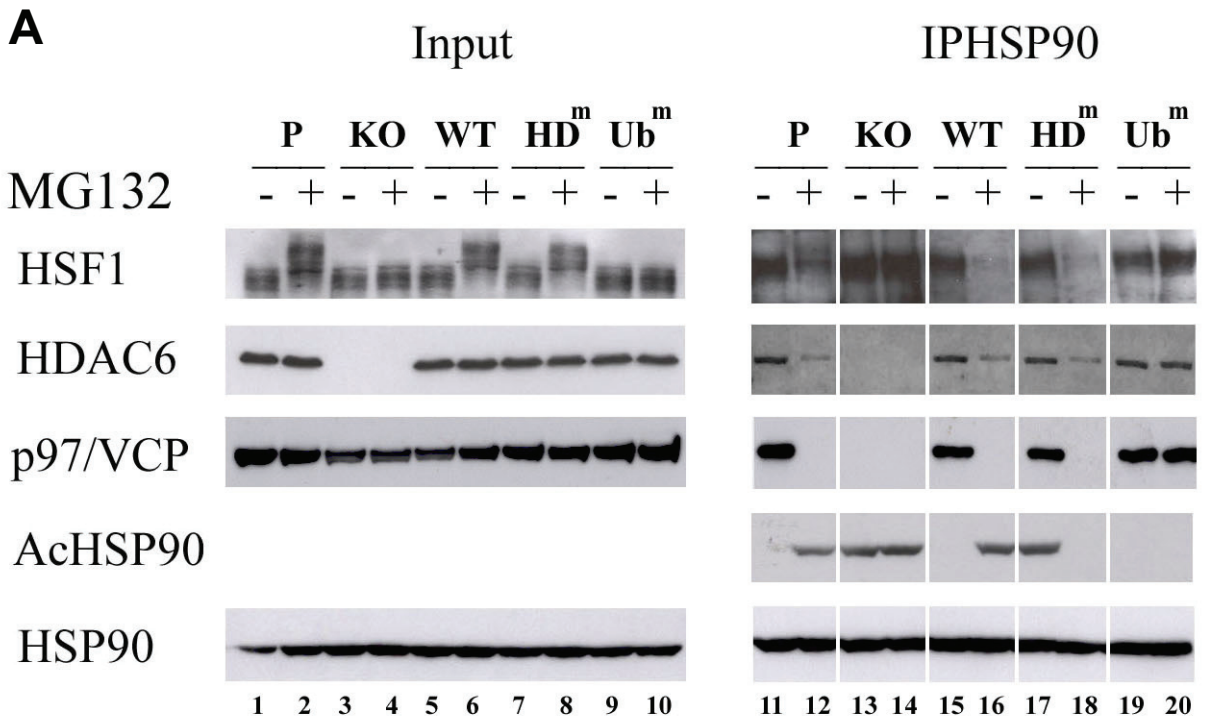


Fig. 3



B

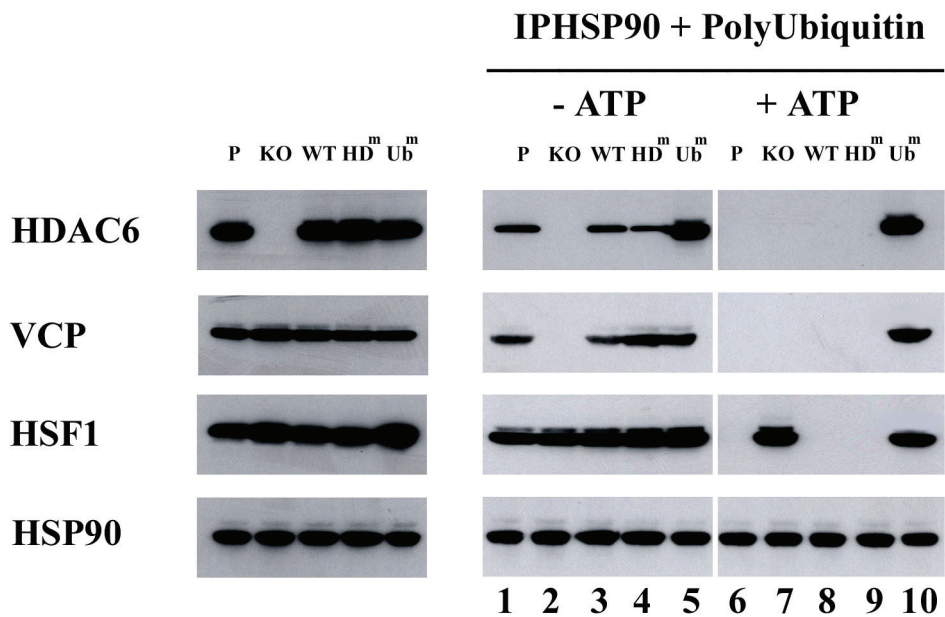
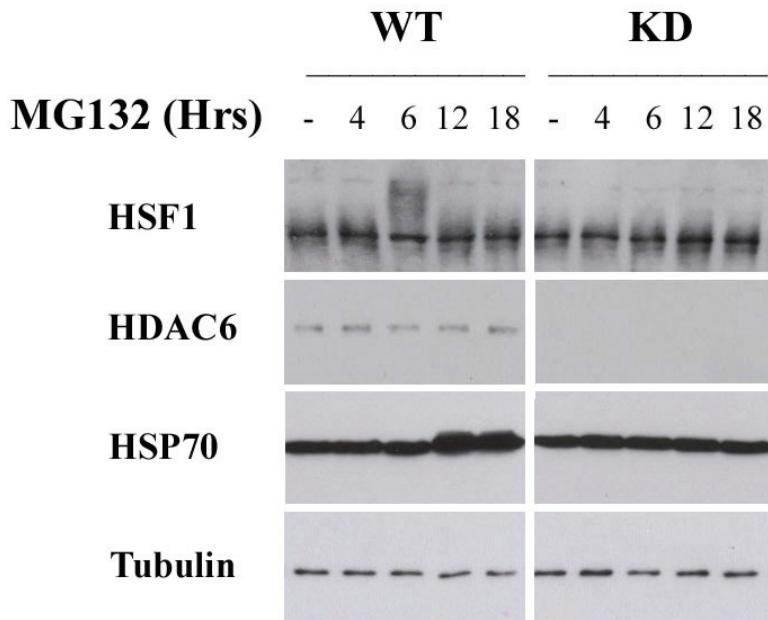


Fig. 4

A



B

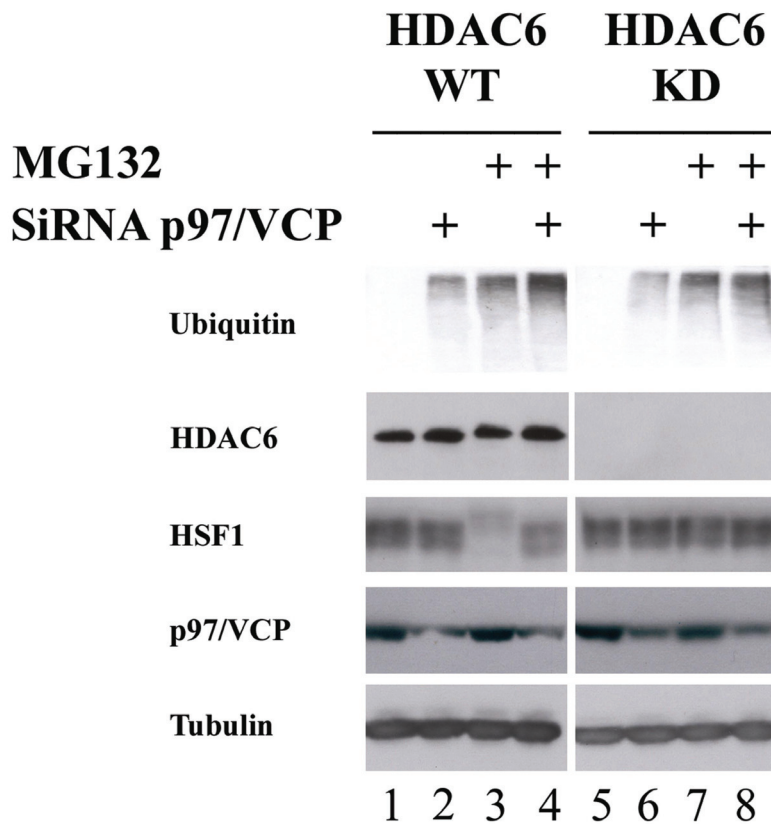


Fig. 5

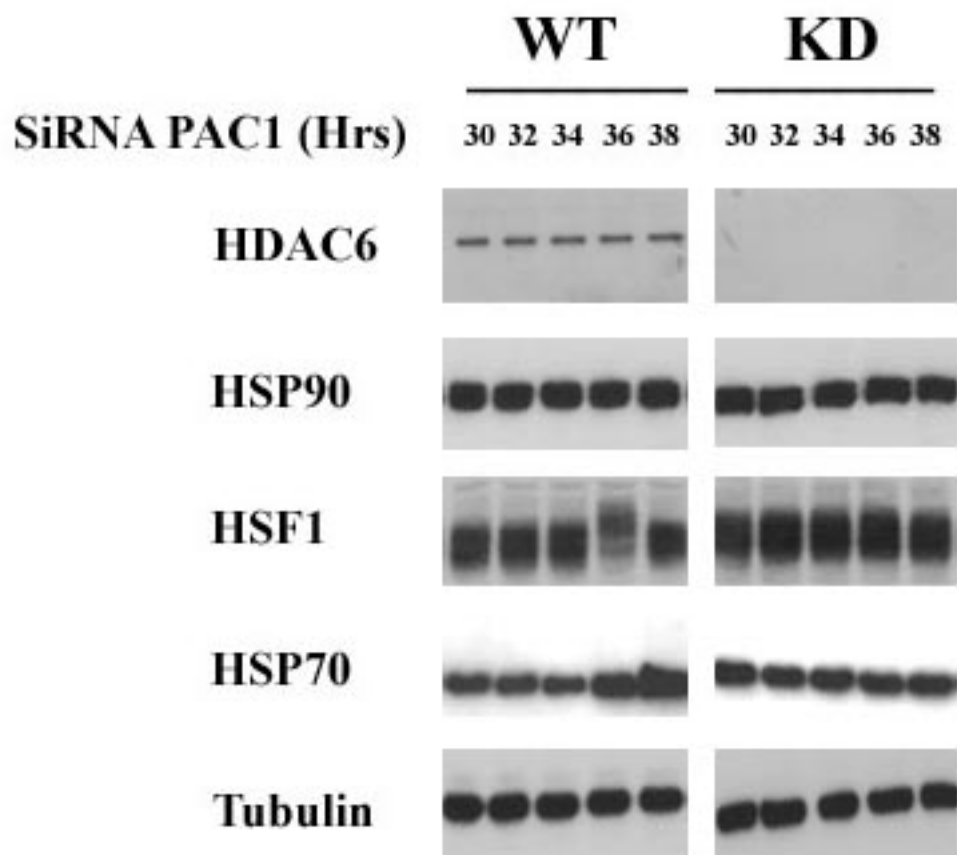
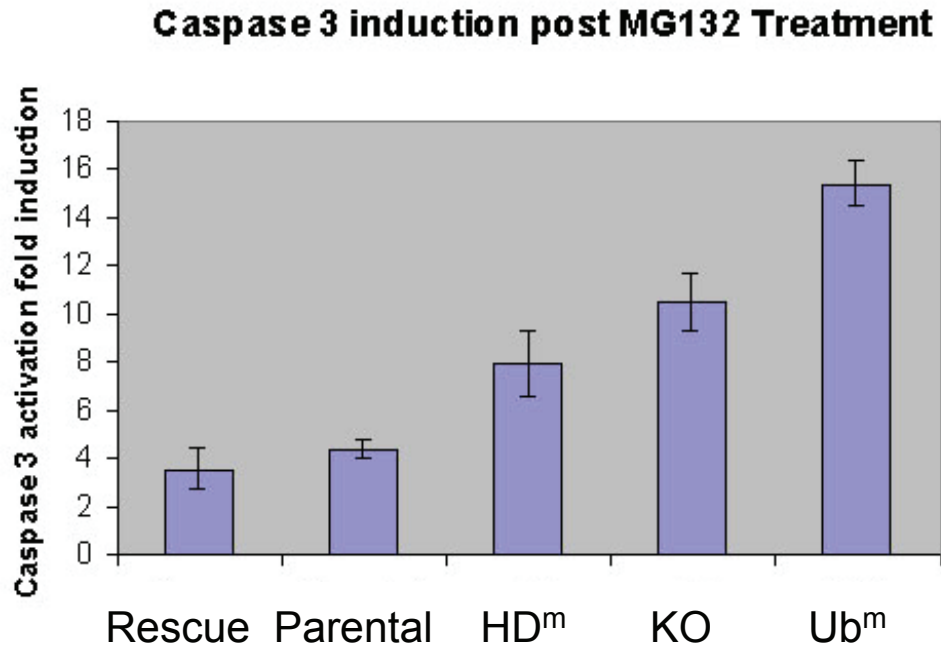


Fig. 6



Conclusion

Conclusion

A. Le recyclage des chaînes de poly-ubiquitine est contrôlé par le complexe HDAC6-p97/VCP

1- HDAC6 ZnF-UBP : le domaine UBD le plus avide pour l'ubiquitine

L'utilisation d'approches biophysiques nous a permis de caractériser le domaine de liaison de HDAC6 à l'ubiquitine, le domaine ZnF-UBP. MicroPIXE et EXAFS, en combinaison avec notre approche de mutagenèse dirigée, suggèrent fortement que 3 atomes de zinc structurent ce domaine et sont donc critiques dans son interaction avec une molécule d'ubiquitine. Parmi les dix domaines de liaison à l'ubiquitine identifiés jusqu'ici, seuls deux domaines, NZF (Npl4 Zinc finger) et le domaine ZnF-UBP de USP5/IsoT sont des domaines structurés par le zinc. Néanmoins, ces deux domaines contiennent un seul zinc, coordonné par 4 résidus cystéines dans le cas de NZF (Alam et *al.*, 2004) ou par 3 cystéines et une histidine dans le cas de USP5/IsoT (Reyes-Turcu et *al.*, 2006).

L'organisation structurale particulière du domaine ZnF-UBP de HDAC6 pourrait expliquer que ce domaine présente l'affinité pour l'ubiquitine la plus forte connue parmi les autres domaines de liaison à l'ubiquitine (Hicke et *al.*, 2005 ; Reyes-Turcu et *al.*, 2006). Pour la plupart des facteurs interagissant avec l'ubiquitine, une faible affinité pour l'ubiquitine a probablement des implications fonctionnelles importantes, puisque les complexes sont capables de rapidement s'associer et se dissocier. Nos données suggèrent que le domaine ZnF-UBP de HDAC6 tombe dans une nouvelle catégorie.

2- Le domaine ZnF-UBP masque les chaînes de poly-ubiquitine

En fait, la haute affinité du domaine de liaison à l'ubiquitine de HDAC6 pose la question de la régulation du complexe HDAC6-Ubiquitine. Plus particulièrement, nous montrons que l'interaction HDAC6-polyubiquitine possède une fonction de masquage,

empêchant ainsi l'action d'autres facteurs pouvant se lier à l'ubiquitine, comme les USPs et les sous unités protéasomales capables d'interagir avec les chaînes de poly-ubiquitine. La conséquence fonctionnelle de cette activité de HDAC6 est une réduction du recyclage des chaînes de poly-ubiquitine. Pour une cellule, il est devenu donc très important d'inverser cette activité particulière de HDAC6, afin de gérer les protéines poly-ubiquitinées et de maintenir une concentration intracellulaire optimale en mono-ubiquitine.

3- HDAC6-ubiquitine : une interaction régulée par p97/VCP

La chaperonne p97/VCP est un excellent candidat pouvant réguler ce phénomène. En effet, c'est un partenaire de HDAC6 (Seigneurin-Berny *et al.*, 2001). De plus, elle est impliquée nombre de fonctions cellulaires s'appuyant sur son activité ségrégase de désassemblage de complexes, incluant ceux contenant les protéines ubiquitinées (Wang *et al.*, 2003 ; Romisch, 2005).

Récemment, une étude détaillée dans la levure a suggéré un modèle pour l'activité de p97/VCP dans la dégradation des protéines par le système ubiquitine protéasome. Il est proposé que p97/VCP restreint l'élongation de la chaîne de poly-ubiquitine d'une protéine substrat médiée par une E4 de levure, Ufd2p (Richly *et al.*, 2005). Une autre étude a suggéré que p97/VCP puisse aussi être impliqué dans le contrôle de l'activité de l'orthologue mammifère de Ufd2p, E4B, qui effectue la poly-ubiquitination de l'ataxine-3. Il semblerait que p97/VCP dissocie E4B de la forme poly-ubiquitinée de ataxine-3. Dans notre étude, nous avons mis en évidence un autre aspect de la fonction de p97/VCP, qui pourrait aussi empêcher l'accumulation excessive de protéines poly-ubiquitinées. En effet, p97/VCP en dissociant les complexes HDAC6-poly-ubiquitine favorise à la fois l'action des USPs ou l'interaction de S5A/RPN10 avec les chaînes de poly-ubiquitine. Ceci suggère un nouveau mécanisme de prévention de la formation d'agrégats de protéines poly-ubiquitinées grâce à p97/VCP. Cette action de p97/VCP accélère la dégradation des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome.

4- HDAC6-p97/VCP : système clef de la gestion des protéines poly-ubiquitinées

Le travail de Kawaguchi et collègues (Kawaguchi et *al.*, 2003) montre que HDAC6 est capable de transporter les agrégats de protéines poly-ubiquitinées vers une structure appelée agrésome. Nous avons pu confirmer ces observations en montrant un rôle positif de HDAC6 dans la formation d'agrésome. Nous avons de plus pu montrer que ceci intervient lors d'un excès de HDAC6 par rapport à p97/VCP. En effet, p97/VCP est capable de recycler HDAC6 et de délivrer les protéines poly-ubiquitinées au protéasome. Nous pensons donc que dans un cas pathologique d'excès de HDAC6 ou de dysfonction de p97/VCP, ces agrégats s'accumulent en agrésomes à cause de l'accrochage irréversible de HDAC6 aux chaînes de poly-ubiquitine et à son activité d'escorte. En accord avec ce modèle, la formation d'agréats protéiques a cause d'un dysfonctionnement de p97/VCP a déjà été observé dans de nombreux systèmes (Hirabayashi et *al.*, 2001 ; Kobayashi et *al.*, 2002 ; Nagahama et *al.*, 2003 ; Wojcik et *al.*, 2004). De façon plus intéressante, des mutations de p97/VCP semblent responsables de IBMAPDBFD (inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia – Watts et *al.*, 2004). HDAC6 et p97/VCP semble donc être de très bonnes cibles pour lutter contre les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose amyotrophique latérale et les maladies à prions, qui sont reconnues pour avoir des mécanismes moléculaires communs, incluant l'agrégation des protéines et la formation de corps d'inclusion.

Bien que ce travail mette en exergue la fonction de HDAC6 en tant que régulateur négatif de la dégradation des protéines par le protéasome, nous pensons que, a des concentrations physiologiques de HDAC6 et p97/VCP, HDAC6 puisse aussi accélérer la dégradation des protéines. En effet, HDAC6 en favorisant la poly-ubiquitination des protéines, et p97/VCP en favorisant leur adressage au protéasome, optimiserait l'ubiquitination des protéines et leur dégradation.

En conclusion de ce travail, nous proposons que HDAC6-p97/VCP constitue un système clef de gestion cellulaire, qui décide du sort des protéines poly-ubiquitinées.

B. L'activité protéasomale et la réponse cellulaire à l'accumulation des protéines poly-ubiquitinées sont reliées par HDAC6

1- Contre l'accumulation des protéines mal repliées et ubiquitinées

Le système ubiquitine/protéasome dégrade une partie importante des protéines cellulaires mal repliées générées continuellement. Ces protéines non fonctionnelles sont la conséquence de mutations, d'un excès au niveau de la synthèse de certaines sous unités ou encore de nombreux stress dénaturants (Goldberg, 2003). De plus, une fraction importante des protéines nouvellement synthétisées a aussi une fraction qui n'est pas fonctionnelle. Ceci contribue donc aussi à augmenter la quantité de protéines non fonctionnelles dans la cellule (Schubert, 2000). Ces protéines non fonctionnelles ont cependant la tendance à s'assembler en agrégats cytotoxiques (Sherman and Goldberg, 2001). Des mécanismes de défense cellulaires pour limiter les effets délétères de ces agrégats. Premièrement, un mécanisme d'élimination a été proposé pour prendre en charge les agrégats et les concentrer dans un corps d'inclusion unique périnucléaire appelé agrésome (Johnston et al., 1998). Certaines équipes pensent que ceci réduit les effets cytotoxiques d'agrégats protéiques multiples pour la cellule (Kopito, 2000). Il a récemment été montré que HDAC6 est un élément clef de ce mécanisme d'élimination, fonctionnant comme un adaptateur qui pontre les agrégats protéiques, grâce à son interaction avec l'ubiquitine, au moteur moléculaire dynéine, permettant ainsi leur transport vers l'agrésome (Kawaguchi et al., 2003). L'apparition d'IB (inclusion body) ou agrésome dans la cellule provoque néanmoins beaucoup de dysfonctionnement de fonctions cellulaires, incluant notamment l'inactivation globale du système ubiquitine-protéasome (Bennett et al., 2005). Ceci va paralyser de nombreuses activités cellulaires vitales et induire la mort cellulaire.

Un autre mécanisme existe donc pour faire face à la toxicité des agrégats protéiques. Ceci passe par l'activation d'un circuit de la transcription des gènes HSPs conduisant à l'accumulation de protéines chaperonnes cellulaires majeurs (Lee and Goldberg, 1998 ; Kawazoe et al., 1998 ; Mathew et al., 1998 ; Kim et al., 1999 ; Mathew et al., 2001) ce qui va diminuer la toxicité des agrégats et faciliter leur résorption (Goldberg, 2003). Ces protéines chaperonnes ont aussi le potentiel d'empêcher la formation d'agrégats en tamponnant les protéines mal repliées afin de les assister soit dans leur repliement, soit pour cibler les protéines dénaturées de façon irréversible au système ubiquitine/protéasome.

Dans ce travail, nous avons montré que HDAC6 est un acteur majeur de ce mécanisme particulier, qui signale l'accumulation anormale de protéines poly-ubiquitinées à la machinerie transcriptionnelle de la réponse cellulaire au stress. Nos données montrent que le domaine d'interaction avec l'ubiquitine de HDAC6 a vraiment un rôle de déclencheur qui, lorsque il est utilisé, induit le désassemblage du complexe répresseur de HSF1. De façon surprenante, nous n'avons trouvé aucune preuve de l'implication de l'acétylation de HSP90 dans la régulation de ce phénomène. En effet, en l'absence d'agrégats de protéines poly-ubiquitinées, le complexe HSF1-HSP90 reste stable, sans lien direct entre l'activité catalytique de HDAC6 et l'état d'acétylation de HSP90.

2- Une nouvelle fonction pour la ségrégase p97/VCP

Tirant profit de nos données obtenues précédemment (Seigneurin-Berny *et al.*, 2001), nous avons été capable d'identifier la dissociation ubiquitine dépendante de HDAC6-p97/VCP en tant qu'événement initiateur majeur de l'activité ségrégase de p97/VCP et donc de la dissociation du complexe HSP90.

La protéine p97/VCP est un régulateur bien connu de l'assemblage et désassemblage de nombreuses structures cellulaires (Woodman, 2003). Cette protéine est aussi très impliquée dans le système ubiquitine protéasome. Premièrement, elle est nécessaire à la prise en charge des substrats de la voie ERAD (ER-Associated Degradation). De plus, elle joue un rôle critique dans le ciblage de ces protéines au protéasome (Romisch, 2005).

Dans ce travail, nous montrons qu'en absence d'un stress d'agrégation protéique, tout comme HSF1, HDAC6 et p97/VCP reste dans un complexe « dormant » avec HSP90. L'accumulation de protéines ubiquitinées suivant l'inhibition de l'activité protéasomale, est détectée par le domaine ZnF-UBP de HDAC6. L'interaction HDAC6-ubiquitine est l'initiateur majeur de la machinerie découverte dans ce travail, libérant HDAC6, p97/VCP et HSF1, chacun assurant différentes fonctions liées à la gestion des protéines ubiquitinées. Dans le précédent travail, nous avons pu montrer que le domaine d'interaction avec l'ubiquitine de HDAC6, ZnF-UBP montre la plus haute affinité pour l'ubiquitine et que p97/VCP est aussi critique pour extraire HDAC6 de l'ubiquitine. Cette étude a aussi montré que la gestion des

protéines cellulaires poly-ubiquitinées est finement régulée par une balance des concentrations entre HDAC6 et p97/VCP.

3- Dysfonctionnement du protéasome et complexes HDAC6-HSP90-HSF1-p97/VCP

Il est important de noter que bien que la dissociation du complexe répressif de HSF1 soit une étape obligatoire de l'activation de HSF1 lors d'un stress, il pourrait être contrôlé par un mécanisme distinct qui dépendrait de la nature du stress. Par exemple, nous n'observons pas un rôle convainquant de HDAC6 dans l'activation de HSF1 lors d'un choc thermique. Dans ce cas, l'activité ségrégase de p97/VCP (dissociant le complexe HSP90) pourrait être stimulé par d'autres facteurs cellulaires.

Les mécanismes décrits dans ce travail, placent HDAC6 au cœur d'un système de réponse spécifiquement active quand les protéines mal repliées et ubiquitinées s'accumulent. Dans le complexe répressif HSP90, HDAC6 et p97/VCP sont respectivement une gâchette et un élément de réponse dissociant. Après leur re-largage, ils servent individuellement à la gestion des agrégats, alors que HSF1 poursuit son processus d'activation pour permettre la mise en place d'une aide supplémentaire en induisant la synthèse massive de chaperonnes.

Conclusion générale

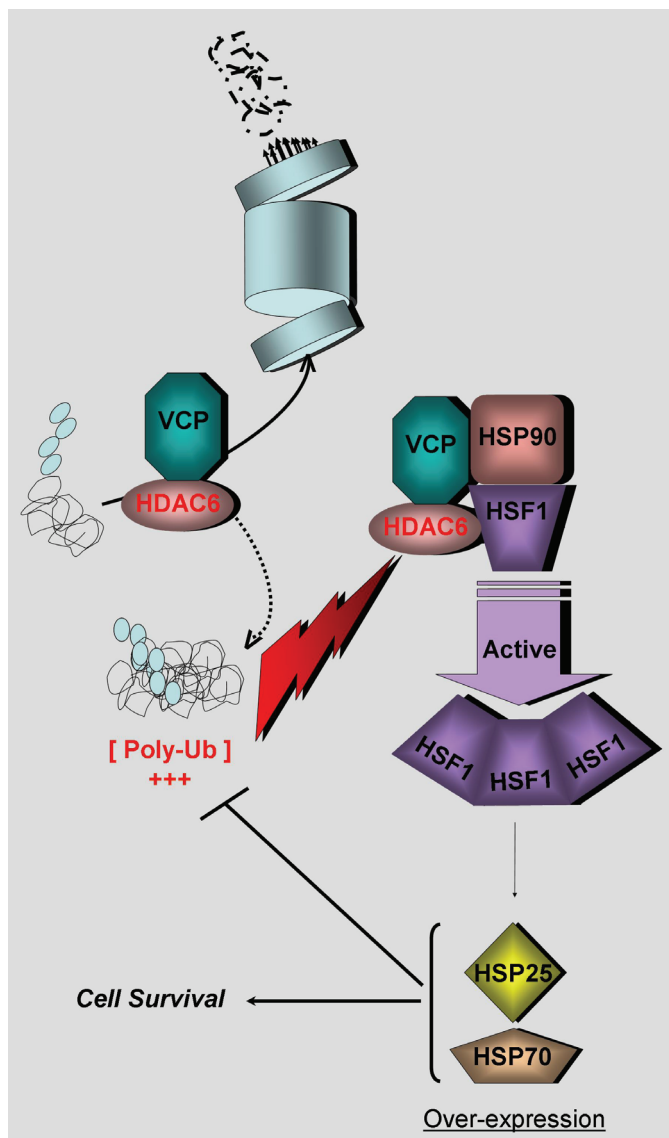


Figure V

Modèle : HDAC6 contrôle la stabilité des protéines et la réponse cellulaire à l'accumulation de protéines poly-ubiquitinées. Le complexe p97/VCP-HDAC6 semble jouer un rôle clef dans le contrôle de la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome. Dans notre modèle, un changement du ratio des concentrations intra-cellulaires dans ce complexe aurait des conséquences drastiques. En effet, un excès de p97/VCP ou de HDAC6 augmenterait respectivement la dégradation des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome ou au contraire stabiliserait les protéines poly-ubiquitinées. De ce fait, les complexes p97/VCP-HDAC6 constitueraient une cible thérapeutique de choix dans la lutte contre les maladies d'agrégation des protéines (comme certaines maladies neurodégénératives) ou encore pour stabiliser les protéines dégradées trop rapidement (cas de la mucoviscidose). Nous pensons aussi que HDAC6 contrôle la réponse cellulaire au stress causée par l'accumulation en protéines poly-ubiquitinées. HDAC6 serait capable de détecter l'augmentation anormale en protéines poly-ubiquitinées, via son domaine ZnF-UBP, et permettrait de mettre en place une réponse spécifique, adaptée, en provoquant le re-largage de HSF1 par HSP90, par un mécanisme p97/VCP dépendant. Nous prévoyons que la libération de HDAC6 et p97/VCP permette la prise en charge plus rapide des protéines poly-ubiquitinées par le protéasome.

Conclusion générale

En réalisant ma thèse chez le Dr. Saadi Khochbin, nous avons décidé de déterminer les fonctions ubiquitine-dépendantes de HDAC6, en utilisant des approches complémentaires de biophysique, de biochimie et de biologie cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons montré que le domaine d'interaction de HDAC6 à l'ubiquitine, domaine ZnF-UBP est un domaine de très haute affinité pour l'ubiquitine. Conséquemment, *in vivo*, HDAC6 est capable de masquer les chaînes de poly-ubiquitine des protéines ciblées pour la dégradation par le protéasome, mais aussi de l'action des USPs. Sa partenaire et ségrégase p97/VCP, est capable de réguler ce phénomène. Nos études ont montré que le complexe HDAC6-p97/VCP est un régulateur clef dans la gestion des protéines mal repliées poly-ubiquitinées, dont le sort dépend en fait de la balance des concentrations relatives de HDAC6 et de p97/VCP (**Figure V**). De ce fait, nous proposons que le complexe HDAC6-p97/VCP soit une cible thérapeutique dans les maladies d'agrégation protéiques.

Il est fortement documenté que l'accumulation des protéines mal repliées et poly-ubiquitinées, déclenche une réponse cellulaire spécifique, adaptée, visant à contrecarrer les effets toxiques de cette accumulation, et permettre ainsi la survie cellulaire. Une telle réponse passe par l'activation d'un facteur de transcription, HSF1. Dans notre première étude, nous avons montré que HDAC6 protège la cellule en favorisant l'agrégation des protéines mal repliées avant leur prise en charge par le protéasome. Dans ce travail, nous montrons que HDAC6, p97/VCP et HSP90 forment un complexe répressif de HSF1. Lors d'une accumulation de protéines poly-ubiquitinées, induite par une inhibition du protéasome, HDAC6 est capable de détecter cette accumulation, via son domaine ZnF-UBP, est re-larguée du complexe répressif, et permet à la ségrégase p97/VCP d'achever l'activation de HSF1 en séparant HSF1 de HSP90. HSF1 peut donc continuer son activation, et promouvoir l'induction de l'expression de ses gènes cibles HSPs. Dans ce travail, nous proposons que HDAC6 relie l'activité protéasomale et le déclenchement de la réponse cellulaire à l'accumulation des protéines poly-ubiquitinées (**Figure V**).

Perspectives

B. Cas de la mucoviscidose, quel rôle pour HDAC6-p97/VCP ?

Dans le cas de la mucoviscidose, le problème est inverse. Dans ce cas là, contrairement à la protéine sauvage, la protéine CFTRdF508 est trop rapidement prise en charge et dégradée par le système ubiquitine-protéasome (Gelman et *al.*, 2002 ; Ward et *al.*, 1995).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'expression de p97/VCP dans les cellules épithéliales bronchiques est très forte (Vij et *al.*, 2006). Des études très intéressantes ont cependant montré qu'en diminuant sa prise en charge par le système ubiquitine/protéasome, notamment en diminuant la concentration intracellulaire de p97/VCP, la protéine CFTRdF508 est adressée de façon significative à la membrane plasmique. Dès lors, les cellules épithéliales bronchiques adoptent un phénotype fonctionnel proche du type sauvage (Vij et *al.*, 2006). Ces observations confortent notre étude. Cependant, il serait intéressant d'analyser les profils d'expression de HDAC6 dans les cellules épithéliales bronchiques des patients atteints de mucoviscidose. Nous pourrions alors déterminer, dans des lignées primaires issues de ces patients, si un excès de HDAC6 dans la cellule restaurerait ou non l'adressage de CFTRdF508 à la membrane.

C. HDAC6 et contrôle des phénomènes reposant sur la mono ubiquitination de facteurs.

La mono ubiquitination est une modification généralement dynamique, impliquée dans au moins 3 fonctions cellulaires distinctes : la régulation des histones (Busch and Goldknopf, 1981 ; Spencer and Davie, 1999), l'endocytose (Hicke, 1999 ; Rotin et *al.*, 2000 ; van Delft et *al.*, 1997) et le bourgeonnement viral à la membrane plasmique (Strack et *al.*, 2000 ; Patnaik et *al.*, 2000 ; Jayakar et *al.*, 2000).

La mono ubiquitination semble être un phénomène capable de réguler la localisation, la structure et l'activité des protéines subissant cette modification, vraisemblablement parce que les protéines ubiquitinées peuvent recruter des protéines à domaine d'interaction avec l'ubiquitine (Hicke, 2001). Puisque HDAC6 possède un domaine de très haute affinité pour la mono ubiquitine, plusieurs pistes me semblent intéressantes à suivre.

Premièrement, le répertoire des partenaires de HDAC6 peut inclure potentiellement toute protéine mono ubiquitinée. Il est très excitant de noter que ces nouveaux partenaires peuvent être découverts par une simple approche biochimique (purification des protéines ubiquitinées sur colonne ZnF-UBP, élution avec mono ubiquitine libre, analyse par spectrométrie de masse, avec comme contrôle : colonne de HDAC6 sans ZnF-UBP).

Deuxièmement, de par sa très forte affinité pour l'ubiquitine, HDAC6 peut être un compétiteur sérieux lors du recrutement d'un facteur A à UBD sur un facteur B mono ubiquitiné. D'après ce que nous avons vu plus haut, nous pouvons donc considérer HDAC6 comme un régulateur négatif des voies de signalisation faisant intervenir des recrutements de protéines à domaines à UBD. Chez la levure comme chez les mammifères, l'internalisation de nombreuses protéines de la membrane plasmique nécessite leur mono ubiquitination qui permet de recruter les facteurs de la machinerie d'endocytose à domaine UBD. C'est notamment le cas des récepteurs impliqués dans la transduction de signaux extracellulaires (Hicke, 1999 ; Strous et *al.*, 1996 ; Bonifacino and Weissman, 1998). De plus, il semblerait que dans certains cas la mono ubiquitination de la machinerie d'endocytose soit nécessaire à la réalisation de ce phénomène (endocytose du récepteur à l'hormone de croissance ; Hicke, 2001). L'endocytose des protéines de la membrane plasmique nécessite donc une cascade d'interaction entre des facteurs ubiquitinés et des protéines à domaine UBD. La fluidité d'un tel système repose sur les très faibles affinités des domaines UBD de ces acteurs pour l'ubiquitine (Hicke and Dunn, 2003). L'analyse du phénomène d'endocytose dans nos lignées HDAC6 nous permettrait de définir quel est le rôle de HDAC6 dans ce processus, et de déterminer si les lignées répondent différemment à des signaux extracellulaires impliquant l'endocytose de leurs récepteurs.

D'autre part, le bourgeonnement des virus enveloppés au niveau de la membrane plasmique des cellules infectées nécessite la mono ubiquitination de nombreux facteurs, dont la poly-protéine GAG, commune à tous les rétrovirus. Cette mono ubiquitination permet l'interaction de la protéine GAG avec la membrane plasmique, et le bourgeonnement (Garoff et *al.*, 1998). Un UBD puissant comme le domaine ZnF-UBP de HDAC6 permettrait peut-être de diminuer ce bourgeonnement viral, en séquestrant GAG mono ubiquitiné. Il me semble donc intéressant de conduire des études de bourgeonnement sur les lignées HDAC6 après infection par rétrovirus afin de déterminer si HDAC6 régule le bourgeonnement viral.

Enfin, la mono ubiquitination des histones H1, H2A et H2B provoque une relaxation de l'heterochromatine. De plus, la mono ubiquitination de nombreux facteurs de transcription augmente leur activité. On peut donc voir la mono ubiquitination comme un phénomène

Perspectives

J'ai volontairement décidé d'extraire mes perspectives de la conclusion, afin d'apporter plus de clarté au manuscrit. Ces perspectives présentent les axes de recherche que je développerais si je devais continuer sur ce sujet, en utilisant les données que nous avons obtenues sur HDAC6.

A. Maladies d'agrégation des protéines, quel rôle pour HDAC6-p97/VCP ?

De nombreuses maladies neurodégénératives semblent être dues à un défaut dans le système ubiquitine/protéasome (Berke and Paulson, 2003 ; Ross and Pickart, 2004). Notamment, dans les cas de maladie d'Alzheimer, Parkinson, Paget et démence fronto-temporale, sclérose amyotrophique latérale, de Polyglutamine ou encore dans les cas de maladies à Prion, l'excès de protéines mal repliées et l'agrégation de telles protéines semblent être toxiques pour la cellule. Cet excès séquestre de nombreux facteurs du système ubiquitine-protéasome ainsi que de nombreuses chaperonnes de type HSP. De plus, il semblerait que cette accumulation, provoque une diminution de l'activité catalytique du protéasome (Berke and Paulson, 2003 ; Tanaka et al., 2001 ; Bence et al., 2001 ; Bennett et al., 2005).

Les travaux d'autres équipes ainsi que les nôtres, montrent qu'une sur expression de p97/VCP augmente le recyclage des protéines poly-ubiquitinées en assurant leur prise en charge par le protéasome (Dai and Li, 2001 ; Richly et al., 2005 ; Wojcik et al., 2006). De ce fait, on peut penser qu'une augmentation de l'expression de p97/VCP ou une diminution de l'expression de HDAC6 chez les patients atteints de maladies d'agrégation des protéines poly-ubiquitinées, permettrait de limiter la mort cellulaire induite par de tels agrégats. Cependant, alors qu'un tel impact de p97/VCP a déjà été mis en évidence (Lucas et al., 2006 ; Weihl et al., 2006), aucune recherche n'a été conduite pour déterminer le rôle de HDAC6 dans certaines pathologies d'agrégation de protéines.

L'analyse de l'expression de HDAC6 (quantitative et qualitative) chez les patients atteints de maladies d'agrégation de protéines me semble donc être une voie d'investigation nécessaire. En effet, cette analyse nous permettrait de déterminer le rôle de HDAC6 chez les patients atteints de ce type de pathologie.

augmentant l'activité transcriptionnelle d'une région de la chromatine. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, HDAC6 est une enzyme qui est constamment expulsée du noyau. Ainsi, même si elle est majoritairement cytoplasmique, HDAC6 peut potentiellement interagir avec les facteurs liés à la chromatine si ils sont mono ubiquitinés. En tant que Histone Déacétylase, un modèle serait qu'elle soit recrutée sur la chromatine « ubiquitinée » transcriptionnellement active afin de permettre sa compaction, et sa répression transcriptionnelle.

D. HDAC6 et immunité.

Lors d'une infection virale, les protéines virales sont normalement dégradées par le système ubiquitine protéasome pour que les peptides résultants soient présentés par les complexes CMH-I à la surface de la cellule. De ce fait, de nombreux cas rapportent que le système ubiquitine-protéasome est contrôlé par les virus comme Epstein Barr (Levitskaya et *al.*, 1997). Ceci constitue un mécanisme d'échappement à la surveillance du système immunitaire.

Or, nos observations suggèrent que HDAC6 contrôle le recyclage des protéines poly-ubiquitinées. Il serait donc intéressant d'effectuer des tests d'infection virale sur nos lignées HDAC6, afin de déterminer l'impact de HDAC6 sur l'apprêtement des antigènes viraux et leur association avec les complexes CMH.

E. HDAC6 : entre l'acétylation et l'ubiquitination des protéines.

L'acétylation et l'ubiquitination sont deux modifications qui s'effectuent toutes les deux sur des résidus lysines. De ce fait, il pourrait exister une compétition entre ces deux modifications au niveau d'un même résidu lysine de la protéine substrat. Nous pouvons imaginer que HDAC6 pourrait déacétyler une lysine afin qu'une E3 puisse ubiquitiner ce résidu. Dans ce cas, et dans un contexte ubiquitine-protéasome, l'acétylation serait une modification qui stabiliserait les protéines, une sorte de sécurité à enlever pour permettre sa dégradation par le protéasome (Caron et *al.*, 2005 : voir l'annexe de ce manuscrit - article 3). Pour les mêmes raisons, HDAC6 pourrait aussi favoriser la mono ubiquitination des protéines, dans un contexte de signalisation cellulaire par mono ubiquitination. Enfin,

HDAC6 pourrait être recruté sur une protéine ubiquitinée, grâce à son domaine ZnF-UBP, et déacétyler d'autres résidus lysines de cette protéine de faciliter son ubiquitination (multi ubiquitination).

Les études de liaison entre l'ubiquitine et le domaine ZnF-UBP de l'isopeptidase-T, conduites par Keith Wilkinson (Reyes-Turcu et *al.*, 2006) montrent que le domaine ZnF-UBP de IsoT interagit avec le motif di-glycine de l'ubiquitine. Cependant, les lysines de l'ubiquitine, nécessaires à la formation de chaînes de poly-ubiquitine, ne sont pas masquées. Bien que la structure du domaine ZnF-UBP de HDAC6 ne soit pas connue à l'heure actuelle, et que les structures primaires de ce domaine soient différentes chez HDAC6 et IsoT, il paraît vraisemblable que les résidus lysines de l'ubiquitine ne soient pas non plus masqués par la liaison avec le domaine ZnF-UBP de HDAC6.

D'autre part, il a déjà été montré que l'ubiquitine est acétylable sur chacun de ses résidus lysines, *in vitro* (Tanaka et *al.*, 1983 ; Taniguchi et *al.*, 1984). Une hypothèse attrayante serait donc que HDAC6 puisse déacétyler l'ubiquitine qu'elle maintient sur son domaine ZnF-UBP. En complexe avec une E3 et une protéine ciblé par la poly-ubiquitination en cours, HDAC6 pourrait contrôler le type de branchement de la chaîne de poly-ubiquitine sur la protéine substrat, en ne libérant qu'un résidu lysine particulier de l'ubiquitine acceptrice de la prochaine ubiquitine.

F. Existe-t-il une interaction de HDAC6 avec des protéines de type ubiquitine ou avec des domaines de type ubiquitine ?

Il existe beaucoup de protéines de type ubiquitine (Ubiquitin like protein ou Ubl). Bien qu'ayant de 10 à 60% d'identité de séquence avec l'ubiquitine, ces protéines possèdent une structure tridimensionnelle très proche (Welchman et *al.*, 2005). Ceci est vraisemblablement dû à leur évolution à partir d'un ancêtre commun. Tout comme l'ubiquitine, les Ubl peuvent être conjugués à des facteurs pour contrôler des activités cruciales pour la cellule : régulation des E3s (NEDD8 - Neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated protein 8), régulation transcriptionnelle (SUMO-1, 2 et 3 – small ubiquitin like

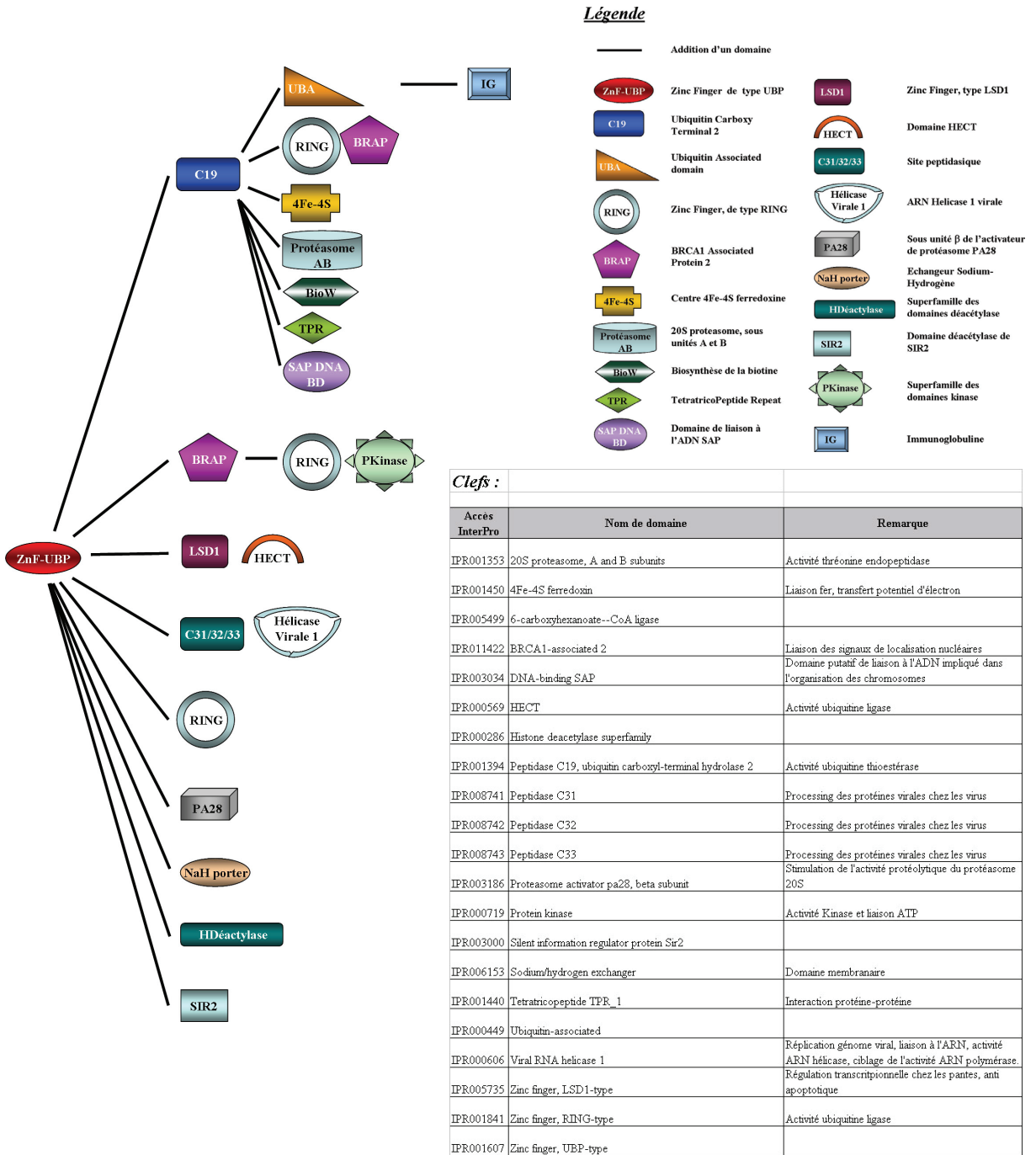


Figure VI.2.

Diversité des protéines à domaine ZnF-UBP. Cette figure présente les associations diverses du domaine ZnF-UBP avec d'autres types de domaines, au sein de protéines eucaryotes, bactériennes et archaebactériennes. Ces associations sont répertoriées d'après SMART, Pfam et Expasy. Chaque trait correspond à l'adjonction d'un domaine avec le(s) domaine(s) précédent(s). Les clefs donnent une description de ces domaines, ainsi que leur code d'entrée au sein de InterPro. Voir le **Tableau VI.1.**, panneaux 1 et 2 pour une description non exhaustive des protéines d'intérêt.

modifier), régulation de la réponse immunitaire (ISG15 – interferon stimulated gene15), l'activation des cellules T (FUB1 – Fau ubiquitin like protein 1), l'épissage (UBL5 – ubiquitin like protein 5), la réponse cellulaire au stress oxydatif (URM1 – ubiquitin related modifier 1) et l'autophagie (ATG8 et 12 – autophagy 8, 12). Le motif di-glycine avec lequel le domaine ubiquitiné de IsoT interagit très fortement, et qui pourrait être impliqué aussi dans l'interaction entre l'ubiquitine et le domaine ZnF-UBP de HDAC6, est conservé chez certaines de ces protéines Ubl. Une des perspectives de nos travaux, serait donc de déterminer si HDAC6 peut se lier à certaines de ces protéines Ubl.

D'autre part, certaines protéines comme Rad23 possèdent des domaines de type ubiquitine (structure tridimensionnelle très proche). Rad23 transporte les protéines poly-ubiquitinées vers le protéasome pour favoriser leur destruction. La sous unité du protéasome S5A/RPN10 est capable de reconnaître le domaine de type ubiquitine au sein de la structure de Rad23. Une étude d'interaction en système *in vitro* avec des protéines recombinantes m'a permis de montrer que le domaine ubiquitiné de HDAC6 est capable d'interagir de façon significative avec les domaines de type ubiquitine de RAD23 (données non montrées). Ceci nous laisse penser que le domaine ubiquitiné de HDAC6 pourrait reconnaître d'autres protéines à domaine de type ubiquitine. De plus, nous pouvons penser que HDAC6 ralentit la dégradation des protéines poly-ubiquitinées en séquestrant les facteurs de transit vers le protéasome, comme Rad23. Cette hypothèse me semble devoir être testée pour compléter notre modèle.

G. Existe-t-il un système similaire à l'ubiquitination chez les procaryotes ?

La structure du protéasome bactérien diffère du protéasome 26S eucaryote (Rohrwild *et al.*, 1996 ; Zwickl, 2002). Néanmoins, des protéines bactériennes possèdent des homologies de séquence et un repliement similaire à celui de l'ubiquitine (β -grasp fold superfamily). C'est notamment le cas des protéines ThiS, Moad, TGS et YukD (Bienkowska *et al.*, 2003 ; Iyer *et al.*, 2006 ; Lake *et al.*, 2001 ; Lehmann *et al.*, 2006). Certains auteurs pensent qu'à l'instar des eucaryotes, les procaryotes pourraient aussi avoir un système de signalisation de type ubiquitine (Iyer *et al.*, 2006).

Une recherche d'homologie de séquence (Pfam et SMART), montre que le domaine ZnF-UBP est déjà présent chez certaines protéines procaryotiques (**Figure VI.1**).

Nombre observé	Domaines	Nom	Autre nom	Expasy	Remarques
45	Non	Q1BEP1_9MYCO	Zinc finger, UBP type protein	Q1BEP1	<i>Mycobacterium</i>
		Q23RF9_TETTH	Zinc finger in ubiquitin-hydrolase protein	Q23RF9	<i>T.thermophila</i>
		Q44BK9_SOLUS	Zinc finger in ubiquitin-hydrolase protein	Q44BK9	<i>S.susitatus</i>
149	C19	SAD1_Yeast	Pre-mRNA-splicing factor SAD1	P43589	<i>S.cerevisiae</i>
		UBP8_Yeast	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	P50102	<i>S.cerevisiae</i>
		UBP8_SCHPO	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 8	Q09738	<i>M.musculus.</i>
		UBP22_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22	Q5DV02	<i>M.musculus</i>
		UBP49_HUMAN	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 49	Q70CQ1	<i>H.sapiens</i>
		UBP51_HUMAN	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase 51	Q70EK9	<i>H.sapiens</i>
		UBP33_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 33	Q8TEY7	<i>H.sapiens</i>
		UBP2_ARATH	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2	Q8W4N3	<i>A.thaliana</i>
		UBP3_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	Q91W36	<i>M.musculus.</i>
		UBP1_ARATH	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1	Q9FPT5	<i>A.thaliana</i>
		UBP44_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 44	Q9H0E7	<i>H.sapiens</i>
		UBP7_SCHPO	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	Q9P7S5	<i>S.pombe</i>
		UBP22_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 22	Q9UPT9	<i>H.sapiens</i>
		UBP20_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 20	Q9Y2K6	<i>H.sapiens</i>
		UBP16_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	Q9Y5T5	<i>H.sapiens</i>
		UBP3_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3	Q9Y6I4	<i>H.sapiens</i>
		Q95TK9_DROME	LD43147p	Q95TK9	<i>D.melanogaster</i>
		Q9U6Q9_DROME	Ubiquitin-specific protease nonstop	Q9U6Q9	<i>D.melanogaster</i>
		Q9VVR1_DROME	CG4166-PA	Q9VVR1	<i>D.melanogaster</i>
11	C19 inactif	SNUT2_MOUSE	U4/U6.U5 tri snRNP associated protein 2	Q3TDX9	<i>M.musculus</i> . Ubiquitin specific protease 39 inactive
		SNUT2_HUMAN	U4/U6.U5 tri snRNP associated protein 2	Q53GS9	<i>H.sapiens</i> . Ubiquitin specific protease 39 inactive. Homologue a SAD1
		SNUT2_PONPY	U4/U6.U5 tri snRNP associated protein 2	Q5R761	<i>P.pygmaeus</i> . Ubiquitin specific protease 39 inactive.
2	4Fe-4S + C19	Q5JV79_HUMAN	Ubiquitin specific protease 45	Q5JV79	<i>H.sapiens</i>
1	C19 + SAP	Q54XH4_DICDI	SAP DNA-binding containing protein	Q54XH4	<i>D.discoideum</i>
1	C19 + TPR	Q22J71_TETTH	Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase protein	Q22J71	<i>T.thermophila</i>
1	C19 + BioW	Q8SSA5_ENCUCU	Ubiquitin carboxyl-terminal 14	Q8SSA5	<i>E.cuniculi</i>
1	C19 + Proteasome AB	Q1DJG7_COCIM	Q1DJG7UBP protein	Q1DJG7	<i>C.immitis</i>

Tableau VI.2. panneau 1

Associations diverses du domaine ZnF-UBP au sein des protéines. Ce tableau décrit brièvement quelques protéines possédant un domaine ZnF-UBP en association, ou non, avec d'autres types de domaines au sein de protéines. Le nombre d'occurrences dans les bases de données SMART, Pfam, Expasy chez les eucaryotes, mais aussi les bactéries et les archaebactéries est indiqué.

Il est très excitant de constater que sur les 3 domaines à doigt de zinc du ZnF-UBP de HDAC6, certaines protéines procaryotiques en possèdent 2.

Chez les procaryotes, à ma connaissance, peu d'études se focalisent sur les domaines d'interaction avec les protéines de type ubiquitine. De par sa conservation chez certains procaryotes, le domaine ZnF-UBP pourrait constituer un tel domaine. Une des perspectives de nos travaux est donc de déterminer si, chez les procaryotes, les protéines à domaine ZnF-UBP, sont capables d'interagir ou non avec les protéines de type ubiquitine. Ceci constituerait les premières informations quand à l'existence d'un système de type ubiquitine chez les procaryotes.

H. Dans un autre contexte, le domaine ZnF-UBP, mais pour quelles fonctions ?

Au cours de ma thèse, j'ai fait une recherche bioinformatique des protéines contenant un domaine de type ZnF-UBP. L'utilisation de Pfam, SMART et Prosite a montré que le domaine ZnF-UBP est un domaine pouvant être associé à différents domaines, au sein de nombreuses protéines, chez les eucaryotes, mais aussi chez certaines bactéries et archaebactéries. La **Figure VI.2** ainsi que le **Tableau VI.2, panneaux 1 et 2**, présentent les résultats de cette recherche. Dans ces illustrations, il est notable que chacune des protéines existent et ne sont pas putatives.

Comme nous pouvons le constater, le domaine ZnF-UBP est classiquement associé avec un domaine de type peptidasique C19, au sein des protéases spécifiques des chaînes d'ubiquitine. Il est cependant frappant que ce domaine soit aussi retrouvé associé, chez certaines espèces, à des domaines impliqués dans des mécanismes variés comme la conjugaison de l'ubiquitine (domaine RING et HECT), la liaison aux signaux de localisation nucléaire (domaine BRAP), ou encore la réplication virale (domaines de type C31, 32, 33 et unité ARN), pour ne citer que ceux-là.

Le cas le plus intrigant, pour moi, reste l'existence d'une protéine de type SIR2 qui possède un domaine ZnF-UBP, chez *Tetrahymena thermophila*. C'est à ma connaissance le seul cas de protéine possédant à la fois un domaine déacétylase et un domaine ubiquitinés, en dehors de HDAC6.

Une des perspectives majeures de notre travail serait de déterminer quelles sont les conséquences fonctionnelles de ces différentes associations. C'est un travail ambitieux, mais

Nombre observé	Domaines	Nom	Autre nom	Expasy	Remarques
53	C19 + UBA	UBP14_YEAST	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	P38237	<i>S.cerevisiae</i>
		UBP5_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P45974	<i>H.sapiens</i> . Homologue de Isopeptidase T
		UEPA_DICDI	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase A	P54201	<i>D.discoideum</i>
		UEP5_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	P56399	<i>M.musculus</i> . Homologue de Isopeptidase T
		UBP14_ARATH	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	Q8L6Y1	<i>A.thaliana</i>
		UBP13_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 13	Q92995	<i>H.sapiens</i> . Homologue de Isopeptidase T-3
		UBP14_SCHPO	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14	Q11119	<i>S.pombe</i>
7	2x ZnF-UBP + C19	Q6ZIC4_ORYSA	Ubiquitin sepcific protease like	Q9ZIC4	<i>O.sativa</i>
		O44787_CAEEL	F09D1.1	O44787	<i>C.elegans</i>
		Q61WL9_CAEER	CBG04341	Q61WL9	<i>C.briggsae</i>
1	BRAP2	Q25A03_ORYSA	H0821 G03.13	Q25A03	<i>O.sativa</i>
37	BRAP2 + RING	YHB0_YEAST	RING Finger protein YHL010C	P38748	<i>S.cerevisiae</i>
		BRAP_HUMAN	BRCA1 associated protein (BRAP2)	Q7Z569	<i>H.sapiens</i>
		BRAP_MOUSE	BRCA1 associated protein (BRAP2)	Q99MP8	<i>M.musculus</i>
1	BRAP2 + RING + Pkinase	Q621R0_CAEER	CBG 023285	Q621R0	<i>C.briggsae</i>
5	RING	Q38FD4_9TRYP	ZnF-UBP RING protein	Q38FD4	<i>T.brucei et cruzi.</i>
		Q24AI6_TETTH	Zinc finger ubiquitin-hydrolase protein	Q24AI6	<i>T.thermophila</i>
1	LSD1 + HECT	O94275	SPBP8B7.27 protein	O94275	<i>S.pombe</i>
10	Hdéacétylase	HDAC6_HUMAN	Histone deacetylase 6	Q9UBN7	<i>H.sapiens</i>
		HDAC6_MOUSE	Histone deacetylase 6	Q9Z2V5	<i>M.musculus</i>
		HDA6_CAEEL	Histone deacetylase 6	Q20296	<i>C.elegans</i> . Un variant sans ZnF-UBP existe aussi.
3	ZnF-UBP compris dans Hdéacétylase	Q86NK9_DROME	CG6170 protein isoform A	Q86NK9	<i>D.melanogaster</i>
		Q22MQ4_TETTH	Zinc finger in ubiquitin hydrolase protein	Q22MQ4	<i>T.thermophila</i>
3	ZnF-UBP compris dans Hdéacétylase + Hdéacétylase	Q29G58_DROPS	GA19406-PA	Q29G58	<i>D.pseudoobscura</i>
3	SIR2	Q24J61_TETTH	Transcriptional regulator, Sir2 family protein	Q24J61	<i>T.thermophila</i>
		Q51GS9_ENTHI	Sir2 famiy transcriptional regulator	Q51GS9	<i>E.histolytica</i>
		Q54QE6_DICDI	Zinc finger containing protein	Q54QE6	<i>D.discoideum</i>
3	Echangeur Na ⁺ /H ⁺	Q3CT92_9ACTO	Na ⁺ /H ⁺ antiporter precursor	Q3GT92	<i>Nocardioides</i>
		Q40VQ2_KINRA	Na ⁺ /H ⁺ antiporter precursor	Q40VQ2	<i>K.radiotolerans</i>
		Q4NMI9	Na ⁺ /H ⁺ antiporter	Q4NMI9	<i>Arthrobacter</i>
2	Peptidase C31/32/33 + Helicase ARN virale	RPOA_PRRS	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA helicase	Q04561	Protéine virale
		RPOA_LVDC	Lactate dehydrogenase elevating virus RNA helicase	Q06502	Protéine virale
1	PA28	Q8IBN0_PLAF7	MAL7P1.120	Q8IBN0	<i>F.falciparum</i>

Tableau VI.2. panneau 2

Associations diverses du domaine ZnF-UBP au sein des protéines. Ce tableau décrit brièvement quelques protéines possédant un domaine ZnF-UBP en association, ou non, avec d'autres types de domaines au sein de protéines. Le nombre d'occurrences dans les bases de données SMART, Pfam, Expasy chez les eucaryotes, mais aussi les bactéries et les archaebactéries est indiqué.

pour moi, c'est la seule façon de mieux connaître l'impact du domaine ZnF-UBP dans la cellule.

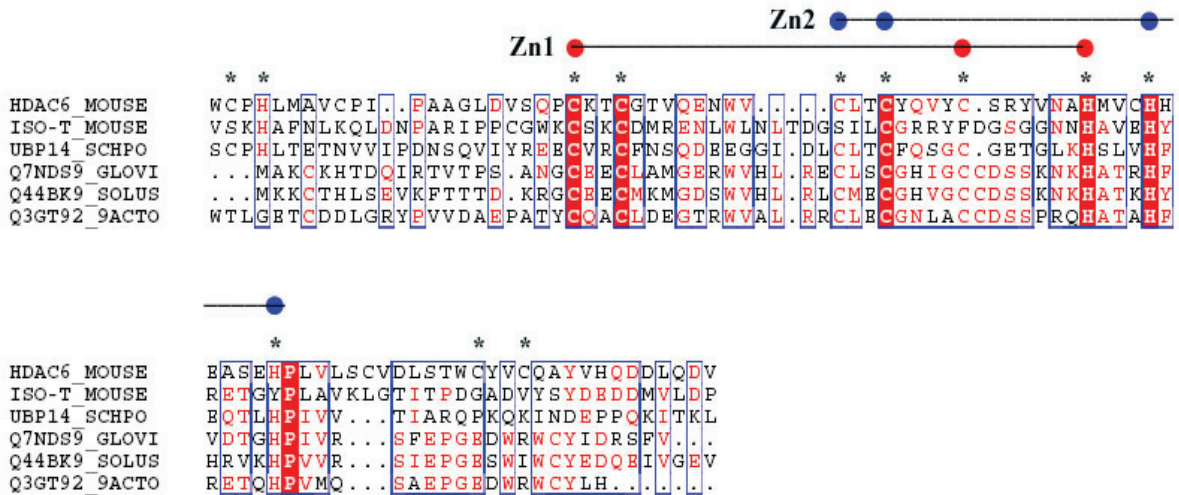


Figure VI.1

Conservation du ZnF-UBP au cours de l'évolution. Les séquences des ZnF-UBP de protéines de bactéries (*G. violaceus*: Q7NDS9_GLOVI; *Nocardioides sp.*: Q3GT92_9ACTO; *S. usitatus*: Q44BK9_SOLUS), de levure (*S.pombe* : UBP14_SCHPO) de l'isopeptidase-T murine (ISO-T_MOUSE) ou de HDAC6 murine (Q9Z2V5) ont été aligné avec multalin et ESPrpt. Les astérisques indiquent les résidus conservés et importants pour la liaison de HDAC6 à l'ubiquitine, d'après nos travaux. Deux des 3 doigts de zinc potentiels de HDAC6, nécessaire à cet accrochage semblent déjà présents chez les bactéries. Abréviation : Zn : Zinc Finger.

Annexe

Annexe

Il apparaît de plus en plus clairement que deux modifications importantes des lysines, l'acétylation et l'ubiquitination, jouent un rôle important dans le contrôle de la stabilité des protéines. A travers cette revue, publiée pendant ma thèse, nous allons voir comment l'acétylation des protéines s'oppose généralement à leur dégradation. Les mécanismes complexes de cette régulation seront décortiqués.

Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability

Cécile Caron, Cyril Boyault, and Saadi Khochbin

BioEssays 27:408–415

Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability

Cécile Caron, Cyril Boyault, and Saadi Khochbin*

Summary

It is now becoming apparent that cross-talk between two protein lysine modifications, acetylation and ubiquitination, is a critical regulatory mechanism controlling vital cellular functions. The most apparent effect is the inhibition of proteasome-mediated protein degradation by lysine acetylation. Analysis of the underlying mechanisms, however, shows that, besides a direct competition between the two lysine modifications, more complex and indirect processes also connect these two signalling pathways. These findings point to protein lysine acetylation as a potential regulator of various cellular functions involving protein ubiquitination. *BioEssays* 27:408–415, 2005. © 2005 Wiley Periodicals, Inc.

Introduction

Specific lysines in a protein may become acetylated through the action of histone acetyltransferases (HATs), whereas the acetyl group can be removed by histone deacetylases (HDACs). These enzymes have first been identified as regulators of histone acetylation thereby controlling chromatin structure and function. Recent investigations have revealed,

however, that an increasing number of cellular and viral proteins are also subject to lysine acetylation. Initially shown to be involved in modulating the activity of transcription factors, protein acetylation appears to regulate a wide variety of cellular events.^(1,2) Interestingly, among these cellular functions, the regulation of protein stability by acetylation is now emerging as a general phenomenon involving different functional classes of proteins. Lysines can also be modified by ubiquitination. One of the best-documented functions of protein polyubiquitination is the degradation of target proteins by the proteasome.⁽³⁾ Indeed, upstream of this proteolytic structure, a complex machinery recognizes a given substrate and uses its specific lysine acceptor sites to catalyze the addition of one ubiquitin (a highly conserved 76 amino acid long peptide). This ubiquitin in turn becomes a target for further ubiquitination and the process continues to finally form a polyubiquitin chain. This chain is thought to serve as a signal mediating the transport of polyubiquitinated proteins to the proteasome, as well as their recognition by this structure. It is widely accepted that at least three classes of factors, known as E1, E2 and E3, act together to activate and finally transfer an ubiquitin unit to a substrate protein. The specificity of substrate recognition largely relies on the diversity of E3s, which themselves work with a defined group of E2s.⁽⁴⁾

The primary relationship between protein ubiquitination and acetylation is based on the nature of the modified amino acid, which in both cases is a lysine. A prior lysine acetylation would therefore affect subsequent protein ubiquitination. The most obvious implication of this acetylation-based protection of lysines would be a stabilization of proteins, which are normally targets of a degradation by the ubiquitin/proteasome system. The analysis of the data available in the literature shows that, in fact, the real interplay between the two lysine modifications goes beyond a simple competition mechanism and involves a complex functional interaction between different actors of these signalling pathways.

Besides the control of protein stability, protein ubiquitination also controls a variety of cellular functions, including transcription and intracellular trafficking.^(5–10) It is therefore expected to also find a regulatory connection between protein acetylation and ubiquitination in cellular functions already known to involve

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation-INSERM U309 Equipe "Chromatine et expression des gènes", Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine-Pharmacie, La Tronche, France
Funding agency: S. K. laboratory is supported by grants from "Sidaction" and "Région Rhône-Alpes — thème prioritaire Cancer".
C. B. is supported by a PhD fellowship from "vaincre la mucoviscidose", and C. C. by "INSERM délégation" program.

*Correspondence to: Saadi Khochbin, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation-INSERM U309 Equipe "Chromatine et expression des gènes", Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine-Pharmacie, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France. E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr
DOI 10.1002/bies.20210
Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Abbreviations: HAT, histone acetyltransferase; HDAC, histone deacetylase; NAT1, N-acetyltransferase 1; Hif1, Hypoxia-Inducible Factor 1; pVHL, von Hippel-Lindau protein; TSA, Trichostatin A; TNF, Tumor Necrosis Factor; VPA, Valproic acid; SAHA, Suberoylanilide hydroxamic acid; HPV, Human Papilloma Virus.

either of these signalling processes. This review aims at dissecting the molecular basis of acetylation-mediated control of protein stability, and further discusses the functional relationship between lysine acetylation and ubiquitination pathways.

Acetylation-dependent protein stabilization

The stability of at least twelve crucial regulatory factors, p53, p73, Smad7, SREBP1a, SREBP2, Runx3, SF-1, ER81, FOXO4, NF-E4, HNF6 and E2F1, have been shown to increase after the acetylation of specific lysines in these proteins (Table 1). A direct competition between lysine acetylation and ubiquitination has been proposed as a major regulatory mechanism preventing protein ubiquitination and degradation. Indeed, in the cases of p53, p73, Smad7, SREBP1a, SREBP2, NF-E4 and Runx3, the same lysines are suggested to be subject to both acetylation and ubiquitination (Table 1). This observation strongly suggests a protective role for lysine acetylation by preventing further modifications of this residue (Fig. 1A). In this regard, HATs specifically acetylating the target lysines would increase the protein stability and, conversely, specific HDACs would accelerate its degradation. p53 and Runx3 nicely illustrate this particular regulatory mechanism. Indeed, acetyl-acceptor sites of p53 are also the sites of protein ubiquitination by the E3 activity of Mdm2. Interestingly, Mdm2 was shown to be associated with HDAC1, which deacetylates p53 and frees the target lysines for subsequent ubiquitination.⁽¹¹⁾ Similarly, Runx3 is acetylated by p300, preventing its degradation by Smurf E3s, and HDAC5 has been shown to reverse the effect of p300 and significantly accelerate Runx3 degradation.⁽¹²⁾ However, for some of these

proteins, such as ER81, SF-1 and E2F1, the experimental data do not support the hypothesis of a direct competition mechanism to explain their acetylation-dependent stabilization. Indeed, the stabilization of ER81 after its acetylation is thought to be due to a conformational change, or to its shielding from E3s, after an acetylation-dependent interaction with partners⁽¹³⁾ (Fig. 1B). In the case of SF-1, the active transport of the acetylated protein in the cytoplasm could be associated with its increased stability,⁽¹⁴⁾ and the P/CAF-mediated acetylation and stabilization of E2F1^(15,16) was suggested to be due to its increasing capacity to interact with Rb⁽¹⁶⁾. HNF6 acetylation on a single lysine by CBP also stabilizes the protein but this stabilization is likely to be independent of the ubiquitin/proteasome system, since it is not affected by specific inhibitors of the proteasome.⁽¹⁷⁾

Acetylation-mediated protein stability may also proceed through unexpected mechanisms not involving lysines. Although this review focuses on protein lysine acetylation, it is noteworthy to mention, considering its potential critical cellular functions, the role of non-lysine acetylation on the control of protein stability. This is exemplified by the case of the N-acetyltransferase NAT1, which acetylates substrates via a ping-pong bi bi mechanism.⁽¹⁸⁾ The first step of the reaction consists of the acetylation of a cysteine in the active site of the enzyme followed by the transfer of the acetyl group to the substrate. Interestingly the acetylated NAT1 intermediate is a stable protein and its substrate-dependent deacetylation results in a rapid degradation of the protein by the ubiquitin/proteasome system.⁽¹⁹⁾ Furthermore, N-terminal polyubiquitination is also emerging as an alternative way to target proteins for degradation by proteasome⁽²⁰⁾ and this designates the N-terminal acetylation occurring in many proteins as a strong protective mechanism against this particular polyubiquitination and subsequent protein degradation.⁽²¹⁾

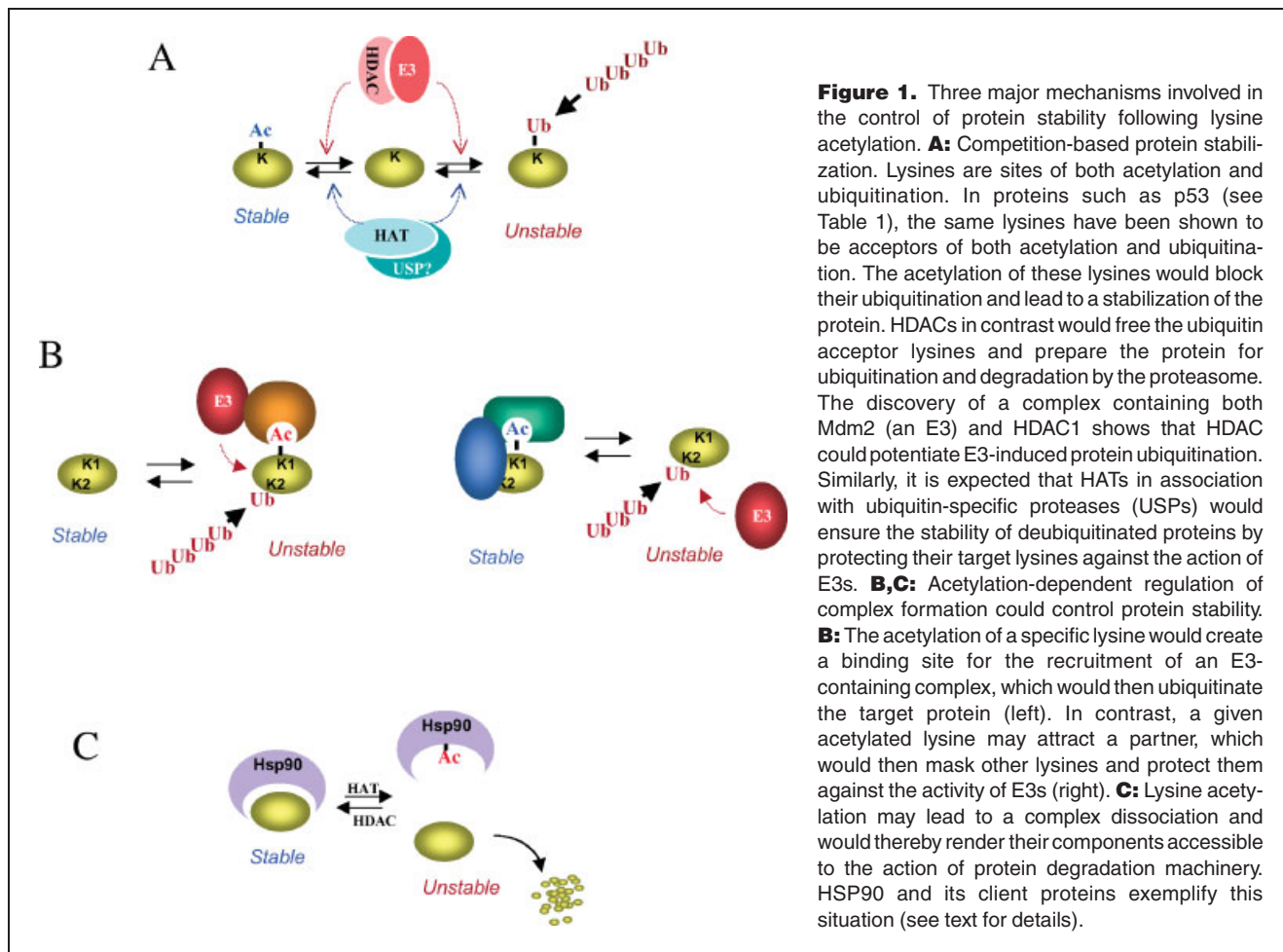
N-terminal and lysine acetylation may also directly affect the activity of ubiquitination machinery and of the proteasome itself. Indeed, N-terminal acetylation was shown to interfere with the proteasome catalytic activity involving a free α amino group of threonine 1 on the β subunits.⁽²²⁾ Furthermore, there is at least one report demonstrating that the E3 ubiquitin ligase, Mdm2, can be acetylated on its ring finger domain and that this acetylation could severely interfere with the E3 activity of the protein. This was shown to lead to the stabilization of the Mdm2 substrate p53.⁽²³⁾

Acetylation-dependent protein degradation

Although in most of the cases discussed above, a direct role for protein acetylation in preventing their active degradation was clearly demonstrated, the underlying mechanism appears to be complex and does not follow a simple and unique rule. The complexity of the acetylation-dependent mechanisms controlling protein stability becomes even more evident considering reports describing an accelerated protein degradation

Table 1. Protein lysine acetylation directly modulates the stability of target proteins

Acetylated factor	Effect of acetylation on half-life	Mechanism	Ref
p53			(11)
P73			(67,68)
NF-E4			(72)
Runx3		Competition with ubiquitination	(12)
Smad7			(69)
SREBP1a			(70)
SREBP2	Increased stability		(70)
SF-1			(14)
ER81			(13)
FOXO4		?	(71)
HNF6			(17)
E2F		Increasing of Interaction with partners?	(15,16)
Hif1-alpha	Degradation	Recruitment of the pVHL-containing ubiquitin ligase complex	(25)



following protein acetylation. In these cases, lysine acetylation governs protein stability essentially by modulating protein–protein interaction. Indeed, the acetylation of lysines in a given protein can create a high-affinity-binding site for other proteins (Fig. 1B). Among the reported acetylation-dependent complexes, at least two involve E3 ubiquitin ligases. Transcriptional complex Hypoxia-inducible factor 1 (Hif-1) is an essential regular of genes responding to hypoxia. The complex is formed of two subunits of which one, Hif1 α , is rapidly degraded under normoxia through the ubiquitin/proteasome system. The degradation of Hif1 α occurs after its interaction with pVHL, mediating its ubiquitination.⁽²⁴⁾ The acetylation of Hif1 α at specific sites has been shown to enhance its interaction with pVHL and its subsequent ubiquitination and degradation⁽²⁵⁾ (Fig. 1B). The other example concerns the recruitment of E3 Mdm2 by acetylated Rb.⁽²⁶⁾ In this latter case, although the involvement of Mdm2 in ubiquitination and degradation of Rb itself has not been demonstrated, the Rb-Mdm2 complex shows a modified activity towards the Mdm2 substrate p53.⁽²⁷⁾

The acetylation-dependent stimulation of protein degradation may follow more indirect mechanisms modulating the

activity of key regulatory proteins, such as chaperones, involved in the control of the stability of a variety of downstream factors. HSP90 constitutes one of the best examples of this mechanism. Indeed, as other chaperones, HSP90 interacts with a variety of cellular proteins, including Bcr-Abl, raf-1, erbB2, erbB1.⁽²⁸⁾ Recently, several reports have clearly shown a modification of HSP90's protective effect upon its acetylation, leading to an accelerated degradation of several HSP90-interacting proteins^(29–31) (Fig. 1C).

Enzymes linking protein acetylation and ubiquitination

A definitive proof for the existence of a cross-talk between protein lysine acetylation and ubiquitination would be the identification of proteins or complexes containing activities affecting both signalling pathways. Interestingly, in the literature, a significant number of reports describe the association of these two types of activities in a single protein or in a defined complex. Indeed HATs with intrinsic ubiquitin activating/conjugating or ligase activities, and HDACs associated with an E3 or proteins of the ubiquitin fusion degradation (UFD)

pathway, have been identified and studied. Three HATs, CBP, p300 and TAF1, could directly be involved in the control of protein ubiquitination. An E4-type ubiquitin ligase activity (involved in the polyubiquitination of a ubiquitinated substrate) was shown to be associated with the N-terminal domain of both CBP and p300.⁽³²⁾ This region is distinct from the HAT domain of the protein, and the interplay between acetyltransferase and E4 activities, both targeting p53, remains to be studied. The *Drosophila* TFIID subunit TAF1, which presents an intrinsic HAT activity, also possesses an ubiquitin-activating/conjugating activity.⁽³³⁾ The only identified ubiquitin-acceptor substrate of TAF1 is histone H1. However, this particular activity of TAF1 implies that its association with an E3 would render this latter particularly active since it would become independent from distinct E1 and E2 enzymes. Accordingly, in yeast, a redundant function for components of TFIID and APC ubiquitination machinery has been evidenced.⁽³⁴⁾

The cellular HAT, Tip60 is known to form a complex with at least two proteins with E3 activity, Mdm2 and Pih1.^(35,36) While Mdm2–Tip60 interaction has been shown to mediate Tip60 ubiquitination and degradation,⁽³⁵⁾ Tip60 stabilizes Pih1, consequently forming a stable complex with an altered sub-cellular localization and containing both HAT and E3 activities.⁽³⁶⁾

Deubiquitination enzymes (DUBs) with ubiquitin-specific protease activity may also play a crucial role in the control of protein stability. Here again p53 exemplifies this particular mechanism since it is strongly stabilized by one of its partners, HAUSP (also known as USP7), which reverses its ubiquitination.^(37,38) Interestingly, recent investigations showed that another DUB, Ubp1, is a member of the histone acetyltransferase Gcn5-containing SAGA complex.⁽³⁹⁾ Although accumulating data show that SAGA links H2B ubiquitination to the control of transcription,^(40,41) there is no hint in the literature linking its activity to the control of protein stability. However, considering the data discussed in this review, the presence of HAT and DUB subunits in a complex makes it a good candidate as a regulator of protein stability, connecting acetylation and ubiquitination signalling pathways in the case of Gcn5 substrates.

More arguments in favour of the existence of machineries capable of integrating both acetylation and ubiquitination signalling are provided by the identification of HDACs associated with components of the protein ubiquitination machinery. The example of the association of HDAC1 with Mdm2 has already been discussed here but the literature reports additional cases. RLIM, another protein with an E3 activity, has also been shown to recruit the Sin3A/histone deacetylase core complex.⁽⁴²⁾ By analogy with the HDAC1–Mdm2 situation one may also propose a similar role for RLIM–HDAC complex. The recently identified substrate of RLIM, HDAC2 (see below), would constitute a good candidate.

HDAC6, a tubulin and histone deacetylase,^(43–46) provides an additional example. Indeed, in addition to its ubiquitin-

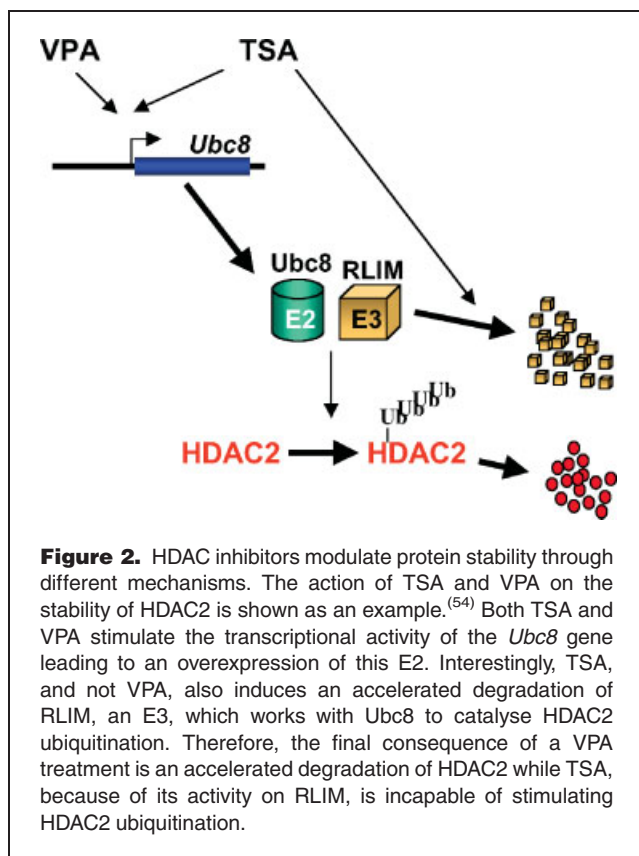
binding activity, HDAC6 is found in a complex containing mouse homologues of *S. cerevisiae* factors involved in the UFD pathway, p97 and UFD3.⁽⁴⁷⁾ p97 is a multifunctional chaperone of the AAA-ATPase family which has been clearly involved in the degradation of specific ubiquitinated substrates.⁽⁴⁸⁾ UFD3, which also interacts with p97 in yeast, has a less-defined function. The protein seems to control the level of free ubiquitin in the cells, since UFD3 mutants show a reduced level of free ubiquitin and the degradation of UFD substrates can be restored by the overexpression of ubiquitin in these mutant cells.⁽⁴⁹⁾ Despite these data, the molecular link between HDAC6 and the protein ubiquitination machinery has not yet been established.

A role for HDAC inhibitors

Several critical cellular factors have been found to undergo an accelerated degradation following the general inhibition of cellular HDAC by specific inhibitors. For instance, sodium butyrate, a selective inhibitor of HDACs, has been shown to induce a dramatic degradation of pRb, p107 and p130 pocket proteins in cells expressing HPV protein, E7.⁽⁵⁰⁾ Butyrate treatment also induced a degradation of p300 in a ubiquitin/proteasome-dependent manner.⁽⁵¹⁾ Another example concerns the NF κ B system, which is regulated at multiple levels by acetylation signalling.⁽⁵²⁾ I κ B α the inhibitor of the transcription factor NF κ B, is rapidly degraded through the ubiquitin/proteasome system following the activation of several signalling pathways including those dependent on TNF. Interestingly, the treatment of cells with TSA was shown to enhance this TNF-induced degradation of I κ B.⁽⁵³⁾

This acceleration of protein degradation by HDAC inhibitors does not always involve a modification of the acetylation of the target proteins but may depend on completely indirect mechanisms. For example, HDAC inhibitors could modulate the concentration of the cellular ubiquitination machinery components through transcriptional regulation. Indeed, the expression of the E2 ubiquitin conjugase Ubc8 gene is induced by two different and unrelated HDAC inhibitors trichostatin A (TSA) and valproic acid (VPA) therefore affecting the ubiquitination of their substrates.⁽⁵⁴⁾ However, the way Ubc8 participates in protein degradation may itself depend on the nature of the HDAC inhibitor. Indeed, the E3 ligase and partner of Ubc8, RLIM, is actively degraded after the treatment of cells by TSA, an inhibitor of both class I and class II HDACs, but not by VPA, which is a more selective inhibitor.⁽⁵⁴⁾ This would explain why HDAC2, a substrate of Ubc8/RLIM, undergoes an accelerated degradation after a VPA treatment, but not after TSA⁽⁵⁴⁾ (Fig. 2).

The treatment of cells by HDAC inhibitors has also been shown to directly affect the proteasome, either by modulating the concentration of its subunits or by affecting its activity. The treatment of cells by SAHA, another inhibitor of HDACs, suppresses the activity of the proteasome as well as the



expression of its subunits and enhances the cells' sensitivity to a drug-induced proteasome inhibition.⁽⁵⁵⁾ In agreement with these findings, a new HDAC inhibitor, NVP-LAQ824, also severely reduces the proteasome chemotrypsin-like activity.⁽⁵⁶⁾ Moreover, a proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells has shown a downregulation of several 26 S proteasome subunits.⁽⁵⁷⁾

Control of aggresome formation by protein acetylation: an indirect way to control protein stability

Aggresomes are peri-centriolar structures where mis-folded and mostly ubiquitinated proteins accumulate, which are also enriched in molecular chaperones and proteasome subunits.^(58,59) Aggresome formation bears a heavy cost for the cell since it disturbs the activity of several critical cellular machineries including the proteasome⁽⁶⁰⁾ and acetyltransferases.^(60,61) A severe disturbance of the acetyltransferase activity of CBP has indeed been shown to occur in cells where proteins containing poly-Q extensions accumulate and sequester CBP in an inactive form in aggresomes.⁽⁶⁰⁾ Aggresomes have therefore a profound influence on both acetylation and ubiquitination signalling pathways, and factors governing aggresome formation are prone to directly or indirectly affect the stability of numerous cellular proteins.

Acetylation signalling pathways also play a critical role in the control of aggresome formation. Mutations causing an expansion of glutamine (Q) tracts in the androgen receptor (AR) induce, like other cases of poly-Q extensions, the accumulation of aggregates. A recent report clearly shows that the mutation of the three lysine acetyl acceptor sites in AR confers to the protein the same property as an expansion of poly-Q tract, suggesting that the acetylation of AR would protect the protein against mis-folding and protein aggregation.⁽⁶¹⁾

In addition to this direct protective role of protein acetylation, a more indirect role for lysine acetylation in aggresome formation becomes clear after the investigation of the function of HDAC6.⁽⁶²⁾ HDAC6, an essentially cytoplasmic deacetylase, has the ability to bind both ubiquitin⁽⁴⁷⁾ and microtubule-associated molecular motors and therefore acts as a linker to lead the ubiquitinated and misfolded proteins to the aggresome compartment.⁽⁶²⁾ Interestingly, this function of HDAC6 was itself found to be dependent on its catalytic activity indicating that the deacetylation of a yet unknown substrate plays an important role in the capacity of HDAC6 to induce aggresome formation. In agreement with this hypothesis, cells treated with HDAC inhibitors contained microaggregates but were incapable of forming proper aggresomes.⁽⁶³⁾

Protein acetylation is therefore a key event in the control of aggresome formation, which in turn affects the cellular acetylation signalling by sequestering major cellular HATs, thereby modifying the stability of various factors, which depends more directly on protein acetylation (Fig. 3).

Conclusions and perspectives

Because lysine acetylation has long been considered as a major participant in the establishment of an epigenetic code, it was first studied essentially in the context of transcriptional regulation, and the majority of the non-histone proteins found to be regulated by acetylation were transcription factors.⁽²⁾ Interestingly, further investigation of the functional significance of this acetylation showed that it also altered the turnover of many of these factors. A close examination of the underlying mechanisms indicates that the control of protein stability may result either from a direct cross-talk between acetylation and ubiquitination, or from completely indirect mechanisms. Whatever the mechanism, the importance of the signalization by acetylation in the control of protein stability now appears beyond doubt.

The cross-talk between protein acetylation and ubiquitination could also have the potential to affect many of the non-proteasomal functions of ubiquitin.⁽⁵⁻¹⁰⁾ Although there is not much to discuss on the role for lysine acetylation in the control of the non-proteasomal functions of ubiquitin, at least one report shows that such a relationship exists. A recent investigation demonstrated that the ubiquitination of major histocompatibility complex (MHC) class II transactivator (CIITA)

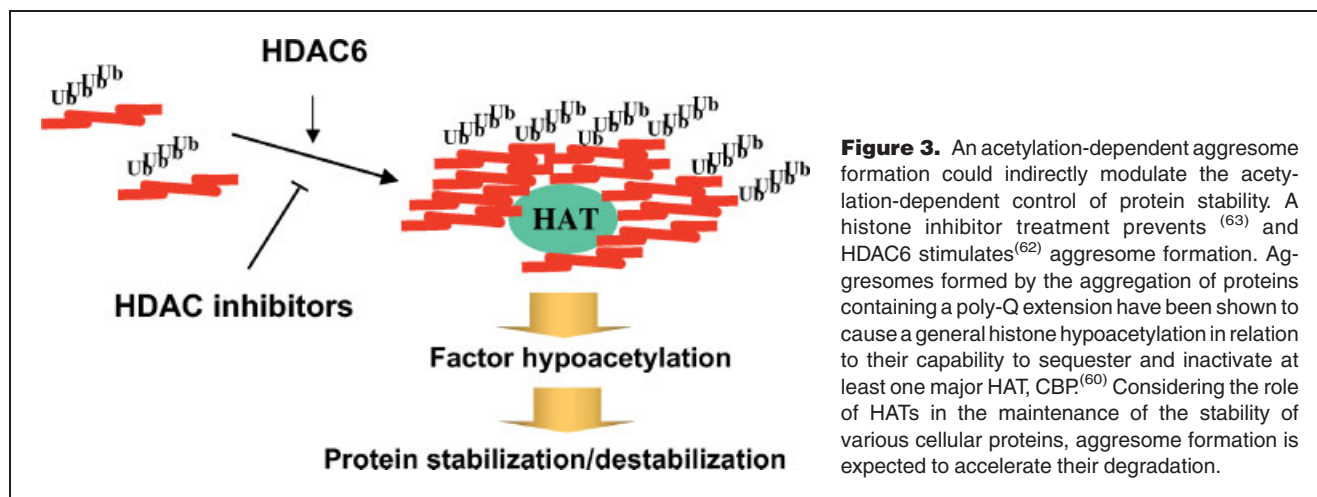


Figure 3. An acetylation-dependent aggresome formation could indirectly modulate the acetylation-dependent control of protein stability. A histone inhibitor treatment prevents⁽⁶³⁾ and HDAC6 stimulates⁽⁶²⁾ aggresome formation. Aggresomes formed by the aggregation of proteins containing a poly-Q extension have been shown to cause a general histone hypoacetylation in relation to their capability to sequester and inactivate at least one major HAT, CBP.⁽⁶⁰⁾ Considering the role of HATs in the maintenance of the stability of various cellular proteins, aggresome formation is expected to accelerate their degradation.

strongly enhances its transcriptional function.⁽⁶⁴⁾ Interestingly, these investigations also showed that CIITA ubiquitination is tightly regulated by HATs and HDACs, demonstrating a connection between acetylation and ubiquitination also in regulating non-proteasomal functions of ubiquitin. However, it is not known in this case whether the effect of HATs and HDACs were achieved directly through the acetylation of CIITA or indirectly. Another example is the ubiquitination-mediated nuclear export of p53.⁽⁶⁵⁾ Since the ubiquitination of p53 is tightly controlled by its acetylation the cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination would also control, besides the stability of the protein, its subcellular localisation. Finally, lysines can be modified by ubiquitin-like proteins such as SUMO and Nedd8 with functions completely different from those of ubiquitin.⁽⁶⁶⁾ The same interplay is also expected to operate between lysine acetylation and these specific modifications. It is therefore very probable that, in a near future, a role will be found for HATs and HDACs in the control of the functions of all types of lysine modifications.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Sophie Rousseaux, for the critical reading of this manuscript. We are grateful to Dr. Xiang-Jiao Yang for giving us access to his review before publication.

References

- Kouzarides T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* 15:1176–1179.
- Yang XJ. 2004. Lysine acetylation and bromodomain: new partnership for signaling. *BioEssays* 26:1076–1087.
- Pickart CM, Cohen RE. 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:177–187.
- Glickman MH, Ciechanover A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82:373–428.
- Marx J. 2002. Cell biology. Ubiquitin lives up to its name. *Science* 297:1792–1794.
- Hicke L, Dunn R. 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:141–172.
- Schnell JD, Hicke L. 2003. Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278:35857–35860.
- Aguilar RC, Wendland B. 2003. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol* 15:184–190.
- Herrera FJ, Triezenberg SJ. 2004. Molecular biology: what ubiquitin can do for transcription. *Curr Biol* 14:R622–624.
- Hochstrasser M. 2004. Ubiquitin signalling: what's in a chain? *Nat Cell Biol* 6:571–572.
- Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, et al. 2002. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* 21:6236–6245.
- Jin YH, Jeon EJ, Li QL, Lee YH, Choi JK, et al. 2004. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem* 279:29409–29417.
- Goel A, Janknecht R. 2003. Acetylation-mediated transcriptional activation of the ETS protein ER81 by p300, P/CAF, and HER2/Neu. *Mol Cell Biol* 23:6243–6254.
- Jacob AL, Lund J, Martinez P, Hedin L. 2001. Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *J Biol Chem* 276:37659–37664.
- Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 19:662–671.
- Ianari A, Gallo R, Palma M, Alesse E, Gulino A. 2004. Specific role for p300/CREB-binding protein-associated factor activity in E2F1 stabilization in response to DNA damage. *J Biol Chem* 279:30830–30835.
- Rausa FM 3rd, Hughes DE, Costa RH. 2004. Stability of the hepatocyte nuclear factor 6 transcription factor requires acetylation by the CREB binding protein coactivator. *J Biol Chem* 279:43070–43076.
- Steinberg MS, Cohen SN, Weber WW. 1971. Isotope exchange studies on rabbit liver N-acetyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 235:89–98.
- Butcher NJ, Arulpragasam A, Minchin RF. 2004. Proteasomal degradation of N-acetyltransferase 1 is prevented by acetylation of the active site cysteine: a mechanism for the slow acetylator phenotype and substrate-dependent down-regulation. *J Biol Chem* 279:22131–22137.
- Ciechanover A, Ben-Saadon R. 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 14:103–106.
- Kuo ML, den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF, Sherr CJ. 2004. N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev* 18:1862–1874.
- Arendt CS, Hochstrasser M. 1999. Eukaryotic 20S proteasome catalytic subunit propeptides prevent active site inactivation by N-terminal acetylation and promote particle assembly. *Embo J* 18:3575–3585.

23. Wang X, Taplick J, Geva N, Oren M. 2004. Inhibition of p53 degradation by Mdm2 acetylation. *FEBS Lett* 561:195–201.
24. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36:1–12.
25. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, Kim SH, Sohn TK, et al. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 111:709–720.
26. Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Demonacos C, La Thangue NB. 2001. Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* 3:667–674.
27. Hsieh JK, Chan FS, O'Connor DJ, Mitnacht S, Zhong S, et al. 1999. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* 3:181–193.
28. Neckers L, Ivy SP. 2003. Heat shock protein 90. *Curr Opin Oncol* 15:419–424.
29. Atadja P, Hsu M, Kwon P, Trogani N, Bhalla K, et al. 2004. Molecular and cellular basis for the anti-proliferative effects of the HDAC inhibitor LAQ824. *Novartis Found Symp* 259:249–266; discussion 266–268, 285–288.
30. Yu X, Guo ZS, Marcu MG, Neckers L, Nguyen DM, et al. 2002. Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by decapeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst* 94:504–513.
31. Nimmanapalli R, Fuino L, Bali P, Gasparetto M, Glozak M, et al. 2003. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or-refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells. *Cancer Res* 63:5126–5135.
32. Grossman SR, Deato ME, Brignone C, Chan HM, Kung AL, et al. 2003. Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300. *Science* 300:342–344.
33. Pham AD, Sauer F. 2000. Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289:2357–2360.
34. Mitsuzawa H, Seino H, Yamao F, Ishihama A. 2001. Two WD repeat-containing TATA-binding protein-associated factors in fission yeast that suppress defects in the anaphase-promoting complex. *J Biol Chem* 276:17117–17124.
35. Legube G, Linares LK, Lemerrier C, Scheffner M, Khochbin S, et al. 2002. Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *Embo J* 21:1704–1712.
36. Logan IR, Sapountzi V, Gaughan L, Neal DE, Robson CN. 2004. Control of human PIRH2 protein stability: involvement of TIP60 and the proteasome. *J Biol Chem* 279:11696–11704.
37. Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, et al. 2002. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416:648–653.
38. Li M, Brooks CL, Kon N, Gu W. 2004. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell* 13:879–886.
39. Henry KW, Wyce A, Lo WS, Duggan LJ, Emre NC, et al. 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes Dev* 17:2648–2663.
40. Daniel JA, Torok MS, Sun ZW, Schieltz D, Allis CD, et al. 2004. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *J Biol Chem* 279:1867–1871.
41. Kao CF, Hillyer C, Tsukuda T, Henry K, Berger S, et al. 2004. Rad6 plays a role in transcriptional activation through ubiquitylation of histone H2B. *Genes Dev* 18:184–195.
42. Bach I, Rodriguez-Esteban C, Carriere C, Bhushan A, Kronen A, et al. 1999. RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex. *Nat Genet* 22:394–399.
43. Verdell A, Khochbin S. 1999. Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* 274:2440–2445.
44. Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, et al. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21:6820–6831.
45. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, et al. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455–458.
46. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, et al. 2003. HDAC6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* 22:1168–1179.
47. Seigneurin-Berry D, Verdell A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, et al. 2001. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 21:8035–8044.
48. Wojcik C, Yano M, DeMartino GN. 2004. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 117:281–292.
49. Johnson ES, Ma PC, Ota IM, Varshavsky A. 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem* 270:17442–17456.
50. Finzer P, Krueger A, Stohr M, Brenner D, Soto U, et al. 2004. HDAC inhibitors trigger apoptosis in HPV-positive cells by inducing the E2F-p73 pathway. *Oncogene* 23:4807–4817.
51. Li Q, Su A, Chen J, Lefebvre YA, Hache RJ. 2002. Attenuation of glucocorticoid signaling through targeted degradation of p300 via the 26S proteasome pathway. *Mol Endocrinol* 16:2819–2827.
52. Greene WC, Chen LF. 2004. Regulation of NF-kappaB action by reversible acetylation. *Novartis Found Symp* 259:208–217.
53. Adam E, Quivy V, Bex F, Chariot A, Collette Y, et al. 2003. Potentiation of tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation by deacetylase inhibitors is associated with a delayed cytoplasmic reappearance of I kappa B alpha. *Mol Cell Biol* 23:6200–6209.
54. Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, et al. 2003. The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *Embo J* 22:3411–3420.
55. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, et al. 2004. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:540–545.
56. Catley L, Weisberg E, Tai YT, Atadja P, Remiszewski S, et al. 2003. NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood* 102:2615–2622.
57. Tan S, Seow TK, Liang RC, Koh S, Lee CP, et al. 2002. Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 98:523–531.
58. Kopito RR, Sitia R. 2000. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep* 1:225–231.
59. Zhou Y, Gu G, Goodlett DR, Zhang T, Pan C, et al. 2004. Analysis of alpha-synuclein-associated proteins by quantitative proteomics. *J Biol Chem* 279:39155–39164.
60. Hughes RE. 2002. Polyglutamine disease: acetyltransferases awry. *Curr Biol* 12:R141–143.
61. Thomas M, Dadgar N, Aphale A, Harrell JM, Kunkel R, et al. 2004. Androgen receptor acetylation site mutations cause trafficking defects, misfolding, and aggregation similar to expanded glutamine tracts. *J Biol Chem* 279:8389–8395.
62. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, et al. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115:727–738.
63. Corcoran LJ, Mitchison TJ, Liu Q. 2004. A novel action of histone deacetylase inhibitors in a protein aggresome disease model. *Curr Biol* 14:488–492.
64. Greer SF, Zika E, Conti B, Zhu XS, Ting JP. 2003. Enhancement of CIITA transcriptional function by ubiquitin. *Nat Immunol* 4:1074–1082.
65. Brooks CL, Li M, Gu W. 2004. Monoubiquitination: the signal for p53 nuclear export? *Cell Cycle* 3:436–438.
66. Schwartz DC, Hochstrasser M. 2003. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem Sci* 28:321–328.
67. Mantovani F, Piazza S, Gostissa M, Strano S, Zacchi P, et al. 2004. Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell* 14:625–636.

68. Bernassola F, Salomoni P, Oberst A, Di Como CJ, Pagano M, et al. 2004. Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by PML. *J Exp Med* 7:1545–1557.
69. Gronroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J. 2002. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* 10:483–493.
70. Giandomenico V, Simonsson M, Gronroos E, Ericsson J. 2003. Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 23:2587–2599.
71. Fukuoka M, Daitoku H, Hatta M, Matsuzaki H, Umemura S, et al. 2003. Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med* 12:503–508.
72. Zhao Q, Cumming H, Cerruti L, Cunningham JM, Jane SM. 2004. Site-specific acetylation of the fetal globin activator NF-E4 prevents its ubiquitination and regulates its interaction with the histone deacetylase, HDAC1. *J Biol Chem* 279:41477–41486.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, **16**, 3797-3804.
- Acquaviva, C., Bossis, G., Ferrara, P., Brockly, F., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2002) Multiple degradation pathways for Fos family proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 426-434.
- Afshar, G. and Murnane, J.P. (1999) Characterization of a human gene with sequence homology to *Saccharomyces cerevisiae* SIR2. *Gene*, **234**, 161-168.
- Alam, S.L., Sun, J., Payne, M., Welch, B.D., Blake, B.K., Davis, D.R., Meyer, H.H., Emr, S.D. and Sundquist, W.I. (2004) Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *Embo J*, **23**, 1411-1421.
- Alberts, B. *et al.* *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell* (Garland, New York, 1998).
- Allfrey, V.G., Faulkner, R. and Mirsky, A.E. (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **51**, 786-794.
- Amann, J.M., Nip, J., Strom, D.K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J.R., Meyers, S. and Hiebert, S.W. (2001) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol*, **21**, 6470-6483.
- Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D. and Hochstrasser, M. (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *Embo J*, **16**, 4826-4838.
- Amerik, A.Y., Li, S.J. and Hochstrasser, M. (2000) Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, **381**, 981-992.
- Amerik, A.Y. and Hochstrasser, M. (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, **1695**, 189-207.
- Aoyagi, S. and Archer, T.K. (2005) Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. *Trends Cell Biol*, **15**, 565-567.
- Arendt, C.S. and Hochstrasser, M. (1997) Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7156-7161.
- Arrigo, A.P. and Pauli, D. (1988) Characterization of HSP27 and three immunologically related polypeptides during *Drosophila* development. *Exp Cell Res*, **175**, 169-183.
- Avalos, J.L., Celic, I., Muhammad, S., Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. and Wolberger, C. (2002) Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol Cell*, **10**, 523-535.
- Avalos, J.L., Bever, K.M. and Wolberger, C. (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell*, **17**, 855-868.
- Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-186.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell*, **87**, 13-20.
- Bakin, R.E. and Jung, M.O. (2004) Cytoplasmic sequestration of HDAC7 from mitochondrial and nuclear compartments upon initiation of apoptosis. *J Biol Chem*, **279**, 51218-51225.
- Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, **14**, 649-683.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. and Bhalla, K. (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*, **280**, 26729-26734.
- Ballinger, C.A., Connell, P., Wu, Y., Hu, Z., Thompson, L.J., Yin, L.Y. and Patterson, C. (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*, **19**, 4535-4545.
- Baumeister, W. and Lupas, A. (1997) The proteasome. *Curr Opin Struct Biol*, **7**, 273-278.

- Beere, H.M. (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*, **117**, 2641-2651.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-1555.
- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J. and Lutsch, G. (1994) Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem*, **269**, 20780-20784.
- Bennett, E.J., Bence, N.F., Jayakumar, R. and Kopito, R.R. (2005) Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell*, **17**, 351-365.
- Berger, S.L. (2001) Molecular biology. The histone modification circus. *Science*, **292**, 64-65.
- Bergerat, A., de Massy, B., Gabelle, D., Varoutas, P.C., Nicolas, A. and Forterre, P. (1997) An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination. *Nature*, **386**, 414-417.
- Berke, S.J. and Paulson, H.L. (2003) Protein aggregation and the ubiquitin proteasome pathway: gaining the UPPER hand on neurodegeneration. *Curr Opin Genet Dev*, **13**, 253-261.
- Bershadsky, A.D., Ballestrem, C., Carramusa, L., Zilberman, Y., Gilquin, B., Khochbin, S., Alexandrova, A.Y., Verkhovskiy, A.B., Shemesh, T. and Kozlov, M.M. (2006) Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur J Cell Biol*, **85**, 165-173.
- Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G. and Reed, S.I. (2001) UBA domains mediate protein-protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J Mol Biol*, **313**, 955-963.
- Bertos, N.R., Wang, A.H. and Yang, X.J. (2001) Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol*, **79**, 243-252.
- Bertos, N.R., Gilquin, B., Chan, G.K., Yen, T.J., Khochbin, S. and Yang, X.J. (2004) Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem*, **279**, 48246-48254.
- Bharadwaj, S., Ali, A. and Ovsenek, N. (1999) Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol*, **19**, 8033-8041.
- Bienkowska, J.R., Hartman, H. and Smith, T.F. (2003) A search method for homologs of small proteins. Ubiquitin-like proteins in prokaryotic cells? *Protein Eng*, **16**, 897-904.
- Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C. and Piper, R.C. (2002) The Vps27p Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nat Cell Biol*, **4**, 534-539.
- Bitterman, K.J., Anderson, R.M., Cohen, H.Y., Latorre-Esteves, M. and Sinclair, D.A. (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*, **277**, 45099-45107.
- Blanchard, N. and Hivroz, C. (2002) The immunological synapse: the more you look the less you know. *Biol Cell*, **94**, 345-354.
- Bogerd, H.P., Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J. and Cullen, B.R. (1996) Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol*, **16**, 4207-4214.
- Bonifacino, J.S. and Weissman, A.M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 19-57.
- Boorstein, W.R. and Craig, E.A. (1990) Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element. *Embo J*, **9**, 2543-2553.
- Borghi, S., Molinari, S., Razzini, G., Parise, F., Battini, R. and Ferrari, S. (2001) The nuclear localization domain of the MEF2 family of transcription factors shows member-specific features and mediates the nuclear import of histone deacetylase 4. *J Cell Sci*, **114**, 4477-4483.
- Borkovich, K.A., Farrelly, F.W., Finkelstein, D.B., Taulien, J. and Lindquist, S. (1989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol*, **9**, 3919-3930.
- Borodovsky, A., Kessler, B.M., Casagrande, R., Overkleeft, H.S., Wilkinson, K.D. and Ploegh, H.L. (2001) A novel active site-directed probe specific for deubiquitylating enzymes reveals proteasome association of USP14. *Embo J*, **20**, 5187-5196.
- Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2003) c-Fos proto-oncoprotein is degraded by the proteasome independently of its own ubiquitinylation in vivo. *Mol Cell Biol*, **23**, 7425-7436.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., Hopf, C., Huhse, B., Mangano, R., Michon, A.M., Schirle, M., Schlegl, J., Schwab, M., Stein, M.A., Bauer, A., Casari, G., Drewes, G., Gavin, A.C., Jackson, D.B., Joberty, G.,

- Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B. and Superti-Furga, G. (2004) A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*, **6**, 97-105.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. and Lacey, D.L. (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**, 337-342.
- Bravo, R., Fey, S.J., Bellatin, J., Larsen, P.M. and Celis, J.E. (1982) Identification of a nuclear polypeptide ("cyclin") whose relative proportion is sensitive to changes in the rate of cell proliferation and to transformation. *Prog Clin Biol Res*, **85 Pt A**, 235-248.
- Bres, V., Kiernan, R.E., Linares, L.K., Chable-Bessia, C., Plechakova, O., Treand, C., Emiliani, S., Peloponese, J.M., Jeang, K.T., Coux, O., Scheffner, M. and Benkirane, M. (2003) A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. *Nat Cell Biol*, **5**, 754-761.
- Brooks, C.L. and Gu, W. (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 164-171.
- Brummelkamp, T.R., Nijman, S.M., Dirac, A.M. and Bernards, R. (2003) Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, **424**, 797-801.
- Brush, M.H., Guardiola, A., Connor, J.H., Yao, T.P. and Shenolikar, S. (2004) Deacetylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases. *J Biol Chem*, **279**, 7685-7691.
- Buggy, J.J., Sideris, M.L., Mak, P., Lorimer, D.D., McIntosh, B. and Clark, J.M. (2000) Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J*, **350 Pt 1**, 199-205.
- Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 351-366.
- Burnett, B., Li, F. and Pittman, R.N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, **12**, 3195-3205.
- Burnett, B.G. and Pittman, R.N. (2005) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4330-4335.
- Busch, H. and Goldknopf, I.L. (1981) Ubiquitin - protein conjugates. *Mol Cell Biochem*, **40**, 173-187.
- Castelli, C., Ciupitu, A.M., Rini, F., Rivoltini, L., Mazzocchi, A., Kiessling, R. and Parmiani, G. (2001) Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res*, **61**, 222-227.
- Chadli, A., Bouhouche, I., Sullivan, W., Stensgard, B., McMahon, N., Catelli, M.G. and Toft, D.O. (2000) Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12524-12529.
- Chan, J.K., Sun, L., Yang, X.J., Zhu, G. and Wu, Z. (2003) Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity. *J Biol Chem*, **278**, 23515-23521.
- Chang, H.C., Nathan, D.F. and Lindquist, S. (1997) In vivo analysis of the Hsp90 cochaperone Sti1 (p60). *Mol Cell Biol*, **17**, 318-325.
- Chauchereau, A., Mathieu, M., de Saintignon, J., Ferreira, R., Pritchard, L.L., Mishal, Z., Dejean, A. and Harel-Bellan, A. (2004) HDAC4 mediates transcriptional repression by the acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF. *Oncogene*, **23**, 8777-8784.
- Chawla, S., Vanhoutte, P., Arnold, F.J., Huang, C.L. and Bading, H. (2003) Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem*, **85**, 151-159.
- Chen, S., Sullivan, W.P., Toft, D.O. and Smith, D.F. (1998) Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell Stress Chaperones*, **3**, 118-129.
- Chen, C.S., Weng, S.C., Tseng, P.H. and Lin, H.P. (2005) Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem*, **280**, 38879-38887.
- Chinkers, M. (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 28-32.
- Chu, B., Soncin, F., Price, B.D., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (1996) Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem*, **271**, 30847-30857.
- Chu, B., Zhong, R., Soncin, F., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (1998) Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J Biol Chem*, **273**, 18640-18646.
- Ciechanover, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1984) Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, **37**, 57-66.
- Ciechanover, A., DiGiuseppe, J.A., Bercovich, B., Orian, A., Richter, J.D., Schwartz, A.L. and Brodeur, G.M. (1991) Degradation of nuclear oncoproteins by the ubiquitin system in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 139-143.
- Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13-21.

- Ciocca, D.R., Oesterreich, S., Chamness, G.C., McGuire, W.L. and Fuqua, S.A. (1993) Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst*, **85**, 1558-1570.
- Conde, R., Xavier, J., McLoughlin, C., Chinkers, M. and Ovsenek, N. (2005) Protein phosphatase 5 is a negative modulator of heat shock factor 1. *J Biol Chem*, **280**, 28989-28996.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*, **3**, 93-96.
- Cope, G.A., Suh, G.S., Aravind, L., Schwarz, S.E., Zipursky, S.L., Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, **298**, 608-611.
- Cosgrove, M.S., Boeke, J.D. and Wolberger, C. (2004) Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1037-1043.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*, **65**, 801-847.
- Coux, O. and Goldberg, A.L. (1998) Enzymes catalyzing ubiquitination and proteolytic processing of the p105 precursor of nuclear factor kappaB1. *J Biol Chem*, **273**, 8820-8828.
- Coux, O. (2003) An interaction map of proteasome subunits. *Biochem Soc Trans*, **31**, 465-469.
- Craig, E.A. and Gross, C.A. (1991) Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci*, **16**, 135-140.
- Cress, W.D. and Seto, E. (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*, **184**, 1-16.
- Csermely, P., Kajtar, J., Hollosi, M., Jalsovszky, G., Holly, S., Kahn, C.R., Gergely, P., Jr., Soti, C., Mihaly, K. and Somogyi, J. (1993) ATP induces a conformational change of the 90-kDa heat shock protein (hsp90). *J Biol Chem*, **268**, 1901-1907.
- Cuesta, R., Laroia, G. and Schneider, R.J. (2000) Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev*, **14**, 1460-1470.
- Cummins, J.M., Rago, C., Kohli, M., Kinzler, K.W., Lengauer, C. and Vogelstein, B. (2004) Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53. *Nature*, **428**, 1 p following 486.
- Curcio-Morelli, C., Zavacki, A.M., Christofollete, M., Gereben, B., de Freitas, B.C., Harney, J.W., Li, Z., Wu, G. and Bianco, A.C. (2003) Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau protein-interacting deubiquitinating enzymes regulates thyroid hormone activation. *J Clin Invest*, **112**, 189-196.
- Cyr, D.M., Hohfeld, J. and Patterson, C. (2002) Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci*, **27**, 368-375.
- Dai, R.M. and Li, C.C. (2001) Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol*, **3**, 740-744.
- Das, A.K., Cohen, P.W. and Barford, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J*, **17**, 1192-1199.
- Davie, J.R. and Spencer, V.A. (1999) Control of histone modifications. *J Cell Biochem*, **Suppl 32-33**, 141-148.
- Davies, B.A., Topp, J.D., Sfeir, A.J., Katzmann, D.J., Carney, D.S., Tall, G.G., Friedberg, A.S., Deng, L., Chen, Z. and Horazdovsky, B.F. (2003) Vps9p CUE domain ubiquitin binding is required for efficient endocytic protein traffic. *J Biol Chem*, **278**, 19826-19833.
- Davy, A., Bello, P., Thierry-Mieg, N., Vaglio, P., Hitti, J., Doucette-Stamm, L., Thierry-Mieg, D., Reboul, J., Boulton, S., Walhout, A.J., Coux, O. and Vidal, M. (2001) A protein-protein interaction map of the *Caenorhabditis elegans* 26S proteasome. *EMBO Rep*, **2**, 821-828.
- Defossez, P.A., Lin, S.J. and McNabb, D.S. (2001) Sound silencing: the Sir2 protein and cellular senescence. *Bioessays*, **23**, 327-332.
- DeFranco, D.B., Ramakrishnan, C. and Tang, Y. (1998) Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65**, 51-58.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Destaing, O., Saltel, F., Gilquin, B., Chabadel, A., Khochbin, S., Ory, S. and Jurdic, P. (2005) A novel Rho-Dia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci*, **118**, 2901-2911.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C. and Rechsteiner, M. (1994) A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*, **269**, 7059-7061.
- Devoy, A., Soane, T., Welchman, R. and Mayer, R.J. (2005) The ubiquitin-proteasome system and cancer. *Essays Biochem*, **41**, 187-203.
- Dey, B., Lightbody, J.J. and Boschelli, F. (1996) CDC37 is required for p60v-src activity in yeast. *Mol Biol Cell*, **7**, 1405-1417.
- Diehl, J.A., Zindy, F. and Sherr, C.J. (1997) Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev*, **11**, 957-972.

- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M. and Heitman, J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13093-13098.
- Donaldson, K.M., Li, W., Ching, K.A., Batalov, S., Tsai, C.C. and Joazeiro, C.A. (2003) Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8892-8897.
- Dong, Y., Hakimi, M.A., Chen, X., Kumaraswamy, E., Cooch, N.S., Godwin, A.K. and Shiekhattar, R. (2003) Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Mol Cell*, **12**, 1087-1099.
- Doucet, C., Gutierrez, G.J., Lindon, C., Lorca, T., Lledo, G., Pinset, C. and Coux, O. (2005) Multiple phosphorylation events control mitotic degradation of the muscle transcription factor Myf5. *BMC Biochem*, **6**, 27.
- Dressel, U., Bailey, P.J., Wang, S.C., Downes, M., Evans, R.M. and Muscat, G.E. (2001) A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J Biol Chem*, **276**, 17007-17013.
- Dragnev, K.H., Freemantle, S.J., Spinella, M.J. and Dmitrovsky, E. (2001) Cyclin proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism. *Ann N Y Acad Sci*, **952**, 13-22.
- Duina, A.A., Marsh, J.A. and Gaber, R.F. (1996) Identification of two CyP-40-like cyclophilins in *Saccharomyces cerevisiae*, one of which is required for normal growth. *Yeast*, **12**, 943-952.
- Duncan, R.F. and Hershey, J.W. (1989) Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J Cell Biol*, **109**, 1467-1481.
- Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. and Buchner, J. (1999) The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem*, **274**, 14867-14874.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. and Hunt, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, **33**, 389-396.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Kathoria, M. and Parkinson, J. (1997) A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *Embo J*, **16**, 1519-1530.
- Eytan, E., Armon, T., Heller, H., Beck, S. and Hershko, A. (1993) Ubiquitin C-terminal hydrolase activity associated with the 26 S protease complex. *J Biol Chem*, **268**, 4668-4674.
- Fan, C.M. and Maniatis, T. (1991) Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, **354**, 395-398.
- Fang, Y., Fliss, A.E., Rao, J. and Caplan, A.J. (1998) SBA1 encodes a yeast hsp90 cochaperone that is homologous to vertebrate p23 proteins. *Mol Cell Biol*, **18**, 3727-3734.
- Farras, R., Bossis, G., Andermarcher, E., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. (2005) Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome: new target for anti-cancer therapy? *Crit Rev Oncol Hematol*, **54**, 31-51.
- Felsenfeld, G. and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature*, **421**, 448-453.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J. and Schreiber, S.L. (1995) Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science*, **268**, 726-731.
- Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H.S., Eng, F., Bertos, N.R., Pelletier, N., Mader, S., Han, V.K., Yang, X.J. and White, J.H. (2003) Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell*, **11**, 139-150.
- Fink, A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, **79**, 425-449.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R. and Pavletich, N.P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **401**, 188-193.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R. and Pavletich, N.P. (2001) Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat Struct Biol*, **8**, 621-625.
- Fischer, D.D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F.A., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P. and Cohen, D. (2002) Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem*, **277**, 6656-6666.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M.J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W. and Verdin, E. (1999) A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem*, **274**, 11713-11720.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Fillion, M., Hendzel, M.J., Voelter, W. and Verdin, E. (2001) Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 35826-35835.
- Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C. and McKay, D.B. (1990) Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, **346**, 623-628.

- Flaherty, K.M., McKay, D.B., Kabsch, W. and Holmes, K.C. (1991) Similarity of the three-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5041-5045.
- Freshney, N.W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J. and Saklatvala, J. (1994) Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, **78**, 1039-1049.
- Frydman, J., Nimmesgern, E., Ohtsuka, K. and Hartl, F.U. (1994) Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*, **370**, 111-117.
- Frye, R.A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 793-798.
- Fujita, N. and Ishihama, A. (1987) Heat-shock induction of RNA polymerase sigma-32 synthesis in Escherichia coli: transcriptional control and a multiple promoter system. *Mol Gen Genet*, **210**, 10-15.
- Fulco, M., Schiltz, R.L., Iezzi, S., King, M.T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R.L. and Sartorelli, V. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*, **12**, 51-62.
- Fuller, K.J., Issels, R.D., Slosman, D.O., Guillet, J.G., Soussi, T. and Polla, B.S. (1994) Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*, **30A**, 1884-1891.
- Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 87-92.
- Galan, J.M., Moreau, V., Andre, B., Volland, C. and Haguenaer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J Biol Chem*, **271**, 10946-10952.
- Galan, J.M. and Haguenaer-Tsapis, R. (1997) Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J*, **16**, 5847-5854.
- Galasinski, S.C., Resing, K.A., Goodrich, J.A. and Ahn, N.G. (2002) Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem*, **277**, 19618-19626.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. and Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, **277**, 25748-25755.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A. and Sessa, W.C. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, **392**, 821-824.
- Garoff, H., Hewson, R. and Opstelten, D.J. (1998) Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1171-1190.
- Garrido, C., Bruey, J.M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A.P. and Solary, E. (1999) HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J*, **13**, 2061-2070.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L. and Kroemer, G. (2001) Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, **286**, 433-442.
- Gelman, M.S., Kannegaard, E.S. and Kopito, R.R. (2002) A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **277**, 11709-11714.
- Georgopoulos, C. and Welch, W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 601-634.
- Gernold, M., Knauf, U., Gaestel, M., Stahl, J. and Kloetzel, P.M. (1993) Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. *Dev Genet*, **14**, 103-111.
- Ghislain, M., Dohmen, R.J., Levy, F. and Varshavsky, A. (1996) Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in Saccharomyces cerevisiae. *Embo J*, **15**, 4884-4899.
- Giasson, B.I. and Lee, V.M. (2003) Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell*, **114**, 1-8.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Plachter, B. and Greenberg, P.D. (1996) Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*, **383**, 720-722.
- Gill, G. (2004) SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, **18**, 2046-2059.
- Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O.A., Thain, A., Anderson, L.A., Snowden, A.W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N.D. and Hay, R.T. (2003) P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*, **11**, 1043-1054.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A. and Finley, D. (1998) A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, **94**, 615-623.

- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fu, H., Larsen, C.N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W., Fried, V. and Finley, D. (1999) Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol Biol Rep*, **26**, 21-28.
- Glover, J.R. and Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, **94**, 73-82.
- Goldberg, A.L. (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, **426**, 895-899.
- Gong, L., Kamitani, T., Millas, S. and Yeh, E.T. (2000) Identification of a novel isopeptidase with dual specificity for ubiquitin- and NEDD8-conjugated proteins. *J Biol Chem*, **275**, 14212-14216.
- Grammatikakis, N., Lin, J.H., Grammatikakis, A., Tsihchlis, P.N. and Cochran, B.H. (1999) p50(cdc37) acting in concert with Hsp90 is required for Raf-1 function. *Mol Cell Biol*, **19**, 1661-1672.
- Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L.J., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. and Loda, M. (2004) The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*, **5**, 253-261.
- Green, M., Schuetz, T.J., Sullivan, E.K. and Kingston, R.E. (1995) A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol Cell Biol*, **15**, 3354-3362.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M. and Goodson, H.V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, **338**, 17-31.
- Grenert, J.P., Sullivan, W.P., Fadden, P., Haystead, T.A., Clark, J., Mimnaugh, E., Krutzsch, H., Ochel, H.J., Schulte, T.W., Sausville, E., Neckers, L.M. and Toft, D.O. (1997) The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *J Biol Chem*, **272**, 23843-23850.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K. and Nakatani, Y. (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell*, **113**, 357-367.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- Grozinger, C.M., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4868-4873.
- Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 and 5 and transcriptional activity by 14-3-3-dependent cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7835-7840.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Guardiola, A.R. and Yao, T.P. (2002) Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem*, **277**, 3350-3356.
- Guenther, M.G., Barak, O. and Lazar, M.A. (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol*, **21**, 6091-6101.
- Guarente, L. (2000) Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*, **14**, 1021-1026.
- Guenther, M.G., Barak, O. and Lazar, M.A. (2001) The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol*, **21**, 6091-6101.
- Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F. and Voellmy, R. (2001) Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J Biol Chem*, **276**, 45791-45799.
- Gupta, K., Chevrette, M. and Gray, D.A. (1994) The Unp proto-oncogene encodes a nuclear protein. *Oncogene*, **9**, 1729-1731.
- Hadari, T., Warms, J.V., Rose, I.A. and Hershko, A. (1992) A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation. *J Biol Chem*, **267**, 719-727.
- Hahn, G.M. and Li, G.C. (1982) Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiat Res*, **92**, 452-457.
- Hamilton, K.S., Ellison, M.J., Barber, K.R., Williams, R.S., Huzil, J.T., McKenna, S., Ptak, C., Glover, M. and Shaw, G.S. (2001) Structure of a conjugating enzyme-ubiquitin thiolester intermediate reveals a novel role for the ubiquitin tail. *Structure*, **9**, 897-904.
- Hampton, R.Y. and Rine, J. (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J Cell Biol*, **125**, 299-312.
- Han, S.I., Ha, K.S., Kang, K.I., Kim, H.D. and Kang, H.S. (2000) Heat shock-induced actin polymerization, SAPK/JNK activation, and heat-shock protein expression are mediated by genistein-sensitive tyrosine kinase(s) in K562 cells. *Cell Biol Int*, **24**, 447-457.
- Harper, J.W. and Schulman, B.A. (2006) Structural complexity in ubiquitin recognition. *Cell*, **124**, 1133-1136.

- Harris, S.F., Shiau, A.K. and Agard, D.A. (2004) The crystal structure of the carboxy-terminal dimerization domain of htpG, the Escherichia coli Hsp90, reveals a potential substrate binding site. *Structure*, **12**, 1087-1097.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-299.
- Hayashi, S.I., Eguchi, H., Tanimoto, K., Yoshida, T., Omoto, Y., Inoue, A., Yoshida, N. and Yamaguchi, Y. (2003) The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer*, **10**, 193-202.
- Hegde, A.N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D.G., Martin, K.C., Kandel, E.R. and Schwartz, J.H. (1997) Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. *Cell*, **89**, 115-126.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, **387**, 43-48.
- Hemelaar, J., Borodovsky, A., Kessler, B.M., Reverter, D., Cook, J., Kolli, N., Gan-Erdene, T., Wilkinson, K.D., Gill, G., Lima, C.D., Ploegh, H.L. and Ova, H. (2004) Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins. *Mol Cell Biol*, **24**, 84-95.
- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L. and Rose, I.A. (1980) Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 1783-1786.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, **258**, 8206-8214.
- Hershko, A., Heller, H., Eytan, E., Kaklij, G. and Rose, I.A. (1984) Role of the alpha-amino group of protein in ubiquitin-mediated protein breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 7021-7025.
- Hershko, A. and Rose, I.A. (1987) Ubiquitin-aldehyde: a general inhibitor of ubiquitin-recycling processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1829-1833.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem*, **61**, 761-807.
- Hershko, A. (1996) Lessons from the discovery of the ubiquitin system. *Trends Biochem Sci*, **21**, 445-449.
- Hershko, A. (1997) Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 788-799.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hetfeld, B.K., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P.M. and Dubiel, W. (2005) The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol*, **15**, 1217-1221.
- Hicke, L. and Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277-287.
- Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, **9**, 107-112.
- Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 195-201.
- Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hicke, L., Schubert, H.L. and Hill, C.P. (2005) Ubiquitin-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 610-621.
- Hilt, W. and Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci*, **21**, 96-102.
- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A.H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S. and Kakizuka, A. (2001) VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ*, **8**, 977-984.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Shirayoshi, Y., Kamitani, H., Watanabe, T., Ohama, E., Tahimic, C.G., Kurimasa, A. and Oshimura, M. (2003) Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **309**, 558-566.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.
- Hofmann, K. and Falquet, L. (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci*, **26**, 347-350.
- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J.O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R.I., Eriksson, J.E. and Sistonen, L. (2001) Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *Embo J*, **20**, 3800-3810.

- Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., Wright, W.E. and White, M.A. (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev*, **13**, 817-826.
- Hook, S.S., Orian, A., Cowley, S.M. and Eisenman, R.N. (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13425-13430.
- Hoppe, T. (2005) Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends Biochem Sci*, **30**, 183-187.
- Hu, M., Li, P., Li, M., Li, W., Yao, T., Wu, J.W., Gu, W., Cohen, R.E. and Shi, Y. (2002) Crystal structure of a UBP-family deubiquitinating enzyme in isolation and in complex with ubiquitin aldehyde. *Cell*, **111**, 1041-1054.
- Huang, Y., Niwa, J., Sobue, G. and Breitwieser, G.E. (2006) Calcium-sensing receptor ubiquitination and degradation mediated by the E3 ubiquitin ligase dorfins. *J Biol Chem*, **281**, 11610-11617.
- Huang, Y., Baker, R.T. and Fischer-Vize, J.A. (1995) Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene. *Science*, **270**, 1828-1831.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. and Yao, T.P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, **417**, 455-458.
- Hughes, E.A., Hammond, C. and Cresswell, P. (1997) Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1896-1901.
- Huot, J., Houle, F., Spitz, D.R. and Landry, J. (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res*, **56**, 273-279.
- Hurst, D.R., Mehta, A., Moore, B.P., Phadke, P.A., Meehan, W.J., Accavitti, M.A., Shevde, L.A., Hopper, J.E., Xie, Y., Welch, D.R. and Samant, R.S. (2006) Breast cancer metastasis suppressor 1 (BRMS1) is stabilized by the Hsp90 chaperone. *Biochem Biophys Res Commun*, **348**, 1429-1435.
- Huynh, K.D., Fischle, W., Verdine, E. and Bardwell, V.J. (2000) BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev*, **14**, 1810-1823.
- Ideguchi, H., Ueda, A., Tanaka, M., Yang, J., Tsuji, T., Ohno, S., Hagiwara, E., Aoki, A. and Ishigatsubo, Y. (2002) Structural and functional characterization of the USP11 deubiquitinating enzyme, which interacts with the RanGTP-associated protein RanBPM. *Biochem J*, **367**, 87-95.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaerberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.
- Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R. and Hayashi, S. (2002) Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol*, **29**, 175-192.
- Ishigaki, S., Hishikawa, N., Niwa, J., Iemura, S., Natsume, T., Hori, S., Kakizuka, A., Tanaka, K. and Sobue, G. (2004) Physical and functional interaction between Dorfin and Valosin-containing protein that are colocalized in ubiquitylated inclusions in neurodegenerative disorders. *J Biol Chem*, **279**, 51376-51385.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G., Jr. (2001) HIF1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Iyengar, S., Hildreth, J.E. and Schwartz, D.H. (1998) Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol*, **72**, 5251-5255.
- Iyer, L.M., Burroughs, A.M. and Aravind, L. (2006) The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol*, **7**, R60.
- Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A. and Kopito, R.R. (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem*, **280**, 40282-40292.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF-1 α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. and Reimann, J.D. (2000) The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol*, **10**, 429-439.
- Jakob, U. and Buchner, J. (1994) Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci*, **19**, 205-211.
- Janssen, J.W., Schleithoff, L., Bartram, C.R. and Schulz, A.S. (1998) An oncogenic fusion product of the phosphatidylinositol 3-kinase p85 β subunit and HUMORF8, a putative deubiquitinating enzyme. *Oncogene*, **16**, 1767-1772.

- Jascur, T., Brickner, H., Salles-Passador, I., Barbier, V., El Khissiin, A., Smith, B., Fotedar, R. and Fotedar, A. (2005) Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISp39, a Hsp90 binding TPR protein. *Mol Cell*, **17**, 237-249.
- Jaster, R., Zhu, Y., Pless, M., Bhattacharya, S., Mathey-Prevot, B. and D'Andrea, A.D. (1997) JAK2 is required for induction of the murine DUB-1 gene. *Mol Cell Biol*, **17**, 3364-3372.
- Jayakar, H.R., Murti, K.G. and Whitt, M.A. (2000) Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *J Virol*, **74**, 9818-9827.
- Jayne, S., Zwartjes, C.G., van Schaik, F.M. and Timmers, H.T. (2006) Involvement of the SMRT/NCoR-HDAC3 complex in transcriptional repression by the CNOT2 subunit of the human Ccr4-Not complex. *Biochem J*, **398**, 461-467.
- Jensen, T.J., Loo, M.A., Pind, S., Williams, D.B., Goldberg, A.L. and Riordan, J.R. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*, **83**, 129-135.
- Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C. and Rauscher, F.J., 3rd. (1998) BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*, **16**, 1097-1112.
- Jentsch, S. (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet*, **26**, 179-207.
- Jernigan, K.M., Blumenthal, R. and Puri, A. (2000) Varying effects of temperature, Ca(2+) and cytochalasin on fusion activity mediated by human immunodeficiency virus type 1 and type 2 glycoproteins. *FEBS Lett*, **474**, 246-251.
- Joazeiro, C.A. and Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, **102**, 549-552.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.
- Johnson, P.R., Swanson, R., Rakhilina, L. and Hochstrasser, M. (1998) Degradation signal masking by heterodimerization of MATA α 2 and MATA α 1 blocks their mutual destruction by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **94**, 217-227.
- Johnson, E.S. (2004) Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem*, **73**, 355-382.
- Johnston, S.C., Larsen, C.N., Cook, W.J., Wilkinson, K.D. and Hill, C.P. (1997) Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution. *Embo J*, **16**, 3787-3796.
- Johnston, S.C., Riddle, S.M., Cohen, R.E. and Hill, C.P. (1999) Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases. *Embo J*, **18**, 3877-3887.
- Johnstone, R.W. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 287-299.
- Kampranis, S.C., Bates, A.D. and Maxwell, A. (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 8414-8419.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.H., Deng, L. and Chen, Z.J. (2004) TAB2 and TAB3 activate the NF- κ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, **15**, 535-548.
- Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P. and Evans, R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev*, **14**, 55-66.
- Kao, H.Y., Verdel, A., Tsai, C.C., Simon, C., Juguilon, H. and Khochbin, S. (2001) Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem*, **276**, 47496-47507.
- Kao, H.Y., Lee, C.H., Komarov, A., Han, C.C. and Evans, R.M. (2002) Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J Biol Chem*, **277**, 187-193.
- Kato, M., Miyazawa, K. and Kitamura, N. (2000) A deubiquitinating enzyme UBPY interacts with the Src homology 3 domain of Hrs-binding protein via a novel binding motif PX(V/I)(D/N)RXXKP. *J Biol Chem*, **275**, 37481-37487.
- Kato, H., Tamamizu-Kato, S. and Shibasaki, F. (2004) Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1 α and increases transcriptional activity. *J Biol Chem*, **279**, 41966-41974.
- Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P., Yakir, L., Mosesson, Y., Harari, D., Machluf, Y., Asao, H., Jovin, T., Sugamura, K. and Yarden, Y. (2002) Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic*, **3**, 740-751.
- Katzmann, D.J., Babst, M. and Emr, S.D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, **106**, 145-155.
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G. and Emr, S.D. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 893-905.

- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. and Yao, T.P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, **115**, 727-738.
- Kawazoe, Y., Nakai, A., Tanabe, M. and Nagata, K. (1998) Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur J Biochem*, **255**, 356-362.
- Kimmins, S. and MacRae, T.H. (2000) Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 76-86.
- Klapisz, E., Sorokina, I., Lemeer, S., Pijnenburg, M., Verkleij, A.J. and van Bergen en Henegouwen, P.M. (2002) A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem*, **277**, 30746-30753.
- Klein, J.B., Barati, M.T., Wu, R., Gozal, D., Sachleben, L.R., Jr., Kausar, H., Trent, J.O., Gozal, E. and Rane, M.J. (2005) Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*, **280**, 31870-31881.
- Kobayashi, T., Tanaka, K., Inoue, K. and Kakizuka, A. (2002) Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem*, **277**, 47358-47365.
- Kostova, Z. and Wolf, D.H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J*, **22**, 2309-2317.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C. and Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 162-166.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.
- Kim, K.I., Baek, S.H. and Chung, C.H. (2002) Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol*, **191**, 257-268.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. and Kirschner, M.W. (1995) A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, **81**, 279-288.
- Kirsh, O., Seeler, J.S., Pichler, A., Gast, A., Muller, S., Miska, E., Mathieu, M., Harel-Bellan, A., Kouzarides, T., Melchior, F. and Dejean, A. (2002) The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J*, **21**, 2682-2691.
- Kline, M.P. and Morimoto, R.I. (1997) Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **17**, 2107-2115.
- Kopito, R.R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell*, **88**, 427-430.
- Kopito, R.R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*, **10**, 524-530.
- Kopp, F., Hendil, K.B., Dahlmann, B., Kristensen, P., Sobek, A. and Uerkvitz, W. (1997) Subunit arrangement in the human 20S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2939-2944.
- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R.G. and Fink, G.R. (1994) Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *Embo J*, **13**, 6021-6030.
- Kovacs, J.J., Murphy, P.J., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C.V., Yoshida, M., Toft, D.O., Pratt, W.B. and Yao, T.P. (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*, **18**, 601-607.
- Kovalenko, A., Chable-Bessia, C., Cantarella, G., Israel, A., Wallach, D. and Courtois, G. (2003) The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*, **424**, 801-805.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kuersten, S., Ohno, M. and Mattaj, I.W. (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol*, **11**, 497-503.
- Kuhl, N.M. and Rensing, L. (2000a) Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 450-463.
- Kuhl, N.M., Kunz, J. and Rensing, L. (2000b) Heat shock-induced arrests in different cell cycle phases of rat C6-glioma cells are attenuated in heat shock-primed thermotolerant cells. *Cell Prolif*, **33**, 147-166.
- Kuppner, M.C., Gastpar, R., Gelwer, S., Nossner, E., Ochmann, O., Scharner, A. and Issels, R.D. (2001) The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol*, **31**, 1602-1609.
- Kwon, Y.T., Kashina, A.S., Davydov, I.V., Hu, R.G., An, J.Y., Seo, J.W., Du, F. and Varshavsky, A. (2002) An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. *Science*, **297**, 96-99.
- Lake, M.W., Wuebbens, M.M., Rajagopalan, K.V. and Schindelin, H. (2001) Mechanism of ubiquitin activation revealed by the structure of a bacterial MoeB-MoaD complex. *Nature*, **414**, 325-329.

- Lam, Y.A., Xu, W., DeMartino, G.N. and Cohen, R.E. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, **385**, 737-740.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5807-5811.
- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G. and Kouzarides, T. (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J*, **21**, 2383-2396.
- Lanker, S., Valdivieso, M.H. and Wittenberg, C. (1996) Rapid degradation of the G1 cyclin Cln2 induced by CDK-dependent phosphorylation. *Science*, **271**, 1597-1601.
- Laskowska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Skorko-Glonek, J. and Taylor, A. (1996) Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of Escherichia coli proteins aggregated in vivo by heat shock; HtrA protease action in vivo and in vitro. *Mol Microbiol*, **22**, 555-571.
- Lee, R.J., Liu, C.W., Harty, C., McCracken, A.A., Latterich, M., Romisch, K., DeMartino, G.N., Thomas, P.J. and Brodsky, J.L. (2004) Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *Embo J*, **23**, 2206-2215.
- Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*, **18**, 30-38.
- Lehmann, C., Begley, T.P. and Ealick, S.E. (2006) Structure of the Escherichia coli ThiS-ThiF complex, a key component of the sulfur transfer system in thiamin biosynthesis. *Biochemistry*, **45**, 11-19.
- Lemercier, C., Verdel, A., Galloo, B., Curtet, S., Brocard, M.P. and Khochbin, S. (2000) mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *J Biol Chem*, **275**, 15594-15599.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., Leube, B., Ulm, G., Mezey, E., Harta, G., Brownstein, M.J., Jonnalagada, S., Chernova, T., Dehejia, A., Lavedan, C., Gasser, T., Steinbach, P.J., Wilkinson, K.D. and Polymeropoulos, M.H. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, **395**, 451- 452.
- Levinson, W., Oppermann, H. and Jackson, J. (1980) Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*, **606**, 170-180.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. and Masucci, M.G. (1997) Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12616-12621.
- Li, J., Lin, Q., Wang, W., Wade, P. and Wong, J. (2002) Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev*, **16**, 687-692.
- Li, X., Song, S., Liu, Y., Ko, S.H. and Kao, H.Y. (2004a) Phosphorylation of the histone deacetylase 7 modulates its stability and association with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*, **279**, 34201-34208.
- Li, M., Brooks, C.L., Kon, N. and Gu, W. (2004b) A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell*, **13**, 879-886.
- Li, Z., Wang, D., Messing, E.M. and Wu, G. (2005) VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep*, **6**, 373-378.
- Lin, L. and Ghosh, S. (1996) A glycine-rich region in NF-kappaB p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol Cell Biol*, **16**, 2248-2254.
- Lin, S.J., Defossez, P.A. and Guarente, L. (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. *Science*, **289**, 2126-2128.
- Lindquist, S. and Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, **22**, 631-677.
- Ling, L. and Lobie, P.E. (2004) RhoA/ROCK activation by growth hormone abrogates p300/histone deacetylase 6 repression of Stat5-mediated transcription. *J Biol Chem*, **279**, 32737-32750.
- Linseman, D.A., Bartley, C.M., Le, S.S., Laessig, T.A., Bouchard, R.J., Meintzer, M.K., Li, M. and Heidenreich, K.A. (2003) Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous Ca(2+) //calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J Biol Chem*, **278**, 41472-41481.
- Liu, J. and DeFranco, D.B. (1999) Chromatin recycling of glucocorticoid receptors: implications for multiple roles of heat shock protein 90. *Mol Endocrinol*, **13**, 355-365.
- Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z. and Lansbury, P.T., Jr. (2002) The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell*, **111**, 209-218.
- Lucas, G.J., Mehta, S.G., Hocking, L.J., Stewart, T.L., Cundy, T., Nicholson, G.C., Walsh, J.P., Fraser, W.D., Watts, G.D., Ralston, S.H. and Kimonis, V.E. (2006) Evaluation of the role of Valosin-containing protein in the pathogenesis of familial and sporadic Paget's disease of bone. *Bone*, **38**, 280-285.
- Luders, J., Demand, J. and Hohfeld, J. (2000) The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 4613-4617.

- Luduena, R.F. (1998) Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol*, **178**, 207-275.
- Lukacs, G.L., Mohamed, A., Kartner, N., Chang, X.B., Riordan, J.R. and Grinstein, S. (1994) Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *Embo J*, **13**, 6076-6086.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, **107**, 137-148.
- Ma, H., Nguyen, C., Lee, K.S. and Kahn, M. (2005) Differential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-mediated survivin gene expression. *Oncogene*, **24**, 3619-3631.
- MacRae, T.H. (1997) Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem*, **244**, 265-278.
- Maki, C.G., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. (1996) In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1). *Cancer Res*, **56**, 2649-2654.
- Malakhova, O.A., Yan, M., Malakhov, M.P., Yuan, Y., Ritchie, K.J., Kim, K.I., Peterson, L.F., Shuai, K. and Zhang, D.E. (2003) Protein ISGylation modulates the JAK-STAT signaling pathway. *Genes Dev*, **17**, 455-460.
- Marchler, G. and Wu, C. (2001) Modulation of Drosophila heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1. *Embo J*, **20**, 499-509.
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. and Kelly, W.K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, **1**, 194-202.
- Marmorstein, R. (2001) Structure of histone deacetylases: insights into substrate recognition and catalysis. *Structure*, **9**, 1127-1133.
- Masuda-Robens, J.M., Kutney, S.N., Qi, H. and Chou, M.M. (2003) The TRE17 oncogene encodes a component of a novel effector pathway for Rho GTPases Cdc42 and Rac1 and stimulates actin remodeling. *Mol Cell Biol*, **23**, 2151-2161.
- Mathew, A. and Morimoto, R.I. (1998) Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann N Y Acad Sci*, **851**, 99-111.
- Mathew, A., Mathur, S.K., Jolly, C., Fox, S.G., Kim, S. and Morimoto, R.I. (2001) Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol*, **21**, 7163-7171.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J*, **21**, 6820-6831.
- McCullough, J., Clague, M.J. and Urbe, S. (2004) AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol*, **166**, 487-492.
- McDonough, H. and Patterson, C. (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones*, **8**, 303-308.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L., Lu, J. and Olson, E.N. (2000a) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*, **408**, 106-111.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L. and Olson, E.N. (2000b) Activation of the myocyte enhancer factor-2 transcription factor by calcium/calmodulin-dependent protein kinase-stimulated binding of 14-3-3 to histone deacetylase 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14400-14405.
- McKinsey, T.A., Zhang, C.L. and Olson, E.N. (2001) Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol*, **21**, 6312-6321.
- McLaughlin, S.H., Smith, H.W. and Jackson, S.E. (2002) Stimulation of the weak ATPase activity of human hsp90 by a client protein. *J Mol Biol*, **315**, 787-798.
- McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K. and Benjamin, I.J. (1998) Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 7523-7528.
- Mercier, P.A., Winegarden, N.A. and Westwood, J.T. (1999) Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J Cell Sci*, **112 (Pt 16)**, 2765-2774.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, **7**, 766-772.
- Meyer, H.H., Wang, Y. and Warren, G. (2002) Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *Embo J*, **21**, 5645-5652.
- Meyer, P., Prodromou, C., Hu, B., Vaughan, C., Roe, S.M., Panaretou, B., Piper, P.W. and Pearl, L.H. (2003) Structural and functional analysis of the middle segment of hsp90: implications for ATP hydrolysis and client protein and cochaperone interactions. *Mol Cell*, **11**, 647-658.
- Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C. and Horikawa, I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, **16**, 4623-4635.

- Milarski, K.L. and Morimoto, R.I. (1986) Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9517-9521.
- Mimnaugh, E.G. and Neckers, L.M. (2005) Measuring ubiquitin conjugation in cells. *Methods Mol Biol*, **301**, 223-241.
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R. and Xu, R.M. (2001) Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell*, **105**, 269-279.
- Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J. and Kouzarides, T. (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *Embo J*, **18**, 5099-5107.
- Mizuno, E., Kawahata, K., Kato, M., Kitamura, N. and Komada, M. (2003) STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif. *Mol Biol Cell*, **14**, 3675-3689.
- Moazed, D. and Johnson, D. (1996) A deubiquitinating enzyme interacts with SIR4 and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell*, **86**, 667-677.
- Moazed, D. (2001) Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 232-238.
- Muller, H. and Helin, K. (2000) The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*, **1470**, M1-12.
- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T. and Tanaka, K. (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep*, **2**, 1133-1138.
- Murphy, P.J., Morishima, Y., Kovacs, J.J., Yao, T.P. and Pratt, W.B. (2005) Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem*, **280**, 33792-33799.
- Murray, R.Z., Jolly, L.A. and Wood, S.A. (2004) The FAM deubiquitylating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E-cadherin and beta-catenin. *Mol Biol Cell*, **15**, 1591-1599.
- Muth, V., Nadaud, S., Grummt, I. and Voit, R. (2001) Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J*, **20**, 1353-1362.
- Nagahama, M., Suzuki, M., Hamada, Y., Hatsuzawa, K., Tani, K., Yamamoto, A. and Tagaya, M. (2003) SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. *Mol Biol Cell*, **14**, 262-273.
- Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Ota, M., Takagi, T. and Yokoyama, K. (1995) Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem*, **233**, 1-8.
- Newton, E.M., Knauf, U., Green, M. and Kingston, R.E. (1996) The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol Cell Biol*, **16**, 839-846.
- Nielsen, T.K., Hildmann, C., Dickmanns, A., Schwienhorst, A. and Ficner, R. (2005) Crystal structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue. *J Mol Biol*, **354**, 107-120.
- Nigg, E.A. (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, **17**, 471-480.
- Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K. and Bernards, R. (2005a) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell*, **123**, 773-786.
- Nijman, S.M., Huang, T.T., Dirac, A.M., Brummelkamp, T.R., Kerkhoven, R.M., D'Andrea, A.D. and Bernards, R. (2005b) The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. *Mol Cell*, **17**, 331-339.
- Nikolay, R., Wiederkehr, T., Rist, W., Kramer, G., Mayer, M.P. and Bukau, B. (2004) Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem*, **279**, 2673-2678.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. and Verdin, E. (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, **11**, 437-444.
- Obermann, W.M., Sondermann, H., Russo, A.A., Pavletich, N.P. and Hartl, F.U. (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol*, **143**, 901-910.
- Ogawa, E., Inuzuka, M., Maruyama, M., Satake, M., Naito-Fujimoto, M., Ito, Y. and Shigesada, K. (1993) Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology*, **194**, 314-331.
- Oishi, K., Miyazaki, K., Kadota, K., Kikuno, R., Nagase, T., Atsumi, G., Ohkura, N., Azama, T., Mesaki, M., Yukimasa, S., Kobayashi, H., Iitaka, C., Umehara, T., Horikoshi, M., Kudo, T., Shimizu, Y., Yano, M., Monden, M., Machida, K., Matsuda, J., Horie, S., Todo, T. and Ishida, N. (2003) Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem*, **278**, 41519-41527.
- Oldham, C.E., Mohney, R.P., Miller, S.L., Hanes, R.N. and O'Bryan, J.P. (2002) The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol*, **12**, 1112-1116.

- Oliveira, S.A., Li, Y.J., Noureddine, M.A., Zuchner, S., Qin, X., Pericak-Vance, M.A. and Vance, J.M. (2005) Identification of risk and age-at-onset genes on chromosome 1p in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, **77**, 252-264.
- Overstreet, E., Fitch, E. and Fischer, J.A. (2004) Fat facets and Liquid facets promote Delta endocytosis and Delta signaling in the signaling cells. *Development*, **131**, 5355-5366.
- Owens-Grillo, J.K., Czar, M.J., Hutchison, K.A., Hoffmann, K., Perdew, G.H. and Pratt, W.B. (1996) A model of protein targeting mediated by immunophilins and other proteins that bind to hsp90 via tetratricopeptide repeat domains. *J Biol Chem*, **271**, 13468-13475.
- Paduch, D.A., Mielnik, A. and Schlegel, P.N. (2005) Novel mutations in testis-specific ubiquitin protease 26 gene may cause male infertility and hypogonadism. *Reprod Biomed Online*, **10**, 747-754.
- Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L. and Maniatis, T. (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell*, **78**, 773-785.
- Panaretou, B., Prodromou, C., Roe, S.M., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Piper, P.W. and Pearl, L.H. (1998) ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *Embo J*, **17**, 4829-4836.
- Panaretou, B., Siligardi, G., Meyer, P., Maloney, A., Sullivan, J.K., Singh, S., Millson, S.H., Clarke, P.A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Cramer, R., Mollapour, M., Workman, P., Piper, P.W., Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2002) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell*, **10**, 1307-1318.
- Papa, F.R. and Hochstrasser, M. (1993) The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human tre-2 oncogene. *Nature*, **366**, 313-319.
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E. and Garrido, C. (2003) Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 505-512.
- Park, S.J., Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2005) Interaction of HSP90 to N-WASP leads to activation and protection from proteasome-dependent degradation. *Embo J*, **24**, 1557-1570.
- Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T.A., Olson, E.N. and Verdin, E. (2005) Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem*, **280**, 13762-13770.
- Patnaik, A., Chau, V. and Wills, J.W. (2000) Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13069-13074.
- Paul, C., Manero, F., Gonin, S., Kretz-Remy, C., Viro, S. and Arrigo, A.P. (2002) Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*, **22**, 816-834.
- Paulding, C.A., Ruvolo, M. and Haber, D.A. (2003) The Tre2 (USP6) oncogene is a hominoid-specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 2507-2511.
- Pearl, L.H. (2005) Hsp90 and Cdc37 -- a chaperone cancer conspiracy. *Curr Opin Genet Dev*, **15**, 55-61.
- Perrod, S., Cockell, M.M., Laroche, T., Renauld, H., Ducrest, A.L., Bonnard, C. and Gasser, S.M. (2001) A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *Embo J*, **20**, 197-209.
- Peters, J.M. (2002) The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*, **9**, 931-943.
- Peters, J.M. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 644-656.
- Peteranderl, R. and Nelson, H.C. (1992) Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry*, **31**, 12272-12276.
- Petrie, K., Guidez, F., Howell, L., Healy, L., Waxman, S., Greaves, M. and Zelent, A. (2003) The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *J Biol Chem*, **278**, 16059-16072.
- Pflum, M.K., Tong, J.K., Lane, W.S. and Schreiber, S.L. (2001) Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem*, **276**, 47733-47741.
- Pickart, C.M. and Rose, I.A. (1986) Mechanism of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. Borohydride and hydroxylamine inactivate in the presence of ubiquitin. *J Biol Chem*, **261**, 10210-10217.
- Pickart, C.M. and VanDemark, A.P. (2000) Opening doors into the proteasome. *Nat Struct Biol*, **7**, 999-1001.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. and Sistonen, L. (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J*, **15**, 1118-1131.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. and Di Fiore, P.P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature*, **416**, 451-455.
- Pornillos, O., Alam, S.L., Rich, R.L., Myszka, D.G., Davis, D.R. and Sundquist, W.I. (2002) Structure and functional interactions of the Tsg101 UEV domain. *Embo J*, **21**, 2397-2406.

- Pratt, W.B., Czar, M.J., Stancato, L.F. and Owens, J.K. (1993) The hsp56 immunophilin component of steroid receptor heterocomplexes: could this be the elusive nuclear localization signal-binding protein? *J Steroid Biochem Mol Biol*, **46**, 269-279.
- Pratt, W.B. and Toft, D.O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 111-133.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Morishima, Y. and Murphy, P.J. (2004) Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem*, **40**, 41-58.
- Prodromou, C., Piper, P.W. and Pearl, L.H. (1996) Expression and crystallization of the yeast Hsp82 chaperone, and preliminary X-ray diffraction studies of the amino-terminal domain. *Proteins*, **25**, 517-522.
- Prodromou, C., Siligardi, G., O'Brien, R., Woolfson, D.N., Regan, L., Panaretou, B., Ladbury, J.E., Piper, P.W. and Pearl, L.H. (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *Embo J*, **18**, 754-762.
- Prodromou, C., Panaretou, B., Chohan, S., Siligardi, G., O'Brien, R., Ladbury, J.E., Roe, S.M., Piper, P.W. and Pearl, L.H. (2000) The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domains. *Embo J*, **19**, 4383-4392.
- Pye, V.E., Dreveny, I., Briggs, L.C., Sands, C., Beuron, F., Zhang, X. and Freemont, P.S. (2006) Going through the motions: the ATPase cycle of p97. *J Struct Biol*, **156**, 12-28.
- Qian, D.Z., Kachhap, S.K., Collis, S.J., Verheul, H.M., Carducci, M.A., Atadja, P. and Pili, R. (2006) Class II Histone Deacetylases Are Associated with VHL-Independent Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1{alpha}. *Cancer Res*, **66**, 8814-8821.
- Radanyi, C., Chambraud, B. and Baulieu, E.E. (1994) The ability of the immunophilin FKBP59-HBI to interact with the 90-kDa heat shock protein is encoded by its tetratricopeptide repeat domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11197-11201.
- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E. and Stenmark, H. (2002) Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol*, **4**, 394-398.
- Rajapandi, T., Greene, L.E. and Eisenberg, E. (2000) The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*, **275**, 22597-22604.
- Ratajczak, T. and Carrello, A. (1996) Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *J Biol Chem*, **271**, 2961-2965.
- Ratajczak, T., Hlaing, J., Brockway, M.J. and Hahnel, R. (1990) Isolation of untransformed bovine estrogen receptor without molybdate stabilization. *J Steroid Biochem*, **35**, 543-553.
- Rechsteiner, M. and Rogers, S.W. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Reiley, W., Zhang, M. and Sun, S.C. (2004) Negative regulation of JNK signaling by the tumor suppressor CYLD. *J Biol Chem*, **279**, 55161-55167.
- Reyes-Turcu, F.E., Horton, J.R., Mullally, J.E., Heroux, A., Cheng, X. and Wilkinson, K.D. (2006) The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin. *Cell*, **124**, 1197-1208.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegel, C. and Jentsch, S. (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, **120**, 73-84.
- Ritchie, K.J., Malakhov, M.P., Hetherington, C.J., Zhou, L., Little, M.T., Malakhova, O.A., Sipe, J.C., Orkin, S.H. and Zhang, D.E. (2002) Dysregulation of protein modification by ISG15 results in brain cell injury. *Genes Dev*, **16**, 2207-2212.
- Ritchie, K.J., Hahn, C.S., Kim, K.I., Yan, M., Rosario, D., Li, L., de la Torre, J.C. and Zhang, D.E. (2004) Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat Med*, **10**, 1374-1378.
- Rock, K.L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D. and Goldberg, A.L. (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, **78**, 761-771.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H. and Goldberg, A.L. (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in Escherichia coli related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5808-5813.
- Romisch, K. (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **21**, 435-456.
- Ross, S., Best, J.L., Zon, L.I. and Gill, G. (2002) SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*, **10**, 831-842.
- Ross, C.A. and Pickart, C.M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*, **14**, 703-711.

- Roth, A.F. and Davis, N.G. (1996) Ubiquitination of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol*, **134**, 661-674.
- Rubin, D.M. and Finley, D. (1995) Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol*, **5**, 854-858.
- Rotin, D., Staub, O. and Haguenauer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol*, **176**, 1-17.
- Rubin, D.M. and Finley, D. (1995) Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol*, **5**, 854-858.
- Rudiger, S., Freund, S.M., Veprintsev, D.B. and Fersht, A.R. (2002) CRINEPT-TROSY NMR reveals p53 core domain bound in an unfolded form to the chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11085-11090.
- Rumpf, S. and Jentsch, S. (2006) Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone. *Mol Cell*, **21**, 261-269.
- Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M. and Grunstein, M. (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14503-14508.
- Russell, N.S. and Wilkinson, K.D. (2004) Identification of a novel 29-linked polyubiquitin binding protein, Ufd3, using polyubiquitin chain analogues. *Biochemistry*, **43**, 4844-4854.
- Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T. and Wada, K. (1999) Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet*, **23**, 47-51.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, **12**, 2831-2841.
- Samali, A. and Orrenius, S. (1998) Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*, **3**, 228-236.
- Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10832-10837.
- Satyal, S.H., Chen, D., Fox, S.G., Kramer, J.M. and Morimoto, R.I. (1998) Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev*, **12**, 1962-1974.
- Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W. and Madura, K. (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature*, **391**, 715-718.
- Scheel, H., Tomiuk, S. and Hofmann, K. (2003) Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet*, **12**, 2845-2852.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. and Howley, P.M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.
- Schoenfeld, A.R., Apgar, S., Dolios, G., Wang, R. and Aaronson, S.A. (2004) BRCA2 is ubiquitinated in vivo and interacts with USP11, a deubiquitinating enzyme that exhibits prosurvival function in the cellular response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, **24**, 7444-7455.
- Schubert, U., Anton, L.C., Gibbs, J., Norbury, C.C., Yewdell, J.W. and Bennink, J.R. (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature*, **404**, 770-774.
- Schuberth, C. and Buchberger, A. (2005) Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol*, **7**, 999-1006.
- Scott, P.M., Bilodeau, P.S., Zhdankina, O., Winistorfer, S.C., Hauglund, M.J., Allaman, M.M., Kearney, W.R., Robertson, A.D., Boman, A.L. and Piper, R.C. (2004) GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*, **6**, 252-259.
- Seibenhener, M.L., Babu, J.R., Geetha, T., Wong, H.C., Krishna, N.R. and Wooten, M.W. (2004) Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*, **24**, 8055-8068.
- Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemerrier, C., Garin, J., Rousseaux, S. and Khochbin, S. (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol*, **21**, 8035-8044.
- Sengupta, N. and Seto, E. (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem*, **93**, 57-67.
- Serrador, J.M., Cabrero, J.R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A. and Sanchez-Madrid, F. (2004) HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*, **20**, 417-428.
- Shaeffer, J.R. and Cohen, R.E. (1997) Ubiquitin aldehyde increases adenosine triphosphate-dependent proteolysis of hemoglobin alpha-subunits in beta-thalassemic hemolysates. *Blood*, **90**, 1300-1308.
- Sherman, J.M., Stone, E.M., Freeman-Cook, L.L., Brachmann, C.B., Boeke, J.D. and Pillus, L. (1999) The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing. *Mol Biol Cell*, **10**, 3045-3059.

- Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, **29**, 15-32.
- Shi, Y., Mosser, D.D. and Morimoto, R.I. (1998) Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*, **12**, 654-666.
- Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Yoshino, K., Takatsu, H., Kobayashi, H., Shin, H.W., Wakatsuki, S. and Nakayama, K. (2004) GAT (GGA and Tom1) domain responsible for ubiquitin binding and ubiquitination. *J Biol Chem*, **279**, 7105-7111.
- Shih, S.C., Katzmann, D.J., Schnell, J.D., Sutanto, M., Emr, S.D. and Hicke, L. (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis. *Nat Cell Biol*, **4**, 389-393.
- Shih, S.C., Prag, G., Francis, S.A., Sutanto, M.A., Hurley, J.H. and Hicke, L. (2003) A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *Embo J*, **22**, 1273-1281.
- Siligardi, G., Panaretou, B., Meyer, P., Singh, S., Woolfson, D.N., Piper, P.W., Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2002) Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J Biol Chem*, **277**, 20151-20159.
- Silverstein, A.M., Galigniana, M.D., Chen, M.S., Owens-Grillo, J.K., Chinkers, M. and Pratt, W.B. (1997) Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor.hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin. *J Biol Chem*, **272**, 16224-16230.
- Simon, M.M., Reikerstorfer, A., Schwarz, A., Krone, C., Luger, T.A., Jaattela, M. and Schwarz, T. (1995) Heat shock protein 70 overexpression affects the response to ultraviolet light in murine fibroblasts. Evidence for increased cell viability and suppression of cytokine release. *J Clin Invest*, **95**, 926-933.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K.G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Wakatsuki, S. and Stenmark, H. (2005) Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem*, **280**, 19600-19606.
- Smith, D.F., Sullivan, W.P., Marion, T.N., Zaitsev, K., Madden, B., McCormick, D.J. and Toft, D.O. (1993) Identification of a 60-kilodalton stress-related protein, p60, which interacts with hsp90 and hsp70. *Mol Cell Biol*, **13**, 869-876.
- Soldano, K.L., Jivan, A., Nicchitta, C.V. and Gewirth, D.T. (2003) Structure of the N-terminal domain of GRP94. Basis for ligand specificity and regulation. *J Biol Chem*, **278**, 48330-48338.
- Somoza, J.R., Skene, R.J., Katz, B.A., Mol, C., Ho, J.D., Jennings, A.J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J.J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E.M., Dougan, D.R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M.W., Swanson, R.V., McRee, D.E. and Tari, L.W. (2004) Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure*, **12**, 1325-1334.
- Soncini, F., Zhang, X., Chu, B., Wang, X., Asea, A., Ann Stevenson, M., Sacks, D.B. and Calderwood, S.K. (2003) Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem Biophys Res Commun*, **303**, 700-706.
- Sorger, P.K. and Pelham, H.R. (1988) Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell*, **54**, 855-864.
- Sorger, P.K. and Nelson, H.C. (1989) Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell*, **59**, 807-813.
- Sparrow, D.B., Miska, E.A., Langley, E., Reynaud-Deonauth, S., Kotecha, S., Towers, N., Spohr, G., Kouzarides, T. and Mohun, T.J. (1999) MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *Embo J*, **18**, 5085-5098.
- Spiro, I.J., Denman, D.L. and Dewey, W.C. (1982) Effect of hyperthermia on CHO DNA polymerases alpha and beta. *Radiat Res*, **89**, 134-149.
- Stancato, L.F., Chow, Y.H., Hutchison, K.A., Perdew, G.H., Jove, R. and Pratt, W.B. (1993) Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem*, **268**, 21711-21716.
- Stewart, G.R. and Young, D.B. (2004) Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. *Curr Opin Immunol*, **16**, 506-510.
- Stock, D., Nederlof, P.M., Seemuller, E., Baumeister, W., Huber, R. and Lowe, J. (1996) Proteasome: from structure to function. *Curr Opin Biotechnol*, **7**, 376-385.
- Storz, G. (1999) An RNA thermometer. *Genes Dev*, **13**, 633-636.
- Stouffs, K., Lissens, W., Tournaye, H., Van Steirteghem, A. and Liebaers, I. (2005) Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *Eur J Hum Genet*, **13**, 336-340.
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M.A., Palu, G. and Gottlinger, H.G. (2000) A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13063-13068.
- Straus, D.B., Walter, W.A. and Gross, C.A. (1987) The heat shock response of E. coli is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature*, **329**, 348-351.

- Straus, D., Walter, W. and Gross, C.A. (1990) DnaK, DnaJ, and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma 32. *Genes Dev*, **4**, 2202-2209.
- Strous, G.J., van Kerkhof, P., Govers, R., Ciechanover, A. and Schwartz, A.L. (1996) The ubiquitin conjugation system is required for ligand-induced endocytosis and degradation of the growth hormone receptor. *Embo J*, **15**, 3806-3812.
- Strous, G.J., van Kerkhof, P., Govers, R., Rotwein, P. and Schwartz, A.L. (1997) Growth hormone-induced signal transduction depends on an intact ubiquitin system. *J Biol Chem*, **272**, 40-43.
- Strudwick, S. and Borden, K.L. (2002) Finding a role for PML in APL pathogenesis: a critical assessment of potential PML activities. *Leukemia*, **16**, 1906-1917.
- Sudakin, V., Ganoth, D., Dahan, A., Heller, H., Hershko, J., Luca, F.C., Ruderman, J.V. and Hershko, A. (1995) The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell*, **6**, 185-197.
- Sullivan, W., Stensgard, B., Caucutt, G., Bartha, B., McMahon, N., Alnemri, E.S., Litwack, G. and Toft, D. (1997) Nucleotides and two functional states of hsp90. *J Biol Chem*, **272**, 8007-8012.
- Takata, T. and Ishikawa, F. (2003) Human Sir2-related protein SIRT1 associates with the bHLH repressors HES1 and HEY2 and is involved in HES1- and HEY2-mediated transcriptional repression. *Biochem Biophys Res Commun*, **301**, 250-257.
- Tanaka, K., Waxman, L. and Goldberg, A.L. (1983) ATP serves two distinct roles in protein degradation in reticulocytes, one requiring and one independent of ubiquitin. *J Cell Biol*, **96**, 1580-1585.
- Tanaka, Y., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R.K., Wanner, T., Tanzi, R.E., Sawa, A., V, L.D., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (2001) Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet*, **10**, 919-926.
- Tanguay, R.M., Wu, Y. and Khandjian, E.W. (1993) Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet*, **14**, 112-118.
- Taniguchi, N., Matsumoto, H. and Deutsch, H.F. (1984) Isolation, characterization, and unique properties of ubiquitin: acetylation, esterase, and CO₂ hydration activity. *Ann N Y Acad Sci*, **429**, 245-247.
- Tanner, K.G., Landry, J., Sternglanz, R. and Denu, J.M. (2000) Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14178-14182.
- Tatham, M.H., Jaffray, E., Vaughan, O.A., Desterro, J.M., Botting, C.H., Naismith, J.H. and Hay, R.T. (2001) Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*, **276**, 35368-35374.
- Taylor, J.P., Hardy, J. and Fischbeck, K.H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, **296**, 1991-1995.
- Tong, J.J., Liu, J., Bertos, N.R. and Yang, X.J. (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1114-1123.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschirritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A. and Mosialos, G. (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature*, **424**, 793-796.
- Uchiyama, K. and Kondo, H. (2005) p97/p47-Mediated biogenesis of Golgi and ER. *J Biochem (Tokyo)*, **137**, 115-119.
- Vaananen, H.K., Zhao, H., Mulari, M. and Halleen, J.M. (2000) The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*, **113 (Pt 3)**, 377-381.
- Valenzuela-Fernandez, A., Alvarez, S., Gordon-Alonso, M., Barrero, M., Ursa, A., Cabrero, J.R., Fernandez, G., Naranjo-Suarez, S., Yanez-Mo, M., Serrador, J.M., Munoz-Fernandez, M.A. and Sanchez-Madrid, F. (2005) Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Mol Biol Cell*, **16**, 5445-5454.
- van Delft, S., Schumacher, C., Hage, W., Verkleij, A.J. and van Bergen en Henegouwen, P.M. (1997) Association and colocalization of Eps15 with adaptor protein-2 and clathrin. *J Cell Biol*, **136**, 811-821.
- Van der Knaap, J.A., Kumar, B.R., Moshkin, Y.M., Langenberg, K., Krijgsveld, J., Heck, A.J., Karch, F. and Verrijzer, C.P. (2005) GMP synthetase stimulates histone H2B deubiquitylation by the epigenetic silencer USP7. *Mol Cell*, **17**, 695-707.
- Van Nocker, S., Deveraux, Q., Rechsteiner, M. and Vierstra, R.D. (1996a) Arabidopsis MBP1 gene encodes a conserved ubiquitin recognition component of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 856-860.
- Van Nocker, S., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickman, M., Fu, H., Coux, O., Wefes, I., Finley, D. and Vierstra, R.D. (1996b) The multiubiquitin-chain-binding protein Mub1 is a component of the 26S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* and plays a nonessential, substrate-specific role in protein turnover. *Mol Cell Biol*, **16**, 6020-6028.

- VanDemark, A.P., Hofmann, R.M., Tsui, C., Pickart, C.M. and Wolberger, C. (2001) Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms2/Ubc13 heterodimer. *Cell*, **105**, 711-720.
- Varshavsky, A. (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, **234**, 179-186.
- Varshavsky, A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12142-12149.
- Varshavsky, A. (1997) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells*, **2**, 13-28.
- Varshavsky, A. (2003) The N-end rule and regulation of apoptosis. *Nat Cell Biol*, **5**, 373-376.
- Vega, R.B., Harrison, B.C., Meadows, E., Roberts, C.R., Papst, P.J., Olson, E.N. and McKinsey, T.A. (2004) Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol*, **24**, 8374-8385.
- Verdel, A. and Khochbin, S. (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem*, **274**, 2440-2445.
- Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M.P., Rousseaux, S., Lemerrier, C., Yoshida, M. and Khochbin, S. (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*, **10**, 747-749.
- Verdin, E., Dequiedt, F. and Kasler, H.G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, **19**, 286-293.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V. and Deshaies, R.J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611-615.
- Versteeg, S., Mogk, A. and Schumann, W. (1999) The Bacillus subtilis htpG gene is not involved in thermal stress management. *Mol Gen Genet*, **261**, 582-588.
- Viatour, P., Dejardin, E., Warnier, M., Lair, F., Claudio, E., Bureau, F., Marine, J.C., Merville, M.P., Maurer, U., Green, D., Piette, J., Siebenlist, U., Bours, V. and Chariot, A. (2004) GSK3-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Mol Cell*, **16**, 35-45.
- Vij, N., Fang, S. and Zeitlin, P.L. (2006) Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications. *J Biol Chem*, **281**, 17369-17378.
- Voellmy, R. (2004) On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones*, **9**, 122-133.
- Wade, P.A. (2001) Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet*, **10**, 693-698.
- Walden, H., Podgorski, M.S., Huang, D.T., Miller, D.W., Howard, R.J., Minor, D.L., Jr., Holton, J.M. and Schulman, B.A. (2003) The structure of the APPBP1-UBA3-NEDD8-ATP complex reveals the basis for selective ubiquitin-like protein activation by an E1. *Mol Cell*, **12**, 1427-1437.
- Walters, K.J., Lech, P.J., Goh, A.M., Wang, Q. and Howley, P.M. (2003) DNA-repair protein hHR23a alters its protein structure upon binding proteasomal subunit S5a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 12694-12699.
- Waltregny, D., Glenisson, W., Tran, S.L., North, B.J., Verdin, E., Colige, A. and Castronovo, V. (2005) Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *Faseb J*, **19**, 966-968.
- Wang, A.H., Bertos, N.R., Vezmar, M., Pelletier, N., Crosato, M., Heng, H.H., Th'ng, J., Han, J. and Yang, X.J. (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol*, **19**, 7816-7827.
- Wang, A.H., Kruhlak, M.J., Wu, J., Bertos, N.R., Vezmar, M., Posner, B.I., Bazett-Jones, D.P. and Yang, X.J. (2000) Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol*, **20**, 6904-6912.
- Wang, A.H. and Yang, X.J. (2001a) Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals. *Mol Cell Biol*, **21**, 5992-6005.
- Wang, L., Nguyen, T.V., McLaughlin, R.W., Sikkink, L.A., Ramirez-Alvarado, M. and Weinshilboum, R.M. (2005) Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9394-9399.
- Wang, P.J., McCarrey, J.R., Yang, F. and Page, D.C. (2001b) An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat Genet*, **27**, 422-426.
- Wang, Y., Satoh, A., Warren, G. and Meyer, H.H. (2004) VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *J Cell Biol*, **164**, 973-978.
- Ward, C.L. and Kopito, R.R. (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem*, **269**, 25710-25718.
- Ward, C.L., Omura, S. and Kopito, R.R. (1995) Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*, **83**, 121-127.

- Watts, G.D., Wymer, J., Kovach, M.J., Mehta, S.G., Mumm, S., Darvish, D., Pestronk, A., Whyte, M.P. and Kimonis, V.E. (2004) Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet*, **36**, 377-381.
- Weihl, C.C., Dalal, S., Pestronk, A. and Hanson, P.I. (2006) Inclusion body myopathy-associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet*, **15**, 189-199.
- Welchman, R.L., Gordon, C. and Mayer, R.J. (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 599-609.
- Wellman, C.L. (2001) Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*, **49**, 245-253.
- Werner, E.D., Brodsky, J.L. and McCracken, A.A. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13797-13801.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhang, Z., Dornan, D., Arnott, D., Deshaies, R.J. and Dixit, V.M. (2004) Human De-ubiquitinase-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science*, **303**, 1371-1374.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., Wu, P., Wiesmann, C., Baker, R., Boone, D.L., Ma, A., Koonin, E.V. and Dixit, V.M. (2004) De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, **430**, 694-699.
- Westendorf, J.J. and Hiebert, S.W. (1999) Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia. *J Cell Biochem*, **Suppl 32-33**, 51-58.
- Westendorf, J.J., Zaidi, S.K., Cascino, J.E., Kahler, R., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Yoshida, M., Stein, G.S. and Li, X. (2002) Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol*, **22**, 7982-7992.
- Westwood, J.T. and Steinhardt, R.A. (1989) Effects of heat and other inducers of the stress response on protein degradation in Chinese hamster and *Drosophila* cells. *J Cell Physiol*, **139**, 196-209.
- Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8324-8328.
- Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. and Israel, A. (1997) I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J*, **16**, 1413-1426.
- Wickner, S., Maurizi, M.R. and Gottesman, S. (1999) Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, **286**, 1888-1893.
- Wicks, S.J., Haros, K., Maillard, M., Song, L., Cohen, R.E., Dijke, P.T. and Chantry, A. (2005) The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling. *Oncogene*, **24**, 8080-8084.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. and Jakob, U. (1992) Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, **358**, 169-170.
- Wiederrecht, G., Seto, D. and Parker, C.S. (1988) Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell*, **54**, 841-853.
- Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L. (1996) The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*, **84**, 769-779.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-438.
- Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C. and Gordon, C. (2001) Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol*, **3**, 939-943.
- Wilkinson, K.D. (1995a) Roles of ubiquitylation in proteolysis and cellular regulation. *Annu Rev Nutr*, **15**, 161-189.
- Wilkinson, K.D., Tashayev, V.L., O'Connor, L.B., Larsen, C.N., Kasperk, E. and Pickart, C.M. (1995b) Metabolism of the polyubiquitin degradation signal: structure, mechanism, and role of isopeptidase T. *Biochemistry*, **34**, 14535-14546.
- Wilkinson, K.D., Ventii, K.H., Friedrich, K.L. and Mullally, J.E. (2005) The ubiquitin signal: assembly, recognition and termination. Symposium on ubiquitin and signaling. *EMBO Rep*, **6**, 815-820.
- Wilson, S.M., Bhattacharyya, B., Rachel, R.A., Coppola, V., Tessarollo, L., Householder, D.B., Fletcher, C.F., Miller, R.J., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (2002) Synaptic defects in ataxia mice result from a mutation in Usp14, encoding a ubiquitin-specific protease. *Nat Genet*, **32**, 420-425.
- Wojcik, C., Yano, M. and DeMartino, G.N. (2004) RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci*, **117**, 281-292.

- Wojcik, C., Rowicka, M., Kudlicki, A., Nowis, D., McConnell, E., Kujawa, M. and Demartino, G.N. (2006) Valosin-containing Protein (p97) Is a Regulator of ER Stress and of the Degradation of N-End Rule and Ubiquitin-Fusion Degradation Pathway Substrates in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell*.
- Won, K.A. and Reed, S.I. (1996) Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J*, **15**, 4182-4193.
- Woodman, P.G. (2003) p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci*, **116**, 4283-4290.
- Wu, X., Yen, L., Irwin, L., Sweeney, C. and Carraway, K.L., 3rd. (2004) Stabilization of the E3 ubiquitin ligase Nrdp1 by the deubiquitinating enzyme USP8. *Mol Cell Biol*, **24**, 7748-7757.
- Xavier, I.J., Mercier, P.A., McLoughlin, C.M., Ali, A., Woodgett, J.R. and Ovsenek, N. (2000) Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem*, **275**, 29147-29152.
- Xia, W. and Voellmy, R. (1997) Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active factor trimers. *J Biol Chem*, **272**, 4094-4102.
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A. and Benjamin, I.J. (1999) HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *Embo J*, **18**, 5943-5952.
- Yaglom, J., Linskens, M.H., Sadis, S., Rubin, D.M., Futcher, B. and Finley, D. (1995) p34Cdc28-mediated control of Cln3 cyclin degradation. *Mol Cell Biol*, **15**, 731-741.
- Yamakami, M., Yoshimori, T. and Yokosawa, H. (2003) Tom1, a VHS domain-containing protein, interacts with tollip, ubiquitin, and clathrin. *J Biol Chem*, **278**, 52865-52872.
- Yang, W.M., Tsai, S.C., Wen, Y.D., Fejer, G. and Seto, E. (2002) Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem*, **277**, 9447-9454.
- Yang, R.C., Jao, H.C., Huang, L.J., Wang, S.J. and Hsu, C. (2004) The essential role of PKCalpha in the protective effect of heat-shock pretreatment on TNFalpha-induced apoptosis in hepatic epithelial cell line. *Exp Cell Res*, **296**, 276-284.
- Yao, T. and Cohen, R.E. (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **419**, 403-407.
- Ye, Y., Meyer, H.H. and Rapoport, T.A. (2003) Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol*, **162**, 71-84.
- Ye, Y., Shibata, Y., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E. and Rapoport, T.A. (2005) Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 14132-14138.
- Yoshida, Y., Adachi, E., Fukiya, K., Iwai, K. and Tanaka, K. (2005) Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. *EMBO Rep*, **6**, 239-244.
- Yoshida, M., Furumai, R., Nishiyama, M., Komatsu, Y., Nishino, N. and Horinouchi, S. (2001) Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, **48 Suppl 1**, S20-26.
- You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M. and Schreiber, S.L. (2001) CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1454-1458.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J. and Hartl, F.U. (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell*, **112**, 41-50.
- Young, J.C., Obermann, W.M. and Hartl, F.U. (1998) Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem*, **273**, 18007-18010.
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R.E., Pickart, C.M. and Rechsteiner, M. (1998) Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J Biol Chem*, **273**, 5461-5467.
- Yura, T., Nagai, H. and Mori, H. (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **47**, 321-350.
- Zaidi, S.K., Javed, A., Choi, J.Y., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B. and Stein, G.S. (2001) A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J Cell Sci*, **114**, 3093-3102.
- Zeremski, M., Stricker, J.R., Fischer, D., Zusman, S.B. and Cohen, D. (2003) Histone deacetylase dHDAC4 is involved in segmentation of the Drosophila embryo and is regulated by gap and pair-rule genes. *Genesis*, **35**, 31-38.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A., Lu, J.R. and Olson, E.N. (2001a) Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor. *J Biol Chem*, **276**, 35-39.
- Zhang, C.L., McKinsey, T.A. and Olson, E.N. (2001b) The transcriptional corepressor MITR is a signal-responsive inhibitor of myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7354-7359.

- Zhang, C.L., McKinsey, T.A. and Olson, E.N. (2002) Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol*, **22**, 7302-7312.
- Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A. and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*, **13**, 1924-1935.
- Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S. and Matthias, P. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J*, **22**, 1168-1179.
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. and Iwase, H. (2004) HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 6962-6968.
- Zhao, K., Harshaw, R., Chai, X. and Marmorstein, R. (2004) Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 8563-8568.
- Zhao, Q., Boschelli, F., Caplan, A.J. and Arndt, K.T. (2004) Identification of a conserved sequence motif that promotes Cdc37 and cyclin D1 binding to Cdk4. *J Biol Chem*, **279**, 12560-12564.
- Zhao, X., Ito, A., Kane, C.D., Liao, T.S., Bolger, T.A., Lemrow, S.M., Means, A.R. and Yao, T.P. (2001) The modular nature of histone deacetylase HDAC4 confers phosphorylation-dependent intracellular trafficking. *J Biol Chem*, **276**, 35042-35048.
- Zhou, X., Richon, V.M., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. (2000a) Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1056-1061.
- Zhou, X., Richon, V.M., Wang, A.H., Yang, X.J., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. (2000b) Histone deacetylase 4 associates with extracellular signal-regulated kinases 1 and 2, and its cellular localization is regulated by oncogenic Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 14329-14333.
- Zhu, Y., Carroll, M., Papa, F.R., Hochstrasser, M. and D'Andrea, A.D. (1996) DUB-1, a deubiquitinating enzyme with growth-suppressing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3275-3279.
- Zhu, Y., Lambert, K., Corless, C., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. and D'Andrea, A.D. (1997) DUB-2 is a member of a novel family of cytokine-inducible deubiquitinating enzymes. *J Biol Chem*, **272**, 51-57.
- Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F. and Voellmy, R. (1998) Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, **94**, 471-480.
- Zuo, J., Rungger, D. and Voellmy, R. (1995) Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol*, **15**, 4319-4330.
- Zwickl, P. (2002) The 20S proteasome. *Curr Top Microbiol Immunol*, **268**, 23-41.

ABSTRACT

At the start of my Ph.D., the lab had discovered and characterized HDAC6, an unusual deacetylase that possesses two deacetylase domains and directly binds to ubiquitin. Moreover, the lab had found that HDAC6 interacts with UFD3/PLAP, a regulator of ubiquitin turnover, and VCP, a mouse homologue of the chaperone Cdc48. However, nothing was known about HDAC6 biological function, especially its role in the ubiquitination pathway.

We first observed that HDAC6 over-expression slows down the degradation of poly-ubiquitinated protein, via ZnF-UBP, its ubiquitin binding domain. Through a series of experiments, we have shown that, actually, HDAC6-VCP complex directly regulates the level of poly-ubiquitinated proteins.

We then discovered that HDAC6 controls the cellular response triggered by the accumulation of poly-ubiquitinated proteins, and have unraveled mechanisms involved in this control. The accumulation of poly-ubiquitinated proteins could be toxic for cells if no cellular response is engaged. Moreover, it has been well-known for about ten years that such accumulation activates the transcription factor Heat Shock Factor 1 (HSF1) to promote cellular survival. We found that, in the absence of stress, HDAC6 and HSF1 are in a complex with VCP and HSP90. However, when the pool of poly-ubiquitinated proteins increases, such as during heat shock, HDAC6 is released from the complex in a ubiquitin and ZnF-UBP dependent manner. Such a release then enables VCP to activate HSF1.

In conclusion, we propose that HDAC6-p97/VCP complex appears as a master regulator during both poly-ubiquitinated protein management and cellular stress response engagement.

Keywords : acetylation, ubiquitination, proteasome, cellular stress, Histone Deacetylase, HDAC6, ZnF-UBP, p97/VCP, HSF1.

RESUME

Avant le début de ma thèse, le laboratoire avait découvert et caractérisé HDAC6, une Histone Déacétylase atypique qui possède deux domaines déacétylases et peut interagir directement avec l'ubiquitine, grâce à son domaine ZnF-UBP. De plus, le laboratoire avait montré que HDAC6 interagit avec UFD3/PLAP, un régulateur du recyclage de l'ubiquitine, et p97/VCP, un orthologue murin de la chaperonne de levure Cdc48p. Cependant, aucune fonction biologique dans la voie d'ubiquitination des protéines n'était connue pour HDAC6.

Nous avons tout d'abord observé que la surexpression de HDAC6 ralentit la dégradation des protéines poly-ubiquitinées, via son ZnF-UBP, son domaine de liaison à l'ubiquitine. Grâce à une série d'expériences, nous avons pu montrer que les complexes HDAC6-p97/VCP régulent directement la stabilité des protéines poly-ubiquitinées.

L'accumulation intracellulaire de protéines poly-ubiquitinées peut être toxique pour les cellules si aucune réponse cellulaire n'est engagée. En réalité, une telle accumulation active le facteur de transcription Heat Shock Factor 1 (HSF1) afin de promouvoir la survie de la cellule. Grâce à ces considérations, nous avons découvert que HDAC6 contrôle la réponse cellulaire à l'accumulation de protéines poly-ubiquitinées et avons disséqué les mécanismes impliqués dans ce contrôle. Nous avons trouvé qu'en l'absence de stress, HDAC6 et HSF1 sont en complexes avec p97/VCP et HSP90. Cependant, lorsque la concentration intracellulaire en protéines poly-ubiquitinées augmente, comme lors d'une inhibition du protéasome, HDAC6 est re-larguée du complexe de manière ubiquitine et ZnF-UBP dépendante. Un tel re-largage permet ensuite à p97/VCP d'activer HSF1 et d'engager la cellule dans la réponse au stress.

Mots clefs : acétylation, ubiquitination, protéasome, stress cellulaire, Histone Déacétylase, HDAC6, ZnF-UBP, p97/VCP, HSF1.