

ETUDE DE LA DEACETYLASE HDAC6 : UNE ENZYME MULTIFONCTIONNELLE

Benoit Gilquin

▶ **To cite this version:**

Benoit Gilquin. ETUDE DE LA DEACETYLASE HDAC6 : UNE ENZYME MULTIFONCTIONNELLE. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT : . tel-00011701

HAL Id: tel-00011701

https://theses.hal.science/tel-00011701

Submitted on 1 Mar 2006

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.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Chimie et Sciences du Vivant

(Arrêté ministériel du 25 avril 2002)

THESE

Pour obtenir le titre de :

Docteur de l'Université Joseph Fourier

Discipline : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par :

Benoît GILQUIN

Le 16 décembre 2005

ETUDE DE LA DEACETYLASE HDAC6 : UNE ENZYME MULTIFONCTIONNELLE

Sous la direction de Saadi KHOCHBIN

COMPOSITION DU JURY :

Présidente	Pr. Claire VOURC'H
Rapporteurs	Dr. Carmen GARRIDO Pr. Germain GILLET
Examinateur	Dr. Saadi KHOCHBIN

Thèse préparée au laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation,
Unité INSERM U309
Institut Albert Bonniot
Rond point de la chantourne 38706 La TRONCHE cedex

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

A mes grands Parents

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Saadi Khochbin de m'avoir guidé, encouragé, conseillé tout au long de cette thèse. Ton expertise incomparable et ton entière disponibilité ont été pour moi un modèle et un exemple à suivre. Merci Saadi…

Je remercie également mes rapporteurs Carmen Garrido et Germain Gillet, ainsi que Claire Vourc'h pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail.

Je voudrais également remercier les associations "la ligue contre le cancer, comité de l'Isère" et "l'ARC" pour avoir soutenu ce projet de recherche, et plus particulièrement les donateurs de ces associations qui ont participé à son financement.

Bien sûr, comment pourrais-je oublier l'environnement de travail…
Un grand merci à Sandrine pour tes conseils, ton sourire et ton support technique tout au long de ces années de thèse. Tu es une des Personnalités (avec un grand P) de ce laboratoire et je te dois beaucoup.
Les croqueurs de poussins : Jérôme, Cyril, Edwige et Cécile pour l'ensemble des échanges, discussions scientifiques et points de vue que l'on a abordés. J'ai pu m'ouvrir à des coutumes bien "particulières" venues du Doubs et de la Savoie et c'est vrai, je l'admet, vous avez de bons fromages… j'ai vraiment apprécié cette ambiance de travail, enrichissante et stimulante.

Le labo c'est aussi Sophie et Cécile, toujours à l'écoute et conseillère dans les manips.
Sans oublier l'ensemble des personnes de l'institut, Flore, Marlène, Emmanuelle, Sabrina, Angeline, Anne Karen, Gaël, Eric, Yannick, Nicolas, Laetitia et Julien pour les Djeun's ; et Sylvie, Caroline, Claire, Karin, Michel, Alain et les deux Stéphans pour les un peu moins Djeun's… Sans oublier les anciens : Yann, Laetitia, Lionel, Leïla, David, Christophe, Nicolas, et Henri Noël. Vous avez tous été là en différents moments et pour les bons conseils et je vous en suis très reconnaissant.
Une pensée pour Aude et Michèle, merci pour votre accueil et votre aide pour tout ce qui est administratif.

Un grand, un très grand merci à tous mes amis (Et oui…) : Gilles, Alex et Thierry, Armelle et JB, Anne et Emmanuel sans oublier Gwladys et Mike. Je suis fier de vous avoir à mes cotés…

J'ai certainement un mot particulier pour les membres de ma famille. Mes parents, Brigitte et François, mes frères Patrick, Hervé, Damien et ma sœur Zazou, ainsi que mes belles-sœurs adorées Claudine et Carole. Vous m'avez sans cesse soutenu et encouragé durant ces longues, longues études…
Ma famille c'est aussi Patricia et Denis. Votre aide et votre appui m'ont été d'un grand recours, vous prenez de plus en plus une place importante dans mon cœur.
Une petite gratouille pour Mimi car il m'a aidé à retirer la poussière de l'écran de mon ordinateur pendant toute ma rédaction…

Pour finir, mes pensées convergent vers mon amour.
Anne-Laure, ta présence et ta patience m'ont permis de réaliser ces études dans une ambiance sereine. Tu as contribué d'une certaine manière à la réalisation de ce travail. C'est tous les jours un bonheur d'être avec toi, je t'aime tant.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Sommaire

LISTE DES ILLUSTRATIONS ..... **- 3 -**

LISTE DES ABREVIATIONS ..... **- 5 -**

INTRODUCTION GENERALE ..... **- 7 -**

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES ..... **- 8 -**

LES HISTONES DEACETYLASES ..... **- 12 -**

LES DIFFERENTES CLASSES HDACS ..... **- 12 -**
Mécanisme de déacétylation des HDACs de classes I et II. ..... - 14 -
ORGANISATION DES HDACS DE CLASSE I ..... **- 16 -**
HDAC1 et 2 ..... - 16 -
HDAC3 ..... - 19 -
HDAC8 ..... - 19 -
Cas particulier d'HDAC11 ..... - 20 -
ORGANISATION DES HDACS DE CLASSE II ..... **- 22 -**
FONCTIONS ET REGULATIONS DES HDACS DE LA CLASSE IIA ..... **- 24 -**
Fonctions de la classe IIa des HDACs ..... - 24 -
Régulations de la classe IIa des HDACs ..... - 30 -
FONCTIONS ET REGULATIONS DES HDACS DE LA CLASSE IIB ..... **- 34 -**
Description générale d'HDAC6 ..... - 34 -
HDAC6 et navette nucléocytoplasmique ..... - 35 -
Les substrats d'HDAC6 ..... - 37 -
Prise en charge des protéines ubiquitinées par HDAC6 ..... - 45 -
HDAC6 et Cancer ..... - 51 -
HDAC10 ..... - 52 -
ORGANISATION DES HDACS DE CLASSE III ..... **- 53 -**
Mécanisme de déacétylation des HDACs de classe III ..... - 53 -
Caractéristiques structurales. ..... - 54 -
Fonction et régulation des Sirtuines ..... - 56 -
Les Sirtuines humaines ..... - 57 -
LES INHIBITEURS DES HISTONES DEACETYLASES ET DROGUES ANTICANCEREUSES ..... **- 62 -**
Inhibiteurs de la classe I et II des déacétylases ..... - 62 -
Inhibiteurs de la classe III des déacétylases ..... - 64 -

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Sommaire

Mécanisme d'action des inhibiteurs d'HDACs - 64 -
Inhibiteurs d'HDACs en combinaison avec d'autres agents - 65 -

LES PROTEINES DU CHOC THERMIQUE - 67 -

VUE GENERALE - 67 -
LE CHOC THERMIQUE ET SES EFFETS - 69 -
LES PRINCIPALES PROTEINES DU CHOC THERMIQUE - 71 -
HSP90 - 71 -
HSP70 - 72 -
HSP60 - 73 -
Hsp27 - 74 -
MECANISME D'ACTIVATION DES HSPS - 77 -
Régulation de l'expression des gènes HSPs chez les procaryotes - 77 -
Régulation de l'expression des gènes HSPs chez les Eucaryotes - 79 -
Modèle d'activation des gènes HSPs par HSF1 - 80 -
Régulation du mécanisme d'activation - 82 -

OBJECTIF ET PLAN DE TRAVAIL - 86 -

RESULTATS - 87 -

ARTICLE 1 : HDAC6 ET ACTIVATION DES HSPS - 87 -
Discussion et commentaires de l'article 1 - 101 -
ARTICLE 2 : REGULATION SUBCELLULAIRE DE HHDAC6 - 105 -
ARTICLE 3 : LES DEUX DOMAINES CATALYTIQUES D'HDAC6 SONT REQUIS DANS L'ACTIVITE DEACETYLASE - 115 -
ARTICLE 4 : HDAC6 ET LA DIFFERENCIATION OSTEOCLASTIQUE - 127 -

DISCUSSION GENERALE - 139 -

CONCLUSION GENERALE - 151 -

ANNEXE - 153 -

BIBLIOGRAPHIE - 160 -

Liste des illustrations

- FIGURES

Fig.1 : Les états condensés de la chromatine ..... - 8 -
Fig.2 : Activité antagoniste des HATs et des HDACs ..... - 10 -
Fig.3 : Arbre phylogénétique d'HDAC1 à HDAC11. ..... - 13 -
Fig.4 : Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDACs de classe I et II ..... - 14 -
Fig.5 : Inhibition du site actif des HDACs par SAHA (Finnin et al, 1999)..... - 15 -
Fig.6 : représentation schématique des HDACs de classe I, leur expression transitoire et leurs effets sur la tubuline acétylée dans des NIH 3T3 (tiré de Matsuyama et al, 2002)..... - 16 -
Fig.7 : représentation schématique des complexes protéiques avec HDAC1 et 2 ..... - 17 -
Fig.8 : Comparaison d'HDAC11 avec les autres classes d'HDACs ..... - 21 -
Fig.9 : Représentation schématique des HDACs de classe IIa, leur expression transitoire et leurs effets sur la tubuline acétylée dans des NIH 3T3 (tiré de Matsuyama et al, 2002).... - 23 -
Fig.10 : Régulation subcellulaire d'HDAC4 ..... - 31 -
Fig.11 : Représentation schématique des HDACs de classe IIb, leur expression transitoire et leurs effets sur la tubuline acétylée dans des NIH 3T3 (tiré de Matsuyama et al, 2002).... - 34 -
Fig.12 : Comparaison de la structure primaire entre hHDAC6 et mHDAC6 ..... - 36 -
Fig.13 : Dynamique interne des podosomes ..... - 39 -
Fig.14 : Processus d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome..... - 46 -
Fig.15 : Comparaison de séquences du domaine Znf-UBP de mHDAC6 avec des protéases de l'ubiquitine (USPs) ..... - 47 -
Fig.16 : Comparaison d'HDAC6 entre différentes espèces..... - 48 -
Fig.17 : Représentation schématique des HDACs de classe III (Michishita et al., 2005) .. - 53 -
Fig.18 : Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDACs de classe III (Avalos et al., 2005)..... - 54 -
Fig.19 : Comparaison d'HDAC10 avec les autres classes d'HDACs ..... - 63 -
Fig.20 : Tests cliniques des inhibiteurs d'HDACs..... - 64 -
Fig.21 : Représentation schématique d'HSP90 ..... - 71 -
Fig.22 : Représentation schématique d'HSP70 ..... - 72 -
Fig.23 : Représentation schématique d'HSP60 ..... - 73 -

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Liste des illustrations

Fig.24 : Représentation schématique d'HSP27 ..... - 75 -
Fig.25 : Régulation des gènes HSPs chez les procaryotes ..... - 78 -
Fig.26 : Représentation schématique d'HSF1 ..... - 79 -
Fig.27 : Régulation et mécanisme d'activation des gènes HSPs chez les eucaryotes ..... - 82 -
Fig.27 : Participation d'HDAC6 dans la régulation de l'activation des gènes HSPs..... - 102 -

- TABLES

Table 1 : Les principales histones acétyltransférases (Johnstone, 2002)…….- 11 -
Table 2 : Complexes protéiques formés avec HDAC1, 2 et 3…….- 18 -
Table 3 : Partenaires de la classe IIa des HDACs (Yang et Grégoire, 2005)……...- 25 -
Table 4 : Informations diverses sur les Sirtuines humaines …….- 57 -
Table 5 : Principales protéines du choc thermique……...- 68 -

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Liste des Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine tri phosphate

BAZF : BCL-6 associated zinc finger protein

BCL6 : B cell lymphoma 6

BCoR : BCL6 interacting corepresor

BRAP2 : BRCA1-associated protein 2

CaMK : Calmodulin-dependent kinase

CamKII : Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II

CBP/P300 : CREB binding protein/P300

CK2 : Casein kinase 2

CPA : Cellules présentatrices d'antigènes

CtBP : E1A C-terminal binding protein

CtIP : CtBP interacting protein

DAD : Deacetylase Activating Domain

ERK1 : Extracellular signal-Regulated Kinase1

FAT : Factor AcetylTransferase

FOG : Friend of GATA-1

GCN5 : General control of amino acid synthesis

GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

HAT : Histone acétyltransférase

HDAC : Histone déacétylase

HIF1α : Hypoxia-inducible factor 1α

HMT : Histones méthyltransférases

HSE : Heat Shock Element

HSF : Heat Shock Factor

HSP : Heat Shock Protein

HSPB1 : Heat shock factor binding protein 1

HTLV : Human T-cell leukemia virus type 1

LCoR : Ligand-dependent corepressor

LMB : Leptomycine B

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Liste des Abréviations

MEF2 : Myocyte Enhancer Factor2
MITR : MEF2-interacting transcription repressor
MMP : Mitochondrial-matrix processing peptidase
MORF : Monocytic leukemia zinc finger related factor
MOZ : Monocytic leukaemia zinc finger protein
MRJ : Mammalian relative of DnaJ
NAD : Nicotine adénine dinucléotide
NAT : N-acétyltransférases
NES : Nuclear Export Signal
NLS : Nuclear Localisation Signal
NuRD : Nucleosome Remodeling and Deacetylating
p/CAF : p300/CBP associated factor
PKCα : Protein Kinase C alpha
PKD1 : Protein kinase D1
PLAP : Phospholipase activating protein
PML : Corps leucémiques promyélocytaires
POD : PML oncogenic domains
POZ : Poxvirus and zinc finger
PP1 : Protein phosphatase type 1
PP5 : Protein phosphatase type 5
RPD3 : Reduced potassium dependency 3
SAHA : suberoylanilide hydroxamic acid
SIR2 : Silent information regulator 2
SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier
TCF : T cell factor
Tip60 : Tat interacting protein 60
TPR : Tetratricopeptide repeat
TSA : Trichostatin A
UFD : Ubiquitin fusion degradation
USP : Ubiquitin Specifique Protease
VCP : Valosin containing protein
Znf-UBP : Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-like zinc finger

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Introduction générale

Les modifications post-transcriptionnelles des histones de la chromatine ont un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes. Les enzymes impliquées dans ces évènements épigénétiques sont multiples.
Parmi elles, les histones déacétylases (HDACs) capables de retirer un groupement acétyl d'un résidu lysine acétylé d'une protéine histone ou non histone. Les protéines HDACs sont des régulateurs critiques d'événements cellulaires fondamentaux comme le cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose. Leur dérégulation est impliquée dans la tumorigénèse.

HDAC6 appartient à la classe IIb des histones déacétylases. C'est une enzyme multifonctionnelle particulière à deux domaines déacétylases et un domaine en doigt de zinc, capable de fixer l'ubiquitine. Cette protéine a plusieurs substrats identifiés dont la tubuline et HSP90 et joue un rôle dans la prise en charge des protéines polyubiquitinées lors de la formation des agrésomes.

Après une recherche bibliographique pour comprendre le contexte scientifique, quatre aspects de la déacétylase HDAC6 vont être étudiés.
Dans une première partie et grâce à l'utilisation de cellules KO et rétablies pour HDAC6, nous allons démontrer la participation de cette enzyme dans l'expression d'HSP25 après un stress thermique. Nous aborderons le mécanisme mis en jeu et évaluerons le rôle d'une HDAC dans la récupération cellulaire sous des conditions d'hyperthermie.
La deuxième partie portera sur la régulation nucléocytoplasmique d'HDAC6 humaine grâce à la découverte d'un domaine spécifique nommé SE14 ; domaine suffisant pour sa localisation subcellulaire.
Dans une troisième partie, nous démontrerons l'importance de la présence simultanée des deux domaines déacétylases chez HDAC6. Nous décortiquerons la réaction de déacétylation grâce à l'utilisation de mutants dans des expériences *in vitro* et *in vivo*.
Finalement, nous étudierons la participation de cette protéine dans la mise en place d'un système cellulaire particulier : lors de la différenciation ostéoclastique.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Recherches Bibliographiques

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. Cette structure est ensuite régulièrement répétée pour former le nucléofilament qui peut, lui aussi, adopter des niveaux d'organisation plus compacts jusqu'au niveau de condensation le plus élevé : celui du chromosome métaphasique.

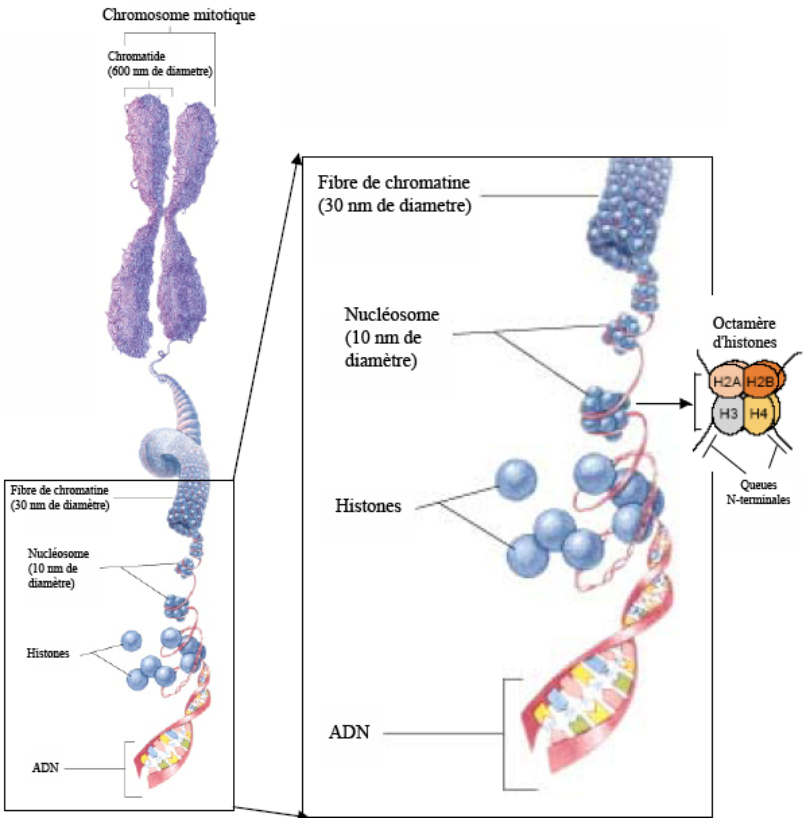


Fig.1 : Les états condensés de la chromatine

Ces états de chromatine ne servent pas seulement d'éléments structuraux essentiels pour préserver l'information génétique mais jouent également un rôle actif pour gouverner l'accessibilité des séquences d'ADN aux facteurs de transcription et à toute sa machinerie.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

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

Les modifications covalentes sur la chromatine peuvent avoir lieu sur l'ADN ou sur les histones. Bien que l'ADN ne soit essentiellement modifié par méthylation de la cytosine, les histones, eux, sont des cibles pour l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation, l'ubiquitination et l'ADP-ribosylation (Berger, 2001; Cosgrove et al., 2004). Ce type de modifications covalentes des histones a été pour la première fois décrite il y a plus de 40 ans (Allfrey et al., 1964) et fait l'objet, à l'heure actuelle, d'une recherche encore active.

Beaucoup d'études récentes dans le champ de la chromatine se sont focalisées sur ces modifications post traductionnelles des queues N-terminales flexibles des histones. En effet, l'observation des états distincts des chromosomes semble hautement corrélée à ces modifications post traductionnelles. Par exemple, une hyperacétylation de la queue des histones et une méthylation sur la lysine 4 de l'histone H3 est associée avec une chromatine transcriptionnellement active (euchromatine), alors qu'une hypoacétylation et la méthylation de la lysine 9 de H3 est associée avec l'hétérochromatine, transcriptionnellement inactive (Noma et al., 2001). Ces observations ont amené à élaborer l'hypothèse du code histone. Ce code décrit des modifications sur les queues N-terminales des histones qui altèrent la structure de la chromatine soit directement, par l'influence des interactions histone-ADN ou histone-histone, soit indirectement à travers le recrutement de protéines qui reconnaissent les marques chimiques sur les queues des histones (Cosgrove et al., 2004; Kouzarides, 2002; Strahl and Allis, 2000)

Parmi les modifications post-traductionnelles, l'acétylation est une marque chimique importante dans la cellule.
L'état d'acétylation des queues des histones est contrôlé par une action antagoniste de deux familles d'enzymes : les histones acétyltransférases (HATs), qui transfèrent un groupe acétyl de l'acétyl co-enzymeA (coA) sur le groupe ε-amine d'un résidu lysine spécifique ; et les histones déacétylases (HDACs) qui catalysent l'hydrolyse de cet acétamide (Fig.2).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

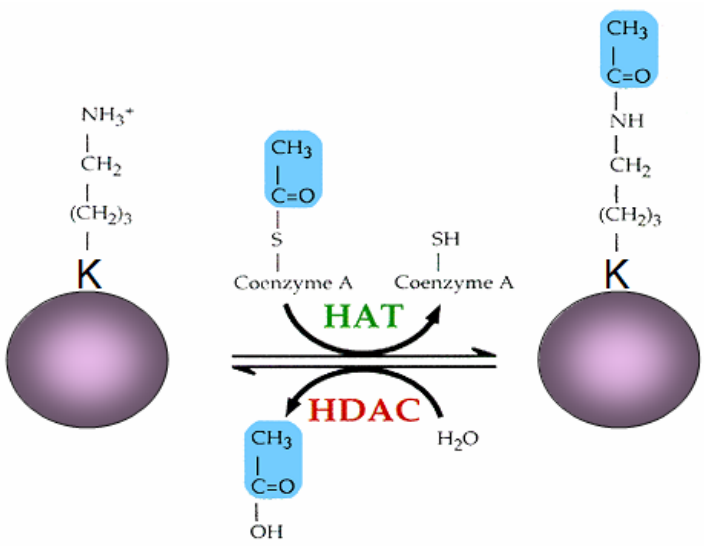


Fig.2 : Activité antagoniste des HATs et des HDACs

Des résidus lysines spécifiques sur la surface des protéines autres que les histones sont aussi sujets à l'acétylation, et à un nombre variable de modifications comme la méthylation, l'ubiquitination ou la sumoylation. Chacune de ces modifications permettent de moduler la fonction, la localisation et le taux de ces protéines dans la cellule.

Les histones acétyltransférases

Les HATs sont généralement des protéines de haut poids moléculaire et des co-activateurs transcriptionnels agissant dans le noyau ou dans le cytoplasme de la cellule.
La première histone acétyltransférase clonée fut HAT1, une acétyltransférase de levure de la famille GNAT, initialement identifiée sur des mutants sensibles à la chaleur et n'ayant plus la capacité d'acétyler des résidus spécifiques d'un peptide de l'histone H4 (Chang et al., 1997; Kleff et al., 1995; Parthun et al., 1996).

S'en suit la découverte d'un orthologue chez *Tetrahymena* de GCN5 de levure (pour General control of amino acid synthesis) qui présente une remarquable activité enzymatique d'histone acétyltransférase (Brownell et al., 1996). GCN5 est connue pour être la sous unité catalytique de deux complexes co-activateurs chez la levure : ADA (Ada2- Ada3- GCN5) et SAGA (SPT-ADA-GCN5-acétyltransférase) (Grant et al., 1997) et d'un complexe homologue de SAGA chez l'homme : le complexe STAGA (SPT3- TAFII31-GCN5-acétyltransférase) (Martinez et al., 1998).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Un nombre important d'enzymes ayant une activité histone acétyltransférase ont été identifiés par la suite chez l'homme :

- comme CBP/P300 (pour CREB binding protein/P300) (Ogryzko et al., 1996),
- comme l'enzyme p/CAF (pour p300/CBP associated factor) (Yang et al., 1996),
- la famille MYST – incluant les protéines humaines MOZ (pour monocytic leukaemia zinc finger protein), MORF (pour monocytic leukemia zinc finger related factor) et Tip60 (pour Tat interacting protein 60) (Champagne et al., 1999; Hilfiker et al., 1997; Kamine et al., 1996; Smith et al., 1998),
- hTFIIIC90 (Hsieh et al., 1999) et TAFII250 (Mizzen et al., 1996).

On notera qu'un grand nombre de HATs ne sont pas uniquement présentes pour acétyler les histones et jouer un rôle direct dans l'expression des gènes. En effet, ces enzymes peuvent avoir une action sur d'autres protéines substrats différentes des histones : elles sont nommées les FATs (pour Factor AcetylTransferase) (Freiman and Tjian, 2003; Sterner and Berger, 2000) (Table1).

Il existe aussi la N-acétylation de l'acide aminé méthionine. Cette acétylation, différente de l'addition du groupement acétyl en position ε-amino sur la lysine, est assurée par un autre type d'enzyme : les N-acétyltransférases (NAT). Cette modification est irréversible et est associée à plusieurs fonctions cellulaires (Polevoda and Sherman, 2003)

Histone acétyltransférase	Histones	Facteurs
Famille GNAT		
HAT1	H4	C-MYB
GCN5	H3, H4	
PCAF	H3, H4	HMG17, P53, MYOD, E2F, TFIIE, TFIIF
P300/CBP		
P300/CBP	H2A, H2B, H3, H4	HMG1, P53, c-MYB, NFκB, GATA1, EKLF, TFIIE, TFIIF, SP1, AML1
Famille MYST		
MOZ	H3	AML1
MORF	H2A, H3, H4	
TIP60	H2A, H3, H4	
Récepteurs nucléaires et co-Activateurs		
ACTR	H3, H4	
TFIIIC90	H3, H4	
TAFII250	H3, H4	TFIIE

Table 1 : Les principales histones acétyltransférases (Johnstone, 2002)

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Les histones déacétylases

Le signal spécifique d'acétylation est réversible par une machinerie contenant des HDACs, également connues comme des régulateurs transcriptionnels liés à la protéine de levure RPD3 (Rundlett et al., 1996), Hda1 (Rundlett et al., 1996) et Sir2 (Imai et al., 2000).

Les différentes classes HDACs

HDAC1 a été la première déacétylase identifiée et isolée par affinité pour la trapoxine, un inhibiteur spécifique des HDACs (Taunton et al., 1996). L'analyse de la séquence d'HDAC1 a révélée qu'elle était l'homologue humain de la protéine de levure RPD3 (pour reduced potassium dependency 3).

Plus tard, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 furent découvertes avec un domaine catalytique homologue à HDAC1 et RPD3 (Khochbin et al., 2001). Différentes protéines ont ensuite été montrées comme possédant une activité déacétylase (Blander and Guarente, 2004; Cress and Seto, 2000; Grozinger and Schreiber, 2002; Khochbin et al., 2001; Verdin et al., 2003).

A l'heure actuelle, à la suite d'analyses phylogénétiques basées sur l'étude de leur homologie de séquences, il a été défini que les HDACs formaient une famille de 3 classes (Gregoretti et al., 2004; Grozinger and Schreiber, 2002; Khochbin et al., 2001; Verdin et al., 2003; Yang and Gregoire, 2005) avec des homologies retrouvées sur la protéine de levure Rpd3, sur Hda1 et sur Sir2 (pour silent information regulator 2).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

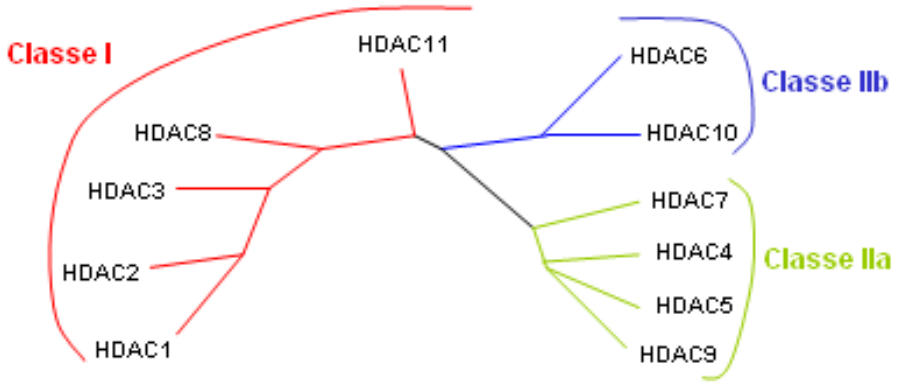


Fig.3 : Arbre phylogénétique d'HDAC1 à HDAC11.

Les séquences ont été alignées en utilisant le serveur Clustal W (université de Nijmegen, Hollande) et la notation PHYLIP (université Claude Bernard de Lyon, France)

On compte aujourd'hui 10 HDACs connues chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
Les protéines Rpd3, Hos1 et Hos2 forment la classe I.
Les membres de la classe II sont les protéines Hda1 et Hos3 d'après une analyse phylogénétique récente (Gregoretti et al., 2004; Rundlett et al., 1996).
La protéine Sir2 et les 4 protéines Hst (homologue de Sir2, aussi connue comme sirtuin) constituent la classe III.

Les HDACs des autres organismes sont regroupées de façon similaire. Par exemple, chez les eucaryotes, les 18 HDACs connues sont divisées en 3 classes (Fig.3) :

- classe I : HDAC1, -2, -3, -8 et 11 homologues à Rpd3
- classe II : HDAC4, -5, -6, -7, -9 et 10, reliés à Hda1
- classe III : SIRT1, -2, -3, -4, -5, -6, et 7, similaires à Sir2

Les classes I et II possèdent des homologies de séquence communes alors que la classe III détient une structure complètement différente. Les membres de cette classe ont effectivement une activité déacétylase dépendante du NAD contrairement aux deux premières classes qui n'utilisent pas un tel cofacteur.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Mécanisme de déacétylation des HDACs de classes I et II.

Le mécanisme d'action des déacétylases permet de retirer un groupement acétyl porté par un résidu lysine sur des histones composants le nucléosome ou sur des protéines non histones.
Une hypoacétylation fait décroître l'espace entre les nucléosomes et l'ADN. Cette conformation de l'ADN diminue l'accessibilité aux facteurs de transcription ou à d'autres protéines qui se lient à la chromatine, amenant en conséquence à une répression transcriptionnelle (Wade, 2001; Yoshida et al., 2001).

Conservé parmi les différentes espèces, le domaine catalytique des HDACs est formé d'environ 390 acides aminés. Le site actif est constitué d'une légère poche tubulaire courbée (Finnin et al., 1999). Le retrait du groupement acétyl s'opère via un système de transfert de charge constitué de deux histidines adjacentes, deux acides aspartiques et d'une tyrosine (voir Fig.4) (Buggy et al., 2000; Finnin et al., 1999).
Le composant essentiel du système de transfert de charge est la présence d'un atome de zinc (Zn^{2+}). Cet atome est immobilisé sur un site de fixation du zinc en dessous de la poche catalytique. Les travaux de Michael Finnin en 1999 ont parfaitement décrit le mécanisme d'action à la suite de la cristallisation du domaine, avec des inhibiteurs comme la trichostatine A (TSA) ou l'acide hydroxamique suberoylanilide (SAHA).

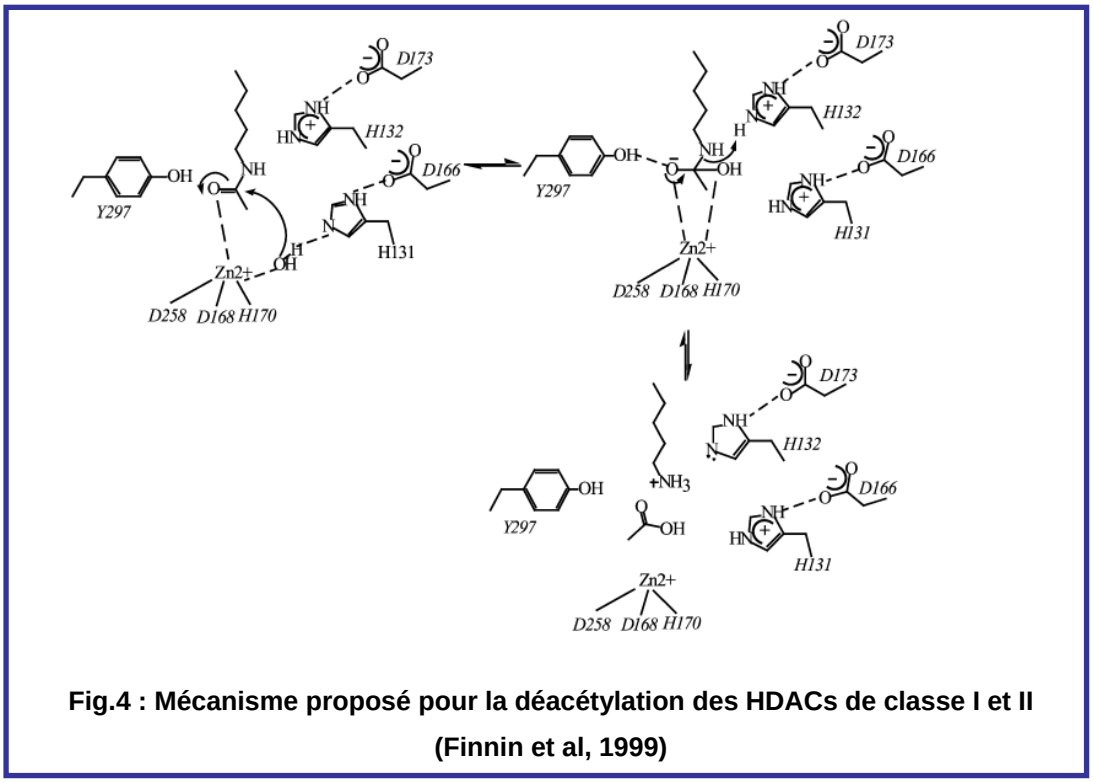


Fig.4 : Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDACs de classe I et II (Finnin et al, 1999)

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Récemment, la structure d'HDAC8 humaine a été élucidée (Somoza et al., 2004). Des homologies et des différences structurales avec les autres membres de la famille des HDACs ont ainsi été révélées. Le domaine catalytique, bien conservé, utilise le même système de transfert de charge décrit cinq ans plus tôt par Finnin. Toutefois, certaines dissemblances structurales peuvent amener à une sélectivité fonctionnelle distincte. En particulier, la phosphorylation d'un résidu sérine qui régule l'activité enzymatique d'HDAC8 n'est pas retrouvée chez les autres membres de la classe I des HDACs.

Avant que l'activité HDAC ne s'opère, il est parfois nécessaire que des cofacteurs soient associés pour obtenir une activité enzymatique. En effet, un certain nombre d'enzymes recombinantes sont inactives *in vitro* en l'absence de ces cofacteurs (Carmen et al., 1999; Hu et al., 2000; Lee et al., 2004).

Les inhibiteurs d'HDACs fonctionnent généralement par déplacement de l'atome de zinc et apportent donc un disfonctionnement dans le système de transfert de charge. SAHA (et la TSA), avec son acide hydroxamique, sa chaîne carbonée de 5 carbones et son groupe phényle, a une conformation optimale pour cibler le site actif (Finnin et al., 1999) (Fig.5). Toutes les HDACs de classe I et II sont sensibles et inhibées par la TSA (Johnstone, 2002; Marks et al., 2001; Marmorstein, 2001; Yoshida et al., 2001).

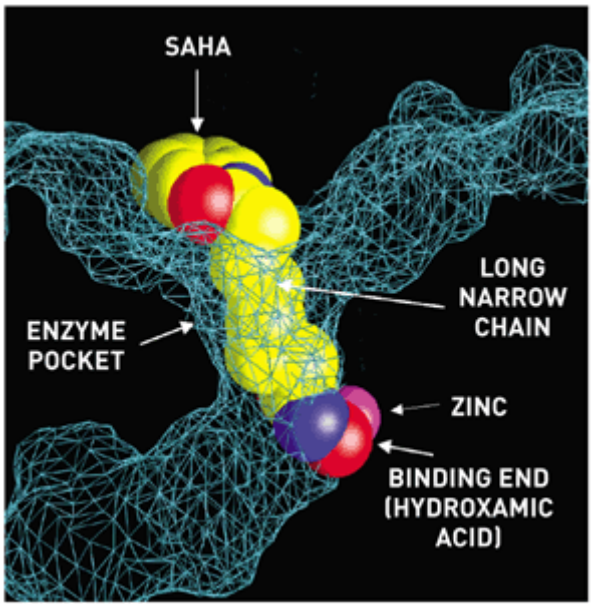


Fig.5 : Inhibition du site actif des HDACs par SAHA (Finnin et al, 1999)

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Organisation des HDACs de Classe I

Les HDACs de classe I ont des homologies de séquence avec la protéine de levure RPD3.

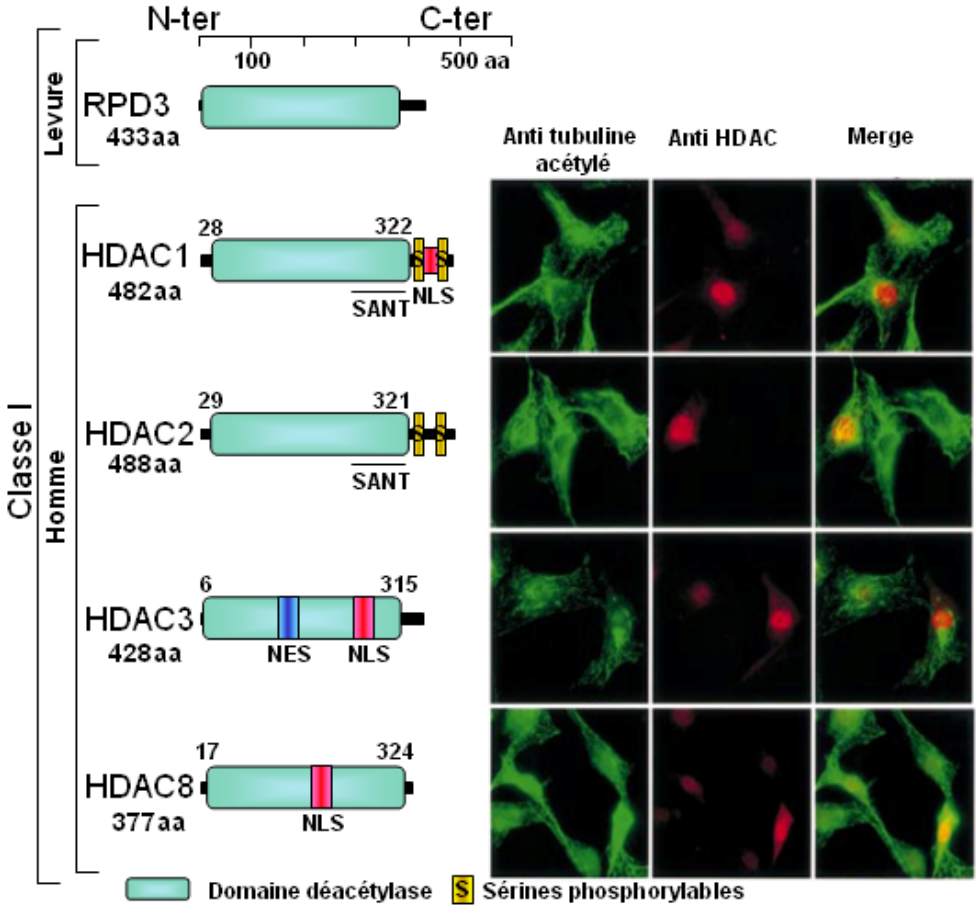


Fig.6 : représentation schématique des HDACs de classe I, leur expression transitoire et leurs effets sur la tubuline acétylée dans des NIH 3T3 (tiré de Matsuyama et al, 2002).

HDAC1 et 2

HDAC1 et HDAC2 sont des enzymes hautement homologues, avec un total de 82% de similarité (Fig.6). Le domaine catalytique coté N-terminal forme la majeure partie de ces protéines (Cress and Seto, 2000; Kao et al., 2000; Li et al., 2002; Wade, 2001). HDAC1 et HDAC2 sont inactives lorsqu'elles sont produites avec des techniques recombinantes, indiquant que des cofacteurs sont nécessaires pour observer l'activité HDAC.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

In vivo, les protéines HDAC1 et HDAC2 ont une activité enzymatique lorsqu'elles sont complexées avec d'autres protéines. Ces complexes sont constitués de facteurs nécessaires pour moduler leur activité déacétylase, leur fixation à l'ADN et pour le recrutement des HDACs aux promoteurs des gènes (Zhang et al., 1999).

Ces complexes protéiques ont été caractérisés et contiennent les deux déacétylases ainsi que les protéines Sin3, NuRD et Co-REST (Table2 et Fig.7).

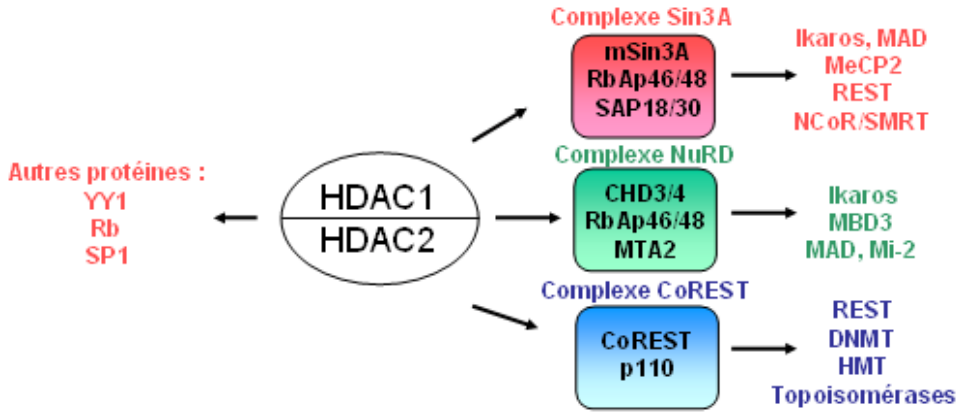


Fig.7 : représentation schématique des complexes protéiques avec HDAC1 et 2

Le complexe Sin3 (nommé d'après son élément caractéristique : la protéine mSin3A) et le complexe NuRD (pour Nucleosome Remodeling and Deacetylating) sont constitués d'éléments de cœur contenant HDAC1, HDAC2, RbAp48 (qui fixe H4 directement) et RbAP46. Le complexe de cœur seul ne possède pas une activité HDAC maximale, car des cofacteurs additionnels sont nécessaires (Table 2) (Galasinski et al., 2002; Heinzel et al., 1997; Kao et al., 2000).

HDAC1 et HDAC2 sont également présentes dans le complexe coREST et sont recrutées par une protéine homologue à MTA1 et MTA2 (You et al., 2001). Cette protéine nommée coREST (car elle peut recruter les HDACs et inhiber l'expression d'un gène rapporteur) contient deux domaines SANT de 50 acides aminés ressemblant aux domaines de fixation de l'ADN des protéines Myb. Ce domaine est souvent retrouvé dans des régulateurs transcriptionnels (incluant des protéines comme SWI3, ADA3, NCoR et TFIIB : d'où le nom SANT) (Pijnappel et al., 2001) et intervient dans des interactions protéine-protéine. Le domaine SANT N-terminal de CoREST est requis pour le recrutement de HDAC1 au promoteur (You et al., 2001).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC1 et HDAC2 peuvent s'associer en complexe avec des méthyltransférases à ADN (DNMTs) (Burgers et al., 2002; Fuks et al., 2001), avec des histones méthyltransférases (HMTs)(Czermin et al., 2001; Datta et al., 2003) et des topoisomérases pour former un complexe répresseur transcriptionnel.

A coté du fonctionnement de ce complexe, HDAC1 et HDAC2 peuvent aussi se lier directement à des protéines fixant l'ADN comme YY1, Rb et SP1 (Brehm et al., 1998; Li et al., 2002; Yao et al., 2001)

.

En plus de la régulation de l'activité de HDAC1 et HDAC2 par les corépresseurs disponibles, il existe une seconde voie de régulation enzymatique, modulable par des modifications post-traductionnelles. L'activité et la formation du complexe sont régulées par phosphorylation.

La phosphorylation permet de maintenir l'activité des HDACs à un niveau optimal. Des analyses mutationnelles sur HDAC1 montrent que les Sérines 421 et 423 sont des sites de phosphorylation cruciaux, qui une fois mutés gênent la formation du complexe et réduisent l'activité HDAC (Galasinski et al., 2002; Pflum et al., 2001).

	HDAC1 et HDAC2			**HDAC3**
Complexe	**Sin3**	**NuRD**	**Co-Rest**	
Fixation d'histone	RbAp48/46	RbAp48/46		RbAp48/46
Partenaires (fixent l'ADN ou intermédiaires entre l'ADN et le complexe HDAC)	Ikaros	MBD3		HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDRP, YY1, Rb, GATA-2, HDAC9, HDAC10
	YY1, SP1, BRCA1, Rb, NF-κB, MeCP2, HDAC10			
Fixation de récepteurs d'hormones nucléaires	mSin3A, SMRT, N-CoR			SMRT, N-CoR
Remodelage		Mi-2		
Module l'activité HDAC		MTA2	Co-REST	SMRT/N-CoR
inconnue	SAP18,SAP30			TBL1
Association comme intermédiaire	MAD, MeCP-1, ER, GR, TR, RPX, les protéines à homéodomaine, Aiolos, p53, REST, Suvar39H1, PML-RARα, DNMT, GAM1		DNMT HMT Topoisomérase	CRM1, HDAC3

Table 2 : Complexes protéiques formés avec HDAC1, 2 et 3

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC3

Dans l'évolution, la protéine HDAC3 est plus reliée à HDAC8 (34% de similarité) qu'aux deux premiers membres de sa classe : HDAC1 et HDAC2. Cette enzyme a toutefois la même structure de domaine que toutes les HDACs de classe I (Fig.6).
La région C-terminale non conservée de cette protéine est requise aussi bien pour l'activité enzymatique que pour la répression transcriptionnelle. A coté du signal de localisation nucléaire (NLS) retrouvé chez les autres HDACs de la classe I, un signal d'export nucléaire (NES) est également présent chez HDAC3. La balance entre ces deux signaux est probablement dépendante du type cellulaire et des conditions environnementales (Yang et al., 2002).

HDAC3 partage des caractéristiques structurales et fonctionnelles avec les autres complexes d'HDACs connus. Les protéines SMRT et N-CoR sont reconnues pour être des facteurs nécessaires pour son activité (table 2). Ces dernières possèdent un domaine DAD conservé (pour deacetylase activating domain) pour l'activation d'HDAC3 (Guenther et al., 2001).
HDAC3 est capable de former des oligomères *in vitro* et *in vivo* avec d'autres HDACs : en utilisant la surexpression couplée à l'immunoprécipitation, il a été montré qu'elle peut interagir avec HDAC4, -5 et -7 au travers d'un complexe avec SMRT et N-CoR (Fischle et al., 2001; Yang et al., 2002). HDAC3 endogène est surtout associé avec elle même et seulement une faible proportion de cette enzyme interagit avec HDAC4.

HDAC3 partage également la capacité d'HDAC1 à modifier l'interaction Rb-RbAp48, suggérant un rôle de ces HDACs dans le cycle cellulaire. Par contre, elle n'interfère pas dans l'activité Rb-E2F contrairement à HDAC1 et HDAC2 (Brehm et al., 1998; Nicolas et al., 2001).

HDAC8

HDAC8 est constituée d'un large domaine catalytique avec un NLS (Fig.6) (Bertos et al., 2001; Buggy et al., 2000; Marks et al., 2001; Yang and Gregoire, 2005).

Pour l'instant, sa participation dans un complexe corépressif de protéines n'a pas encore été démontrée.
La structure cristalline humaine d'HDAC8 complexée avec SAHA a été réalisée en 2004. Elle définit clairement le mécanisme de déacétylation et le mode d'inhibition de cette protéine (Vannini et al., 2004). HDAC8 participe à la croissance cellulaire de certaines cellules cancéreuses (A549, HeLa et HCT116) et s'associe spécifiquement avec la protéine de fusion inv(16) retrouvée dans les leucémies myéloïdes (Durst et al., 2003)

Récemment, la protéine HDAC8 a été détectée dans le cytosol des cellules musculaires lisses en différenciation (Waltregny et al., 2005). C'est la première fois qu'une HDAC de classe I s'associe avec le cytosquelette d'actine. Elle interagit avec l'α-actine du muscle lisse. Des expériences d'ARN interférence pour "éteindre" l'expression d'HDAC8 dans des cellules musculaires lisses ont démontrées que cette enzyme est nécessaire pour la contraction des fibres de collagène de type I (Waltregny et al., 2005).

Deux différents transcrits de 2 et 2,4 kb ont été trouvés et une analyse par northern blot a révèlée un taux variable de l'expression d'HDAC8 dans différents types de tissus suggérant une faible abondance des ARNs messagers d'HDAC8 (Buggy et al., 2000; Hu et al., 2000).
Malgré sa séquence de localisation nucléaire, aucune activité sur les queues N-terminales des histones n'a été observée à l'heure actuelle.

Cas particulier d'HDAC11

Clonée et caractérisée en 2002 (Gao et al., 2002), HDAC11 possèdent des propriétés communes aux deux premières classes d'HDACs (Fig.8).
La protéine comporte 347 acides aminés avec des homologies de séquences sur le domaine catalytique des classes I et II d'HDACs. La taille de la protéine est du même ordre que celle des HDACs de classe I, d'où son appartenance à cette classe. Pourtant, HDAC11 est exprimée dans le cœur, le cerveau, le muscle squelettique et les reins, ce qui est typique des HDACs de classe II.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

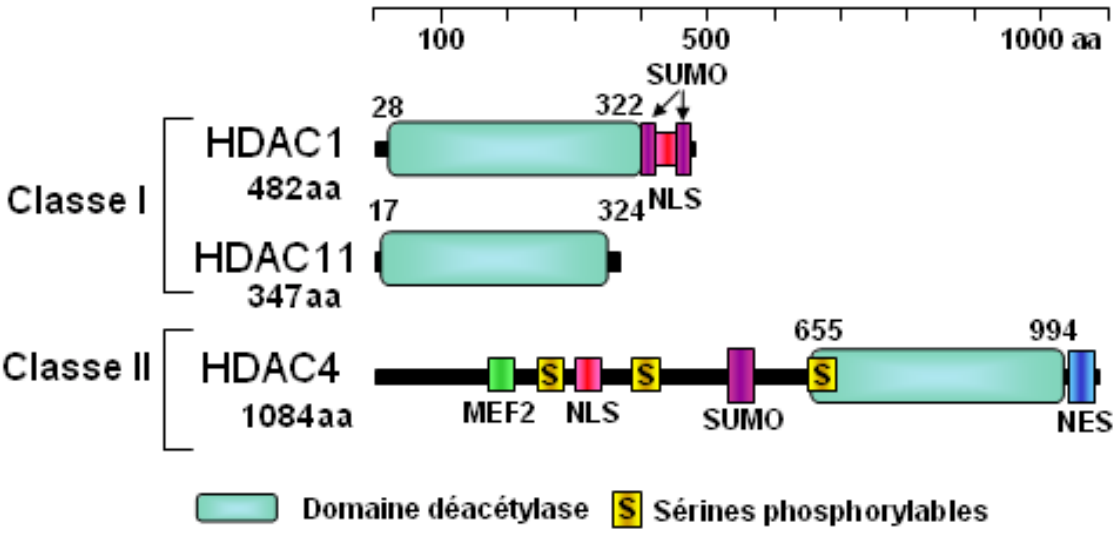


Fig.8 : Comparaison d'HDAC11 avec les autres classes d'HDACs

Cette protéine est principalement nucléaire et peut être inhibée par des inhibiteurs d'HDACs comme la TSA.

Bien qu'il existe une interaction avec HDAC6 dans le noyau (Gao et al., 2002), HDAC11 n'est retrouvée dans aucun complexe répresseur d'HDACs connu (Sin3, N-CoR/SMRT). Ceci indique une fonction biochimique distincte d'HDAC11 par rapport aux autres HDACs de classe I.

Peu de développements ont été réalisés sur cette enzyme. Une étude génomique récente a cependant permis d'identifier sa localisation sur le chromosome 3 par une technique d'hybridation *in situ* (Voelter-Mahlknecht et al., 2005).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Organisation des HDACs de classe II

Les HDACs de classe II existent chez un nombre varié d'organismes eucaryotes. Ces enzymes possèdent un domaine déacétylase ayant des homologies de séquences significatives avec le domaine déacétylase de la protéine Hda1 de levure.
Dans les différentes espèces de levure, les déacétylases similaires à Hda1 ont des séquences hautement conservées sur la totalité de la protéine. Par contre, chez les mammifères, seul le domaine déacétylase est similaire.

Chez les mammifères, 6 protéines voisines de la protéine Hda1 de levure sont présentes :
- HDAC4 (Fischle et al., 1999; Grozinger et al., 1999; Miska et al., 1999; Wang et al., 1999).
- HDAC5 (Fischle et al., 1999; Verdel and Khochbin, 1999).
- HDAC6 (Fischle et al., 1999; Verdel and Khochbin, 1999).
- HDAC7 (Fischle et al., 2001; Kao et al., 2000).
- HDAC9 (Mejat et al., 2005; Phiel et al., 2001; Zhou et al., 2001).
-HDAC10 (Fischer et al., 2002; Guardiola and Yao, 2002; Kao et al., 2002; Tong et al., 2002).

Ces protéines sont divisées en deux sous-groupes :

HDAC4, -5, -7 et -9 forment la classe IIa (Fig.9).
HDAC6 et HDAC10 forment la classe IIb (Fig.10).

En plus de leur domaine catalytique, les membres de la classe IIa des mammifères possèdent également des homologies de séquences importantes sur les domaines N- et C-terminaux. L'extension N-terminale possède des motifs conservés jouant un rôle dans leur fonction et leur régulation (Fig.9).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

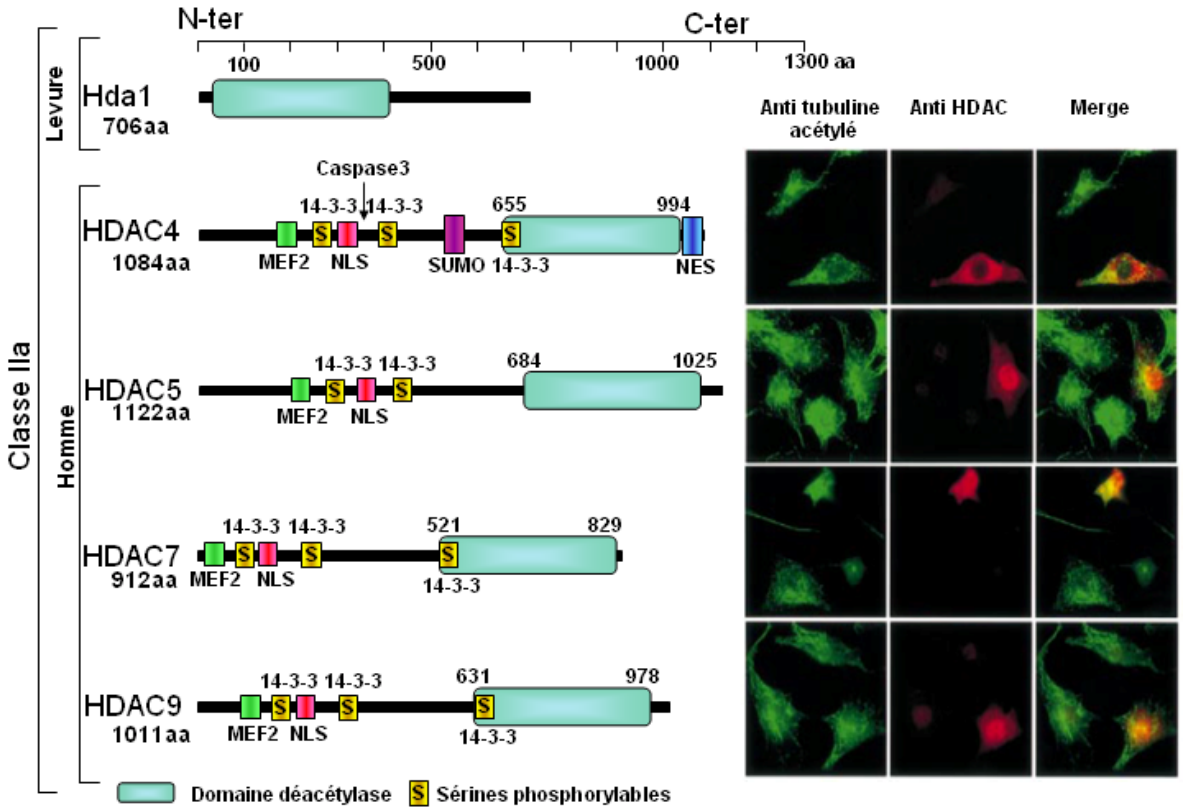


Fig.9 : Représentation schématique des HDACs de classe IIa, leur expression transitoire et leurs effets sur la tubuline acétylée dans des NIH 3T3 (tiré de Matsuyama et al, 2002).

Contrairement aux mammifères, les organismes comme *C.elegans* ou *D.melanogaster* ne possèdent qu'un membre unique dans la classe IIa (Choi et al., 2002; McKinsey et al., 2000a; Zeremski et al., 2003), par contre, le site de fixation à la protéine MEF2 (pour Myocyte Enhancer Factor2) est conservé.

La protéine HDAC4 de *C.elegans* (ceHDAC4) dispose d'un seul site putatif de fixation pour la protéine 14-3-3 alors qu'il est présent en deux endroits chez *D.melanogaster* (dHDAC4). De plus, dHDAC4, par rapport à ceHDAC4 possède une forte homologie de séquence avec un NLS retrouvé chez les HDACs humaines de la classe IIa (McKinsey et al., 2000a; Wang and Yang, 2001).

A la différence des membres de la classe IIa des HDACs, HDAC6 possède deux domaines déacétylases et un motif en doigt de zinc : le domaine Znf-UBP (Fig.10) (Grozinger et al., 1999; Verdel and Khochbin, 1999). Cette histone déacétylase atypique est localisée dans le cytoplasme et possède un domaine catalytique conservé au cours de l'évolution. Suivant les

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

espèces, un isoforme supplémentaire de cet déacétylase n'ayant plus le domaine Znf-UBP est présent dans les banques de données (Fig.16).
Cette enzyme peut avoir de petites particularités de structure suivant l'espèce considérée. En effet, la protéine HDAC6 humaine (hHDAC6) possède un unique domaine SE14 (Fig.10) qui n'est pas conservé ou absent dans les séquences publiées de souris, de rat, de *C.elegans*, de *D.melanogaster* ou d' *A.thaliana* (Bertos et al., 2004). Ce domaine contient 8 répétitions d'un tétradécapeptide et est important pour la rétention cytoplasmique d'HDAC6 humaine (Bertos et al., 2004; Bertos et al., 2001).

L'extrémité N-terminale d'HDAC10 (Fig.10) est plus similaire au premier domaine catalytique de HDAC6 qu'au second (Fischer et al., 2002; Guardiola and Yao, 2002; Kao et al., 2002; Tong et al., 2002). La partie C-terminale de HDAC10 est riche en leucines et montre des homologies de séquence moins fortes avec le deuxième domaine déacétylase d'HDAC6 (Guardiola and Yao, 2002).

Ainsi, dans les différents organismes, la base structurale des domaines de classe II est liée aux domaines de la protéine Hda1.

Fonctions et régulations des HDACs de la classe IIa

Fonctions de la classe IIa des HDACs

Comme Hda1 chez la levure, les HDACs la classe IIa des mammifères ont principalement une fonction de co-répresseur transcriptionnel (Table.3). En plus de leur domaine déacétylase (Fig.9), elles possèdent un autre domaine de répression (Kao et al., 2000; Lemercier et al., 2000; Sparrow et al., 1999; Wang et al., 1999; Zhou et al., 2000a). Ces enzymes agissent avec d'autres co-répresseurs ou se fixent directement sur des facteurs de transcription comme MEF2, NF-AT3c, BCoR et Runx3 (table.3).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Partenaires	Fonction / Description	référence
53BP1	Régule le cycle cellulaire et répond lors des dommages de l'ADN	(Kao et al., 2003)
ANCO-1	Co-facteur contenant des répétitions Ankyrines	(Zhang et al., 2002a)
ARR19	Co-répresseur de récepteurs aux androgènes	(Jeong et al., 2004)
BCL6	Facteur de transcription à domaine POZ pour la survie et différenciation cellulaire	(Lemercier et al., 2002)
BCoR	Co-répresseur de BCL6 important dans l'embryogenèse	(Huynh et al., 2000)
Ca^{2+}/Calmoduline	Protéine fixant le calcium	(Berger et al., 2003)
CREB2	Facteur de transcription dans la croissance synaptique	(Guan et al., 2002)
CtBP	Co-répresseur transcriptionnel (E1A C-terminal binding protein)	(Zhang et al., 2001a)
ETR-A	Récepteur de protéine G	(Lee et al., 2001)
GATA1	Facteur de transcription pour la différenciation erythroïde	(Watamoto et al., 2003)
HIF1α	Facteur de transcription contrôlant les gènes hypoxiques	(Kato et al., 2004)
HP1	Partenaire de SUV39H1 (Heterochromatin Protein 1)	(Zhang et al., 2002b)
ICP0	Protéine du virus Herpes simplex	(Lomonte et al., 2004)
IκBα	Régulateur négatif de NF-κB	(Aguilera et al., 2004)
MEF2	Régulation de la différenciation cellulaire	(Kao et al., 2001)
MRJ	Chaperonne et co-répresseur des protéines NF-ATs	(Im and Rao, 2004)
Myocardin	Co-activateur transcriptionnel dans la différenciation musculaire lisse	(Cao et al., 2005)
N-CoR	Co-répresseur de récepteurs nucléaires	(Kao et al., 2000)
NF-AT3c	Facteur de transcription dans la différenciation cellulaire et la réponse immunitaire	(Im and Rao, 2004)
PLZF	Facteur de transcription à domaine POZ	(Chauchereau et al., 2004)
Rea	Répresseur de l'activité des récepteurs d'oestrogènes	(Kurtev et al., 2004)
RIP140	Co-répresseur de récepteurs nucléaires	(Castet et al., 2004)
Runx2 et Runx3	Facteurs de transcription à domaine Runt	(Vega et al., 2004b)
SMRT	Co-répresseur de récepteurs nucléaires	(Huang et al., 2000a)
SRF	Facteur de réponse au sérum pour la croissance et différenciation cellulaire	(Davis et al., 2003)
TIP60	Histone acétyltransférase	(Lee et al., 2001)
TR2	Récepteur nucléaire	(Franco et al., 2001)
14-3-3	Protéine fixant phosphosérines et phosphothréonine	(Wang et al., 2000)

Table 3 : Partenaires de la classe IIa des HDACs (Yang et Grégoire, 2005).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Fonction avec MEF2.

Bien qu'il n'existe qu'une seule protéine chez *C.elegans* ou *D.melanogaster*, il y a quatre isoformes de MEF2 chez les vertébrés : MEF2A, -B, -C et –D (Han and Molkentin, 2000; McKinsey et al., 2002). Ces protéines ont été identifiées initialement comme des activateurs transcriptionnels majeurs des gènes structuraux du muscle cardiaque et squelettique (Black and Olson, 1998). Les protéines MEF2 sont également retrouvées dans la régulation de différents programmes cellulaires comme la survie neuronale, l'apoptose des cellules T et la réponse aux facteurs de croissance (Han and Molkentin, 2000; McKinsey et al., 2002). Une protéine MEF2 aberrante est impliquée dans des maladies du cœur et certains lymphomes (Wang et al., 2003; Yuki et al., 2004).

Depuis sa découverte initiale en 1999, le lien entre la classe IIa des HDACs et MEF2 a été largement caractérisé (Dressel et al., 2001; Lemercier et al., 2000; Lu et al., 2000a; Lu et al., 2000b; Miska et al., 1999; Sparrow et al., 1999; Wang et al., 1999; Zhang et al., 2001b).
Le site d'interaction avec MEF2 est compris sur un petit motif conservé des quatre membres de la classe IIa chez les mammifères (Fig.9) (Lu et al., 2000a; Sparrow et al., 1999). L'analyse structurale de ce motif a révélé que le mode de fixation ressemble à celui utilisé par la protéine Cabin1 (Han et al., 2005; Han et al., 2003) et que les résidus essentiels sont aussi conservés sur la protéine HDAC4 de *C.elegans* ou *D.melanogaster* (Choi et al., 2002; Zeremski et al., 2003).

Pour HDAC4 et HDAC5, ce motif se chevauche avec le site de fixation de la Ca^{2+}/calmoduline (Fig.9) (Berger et al., 2003; Youn et al., 2000). Cela suggère que la fixation de la Ca^{2+}/calmoduline empêche la répression de la transcription MEF2 dépendante par les HDACs de classe IIa.
La Ca^{2+}/calmoduline active aussi certaines kinases particulières : les CaMKs (pour Calmodulin-dependent kinases). Ces enzymes participent à l'export nucléaire des HDACs après leur phosphorylation et leur fixation à la protéine 14-3-3.
Par conséquent, à la suite d'un signal, MEF2 recrute les HDACs de classe IIa pour réprimer la transcription : il y a conversion de la protéine MEF2 d'un activateur en un répresseur transcriptionnel.

Cette notion est compatible avec le fait que les souris déficientes en gènes codant pour HDAC4 et HDAC9 souffrent d'une hypertrophie cardiaque (Chang et al., 2004; Mejat et al., 2005; Zhang et al., 2002a).

Les HDACs de la classe IIa interagissent avec MEF2C et MEF2D pour réguler l'apoptose des cellules T et la survie neuronale (Chawla et al., 2003; Dequiedt et al., 2003). Finalement, la classe IIa des HDACs initie la sumoylation et la phosphorylation de MEF2C et MEF2D afin de potentialiser la répression transcriptionnelle.

Fonction avec BCoR (BCL6 interacting corepresor)

La protéine BCL6 (pour B cell lymphoma 6) est codée par un gène impliqué dans les translocations chromosomiques associées aux lymphomes non-Hodgkiniens (Huynh et al., 2000). BCL6 est un répresseur contrôlant l'expression des gènes de la différentiation lymphocytaire, de l'inflammation et du cycle cellulaire (Shaffer et al.). Il contient un domaine POZ (poxvirus and zinc finger) qui intervient dans les interactions protéine-protéine (Bardwell and Treisman, 1994).

BCoR a été identifiée à la suite d'une recherche par double hybride où le domaine POZ de BCL6 à été utilisé comme appât (Huynh et al., 2000). Il apparaît que BCoR est un répresseur spécifique de BCL-6 mais pas des autres protéines à domaine POZ comme BAZF (pour BCL-6 associated zinc finger protein). BCoR interagit avec HDAC1, -3, -4 et HDAC5 (Huynh et al, 2000), suggérant qu'à travers BCoR, BCL-6 recrute la classe I et la classe IIa des déacétylases pour réprimer la transcription.

Fonction avec NF-AT3c

La Ca^{2+}/calmoduline active également la phosphatase calcineurine pour déphosphoryler et activer la protéine NF-AT. Cette voie est importante dans l'hypertrophie cardiaque et l'activation des lymphocytes T (Crabtree and Olson, 2002).
Dans les cellules musculaires cardiaques, NF-AT3c collabore avec les facteurs de transcription comme MEF2 et GATA4 pour activer la transcription.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC4 interagit avec NF-AT3c et MRJ (pour mammalian relative of DnaJ) pour réprimer la transcription (Crabtree and Olson, 2002), suggérant que HDAC4 et les autres HDACs de classe IIa servent de répresseur des protéines NF-ATs.

Fonction avec les facteurs de transcription à domaine Runt

Les facteurs de transcription mammifères Runx ont un rôle important dans le développement et la tumorigénèse (Ito, 2004). Parmi eux, la protéine Runt de *D.melanogaster* intervient dans la segmentation.
Runx1 et Runx2 interagissent avec la classe IIa des HDACs. L'élimination du gène codant la protéine HDAC4 provoque une hypertrophie des chondrocytes chez les souris (Vega et al., 2004b). De même, Runx2 joue un rôle essentiel dans le développement des os (voir chapitre "les substrats nucléaire d'HDAC6" et (Ducy et al., 2000).
Le gène qui code pour la protéine HDAC4 humaine est localisé sur le chromosome 2q37, une région où des anormalités ont été liés au syndrome ostéodystrophique de Albright (Chassaing et al., 2004).

Fonction avec CtBP (E1A C-terminal binding protein)

Les protéines adénovirales E1A interviennent dans la transformation oncogénique des cellules primaires animales.
En plus de la protéine suppresseur de tumeur RB et de la protéine P300, CtBP a été identifiée initialement comme un nouveau facteur interagissant avec les protéines E1A (Schaeper et al., 1995).
La protéine CtBP a des fonctions de coactivateurs ou de corépresseurs selon le contexte et les différents processus développementaux (Phippen et al., 2000; Turner and Crossley, 1998).

La protéine CtBP interagit avec les protéines cellulaires possédant un motif particulier : le motif PxDLS (où x correspond à n'importe quel acide aminé). De plus, elle interfère avec un grand nombre de facteurs de transcription comme TCF (pour T cell factor), Ikaros et Snail (Burke and Baniahmad, 2000) ou avec des corégulateurs transcriptionnels comme CtIP (pour CtBP interacting protein) (Schaeper et al., 1995) et FOG (pour friend of GATA-1) (Turner

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

and Crossley, 1998). Dans les cellules mammifères, il existe deux orthologues de la protéine CtBP : CtBP1 et CtBP2 (Schaeper et al., 1995; Turner and Crossley, 1998).

Pour la caractérisation fonctionnelle de la classe IIa des HDACs, une recherche en double hybride chez la levure a été réalisée. Le domaine N-terminal d'HDAC4 a été utilisé comme appât (Zhang et al., 2001a). De façon intéressante, quelques clones positifs codent pour la protéine CtBP1. dans des expériences *in vitro* et *in vivo* ces interactions de CtBP1 avec HDAC4, mais aussi avec MITR et HDAC5 ont été confirmées. Ces protéines possèdent toutes le motif PxDLS et peuvent recruter CtBP1 comme corépresseur.

Rôles particulier pour les HDACs de classe IIa

HDAC4 interagit avec la protéine 53BP1 et peut réguler la réparation de l'ADN (Kao et al., 2003).
HDAC5 se fixe et déacétyle la protéine Runx3. En retirant le groupement acétyl, HDAC5 favorise l'ubiquitination de cette protéine et finalement sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome (Jin et al., 2004)
En plus de son rôle de corépresseur, HDAC7 interagit avec la protéine HIF1α (hypoxia-inducible factor 1α) et active la transcription (Kato et al., 2004). De plus, HDAC7 se localise dans les mitochondries et peut réguler l'initiation de l'apoptose (Bakin and Jung, 2004).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Régulations de la classe IIa des HDACs

Expression de la classe IIa

Intimement lié à sa fonction, la régulation des HDACs est un point important à considérer (Sengupta and Seto, 2004).
L'expression de la classe IIa des HDACs est contrôlée de façon tissue spécifique. La plupart sont fortement exprimées dans le muscle squelettique, le cœur, le cerveau et le thymus avec des rôles importants dans la différenciation cellulaire (Verdin et al., 2003).

Parmi les mécanismes de régulation, l'épissage alternatif représente un premier niveau d'intervention. Par exemple, de multiples isoformes sont générés à partir du gène codant pour la protéine HDAC9. Un des isoformes, connu sous le nom de MITR, perd la partie C-terminale et se localise dans le noyau (Sparrow et al., 1999; Zhang et al., 2001b). Contrairement à celui-ci, d'autres isoformes ne contenant pas de NLS sont constitutivement cytoplasmiques (Petrie et al., 2003).
La protéine HDAC9 n'est pas la seule à subir un épissage alternatif, d'autres HDACs de la classe IIa, comme dHDAC4, subissent aussi ce type de régulation (Zeremski et al., 2003).

Compartimentation subcellulaire de la classe IIa des HDACs

Les déacétylases de la classe IIa sont présentent aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme (Grozinger and Schreiber, 2000; Khochbin et al., 2001; Miska et al., 1999). Un traitement avec de la leptomycine B a solidement établit que l'export nucléaire est dépendant de la protéine CRM1 (Fischle et al., 1999; Grozinger and Schreiber, 2000; Kao et al., 2001; McKinsey et al., 2000a; Miska et al., 1999; Wang et al., 2000). Ces HDACs possèdent un signal d'importation ou d'exportation nucléaire pour le trafic nucléocytoplasmique (Fig.9) (McKinsey et al., 2000a; McKinsey et al., 2001; Wang and Yang, 2001). Ces signaux

génèrent un équilibre dans la dynamique du trafic, et les perturbations de cet équilibre peuvent affecter la distribution subcellulaire (Fig10).

Parmi les partenaires connus, MEF2 et HIF1α (table.3) participent à la localisation nucléaire de la classe IIa (Borghi et al., 2001; Chan et al., 2003; Kato et al., 2004; Miska et al., 1999; Wang and Yang, 2001).

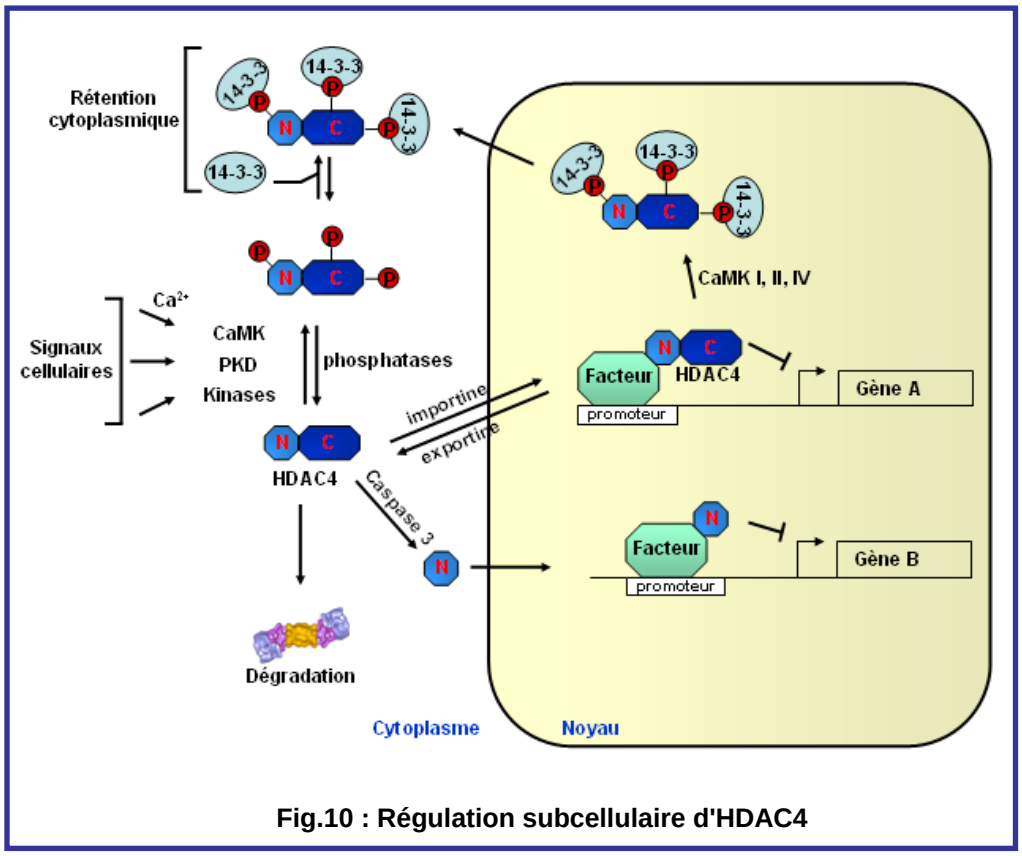


Fig.10 : Régulation subcellulaire d'HDAC4

Par opposition, la protéine 14-3-3 joue un rôle dans la rétention cytoplasmique (Grozinger and Schreiber, 2000; Kao et al., 2001; McKinsey et al., 2000b; Wang et al., 2000). Dépendante d'un site spécifique de phosphorylation, cette protéine se fixe sur les déacétylases de la classe IIa et exerce ses effets par de multiples mécanismes (Fig.10).

Le site majeur de fixation de la protéine 14-3-3 sur les HDACs se juxtapose à la séquence NLS (Fig.10). Ainsi, sa fixation empêche l'accès de l'importine et bloque l'import nucléaire (Grozinger and Schreiber, 2000). Ce site de fixation est conservé chez cHDAC4 et dHDAC4 (Choi et al., 2002; Zeremski et al., 2003), indiquant que ce mécanisme de régulation pourrait être généralisable à ces organismes.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

L'ancrage de la protéine 14-3-3 peut également servir d'un signal d'export nucléaire pour initier le transfert des HDACs de classe IIa du noyau au cytoplasme.
De plus, la fixation de la protéine 14-3-3 affecte la localisation subnucléaire des HDACs. Effectivement, après l'interaction avec cette protéine , MITR passe d'une localisation spécifique sous forme de points à une redistribution uniforme dans le noyau (Zhang et al., 2001b).
Finalement, la protéine 14-3-3 a récemment été montrée comme participant à la protection proteasomale d'HDAC7 en s'associant avec elle (Li et al., 2004). Ce qui contribue à son accumulation cytoplasmique.

Les CaMKs I, II, et IV phosphorylent les HDACs sur le site de fixation de la protéine 14-3-3 (Fig.9) et interviennent dans leur export nucléaire (Chawla et al., 2003; Davis et al., 2003; Kao et al., 2001; Linseman et al., 2003; McKinsey et al., 2000a).
D'autres données suggèrent que des kinases inconnues distinctes des CaM Kinases peuvent aussi réguler les déacétylases sur des sites identiques (Zhang et al., 2002a; Zhao et al., 2001). Parmi elles, la protéine kinase D1 (PKD1) phosphorylant HDAC5 et HDAC7 a été récemment découverte (Parra et al., 2005; Vega et al., 2004a).

De façon intéressante, la régulation de la localisation des déacétylases par phosphorylation peut être exécutée sur des sites différents de ceux utilisés par la protéine 14-3-3. En effet, un mutant d'HDAC4 déficient de ce site de fixation est malgré tout phosphorylable (Bertos et al., 2001). Ceci prouve que des kinases peuvent agir sur des sites différents et réguler la localisation des HDACs. Dans ce sens, la protéine oncogénique Ras initie la localisation nucléaire d'HDAC4 par stimulation de sa phosphorylation par la kinase 1 et 2 à la suite d'un signal extracellulaire (Zhou et al., 2000b).

La localisation subcellulaire de la classe IIa des HDACs est connue pour être affectée par privation de sérum (Dressel et al., 2001), la dépolarisation membranaire (Chawla et al., 2003; Linseman et al., 2003), l'hypoxie (Kato et al., 2004) et d'autres stimuli (Chang et al., 2004; Halkidou et al., 2004; Harrison et al., 2004; Kao et al., 2003).

Malgré des schémas de régulation partagés, les membres de la classe IIa ont des localisations subcellulaires distinctes (Bertos et al., 2001; Matsuyama et al., 2002). Ainsi, l'hypoxie induit l'import nucléaire de HDAC7 mais pas de HDAC4 ou HDAC5 (Kato et al., 2004). En

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

conséquence, d'autres kinases peuvent réguler de façon différentielle la localisation subcellulaire de ces membres.

La caspase 3 clive spécifiquement HDAC4 et provoque la localisation nucléaire du fragment N-terminal (Fig.10) (Liu et al., 2004; Paroni et al., 2004).

A la différence des autres membres de la classe IIa, HDAC7 se localise dans la mitochondrie (Bakin and Jung, 2004).

En plus de la phosphorylation, HDAC4, -5 et -9 sont sujets à l'ubiquitination et à la sumoylation (Hook et al., 2002; Kirsh et al., 2002; Petrie et al., 2003; Tatham et al., 2001). Ces deux modifications n'affectent pas leur localisation subcellulaire.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Fonctions et régulations des HDACs de la classe IIb

La classe IIb des HDACs (Fig.11) comporte à l'heure actuelle deux membres : HDAC6 et HDAC10. La protéine HDAC6 fait l'objet d'une recherche importante, elle est immédiatement apparue différente de par sa structure et sa localisation. Découverte plus tard, la protéine HDAC10 est moins étudiée et son rôle dans le système cellulaire moins documenté.

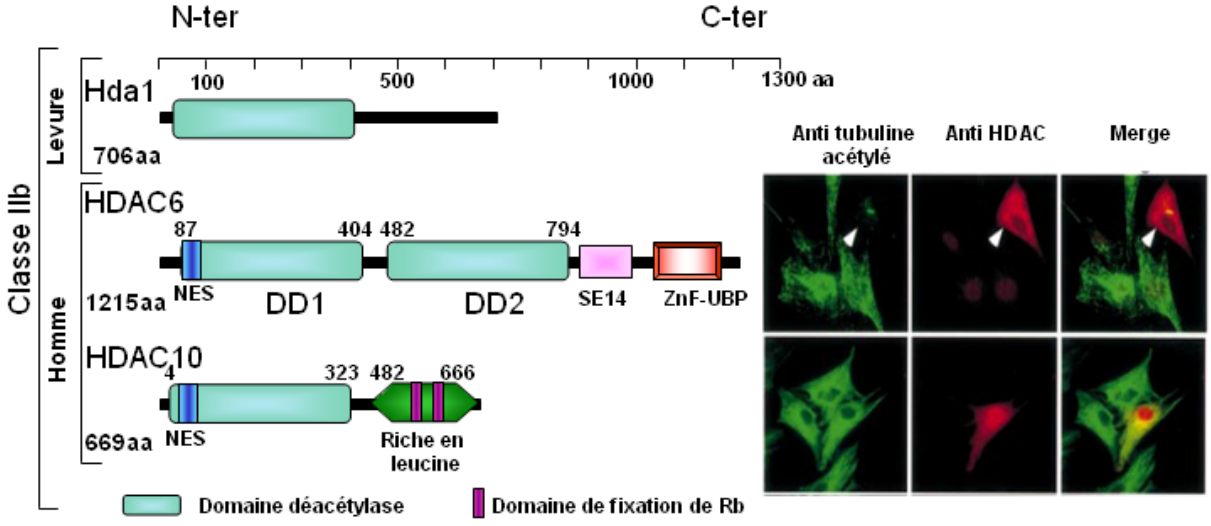


Fig.11 : Représentation schématique des HDACs de classe IIb, leur expression transitoire et leurs effets sur la tubuline acétylée dans des NIH 3T3 (tiré de Matsuyama et al, 2002).

Description générale d'HDAC6

Découverte en 1999 (Verdel and Khochbin, 1999), HDAC6 est une enzyme au profil bien particulier : elle possède deux domaines déacétylases et un domaine Znf-UBP. Cette protéine est localisée exclusivement dans le cytoplasme via un mécanisme actif.

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

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

L'analyse initiale de l'activité catalytique des deux domaines HDACs par mutagenèse dirigée suggère qu'ils peuvent avoir des fonctions indépendantes (Grozinger et al., 1999). Néanmoins, après une étude plus poussée sur l'influence interne des deux domaines dans le mécanisme de déacétylation, il apparaît clairement que la présence simultanée de ces deux domaines est absolument nécessaire pour observer une activité catalytique chez HDAC6 (Zhang et al., 2003).

De façon intéressante, l'activité enzymatique d'HDAC6 est résistante à la trapoxine B, une toxine fongique qui inhibe fortement la classe I des HDACs et les autres HDACs de classe II (Furumai et al., 2001). Comme les autres HDACs de classe I et II, HDAC6 est inhibé par la TSA. Le domaine déacétylase est hautement conservé chez les protéines HDAC6 depuis le nématode, la drosophile jusqu'au mammifère.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC6 et navette nucléocytoplasmique

La protéine HDAC6 fait la navette entre le noyau et le cytoplasme comme la plupart des HDACs de Classe II (Verdel et al., 2000). Bien qu'HDAC6 ne se fixe pas à la protéine 14-3-3, sa localisation subcellulaire est activement régulée.
En l'absence de stimulus, la majorité d'HDAC6 murine (mHDAC6) 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).

Pour mHDAC6, trois séquences NES indépendantes ont été identifiées. Ces séquences sont similaires à celles initialement décrites dans l'export nucléaire de la protéine Rev du VIH-1 et la protéine Rex de HTLV (pour human T-cell leukemia virus type 1) contrôlé par la protéine CRM1 (Bogerd et al., 1996). Seule la séquence NES coté N-terminal est essentielle pour maintenir mHDAC6 dans le cytoplasme. Le blocage de l'activité CRM1 par la leptomycine B entraîne une redistribution et une relocalisation nucléaire de mHDAC6.

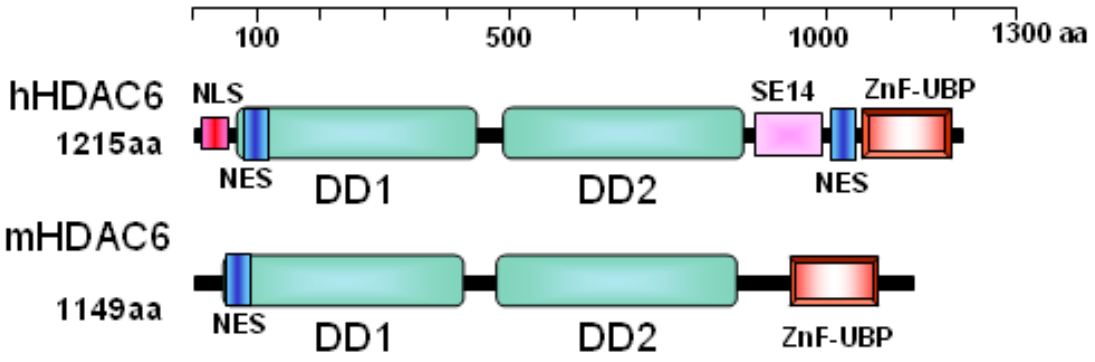


Fig.12 : Comparaison de la structure primaire entre hHDAC6 et mHDAC6

Le contrôle de la localisation sub-cellulaire d'HDAC6 humaine (hHDAC6) est régulé différemment. Contrairement à ses orthologues d'organismes inférieures, hHDAC6 possède un domaine supplémentaire appelé SE14 (voir article 2 et Fig.12). Entouré entre le deuxième domaine déacétylase et le domaine Znf-UBP, ce tétradécapeptide participe aussi à la localisation cytoplasmique de hHDAC6.

La localisation de cette déacétylase dans la cellule est primordiale car elle contribue directement au choix des substrats pour cette enzyme multifonctionnelle.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Les substrats d'HDAC6

HDAC6 : une tubuline déacétylase

Bien que la dénomination "histone déacétylase" soit utilisée dans un but de simplification pour la nomenclature, le premier substrat physiologique d'HDAC6 découvert fut l'α-tubuline cytoplasmique et non les histones.

Les microtubules sont des structures cylindriques creuses du cytosquelette retrouvées dans toutes les cellules eucaryotes, impliquées dans une grande variété de processus cellulaires comme la mitose, le transport intracellulaire de vésicules ou d'organites et la mobilité des flagelles (Luduena, 1998). La sous-unité structurale des microtubules est un complexe hétérodimèrique d'environ 100 kDa d'α et β tubuline. Certains types de modifications post traductionnelles affectent la fonction de la tubuline : acétylation, phosphorylation, polyglutamination, polyglycylation et détyrosination (MacRae, 1997).

L'utilisation de lignées stables exprimant la protéine HDAC6 sauvage ou HDAC6 mutée sur son domaine catalytique montre que cette enzyme a clairement une activité de tubuline déacétylase. Ceci est également observé à partir de traitements qui inhibent spécifiquement HDAC6 endogène en utilisant des drogues (comme la TSA, le butyrate ou la trapoxine B) ou des techniques d'ARN interférence contre la protéine (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003). HDAC6 interagit avec la β-tubuline (Zhang et al., 2003) et catalyse la déacétylation de la lysine 40 de l'α-tubuline acétylée. Cette déacétylation s'opère via son deuxième domaine déacétylase et nécessite la présence des deux domaines catalytiques (Haggarty et al., 2003).
L'utilisation d'une protéine HDAC6 recombinante ne présente pas d'activité déacétylase sur les dimères libres α/β de la tubuline (Hubbert et al., 2002). La déacétylation est observée uniquement sur des microtubules polymérisés.

En 2003, Les travaux de Brian North ont montré que SIRT2, une autre déacétylase de la classe III des HDACs interagit avec HDAC6 et possède une activité tubuline déacétylase en présence de NAD (North et al., 2003). HDAC6 et SIRT2 co-localisent avec le réseau de

microtubules dans le cytoplasme. Contrairement à HDAC6 qui ne déacétyle que l'α-tubuline acétylée des microtubules, SIRT2 possède une action catalytique sur la tubuline acétylée seule et sur les microtubules acétylés.

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'ostéoclaste qui dégrade la matrice osseuse et l'ostéoblaste qui la reconstruit.
L'ostéoclaste est une cellule hématopoïétique dérivant de la lignée monocytaire. Son précurseur se situe entre le monocyte et le macrophage. C'est la fusion de ces précurseurs monocytaires, dans l'environnement osseux, qui aboutit à l'ostéoclaste plurinucléé fonctionnel (Boyle et al., 2003).

Pour permettre leur fixation au substrat ou bien leur migration, les ostéoclastes se reposent sur une structure d'adhésion cellulaire particulière : le podosome.
Sur des bases initialement décrites chez le macrophage, le podosome est constitué d'un corps riche en F-actine (contrairement aux plaques d'adhésion focales) autour duquel s'entoure une structure en anneau riche en vinculine et taline (Linder and Aepfelbacher, 2003). Plusieurs classes de molécules sont retrouvées dans le podosome : des composants et régulateurs du cytosquelette, des kinases, des intégrines et des Rho GTPases.

In vitro, durant le processus de maturation des ostéoclastes, l'organisation des podosomes évolue. Les anneaux de podosomes des ostéoclastes immatures vont progressivement s'organiser en ceinture de podosome dans les ostéoclastes matures (Destaing et al., 2003). Cette ceinture définit une zone hermétique permettant la résorption de la matrice osseuse (Vaananen et al., 2000).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

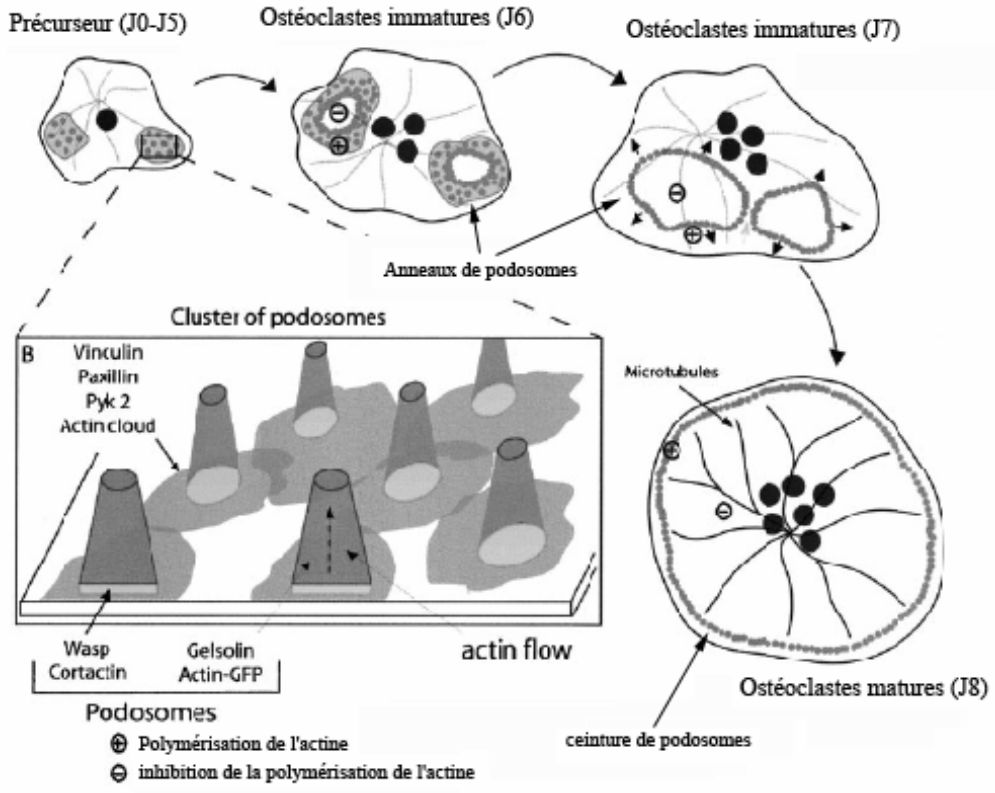


Fig.13 : Dynamique interne des podosomes dans la différenciation ostéoclastique (Destaing et al., 2003)

Les mécanismes cellulaires de cette maturation sont progressivement étudiés par analogie avec ce qui se passe au niveau des adhésions focales. L'intégrité du réseau de microtubules est cruciale dans ce mécanisme (Destaing et al., 2003) et la participation des principaux régulateurs de la dynamique de l'actine et des microtubules comme les petites protéines G Rac, cdc42 et Rho est essentielle.

De façon surprenante, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature dans d'autres systèmes cellulaires, une inhibition de Rho provoque une stabilisation et une hyperacétylation des microtubules dans le système de différenciation ostéoclastique.

Cette hyperacétylation est réversible grâce à une coopération entre HDAC6 et mDIA2, un effecteur de Rho GTPase. L'effecteur mDIA2 interagit avec les deux domaines déacétylases d'HDAC6 et accroît son activité enzymatique sur la tubuline acétylée (article 4).

Ces résultats indiquent que le niveau d'acétylation des microtubules contrôlé par HDAC6 est crucial dans la fonction et la différenciation ostéoclastique.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Déacétylation de la tubuline et organisation synaptique immunitaire

Dans une autre étude, Serrador et ses collègues rapportent que la protéine HDAC6 intervient dans la formation synaptique des lymphocytes T.

La synapse immunitaire est une jonction spécialisée cellule-cellule entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs). Cette synapse est importante pour l'activation des cellules T (Blanchard and Hivroz, 2002).

Lors du contact entre les cellules T et les CPAs, HDAC6 est rapidement déplacé et concentré au niveau de la synapse immunitaire. Ce déplacement est corrélé avec une déacétylation des microtubules et joue un rôle dans le réarrangement de la membrane et du cytosquelette, dans la translocation du MTOC et dans la synthèse d'interleukine (IL-2). Une surexpression d'HDAC6 sauvage, contrairement au mutant catalytique, peut perturber l'organisation de la synapse immunitaire et *in fine*, l'activation des cellules T.

Ainsi, les microfilaments d'actine ne sont pas les seuls à intervenir dans la mise en place de ces structures (Dustin and Cooper, 2000). Via HDAC6, le niveau de microtubules acétylés est nécessaire pour une bonne organisation de la synapse et pour l'activation des cellules T.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC6 et infection du VIH-1

L'infection du virus immunodéficient humain de type 1(VIH-1) est initiée par sa fixation à la surface cellulaire et se poursuit par sa fusion avec la membrane plasmique (Moore et al., 1997). Ces processus s'accompagnent de changements importants dans l'organisation du cytosquelette (Iyengar et al., 1998; Jernigan et al., 2000).
La fixation du virus sur des lymphocytes T induit une acétylation de l'α-tubuline.
Dans ce contexte, l'activité d'HDAC6 influence fortement l'infection du virus sur les cellules sans affecter l'expression et la distribution des récepteurs impliqués dans ce mécanisme (CD4, CCR5 et CXCR4).

Des expériences d'ARN interférence pour éteindre l'expression d'HDAC6 ont permis d'analyser quantitativement l'acétylation de la tubuline, la fusion et l'infection de membranes par le VIH-1. Les résultats présentent clairement une relation inversement proportionnelle entre la susceptibilité des cellules à être infectées par le VIH et l'activité tubuline déacétylase d'HDAC6 (Valenzuela-Fernandez et al., 2005). Les auteurs proposent que l'association entre la membrane plasmique et l'α-tubuline acétylée soit fortement influencée par HDAC6. Cette régulation agit sur la tension dynamique de la membrane plasmique et affecte le mécanisme de fusion et d'infection du VIH-1.

HDAC6 et prise en charge des "protéines clientes"

Un complexe de chaperonnes contenant HSP90 est essentiel pour la stabilité et la fonction des "protéines clientes" importante dans l'homéostasie cellulaire. Parmi ces "protéines clientes", le récepteur au glucocorticoïde est un excellent candidat.

A l'état non stimulé, le récepteur au glucocorticoïde est séquestré dans le cytoplasme à l'intérieur d'un complexe constitué des protéines HSP90 et HSP70, des co-chaperonnes HSP40, P23, HOP et d'immunophillines FKBP52 et CyP40.
Cet hétérocomplexe est requis pour une conformation optimale du récepteur pour favoriser la fixation du glucocorticoïde (Pratt, 1993). HSP90 et HSP70 sont nécessaires et suffisants pour

l'ancrage de la drogue et participent au changement conformationnel du domaine fixant le ligand afin de faciliter le transport du récepteur (Rajapandi et al., 2000).

La protéine HSP90 est identifiée comme substrat d'HDAC6 dans deux études indépendantes (Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005).
Les travaux de Kovacs en 2005 décrivent qu'une inactivation d'HDAC6 dans des cellules embryonnaires de rein humaines (293T) entraîne une hyperacétylation d'HSP90, une dissociation de sa principale co-chaperonne P23 et la perte de son activité dans la maturation des protéines clientes. Dans des cellules KO pour HDAC6, la maturation par HSP90 des récepteurs aux glucocorticoïdes est compromise. Ceci résulte d'un défaut de fixation du ligand sur le récepteur. Ainsi, la translocation nucléaire du récepteur ne se fait plus : il n'y a plus d'activation transcriptionnelle.
HSP90 est une cible d'HDAC6 et son acétylation réversible est un mécanisme qui régule l'activité chaperonne du complexe (Aoyagi and Archer, 2005; Kovacs et al., 2005; Murphy et al., 2005).

Les substrats et partenaires nucléaires d'HDAC6

Bien que localisée exclusivement dans le cytoplasme grâce à un mécanisme actif qui l'expulse du noyau, la protéine HDAC6 interagit avec des protéines nucléaires.
Des expériences par transfection transitoire montrent que le recrutement d'HDAC6 à un promoteur réprime la transcription, suggérant que la présence d'HDAC6 dans le noyau a un impact sur l'activité de certains gènes (Girdwood et al., 2003; Westendorf et al., 2002; Zhang et al., 2003). De plus, des expériences de déacétylation *in vitro* sur un peptide acétylé de la queue N-terminale de l'histone H4 permettent de conclure qu'en plus de son activité catalytique sur la tubuline acétylée, les queues N-terminales acétylées sont susceptibles d'être déacétylées par HDAC6 (Matsuyama et al., 2002)(article 3).
Néanmoins, cette activité catalytique sur les histones est quatre fois moins importante chez HDAC6 (Matsuyama et al., 2002) et le niveau d'acétylation de l'histone H3 et H4 dans des cellules ES déficientes en protéine HDAC6 ne varie pas significativement (Zhang et al., 2003). Ces observations laissent à penser qu'il n'est pas exclu que dans certains types cellulaires ou en réponse à certains signaux spécifiques, HDAC6 participe à la déacétylation très localisée d'histones et permet d'observer *in vivo* des effets très limité sur la transcription.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

- Le facteur de transcription Runx2

La formation de l'os est très liée à des mécanismes transcriptionnels d'induction et de répression séquentielle de gènes permettant un développement progressif.

Les facteurs de transcription Runx et ses régulateurs contrôlent cette différenciation cellulaire (Westendorf and Hiebert, 1999). Les protéines Runx sont localisées dans le noyau grâce à leur domaine C-terminal et interagissent avec l'ADN par leur domaine N-terminal (domaine d'homologie Runt) (Ogawa et al., 1993; Zaidi et al., 2001).
En 2002, Jennifer Westendorf et ses collègues ont montré pour la première fois qu'HDAC6 peut interagir avec le facteur de transcription Runx2. La déacétylase est alors recrutée sur la chromatine et réprime le promoteur de la protéine $p21^{WAF1}$ dans des lignées fibroblastiques ou ostéoblastiques. Grâce à son domaine C-terminal, Runx2 interagit avec HDAC6 pour réprimer ce promoteur (Westendorf et al., 2002).

- Le corépresseur LCoR

LCoR (pour ligand-dependent corepressor) est un corépresseur transcriptionnel recruté dans le noyau par des récepteurs au motif LXLL, comme le récepteur d'oestrogène α. Ce facteur est localisé exclusivement dans le noyau et intervient dans les premiers stades du développement fœtal de façon HDAC dépendante.

L'équipe du laboratoire de John White a montré que des HDACs, et en particulier HDAC3 et HDAC6, peuvent interagir avec des régions distinctes du corépresseur dans des expériences de pull down *in vitro* et de co-immunoprécipitation *in vivo* dans des cellules MCF7. Cette interaction décrit un mécanisme de répression supplémentaire de LCoR sur la chromatine (Fernandes et al., 2003).

- La protéine HDAC11

De la même façon, HDAC6 interagit avec la protéine HDAC11 exclusivement nucléaire (Gao et al., 2002). Les significations et les fonctions biologiques de cette interaction ne sont pas

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

très claires, les auteurs spéculent sur le fait que ce complexe pourrait agir sur des protéines non-histones mais rien n'a été démontré jusqu'à maintenant.

- L'histone acétyltransférase P300

Le recrutement de la protéine HDAC6 par l'histone acétyltransférase P300 sumoylée, exclusivement nucléaire, est une preuve supplémentaire de l'action d'HDAC6 dans le noyau. HDAC6 contrôle alors la fonction de P300 et réprime son activité transcriptionnelle.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Prise en charge des protéines ubiquitinées par HDAC6

L'ubiquitine est une petite protéine globulaire de 76 acides aminés découverte en 1971 (Hershko and Tomkins, 1971) et conservée au cours de l'évolution (de la levure à l'humain, seulement trois acides aminés sont différents). La conjugaison de l'ubiquitine à d'autres protéines (l'ubiquitination) est une des voies de modification covalente des protéines décrite au sein de la cellule (Hershko and Ciechanover, 1998).

La première fonction étudiée pour l'ubiquitine est la dégradation des protéines, importante pour l'élimination ou le remplacement des protéines cellulaires. L'ubiquitine intervient également dans d'autres fonctions cellulaires comme la transcription, la réparation de l'ADN, le trafic des vésicules et l'apoptose (Aguilar and Wendland, 2003; Welchman et al., 2005).

Système ubiquitine protéasome

L'ubiquitination est un processus multi étapes qui implique au moins 3 enzymes nommées E1, E2 et E3 (Pickart, 2001; Weissman, 2001). Les enzymes E1 activent l'ubiquitine en formant, de façon ATP dépendante, une liaison thiol-ester avec la glycine C-terminale de l'ubiquitine. L'enzyme E2 accepte l'ubiquitine activée de la protéine E1 par une réaction de transthiolation qui implique aussi la partie C-terminale de l'ubiquitine. Ensuite, une troisième enzyme, une protéine ligase (E3) reconnaît spécifiquement le substrat et catalyse le transfert de l'ubiquitine de la protéine E2 vers le groupement ε-amino d'un résidu lysine de la protéine à ubiquitiner.

D'autres ubiquitines peuvent être additionnées de la même façon pour former une chaîne dite de "polyubiquitine". A quelques exceptions près, cette chaîne est le signal cellulaire nécessaire pour la dégradation par le protéasome.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

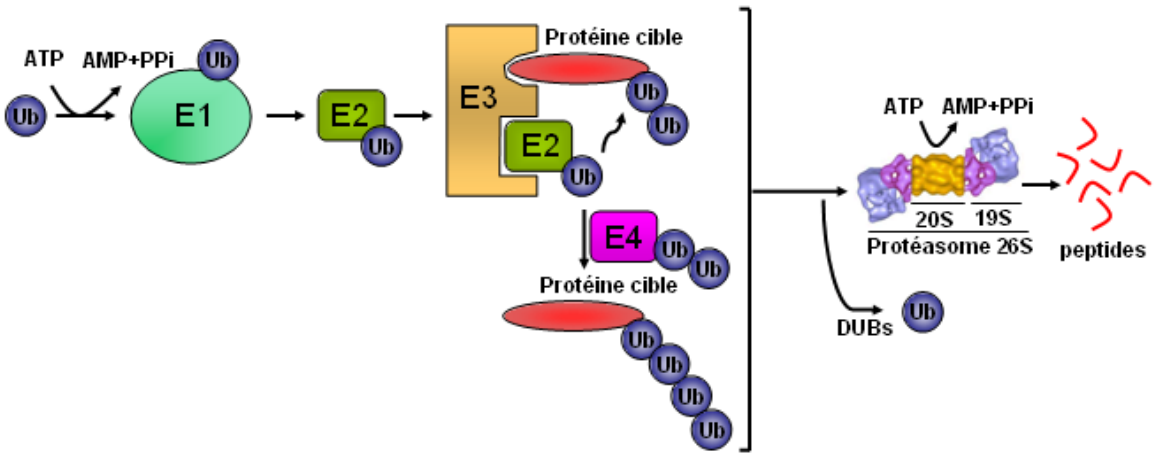


Fig.14 : Processus d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome

L'ubiquitination est un processus dynamique et réversible. Les enzymes déubiquitinantes (DUBs) ont plusieurs fonctions et sont des régulateurs importants de la voie de l'ubiquitine. Elles permettent de cliver les ubiquitines des protéines et désassemblent les chaînes de polyubiquitines. Certaines de ces enzymes sont importantes dans la transformation des ubiquitines immatures codées en multigènes, en ubiquitine mature disponible pour la cellule (Weissman, 2001).

La conséquence la plus décrite et la plus caractérisée de l'ubiquitination est la dégradation par le protéasome. Le protéasome 26S, composé en générale d'une sous-unité 20S et d'une sous-unité 19S, catalyse la dégradation non lysosomiale des protéines d'une façon ATP dépendante (Ciocca et al., 1993).

Après avoir été pris en charge par des protéines HSPs (Connell et al., 2001; Parcellier et al., 2003), les substrats ubiquitinés sont acheminés puis attachés au protéasome 26S via une interaction entre la chaîne d'ubiquitines et les composants de la sous unité 19S ("le couvercle"). La chaîne de polyubiquitines est désassemblée par la protéine Rpn11 du couvercle (Verma et al., 2002) et il s'en suit un dépliement du substrat par les ATPases de la base de la petite sous-unité 19S. Le substrat subit finalement une protéolyse dans la sous-unité 20S du protéasome.

Les protéines régulatrices comme les cyclines, les facteurs de transcription, les oncoprotéines et d'autres protéines sont majoritairement éliminées par ce mécanisme.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Le signal minimum pour activer la dégradation par le protéasome est une chaîne de quatre ubiquitines (Thrower 2000). L'assemblage de ces chaînes peut faire intervenir une quatrième classe de protéines, nommée E4, ces enzymes sont capables d'allonger les chaînes après l'ajout de la première ubiquitine par la protéine E3 ligase sur le substrat (Koegl 1999).

Ubiquitination et acétylation : rôle d'HDAC6

Avant même de découvrir son activité de tubuline déacétylase, HDAC6 a été décrite comme une protéine capable d'interagir avec l'ubiquitine et des protéines liées au système ubiquitine-protéasome (Seigneurin-Berny et al., 2001).
Sur le coté C-terminal de la protéine, il existe un domaine en doigt de zinc d'interaction avec la mono et la polyubiquitine ne possédant pas d'activité enzymatique isopeptidasique (Hook et al., 2002).

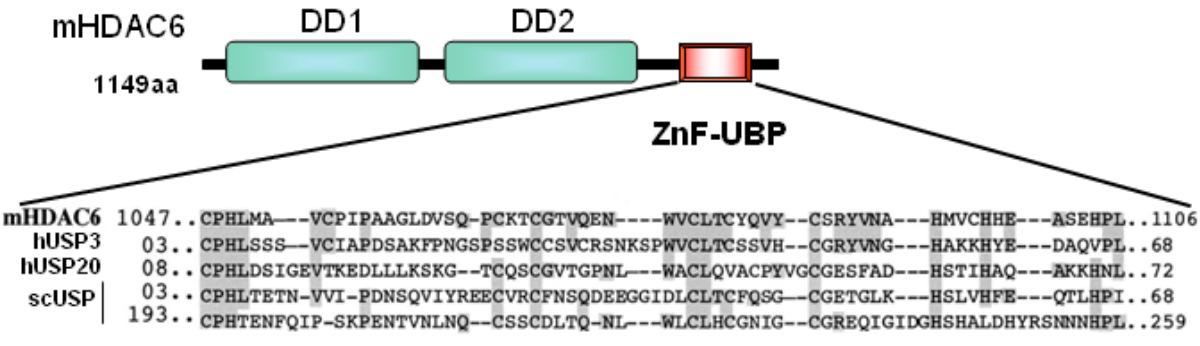


Fig.15 : Comparaison de séquences du domaine Znf-UBP de mHDAC6 avec des protéases de l'ubiquitine (USPs)

La partie centrale de ce motif est similaire à des régions trouvées dans la protéine BRAP2 (pour BRCA1-associated protéine 2) et quelques protéases de l'ubiquitine (USPs). Ce domaine dispose de plusieurs noms et se réfère au domaine DAUP (pour deacetylase ubiquitin specific protease) (Amerik et al., 2000), ou Znf-UBP (pour ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-like zinc finger) (Seigneurin-Berny et al., 2001) ou encore le domaine HUB (pour HDAC6, USP3, BRCA1-related) (Bertos et al., 2001). Due à sa capacité à fixer les chaînes de polyubiquitines, ce motif est encore connue sous le nom de domaine PAZ (pour polyubiquitin-associated zinc finger) (Hook et al., 2002) ou de domaine BUZ (pour bound to

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

ubiquitin zinc finger) (Hubbert et al., 2002; Kawaguchi et al., 2003). La liaison avec l'ubiquitine n'a pas d'action sur l'activité catalytique des domaines déacétylases voisins (Seigneurin-Berny et al., 2001).

Il existe un isoforme chez *C.elegans* caractérisé par l'absence du domaine Znf-UBP. De façon intéressante, des orthologues d'HDAC6 chez *A.thaliana* et *D.melanogaster* sont homologues à cet isoforme retrouvé dans le nématode. La déacétylase semble évoluer en regroupant deux fonctions cellulaires distinctes en une seule. Ceci reflète soit un gain de temps ou d'énergie pour ces deux fonctions, soit l'apparition d'une nouvelle fonction propre aux eucaryotes supérieurs.

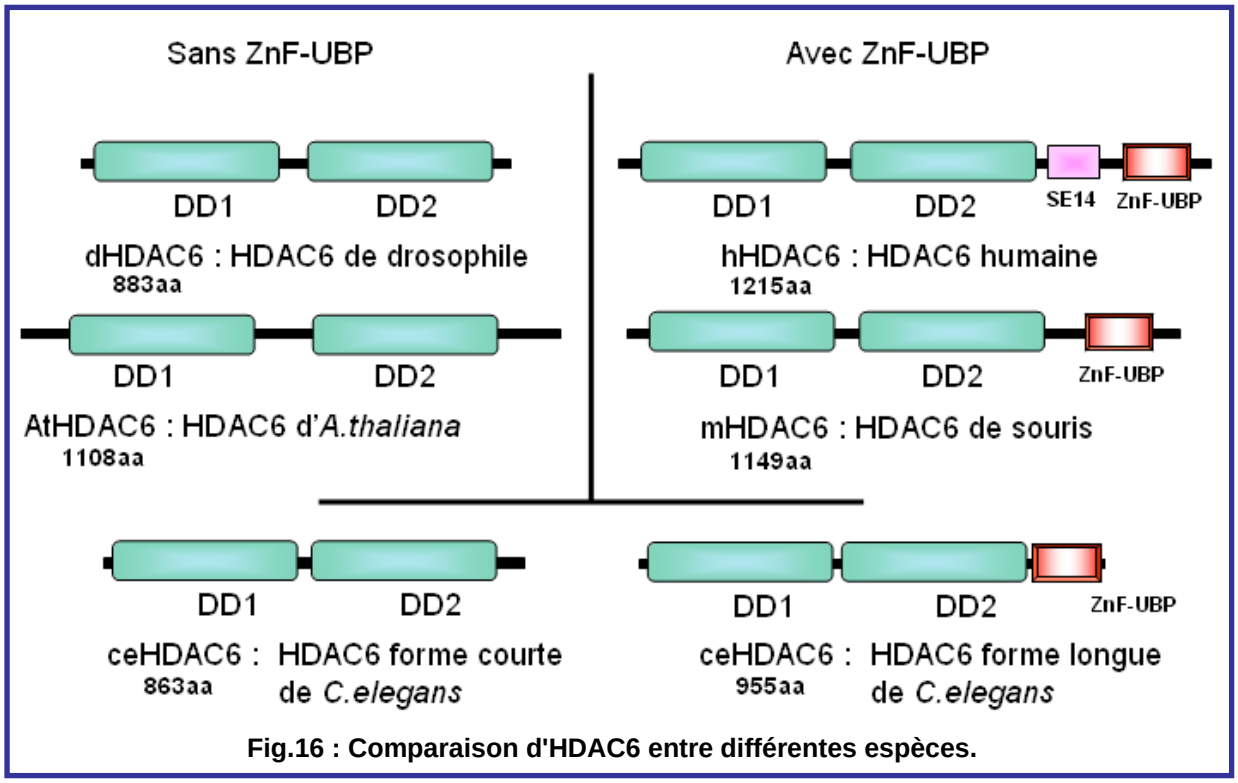


Fig.16 : Comparaison d'HDAC6 entre différentes espèces.

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

Dans les testicules où son expression protéique est maximale, HDAC6 forme un complexe avec la protéine VCP (pour Valosin containing protein) et la protéine PLAP (pour phospholipase activating protein). Ces protéines, homologues de CDC48 et UFD3 de levure, sont des acteurs décrits dans la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine pour la première (Ghislain et al., 1996) et dans la régulation de la concentration d'ubiquitine libre chez la levure pour la seconde (Johnson et al., 1995).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

D'une manière intéressante, le complexe est dissocié après fixation de l'ubiquitine par HDAC6 suggérant que cette dernière intervient dans des voies de régulation de l'ubiquitine. La conséquence de cette libération de VCP et PLAP n'est pas clairement définit mais l'hypothèse avancée serait que la protéine VCP ait une participation dans la libération de l'ubiquitine fixée par HDAC6.

Intervention d'HDAC6 dans la formation d'agrésomes.

La protéine HDAC6 contribue à la protection de la cellule grâce à la prise en charge des d'agrégats protéiques nocifs.

L'accumulation d'agrégats protéiques dans les corps d'inclusion cellulaires est un trait pathologique commun à l'ensemble des maladies neurodégénératives (Taylor et al., 2002). La formation de ces corps d'inclusion apparaît comme une réponse cytoprotectrice servant à séquestrer et sûrement faciliter l'élimination d'agrégats protéiques toxiques pour la cellule (Kopito, 2000; Taylor et al., 2002). Les corps d'inclusion dans les cellules eucaryotes sont formés par transport rétrograde d'agrégats de protéines mal repliées le long des microtubules à une structure péricentriolaire appelée agrésome (Kopito, 2000).

Expérimentalement, les agrésomes sont formés en réponse à l'inhibition du système ubiquitine-protéasome, le principal mécanisme pour éliminer les protéines mal repliées avant leur agrégation. Les agrésomes sont enrichis en composants cytoplasmiques de la machinerie de "contrôle qualité" comme des chaperonnes moléculaires et des sous-unités du protéasome et fréquemment, mais pas toujours, de conjugués ubiquitinés. Leur formation est supprimée en présence de drogues agissant sur le cytosquelette de microtubules.

La protéine HDAC6 est importante dans la formation des agrésomes (Kawaguchi et al., 2003; Wang et al., 2005). HDAC6 est un adaptateur capable de fixer simultanément le moteur dynéine/dynactine et les chaînes polyubiquitinées des protéines mal repliées lors d'un traitement provoquant la formation des agrésomes.

L'exposition à des inhibiteurs du protéasome comme le MG132 mobilise HDAC6 dans une région cytoplasmique qui co-localise avec des marqueurs d'agrésomes. Des protéines polyubiquitinées de haut poids moléculaires et HDAC6 peuvent être immunoprécipitées avec un anticorps anti-dynéine et l'utilisation d'ARN interférence éliminant la production d'HDAC6, annule cette association. La protéine HDAC6 fixe les protéines ubiquitinées par

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

son domaine Znf-UBP et utilise le réseau de microtubules pour un transport rétrograde vers les agrésomes grâce à son interaction entre ses deux domaines déacétylases avec le moteur de dynéine/dynactine.

HDAC6 et sumoylation

La sumoylation est la conjugaison d'une molécule nommée SUMO (pour Small Ubiquitin-like MOdifier) sur un substrat qui est le plus souvent un régulateur cellulaire. La sumoylation est un processus réversible auquel on a attribué une variété de fonctions. Une de ces fonctions décrit la sumoylation comme régulateur de la localisation des protéines à l'intérieur ou autour du noyau. Parce que la sumoylation touche les mêmes lysines que l'ubiquitination, il est décrit que cette modification post-traductionnelle régule négativement l'ubiquitination et finalement la dégradation (Gill, 2004).
La modification par sumoylation a également des impacts sur l'activité transcriptionnelle. La sumoylation de protéines activatrices est reliée à leur rétention et leur inactivation après leur entrée dans une structure particulière du noyau : les corps nucléaires.
Par exemple, la protéine PML produite par le gène leucémique promyélocytaire est détectée dans des structures subnucléaires appelées PODs (pour PML oncogenic domains) ou corps nucléaires (Strudwick and Borden, 2002).
De façon similaire, la protéine P53 est modifiée par SUMO à la suite d'une irradiation par des UV : cette sumoylation est un processus essentiel dans l'induction de l'apoptose P53 dépendante (Muller et al., 2000). D'autres facteurs de transcription comme c-jun, HSF1 et HSF2, les récepteurs aux androgènes, SP3 et P300 sont des cibles pour la sumoylation (Kim et al., 2002; Ross et al., 2002).

Girdwood et ses collègues (Girdwood et al., 2003) ont localisé le domaine de répression transcriptionnel du co-activateur P300. Ils ont trouvé que cette région contient des sites de fixation à SUMO-1.
P300 modifié par SUMO recrute HDAC6 et réprime sa fonction d'activateur. Un traitement avec des inhibiteurs d'HDACs ou des siRNA dirigés contre HDAC6 abolissent la répression de P300 par cette HDAC.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC6 et Cancer

Il est maintenant bien établi que les oestrogènes jouent un rôle important dans la croissance et le développement des glandes mammaires, mais aussi pour l'initiation et la progression des cancers du sein dépendants des l'oestrogènes.
L'effet des oestrogènes dans la tumorigenèse des tissus du sein se fait au travers des récepteurs aux oestrogènes. En clinique, le statut des récepteurs aux oestrogènes des patients atteints d'un cancer du sein est largement utilisé soit comme indicateur de bonne réaction à une thérapie endocrine, ou soit comme pronostique. De multiples d'études ont été menées pour identifier des facteurs alternatifs ou prédictifs. L'analyse par technologie des puces à ADN du profil d'expression des gènes, a été utilisée pour élucider le système de signalisation des oestrogènes dans les cellules MCF-7. Ce profil indique que le gène HDAC6 est un gène régulée à la suite d'un traitement aux oestrogènes (Hayashi et al., 2003; Inoue et al., 2002).

Les ARNm d'HDAC6 sont exprimés à un niveau significatif sur des petites tumeurs de patients atteints d'un cancer du sein.
Les patients avec un haut niveau d'expression d'ARNm et de protéine d'HDAC6 ont un meilleur pronostic en terme de taux de survie. Le niveau d'expression des ARNm d'HDAC6 est donc un nouvel indicateur pronostic et indicateur de bonne réaction pour une thérapie endocrine dans le cancer du sein (Zhang et al., 2004).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC10

HDAC10 est le membre le plus récent découvert dans la classe II des HDACs. Deux espèces d'ARNm de tailles différentes ont été trouvés, suggérant l'existence de deux variants d'HDAC10 (Fischer et al., 2002). L'analyse des séquences protéiques montre que HDAC10 est homologue à HDAC6 avec 37% de similarités (Guardiola and Yao, 2002).
HDAC10 renferme un domaine catalytique sur sa partie N-terminale, une séquence NES et un domaine incomplet côté C-terminal. De plus, deux domaines potentiels fixant la protéine RB ont été découverts sur la protéine HDAC10, suggérant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Fig.10).

HDAC10 a été montrée comme interagissant avec HDAC1,-2 et -3 (et/ou SMRT) et HDAC4,-5 et -7 mais pas avec HDAC6 bien que des résultats contradictoires soient présentés dans la littérature. Le fait que la protéine HDAC10 soit capable de s'associer avec d'autres HDACs indique qu'elle agit plus comme un recruteur de protéines à activité HDAC plutôt qu'une déacétylase elle-même. Toutefois, seule, cette enzyme a malgré tout une activité déacétylase (Fischer et al., 2002; Guardiola and Yao, 2002; Kao et al., 2002; Tong et al., 2002)

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Organisation des HDACs de classe III

La troisième classe d'HDACs est reliée au répresseur transcriptionnel Sir2 (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000). La protéine Sir2 de levure a été découverte à la suite d'une recherche de mutants empêchant le silencing transcriptionnel du loci HM chez la levure.

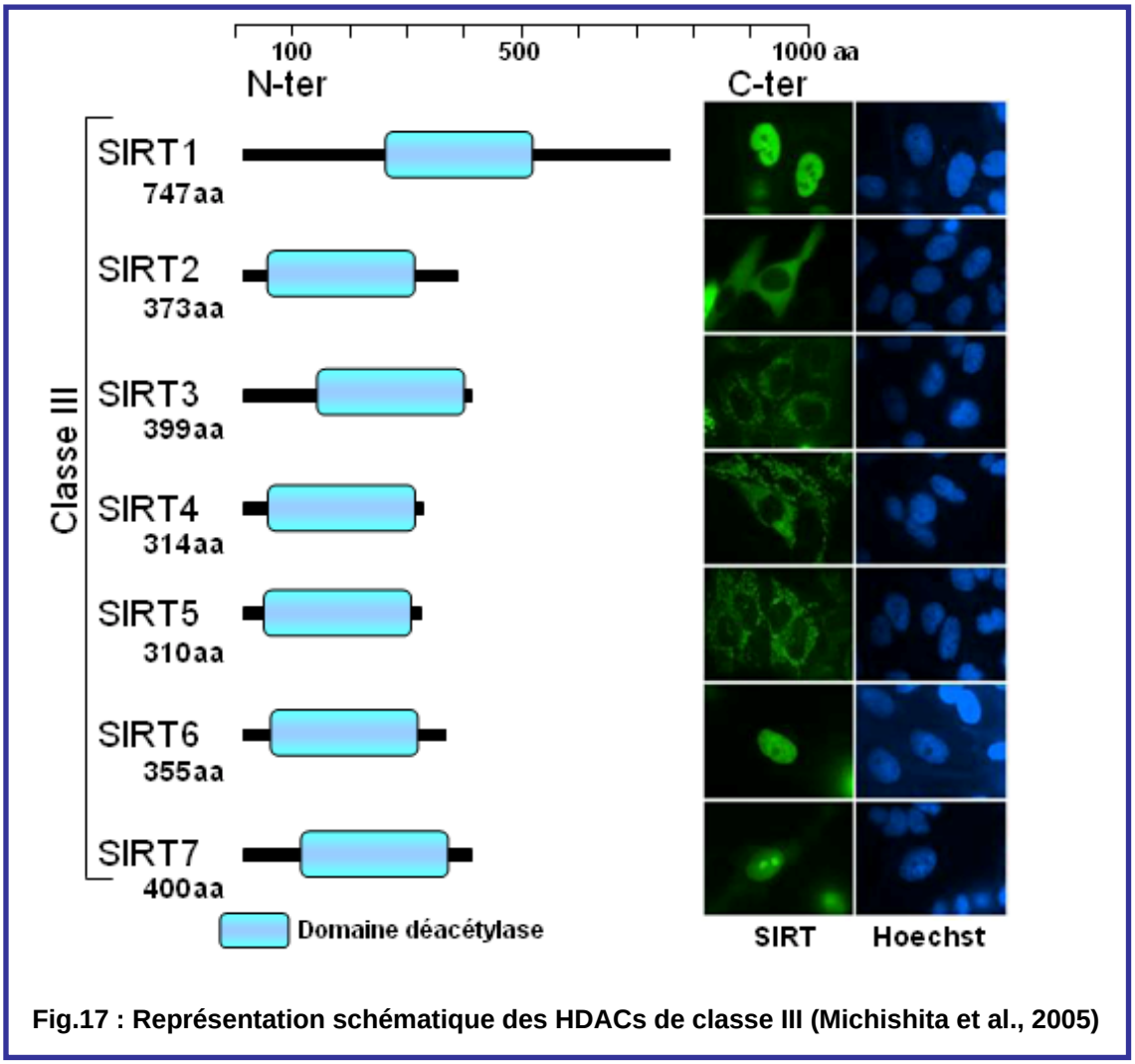


Fig.17 : Représentation schématique des HDACs de classe III (Michishita et al., 2005)

Mécanisme de déacétylation des HDACs de classe III

La famille des enzymes Sir2 contient un domaine catalytique de 275 acides aminés qui n'a aucun lien de parenté avec les HDACs de classe I et II. En effet, un mécanisme complètement différent requiert le nicotine adénine dinucléotide (NAD) comme substrat. Sir2 couple la

déacétylation des histones au clivage d'une liaison de haute énergie du NAD (Moazed, 2001). Cette réaction de déacétylation est étroitement liée à la formation d'un acétyl-ADP-ribose. Une molécule de NAD et une molécule d'acétyl lysine sont catalysées en une molécule de lysine déacétylée, nicotinamide et un O-acetyl-ADP-ribose (Avalos et al., 2005; Tanner et al., 2000) (Fig.18).

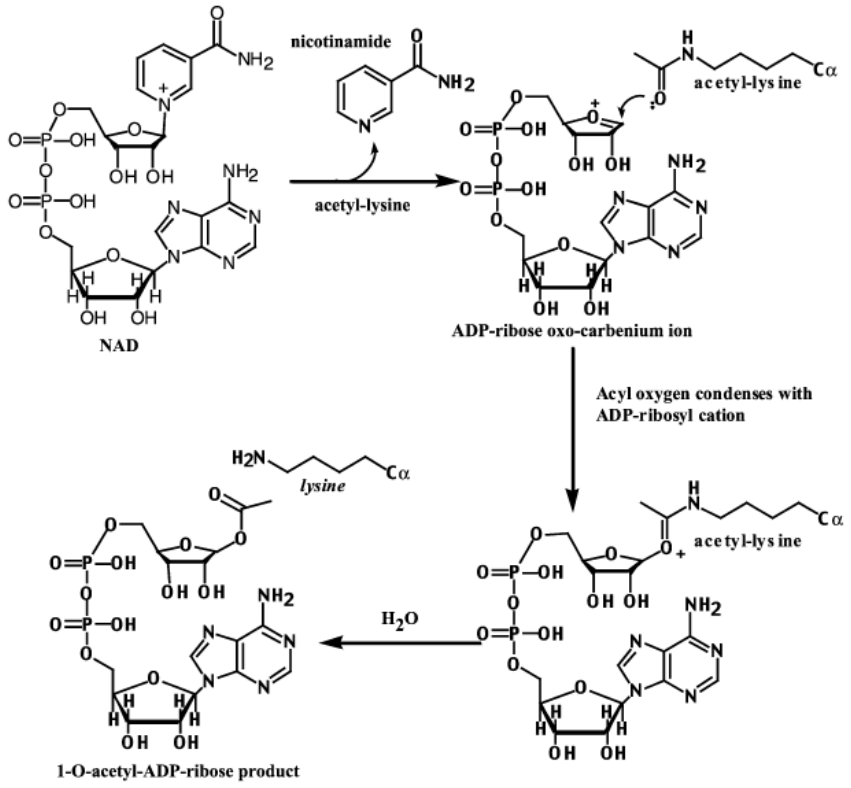


Fig.18 : Mécanisme proposé pour la déacétylation des HDACs de classe III (Avalos et al., 2005)

Caractéristiques structurales.

Les structures de 4 sirtuines (Sir2-Af1 et Sir2 Af2 d' *Archaeoglobus fulgidus*, SirT2 humaine et Hst2 de levure) ont été obtenues à une résolution atomique et un grand nombre de points communs ont été relevés (Avalos et al., 2002; Finnin et al., 2001; Min et al., 2001; Zhao et al., 2004).

Les quatre protéines sont organisées en deux domaines globulaires : un petit domaine avec deux modules distincts, et un domaine large.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Le domaine large contient une structure ouverte renversée α/β de type repliement de Rossmann qui est communément retrouvé dans les protéines qui fixent le NAD ou NADP oxydé ou réduit (Avalos et al., 2002; Finnin et al., 2001; Min et al., 2001).
Le petit domaine, quant à lui est composé de deux modules structuraux résultant de deux insertions dans le domaine large (Avalos et al., 2002; Finnin et al., 2001; Min et al., 2001). La première insertion est constituée de trois hélices α qui forment un module hélical. La deuxième insertion forme un module qui fixe le zinc, composé de feuillets β antiparallèles contenant deux motifs Cys-X-X-Cys (où X est n'importe quel acide aminé), séparés par 15 à 20 acides aminés, impliqués dans la coordination avec le zinc (Avalos et al., 2002; Finnin et al., 2001; Min et al., 2001). Le remplacement des cystéines par des alanines abolit l'activité enzymatique *in vitro* et l'activité de silencing *in vivo* aux télomères et aux loci d'ADNr (Min et al., 2001; Sherman et al., 1999).

La poche qui fixe le NAD, localisée sur le domaine large peut être divisée en trois régions spatiales différentes : le site A où la partie adénine-ribose du NAD est fixée. Le site B où la partie nicotinamide-ribose est fixée et le site C localisé en profondeur dans la poche à NAD (Min et al., 2001). Les sites B et C sont directement impliqués dans la catalyse : En présence d'une lysine acétylée, le NAD se fixe au site B et provoque un changement de conformation, fixe le groupe nicotinamide à la proximité du site C, où il peut être clivé (Min et al., 2001). Le produit ADP ribose de cette réaction peut retourner au site B, où la déacétylation de la lysine s'effectue. L'organisation de la poche à NAD permet d'expliquer comment le nicotinamide peut inhiber l'activité des sirtuines. A haute concentration, du nicotinamide libre peut occuper le site C, sans savoir si une lysine acétylée est fixée, et bloquer l'enzyme par un changement conformationnel (Bitterman et al., 2002).

A l'heure actuelle, il est difficile de savoir si toutes les classes de sirtuines ont une activité déacétylase. Pour l'instant, seulement la classe I des sirtuines humaines (SirT1, SirT2, SirT3) ont une forte activité enzymatique sur un peptide correspondant à la partie N-terminale de la queue de l'histone H4 (North et al., 2003). Sirt5, de la classe III des sirtuines, possède une activité faible mais détectable par comparaison à la classe I. Toutefois, la classe III des sirtuines de *A.fulgidus*, Sir2-Af1, dispose également d'une faible activité sur le peptide histone mais une très forte activité sur la sérum albumine bovine acétylée. Ceci laisse à penser que le niveau d'activité déacétylase est substrat spécifique (Avalos et al., 2002; Min et al., 2001).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Fonction et régulation des Sirtuines

Chez la levure, Sir2 est retrouvée dans deux complexes majeurs. Un est constitué de Sir2, Sir3 et Sir4 et est responsable du silencing du télomère et du loci HM. Un second comprend Sir2, Net1 et cdc14 et supprime les recombinaisons génétiques au locus ADNr. Ce complexe est situé dans le nucléole et associé avec des répétitions en tandem d'ADNr.

La protéine Sir2 télomérique est requise pour le maintien de l'intégrité du génome et joue un rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN (Palladino et al., 1993). Toutefois, au locus ADNr, la protéine de levure Sir2 inhibe la recombinaison génétique et ainsi module la durée de vie (Defossez et al., 2001; Guarente, 2000).
Les répétitions d'ADNr permettent la recombinaison, celles-ci peuvent être épissées et former des cercles extrachromosomiques. Ces cercles s'accumulent dans les vieilles cellules et peuvent faire décroître la durée de vie des levures. En effet, une répression de la protéine responsable de la recombinaison au locus d'ADNr permet à la levure de récupérer cette diminution de durée de vie (Kaeberlein et al., 1999). La fréquence de recombinaison dans les répétitions d'ADNr est réduite par la formation d'une chromatine hypoacétylée et condensée par Sir2. Augmenter le dosage de Sir2 augmente la durée de vie, suggérant que le niveau de Sir2 est limitant.
Comme le niveau de NAD est étroitement lié à l'activité de la cellule, il est décrit que Sir2 est régulée par des voies métaboliques (Lin et al., 2000). La croissance avec des conditions riches en glucose induit l'augmentation du métabolisme, entraînant une réduction de NAD en NADH. Cette réduction du taux de NAD supprime l'activité déacétylase de Sir2 et augmente le taux de recombinaison et ainsi le raccourcissement de la durée de vie.

Cette notion d'effet des Sirtuines sur la durée de vie réplicative n'a été montrée que chez la levure et le nématode et n'est pas directement applicable sur des cellules mammifères. En effet, une étude récente (Michishita et al., 2005) a conclue que la durée de vie réplicative de cellules humaines normales ne peut pas être modulée à la suite d'une augmentation de l'expression d'une simple protéine SIRT. Les auteurs observent un fort contraste entre l'effet de l'allongement de la vie (par l'expression des protéines SIR2 dans les eucaryotes inférieurs) (Kaeberlein 1999, Tissenbaum et Guarente 2001, Rogina et Helfand 2004) et l'absence d'effet qu'ils obtiennent en transfectant n'importe quelle sirtuine humaine dans des cellules

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

d'eucaryotes supérieurs. Ceci indique qu'il existe une régulation complexe de l'âge réplicatif des cellules humaines.

Les Sirtuines humaines

Chez les eucaryotes, le génome code pour 7 Sirtuines qui se répartissent dans des sous-classes allant de I à IV (table 4) (Frye, 2000).

Nom	Sous classe	Identifiant OMIM (NCBI)	Localisation intracellulaire	Partenaires	cible	orthologues	
						levure	Souris
SIRT1	Ia	604479	Nucléaire Corps PML	P53, PML, P/CAF, HES1 HEY2, CTIP1, CTIP2	H3, H4, P53, TAFI68 P/CAF, MyoD	Sir2, Hst1	SIR2β
SIRT2	Ib	604480	cytoplasme	HDAC6	Tubuline	Hst2	SIR212
SIRT3	Ib	604481	Mitochondrie	MMP	H4	Hst3	SIR213
SIRT4	II	604482	Mitochondrie				SIRT4
SIRT5	III	604483	Mitochondrie				SIRT5
SIRT6	IVa	606211	Nucléaire				SIRT6
SIRT7	IVb	606212	Nucléaire				SIRT7

Table 4 : Informations diverses sur les Sirtuines humaines

Les fonctions et les substrats des sirtuines humaines SIRT1, -2 et -3 sont largement documentés alors que peu d'éléments sont connus sur les protéines SIRT4, -5, -6 et SIRT7.

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).

Le fait que la protéine Sir2 de *S.cerevisiae* régule aussi l'ADNr suggère que Sir2 et SIRT1 peuvent avoir des fonctions similaires. La déacétylation de Sir2α, orthologue murin de SIRT1 humain, inhibe l'initiation de la transcription *in vitro* (Muth et al., 2001).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

SIRT1 est également connue pour interagir avec les protéines répresseurs à domaine bHLH : hHES1 et hHEY2 (Takata and Ishikawa, 2003). De plus, une interaction similaire est retrouvée chez la drosophile avec les répresseurs Hairy et deadpan. Ces protéines à domaine bHLH, sont elles aussi des répresseurs transcriptionnels et jouent des rôles importants dans divers aspects du développement.

Par ailleurs, il a été montré que SIRT1 pouvait former un complexe avec l'histone acétyltransférases PCAF et le facteur de transcription MyoD, et déacétyler les deux protéines (Fulco et al., 2003). Bien que la régulation transcriptionnelle par SIRT1 se fasse sur TAF_I68, MyoD et P53 (voir plus loin) identifiées comme des cibles non histones, SIRT1 peut réguler directement l'acétylation des histones grâce à des facteurs qui fixent l'ADN comme CTIP1 et CTIP2 (COUP-TF-interacting proteins 1 et 2) ou le complexe MyoD/PCAF (Fulco et al., 2003; Senawong et al., 2003). Ceci montre bien l'implication de SIRT1 comme un répresseur transcriptionnelle au travers de la déacétylation des protéines histones et non histones.

L'activité déacétylase de SIRT1 a également été impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN par le biais d'une déacétylation du suppresseur de tumeur P53 (Luo et al., 2001; Michishita et al., 2005; Vaziri et al., 2001), un facteur de transcription qui régule des processus comme le cycle cellulaire, la mort cellulaire, la réparation de l'ADN, en réponse à une variété de signaux de stress.

La protéine P53 est acétylée sur deux lysines, lysine 320 et lysine 382, en réponse au dommage de l'ADN, pour mener cette activation (Gu and Roeder, 1997; Liu et al., 1999; Sakaguchi et al., 1998). L'acétylation par l'acétyltransférase P300 régule positivement l'activité de P53, et la déacétylation par HDAC1 et SIRT1 régule négativement son activité (Gu and Roeder, 1997; Vaziri et al., 2001). La déacétylation de P53 par SIRT1 supprime l'induction de l'apoptose et prolonge la vie cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN (Luo et al., 2001). SIRT1 et P53 peuvent être localisées dans les corps leucémiques promyélocytaires (PML) (Langley et al., 2002), structures subnucléaires altérées ou détruites dans certaines tumeurs en réponse à différents stress cellulaires (Strudwick and Borden, 2002).

SIRT1 semble être la seule déacétylase humaine de la classe III capable de déacétyler la protéine P53 *in vivo* malgré la présence dans le noyau de SIRT6 et SIRT7 (Michishita et al., 2005). Ceci indique que P53 n'est pas le substrat majeur *in vivo* des autres protéines SIRT

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Plusieurs études suggèrent que SIRT1 déacétyle la protéine P53 et que cette enzyme intervient dans l'apoptose et la sénescence cellulaire (Gu and Roeder, 1997; Langley et al., 2002; Liu et al., 1999; Luo et al., 2001; Michishita et al., 2005; Sakaguchi et al., 1998; Vaziri et al., 2001).

Deux études (Cheng et al., 2003; McBurney et al., 2003a) ont utilisées des expériences de mutagenèse dirigée dans la souris pour examiner les conséquences de l'expression d'un mutant SIRT1 dont une partie du domaine catalytique a été supprimée ou lorsque la totalité du gène orthologue de SIRT1 (Sir2α) est éliminé. Les auteurs ont montré que les animaux homozygotes sans allèle de Sir2α, étaient nés avec une fréquence deux fois moins importantes que des souris normales, suggérant une létalité prénatale. Les embryons et les souriceaux homozygotes étaient d'une taille plus petite que la normale mais pouvaient survivre à l'âge adulte. Toutefois, les femelles avaient des problèmes d'ovulation et les mâles, une spermatogenèse inefficace (McBurney et al., 2003b).

De façon inexpliquée, il n'y a pas de défaut du silencing des gènes dans les animaux KO pour Sir2α, suggérant que les orthologues de SIRT1 ont des rôles différents chez les mammifères et chez les levures. Il se pourrait que le silencing des gènes ne s'opère que sur une petite partie de gènes mammifères ou qu'une autre protéine prenne le relais de la fonction de SIRT1 (McBurney et al., 2003a; McBurney et al., 2003b). Dans la deuxième étude qui utilise des souris exprimant SIRT1 où une partie du domaine catalytique est manquante (Cheng et al., 2003), les auteurs aboutissent aux mêmes problèmes de développement avec une mort postnatale plus importante. Cette étude montre en plus une hyperacétylation de P53 en réponse à la radiation ionisante, suivie de l'apoptose.
Le phénotype de ces souris KO suggère que la protéine SIRT1 est essentielle pour une embryogenèse normale et dans la reproduction des deux sexes chez les mammifères.

SIRT2

La protéine humaine SIRT2 est similaire en séquence à la protéine de levure Hst2. De plus, les deux protéines sont localisées dans le cytoplasme (Afshar and Murnane, 1999; Perrod et al., 2001), où Hst2 affecte le silencing de la chromatine au travers d'un mécanisme inconnu (Perrod et al., 2001).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

SIRT2 colocalise avec le réseau de microtubules et déacétyle la lysine 40 de l'α-tubuline (North et al., 2003). Le même résidu est d'ailleurs déacétylé par HDAC6 et amène un changement dans la mobilité cellulaire (Hubbert et al., 2002). SIRT2 et HDAC6 sont retrouvés le long des microtubules et peuvent co-immunoprécipiter, suggérant que les deux protéines coordonnent la régulation du niveau d'acétylation de la tubuline.
Des expériences récentes ont montrées que SIRT2 est régulée avant la mitose. Ceci suggère que cette protéine a un rôle dans la régulation du cycle cellulaire (Dryden et al., 2003). SIRT2 est rapidement dégradée après la mitose, et la surexpression de formes mutantes de SIRT2 ralentie le départ de la cellule en mitose.

Un des rôles de SIRT2 dans la pathogenèse des cancers à été démontré en utilisant une approche protéomique (Hiratsuka et al., 2003). Le gène SIRT2, localisé sur le chromosome 19, est le lieu d'une région fréquemment délétée dans les gliomes humains. Le niveau des ARNs de SIRT2 et son expression protéique sont fortement réduits dans une grande partie des lignées cellulaires de gliomes humains (Hiratsuka et al., 2003). Une expression ectopique de SIRT2 dans ces cellules supprime la formation de colonies et modifie le réseau de microtubules.
Ces résultats indiquent que SIRT2 peut agir comme suppresseur de tumeur et peut avoir comme fonction de contrôler le cycle cellulaire et l'acétylation de l'α-tubuline.

SIRT3

La protéine SIRT3 humaine est localisée dans la matrice mitochondriale (Onyango et al., 2002; Schwer et al., 2002) (figure 4) et son import dans la mitochondrie est réalisé grâce à un domaine en hélice alpha coté N-terminal de la protéine. La protéine, qu'elle soit endogène ou surexprimée, est clivée par protéolyse sur sa partie amino-terminale in vivo, résultant d'une perte des cents premiers acides aminés.
Ce clivage peut être observé in vitro par l'action d'une peptidase : la protéine MMP (pour mitochondrial-matrix processing peptidase) (Schwer et al., 2002). La protéine SIRT3 non clivée ne possède pas d'activité enzymatique, elle devient une enzyme après avoir été coupée par la MMP.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Bien que la protéine SIRT3 montre une bonne activité déacétylase sur le peptide H4 *in vitro*, l'absence des histones dans la mitochondrie suggère que des protéines non histones soient les principales cibles (Onyango et al., 2002; Schwer et al., 2002).

Les autres SIRT humaines

Les protéines humaines SIRT4, SIRT5, SIRT6 et SIRT7 montrent une faible ou indétectable activité enzymatique sur le peptide de l'histone H4 (North et al., 2003). Ceci peut refléter une spécificité de substrats différente ou un besoin de cofacteurs différents pour observer leur activité enzymatique. Une étude récente a montré que SIRT4 et SIRT5 sont localisées dans la mitochondrie de façon identique à SIRT3 alors que SIRT6 et SIRT7 ont plutôt une localisation subnucléaire comme SIRT1 (Michishita et al., 2005). Les auteurs confirment *in vitro* qu'il n'y a pas d'activité déacétylase de SIRT6 et SIRT7 sur les peptides P53 et de l'histone H4.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Les inhibiteurs des histones déacétylases et drogues anticancéreuses.

La découverte de drogues anticancéreuses n'a cessé de se développer depuis ces dernières années. Les principaux moyens employés pour lutter contre cette maladie ont évolué d'une chimiothérapie conventionnelle à une approche plus ciblée sur les mécanismes de bases ayant pour but d'arrêter la croissance de la tumeur.

Les progrès rapides de la recherche sur la chromatine ont offert une pléthore de cibles potentielles pour intervenir contre le cancer. Parmi elles, on retrouve les HDACs, qui sont largement impliquées dans la croissance et le contrôle transcriptionnel. De plus, l'utilisation de nouvelles molécules inhibitrices de l'activité déacétylase provoque l'apoptose des cellules tumorales.

Inhibiteurs de la classe I et II des déacétylases

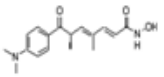
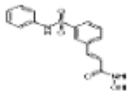
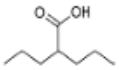
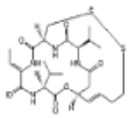
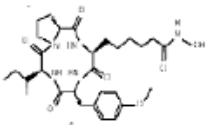
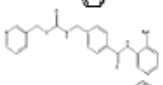
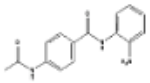
L'antibiotique, antifongique trichostatine A a été le premier inhibiteur d'HDACs identifié comme agent antiprolifératif. Quoiqu'il n'ait jamais progressé comme candidat clinique, il a été un outil majeur dans la validation des HDACs comme des cibles anticancéreuses. La TSA est un produit basé sur un acide hydroxamique. Il atteint le site actif des HDACs, chélate l'ion Zn^{2+} et inhibe l'enzyme à des concentrations nanomolaires (Fig.5). D'autres inhibiteurs d'HDACs, basés sur l'acide hydroxamique, comme SAHA et PXD101 sont actuellement en essais cliniques (Fig.19 et Fig.20) comme agents anticancéreux et offrent des propriétés améliorées par rapport à la TSA.

Le plus avancé, SAHA, est actuellement en phase II d'essais cliniques et a été démontré comme bien toléré par voie orale ou intraveineuse (Kelly et al., 2005).

Moins convaincant que les hydroxamates, les dérivés d'acides aliphatiques comme l'acide valproïque et le butyrate (Fig.19) ont aussi été développés contre le cancer dans des essais cliniques. Leur activité d'inhibiteur d'HDACs a été clairement montrée et l'acide valproïque est également utilisé dans des traitements anti-épileptiques (Blaheta et al., 2002).

Un autre produit naturel inhibiteur d'HDACs est le depsipeptide (FK-228), qui est actuellement employé dans des essais en phase II contre des lymphomes cutanés (Marshall et

al., 2002; Sandor et al., 2002). Ce tétrapeptide cyclique est isolé de *Chromobacterium violceum*. Un autre tétrapeptide cyclique hybride, CHAPS, est aussi un inhibiteur d'HDACs (Furumai et al., 2001; Komatsu et al., 2001).

Famille	nom	Structure	[conc]	Effets *in vitro*	Action clinique
Acides hydroxamiques	TSA		nM	Apop / Diff /Arrêt	Pas utilisé
	SAHA		µM	Apop / Diff / Arrêt	Tumeurs solides et hématologiques
	PXD101		µM	Diff / Arrêt	Inhibe la croissance des tumeurs
Acides aliphatiques	Butyrate		mM	Apop / Diff /Arrêt	Cancers de la prostate
	Valproate		mM	Apop / Diff	Anti épileptique
Tétrapeptides cycliques	FK228		µM	Apop / Arrêt	Lymphomes cutanés
	CHAP		nM	Arrêt	Inhibe la croissance des tumeurs
Benzamides	MS-275		nM	Arrêt	Mélanomes cancers de la prostate
	CI-994		µM	Arrêt	Cancers rénaux

Apop : Apoptose / Diff : différenciation cellulaire / Arrêt : Arrêt du cycle cellulaire

Fig.19 : Comparaison d'HDAC10 avec les autres classes d'HDACs

Deux autres inhibiteurs en développement clinique, MS-275 et CI-994 (Fig.19 et Fig.20) sont des dérivés de la benzamide et sont étudiés dans des essais cliniques (Prakash et al., 2001; Saito et al., 1999).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

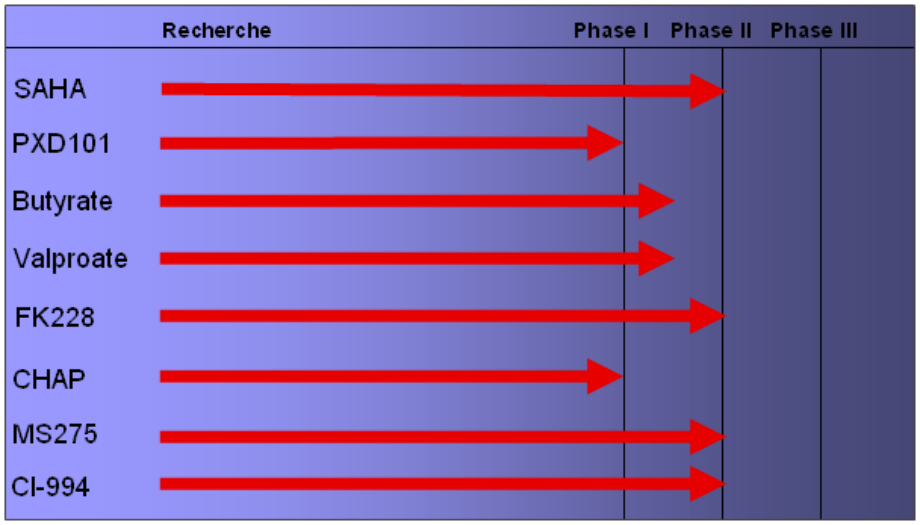


Fig.20 : Tests cliniques des inhibiteurs d'HDACs

Inhibiteurs de la classe III des déacétylases

Des petites molécules agissant comme inhibiteurs des déacétylases de type SIR2 ont été simultanément découvertes par Grozinger (Grozinger et al., 2001) et par Bedalov (Bedalov et al., 2001). Les deux équipes ont utilisé un criblage phénotypique de composés à partir d'une librairie chimique. Parmi les molécules criblées, le Sirtinol est un inhibiteur efficace de l'activité de silencing transcriptionnel *in vivo* de la protéine de levure Sir2 et de l'activité déacétylase *in vitro* de SIRT2 humaine.

Mécanisme d'action des inhibiteurs d'HDACs

Une littérature importante indique que les inhibiteurs d'HDACs bloquent le cycle cellulaire et induit l'apoptose ou la différenciation suivant le type cellulaire et les facteurs environnementaux (Finzer et al., 2001; Kim et al., 2001; Kim et al., 2000; McLaughlin et al., 2003). SAHA par exemple, régule des protéines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire comme p21, p27 et la gelsonine (Huang et al., 2000b). Ceci peut résulter d'un effet transcriptionnel sur certains gènes cibles, de l'activité de protéines comme E2F, RB et P53 directement influencées par l'acétylation et plus encore, sur des protéines impliquées dans le

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

contrôle direct du cycle cellulaire (Chan et al., 2001; Gu and Roeder, 1997; Martinez-Balbas et al., 2000).

A la suite d'un traitement par des inhibiteurs d'HDACs et en observant le profil transcriptionnel sur micropuce, il est surprenant d'observer que seulement un faible pourcentage d'ARN messagers transcrits est modulé. De plus, par contraste avec l'idée selon laquelle les HDACs sont des régulateurs majeurs et globaux de la transcription, il apparaît que l'inhibition des HDACs altère que moyennement le profil d'expression des gènes ; ceci peut expliquer la faible cytotoxicité apparente des essais cliniques engagés (Glaser et al., 2003; Van Lint et al., 1996).

Jusqu'à présent, les gènes régulés par les inhibiteurs d'HDACs, comme SAHA, ont des effets pléiotropiques sur les voies clés impliquées dans la prolifération, l'apoptose, les gènes suppresseurs de tumeur, la synthèse d'ADN, sa réparation et enfin le turnover des protéines (Mitsiades et al., 2004).

Inhibiteurs d'HDACs en combinaison avec d'autres agents

Le fort potentiel des inhibiteurs d'HDACs tient au fait qu'ils sont capables de moduler l'activité d'autres agents thérapeutiques. Une variété de combinaisons de drogues a montré des effets prometteurs dans le traitement du cancer (Rosato and Grant, 2004).
Le prétraitement ou la co-administration d'inhibiteurs d'HDACs avec un grand nombre d'agents anticancéreux montre qu'il y a un effet additionnel ou synergétique qui accroît l'apoptose des cellules cancéreuses en culture (Kim et al., 2003; Mitsiades et al., 2004; Rahmani et al., 2005; Rahmani et al., 2003b; Zhu and Otterson, 2003) voire même une efficacité antitumorale in vivo (Belinsky et al., 2003; Keen et al., 2003). De plus, l'augmentation de l'activité est observée lorsque des inhibiteurs d'HDACs sont combinés avec des chimiothérapies (Fuino et al., 2003; Kim et al., 2003; Witzig et al., 2000).

Des ligands de récepteurs nucléaires (Coffey et al., 2001; Rashid et al., 2001), des antagonistes d'HSP90 (Rahmani et al., 2003a), des inhibiteurs du protéasome (Mitsiades et al., 2004; Yu et al., 2003), des inhibiteurs de la transduction du signal (Fuino et al., 2003; Nimmanapalli et al., 2003; Rahmani et al., 2003b) et des agents déméthylants l'ADN

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

(Cameron et al., 1999; Primeau et al., 2003) représentent les classes d'agents les plus prometteuses.

L'expression de la protéine P21WAF est régulée par les HDACs. En réponse à des inhibiteurs d'HDACs, cette protéine joue un rôle critique dans le choix d'une réponse par différenciation cellulaire ou d'une réponse apoptotique spécifique des cellules cancéreuses (Han et al., 2000a; Richon et al., 2000).

Les inhibiteurs du protéasome et les antagonistes de HSP90 représentent deux autres groupes d'agents intéressants pouvant être combinés avec des inhibiteurs d'HDACs. HSP90 est une chaperonne moléculaire (voir chapitre étude des gènes HSPs) qui stabilise et contrôle le trafic intracellulaire des protéines clientes comme les récepteurs de stéroïdes.
L'inhibition d'HSP90 avec des antagonistes comme le 17-AAG amène à une dégradation par le protéasome de ses protéines clientes. En raison de la régulation de la fonction d'HSP90 par acétylation, la combinaison d'inhibiteurs d'HDACs et d'antagonistes d'HSP90 est utilisée en stratégie thérapeutique. Expérimentalement, le 17-AAG en combinaison avec SAHA ou le butyrate de sodium inhibe l'induction de P21WAF, induit le clivage de BCL-2 de façon synergique et accroît l'apoptose des cellules tumorales (Rahmani et al., 2003a).

Les inhibiteurs du protéasome ralentissent la dégradation d'importantes et diverses protéines cellulaires. Leur combinaison avec des inhibiteurs d'HDACs permet d'obtenir un meilleur blocage de l'activité du protéasome et accroît l'apoptose des cellules tumorales de façon synergique (Giuliano et al., 1999; Mitsiades et al., 2004; Yu et al., 2003).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Les protéines du choc thermique

Vue générale

Au niveau moléculaire, les variations de l'environnement nocives pour la cellule sont prises en charge par un mécanisme de protection faisant intervenir une famille de protéines : les protéines du choc thermique (HSPs).

Les HSPs ont une activité principale de chaperon moléculaire et sont fortement synthétisées après l'exposition des cellules à une température élevée (Hahn and Li, 1982). Elles sont présentes constitutivement dans la cellule et répondent également à d'autres variétés de stimuli physiques, chimiques et biologiques comme 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).

Ces enzymes sont classées suivant leur masse moléculaire allant de 15 à 110 kDa et sont divisées en plusieurs sous-groupes. Les acteurs principaux sont les protéines HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 et les petites protéines HSPs (Jolly and Morimoto, 2000; Kregel, 2002) (table 5).

Les HSPs se localisent dans différents sites intracellulaires (table 5). Il est possible de les retrouver dans le cytoplasme ou dans le noyau et sont présentes dans des organelles comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique. Elles possèdent un vaste spectre de distribution dans l'organisme et s'expriment dans plusieurs tissus, mais à des degrés variables (Tanguay et al., 1993).

Les 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).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

L'expression des HSPs est également liée à différents états pathologiques et en particulier au cancer (Fuller et al., 1994).

Famille	HSP	localisation	Remarques
HSP90	HSP90α /β	Noyau / cytoplasme	Intervention dans la maturation des récepteurs d'hormones stéroïdes, régulation de la réponse au choc thermique
	Grp94	Réticulum endoplasmique	Induites/constitutives, activité ATPase, repliement des protéines et sécrétion
HSP70	HSC70	Noyau / cytoplasme	Chaperonne exprimée constitutivement, activité ATPase, tolérance à l'hyperthermie, intervient dans la dégradation lysosomiale
	HSP70	cytoplasme	Inductibles au stress, tolérance à l'hyperthermie, activité ATPase, protection contre l'agrégation protéique, régulation de la réponse au choc thermique, anti-apoptotiques
HSP60	HSP60 -cyto	cytoplasme	Inductibles au stress, chaperonnes moléculaires (chaperonines), pro-apoptotiques
	HSP60 -mito	mitochondrie	Induites/constitutives, fixent et replient les protéines
HSP40	Hdj1	Noyau / cytoplasme	Co-facteurs d'HSP70, augmentent son activité ATPase.
HSP27	Isoformes variés	Noyau / cytoplasme	Régulateurs du cytosquelette, prévention de l'agrégation, anti-apoptotiques, résistance au stress oxydatif, forment de larges oligomères
HSP10	HSP10	mitochondrie	Co-facteurs d'HSP60
	Ubiquitine	Noyau / cytoplasme	Intervention dans la dégradation protéique et le transport vésiculaire

Table 5 : Principales protéines du choc thermique

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 nombreuses protéines nouvellement synthétisées ont besoin de l'assistance d'une chaperonne pour un repliement correct. Environ 15 % des nouvelles protéines sont associées avec des chaperonnes (Wickner et al., 1999). Par exemple, la machinerie d'HSP70 agit tôt dans la vie d'un grand nombre de protéines, en se fixant sur une séquence d'acides aminés hydrophobes avant même que la protéine ne quitte le ribosome.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Les protéines correctement conformées peuvent plus tard être mal repliées à la suite de différents stress environnementaux. Elles exposent alors leurs surfaces hydrophobes libres, se rassemblent et finalement précipitent en solution. Les protéines chaperonnes agissent sur ces agrégats pour permettre leur élimination (Glover and Lindquist, 1998). De plus, elles préviennent l'agrégation des protéines mal-conformées en se fixant sur les surfaces hydrophobes exposées et aident au repliement. Par exemple, la famille des HSP60 a une structure caractéristique en forme de barrique pour accueillir les protéines mal-repliées et obtenir un environnement favorable pour une reconformation optimale.

Généralement, les chaperonnes inhibent l'apoptose. HSP27, HSP70 et HSP90 sont principalement anti-apoptotiques. Par exemple, HSP70 et d'autres HSPs peuvent vaincrent des stimuli apoptotiques dépendants et indépendants des caspases (Beere, 2004; Bruey et al., 2000; Garrido et al., 1999). A l'inverse, certaines chaperonnes peuvent participer à des effets pro-apoptotiques (Beere, 2004).

Le choc thermique et ses effets

Lors d'une infection virale ou bactérienne, l'organisme réagit en augmentant la température corporelle. Cette hyperthermie est un système de défense réactif provoquant ainsi des dommages conformationnels sur l'intrus et facilitant ainsi son élimination.

Le choc thermique provoque un certain nombre de bouleversements 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 and Hershey, 1989; Kuhl and Rensing, 2000). Les ADN polymérases sont inactivées (Spiro et al., 1982). Le cycle et la prolifération cellulaire sont stoppés (Kuhl et al., 2000) et la morphologie des cellules apparaît différente car la polymérisation des microfilaments d'actine est perturbée (Han et al., 2000b).

Dans les cellules humaines, des structures en forme d'agrégats nucléaires apparaissent dans le noyau. Ces assemblages, appelés granules de stress, sont constitués principalement du facteur transcriptionnel HSF1 et de protéines importantes dans l'épissage d'ARN ribosomiques (Metz et al., 2004). Elles ne co-localisent pas avec des sites de transcription des gènes du choc

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

thermique ou des sites de réplication d'ADN et ont l'apparence d'une petite structure globulaire (Jolly et al., 1997).
On suggère que les granules de stress servent de site de stockage ou de recyclage des facteurs de transcription (Jolly et al., 1997) et qu'ils peuvent agir dans la protection de sites sensibles du génome lors d'un stress (Jolly et al., 1999). Toutefois d'une façon surprenante, il a été récemment démontré que ces granules correspondent à des sites actifs de transcription de l'hétérochromatine et plus particulièrement au niveau du chromosome 9q12 sur des éléments de répétitions satellites III. HSF1 est le déterminant clé de cette activité intéressante. L'ARN transcrit n'est pas traduit et structure le génome (Jolly et al., 2004).

L'augmentation de température affecte une majorité de protéines et seulement une faible proportion de ces facteurs est insensible à ce stress.
En effet, le taux intracellulaire des HSPs s'accroît rapidement en réponse à une augmentation brutale des protéines mal conformées. Cette induction participe à la protection de la cellule (Samali and Orrenius, 1998) et empêche l'agrégation d'un grand nombre de protéines au travers de leur activité chaperonne.

Si la renaturation des protéines (Pinto et al., 1991) n'est plus possible à cause d'un stress trop intense (quantité ou durée du stress), les HSPs assistent les protéines mal conformées et les accompagnent au système de dégradation pour qu'elles soient éliminées (Connell et al., 2001; Parcellier et al., 2003). Elles évitent alors la formation d'agrégats protéiques néfastes pour la cellule.
Si le stress thermique est extrême, le système de dégradation protéique est lui aussi bloqué et la mort cellulaire programmée de la cellule est engagée (Westwood and Steinhardt, 1989).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Les principales protéines du choc thermique

HSP90

HSP90 (HSP83) est la protéine cytosolique la plus abondante dans les cellules eucaryote (2% des protéines totales). Des homologues sont trouvés dans le réticulum endoplasmique des eucaryotes supérieurs (l'endoplasmine par exemple) et chez les procaryotes (HtpG).
Chez les eucaryotes supérieurs, HSP90 est présent sous deux isoformes homologues : les formes α et β produites dans la même proportion.
Chez *E.coli*, la protéine HtpG (68 kDa) diffère d'HSP90 par l'absence d'une aire chargée d'approximativement 40 acides aminés, qui est caractéristique des autres homologues d'HSP90 (Parsell et al., 1993).

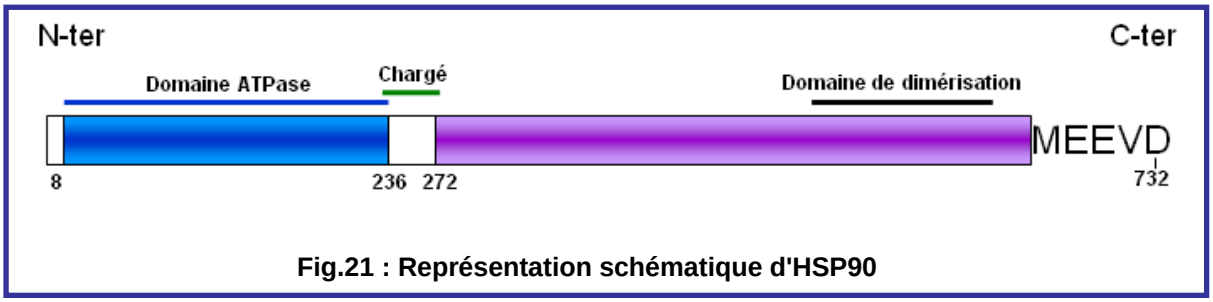


Fig.21 : Représentation schématique d'HSP90

Dans toutes les espèces étudiées, les différentes HSP90 ont une structure commune (Fig.21) et fonctionnent probablement suivant un mécanisme d'action identique. HSP90 est un homodimère constitutif avec un domaine d'interaction de 190 acides aminés localisé coté C-terminal de la protéine (Nemoto et al., 1995). Coté N-terminal, un domaine hautement conservé de 25kDa est le site de fixation de l'ATP et de la geldanamycine, une drogue spécifique qui cible le domaine ATPase d'HSP90 (Whitesell et al., 1994)

Selon les conditions physiologiques, HSP90 est retrouvée en association avec un grand nombre de protéines intracellulaires comme HSF1, l'actine, la tubuline, des kinases et des récepteurs d'hormones (Jakob and Buchner, 1994).

HSP90 intervient dans la régulation des récepteurs d'hormones. (DeFranco et al., 1998; Liu and DeFranco, 1999). Les récepteurs qui ne peuvent pas se fixer à leur hormone sont fixés par HSP90 rapidement après leur traduction (Pratt, 1993). C'est la partie C-terminale de l'enzyme qui est responsable de la fixation du récepteur. Dans le cas des récepteurs aux glucocorticoïdes, leur liaison à HSP90 améliore la capacité de fixation des hormones stéroïdes.
Cette protéine stabilise le monomère d'HSF1 quand la cellule n'est pas en conditions de stress. Ce processus est important dans l'empêchement de toute activation non contrôlée des gènes du choc thermique (Zou et al., 1998).

Par ailleurs, HSP90 possède une fonction de chaperonne comparable à la fonction de GroEL chez la bactérie (voir ci-dessous) et évite l'agrégation des protéines durant l'assemblage des structures tertiaires (Wiech et al., 1992).

HSP70

La structure des protéines HSP70 chez les eucaryotes est très voisine de celle de son équivalent procaryote (appelé Dnak). Il y a approximativement 50% d'homologies de séquence entre HSP70 et DnaK (Lindquist and Craig, 1988).

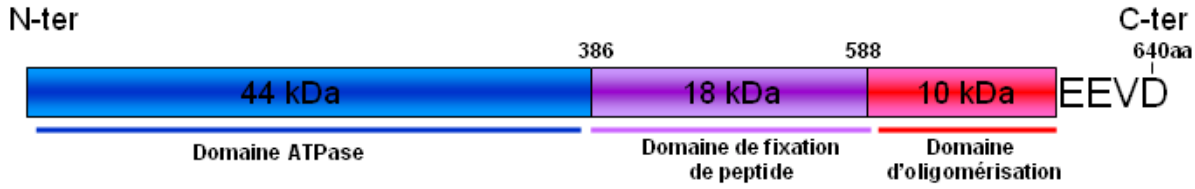


Fig.22 : Représentation schématique d'HSP70

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 trois domaines de 44 kDa, 18 kDa et 10 kDa respectivement.
Le domaine de 18 kDa représente la partie de la molécule capable de fixer les peptides (2 feuilles β antiparallèles et une simple hélice α). Le domaine C- terminal de 10 kDa est une hélice α contiguë à une séquence d'acides aminés EEVD (acide glutamique, valine et acide

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

aspartique) très conservée et retrouvée chez HSP90 (Hightower et al 1994). Enfin, coté N-terminal, un domaine avec une activité ATPase possédant de hautes homologies de structure avec le domaine ATPase des hexokinases et de l'actine est retrouvé (Flaherty et al., 1990; Flaherty et al., 1991).

Les membres de la famille d'HSP70 sont des chaperonnes moléculaires. Elles fixent transitoirement et stabilisent les protéines mal conformées ou partiellement conformées. Elles contrôlent le repliement correct, l'oligomérisation, la translocation à travers la membrane et accompagnent les protéines à la dégradation (Bukau and Horwich, 1998; Fink, 1999; Georgopoulos and Welch, 1993).

Les protéines de la famille des HSP70 sont connues pour leur capacité à fixer les chaînes peptidiques. Avec leur domaine C-terminal, elles reconnaissent un large spectre de peptides avec une préférence pour les résidus hydrophobes (leucines ou isoleucines). Elles agissent dans la protection durant la formation des protéines naissantes (Frydman et al., 1994).

HSP60

En 1981, la fonction essentielle de GroEL a été décrite pour la première fois avec la morphogenèse de la tête des phages lambda et T4, et dans la formation de la queue de phage T5 (Tilly et al., 1981).

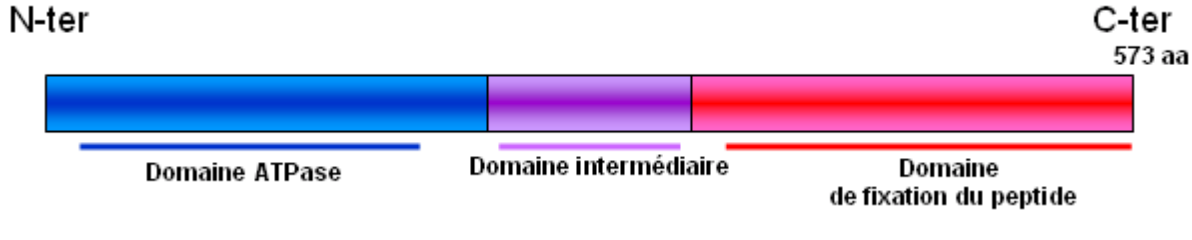


Fig.23 : Représentation schématique d'HSP60

Les chaperonines (le groupe des protéines de stress appartenant à la famille des HSP60) ont un rôle significatif dans le repliement des polypeptides et dans le transport intracellulaire. Ces

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HSPs sont inductibles et ont été les premières protéines à être associées au terme de "chaperon moléculaire" (Hemmingsen et al., 1988).

Dans la grande majorité des cellules, les HSP60 forment deux couches heptamériques en forme d'anneaux. Ces protéines ne sont pas seulement présentes dans des cellules bactériennes mais aussi dans les mitochondries et les chloroplastes des cellules végétales (Hemmingsen et al., 1988; Reading et al., 1989). HSP60 Chloroplastique est un composant important lors de la biosynthèse de la Rubisco (pour ribulose biphosphate carboxylate). La chaperonne fixe les polypeptides mal conformés avant de former l'holoenzyme (Roy et al., 1982).
Ce rôle de chaperon moléculaire est également observé dans la mitochondrie. HSP60, en partenariat avec HSP10, participe au repliement des protéines importées du cytoplasme. Dépliées pour franchir la membrane mitochondriale, celles-ci sont reconformées par ces chaperonnes pour retrouver leur fonction (Bukau and Horwich, 1998).
Généralement les chaperonines sont capable de former un complexe stable avec des protéines pour les importer dans le chloroplaste ou dans la mitochondrie (Hemmingsen et al., 1988).

Contrairement à HSP27 ou HSP70, HSP60 est pro-apoptotique puisqu'elle favorise la maturation de la pro-caspase 3 lorsque celle-ci est relarguée dans le cytoplasme (Samali and Orrenius, 1998).

Hsp27

Hsp27 fait partie de la famille des petites protéines du choc thermique. Elle a une expression constitutive dans la cellule et peut être fortement induite à la suite d'un stress cellulaire (environ 15 fois).
Chez l'homme, son poids moléculaire est de 27 kDa (d'où l'appellation hHsp27) alors que celui de son orthologue murin est de 25 kDa (mHsp25). La protéine hHSP27 possède 205 acides aminés et de nombreuses sérines ciblées par la phosphorylation (Ciocca et al., 1993)

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

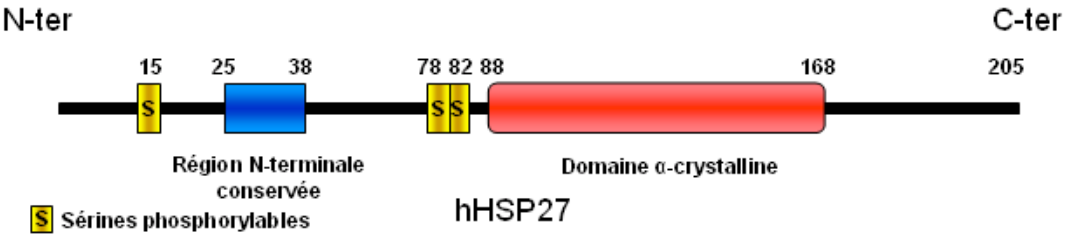


Fig.24 : Représentation schématique d'HSP27

La localisation intracellulaire de cette protéine dépend de l'état physiologique de la cellule, du type et de l'intensité du stress. En général, à l'état normal, elle se retrouve dans le cytoplasme et ce n'est qu'à la suite d'un stress qu'elle se relocalise dans le noyau. Pendant la récupération des cellules, HSP27 est exprimée tardivement dans le cytoplasme (4-6 heures après choc thermique) (Ciocca et al., 1993).

Dans les cellules non stressées, HSP27 est sous la forme d'oligomères de 200 à 800 kDa pour atteindre prés de 2000 kDa après un choc thermique (Arrigo et al., 1988).
La formation de ces structures oligomériques (jusqu'à 50 homo ou hétérodimères d'HSP27) est très dynamique et permet de disposer en permanence de la protéine de façon à exercer rapidement ses fonctions cellulaires (Ehrnsperger et al., 1999; MacRae, 2000).

HSP27 est phosphorylable par la MK2 (pour MAPKAP2), elle même activée par la principale kinase du stress : la MAP kinase P38 (Freshney et al., 1994). Hsp27 adopte une forme non phosphorylée dans les oligomères de hauts poids moléculaires alors que sa forme phosphorylée se dissocie des agrégats cytoplasmiques et peut permettre sa translocation nucléaire (Kato et al., 1994).Contrairement à mHSP25, l'état de phosphorylation d'hHSP27 influence sa localisation cytoplasmique (Lavoie et al., 1995).

Ces petites protéines oligomériques sont fortement exprimées dans le muscle squelettique (Gernold et al., 1993) et dans un nombre important de lignées cellulaires tumorales (Garrido et al., 2001).
Une des principales fonction d'HSP27 est sa capacité à inhiber l'apoptose en se fixant et inhibant des protéines pro-apoptotiques souvent activées sous les conditions de stress (Beere, 2004; Garrido et al., 2001). L'induction d'HSP27 module l'activité de certaines voies de

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

signalisation et empêche la mort cellulaire apoptotique en inactivant la caspase-3, la caspase-9 et le cytochrome c (Garrido et al., 1999; Paul et al., 2002).

A l'instar d'HSP70 et d'HSP60, HSP27 a un rôle de chaperonne moléculaire. En effet, elle se lie et séquestre les protéines mal conformées (Ehrnsperger et al., 1997).
L'état de phosphorylation d'HSP27 intervient dans la polymérisation des filaments d'actine, dans leur protection et leur récupération à la suite d'un stress. À l'état non phosphorylé, Hsp27 limite cette polymérisation dans la cellule et inversement (Benndorf et al., 1994; Huot et al., 1996).

HSP27 contribue à l'activation de la voie NF-kB et à la survie cellulaire grâce à la participation dans la dégradation d'IkB polyubiquitiné par le protéasome. Liée à son activité chaperonne, IkB est acheminée par HSP27 et favorise l'interaction entre IkB phosphorylée et le protéasome 26S (Parcellier et al., 2003).
De même, HSP25 interagit avec eIF4G afin de provoquer l'inhibition de la synthèse protéique durant un choc thermique sévère (Cuesta et al., 2000).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Mécanisme d'activation des HSPs

Une cellule possède des HSPs constitutives immédiatement utilisables après une agression cellulaire ou à la suite d'une altération de son état physiologique. Ces stimuli entraînent la transcription et la traduction des protéines HSPs, protéines importantes dans la réponse au stress cellulaire.

Régulation de l'expression des gènes HSPs chez les procaryotes

Les premières informations sur la transcription des gènes HSPs ont été obtenues à partir d'études utilisant la bactérie *E.coli*.

Dans les cellules procaryotiques, une augmentation de la transcription des gènes codants pour les protéines de stress est observée après une induction par le facteur sigma32. Ce facteur est codé par le gène rpoH et contrôle la transcription d'environ 20 HSPs comme DnaK, DnaJ, GroEL et GroES. Ces protéines ont été identifiées par électrophorèse bidimensionnelle (Yura et al., 1993).

Le facteur de transcription majeur dans les cellules procaryotes est sigma70. Si le niveau de sigma70 est réduit, l'expression des HSPs augmente car l'ARN polymérase devient plus accessible au facteur sigma32. La synthèse de ces protéines est régulée par compétition.

La fonction de régulation de sigma32 est basée sur sa synthèse, son activation et sa dégradation (Storz, 1999). Dans les conditions normales, le niveau de sigma32 est très faible, mais sa demie-vie devient plus longue lorsque la température augmente (Straus et al., 1987). La quantité de sigma32 est influencée par un rétrocontrôle négatif par DnaK. Sans la présence de DnaK, le temps de vie de sigma32 est 10 à 30 fois plus long. Des effets similaires sur le niveau de sigma32 ont également été démontrés avec les protéines DnaJ et GrpE.

De plus, l'activité de sigma32 est dépendante de la température (Straus et al., 1990).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

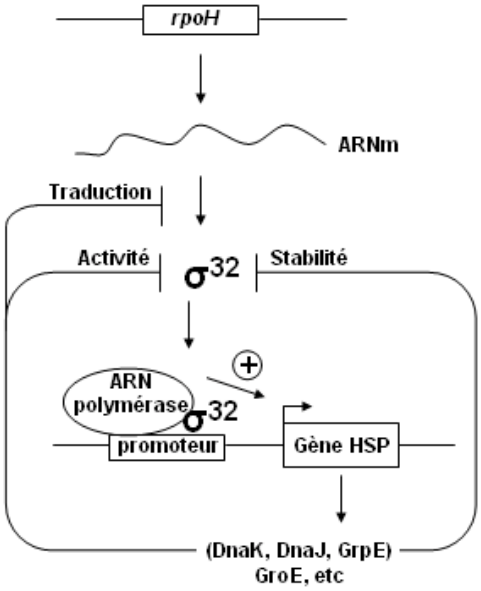


Fig.25 : Régulation des gènes HSPs chez les procaryotes

Le gène codant pour sigma32 (rpoH) possède au moins quatre promoteurs. Trois d'entre eux, P1, P4 et P5 sont transcrits par sigma70 (Fujita and Ishihama, 1987), tandis que P3 est transcrit par une ARN polymérase qui contient le facteur sigma24 - acteur supplémentaire dans la réponse au stress - plus actif sous très haute température (Erickson and Gross, 1989).

SigmaE (sigma24) est un facteur de transcription impliqué dans une seconde voie de transcription des gènes HSPs chez *E.coli* (Laskowska et al., 1996). Cette régulation peut amplifier l'action de sigma32, acteur principale dans l'expression des gènes HSPs.
Les promoteurs P1 et P4 sont responsables de la majorité de la transcription des gènes rpoH durant les conditions végétatives. Le promoteur P4 présente tout de même une activité 2 à 3 fois plus forte sous une température élevée (Fujita and Ishihama, 1987). De même, le promoteur P3 est beaucoup plus actif dans des conditions extrêmes, à une température létale (au dessus de 50°C).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Régulation de l'expression des gènes HSPs chez les Eucaryotes

Les gènes HSPs eucaryotes sont généralement contrôlés par des régions d'ADN nommées HSE (pour heat shock element) capables de fixer spécifiquement des facteurs de transcription : les HSFs (pour heat shock factors).

Toutes les HSE contiennent un motif basique de séquence 5'-NGAAN-3'. Le nombre de ces motifs est variable d'une HSE à l'autre et le nombre de HSE est différent suivant les gènes étudiés. Par exemple, dans la région promotrice d'HSP70 de *D.melanogaster*, quatre HSE de 4 motifs sont présents alors qu'un seul HSE de 8 motifs est retrouvé pour HSP90 (Amin et al., 1988; Scharf et al., 1998).

Plusieurs étapes discrètes impliquent l'activation complète d'HSF1 : la formation de l'homotrimère, la fixation sur les HSE, l'hyperphosphorylation et l'activation du domaine d'activation transcriptionnelle.

HSF1 acteur majeur dans la choc thermique

Depuis la découverte du seul gène HSF chez *S.cerevisiae* (Sorger and Pelham, 1988) et chez *D. melanogaster* (Wiederrecht et al., 1988), quatre facteurs, nommés HSF1 à HSF4, ont été trouvés chez les vertébrés à ce jour (Pirkkala et al., 2001).

Dans la réponse au stress, HSF1 est le principal activateur transcriptionnel chez les mammifères. Eliminer le gène qui code pour HSF1 abolit totalement l'induction de l'expression des principales HSPs après un choc thermique (McMillan et al., 1998; Xiao et al., 1999).

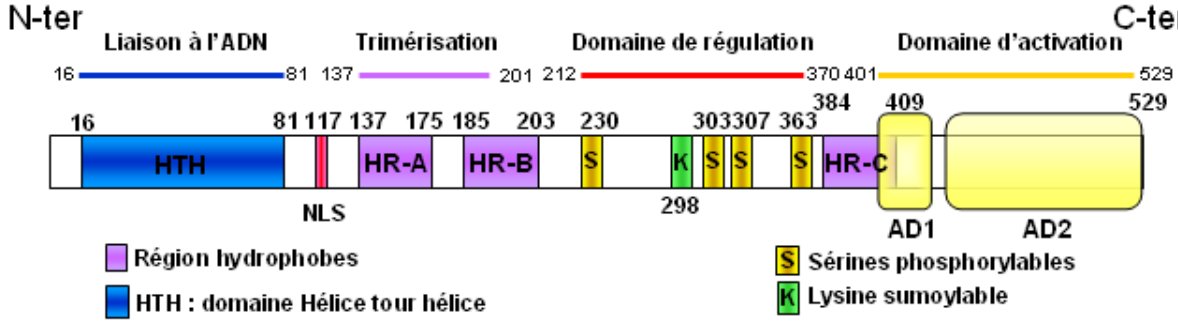


Fig.26 : Représentation schématique d'HSF1

Capable de se fixer à l'ADN, de se trimériser et d'activer la transcription, HSF1 est constitutivement exprimé dans les cellules mammifères. A l'état non activée, cette protéine est localisée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Mercier et al., 1999).

Ce facteur est divisé en plusieurs domaines importants définissant ses propriétés basiques :
Coté N-terminal, le domaine de liaison à l'ADN permet la fixation spécifique sur les régions HSE en cis des gènes du choc thermique.
HSF1 contient deux domaines d'activation distincts côté C-terminal, AD1 et AD2, sous le contrôle d'un troisième domaine RD (pour regulatory domain) placé sur la partie centrale de la protéine (Green et al., 1995). Comme le domaine AD1 n'est pas régulé lui-même par la température, le domaine RD est proposé comme le détecteur du choc thermique (Newton et al., 1996). Une simple substitution de la lysine 298 en alanine dans le domaine RD provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'HSF1 en absence de stress (Knauf et al., 1996).
Deux régions conservées riches en répétitions hydrophobes nommées HRA/B et HRC sont impliquées dans la trimérisation d'HSF1 (Peteranderl and Nelson, 1992; Sorger and Nelson, 1989).
Contiguë au domaine de liaison à l'ADN, un NLS est présent et participe à l'export nucléaire lorsque celui-ci est dévoilé après un choc thermique.

Modèle d'activation des gènes HSPs par HSF1

Les modèles contemporains de la régulation d'HSF1 dans l'activation des gènes HSPs eucaryotes font intervenir des chaperonnes et co-chaperonnes. Ces protéines participent dans l'inactivation, la fixation d'HSF1 à l'ADN, l'activité transcriptionnelle, la désactivation et le désassemblage des trimères d'HSF1. Ces données sont le résultat d'une recherche dense sur ces mécanismes (Bharadwaj et al., 1999; Guo et al., 2001; Marchler and Wu, 2001; Shi et al., 1998; Voellmy, 2004; Zou et al., 1998) (Fig.27)

Dans ce modèle, HSF1 existe sous une forme monomérique dans les cellules non stressées. Cette forme interagit avec un complexe chaperon composé d'HSP90, de P23 et d'immunophyline (FKBP52). Ce complexe, en coopération avec d'autres protéines inhibitrices et modifications post-traductionnelles (comme la phosphorylation sur des sérines spécifiques

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

d'HSF1), agit pour réprimer l'expression des gènes HSPs lorsqu'il n'y a pas de stress. Cette répression est le résultat d'un blocage concomitant de l'homotrimérisation et de la liaison d'HSF1 à l'ADN.

Pendant un stress, le complexe d'inhibition de chaperonnes et de co-chaperonnes se séparent et les formes monomères inactives interagissent entres elles pour former un homotrimère inactif capable de se fixer aux régions HSE en amont des gènes HSPs. Ce mécanisme semble le résultat d'un titrage des chaperonnes par les protéines mal-conformées abondantes durant un stress.
Lorsque l'homotrimère d'HSF1 fixé à l'ADN est hyperphosphorylé, celui-ci peut alors activer la transcription.

Pendant l'activation de la transcription, HSF1 favorise l'initiation et stimule l'élongation en recrutant la machinerie transcritionnnelle (TBP, TAFs, TFIIA et B) et des facteurs qui remodèlent la chromatine.

Pendant la récupération, l'homotrimère d'HSF1 est progressivement déphosphorylé, désassemblé et sa fixation à l'ADN se réduit graduellement. Cette désactivation et ce désassemblage sont orchestrés par des phosphatases et les chaperonnes HSP40 et HSP70. On passe d'un homotrimère actif à un monomère inactif. Par un jeu d'échanges entre les protéines HSPs, HSF1 va finalement interagir avec HSP90, P23 et l'immunophyline.

Le facteur inactivé peut alors de nouveau être utilisé dans un cycle d'activation et d'inactivation en réponse à un stress (Fig.27).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

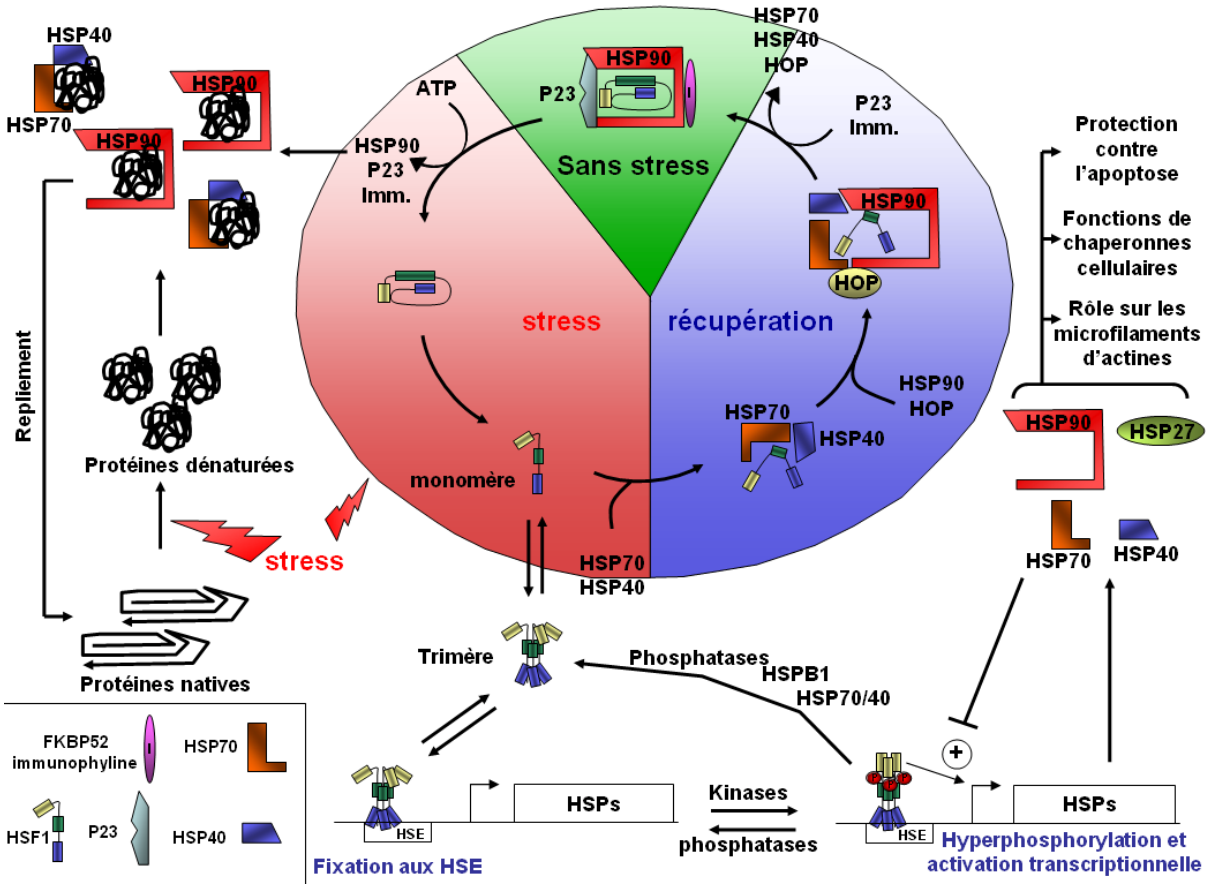


Fig.27 : Régulation et mécanisme d'activation des gènes HSPs chez les eucaryotes

Régulation du mécanisme d'activation

Sur des cellules non stressées

Sans stress, la protéine HSF1 est activement et négativement régulée par sa faculté à fixer l'ADN et à activer la transcription. Ce mécanisme a pour but d'éviter toute transcription accidentelle des gènes HSPs, acteurs importants dans un grand nombre de processus cellulaires.

En plus de l'inhibition prise en charge par HSP90 (Zou et al., 1998), des sérines éloignées du domaine d'activation transcriptionnel sont le siège d'une phosphorylation inhibitrice.

Cette modification post-traductionnelle constitutive d'HSF1 sur les sérines 303, 307 et 363 participe au maintien d'une forme non activée de ce facteur de transcription. C'est le résultat

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

de l'activité enzymatique de MAP kinases des voies ERK ou GSK3 (Chu et al., 1998; Kline and Morimoto, 1997).

Un troisième niveau de régulation fait intervenir la protéine CHIP : une co-chaperonne, régulatrice d'HSF1, qui interagit avec HSP90 et HSP70 en agissant sur leur domaine ATPase (Ballinger et al., 1999).
Si CHIP n'est plus présente dans la cellule, la quantité des protéines HSPs exprimées est diminuée lors d'un stress. Cette diminution est le résultat d'une inhibition de l'activation d'HSF1 (Dai et al., 2003). Inversement, une surexpression de CHIP active HSF1.
L'hypothèse avancée serait qu'il existerait une participation de la protéine CHIP dans la régulation du taux de complexe HSP90-HSF1 sous forme activée (trimère) ou inactivée (monomère). D'autre part, CHIP participerait à la dissociation de la protéine P23 du complexe HSP90-HSF1 (McDonough and Patterson, 2003), étape importante pour libérer HSF1.

Après un stress

Parmi les possibles régulateurs intracellulaires, les HSPs elles-mêmes sont candidates au contrôle direct ou indirect de l'activité des HSFs. L'activité transcriptionnelle d'HSF de *S.cerevisiae* est maintenue en l'absence de stress thermique quand le niveau normal d'HSP70 est réduit à cause d'une mutation sur deux gènes HSP70 constitutivement exprimés, SSA1 et SSA2 (Boorstein & Craig 1990). Ces résultats suggèrent un modèle dans lequel le niveau constitutif des HSPs, et particulièrement d'HSP70, contrôle négativement l'activité des HSFs sous des conditions environnementales normales (Wu, 1995).

De plus, sous des conditions de choc thermique, le nombre de protéines dénaturées et agrégées réduit le pool des HSPs utilisées pour réprimer le facteur HSF (Voellmy, 2004). Ce dernier peut induire la synthèse de nouvelles protéines du choc thermique qui, par rétrocontrôle, vont réprimer son l'activité : les HSPs participent à l'inhibition du mécanisme d'activation. Le même mécanisme de "feedback" est observé chez la bactérie (Craig and Gross, 1991). Compatible avec cette hypothèse, l'injection de protéines dénaturées dans des œufs de xénope non stressés provoque l'induction de l'activité d'HSF (Mifflin and Cohen, 1994a) et celle-ci peut être atténuée par co-injection avec HSC70 (Mifflin and Cohen, 1994b).
Le mécanisme de désactivation d'HSF1 par les chaperonnes est expliqué par leur participation au désassemblage du trimère après activation (Shi et al., 1998).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Blocage par HSPB1

A coté de la régulation d'HSF1 par rétrocontrôle des HSPs, d'autres protéines sont connues pour fixer et inhiber HSF1.

Les répétitions hydrophobes du domaine de trimérisation d'HSF1 ont été utilisées comme appât dans une recherche par double hybride et ont permis d'identifier une nouvelle protéine nucléaire nommée HSPB1 (pour heat shock factor binding protein 1). Cette protéine de 76 acides aminés contient deux régions étendues de répétitions hydrophobes capables d'interagir avec HSF1. *In vivo*, l'interaction s'établit avec la forme trimérique active du facteur de transcription pendant le choc thermique. HSPB1 affecte négativement l'activité de fixation de l'ADN du facteur HSF1. Ainsi, une surexpression de HSPB1 dans les cellules mammifères réprime l'activité transactivatrice d'HSF1 sur les gènes HSPs.

Afin d'établir un rôle biologique pour HSPB1, la protéine homologue chez *C.elegans* a été surexprimée dans des cellules musculaires de nématode. Grâce à l'utilisation d'un rapporteur comportant un promoteur HSE, les auteurs ont observés un blocage de l'activation dans la réponse au choc thermique. De plus, une altération du niveau d'expression de HSPB1 chez *C.elegans* entraîne des effets sévères sur la survie des animaux après un stress chimique ou thermique. Cette observation est ainsi compatible avec le rôle de régulateur négatif dans la réponse au choc thermique (Satyal et al., 1998).

Rôle de la phosphorylation dans l'inactivation

Par ailleurs, la régulation d'HSF1 passe également par un contrôle de sa phosphorylation. En effet, la protéine n'est fonctionnelle qu'une fois phosphorylée. (Voellmy, 2004; Xia and Voellmy, 1997; Zuo et al., 1995). L'hyperphosphorylation est généralement associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle.

De même, certaines kinases phosphorylent HSF1 sur des résidus spécifiques pour induire ou réprimer son activité. Comme la CamKII (pour Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II) (Holmberg et al., 2001), CK2 (pour casein kinase 2)(Soncin et al., 2003), PKCα (pour Protein Kinase C alpha) (Yang et al., 2004), GSK3 (pour glycogen synthase kinase 3)(Chu et al., 1998; Xavier et al., 2000) et ERK1 (pour extracellular signal-regulated kinase1) (Chu et al., 1996; Wang et al., 2004).

Les travaux de Mivechi ont démontré qu'HSP70 active *in vitro* des phosphatases et particulièrement PP1 (pour protein phosphatase type 1). Les phosphatases responsables de la déphosphorylation d'HSF1 peuvent être inactivées durant le choc thermique, et HSP70 peut faciliter leur retour à une forme active. L'acide okadaïque empêche la déphosphorylation d'HSF1 durant la récupération après un choc thermique et prolonge la capacité d'HSF1 à se fixer sur les régions HSE. Ces résultats étayent l'hypothèse qu'un haut niveau de phosphorylation est important pour une activation maximale d'HSF1, et que inversement, la déphosphorylation participe à l'inhibition de l'activation des gènes du choc thermique.

La protéine PP5 (pour protein phosphatase 5) est un composant majeur de l'hétérocomplexe HSP90-recepteur stéroïde impliqué dans la régulation des récepteurs aux glucocorticoïdes et des récepteurs aux oestrogènes (Chinkers, 2001). Cette protéine de 58 kDa est une protéine phosphatase qui contient un domaine TPR (pour tetratricopeptide repeat) coté N-terminal. Ce domaine inhibe l'activité phosphatase situé aussi coté N-terminal et permet l'interaction avec HSP90 (Yang et al., 2005).
Les travaux de Renaud Conde récemment publiés (Conde et al., 2005) décrivent la protéine PP5 comme le modulateur négatif d'HSF1. Dans les œufs de xénope, la phosphatase PP5 diminue l'activité de trimérisation et de fixation à l'ADN induite après un choc thermique. Cette protéine est aussi impliquée dans la désactivation du facteur HSF1 activé. Durant la récupération, PP5 déphosphoryle HSF1 et permet son inactivation.

Blocage par méthylation

Le blocage de l'expression de l'αB-crystalline dans les cellules L929 a été analysée en détail (Blackburn et al., 1997).
D'une manière intéressante, l'expression de l'αB-crystalline peut être restaurée après un long traitement des cellules au 5-azacytidine. Ceci indique que la méthylation de l'ADN est responsable de l'arrêt de l'expression de cette HSP dans ce type de cellules. De plus, il semblerait que la régulation de l'expression de l'αB-crystalline par méthylation n'est observée que dans le contexte génomique. Effectivement, la région promotrice de l'αB-crystalline introduit par transfection transitoire dans des cellules L929 est tout a fait activable par choc thermique.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Objectif et plan de travail

L'objectif de mon travail de thèse est d'étudier le fonctionnement de la protéine HDAC6 au sein de la cellule et de tenter de découvrir de nouveaux substrats ou partenaires.
Mes travaux se sont basés sur l'emploi de drogues à effets différentiels sur l'activité catalytique de cette enzyme et l'utilisation de cellules murines où l'expression d'HDAC6 est éliminée ou rétablie, voir rétablie partiellement.
La suite de l'étude décrit quatre aspects particuliers d'HDAC6 présentés dans quatre articles. Ces travaux ont été le fruit de plusieurs collaborations et tendent à démontrer l'aspect multifonctionnel d'HDAC6 dans sa participation en réponse à un stress thermique (article I) ou sa participation dans la mise en place des podosomes (Article IV).
Deux articles supplémentaires vont s'attacher plus particulièrement au mode de régulation de la protéine humaine (Article II) et à l'étude de sa mécanistique intrinsèque (Article III).

Ma participation précise dans ces différents travaux est la suivante :

Article I : toutes les figures de l'article sauf la figure 6.Cette figure provient du travail de Cyril Boyault qui a poursuivit les expériences durant ma rédaction de thèse.
Ce travail à aussi fait l'objet d'une collaboration étroite avec Sabrina Fritah, Claire Vourc'h et Carmen Garrido, apportant leur expérience sur les protéines HSPs.
Yu Zhang et Patrick Matthias ont fournit les cellules KO et Rescues HDAC6.

Article II : Figure 3A, 3B et 3C.

Article III : Figure 2A et 2B.

Article IV : Figure 3B, 3C, 3D

Ma contribution dans toutes ces colaborations est à la fois un apport technique sur diverses expériences mais aussi des échanges actifs sur les concepts exposés.
Durant ma thèse, d'autres collaborations ont été établies pour travailler sur d'autres fonctions d'HDAC6 mais elles n'ont pas, à l'heure actuelle, abouties à des publications. Collaboration avec le Dr.Laurent Schaeffer, le Dr. Alexander Bershadsky, le Dr. Ekkehard Schulze et le Dr. Minoru Yoshida. Mon choix dans ce manuscrit a été de présenter des résultats sur les données publiées

Chaque article présenté dans ce manuscrit sera accompagné d'un bref résumé.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Résultats

Article 1 : HDAC6 et Activation des HSPs

L'article 1 est en cours de finalisation et doit être prochainement sousmis. Voici les principaux éléments qui composent cet article.

Résumé

L'activation des gènes HSPs chez les eucaryotes est un processus multi-étapes faisant intervenir HSF1 comme principal facteur de transcription impliqué dans la réponse au stress. Ce mécanisme d'activation régule l'expression des gènes du choc thermique par la fixation d'une forme trimérique activée d'HSF1 sur les promoteurs des gènes HSPs.
A l'état non activé, ce facteur est pris en charge par un complexe répressif constitué de chaperonnes et co-chaperonnes comme HSP90 ou p23. Ce complexe permet d'éviter toute induction des gènes du choc thermique par séquestration d'HSF1.

L'absence d'induction de la protéine HSP25 dans des cellules rescues HDAC6 mutantes (qui expriment la protéine mutée sur le domaine déacétylase ou le domaine fixant l'ubiquitine), implique que la déacétylase participe à l'activation et à la récupération à la suite d'un choc Thermique.
Ce défaut d'activation n'est pas lié à un processus post-transcriptionnel mais est cohérent avec l'absence de la libération du facteur HSF1 du complexe répressif de chaperonnes.
HDAC6 apparaît comme un verrou supplémentaire capable de favoriser la libération d'HSF1 pendant un stress et réciproquement, capable de favoriser son retour à l'état inactif lors de la phase de récupération.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC6 determines the extent of late cellular response to heat shock

Benoit Gilquin[1]*, Yu Zhang[2]*, Cyril Boyault[1], Sabrina Fritah[3], Carmen Garrido[4], Claire Vourc'h[3], Patrick Matthias[2], 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 - INSERM U-517, IFR-100, Faculty of Medicine and Pharmacy, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21033 Dijon, France.

*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

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Abstract

The involvement of HDAC6, a multi-functional cytoplasmic deacetylase, in processes such as the clearance of aggregated mis-folded proteins and the deacetylation of the HSP90 chaperone, has prompted us to hypothesize a role for this deacetylase in the cellular response to heat shock. Using specific cellular model systems established from HDAC6-/- mice, we have shown that heat shock efficiently elicited a cellular response regardless of the presence of HDAC6. However, inactivating mutations in different functional domains of HDAC6 dramatically reduced the activity of HSF1 during the recovery period, leading to a complete absence of induction of the late heat shock responsive HSP27 gene. Based on these data, we propose that, in non-stressed cells, HDAC6 is part of a HSF1 repressive complex and that its release from the complex is necessary but not sufficient to maintain HSF1 active during the post heat shock recovery period.

Introduction

HDAC6 was first discovered in the mouse as a specific member of a new family of HDACs (Verdel and Khochbin, 1999) now known as class II (Yang and Gregoire, 2005). Later functional studies showed that HDAC6 is actively maintained in the cytoplasm (Verdel et al., 2000) and is capable of efficiently binding mono- and poly-ubiquitin (Hook et al., 2002; Seigneurin-Berny et al., 2001). HDAC6 was also identified as a major cytoplasmic tubulin-deacetylase (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003). HDAC6 therefore functionally links cellular ubiquitin signalling to microtubules. One of the implications of this particular property of HDAC6 was recently discovered as the protein was found to link mis-folded ubiquitinated proteins to dynein motors for their transport to the aggresomes (Kawaguchi et al., 2003). These data suggested that HDAC6 plays a critical role in the management of mis-folded protein aggregates. Moreover, it has recently been shown that the Hsp90 chaperone activity is modulated by its HDAC6-dependent déacétylation (Kovacs et al., 2005). HSP90 also keeps the critical regulator of the heat shock response, the transcription factor (HSF1), under negative control in non-stressed cells and plays a role in the attenuation phase of HSF1 activation after stressful stimuli (Ali et al., 1998; Bharadwaj et al., 1999; Guo et al., 2001; Zou et al., 1998). HDAC6 is therefore an excellent candidate to

control the cellular response to heat shock since it both modulates HSP90 activity and participates in the clearance of cytotoxic mis-folded protein aggregates (Kawaguchi et al., 2003; Kovacs et al., 2005).
We therefore reasoned that HDAC6 could play a pivotal role in cell response to heat shock and designed experiments to investigate this issue.

Results

Fibroblasts were isolated from HDAC6 -/- mouse embryos and used to establish 3T3 cell lines. In order to evaluate the activity of HDAC6 and the effect of specific mutations, a retroviral gene transfer system was used to re-introduce wild type HDAC6 (wt) or HDAC6 bearing inactivating mutations in its catalytic domains or in its ubiquitin-binding domain (ZnF-UBP) in one of the HDAC6-/- lines. We therefore obtained a HDAC6 -/- cell line and the same cells expressing either wt HDAC6 or catalytically dead (HD^m) or non ubiquitin-binding (Ub^m) versions of the protein.

Figure 1 shows that, as expected, tubulin is hyperacetylated in HDAC6-/- cells, while the re-introduction of wild type HDAC6 or the Ub^m version of the protein, but not that of the HD^m protein, dramatically reduces tubulin acetylation to levels comparable to the parental HDAC6 +/+ cells.
In order to evaluate the role of HDAC6 in cell response to heat shock, the four cell lines described above were heat shocked at 42°C for one hour and let to recover at 37°C. In order to have a thorough insight into the recovery process, besides the early inducible HSP70 accumulation, we also monitored the accumulation of the small HSP protein, HSP27 (HSP25 in mouse), which accumulates during later stages of the recovery (Garrido et al., 2003).

Figure 2 shows that HSP70 and HSP25 were both induced efficiently and followed the same kinetics in the wild type parental cells, in HDAC6-/- cells and in the same cells re-expressing wild type HDAC6 (since in all the experiments the wild type parental HDAC6+/+ cells behaved very similarly to the HDAC6-/- cells re-expressing wild type HDAC6, we decided not to include the data from these parental cells in the Figures). At first consideration, these data suggest that HDAC6 is not involved the control of cell response to heat shock. However, the expression of catalytically dead HDAC6 or non ubiquitin-binding mutant of HDAC6 in

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

the HDAC6-/- cells, while not affecting the heat shock-dependent induction of HSP70, completely abolished the expression of HSP25 during the recovery process.

Figure 3 shows that the absence of HSP25 accumulation is due to a lack of the heat shock-dependent induction of its encoding mRNA in HDAC6 -/- cells expressing the mutated forms of HDAC6.

In order to confirm the inhibitory effect of HDAC6 mutants on the HSP25 induction during the post-heat shock recovery period, an unrelated balb/c 3T3 cell line was transfected with vectors expressing wild type HDAC6 or HD^m or Ub^m mutants. Twenty hours after heat shock, the proportion of transfected cells accumulating HSP25 was monitored (Fig. 4). Data obtained showed that while 25% of the cells expressing wt HDAC6 also expressed HSP25 in response to heat shock, only 10% and 5% of the cells respectively expressing HD^m or Ub^m HDAC6 mutants also expressed HSP25, during the same period. These data show that the effect of the HDAC6 mutants on the HSP25 gene activation after heat shock is not specific to the cells established from HDAC6-/- mice and also could be observed in unrelated cell lines.

In order to unravel the mechanisms underlying the function of HDAC6 in the heat shock response, we first controlled the activation of the critical heat shock responsive transcription factor, HSF1. Hyper-phosphorylation of HSF1 leading to the appearance of slow migrating protein species is a convenient way to follow protein activation after a heat shock. Extracts from the experiments presented above were probed with an anti-HSF1 antibody (Fig. 5).

Interestingly, the data obtained showed that although the activation and deactivation of HSF1 occurred normally in the absence of HDAC6, the presence of the mutated forms of HDAC6 in cells dramatically attenuated HSF1 activation. These observations explain why the expression of HSP25 was completely abolished in cells expressing the mutated HDAC6 proteins. Indeed, the mutated HDAC6 derivatives very rapidly attenuated the HSF1 activation.

Stress-denatured proteins are thought to counteract the formation of repressive HSF1 complexes by mobilizing HSP90 and preventing the HSP90-dependent attenuation of HSF1 activity (Guo et al., 2001). Accordingly, since through both its ubiquitin-binding domain and its catalytic activity, HDAC6 participates in the management of mis-folded proteins, it could also be mobilized by the denatured proteins (Kawaguchi et al., 2003) (SK, unpublished data).

We hypothesized those mutant HDAC6 derivatives, because of their inability to be mobilized by denatured proteins, favour the formation of repressive HSF1 complexes and attenuate heat shock-dependent HSF1 activation.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

In order to test this hypothesis, we immunoprecipitate HSP90 from non-stressed cells or heat shocked cells to monitor the association between HSP90, HSF1 and HDAC6 in the various cell lines described above.

Figure 6 shows that in cells expressing wt HDAC6, both HDAC6 and HSF1 co-immunoprecipitate with HSP90. Interestingly, after a one hour heat shock, reduced amounts of HSF1 and HDAC6 were found associated with HSP90 leading to a dramatic increase in the acetylation of HSP90. In cells expressing Ub^m HDAC6, neither the increase in HSP90 acetylation nor a complex dissociation were observed following heat shock. In cells expressing catalytically dead HDAC6 (HD^m), as expected, HSP90 was found acetylated before the heat shock and here again, the heat shock had no detectable effect on the complex dissociation. However, intriguingly, we reproducibly noticed a deacetylation of HSP90 after heat shock in a complete absence of a catalytically active HDAC6. This observation suggests that the maintenance HDAC6 associated with HSP90 also attracts another HSP90 deacetylase which remains to be identified.

We propose that "free" HDAC6, not mobilized by post-heat shock events, accelerates the attenuation of HSF1 activity during the recovery period. At physiological levels, HDAC6 is expected to be mobilized by mis-folded and aggregated ubiquitinated proteins. This activity of HDAC6 depends on both its ubiquitin-binding ZnF-UBP domain and its deacetylase activity (Kawaguchi et al., 2003). Mutant HDAC6 incapable of being mobilized by post-heat shock cellular events are therefore prone to interact with HSP90 and induce the formation of repressive HSF1 complexes.
This model also explains why over-expressed wt HDAC6 in balb/c 3T3 cells inhibits HSP25 accumulation in 75% of the transfected cells (Fig. 4). Indeed, in contrast to stable HDAC6 expressing HDAC6-/- cells, in many of the transiently transfected cells, HDAC6 is largely over-expressed. In these cells the number of expressed HDAC6 molecules should largely be superior to those mobilized by heat shock related events. These "free" HDAC6 molecules would then be available to attenuate HSF1 activation after heat shock.

Based on these data, we propose the following model for the control of cellular heat shock response by HDAC6. Upon stressful stimuli, HDAC6 dissociates from the repressive HSP90-HSF1 complexes and participates in various cellular functions, necessitating both its catalytic and ubiquitin-binding domains, such as the management of mis-folded proteins during the

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

recovery period. After the complete recovery, HDAC6 would become "free" to stabilize the HSP90-dependent HSF1 inactivating complexes. HDAC6 would therefore behave as a sensor molecule adapting the duration of HSF1 activity to the extent of cellular needs for chaperons during the recovery.

Materials and methods

HDAC6-/- cell line and the re-expression of HDAC6 derivatives

Mice with invalidated HDAC6 gene were generated (Zhang et al., 2003 and 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 blot. 3T3 cell lines were established followed standard 3T3 protocol. The cells were plated at density of 3X105 cells per 5cm plate and spited every 3 days for about 20 passages.

Wild type and mutant HDAC-6 cDNAs were cloned into pMSCV.EGFP vector. The retrovirus was made from Pheonix cells following standard protocol. The HDAC6-/- 3T3 cells were infected. The infected cells were kept in culture for 2 weeks and single GFP-positive cells were sorted into 96-well plates. The positives were identified by western blot and PCR.

Plasmids and antibodies

Vectors expressing hemagglutinin (HA)-tagged mHDAC6 and pcDNA HA-HDAC6 Ub^m have been described previously in (Verdel et al., 2000) and (Seigneurin-Berny et al., 2001)

pcDNA HA-HDAC6 HD^m have been described in (Matsuyama et al., 2002), is a deacetylase-negative version of mouse HDAC6 that was constructed to have amino acid replacements of D250N, D252N, H254V, H255V, D648N, H650V and H651V.

Western blotting : The Rabbit polyclonal antibody against HSF-1 (SPA-901) and against HSP25 (SPA-801) were purchased from Stressgen. Mouse monoclonal antibodies against Tubulin (T5168) and against acetylated Tubulin (T6793) were acquired from Sigma.

Mouse antibody against HSP70 (3A3) was from Rick Morimoto lab (Bhattacharyya et al., 1995).

Rabbit polyclonal antibody again HSP90 (mab 119) was gived by Claire Vourc'h

Immunoprecipitation: Mouse Anti-acetyl-lysine: Cell signaling ref : 9681

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Anti-Hsp90 (SPA-830) was acquire from Stressgen

Cells culture and heat shock.

HDAC6-/- cells or derived cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum. Cells were incubated in a 43°C water bath for 1 hour, and allowed to recover at 37°C as indicated on figure legend.

Cells were scrapped and lysed with 8M urea lysis buffer. Total protein concentration was measured with Protein Assay (Bio-Rad) and a western blot analysis was performed on 2 µg of proteins (except for HSF1: 12µg).

Immunofluorescence microscopy

Cells fixed with PFA (15 minutes, RT) were washed with phosphate-buffered saline, and incubated with anti-HSP25 antibody (Stressgen SPA-801 ; 1:100) followed by an alexa 488 conjugated goat anti rabbit antibody (Invitrogen A11034 ; 1:500). Cells were then incubated in 20 µg/ml DAPI for 5 min, washed three times for 10 min each in PBS and mounted on slides. Slides were examined using microscope equipped with epifluorescence optics.

With the same protocol, NIH 3T3 Cells were fixed and stained with anti-HA monoclonal antibody (Roche, 3F10) and anti-HSP25 antibody (Stressgen SPA-801 ; 1:100).

Statistics were performed in three independent series.

Immunoprecipitation

Cells were heat shocked for 1h at 43°C, scrapped and lysed by incubation for 20 min on ice in NP-40 buffer (50 mM Tris-Cl, 120 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40) containing protease inhibitors cocktail (Roche, complete mini EDTA-free). After centrifugation, 500 µg of proteins were incubated with 0,5 µg of anti-HSP90 antibody (Stressgen SPA-830) for 1hr on ice. Protein A-Sepharose beads (Amersham) were then added and incubated at 4°C on a rotoshake for 1hr. After 3 washes with NP-40 buffer, complexes were recovered by adding Laemmli sample buffer, and analyzed by western blots.

Northern blot analysis

RNA was isolated from KOHDAC6 cells and rescues cells by using tri reagent buffer (T-9424, sigma). For each sample, 10 µg RNA were separated electrophoretically on a 1% agarose/formaldehyde gel, transferred to a positively charged nylon membrane (Hybond N+; Amersham Pharmacia Biotech), and crosslinked by UV irradiation. For hybridization the

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

nylon membranes were prehybridized in hybridization buffer (5X SSC, 10X Denhardt's solution, solution, 50% formamide, 1% SDS, 1% bovine serum albumin, 200 mg/ml denaturated salmon sperm DNA) at 45 °C for 2 h, followed by an incubation in hybridization buffer with a probe containing the 32Plabeled DNA probe specific for Hsp25 or mouse G3PDH overnight at 42 °C. The probe was prepared by using the random primed DNA synthesis (oligolabeling kit; Amersham Pharmacia Biotech) in the presence of [α-32P]dCTP (3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). After washing with 2X SSC, 1% SDS and 0.2X SSC, 1% SDS for several times at 60 °C, hybridization signals were detected by autoradiography.

Legend to figures

Figure 1: Establishment of HDAC6-expressing cell lines from HDAC6-/- 3T3 cells

3T3 cell lines established from mouse embryo fibroblasts were used to established new lines re-expressing wild type HDAC6 (wt) or HDAC6 bearing mutations either in their two catalytic deacetylase domains (HD^m) or in the 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 with a 3T3 cell line isolated from mouse embryo fibroblasts of the parental HDAC6+/+ mice and a blot was obtained. The blot was then successively probed with the indicated antibodies.

Figure 1B : Expression of Ubiquitin during the heat shock response on rescue HDAC6 wt cells

Ubiquitin and tubulin expression were detected in an experiment similar to that presented in Fig. 2

Figure 2: Abolishment of late heat shock response in cells expressing mutated HDAC6 derivatives

HDAC6-/- cells or derived cell lines expressing the indicated HDAC6 forms were heat shocked for one hour at 43°C and let to recover at 37°C for the indicated times. Extracts were prepared for each of the indicated time point and analysed by a western blot for HSP70, HSP25, HSP90 and tubulin expression (left panel). The right panel shows HSP25 expression

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

in the indicated cell lines revealed by immunofluorescence. "-" means non heat shocked cells and "0" means cells taken right after one hour heat shock.

Figure 3: Non-functional HDAC6 mutants prevent HSP25 mRNA accumulation in response to heat shock.

RNA from the indicated cell lines non heat shocked (-), or after 6 hours (6 h) post heat shock were prepared and probed with HSP25 or GAPDH probes.

Figure 4: HDAC6 mutants prevent post-heat shock HSP25 accumulation in NIH 3T3 cells

NIH 3T3 cells were transfected with the indicated HA-tagged HDAC6 expression vectors. Twenty hours post-heat shock, HDAC6 expressing cells (revealed by an anti-HA antibody) were counted and the proportions of cells also expressing the endogenous HSP25 (revealed by an anti-HSP25 antibody) was calculated. The histograms represent values from three independent experiments.

Figure 5: Mutated HDAC6 derivatives attenuate heat shock-dependent HSF1 activation.

HSF1 expression and phosphorylation were monitored in an experiment similar to that presented in Fig. 2 but the blots were probed with anti-HSF1 and anti-tubulin antibodies.

Figure 6: HSP90 acetylation and complex formation during heat shock depend on HDAC6 functionality.

HDAC6-/- derived cell lines expressing the indicated HDAC6 forms were non heat shocked or heat shocked for one hour at 43°C. Immunoprecipitation was performed with antibody against HSP90 (Stressgen SPA-830) and analyzed by western blots. The blot was then successively probed with the indicated antibodies

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Figure 1: Establishment of HDAC6-expressing cell lines from HDAC6-/- 3T3 cells

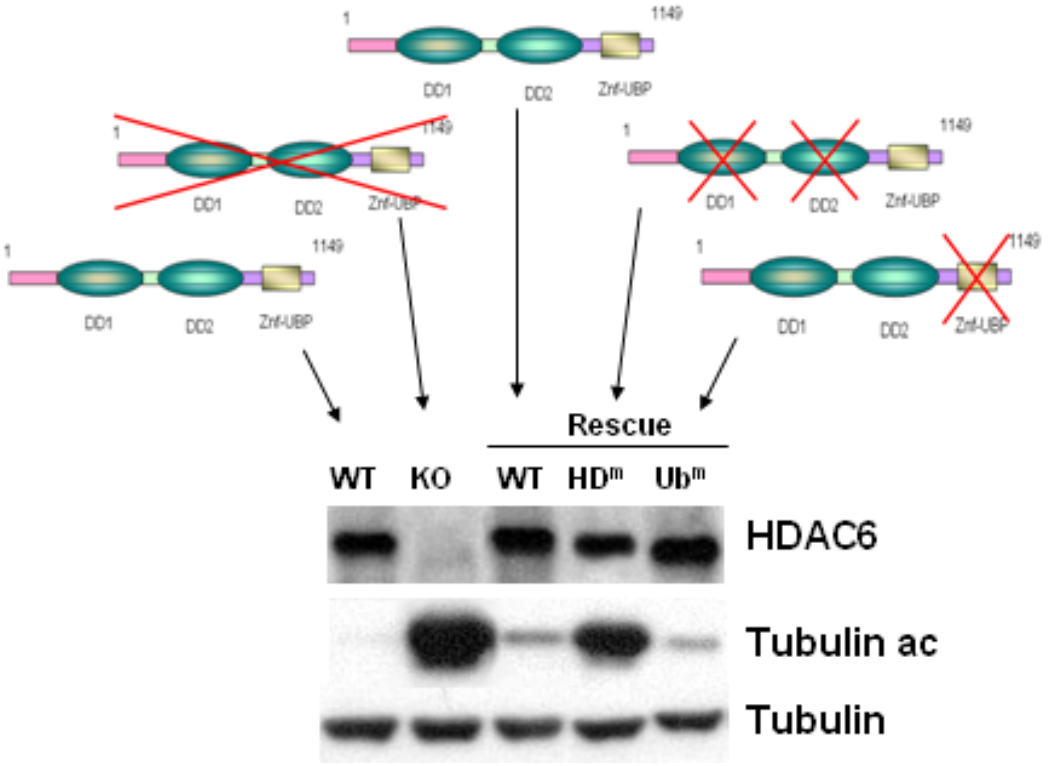
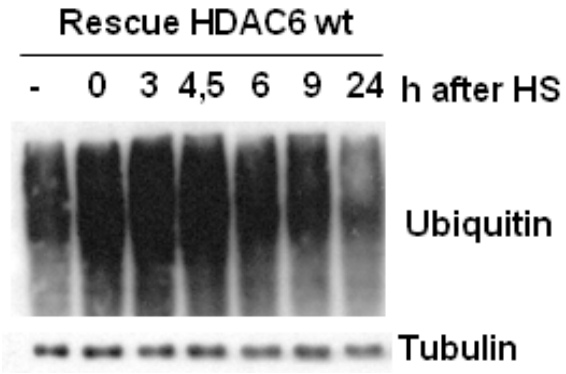
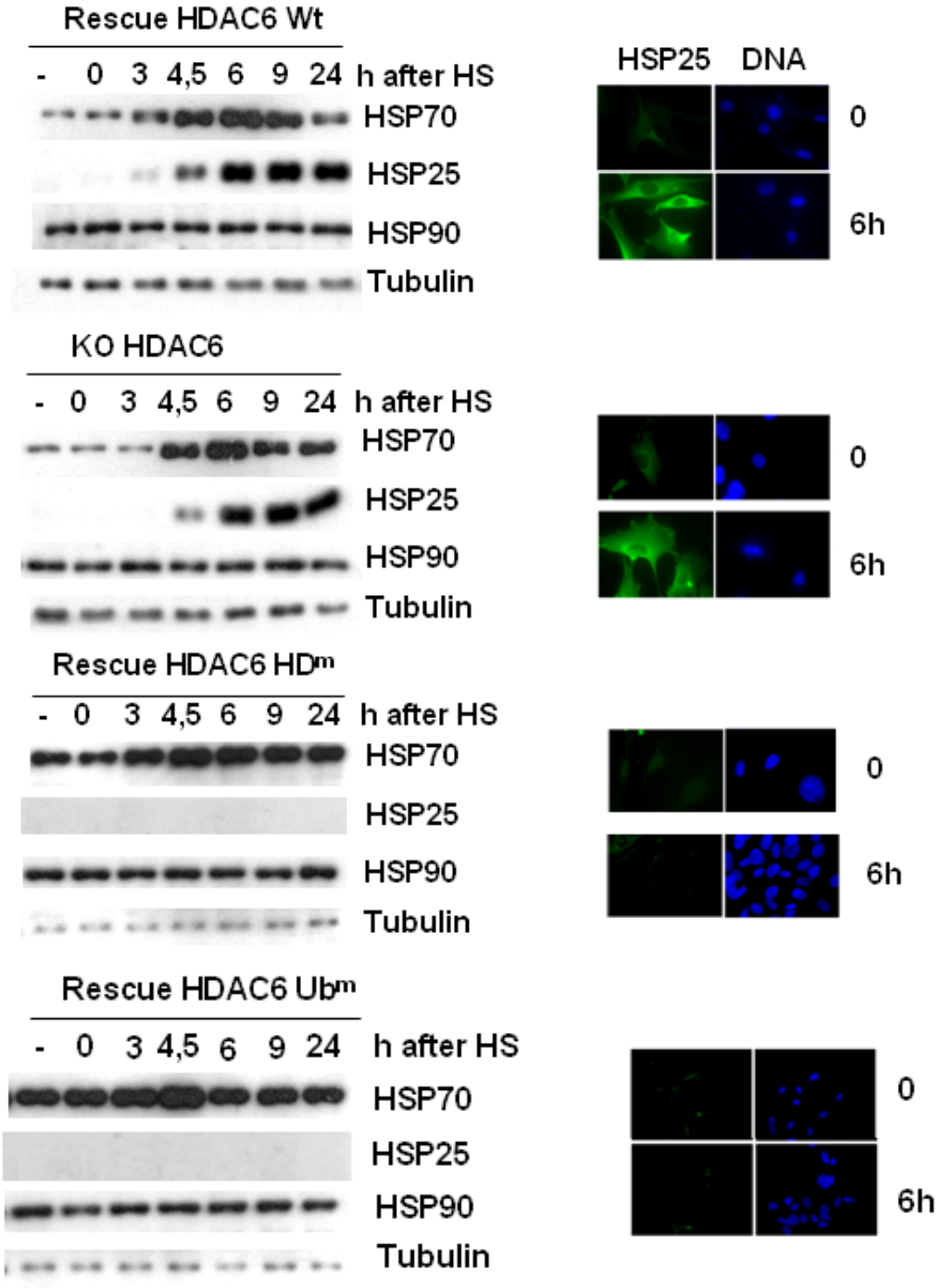


Figure 1B : Expression of ubiquitin during the heat shock response on rescue HDAC6 wt cells



tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Figure 2: Abolishment of late heat shock response in cells expressing mutated HDAC6 derivatives



tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Figure 3: Non-functional HDAC6 mutants prevent HSP25 mRNA accumulation in response to heat shock.

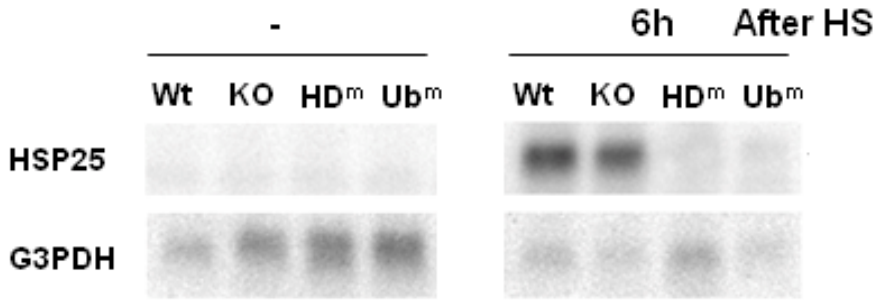
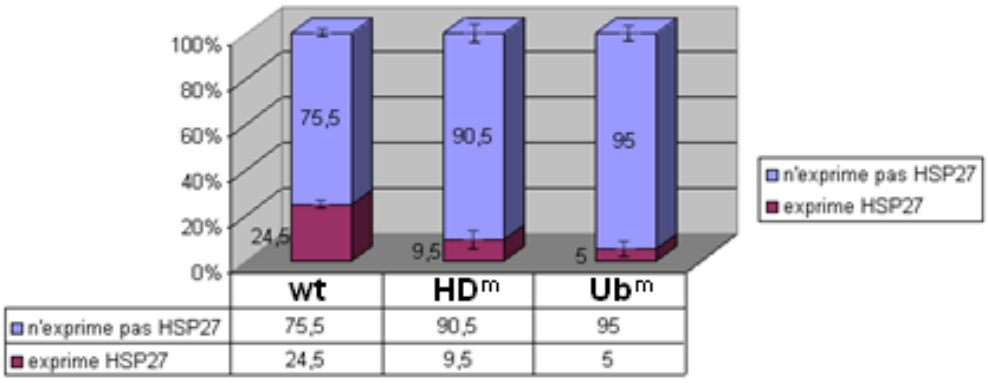


Figure 4: HDAC6 mutants prevent post-heat shock HSP25 accumulation in NIH 3T3 cells



tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Figure 5: Mutated HDAC6 derivatives attenuate heat shock-dependent HSF1 activation.

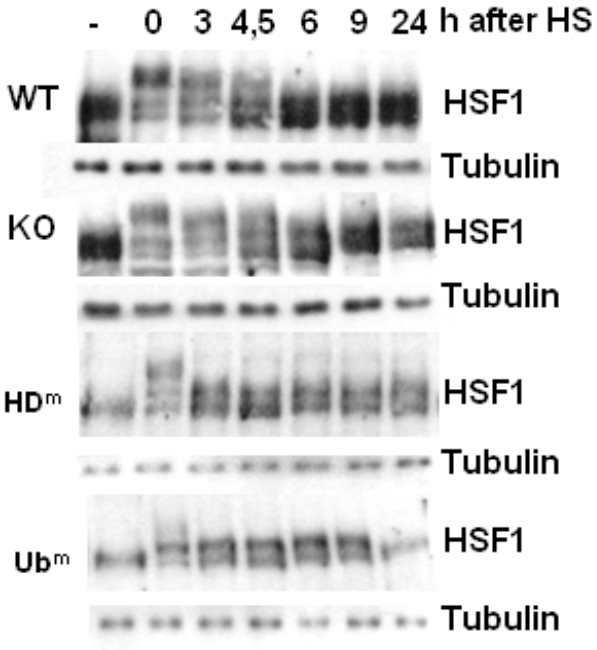
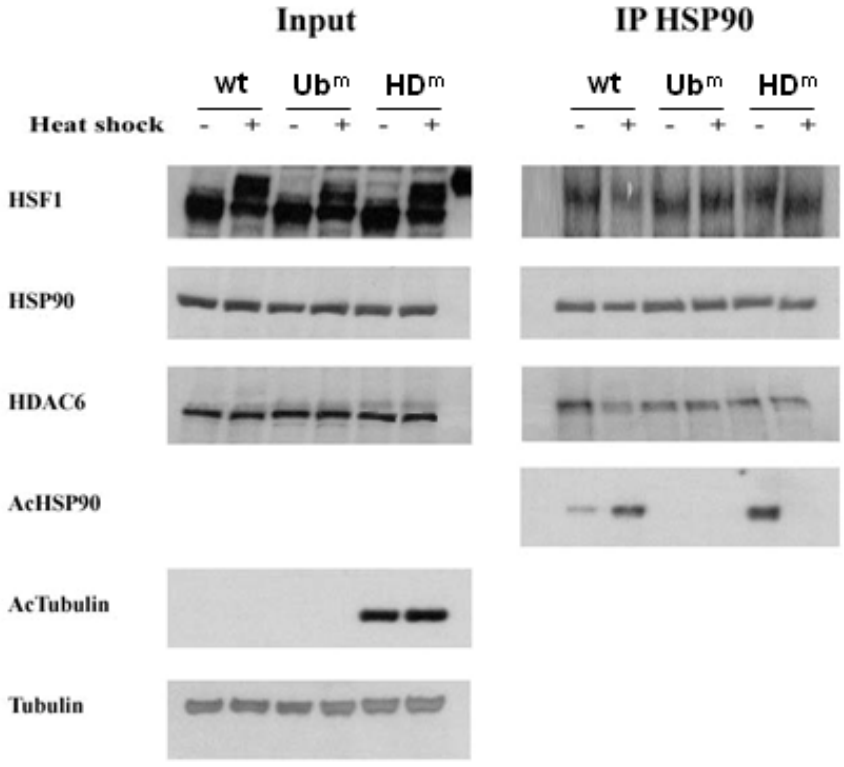


Figure 6: HSP90 acetylation and complex formation during heat shock depend on HDAC6 functionality.



tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Discussion et commentaires de l'article 1

Les travaux présentés ici décrivent un rôle inédit de la déacétylase HDAC6 : sa participation dans la réponse au stress thermique (figure 27).

Descriptions générales du mécanisme de régulation

A l'état non stressé, le facteur principal de réponse au stress (HSF1) est pris en charge par un système répressif constitué de chaperonnes, co-chaperonnes et d'HDAC6. Cet accompagnement empêche efficacement HSF1 de se trimériser et finalement inhibe l'activation des gènes du choc thermique.

A la suite d'un stress, la quantité de protéines mal conformées et ubiquitinées augmente significativement à l'intérieur de la cellule (figure 1B). HDAC6 peut alors interagir avec les chaînes de polyubiquitines et provoquer à la fois, sa propre libération et l'exclusion du facteur HSF1 du complexe répressif HSP90 (figure 6). L'expulsion de ces deux protéines est dépendante des domaines déacétylases et/ou des domaines fixant l'ubiquitine (figure 6). Le facteur HSF1 peut alors se trimériser et migrer dans le noyau pour induire la transcription des gènes HSPs. La quantité cellulaire des protéines du choc thermique augmente pendant les heures après le stress (figure 2). Celles-ci sont capables d'interagir avec les protéines mal conformées et exercent leur activité de chaperonnes.
Dans le même temps, HDAC6 libre est titrée par les protéines ubiquitinées présentes dans la cellule. Tant que le nombre de ces protéines est conséquent, HDAC6 ne reforme pas le complexe avec HSP90, cette dernière devient alors hyperacétylée (figure 6) et comme les autres chaperonnes, peut agir sur les protéines mal conformées.

Le retour à la normale est favorisé par l'action de chaperonnes qui replient les protéines dénaturées, de déubiquitinases éliminant les chaînes de polyubiquitines et du protéasome qui détruit les protéines altérées. Cette période est décrite comme le temps de récupération et se situe entre la phase de stress et l'état normal.
L'hypothèse proposée serait que la protéine HDAC6, alors libérée des chaînes de polyubiquitines, peut de nouveau interférer avec le complexe répressif d'HSP90. Cette

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

interaction favoriserait le retour à l'état normal en incitant HSF1 à retrouver une conformation de monomère inactif.

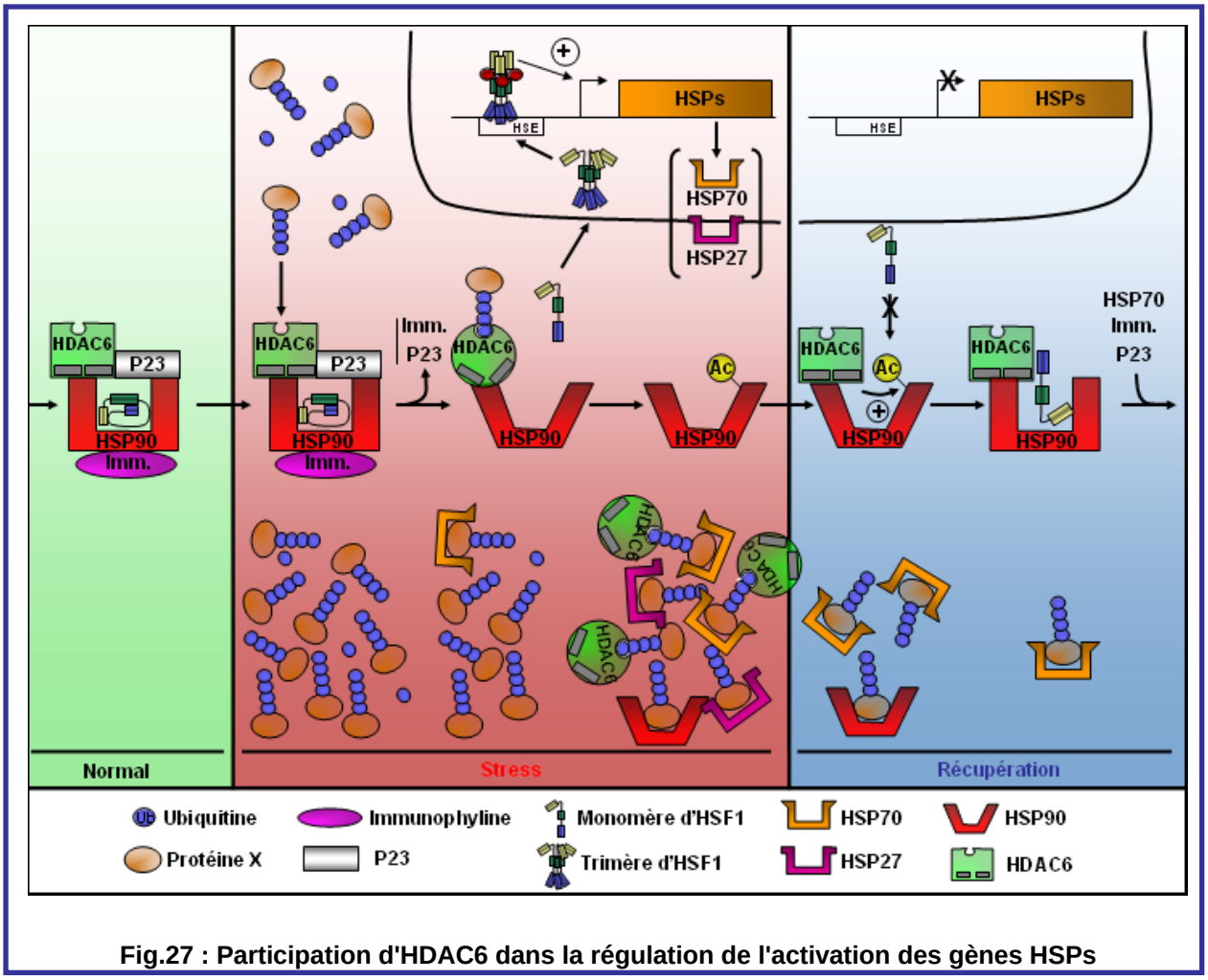


Fig.27 : Participation d'HDAC6 dans la régulation de l'activation des gènes HSPs

Dans la réponse au choc thermique, HDAC6 est présent au niveau du complexe de chaperonnes répressif du facteur HSF1. Lié à la quantité de protéines ubiquitinées dans la cellule, la déacétylase est impliquée indirectement dans l'inactivation du facteur HSF1 après un stress.

Cas des mutants d'HDAC6

Dans cette étude, l'utilisation des mutants est cruciale dans la découverte de cette nouvelle fonction d'HDAC6. La perte d'induction du gène HSP25 n'est observée qu'à la suite de l'utilisation de protéines mutées sur les domaines déacétylases et/ou le domaine fixant

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

l'ubiquitine. Ceci indique que l'un ou l'autre des mutants bloque le processus d'activation des protéines du choc thermique d'une manière pré ou post-transcriptionnelle. Les figures 3, 5 et 6 confirment que le problème se situe au niveau de l'activation d'HSF1.
Contrairement à l'enzyme sauvage, les protéines HDAC6 mutées HD^m et Ub^m restent associées à HSP90 et empêchent la libération du facteur HSF1 : c'est la cause de l'inactivation du gène HSP25 dans ces expériences.

Faut-il une hyperacétylation d'HSP90 pour libérer HSF1 ?

Dans les cellules exprimant HDAC6 sauvage, l'état d'acétylation d'HSP90 évolue d'une forme non acétylée en une forme acétylée (figure 6), suggérant ainsi que la présence de l'acétylation provoque la libération du facteur HSF1.
En réalité, le cas du mutant HD^m permet d'exclure cette hypothèse puisque, sans stress, le facteur reste fixé à HSP90 malgré son hyperacétylation.
Ceci démontre clairement que l'état d'acétylation d'HSP90 n'agit pas sur l'exclusion d'HSF1 et que c'est plutôt une conséquence indirecte de l'absence physique d'HDAC6 avec le complexe répressif.

Cas du mutant HD^m

D'une façon étonnante, l'état d'acétylation d'HSP90 du mutant HDAC6 HD^m est précisément opposé a celui observé avec la protéine sauvage (figure 6).
Cela suggère plusieurs conclusions :
D'une part, l'interaction d'HDAC6 sur HSP90 à l'état non stressé ne bloque pas le site d'acétylation : dans le cas d'HDAC6 sauvage, c'est donc une déacétylation continue qu'exerce l'enzyme sur ce site.
D'autre part, l'absence d'acétylation peut être le résultat de l'action d'une déacétylase à activité catalytique redondante. Cette déacétylase serait inductible après un choc thermique et capable d'exercer une activité enzymatique sur la même lysine acétylée d'HSP90.
Néanmoins, il ne faut pas exclure que cette absence d'acétylation est la conséquence d'un changement de conformation d'HSP90. Le site d'acétylation caché par HDAC6 bloquée sur HSP90 ne peut alors plus être la cible de l'acétyltransférase encore non identifiée de la chaperonne.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Différence d'activation entre HSP70 et HSP25

Une des particularités observées dans l'expérience de la figure 2 à la base de la découverte de la participation d'HDAC6 dans ces mécanismes, est la différence d'induction entre HSP70 et HSP25. Les deux mutants bloquent l'expression d'HSP25 sans atteindre celle d'HSP70.
L'explication ne s'oriente pas à priori vers un mécanisme particulier d'induction d'HSP25 mais elle réside plutôt sur la sensibilité des promoteurs à fixer le trimère d'HSF1.
En effet, si l'on compare la quantité d'HSF1 activé (Fig 5) et l'induction d'HSP70 (Fig 2) dans les cellules mutantes, il apparaît que plus on réduit la quantité d'HSF1 activée, plus l'induction d'HSP70 est touchée. On devine une induction d'HSP70 dans le mutant Ub^m uniquement sur le point 4,5h alors que l'induction semble plus conséquente dans le mutant HD^m où l'on détecte une quantité plus importante d'HSF1 activée.
C'est un effet de seuil dans la sensibilité des promoteurs. Ce seuil est très faible pour HSP70 et beaucoup plus important chez HSP25, d'où son absence d'induction dans les mutants Ub^m et HD^m.
On ne peut tout de même pas exclure qu'il existe un mécanisme particulier d'induction spécifique d'HSP25 dépendant d'HDAC6. Des expériences complémentaires confirmeront ou infirmeront ces hypothèses.

Perspectives d'étude

La mise en place du système répressif des chaperonnes a déjà été étudiée par différentes équipes (Ali et al., 1998; Guo et al., 2001; Zou et al., 1998). Il serait intéressant de connaître avec précision le déroulement des étapes d'activation et de récupération d'HSF1 en ajoutant HDAC6 dans le schéma général déjà établi (Fig.26).

La recherche de la déacétylase détenant une activité redondante avec celle d'HDAC6 serait un autre point à éclaircir. Elle permettrait de comprendre pourquoi l'absence complète d'HDAC6 n'altère pas l'activation des gènes HSPs, quelle est la fonction de l'acétylation d'HSP90 et aboutirait à l'identification de l'acétyltransférase qui acétyle cette lysine.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Article 2 : Régulation subcellulaire de hHDAC6

L'article 2 a été publié dans le journal "the Journal of Biological Chemistry" (septembre 2004).

Résumé

Par rapport aux autres HDACs, la protéine HDAC6 a une localisation subcellulaire exclusivement cytoplasmique.
Cette caractéristique est primordiale pour HDAC6 dans ses fonctions de déacétylase de la tubuline, de prise en charge des protéines ubiquitinées et récemment, dans l'activation des HSPs.

La description d'un mécanisme de régulation a déjà fait l'objet d'un travail sur la protéine murine (Verdel et al., 2000). HDAC6 de souris est activement exportée du noyau par un système d'export contrôlé par la protéine CRM1.

L'article présenté ici montre la régulation de la localisation d'HDAC6 humaine (hHDAC6).
Il décrit un domaine particulier absent sur les protéines HDAC6 des autres organismes. Ce domaine, riche en sérines et en acides glutamique (nommé SE14), est la répétition d'un tétradécapeptide positionné coté C-terminal de la protéine.
Il n'a pas d'action sur les propriétés connues de déacétylation de la tubuline ou de fixation de l'ubiquitine mais intervient plutôt dans la régulation de la localisation d'hHDAC6.

Après l'identification des autres domaines d'exports et d'imports nucléaires, il apparaît que le domaine SE14 est à la base d'un mécanisme supplémentaire, résistant à la leptomycine B, renforçant la position cytoplasmique d'hHDAC6.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 279, No. 46, Issue of November 12, pp. 48246–48254, 2004
© 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Printed in U.S.A.

Role of the Tetradecapeptide Repeat Domain of Human Histone Deacetylase 6 in Cytoplasmic Retention*

Received for publication, July 28, 2004, and in revised form, September 1, 2004
Published, JBC Papers in Press, September 3, 2004, DOI 10.1074/jbc.M408583200

Nicholas R. Bertos‡, Benoit Gilquin§, Gordon K. T. Chan¶, Tim J. Yen¶, Saadi Khochbin§, and Xiang-Jiao Yang‡‖

From the ‡Molecular Oncology Group, Department of Medicine, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada, §Equipe Chromatine et Expression des Genes, INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Faculte de Medecine, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France, and ¶Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania 19111

Histone deacetylase 6 (HDAC6) contains tandem catalytic domains and a ubiquitin-binding zinc finger and displays deacetylase activity toward acetylated microtubules. Here we show that unlike its orthologs from *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila,* and mouse, human HDAC6 possesses a tetradecapeptide repeat domain located between the second deacetylase domain and the C-terminal ubiquitin-binding motif. Related to this structural difference, the cytoplasmic localization of human, but not murine, HDAC6 is resistant to treatment with leptomycin B (LMB). Although it is dispensable for the deacetylase and ubiquitin binding activities of human HDAC6, the tetradecapeptide repeat domain displays acetyl-microtubule targeting ability. Moreover, it forms a unique structure and is required for the LMB-resistant cytoplasmic localization of human HDAC6. Besides the tetradecapeptide repeat domain, human HDAC6 possesses two LMB-sensitive nuclear export signals and a nuclear localization signal. These results thus indicate that the cytoplasmic localization for murine and human HDAC6 proteins is differentially regulated and suggest that the tetradecapeptide repeat domain serves as an important sequence element to stably retain human HDAC6 in the cytoplasm.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Lysine acetylation has been shown to regulate functions of histones, about 40 transcription factors, and over 30 other proteins (1). This modification process is reversible and maintained by opposing actions of lysine acetyltransferases and deacetylases *in vivo*. Among the latter are histone deacetylases (HDACs).[1] According to sequence homology to yeast prototypes, known mammalian HDACs have been grouped into three classes (2–5). Within class II, there are HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9, and HDAC10. The catalytic domains of these deacetylases display significant sequence similarity to that of yeast Hda1 (6). Among class II members, HDAC4, HDAC5, HDAC7, and HDAC9 constitute a subclass (IIa), whereas HDAC6 and HDAC10 form class IIb. It is well established now that class IIa members are enzymatic transcriptional corepressors whose functions are regulated by nucleocytoplasmic trafficking (5, 7).

HDAC6, a class IIb member, possesses tandem catalytic domains and a Cys/His-rich motif (8, 9). The Cys/His-rich motif shows significant sequence homology to the BRCA1-associated protein BRAP2 and several ubiquitin-specific proteases, and is known as a DAUP (deacetylase-ubiquitin-specific protease) domain (10), HUB (HDAC6-, USP3- and BRAP2-related) finger (11), ZnF-UBP (ubiquitin C-terminal hydrolase-like zinc finger) (12), PAZ (polyubiquitin-associated zinc finger) (13), and BUZ (bound to ubiquitin zinc finger) (14). It specifically interacts with ubiquitin (12, 13) and may function as a monoubiquitin ligase (15). Related to this, HDAC6 binds to phospholipase A_2-activating protein and p97, both of which have been implicated in regulating ubiquitin-dependent degradation (12). In addition, HDAC6 colocalizes with microtubules and deacetylates α-tubulin to regulate cell motility (16–21), aggresome formation (14), and immune synapse organization (22). Therefore, HDAC6 plays important roles in the cytoplasm.

Inhibition of CRM1-dependent nuclear export results in accumulation of murine HDAC6 (mHDAC6) in the nucleus (23), so its cytoplasmic localization may be regulated. Different from the *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila,* and murine orthologs, human HDAC6 (hHDAC6) possesses eight consecutive Ser-Glu-containing tetradecapeptide (SE14) repeats between the second deacetylase domain and the C-terminal ubiquitin-binding zinc finger (11). Here we report that the cytoplasmic localization of hHDAC6 is resistant to treatment with leptomycin B (LMB), demonstrate that the SE14 repeat domain is responsible for this resistance, and show that hHDAC6 possesses intrinsic nuclear import and export signals. Thus, these results unexpectedly reveal that, compared with its murine ortholog, hHDAC6 possesses additional mechanisms for its cytoplasmic retention.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmid Constructs—Mammalian expression plasmids for hHDAC6 and deletion mutants were constructed on pcDNA3.1(−) (Invitrogen) by

* This work was supported by funds from the Canadian Cancer Society through the National Cancer Institute of Canada and from the Canada Foundation for Innovation (to X. J. Y.), a fellowship from Ligue Nationale Contre Cancer-comité de l'Isère and ARC (to B. G.) and a grant from Région Rhône-Alpes-thème prioritaire Cancer (to S. D.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‖ To whom correspondence should be addressed: Molecular Oncology Group, Royal Victoria Hospital, Rm. H5.41, McGill University Health Centre, 687 Pine Ave. West, Montreal, Quebec H3A 1A1, Canada. Tel.: 514-934-1934 (ext. 34490); Fax: 514-843-1478; E-mail: xiang-jiao.yang@mcgill.ca.

[1] The abbreviations used are: HDAC, histone deacetylase; hHDAC6, human HDAC6; mHDAC6, murine HDAC6; dHDAC6, *Drosophila* HDAC6; SE14, serine-glutamate containing tetradecapeptide; LMB, leptomycin B; HUB, HDAC6-, USP3- and BRAP2-related zinc finger; CRM1, chromosome regulation and maintenance 1; NES, nuclear export signal; NLS, nuclear localization signal; CRS, cytoplasmic retention signal; ActD, actinomycin D; GFP, green fluorescent protein; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RT, reverse transcription; PBS, phosphate-buffered saline; TSA, trichostatin A.

This paper is available on line at http://www.jbc.org

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

standard methods. GFP constructs were derived from pEGFP-C2 (BD Biosciences). Additional HDAC6 mutants were generated by PCR with Expand (Roche Applied Science) thermostable DNA polymerase or by site-directed mutagenesis with single-stranded uracil-containing templates and T7 DNA polymerase. Mutations were confirmed by sequencing with T7 Sequenase 2.0 (Amersham Biosciences).

RT-PCR—Total RNA was isolated from murine kidney, liver, and lung using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. A One-step RT-PCR kit (Qiagen) was used to amplify cDNA fragments corresponding to nucleotides 2607–3133 of mHDAC6 (GenBank™ accession number NM_010413) with primers NDA57 (5′-TCC TGT ATC AGC TAA GGA AA-3′) and NDA58 (5′-GGG TAT TAA AGT CCC CAA AT-3′). An aliquot of 200 ng of RNA was used in a total volume of 10 μl per RT-PCR. After 30 cycles of amplification in the GeneAmp PCR System 9700 (PerkinElmer Life Sciences), amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis and cloned for subsequent sequencing.

Preparation of Extracts from HeLa S3 Suspension Culture—For suspension culture, adherent cells were harvested by trypsinization and resuspended in Joklik's-modified essential medium (Invitrogen) supplemented with minimum Eagle's medium nonessential amino acids (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 24 mM $NaHCO_3$, and 5% fetal bovine serum. The suspension culture was grown in spinner flasks at 37 °C with stirring (100 rpm). For extract preparation, cells were harvested at $0.8–1.7 \times 10^6$ cells/ml. Cytoplasmic and nuclear extracts were prepared as described (24).

Sizing Chromatography—Cell extracts were fractionated on a prepacked Superose 6 column (HR 10/30; Amersham Biosciences) linked to a BioLogic protein purification system (Bio-Rad). The column was equilibrated with buffer B (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10% glycerol, 5 mM $MgCl_2$, 0.1% Tween 20, 5 mM β-mercaptoethanol, and 0.5 mM PMSF) containing 0.15 M KCl. For extract injection, 0.5- or 1.0-ml static loops were used. For molecular weight calibration of the column, a gel filtration HMW calibration kit (Amersham Biosciences) was used. Fractions were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie staining.

Expression of hHDAC6 in Sf9 Cells—The hHDAC6 coding sequence was cloned into pFastBac1 (Invitrogen) along with a C-terminal FLAG tag. Recombinant baculovirus was generated using the Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) and then used to infect Sf9 insect cells, growing as a suspension culture in Grace's insect medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% Pluronic F68, and antibiotics. 48 h post-infection, cells were harvested and washed once with phosphate-buffered saline (PBS). Extracts were prepared in buffer B containing 0.15 M KCl and subjected to affinity purification on anti-FLAG M2-agarose. Protein purity was assessed by SDS-PAGE and Coomassie staining.

HDAC Assays—HDAC activities were determined by measuring the release of [^{3}H]acetate from [^{3}H]acetyl-histones as described previously (25). Assays were carried out in 0.2 ml of buffer H (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 0.1 mM PMSF) containing [^{3}H]acetyl-histones (20,000 dpm). The reaction was allowed to proceed at 37 °C for 2 h and was stopped by the addition of 50 μl of 0.1 M HCl, 0.16 M acetic acid. Released [^{3}H]acetate was extracted with 0.6 ml of ethyl acetate. After centrifugation, 0.45 ml of the upper organic phase was subjected to liquid scintillation counting.

Tubulin Deacetylation—In vivo tubulin deacetylation assays were performed as described (18). For *in vitro* assays, 6-well plates containing COS cells at 75% confluency were transfected with 2 μg of expression vectors encoding hHDAC6 and mutants. 24 h after transfection, cells were lysed in 50 μl of lysis buffer (15 mM NaCl, 60 mM KCl, 12% sucrose, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.65 mM spermidine, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, and 50 ng/ml trichostatin A (TSA)) and kept at room temperature for 30 min prior to the addition of the SDS sample buffer for subsequent SDS-PAGE and Western blotting analysis.

Ubiquitin Binding Assays—Extract preparation and ubiquitin pull-down assays were performed as described previously (12).

Anti-hHDAC6 Antibody Production—The C-terminal 409 residues of hHDAC6 were expressed as a maltose-binding protein fusion and purified as described (26). The purified maltose-binding protein fusion protein was dialyzed against PBS and then injected into a rabbit for antiserum production.

Small Scale Cytoplasmic and Nuclear Fractionation—A procedure described previously (26, 27) was used with minor modifications. Briefly, cultured cells were washed twice with PBS and lysed *in situ* using 0.5 ml of ice-cold hypotonic lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.6, 20% glycerol, 10 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 25 mM NaF, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, and protease inhibitors). After 5 min on ice with occasional agitation, the cell lysate was harvested by scraping and centrifuged for 10 min in a benchtop centrifuge ($1,300 \times g$) at 4 °C. The supernatant was collected, cleared by high speed centrifugation (10 min at $16,000 \times g$) at 4 °C, and saved as the cytoplasmic fraction. The pellet from the low speed centrifugation was suspended in 0.5 ml of hypotonic lysis buffer containing 0.5 M NaCl and rotated for 30 min at 4 °C. After the high speed centrifugation, supernatants were collected as nuclear extracts.

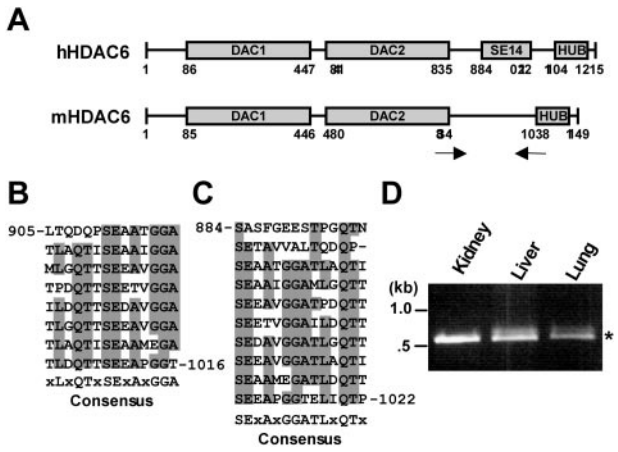


FIG. 1. **The SE14 repeat domain is unique to hHDAC6.** *A*, schematic representation of human and mouse HDAC6. *DAC1* and *DAC2*, tandem deacetylase domains; *SE14*, SE14 repeat domain; and *HUB*, HDAC6-, USP3-, and BRAP2-related zinc finger. *Arrows* represent positions of primers used for RT-PCR amplification of a mHDAC6 cDNA fragment. *B* and *C,* two potential sequence alignments of the SE14 repeats of hHDAC6. Consensus sequences are also shown. To derive the consensus sequences, a residue was considered to be conserved if it remains unchanged in six (*B*) or seven (*C*) repeats. *D*, RT-PCR was performed with total RNA from indicated murine tissues using primers depicted above. The *asterisk* marks the predicted size of the RT-PCR fragment based on published mHDAC6 sequences.

Fluorescence Microscopy—Green fluorescence and indirect immunofluorescence microscopic analyses were performed as described (28).

RESULTS

SE14 Repeat Domain of hHDAC6—Besides its tandem catalytic domains and the ubiquitin-binding zinc finger, hHDAC6 possesses eight SE14 repeats with the consensus sequence *X*LX*Q*TX*S*E*X*A*X*GGA, where *X* represents any amino acid residue and invariant residues are shown in boldface (Fig. 1, *A* and *B*). A slightly different alignment allows 10 repeats with the consensus sequence SE*X*A*X*GGATL*X*Q*T*X (Fig. 1*C*). It is presently unclear which alignment represents the structure of this domain, but the presence of such repeats suggests that this domain may have a unique structure and thereby play a role in regulating the function of hHDAC6. Most intriguingly, this SE14 repeat domain is not present in the published sequences of *C. elegans*, *Drosophila*, mouse, and rat HDAC6 proteins (GenBank™ accession numbers NP_500788, NP_034543 and XP_228733 (8, 29). To confirm that the published mouse HDAC6 sequence (8) does not just represent an isoform lacking an SE14 repeat domain, total RNA was isolated from three murine tissues and subjected to RT-PCR with primers flanking the potential SE14 repeat domain (Fig. 1*A*). Based on the published mouse HDAC6 sequence (8), the fragment was predicted to be 530 bp. If there were an isoform with an SE14 repeat domain, the corresponding cDNA fragment would be ~1 kb. As shown in Fig. 1*D*, only a fragment of ~530 bp was amplified from all three tissues. DNA sequencing confirmed that this fragment corresponds to the published mouse HDAC6 sequence. Exon-intron organization of the *hHDAC6* gene and RT-PCR analysis indicated that there are no alternatively spliced hHDAC6 isoforms lacking the SE14 repeat domain

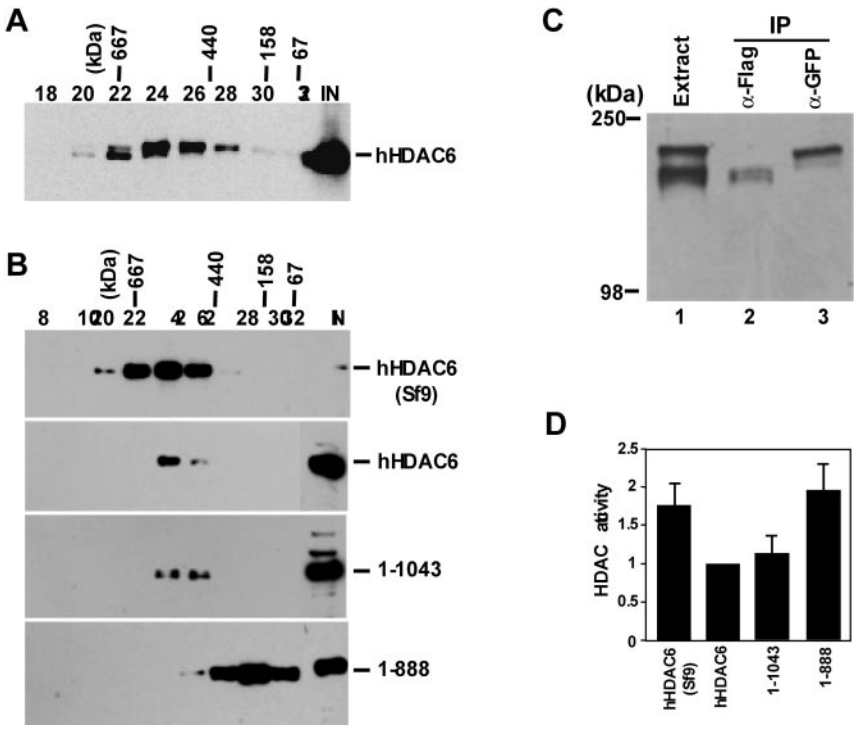


FIG. 2. **The SE14 repeat domain affects the apparent size, but not the deacetylase activity, of hHDAC6.** *A*, HeLa S3 cytoplasmic extracts were fractionated on a Superose 6 column, and resulting fractions as well as extracts were analyzed by Western blotting with anti-HDAC6 antibody. Peak migration positions of native molecular weight standards are depicted at *top*. *B*, extracts from Sf9 insect cells (*top*) expressing FLAG-tagged hHDAC6 and from 293 cells (*lower three panels*) expressing FLAG-tagged hHDAC6 and two deletion mutants were fractionated as in *A*. The resulting fractions were analyzed by Western blotting with anti-FLAG M2 antibody. *C*, extracts from 293 cells expressing GFP-hHDAC6 and FLAG-hHDAC6 were subject to immunoprecipitation (*IP*) with anti-FLAG (*lane 2*) or anti-GFP antibody (*lane 3*), followed by immunoblotting with anti-hHDAC6 antibody. *D*, FLAG-tagged hHDAC6 and its deletion mutants were expressed in Sf9 and 293 cells and affinity-purified on M2 agarose prior to HDAC assays. Relative protein concentrations were assessed by immunoblotting with anti-FLAG antibody and used for normalization. The activity of hHDAC6 expressed in and affinity-purified from 293 cells was arbitrarily set to 1.0.

(data not shown). Therefore, the SE14 repeat domain is present in human, but not murine, HDAC6.

Role of the SE14 Repeat Domain in Modulating the Apparent Size of HDAC6—The unusual feature of the SE14 repeat domain suggests that it may affect the overall structure of full-length hHDAC6. To address this, size-exclusion chromatography was performed to determine the apparent size of hHDAC6. HeLa S3 cell extracts were fractionated on a Superose 6 column, and the resulting fractions were analyzed by immunoblotting with anti-HDAC6 antibody. Endogenous hHDAC6 was detected in fractions 24–26, corresponding to a molecular mass of ~500 kDa (Fig. 2*A*). This is larger than the predicted molecular mass of monomeric hHDAC6 (~150 kDa). To assess whether the apparent size of native hHDAC6 is due to association with other proteins, we expressed FLAG-tagged hHDAC6 in Sf9 insect cells. Extracts from these cells were fractionated on the same Superose 6 column, and the resulting fractions were analyzed by immunoblotting with anti-FLAG antibody. Similar to what was observed with endogenous hHDAC6, FLAG-tagged hHDAC6 from Sf9 cells peaked at fraction 24, corresponding to a molecular mass of ~500 kDa (Fig. 2*B*, *top*). No signal was detected at the expected molecular mass of monomeric hHDAC6 (~150 kDa). Coomassie staining of FLAG-tagged hHDAC6, affinity-purified from Sf9 cells, revealed that the purified protein is almost homogeneous (data not shown), suggesting that the apparent size of hHDAC6 is not due to association with other proteins.

To investigate whether the apparent size of hHDAC6 is due to oligomerization, we determined its self-association ability. For this, FLAG-tagged hHDAC6 was coexpressed with GFP-hHDAC6 in 293 cells. These two fusion proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG and anti-GFP antibodies, and immunoblotting was performed using anti-hHDAC6 antibody. As shown in Fig. 2*C*, FLAG-hHDAC6 and GFP-hHDAC6 did not coimmunoprecipitate with each other, indicating that they do not oligomerize. In agreement with this, *Drosophila* HDAC6 is mainly monomeric (29).

To assess how the SE14 repeat domain contributes to the apparent size of hHDAC6, two C-terminal deletion mutants, 1–1043 and 1–888, were utilized. Whereas the former lacks the HUB finger, the latter possesses neither the HUB finger nor the SE14 repeat domain (Fig. 1*A*). Full-length hHDAC6 and these two mutants were expressed in 293 cells as FLAG-tagged proteins. Extracts were prepared and subjected to sizing chromatography as described above. As shown in Fig. 2*B* (*lower three panels*), like endogenous HDAC6 from HeLa S3 cells, FLAG-tagged hHDAC6 migrated on the Superose 6 column as an ~500-kDa species. Mutant 1–1044 was detected as a peak slightly smaller than hHDAC6, suggesting that the HUB domain does not grossly affect the migration of hHDAC6 on the gel filtration column. By contrast, mutant 1–888 peaked at fraction 30, corresponding to ~150 kDa, suggesting that the SE14 repeat domain is responsible for the anomalous migration of hHDAC6 in size-exclusion chromatography. These results indicate that the SE14 repeat domain may form an unusual structure and affect the overall structure of hHDAC6.

Requirement of the SE14 Repeat Domain for Deacetylase Activities of hHDAC6—We next investigated whether the SE14 repeat domain affects functions of hHDAC6. For this, FLAG-tagged hHDAC6 was expressed in Sf9 cells and affinity-purified to near-homogeneity. As shown in Fig. 2*D*, the purified hHDAC6 protein possessed similar activity as that expressed in and affinity-purified from 293T cells. To assess how the SE14 repeat domain might affect the HDAC activity of hHDAC6, we analyzed the deletion mutants 1–1043 and 1–888. As shown in Fig. 2*D*, both mutants were found to be as active as the full-length hHDAC6 proteins, indicating that the SE14 repeat domain is not required for the HDAC activity of hHDAC6.

Besides its deacetylase activity toward histones, HDAC6 also deacetylates α-tubulin (16, 18, 19, 21), so we asked whether the SE14 repeat domain regulates the tubulin deacetylase activity of hHDAC6. For this, BalbC3T3 cells were transfected with expression vectors for GFP-tagged hHDAC6 and mutant ΔSE14. In this mutant, residues 888–1024 were removed to delete the SE14 repeat domain. Cells expressing GFP-hHDAC6 or -ΔSE14 were treated with 50 nM TSA and analyzed by fluorescence microscopy. As shown in Fig. 3*A*, like the wild-type HDAC6 protein, mutant ΔSE14 deacetylated α-tubulin *in*

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

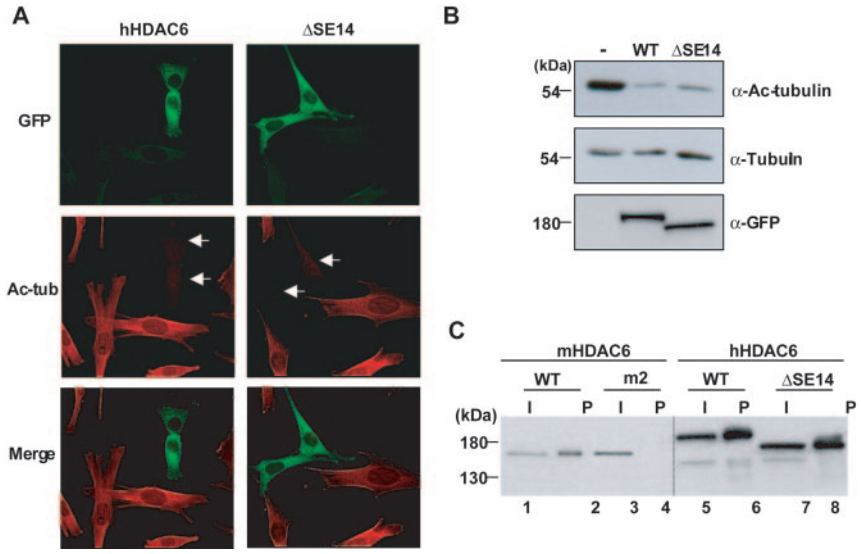


FIG. 3. **The SE14 repeat domain of hHDAC6 is dispensable for tubulin deacetylation and ubiquitin binding.** *A*, BalbC3T3 cells were transfected with a plasmid expressing GFP-hHDAC6 or GFP-ΔSE14. 24 h post-transfection, cells were treated with 50 nM TSA for 6 h and fixed for fluorescence microscopy to detect GFP fusion proteins (*green*) and acetyl α-tubulin (*red*). Merged images are depicted at the *bottom*. *Arrows* indicate the disappearance of acetyl α-tubulin. *B*, COS cells were transfected with expression vectors for GFP-hHDAC6 or GFP-ΔSE14. 24 h post-transfection, cells were lysed and kept at room temperature for 30 min prior to addition of SDS-PAGE sample buffer. Immunoblotting was performed successively with anti-acetyl α-tubulin (*upper panel*), anti-α-tubulin (*middle panel*), and anti-GFP (*lower panel*). *C*, expression vectors for hemagglutinin-tagged mHDAC6 and mutant m2, and for GFP-tagged hHDAC6 and ΔSE14, were expressed in COS cells. 24 h post-transfection, cell extracts were prepared and incubated with ubiquitin-agarose beads. Proteins retained on the beads were eluted (*P*) and analyzed together with 10% of input (*I*) by Western blotting with anti-hemagglutinin (*lanes 1–4*) or anti-GFP (*lanes 5–8*) antibody. *WT*, wild type.

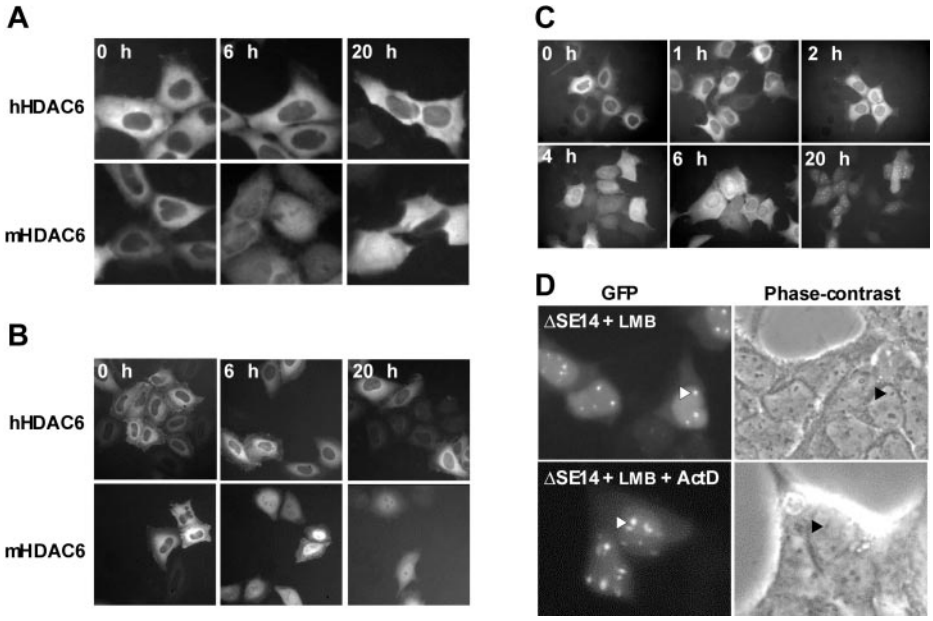


FIG. 4. **The SE14 repeat domain of hHDAC6 mediates LMB resistance.** *A* and *B*, 293 (*A*) and HeLa (*B*) cells expressing hHDAC6 and mHDAC6 as GFP fusion proteins were treated with 0.1 (*A*) or 0.02 μM (*B*) LMB and analyzed by green fluorescence microscopy at the indicated time points. *C*, 293 cells expressing GFP-ΔSE14 were treated with 0.02 μM LMB and analyzed by green fluorescence microscopy at the indicated time points. *D*, 293 cells expressing GFP-ΔSE14 were treated either with 0.02 μM LMB for 17 h (*top*) or 0.02 μM LMB for 17 h followed by 1.0 μg/ml ActD for 2 h (*bottom*). The subcellular localization of GFP-ΔSE14 was assessed by live green fluorescence microscopy. Representative intense GFP signals (*left*) and the corresponding nucleoli (*right*) are indicated with *light* and *dark arrowheads*, respectively.

vivo. Consistent with this, the wild-type and mutant HDAC6 proteins both efficiently deacetylated α-tubulin *in vitro* (Fig. 3*B*), indicating that the SE14 repeat domain is dispensable for the tubulin deacetylase activity of hHDAC6.

Role of the SE14 Repeat Domain in Ubiquitin Binding—The HUB finger of HDAC6 binds to ubiquitin (12, 13). Because of its close proximity to this finger (Fig. 1*A*), the SE14 repeat domain may affect the ubiquitin binding activity of hHDAC6. To address this, mouse and human HDAC6 proteins were expressed in COS cells, and extracts were tested for the ability to bind ubiquitin-agarose. As a control, we tested mHDAC6 and its point mutant, m2, in which His-1094 and His-1098, residues critical for ubiquitin binding, are replaced with alanine (12). As reported (12), wild-type mHDAC6, but not m2, was retained on ubiquitin-agarose (Fig. 3*C*, *lanes 1–4*). Wild-type hHDAC6 and mutant ΔSE14 were retained on the agarose to similar levels (Fig. 3*C*, *lanes 5–8*), indicating that the SE14 repeat domain does not affect the ubiquitin binding ability of hHDAC6. Moreover, the SE14 repeat domain itself did not bind to ubiquitin (data not shown).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

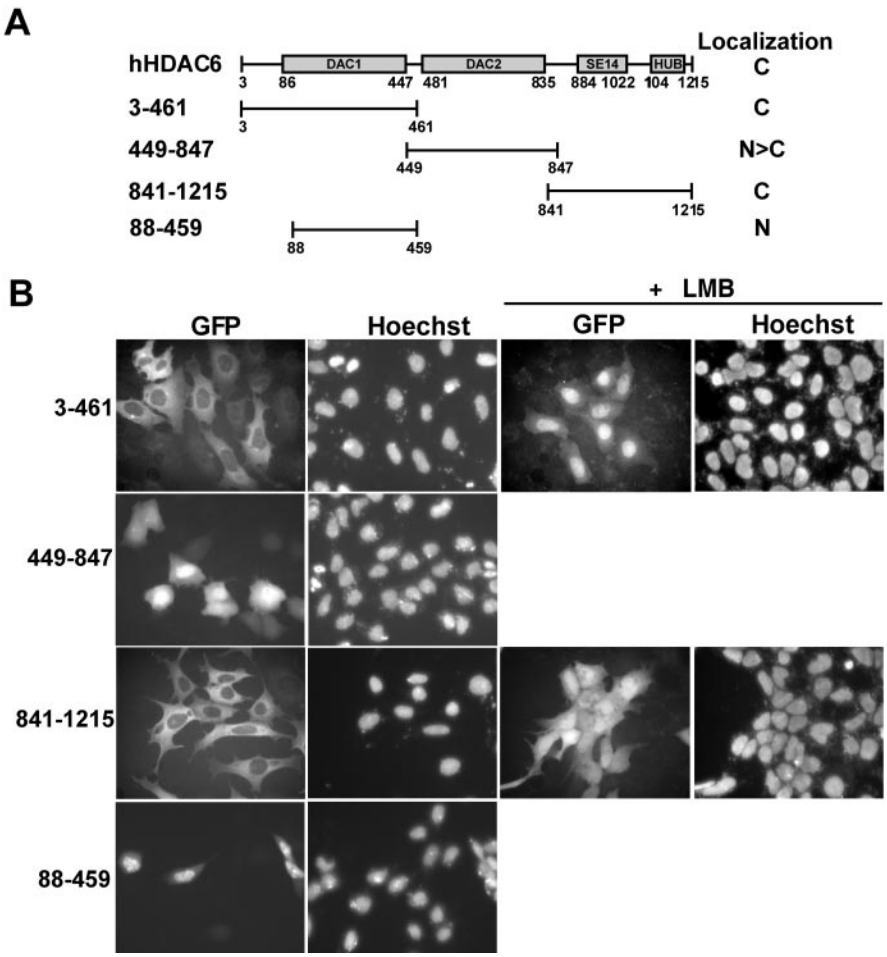


FIG. 5. **hHDAC6 possesses motifs with nuclear import and export activities.** *A*, schematic representation of hHDAC6 deletion mutants with their subcellular localization summarized at right: *C*, predominantly cytoplasmic; *N>C*, partially enriched in the nucleus; and *N*, predominantly nuclear. *B*, 293 cells expressing the indicated deletion mutants as GFP fusion proteins were fixed, stained with Hoechst 33258, and examined under a fluorescence microscope. For assessment of CRM1-dependent nuclear export, transfected cells were incubated with 0.02 μM LMB for 17 h prior to fixation.

LMB-resistant Cytoplasmic Localization of hHDAC6—mHDAC6 is mainly cytoplasmic (23), so we examined the subcellular localization of hHDAC6. For this, nuclear and cytoplasmic extracts were prepared from 293, 293T, and HeLa cells. Immunoblotting analysis of these extracts with a polyclonal antibody raised against the C-terminal third of hHDAC6 revealed that endogenous hHDAC6 was predominantly cytoplasmic (data not shown). Moreover, GFP-hHDAC6 was found to be mainly cytoplasmic in 293 and HeLa cells (Fig. 4, *A* and *B*). Therefore, like mHDAC6, hHDAC6 is a cytoplasmic protein.

mHDAC6 is actively exported from the nucleus in a CRM1-dependent manner (23), so we asked whether hHDAC6 is similarly regulated. To address this question, 293 and HeLa cells expressing GFP-hHDAC6 were treated with LMB (30). Unexpectedly, the cytoplasmic localization of GFP-hHDAC6 was minimally affected by this treatment (Fig. 4, *A* and *B*). As reported (23), LMB treatment stimulated the nuclear accumulation of GFP-mHDAC6 (Fig. 4, *A* and *B*). These results indicate that the cytoplasmic localization of hHDAC6 is controlled differently from that of mHDAC6.

Role of the SE14 Repeat Domain in LMB-resistant Cytoplasmic Localization of hHDAC6—The SE14 repeat domain is the major difference between murine and human HDAC6 proteins (Fig. 1*A*). To determine whether this domain regulates the cytoplasmic retention of hHDAC6, mutant ΔSE14 was expressed as a GFP fusion protein in 293 cells, and its subcellular localization was examined by fluorescence microscopy. Without LMB treatment, GFP-ΔSE14 was mainly cytoplasmic in 293 cells (Fig. 4*C*). 2 h after LMB treatment, GFP-ΔSE14 started to enter the nucleus; at 4–6 h, it became almost pancellular; and at 20 h, it was enriched in visible nuclear dots. These dots appeared to be nucleoli (Fig. 4*D*, *top*). To understand how ΔSE14 is associated with subnucleolar compartments, 293 cells expressing GFP-ΔSE14 were treated with LMB along with 1 μg/ml actinomycin D (ActD). At this concentration, ActD leads to segregation and subsequent dispersal of nucleolar compartments (31). As shown in Fig. 4*D* (*bottom*), GFP-ΔSE14 remained associated with punctate structures corresponding to compacted nucleoli that are known to contain condensed nucleolar chromatin. These results indicate that the SE14 repeat domain of hHDAC6 is required for LMB-resistant cytoplasmic localization.

Cytoplasmic Retention and Nuclear Export Signals of hHDAC6—Because the cytoplasmic localization of mutant ΔSE14 was sensitive to LMB treatment (Fig. 4*C*), hHDAC6 may possess a CRM1-dependent NES(s). Because mutant ΔSE14 is able to relocate to the nucleus (Fig. 4*C*), hHDAC6 may possess an NLS(s). Consistent with these contentions, mHDAC6 is subject to active nucleocytoplasmic trafficking and possesses a functional NES (23). To determine whether the LMB-resistant cytoplasmic localization of hHDAC6 is due to lack of nucleocytoplasmic trafficking signals and to analyze how the SE14 repeat domain contributes to the cytoplasmic localization of hHDAC6, we took a systematic approach to map related sequence determinants. Compared with full-length hHDAC6, mutant ΔSE14 is more similar to mHDAC6 at the structural level (Fig. 1*A*). Like mHDAC6 (23), ΔSE14 is subject to active nuclear export (Fig. 4*C*), suggesting that this mutant possesses nuclear import and export signals. To map these signals, we analyzed the deletion mutants 3–461, 449–847, and 841–1215 (Fig. 5*A*). As shown in Fig. 5*B*, 3–461 and 841–1215, but not 449–847, were mainly cytoplasmic. LMB treat-

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

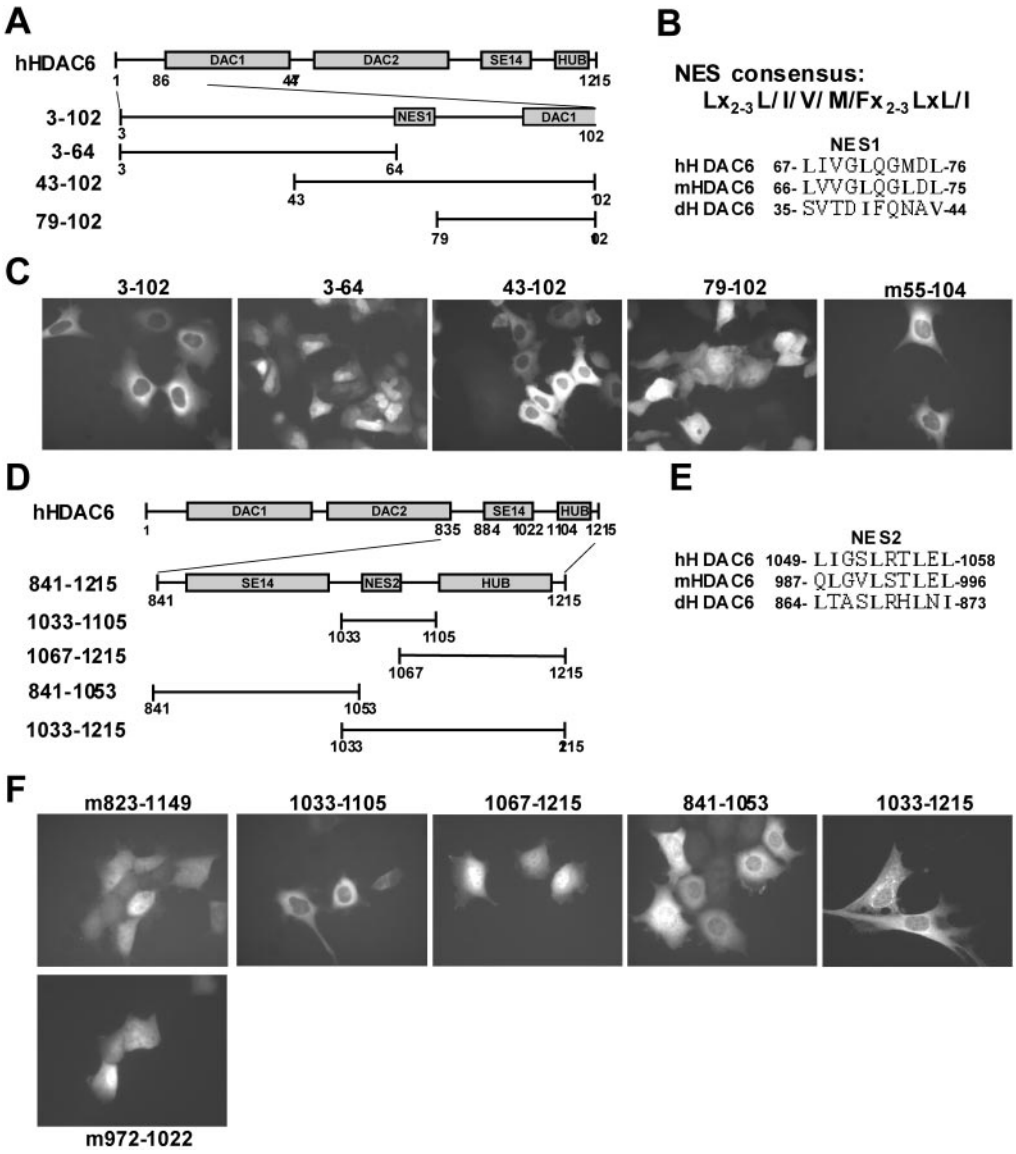


FIG. 6. **Mapping of cytoplasmic retention and nuclear export sequences.** *A*, schematic illustration of hHDAC6 deletion mutants used to map NES1. *B*, sequence alignment of hHDAC6 NES1 with the corresponding regions of mHDAC6 and dHDAC6. Residues matching the NES consensus sequence (depicted at *top*: *x* denotes any residue) are shown in *boldface. C*, 293 cells expressing the indicated deletion mutants as GFP fusion proteins were analyzed by live green fluorescence microscopy. *D*, schematic illustration of hHDAC6 deletion mutants used to map NES2. *E*, sequence alignment of NES2 with the corresponding regions of mHDAC6 and dHDAC6. Residues matching the NES consensus sequence are indicated in *boldface. F*, 293 cells expressing the indicated deletion mutants as GFP fusion proteins were analyzed by live green fluorescence microscopy.

ment led to nuclear accumulation of 3–461 (Fig. 5*B*), suggesting that it contains nuclear import and export signals. The same treatment led to pancellular distribution of 841–1215 (Fig. 5*B*), so it possesses an NES.

Unlike 3–461, mutant 88–459 was mainly nuclear (Fig. 5), indicating that an NES is located within the N-terminal 88 residues. Moreover, different from 3–102, 3–64 was nuclear (Fig. 6, *A* and *C*), so the NES is located between residues 64 and 88. The consensus sequence of known leucine-rich NESs is $LX_{2-3}L/I/V/M/FX_{2-3}LXL/I$, where *X* denotes any residue (32, 33). Inspection of the hHDAC6 sequence revealed that residues 67–76 constitute a putative NES (Fig. 6*B*, *NES1*). Upon treatment with LMB for 15 min, mutant 3–102 accumulated in the nucleus (data not shown), suggesting that its nuclear export occurs in a CRM1-dependent manner. To map the NES, mutants 43–102 and 79–102 (Fig. 6, *A* and *C*) were expressed as GFP fusion proteins and subjected to fluorescence microscopy. As shown in Fig. 6*C*, 43–102 was mainly cytoplasmic, unlike 79–102, indicating that residues 65–78 are important for the cytoplasmic localization. Substitution of Leu-76 with alanine inhibited the cytoplasmic localization of a deletion mutant containing the N-terminal 145 residues of hHDAC6 (data not shown). Therefore, NES1 constitutes a functional export signal. Consistent with this, a similar sequence is present in mHDAC6 (Fig. 6*B*) and functions as an NES (Fig. 6*C*, *m55–104*) (23).

Mutant 841–1215 was predominantly cytoplasmic (Fig. 5*B*). By contrast, the corresponding fragment of mHDAC6 was pancellular (Fig. 6*F, mHDAC6 mutant m823–1149*). These findings further support the conclusion that residues 841–1215 of hHDAC6 possess an NES(s). Sequence inspection revealed a potential leucine-rich NES within this region (Fig. 6*E, NES2*), which matches the aforementioned consensus NES sequence (32, 33). To test whether NES2 is functional, four deletion mutants (Fig. 6*D*, *1033–1105, 1067–1215, 841–1053,* and *1033–1215*) were expressed as GFP fusion proteins and analyzed by green fluorescence microscopy. As shown in Fig. 6*F*, like 841–

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

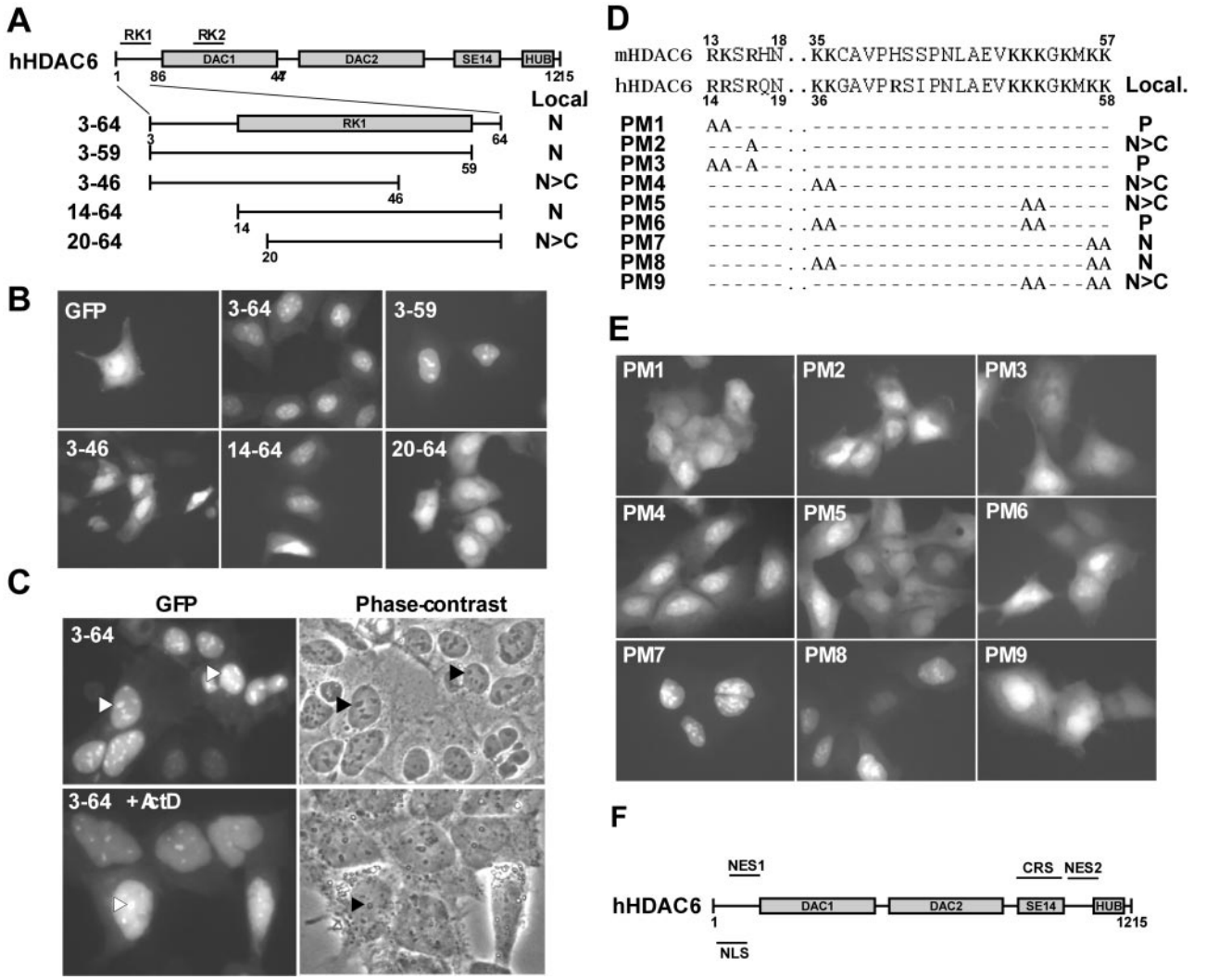


FIG. 7. **Mapping of an NLS.** *A*, schematic representation of hHDAC6 deletion mutants. Subcellular localization is summarized at *right*: *N*, predominantly nuclear and *N*>*C*, partially enriched in the nucleus. Also indicated are two arginine/lysine-rich clusters: *RK1*, residues 14–58, and *RK2*, residues 241–246 (KHRIRR). *B*, the indicated deletion mutants were expressed in 293 cells as GFP fusion proteins, and their subcellular localization was determined by live green fluorescence microscopy. *C*, comparison of the green fluorescence image (*left*) with the corresponding phase-contrast micrograph (*right*) of 293 cells expressing mutant 3–64 as a GFP fusion protein. Representative intense GFP signals and the corresponding nucleoli are denoted with *light* and *dark arrowheads*, respectively. ActD treatment was performed as in Fig. 4*D*. *D*, schematic representation of point mutants (*PM*) derived from mutant 3–64. Subcellular localization of the point mutants is summarized at *right*: *P*, pancellular; *N*, predominantly nuclear; and *N*>*C*, partially enriched in the nucleus. *E*, the indicated point mutants were expressed in 293 cells as GFP fusion proteins, and their subcellular localization was assessed by live green fluorescence microscopy. *F*, schematic representation of sequence elements controlling the subcellular localization of hHDAC6. Besides the indicated NLS, DAC1 also exhibits potent nuclear localization activity (Fig. 4), but this does not appear to be dependent on the arginine/lysine-rich motif RK2.

1215, 1033–1105 and 1033–1215 were cytoplasmic, suggesting that NES2 is functional. Consistent with this, 1067–1215 was pancellular (Fig. 6*F*). After a brief exposure to LMB, 1033–1105 became pancellular (data not shown), indicating that the nuclear export by NES2 occurs in a CRM1-dependent manner. Therefore, hHDAC6 possesses two leucine-rich nuclear export sequences.

Although GFP itself was slightly enriched in the nucleus (data not shown), mutant 841–1053 fused to GFP was slightly enriched in the cytoplasm (Fig. 6*F*), indicating that the SE14 repeat domain exhibits cytoplasmic retention activity. These results also suggest that NES2 and the SE14 repeat domain both contribute to the cytoplasmic localization activity of the C-terminal part of hHDAC6. Unlike mutant 1033–1105, the corresponding region of mHDAC6 did not exhibit such an activity (Fig. 6*F*, mHDAC6 mutant *m972–1022*). Therefore, compared with mHDAC6, hHDAC6 contains additional sequence determinants (*i.e.* the SE14 repeat domain and NES2) for cytoplasmic retention.

Nuclear Localization Signal of HDAC6—Upon LMB treatment, mutant 3–461 became nuclear (Fig. 5), so it possesses a potential NLS(s). Although 88–459 was enriched in the nucleus (Fig. 5), 3–102 was cytoplasmic (Fig. 6). Examination of the amino acid sequence of mutant 3–461 revealed two clusters rich in arginine and lysine residues (Fig. 7*A, RK1* and*RK2*) (34). Because 88–459 was nuclear, we first characterized RK2. Alanine substitution of residues 245–246 did not affect the nuclear localization of 88–459 (data not shown), indicating that RK2 is nonfunctional. This finding prompted us to analyze RK1. As shown in Fig. 7, *B* and *C*, mutant 3–64 was enriched in the nucleus, especially in the dots corresponding to nucleoli, suggesting that RK1 functions as an NLS and contributes to the nucleolar localization of ΔSE14 (Fig. 4). Consistent with this, as observed with ΔSE14, ActD treatment did not alter the association of 3–64 with nucleoli (Fig. 7*C*).

To characterize further the nuclear localization activity of RK1, four deletion mutants (Fig. 7*A*, *3–59*, *3–46*, *14–64*, and *20–64*) were tested. As shown in Fig. 7*B*, mutants 3–59 and

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

14–64 were nuclear, whereas 3–46 and 20–64 exhibited more intense signals in the cytoplasm, suggesting that residues 14–19 and 47–64 are important elements of RK1. Mutant 3–59 was more nuclear than 3–64 (Fig. 7*B*), so residues 60–64 may negatively regulate the nuclear import function. To characterize RK1 further, selected basic residues conserved in mHDAC6 were substituted with alanine (Fig. 7*D*). The resulting mutants were expressed in 293 cells and analyzed by live green fluorescence microscopy. As shown in Fig. 7, *D* and *E*, substitution of RR14–15 dramatically decreased the nuclear localization, whereas replacement of R17 or KK36–37 with alanine had smaller effects (compare the point mutants PM1–4 with 3–64). Substitution of 52–53 also decreased the nuclear localization (compare the point mutant PM5 with 3–64). Consistent with this, mutant PM6 was almost pancellular, whereas PM4 was enriched in the nucleus. Most surprisingly, replacement of KK57–58 increased the nuclear localization (compare mutants PM7 and PM8 with 3–64 and PM4, respectively). This is consistent with the observation that 3–59 was more nuclear than 3–64 (Fig. 7*B*). The point mutant PM9 was less nuclear than PM7 (Fig. 7, *D* and *E*), confirming the importance of KK52–53. Together, these results suggest that RK1 of hHDAC6 constitutes a functional NLS. Consistent with this, deletion of RK1 in full-length mHDAC6 delayed its nuclear entry upon LMB treatment (data not shown). Therefore, RK1 of HDAC6 functions as an NLS.

DISCUSSION

The SE14 Repeat Domain Functions as a CRS—The results presented here indicate that hHDAC6 possesses a unique SE14 repeat domain that is missing in HDAC6 proteins from *C. elegans, Drosophila*, mouse, and rat (Fig. 1). Like mHDAC6 (23), hHDAC6 is mainly cytoplasmic (Fig. 4) (16, 18–21). Unlike that of mHDAC6 (23), the cytoplasmic localization of hHDAC6 is LMB-resistant (Fig. 4), indicative of differential regulation for the cytoplasmic localization of murine and human HDAC6 proteins. The SE14 repeat domain is required for the LMB resistance (Fig. 4) and is also responsible for the anomalous migration of hHDAC6 in size-exclusion chromatography (Fig. 2). Moreover, fragment 841–1053 was able to target GFP to the cytoplasm (Fig. 6). This fragment also displays weak microtubule targeting activity (data not shown). Therefore, the SE14 repeat domain is a CRS that is important for modulating the cytoplasmic localization of hHDAC6.

HDAC6 Possesses Sequences with Nuclear Import and Export Activities—Besides the SE14 repeat domain, hHDAC6 possesses potential nuclear import and export sequences (Fig. 7*F*). It has two potent leucine-rich export signals, residues 67–76 and 1049–1058 (Figs. 6 and 7*F, NES1* and *NES2*, respectively). Upon treatment with the CRM1-specific inhibitor LMB, mutants 3–102 and 1033–1105 rapidly relocated to the nucleus (~15 min; data not shown), so both NES1 and NES2 can function as potent CRM1-dependent export signals. NES1 is highly conserved in mHDAC6 (Fig. 6*B*), and the corresponding region has been identified as an NES (Fig. 6*C, m55–104*) (23). By contrast, NES2 is less conserved in mHDAC6 (Fig. 6*E*), and the corresponding region has been found to be nonfunctional in nuclear export (Fig. 6*F*, *m972–1022*) (23). Most interestingly, NES2, but not NES1, is conserved in dHDAC6 (Fig. 6, *B* and *E*) (29), so the region corresponding to dHDAC6 may function as an NES. Related to this, dHDAC6 is mainly cytoplasmic (29). Therefore, different HDAC6 proteins contain distinct NESs.

When fused to GFP, RK1 of hHDAC6 functioned as an NLS (Fig. 7). Compared with known nuclear import signals, this NLS is atypical. RR14–15 and KK52–53 are key elements, whereas R17 and KK36–37 play less important roles (Fig. 7, *D* and *E*). Such an organization is distinct from classical monopartite or bipartite NLSs (34–36). Residues 57–64 negatively regulate the function of RK1 (Fig. 7). RK1 displays nucleolus targeting activity. Like RK1, several known nucleolar localization signals are R/K-rich (37, 38). RK1 of hHDAC6 is well conserved in mHDAC6 (Fig. 7*D*), and mHDAC6 is actively shuttled between the nuclear and cytoplasmic compartments (Fig. 4) (23), indicating that RK1 may be involved in the nuclear import of mHDAC6. By contrast, dHDAC6 does not have a similar sequence (29), suggesting that RK1-directed activity is unique to HDAC6 proteins from higher organisms.

The identification of sequences with nuclear import and export activities (Figs. 6 and 7) suggests two possibilities. The first one is that the subcellular localization of hHDAC6 is regulated. Consistent with this, LMB treatment led to nuclear accumulation of mHDAC6 (Fig. 4, *A* and *B*) (23). In addition, HDAC6 has been shown to interact with nuclear proteins such as HDAC11 (39), the transcriptional corepressors ETO2 and L-CoR (40, 41), the runt-domain transcription factor Runx2 (42), and sumoylated p300 (43). The second possibility is that the import and export sequences are recognized by importin and exportin for cellular processes other than nucleocytoplasmic trafficking (44, 45). CRM1 is involved in regulating DNA replication (45) and importin α/β transports protein targets with basic NLSs to the proximity of mitotic chromosomes (44, 46–48). Of relevance, HDAC6 associates with special microtubule structures such as the microtubule organization centers and the midbody (19, 20). The results presented here thus pave the way for further investigation to distinguish between these intriguing possibilities.

REFERENCES

1. Yang, X. J. (2004) *BioEssays* **26,** 1076–1087
2. Cress, W. D., and Seto, E. (2000) *J. Cell. Physiol.* **184,** 1–16
3. Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C., and Seigneurin-Berny, D. (2001) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11,** 162–166
4. Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2002) *Chem. Biol.* **9,** 3–16
5. Verdin, E., Dequiedt, F., and Kasler, H. G. (2003) *Trends Genet.* **19,** 286–293
6. Rundlett, S. E., Carmen, A. A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B. M., and Grunstein, M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93,** 14503–14508
7. McKinsey, T. A., Zhang, C. L., and Olson, E. N. (2002) *Trends Biochem. Sci.* **27,** 40–47
8. Verdel, A., and Khochbin, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 2440–2445
9. Grozinger, C. M., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 4868–4873
10. Amerik, A. Y., Li, S. J., and Hochstrasser, M. (2000) *Biol. Chem.* **381,** 981–992
11. Bertos, N. R., Wang, A. H., and Yang, X. J. (2001) *Biochem. Cell Biol.* **79,** 243–252
12. Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemercier, C., Garin, J., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21,** 8035–8044
13. Hook, S. S., Orian, A., Cowley, S. M., and Eisenman, R. N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 13425–13430
14. Kawaguchi, Y., Kovacs, J. J., McLaurin, A., Vance, J. M., Ito, A., and Yao, T. P. (2003) *Cell* **115,** 727–738
15. Kovacs, J. J., Hubbert, C., and Yao, T. P. (2004) *Novartis Found Symp.* **259,** 170–177
16. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., and Yao, T. P. (2002) *Nature* **417,** 455–458
17. Palazzo, A., Ackerman, B., and Gundersen, G. G. (2002) *Nature* **421,** 230
18. 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) *EMBO J.* **21,** 6820–6831
19. Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., and Matthias, P. (2003) *EMBO J.* **22,** 1168–1179
20. Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 4389–4394
21. North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., and Verdin, E. (2003) *Mol. Cell* **11,** 437–444
22. Serrador, J. M., Cabrero, J. R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A., and Sanchez-Madrid, F. (2004) *Immunity* **20,** 417–428
23. Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M. P., Rousseaux, S., Lemercier, C., Yoshida, M., and Khochbin, S. (2000) *Curr. Biol.* **10,** 747–749
24. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983) *Nucleic Acids Res.* **11,** 1475–1489
25. 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) *Mol. Cell. Biol.* **19,** 7816–7827
26. 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) *Mol. Cell. Biol.* **20,** 6904–6912
27. Champagne, N., Bertos, N. R., Pelletier, N., Wang, A. H., Vezmar, M., Yang, Y., Heng, H. H., and Yang, X. J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 28528–28536
28. Wang, A. H., and Yang, X. J. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21,** 5992–6005
29. Barlow, A. L., van Drunen, C. M., Johnson, C. A., Tweedie, S., Bird, A., and

Turner, B. M. (2001) *Exp. Cell Res.* **265,** 90–103
30. Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 9112–9117
31. LaMorte, V. J., Dyck, J. A., Ochs, R. L., and Evans, R. M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 4991–4996
32. Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16,** 4207–4214
33. Murphy, R., and Wente, S. R. (1996) *Nature* **383,** 357–360
34. Dingwall, C., and Laskey, R. A. (1991) *Trends Biochem. Sci.* **16,** 478–481
35. Nakielny, S., and Dreyfuss, G. (1999) *Cell* **99,** 677–690
36. Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984) *Cell* **39,** 499–509
37. Perkins, A., Cochrane, A. W., Ruben, S. M., and Rosen, C. A. (1989) *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* **2,** 256–263
38. Scott, M., Boisvert, F. M., Vieyra, D., Johnston, R. N., Bazett-Jones, D. P., and Riabowol, K. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29,** 2052–2058
39. Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 25748–25755
40. Amann, J. M., Nip, J., Strom, D. K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J. R., Meyers, S., and Hiebert, S. W. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21,** 6470–6483
41. Fernandes, I., Bastien, Y., Wai, T., Nygard, K., Lin, R., Cormier, O., Lee, H. S., Eng, F., Betos, N. R., Pelletier, N., Mader, S., Han, V. K. M., Yang, X.-J., and White, J. H. (2003) *Mol. Cell* **11,** 139–150
42. 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) *Mol. Cell. Biol.* **22,** 7982–7992
43. 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) *Mol. Cell* **11,** 1043–1054
44. Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A., and Zheng, Y. (2001) *Science* **291,** 653–656
45. Yamaguchi, R., and Newport, J. (2003) *Cell* **113,** 115–125
46. Dasso, M. (2001) *Cell* **104,** 321–324
47. Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R., and Weis, K. (2001) *Cell* **104,** 95–106
48. Schatz, C. A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, I. W., Gruss, O. J., and Carazo-Salas, R. E. (2003) *EMBO J.* **22,** 2060–2070

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Article 3 : Les deux domaines catalytiques d'HDAC6 sont requis dans l'activité déacétylase

L'article 3 a été publié dans le journal "the Journal of Biological Chemistry" (novembre 2005).

Résumé

En comparaison avec les autres HDACs de classe I et II, une des particularités remarquables de la protéine HDAC6 est l'existence d'un double domaine déacétylase fonctionnel.
Capables d'avoir une activité catalytique sur les groupements lysines acétylés de différentes protéines (α-tubuline, queue N-terminale de l'histones H4 et récemment HSP90 (Kovacs et al., 2005; Zhang et al., 2003)), les domaines enzymatiques d'HDAC6 semblent pouvoir agir sur un nombre important de substrats.

Malgré des travaux poussés des dernières années sur l'identification des fonctions cellulaires de cette déacétylase, peu de données ont été abordées à propos de la présence simultanée des deux domaines catalytiques et de l'influence qu'il peuvent avoir sur le choix des substrats.

Le travail présenté ici a permis de démontrer que la réaction de déacétylation d'HDAC6 a besoin de l'activité fonctionnelle simultanée des deux domaines déacétylases.
A la suite d'expériences *in vitro* et *in vivo*, l'utilisation de mutants ponctuels d'HDAC6 sur l'un ou l'autre, ou sur les deux domaines déacétylases ont abouti à une inhibition complète de la réaction de déacétylation des substrats.
La position des deux domaines déacétylases est également un élément majeur dans l'activité enzymatique d'HDAC6. L'emploi de mutants avec des domaines catalytiques plus ou moins éloignés permet d'évaluer l'influence et la spécificité pour certains substrats.
Finalement, grâce à l'utilisation de chimères élaborées à partir de domaines déacétylases différents (à partir des domaines d'HDAC6 et des domaines d'autres HDACs de classe II), une activité déacétylase sur l'histone H4 ou la tubuline, est de nouveau observée. Ceci renforce l'idée que l'arrangement spatial des deux domaines déacétylases est un élément clé dans la réaction de déacétylation d'HDAC6.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

JBC Papers in Press. Published on November 6, 2005 as Manuscript C500241200
The latest version is at http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.C500241200

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Two catalytic domains are required for protein deacetylation

Yu Zhang[1], Benoit Gilquin[2], Saadi Khochbin[2]& Patrick Matthias[1,3]
[1]Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Novartis Research Foundation, PO Box 2543, Maulbeerstrasse 66, 4058 Basel, Switzerland [2]INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine, Domaine de la Merci, 38706 La Tronche Cedex, France

Running title: Specific structure requirement of protein deacetylation

[3]Address correspondence to :Patrick Matthias, Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research, Novartis Research Foundation, PO Box 2543, Maulbeerstrasse 66, 4058 Basel, Switzerland Tel: 061-697 66 61, Fax. 061-697 39 76, email: patrick.matthias@fmi.ch

HDAC-6 was recently identified as a dual-, possibly multi-, substrate deacetylase that can act both on acetylated histone tails and on α-tubulin acetylated on Lys40. HDAC-6 is unique among deacetylases in having two hdac domains and we have used this enzyme as a useful model to dissect the structural requirements for the deacetylation reaction. In this report, we show that both hdac domains are required for the intact deacetylase activity of HDAC-6 *in vitro* and *in vivo*. The spatial arrangement of these two domains in HDAC-6 is essential and alteration of the linker region between the two domains severely affects the catalytic activity. Artificial chimeric HDACs, made by replacing the hdac domains in HDAC-6 with corresponding domains from other class II HDACs, show *de novo* deacetylase activity. Taken together, our results demonstrate for the first time that the spatial arrangement of hdac domains is critical for *in vivo* deacetylation reaction and may provide a useful model for the development of novel HDAC inhibitors.

Protein acetylation, especially histone acetylation, is one of the most important posttranslational modifications. It is involved in the regulation of protein structure and functions, therefore has potentially important roles in most of cellular processes. In particular, the impact of histone N-terminal acetylation on chromatin organization and gene expression has been well documented. Acetylation and deacetylation of histone tails or of other proteins are catalyzed by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), respectively. In mammals, there are more than 18 HDACs that can be grouped into Class I, Class II and Class III HDACs (1, 2). In cells most, if not all, HDACs are part of large molecular weight complexes that typically contain several HDAC polypeptides and are recruited to DNA via their interactions with sequence-specific or non-specific DNA binding proteins. Among the HDACs, HDAC-6 was recently identified as a dual-, and possibly multi-, substrate deacetylase that can deacetylate both histone tails and also α -tubulin Lys40 *in vitro* and *in vivo* (3, 4, 5). Interestingly, HDAC-6 is not known to be part of an obligatory higher molecular weight complex and has a unique structure with two intact hdac catalytic domains. HDAC-6 thus mimics in one molecule the presence of more than one hdac domain, as it is observed in other HDAC-containing protein complexes. Therefore, investigation of the deacetylation reaction catalyzed by HDAC-6 and functional dissection of its two hdac domains on different substrates may provide important information to understand general principles of protein deacetylation and also provide a useful model for the design of novel clinical HDAC inhibitors.

In this report, using various *in vitro* and *in vivo* assays we demonstrate that both hdac domains of HDAC-6 are essential for activity of this enzyme. Proper spatial organization of the two hdac domains in HDAC-6 is critical for the selective activities on different substrates. More

Copyright 2005 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

importantly, artificial combination of hdac domains that individually are inactive lead to *de novo* activity, suggesting that the presence of more than one hdac domain is a general requirement for the deacetylation reaction.

Materials and Methods

Plasmids and mutagenesis - Mutations and deletions were generated by Quickchange kit (Strategene). For EGFP insertions, part of the EGPF was PCR-amplified from pEGFP (Clontech) and subsequently cloned into the Xba I site in the linker region of HDAC-6 cDNA. To clone the chimeric HDAC, the hdac domains from either HDAC-4 or -5 were PCR-amplified and used to replace the first or second hdac domain in HDAC-6.

3T3 cells and rescue by HDAC-6 wild type and mutants - Mouse embryo fibroblasts were isolated from E13.5 mouse embryos and subsequently 3T3 cell lines were established following a standard protocol. 3T3 cells were infected with pMSCV-EGFP plasmids containing wild type or mutant mouse HDAC-6 cDNAs. Individual clones were expanded and checked for HDAC-6 expression by western blot.

Co-immunoprecipitation and HDAC/TDAC assays - 500 µg of extracts from HEK 293T cells transfected by Fugene (Roche) were incubated overnight with the primary antibody at 4°C. Mouse IgG was used as control. Then, protein A–Sepharose slurry was added and incubated for 1 hour at 4°C. Beads were washed three times and subsequently used for activity assay. The peptides corresponding to either amino acid 33-46 of human α-tubulin or histone H4 N-terminus were chemical acetylated by H^3-acetic acid (PerkinElmer). HDAC/TDAC assays were performed as described (5).

Purification of recombinant mouse HDAC6s - A His_6 tag was added to the C-terminal end of wild type or mutant mouse HDAC-6 cDNA in pDEST8 vector by PCR. Bacmids for insect cell transformation were generated using the Bac-To-Bac Baculovirus Expression System (Life Technologies). For protein overexpression, insect Sf9 cells were infected and collected 3 days later. The recombinant enzymes were purified with a Ni-NTA Superflow (Qiagen) and HiTrap Q FF columns (Amersham).

Immunofluoresence and immunoblotting - Cells were fixed and stained with anti-HA polyclonal antibody (Santa Cruz), and TU6-11 for acetylated tubulin (Sigma). The DNA was counterstained by DAPI. Protein lysates were resolved by electrophoresis on 8% SDS-PAGE gels and subsequently transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Antibodies used are: TU6-11, DM1A, FlagM2 (Sigma), anti-HA (Santa Cruz), Glu-tubulin, Tyr-tubulin (Synaptic Systems), and mHDAC-6 (6).

RESULTS

Two hdac domains are required for deacetylation by HDAC-6

To investigate whether the two hdac domains in HDAC-6 might have different roles in the deacetylation reaction, we prepared several mutant constructs, with mutations in the catalytic cores or in the presumed substrate recognition regions (so-called ER motif, 7) (Fig.1 A). Mutations were made either only in one or in both hdac domains. The different proteins were prepared from transiently transfected 293T cells by immunoprecipitation with an anti-HA antibody and were used for *in vitro* activity assays with chemically acetylated histone H4 or α-tubulin peptides (5). The expression levels of each mutant in transiently transfected cells were similar as demonstrated by western blot analysis (Fig.1 B upper panel). As shown in Fig.1 B lower panel, point mutations in the catalytic core of both hdac domains (HD1/2m) completely abolished the histone deacetylase (HDAC) and the tubulin deacetylase (TDAC) activities of HDAC-6. Surprisingly, mutating either of the hdac catalytic cores (HD1m or HD2m) also destroyed the whole activity on both substrates. This suggests that the cooperation between the two hdac catalytic cores is critical for the deacetylation reaction mediated by HDAC-6. Interestingly, the mutations in the presumed substrate recognition region (7) led to somewhat different effects on enzymatic activities. The mutation in the second substrate recognition site (L798A) completely inactivated the catalytic activity on both peptides, whereas the mutation of the corresponding region in the first hdac domain (L402A) retained partial activity. Interestingly, the latter mutation had a stronger

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

effect on TDAC activity than on HDAC activity. This result suggests that in the deacetylation reaction the two different peptide substrates might interact differently with the N-terminal catalytic domain of HDAC-6.

To rule out the possible interference of co-immunoprecipated proteins with HDAC-6, we set up the purification of recombinant wild type or mutant HDAC-6 from a baculovirus expression system. After Ni-NTA and QFF columns, His_6-tagged HDAC-6 proteins could be purified as single protein and equal amount of wild type and mutant proteins were used for activity assays (Fig. 1C left panel). As shown in Fig.1 C right panel, the HDAC and TDAC activity of HDAC-6 is intrinsic and requires both intact catalytic cores.

To confirm these *in vitro* results, tubulin deacetylation was also tested *in vivo*. For this, HDAC-6 wild type and mutants constructs were transfected into NIH3T3 cells and the cells were subsequently immunostained for acetylated tubulin and expression of the HA epitope, which marks transfected cells. As shown in Fig.2 A, the results of these experiments agree well with the above *in vitro* assays: endogenous tubulin acetylation was dramatically reduced by overexpression of wild type HDAC-6, but not by the different HDAC-6 catalytic-core mutants.

To rule out any possible effect from endogenous HDAC-6 on these assays, we also made use of HDAC-6 deficient 3T3 cell lines (Zhang Y., unpublished data). In the complete absence of HDAC-6, 3T3 cells showed dramatically increased tubulin acetylation (lane 4 vs. lane 1 in Fig.2 B upper panel), in agreement with the notion that tubulin is the physiological substrate of HDAC-6. Stable re-introduction of HDAC-6 into the knockout cells at an expression level comparable to the wild type efficiently reduced tubulin acetylation (Fig.2 B, lane 6). Clones expressing lower levels of HDAC-6 also showed a decrease in tubulin acetylation, albeit less pronounced (lane 5 in Fig.2 B). Interestingly, whereas the tubulin acetylation increased dramatically in the absence of HDAC-6, other tubulin modifications, such as tyrosinated (Tyr) or detyrosinated (Glu) tubulin did not change. Next, we measured the capacity of HDAC-6 mutants to deacetylate tubulin *in vivo* by stably re-introducing them into HDAC-6 deficient cells. Specifically, we tested HDAC-6 constructs with mutations in the first or in the second hdac catalytic core. Because it was difficult to obtain high expression of these mutants, we used as a control for these experiments a cell clone expressing wild type HDAC-6 at an intermediate level which was similar to that of the mutant proteins (lanes 2, 3 and 4, Fig.2 B lower panel). Examination of the degree of tubulin acetylation in the different cell lines (lane 2 to 4) revealed that in the two cell lines expressing mutant HDAC-6 tubulin acetylation was not reduced compared to control-transfected cells expressing GFP (lane 1). This result indicates that these two HDAC-6 mutants are inactive when tested in cells lacking endogenous HDAC-6. Taken together, these results show that two intact hdac domains are required for the deacetylation by HDAC-6. The two domains might each have different roles in the substrate recognition and contribute individually to substrate specificity.

The spatial arrangement of the hdac domains in HDAC-6 is important for the selective activities on different substrates

To examine whether the spatial arrangement of the two catalytic domains is important for the activity of HDAC-6, we prepared a series of constructs in which the distance between the two domains was modulated by insertions or deletions. Fragments derived from the EGFP protein, ranging from 5 amino acids to full length of EGFP (239 amino acids), were inserted between the two hdac domains (Fig.3 A). To shorten the distance between the two hdac domains, the linker region was deleted by 5, 25, or 68 amino acids, respectively. As shown in Fig.3 B, all constructs were equally expressed in transiently transfected 293T cells and subsequently used for immunoprecipitation and activity assays. Surprisingly, even slight modulation of the linker length, by addition or removal of only 5 amino acids, dramatically affected the catalytic activity (Fig.3 C). Generally, both HDAC and TDAC activities decreased along with increasing length of the insertions (Fig.3 C). The most dramatic loss of activity was observed when the entire linker region was deleted (Δ411-478). Interestingly, the impairment of the activity clearly showed substrate preference and TDAC activity was found to be more sensitive to spatial changes than HDAC activity. This has also been observed in the mutation analysis of the hdac domains presented in Fig.1 B. Our data therefore suggest that the two active catalytic domains of HDAC-6 might use a selective conformation to recognize and act on different substrates.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Generation of active artificial chimeric HDACs from inactive HDAC fragments

Finally, we tested whether artificial HDACs, made from combinations of different class II HDACs, might be selectively active. To create chimeric HDACs, we replaced the first or the second hdac domain of HDAC-6 by the hdac domains from either HDAC-4 or HDAC-5 (Fig.4 A). Since the distance between two hdac domains is important for activity (Fig.3), in the chimeric HDACs we used the linker region from HDAC-6 to keep the distance between two catalytic cores as it is in the wild type HDAC-6 protein. After transfection into 293T cells, the extracts were subsequently used for immunoprecipitation and activity assays. The specific activities were normalized to the protein expression levels determined by western blot. As shown in Fig.4 B, replacement of the second hdac domain of HDAC-6 by domains from either HDAC-4 or HDAC-5 resulted in a chimeric protein with almost no activity on either tubulin or histone substrates. On their own, full-length HDAC-4 and -5 show no deacetylase activity (12, 5, and results not shown). On the other hand, chimeric proteins with the first hdac domain derived from either HDAC-4 or HDAC-5 and the second domain from HDAC-6, showed activity on both histone and tubulin substrates. Here again activity was greater on the histone peptide than on the tubulin substrate, which might be due to selective recognition and/or enzymatic activity of HDAC-4 or -5 on the histone but not on the tubulin peptide. These experiments showed that artificial combination of the hdac domains from HDAC-4 or -5 and the second HDAC-6 domain, either of which are inactive by themselves, led to *de novo* activity.

DISCUSSION

HDAC-6 has a unique structure in that it contains two intact hdac catalytic domains which might mimic native HDAC-containing complexes. Since the two hdac domains in HDAC-6 are well conserved, the first question was whether they are both important and/or functionally different. Here we demonstrate that mutating a single hdac core is sufficient to inactivate HDAC-6 on both histone and tubulin substrates, both *in vitro* or *in vivo*. In addition, changing the spatial arrangement between these two domains by insertions or deletions has a significant impact on the activity. This confirms that both hdac domains are necessary for the activity and also suggests that their precise arrangement relative to another is important. We have shown previously that each hdac domain in HDAC-6 is sufficient to bind on its own β-tubulin and this interaction is maintained even when the catalytic core is mutated (5). Within the hdac domain, in addition to the conserved catalytic core, a region of homology between HATs (such as Esa1) and HDACs (such as Rpd3) has been identified. This motif, termed ER (Esa1-Rpd3) motif (7) is located near the active center in the tertiary structure of Esa1. Recent structure analysis of the tGCN5/CoA/H3 complex (9) showed that this motif might be involved in the interaction and recognition with histone tails. In Rpd3, for which the tertiary structure remains unclear, it was demonstrated by circular dichroism analysis that the ER motif contains a similar secondary structure as found in Esa1. Mutation analysis revealed that the ER motif regions of Esa1 or Rpd3 are required for HAT activity of Esa1 and HDAC activity of Rpd3, respectively (7). By mutating these putative substrate recognition motifs in HDAC-6, we find that the second ER motif might be more important for interaction with the substrate(s). This is the first evidence to show a functional difference between the two hdac domains in HDAC-6. The results obtained with chimeric HDACs further support this hypothesis. Replacement of first hdac domain in HDAC-6 by that from HDAC-4 or HDAC-5 gives enzymes with partial activity, whereas replacement of the second hdac domain leads to no activity. Notably, HDAC-4 or -5 display no activity on their own (12, 5). Our findings therefore suggest that the hdac domain of these two enzymes can contribute to activity when combined to the second hdac domain of HDAC-6. Moreover, we observed that the mutation in the first ER motif had different effects on deacetylation of the tubulin or histone peptide: TDAC activity is more sensitive to this mutation than HDAC activity. This suggests that the two hdac domains selectively interact with and recognize different substrates. Moreover, modulation of the distance between the two hdac domains in HDAC-6 also has a stronger effect on tubulin peptide deacetylation than on histone peptide deacetylation. We think that this might be also partially due to selective substrate recognition. While the tubulin substrate only has

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

one acetylated lysine (Lys 40), histone tails usually have several acetylated lysine residues. *In vitro* experiments have demonstrated that class I and II HDACs could deacetylate all acetylated lysines on core histone substrates, albeit with slightly different efficiencies (2). This suggests that there might be a dynamic sliding between HDACs and histone tails in order to allow deacetylation of all residues. Because of this the recognition of the histone substrates might be inherently more flexible than that of tubulin. In the deletion and insertion constructs of HDAC-6, the fact that the effect was stronger on histone than on tubulin substrates also suggests that tubulin deacetylation needs a more tightly controlled conformation of HDAC-6. Further experiments are currently ongoing to resolve the tertiary structure of HDAC-6 with different substrates.

It is generally assumed that most of the *in vivo* deacetylase activity for histones, and possibly other proteins, is found in HDAC-containing multi-protein complexes. Interestingly, in all known HDAC-containing complexes, there are normally two HDACs (10). For example, HDAC-1 is commonly found to work together with HDAC-2. Moreover, HDAC-1 itself can homo-oligomerise through its N-terminal domain; the same domain is necessary for interaction *in vitro* with HDAC-2 or -3 and also for catalytic activity (11). This raises the question whether the *in vivo* deacetylation reactions also need two HDAC molecules together. Previous results demonstrated that class II HDACs regulate transcription by bridging the enzymatically active SMRT/N-CoR-HDAC-3 complex and select transcription factors, independently of any intrinsic class II HDAC activity (12). For example, the catalytic domain of HDAC-4 interacts with HDAC-3 via the transcriptional corepressor N-CoR/SMRT. All experimental conditions leading to the suppression of HDAC-4 binding to SMRT/N-CoR and to HDAC-3 resulted in the loss of enzymatic activity associated with HDAC-4. *In vitro* reconstitution experiments indicate that HDAC-4 and other class II HDACs are inactive in the context of the SMRT/N-CoR-HDAC-3 complex and do not contribute to its enzymatic activity. *In vivo* analysis of HDAC-1 function in *Drosophila* found that flies have different phenotypes when they are either completely deficient for HDAC-1 or only have a single point mutation, which may toxify HDAC-containing complexes (13). It was suggested that in the absence of HDAC-1, other HDACs might be able to compensate for it; therefore complexes that normally would contain HDAC-1 could remain at least partially functional. By contrast, a HDAC-1 point mutant, which is still able to form complexes but is deficient in the catalytic activity, would result in a stronger phenotype than a null mutant. This evidence also indirectly suggested that the mutation in one of the hdac domains in the HDAC-containing complexes could inactivate the whole complex. So far, HDAC-6 is the only HDAC that has been shown to have catalytic activity independently from other HDACs or dimerization. Our results showed that the catalytic activity of HDAC-6 is dependent on both intact hdac domains. Moreover, artificially tethering parts of HDAC-6 and HDAC-4 or -5 was found to result in *de novo* catalytic activity; this mimics the result from N-CoR/SMRT complex, where HDAC-4 is made active by being tethered to HDAC-3. Based on these observations, we propose a possible general model for the deacetylation reaction, in which two hdac domains are required. As in the case for HDAC-6, HDAC-containing complexes might have a specific spatial arrangement of hdac domains, originating from two different HDAC molecules. These two hdac domains cooperate to confer the catalytic activity of the whole complex. The components of the different complexes determine the spatial arrangement of the two core hdac domains and therefore the specific activity of the complexes on different potential substrates. Solving the crystal structure of native whole HDAC-containing complexes should help to verify this hypothesis.

REFERENCES

1. Thiagalingam, S., Cheng, K. H., Lee, H. J., Mineva, N., Thiagalingam, A., Ponte, J. F. (2003) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **983**,84-100

2. De Ruijter, A. J., van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., van Kuilenburg, A. B. (2003) *Biochem. J.* **370**,737-749.

3. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X. F., Yao, T. P. (2002) *Nature* **417**,455-458
4. 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) *EMBO J.* **21**,6820-31.
5. Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., Khochbin, S., Matthias, P. (2003) *EMBO J.* **22**,1168-1179.
6. Verdel, A., Curtet, S., Brocard, M. P., Rousseaux, S., Lemercier, C., Yoshida, M., Khochbin, S. (2000) *Curr. Biol.* **10**:747-749
7. Adachi, N., Kimura, A., Horikoshi, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**,35688-35695.
8. Yang, X. J. (2004) *BioEssays* **26**:1076-1087
9. Clements, A., Poux, A. N., Lo, W. S., Pillus, L., Berger, S. L., Marmorstein, R. (2003) *Mol. Cell* **12**,461-473.
10. Grozinger, C. M. and Schreiber, S. L. (2002) *Chem. Biol.* **9**,3-16
11. Taplick, J., Kurtev, V., Kroboth, K., Posch, M., Lechner, T., Seiser, C. (2001) *J. Mol. Biol.* **308**,27-38
12. Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., Verdin, E. (2002) *Mol. Cell* **9**,45-57.
13. Mottus, R., Sobel, R. E., Grigliatti, T. A. (2000) *Genetics* **154**,657-68.
14. Marks, P. A., Richon, V. M., Kelly, W. K., Chiao, J. H., Miller, T. (2004) *Novartis Found. Symp.* **259**,269-81

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

FOOTNOTES

We are grateful to Na Li , Sandrine Benitski and Adam Mizeracki for technical assistance and for Dr. Jan Hofsteenge for critical comments on the manuscript. This work was supported by the Novartis Research Foundation. The team of SK was supported by Région Rhône-Alpes: thématiques prioritaires "Cancer" programmes.

FIGURE LEGENDS

Fig.1. Two intact HDAC domains are required for deacetylation by HDAC-6 *in vitro*. *A.* Schematic representation of the HDAC-6 protein and the mutations made. The conserved hdac domains are shown as gray boxes with the catalytic cores highlighted in red. The ER motif is shown in yellow. The HDAC-6 mutants have the following structure. HD1m: Asp250 and 252 are replaced by Asn, and His254 and 255 are replaced by Val. HD2m: Asp648 is replaced by Asn, and His650 and 651 are replaced by Val. The mutants in the ER motif have either Leu402 replaced by Ala (L402A), or Leu798 replaced by Ala (L798A). *B. In vitro* HDAC or TDAC activity assays with wild type and mutant HDAC-6s. 293T cells were transfected with appropriate expression vectors and cell extracts were immunoprecipitated with an anti-HA antibody. Upper panel: equal protein input was confirmed by western blotting with HA-antibody. Lower panel: for the assays, acetylated tubulin peptide or histone H4 tail peptide were used as substrates. The results presented are averaged from three independent experiments. *C.* recombinant HDAC-6 needs two intact hdac domains to be active. Left panel: purified wild type and mutant HDAC-6 proteins (5 µl) were analyzed by SDS-PAGE. Right panels: acetylated tubulin peptide or histone H4 tail peptide were used as substrates for deacetylation assays performed with equal amounts of purified proteins. The results presented are averaged from three independent experiments.

Fig.2. Two intact HDAC domains are required for deacetylation by HDAC-6 *in vivo*. *A*. *In vivo* tubulin deacetylation assays with wild type and mutants HDAC-6. Expression vectors encoding wild

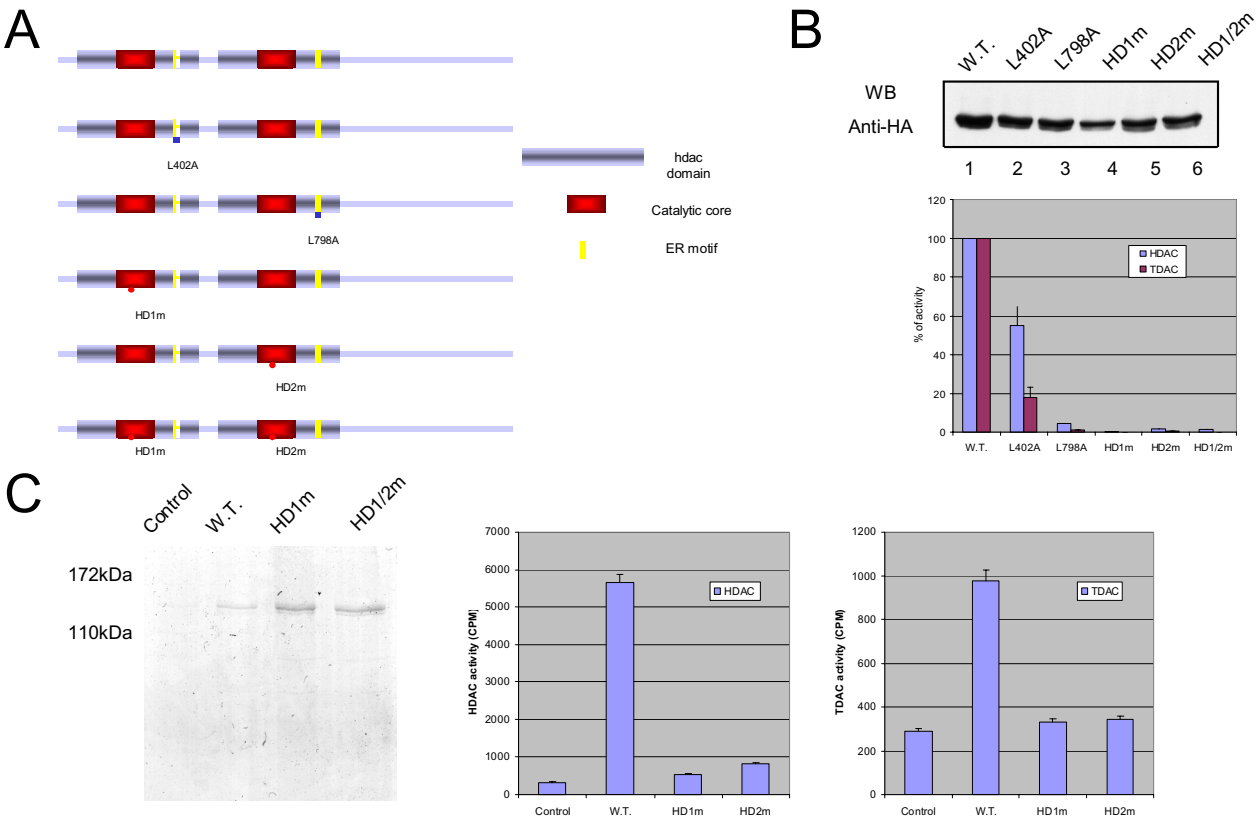
type or mutant HDAC-6 proteins were transiently transfected into NIH3T3 cells, as indicated. Immunofluorescence stainings for HA and acetyl-tubulin were performed after two days. *B*. *In vivo* tubulin deacetylation in 3T3 cells. Upper panel: Retroviruses encoding wild type HDAC-6 were used to infect control (lanes 2 and 3) or HDAC-6 deficient 3T3 cells (lanes 5 and 6). For the wild type 3T3s the parental clone is presented (609, lane 1) as well as two derivatives overexpressing HDAC-6 at intermediate (9F5, lane2) or high level (9F8, lane 3). For the HDAC-6 deficient 3T3s, the parental clone is presented (615, lane 4) as well as two derivatives expressing HDAC-6 at either low (lane 5) or high level (lane 6). Western blot analysis is shown for expression of HDAC-6, alpha-tubulin, as well as for the level of acetylated, detyrosinated (Glu antibody) or tyrosinated (Tyr antibody) tubulin. Genotyping of the different cells is shown. Lower panel: Retroviruses encoding WT or mutant HDAC-6 (HD1m or HD2m, as in Fig. 1A) were used to infect HDAC-6 deficient 3T3s (615, lanes 1 to 4). In lane 1 an empty expression vector expressing only GFP was used as a control. In lane 2 a clone expressing WT HDAC-6 at intermediate level, similar to the expression level of the mutants (lanes 3 and 4), is presented. Western blot analysis is shown for expression of alpha tubulin and for the level of tubulin acetylation.

Fig.3. The spatial arrangement of two hdac domains in HDAC-6 is important for the selective activities on different substrates. *A*. Schematic representation of insertion and deletion mutants of HDAC-6. Fragments from EGFP, varying from 5 amino acids to full-length (shown by green), were inserted between the two hdac domains in wild type HDAC-6. In the deletion mutants, various lengths were deleted from the linker region (depicted by the dotted boxes). *B.* 293T cells were transfected with appropriate expression vectors and cell extracts were immunoprecipitated with an anti-HA antibody. Western blotting with HA-antibody was used to check the protein input used for the activity assays, as in Fig. 1B. *C.* Extracts from B were used HDAC or TDAC activity assays. The results presented are the average from three independent experiments.

Fig. 4. Generation of active artificial chimeric HDACs from inactive HDAC fragments. *A*. Schematic representation of HDAC-4, -5, -6 and chimeric HDACs thereof. The hdac domains from either wild type HDAC-4 or HDAC-5 were PCR amplified and used to replace the first and/or second hdac domains in wild type HDAC-6. *B.* Chimeric HDACs and HDAC-6 were immunoprecipitated from transfected 293T cells and used for HDAC or TDAC assays. The results averaged from three independent experiments are presented.

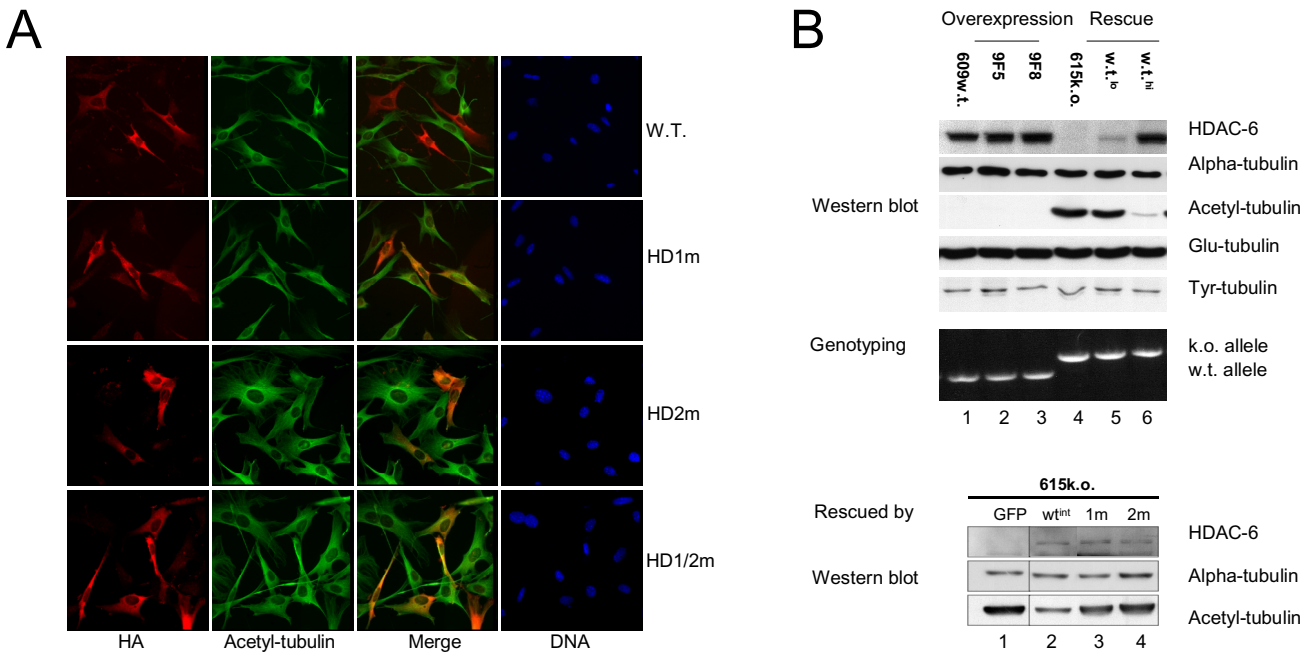
tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Fig.1



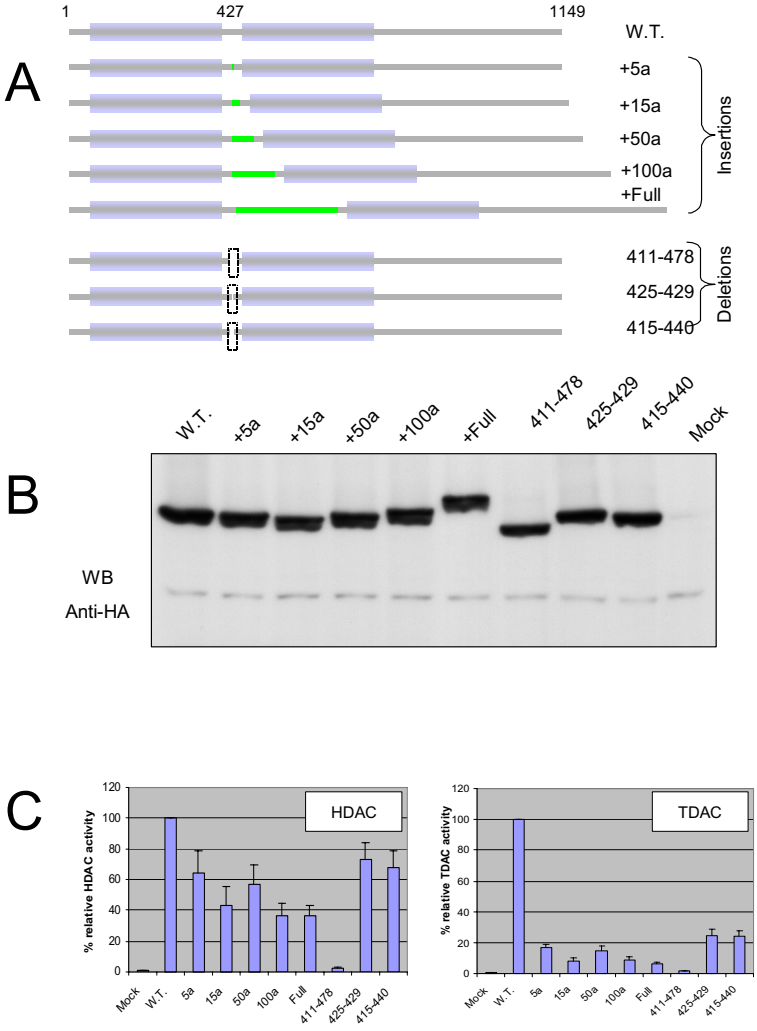
tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Fig.2



tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

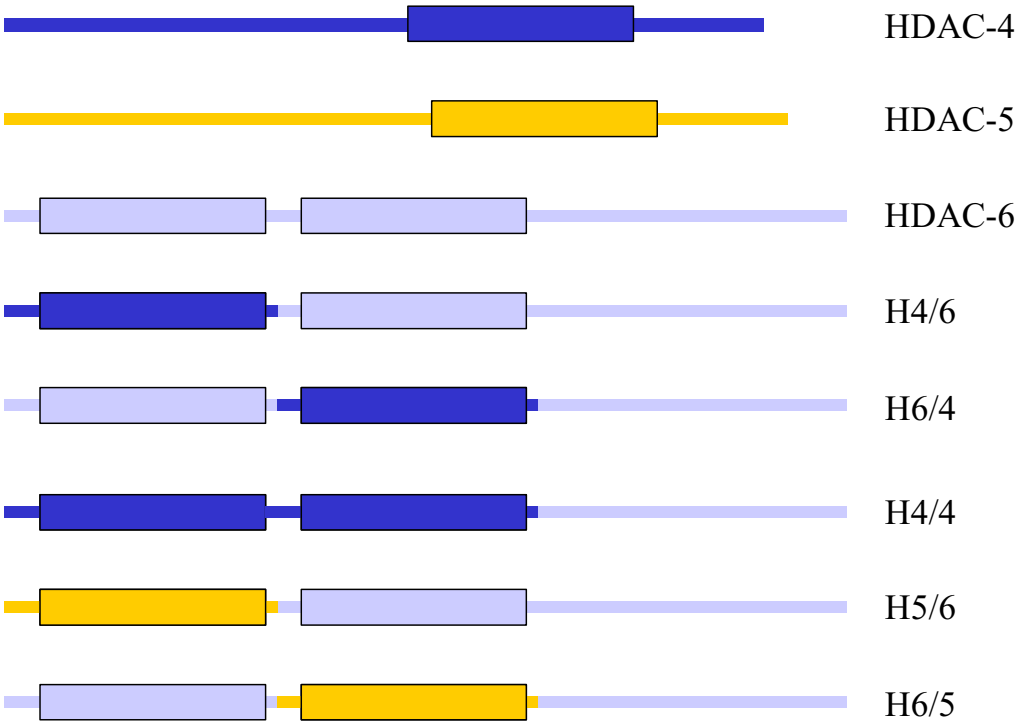
Fig.3



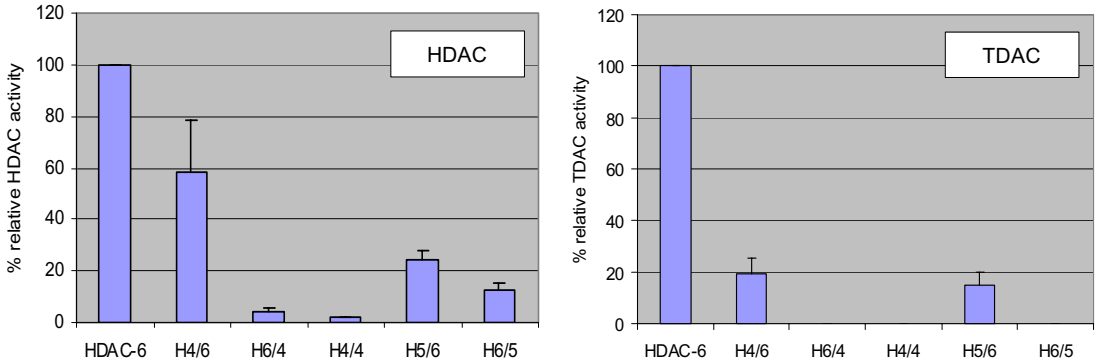
tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Fig.4

A



B



tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Article 4 : HDAC6 et la différenciation ostéoclastique

L'article 4 a été publié dans the Journal of Cell Science en avril 2005.

Résumé

Le podosome est une structure d'adhésion particulière riche en F-actine et intervenant dans la fixation du substrat ou dans la migration des ostéoclastes.
Durant la différenciation ostéoclastique, un processus de maturation des podosomes va progressivement se mettre en place. D'une localisation ubiquitaire dans l'ostéoclaste en début de maturation, les podosomes vont se regrouper dans une structure transitoire dite en "anneaux de podosomes" pour progressivement s'organiser en une "ceinture de podosomes" périphérique. Cette ceinture est le signe d'un ostéoclaste mature capable de dégrader la matrice osseuse.

Dans l'article présenté ici, les microtubules sont acétylés durant la différenciation ostéoclastique et la perturbation de cette acétylation (ou de la voie Rho) affecte l'architecture caractéristique des ostéoclastes matures. De plus, cette acétylation est corrélée avec une résistance des microtubules à une déstabilisation par le nocodazole.

Les résultats de cette étude révèlent les bases de la relation entre podosomes et microtubules et comment RhoA joue un rôle positif dans la maturation des podosomes.
Ces données suggèrent que durant la différenciation ostéoclastique, la voie Rho/mDia2 est inhibée. L'activité catalytique de la protéine HDAC6 sur les microtubules est alors réduite, résultant d'une augmentation de l'acétylation et d'une stabilisation de ces microfilaments. Cette stabilisation, requise pour la formation de la ceinture de podosomes, est dépendante de l'interaction entre HDAC6 et mDia 2.

L'article aborde la voie biochimique et le mécanisme régulant l'organisation des podosomes : de la transition d'une adhésion nécessaire pour la migration cellulaire à la formation d'une ceinture requise pour la fixation à la matrice osseuse. Cette fixation est importante pour sa résorption et son remodelage.

A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts

Olivier Destaing[1,*,‡], Frédéric Saltel[1,*,§], Benoit Gilquin[2], Anne Chabadel[1], Saadi Khochbin[2], Stéphane Ory[3,*] and Pierre Jurdic[1,*,¶]

[1]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 5665 CNRS/ENS, INRA 913, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon CEDEX 7, France
[2]Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Différenciation, INSERM U309, Institut Albert Bonniot, Faculté de Médecine, 38706 La Tronche Cedex, France
[3]CRBM, CNRS FRE2593, 1919 route de Mende, 34293 Montpellier CEDEX 5, France

*These authors contributed equally to this work
‡Present address: Boyer Center for Molecular Medicine, Yale School of Medicine, 295 Congress Avenue, 06510 New Haven CT, USA
§Present address: CMU-Dpt physiologie cellulaire et métabolisme, 1 rue Michel Servet, 1211 Geneve 4, Switzerland
¶Author for correspondence (e-mail: pjurdic@ens-lyon.fr)

Accepted 6 April 2005
Journal of Cell Science 118, 2901-2911 Published by The Company of Biologists 2005
doi:10.1242/jcs.02425

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

Summary

Osteoclast maturation is accompanied by changes in podosome patterning, resulting in the formation of a peripheral belt, which requires an intact microtubule network. Here, we report that by inhibiting Rho, the podosome belt is maintained at the cell periphery despite depolymerisation of microtubules by nocodazole. Rho inhibition was correlated to the increase in microtubule stabilisation and microtubule acetylation. By microinjecting activated Rho or its activated effector mDia2 in osteoclasts, we found that the podosome belt was disrupted and the level of microtubule acetylation dramatically decreased. We further characterised the molecular mechanism responsible for microtubule deacetylation by co-immunoprecipitation experiments. We found that not only was mDia2 coprecipitating with the recently identified microtubule deacetylase HDAC6 but that it also activated the microtubule deacetylase activity of HDAC6 in an in vitro deacetylase assay. Finally, we found that during osteoclastogenesis, there is a correlation between the increase in microtubule acetylation and the podosome belt stabilisation and that if Rho is inhibited in the early stages of osteoclast differentiation, it accelerates both microtubule acetylation and podosome belt stabilisation. Altogether, our data reveal a pathway in which Rho interferes with the osteoclast maturation process by controlling the level of microtubule acetylation and actin organisation through mDIA2 and HDAC6.

Key words: HDAC6, Rho GTPase, mDIA, Microtubule acetylation, Podosomes, Osteoclasts

Introduction

By degrading mineralised matrix, multinucleated osteoclasts are crucial for the regulation of bone and calcium homeostasis. In the presence of M-CSF and RANK-L, monocyte-macrophage precursors fuse together to form large multinucleated cells in vitro (Boyle et al., 2003). Unlike most non-transformed cells, cells from monocytic lineage, including dendritic cells, macrophages and osteoclasts rely on podosomes to migrate or adhere to a substrate rather than on F-actin stress fibres or focal adhesion plaques. Podosomes are adhesion structures containing a column of a continuous flux of F-actin surrounded by focal adhesion proteins. In many respects, podosomes are similar to focal adhesion plaques as they are short-lived structures involved in cell migration, and share major focal adhesion proteins such as integrin, vinculin and talin as well as the signalling protein FAK/Pyk2 (for a review see Linder and Aepfelbacher, 2003). An important feature of podosomes is that they are associated with extracellular matrix degradation; they are thought to actively contribute to tissue invasion and matrix remodelling. For example, podosome clusters are found in highly motile and immature dendritic cells but not in static and mature cells found in tissues (Burns et al., 2001). These observations underscore the requirement of podosomes for cell migration. In vitro, osteoclast podosomes acquire a higher degree of self-organisation through the process of maturation. Immature osteoclasts exhibit clustered podosomes that are subsequently arranged into dynamic short-lived rings. Then, these podosome rings expand to the cell periphery to form a stable podosome belt in mature osteoclasts (Destaing et al., 2003). This podosome belt is reminiscent of the sealing zone found in resorbing osteoclasts, which provides tight attachment to bone and seals off the resorption pit where proteases and protons are secreted to degrade the bone matrix (Vaananen et al., 2000). The molecular mechanisms driving the transition from podosome clusters or dynamic rings to the podosome belt are presently unknown. However, recent evidence indicates that, as in focal adhesions and the formation of F-actin structures, microtubules and Rho GTPases are critical for podosome

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

patterning and assembly (for reviews, see Etienne-Manneville and Hall, 2002; Linder and Aepfelbacher, 2003). Similar to focal adhesions, microtubule plus ends may target podosomes (Kaverina et al., 1999; Evans et al., 2003) and microtubule network integrity has been shown to be crucial for podosome patterning (Destaing et al., 2003). Forced depolymerisation of microtubules by nocodazole treatment leads to the destabilisation of isolated podosomes in macrophages or in macrophage polykaryons (Linder et al., 2000; Ory et al., 2002) and, in osteoclasts, the podosome belt is disrupted. However, in the absence of polymerised microtubules and in contrast to macrophages, isolated podosomes are still formed in osteoclasts, indicating that in these cells, depolymerisation disrupts podosome patterning rather than the formation of podosomes themselves (Destaing et al., 2003).

Rho GTPases are known to promote F-actin and adhesion structure rearrangements and appear to be the probable signalling intermediates between microtubules and F-actin (Etienne-Manneville and Hall, 2003). Microtubule depolymerisation in fibroblasts promotes stress fibre formation and focal adhesion plaque assembly, which relies on RhoA activation (Enomoto, 1996; Ren et al., 1999). Although the function of Rho GTPases in podosome assembly or patterning is rather unclear, Rho GTPase activity needs to be tightly regulated to maintain podosome assembly (Linder and Aepfelbacher, 2003) and as in fibroblasts, microtubule dynamics regulates Rho GTPase activity (Ory et al., 2002). We recently showed that microtubule repolymerisation recapitulates the sequence of events that lead to podosome belt formation during osteoclast maturation. This process starts with podosome clustering at the early stage of microtubule repolymerisation and proceeds to the formation of podosome rings that eventually fuse together to generate the podosome belt at the cell periphery when microtubules are fully regrown (Destaing et al., 2003). It should be noted that the kinetics of microtubule repolymerisation are faster than the reformation of the podosome belt, indicating that not only the dynamics of microtubules are crucial for early events in podosome patterning (clusters or rings) but also that the microtubule network needs to be in place or stabilised before the podosome belt can be formed. In cells, there are two pools of dynamic microtubules, those that exhibit dynamic instability and have half-lives of 5-10 minutes, and stabilised microtubules, which do not exhibit dynamic instability and persist for hours (Saxton et al., 1984; Schulze and Kirschner, 1986; Webster et al., 1987a; Webster et al., 1987b). Stable microtubules accumulate post-translational modifications including detyrosination or acetylation, and may contribute to specialised functions in cells (Bulinski and Gundersen, 1991; Palazzo et al., 2001b; Rosenbaum, 2000).

Starting with these observations, we decided to investigate the molecular mechanisms that drive microtubule-dependent podosome belt stabilisation in osteoclasts and the extent to which Rho GTPase is involved in this process. Here, we report that Rho inhibition prevents podosome belt disruption following microtubule depolymerisation by nocodazole and, more surprisingly, that Rho inhibition increases the resistance of microtubules to nocodazole. Checking for microtubule post-translational modifications, we found that stable microtubules were acetylated and not detyrosinated. This led us to investigate whether Rho was involved in microtubule acetylation in osteoclasts. We used the fact that the histone acetylase HDAC6 has recently been described as a microtubule deacetylase (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002) and that the Rho effectors of the mDia family are involved in the control of post-translational modification of microtubules (Palazzo et al., 2001b) as well as the coordination of the microtubule and actin networks (Watanabe et al., 1999). This allowed us to reveal a pathway where activation of Rho promotes the deacetylation of microtubules through mDia2 and HDAC6 activation. Moreover, we present evidence that the level of microtubule acetylation is important for osteoclast function.

Materials and Methods

Reagents

Nocodazole, trichostatin A (TSA) and n-butyrate (Sigma-Aldrich) were used at 2 μM, 3 μM and 5 μM. Human M-CSF and recombinant human RANK-L were produced as previously described (Destaing et al., 2003). Supernatants were used at a final dilution of 1% corresponding to about 20 ng/ml and 30 ng/ml recombinant M-CSF and RANK-L, respectively. Monoclonal antibody AC40 anti-actin, anti-β-tubulin (clone DM1A) and anti-acetylated tubulin monoclonal antibody 6-11B-1 were from Sigma; anti-β-tubulin (clone N357) from Amersham Life Science, anti-HA (clone Y11) from Santa Cruz Biotechnology and anti-GFP monoclonal antibody was from Roche and Clontech. Anti-detyrosinated tubulin was a kind gift from Didier Job (CEA, Grenoble, France) and anti-HDAC6 polyclonal was raised against C-terminal peptide (Seigneurin-Berny et al., 2001). F-actin distribution was revealed after incubation with TRITC-conjugated phalloidin (Molecular Probes). Coverslips were mounted in Prolong® Antifade (Molecular Probes). Apatite collagen complexes (ACCs) were prepared using a method described previously (Shibutani et al., 2000; Saltel et al., 2004).

Plasmids and constructs

GFP-mDIA2 and GFP-mDIA2-ΔGBD were from Art Alberts (Van Andel Institute) and have been described previously (Palazzo et al., 2001a). GFP-G14VRho and GFP-G12VRac were gifts from Philippe Fort (CRBM, Montpellier, France). pEGFP-Actin Vector® was from Clontech. TAT-C3 expression vector was a kind gift from Erik Sahai and was produced as described (Coleman et al., 2001). Vectors expressing haemagglutinin (HA)-tagged mHDAC6 and deletion mutants have been described previously (Seigneurin-Berny et al., 2001).

Osteoclast differentiation

Spleen cells from six- to eight-week-old male OF1 mice were seeded at 2500 cells/mm^2 and cultured for 8 days on coverslips in differentiation medium: α-MEM medium (Life Technologies) containing 10% foetal calf serum (FCS, Hyclone) plus M-CSF and soluble recombinant RANK-L.

Microinjection

Mouse spleen cell-derived osteoclasts differentiated in vitro on Eppendorf CELLocate® coverslips for 7 days in differentiation medium were transferred to observation medium: α-MEM without bicarbonate (Life Technologies) containing 10% foetal calf serum, M-CSF, 20 mM HEPES and soluble recombinant RANK-L. Intranuclear microinjections of cDNA (0.2 mg/ml in 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) were carried out at room temperature using Eclipse TE 200 inverted microscope (Nikon) with an InjectMan micromanipulator and an Eppendorf 5246 microinjector. After injection, cells were further

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

maintained at 37°C and 5% CO_2 for 6 hours in differentiation medium before imaging.

Immunoprecipitation and interaction site mapping

For co-immunoprecipitation and interaction site mapping, COS cells were lysed 24 hours after transfection with Fugene 6® following the manufacturer's recommendations (Roche). Lysis buffer consists of 100 mM HEPES pH 7.9, 6 mM $MgCl_2$, 40% glycerol, 150 mM KCl, 0.1% Nonidet P40 and 1 mM dithiothreitol supplemented with a protease inhibitor cocktail. The lysate was incubated on ice for 20 minutes and cleared by centrifugation at 17,000 ***g*** for 10 minutes at 4°C. HA-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-HA antibody and protein-G sepharose for 2 hours at 4°C. Immunoprecipitated proteins were washed three times in lysis buffer.

Confocal microscopy

For immunofluorescence, cells were fixed in Busson fixation solution at pH 6.9 (4% paraformaldehyde, 60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 20 mM EGTA, 2 mM magnesium acetate, 0.05% glutaraldehyde w/v), processed as described (Ory et al., 2000) and imaged with a Zeiss LSM 510 microscope using a 63× (NA 1.4) Plan NeoFluor objective. To prevent cross-contamination between fluorochromes, each channel was imaged sequentially using the multi-track recording module before merging.

Tubulin deacetylase assay

COS cells transfected with 1 μg HDAC6 and/or mDia plasmids were lysed at room temperature for 40 minutes in buffer A (15 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 340 mM sucrose, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.65 mM spermidine, 1 mM dithiothreitol, 0.5% Triton X-100, 50 ng/ml TSA) with a complete protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals). After centrifugation at 17,000 ***g*** at 4°C, the supernatant (cytoplasmic extract) was mixed with Laemmli buffer and the extent of tubulin acetylation monitored by western blotting, using an anti-acetylated tubulin antibody.

GTP-GTPase affinity precipitation assay

The GST-RBD construct used to evaluate the level of GTP-Rho in cell lysates was kindly provided by M. Schwartz (Scripps Research Institute, La Jolla, CA). The activity assay was performed as described (Ren et al., 1999) for GTP-Rho with slight modifications. Briefly, GST-fusion proteins containing the Rho-binding domain (RBD) from mouse Rhotekin (amino acids 7-89) were produced in *Escherichia coli* BL21 cells. After isopropylthiogalactoside (IPTG) induction, pellets of bacteria were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $Na_2S_2O_5$, 10% glycerol, 20% sucrose, 2 mM DTT, 1 μg/ml each aprotinin, leupeptin and pepstatin) and sonicated. Cell lysates were centrifuged for 20 minutes at 4°C, 45,000 ***g*** and the supernatants were incubated with glutathione-coupled sepharose 4B beads (Pharmacia Biotech) for 2 hours at 4°C. After three washes with lysis buffer, the amount of GST-RBD fusion proteins bound to the beads was estimated from Coomassie Blue-stained SDS gels.

Cells at different stages of the differentiation process were rapidly washed in ice-cold PBS and proteins were extracted with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$, 1% Triton-X100, 10% glycerol, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 500 mM NaCl and 1 μg/ml each leupeptin, pepstatin and aprotinin). Lysates were centrifuged for 5 minutes at 17,000 ***g*** and 4°C, and aliquots from the supernatant were used to determine total GTPase in the cell lysate. 20 μg of bacterially produced GST, GST-RBD fusion proteins bound to glutathione-coupled sepharose beads were added to cell lysates and incubated for 1 hour at 4°C. Beads were washed four times in lysis buffer and bound proteins were eluted in Laemmli sample buffer. Analyses for bound GTPases by western blotting were performed using monoclonal antibody 26C4 against RhoA (a generous gift from J. Bertoglio, Inserm U461, Paris, France).

Results

Rho inhibition slows down podosome belt disruption following microtubule depolymerisation

As microtubule integrity is required for podosome belt formation in mature osteoclasts (Destaing et al., 2003) and the small GTPase Rho is activated by microtubule depolymerisation in fibroblasts (Ren et al., 1999) or in macrophage osteoclast-like polykaryons (Ory et al., 2002), we wondered whether podosome belt destabilisation after microtubule depolymerisation was dependent on Rho activity. To address that question, we used the ability of exoenzyme C3 fused to the HIV TAT protein fragment (TAT-C3) to inhibit Rho activity quickly (Coleman et al., 2001; Nagahara et al., 1998; Schwarze et al., 1999). We first verified, using an in vitro ribosylation assay, that TAT-C3 efficiently inhibited Rho after 5 hours in osteoclasts (data not shown). Then, to examine the requirement of Rho activity for podosome belt destabilisation after microtubule depolymerisation, we maintained the osteoclasts for 5 hours in medium containing either TAT-C3, or TAT-GFP fusion proteins as a control, and treated them with nocodazole for 0, 30, 60 or 90 minutes. The cells were then fixed and stained for actin and β-tubulin (Fig. 1A). TAT-C3 alone neither affected the podosome belt nor the microtubule network (Fig. 1B). However, whereas the podosome belt started to be disassembled into podosome clusters after 30 minutes of nocodazole treatment, (Fig. 1A,B arrowheads), it remained tightly associated at the cell periphery in TAT-C3 treated osteoclasts (Fig. 1B). Longer treatment with nocodazole led to complete disruption of the podosome belt followed by cell retraction in control cells, whereas C3 treatment drastically delayed podosome belt disassembly as even after 90 minutes nocodazole treatment, the podosome belt was maintained at the cell periphery (Fig. 1A). This

Table 1. Percentage of osteoclasts presenting podosome belts compared to podosomes arranged in clusters or rings after various treatments*

	Control	Nocodazole (50 minutes)	TAT-C3 (5 hours)	TAT-C3 (5 hours) then nocodazole (50 minutes)	TAT-GFP (5 hours)	TAT-GFP (5 hours) then nocodazole (50 minutes)
% of cells with podosome rings	27	90	15	35	22	95
% of cells with podosome belts	73	10	85	65	78	5

*600 osteoclasts were counted for each condition and the results are from five independent experiments.

observation that TAT-C3 treatment prevented podosome belt disruption following depolymerisation of microtubules was further confirmed by quantifying the relative amount of osteoclasts with podosome belts compared to rings (Table 1). Longer nocodazole treatment resulted in the total loss of the podosome belt under both conditions, confirming the crucial role of microtubules in podosome belt integrity (data not shown).

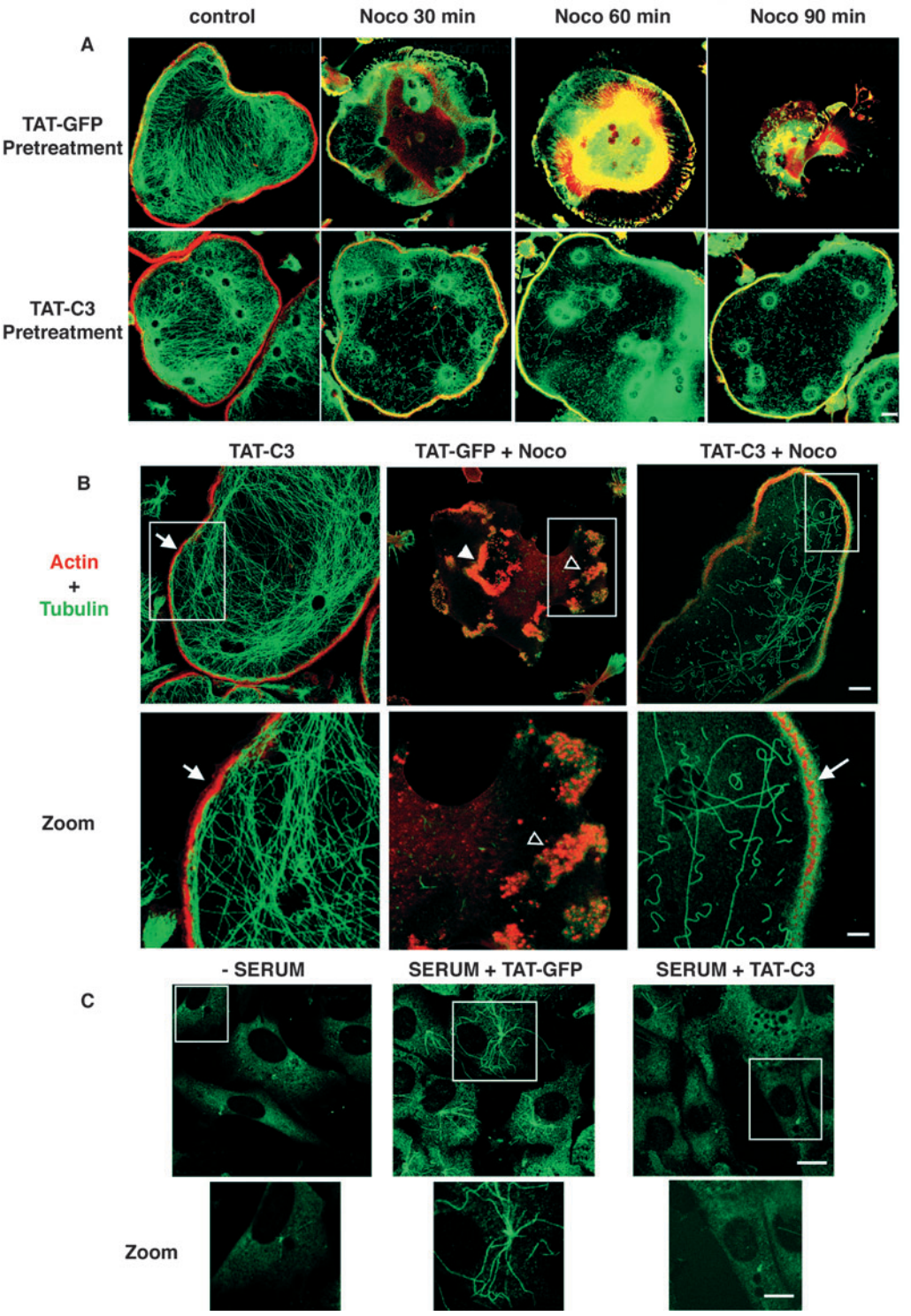


Fig. 1. TAT-C3-mediated Rho inhibition in osteoclasts confers podosome belt resistance to microtubule depolymerisation through stabilisation of a subset of microtubules. Rho-inhibition partially blocks nocodazole-induced microtubule depolymerisation and podosome belt dissociation. Osteoclasts either untreated or treated for 5 hours in the presence of TAT-GFP (0.5 μM) or TAT-C3 (0.5 μM) were incubated in the presence of nocodazole (2 μM) for 50 minutes and then fixed and stained for actin (in red) and β-tubulin (in green) before observation using a confocal microscope. (A) Kinetics of nocodazole-mediated podosome belts and microtubule disruption. In the presence of the control (TAT-GFP), nocodazole disrupted both microtubules and podosome belts in less than 30 minutes. In the presence of TAT-C3, podosomes belts were resistant to nocodazole treatment for more than 1 hour whereas subsets of microtubules were still observed. (B) TAT-C3 pretreatment had no effect on osteoclast cytoskeletons exhibiting a dense microtubule network and a podosome belt, whereas nocodazole induced complete microtubule dissociation together with podosome belt destabilisation and the subsequent formation of podosome rings (arrowheads) and clusters (open arrowheads) as previously described (Destaing et al., 2003). In contrast, TAT-C3 blocked the action of nocodazole since podosome belts were stabilised at the osteoclast periphery (arrows) and a subset of microtubules was maintained. A close-up of the area within the white insert is presented underneath each image. (C) Rho activation induces microtubule stabilisation in nocodazole-treated NIH3T3 cells. NIH3T3 cells were serum starved for 12 hours in the presence of TAT-GFP or TAT-C3 (0.5 μM) for the last 4 hours. Then cells were stimulated by serum addition for a further 2 hours before a 50-minute nocodazole (2 μM) treatment. Nocodazole-resistant microtubules were barely detectable when Rho was inactivated either in the absence of serum or in the presence of TAT-C3. In contrast, Rho activation by serum induced microtubule stabilisation in TAT-GFP control cells. A close-up of the area within the white insert is presented underneath each image. Bar, 10 μm (A, lower panels in B, C); 20 μm (upper panels in B).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

Surprisingly, TAT-C3-treated osteoclasts showed a significant increase in nocodazole-resistant microtubules compared to TAT-GFP-treated cells (Fig. 1A,B). This observation contradicts previous published data showing that microtubule stabilisation is induced by Rho activation rather than Rho inhibition in NIH3T3 cells (Cook et al., 1998). To confirm that our results were not due to experimental deficiencies, we observed the microtubule content in NIH3T3 cells that were first stimulated by serum to activate Rho, and then treated with nocodazole in the presence of TAT-C3 or TAT-GFP. As described by others, and in contrast to osteoclasts, Rho activation by serum induced microtubule stabilisation that was otherwise blocked by TAT-C3 (Fig. 1C). We conclude that the effects of Rho inhibition on microtubule stability are cell type specific. It should be noted that microtubule stabilisation by Rho inhibition has also been found in astrocytes (S. Etienne-Manneville, personal communication).

Rho activity and HDAC6 regulate acetylated microtubule levels in osteoclasts

Our previous experiments indicating that Rho inhibition somehow stabilised microtubules prompted us to check whether the level of Rho activity could modulate post-translational modifications (PTMs) of microtubules, as PTMs are often associated with a change in microtubule dynamics and/or stability (Rosenbaum, 2000).

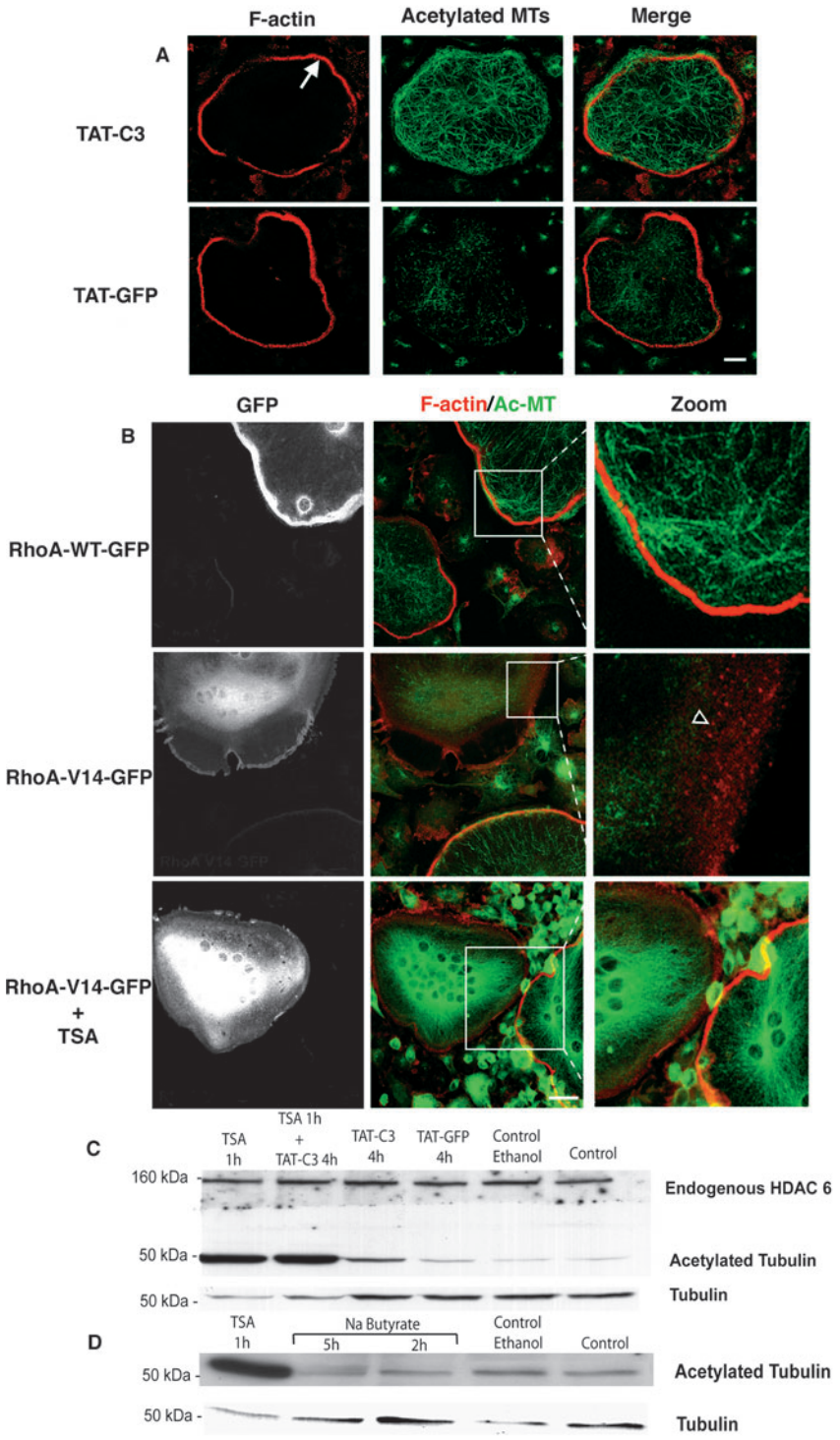


Fig. 2. Rho activity controls the level of tubulin acetylation upstream of HDAC6. (A) Inhibition of Rho by 0.5 μM TAT-C3 for 5 hours induced an accumulation of acetylated microtubules in comparison to 0.5 μM TAT-GFP used as a control. (B) One nucleus per osteoclast was microinjected with either RhoA WT-GFP or a constitutively activated form of Rho, RhoAV14-GFP expression vectors. Cells were fixed 6 hours after microinjection and GFP-expressing cells were detected by GFP fluorescence using a confocal microscope. Acetylated tubulin was detected by indirect immunofluorescence (green) and F-actin by means of phalloidin-RITC (red) and a close-up of each condition is presented. In the presence of RhoA-WT, osteoclasts exhibit the typical podosome belt and dense networks of acetylated microtubules. On the other hand, expression of Rho V14-GFP induced deacetylation of microtubules and disorganisation of podosome belts (arrowhead in close-up area). However, tubulin deacetylation dependent on Rho activation was inhibited after treatment with the HDAC6 inhibitor TSA (3 μM) for 1 hour, showing that this enzyme is downstream of Rho. (C,D) HDAC6 is present and active in osteoclasts. Endogenous HDAC6 was easily detected in osteoclasts by western blotting with a polyclonal anti-HDAC6 antibody (C). The deacetylase activity of HDAC6 was tested with two drugs: TSA, known to inhibit its activity and sodium butyrate, which does not. HDAC6 was indeed active in osteoclasts as confirmed by greatly increased levels of acetylated tubulin in TSA-treated osteoclasts and unchanged levels in the presence of sodium butyrate compared to the control and to the total amount of β-tubulin (D). Finally, inhibition of Rho by TAT-C3 (for 4 hours) in the presence of TSA had no additional effect on the increase in acetylated tubulin (C). Bar, 20 μm.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

Osteoclasts were incubated for 5 hours with either TAT-GFP as a control or TAT-C3 to inhibit Rho, and processed for confocal microscopy analysis after staining of their actin and acetylated-microtubule (Ac-MT) cytoskeleton. Whereas the Ac-MT level was detectable but low in osteoclasts incubated with TAT-GFP fusion protein, it was increased in osteoclasts maintained in presence of TAT-C3 (Fig. 2A). On the other hand, we never observed changes in detyrosinated microtubules (data not shown), suggesting that Rho inhibition was promoting microtubule acetylation and also that Rho activation should trigger microtubule deacetylation. To test this hypothesis, one nucleus per osteoclast analysed was microinjected with vectors encoding GFP fused to a wild-type form or a constitutively activated form of RhoA (RhoA-WT, V14-RhoA respectively). Cells were then fixed and Ac-MT levels compared by immunostaining. GFP-RhoA WT did not significantly affect levels of Ac-MT whereas V14RhoA promoted a drastic decrease in the amount of Ac-MT together with disruption of the podosome belt (Fig. 2B). Thus, Rho appears to be a key player in regulating levels of Ac-MT in osteoclasts.

It has recently been shown that the histone deacetylase 6 (HDAC6) acts as a major microtubule deacetylase that can be inhibited by TSA (Matsuyama et al., 2002). To test whether HDAC6 could act on the Rho pathway, multinucleated osteoclasts were microinjected with V14RhoA cDNA and treated with TSA for 30 minutes. TSA treatment blocked the V14RhoA-mediated deacetylation of microtubules (Fig. 2B, lower panel), indicating that HDAC6 was downstream of Rho. To confirm that microtubule acetylation was increased by HDAC6 or Rho inhibition, we monitored levels of acetylated tubulin in osteoclast lysates treated with TAT-GFP, TAT-C3 or TSA (Fig. 2C). As expected, whereas levels of tubulin were comparable between samples, levels of acetylated tubulin increased an average of 2.5-fold in TAT-C3-treated osteoclasts when compared to TAT-GFP-treated osteoclasts (mean of five independent experiments). However, the relative increase of acetylated tubulin was much higher in TSA-treated compared to C3-treated cells indicating that Rho may partially control tubulin acetylation and/or only affect a subset of microtubules. In addition, in contrast to most HDAC proteins, TSA-sensitive HDAC6 has been shown to be insensitive to sodium butyrate. To assess whether microtubule deacetylation was dependent on other HDACs in osteoclasts, cells were treated with TSA or sodium butyrate and the amount of acetylated tubulin determined by western blotting. The amount of acetylated tubulin did not change in sodium butyrate-treated osteoclasts but did drastically increase when osteoclasts were treated with TSA (Fig. 2D). Altogether, these experiments indicate that Rho activation is able to stimulate microtubule deacetylation and that HDAC6 is a probable intermediate.

Rho activates HDAC6 via mDia2

To further evaluate the role of the Rho pathway in microtubule acetylation in osteoclasts, we decided to test whether the two best-characterised Rho effectors, namely ROCK and mDia proteins, modified levels of Ac-MT in osteoclasts. As the ROCK inhibitor Y27632 did not modify levels of Ac-MT in osteoclasts (data not shown), we focused on mDia2. Indeed, mDia2 was a good candidate as it has been shown to be involved in microtubule stabilisation and in coordinating microtubule and actin dynamics (Ishizaki et al., 2001; Palazzo et al., 2001a). We thus microinjected plasmids encoding a constitutive active mutant of mDia2 fused to GFP (GFP-mDIA2-ΔGBD) into osteoclasts (Palazzo et al., 2001a). Consistent with the effect of activated Rho, we found that activated mDia2 triggered a drastic decrease in levels of Ac-MT as well as disruption of the podosome belt without any new specific actin structures being formed (Fig. 3A). As our results suggest that both HDAC6 and mDia2 act downstream of Rho, we hypothesised that mDia2 and HDAC6 could interact together to regulate tubulin acetylation. To test this hypothesis, we cotransfected HDAC6 with either wild-type mDia2 or activated mDia2 fused to GFP (GFP-mDia2WT or GFP-mDIA2-ΔGBD) in COS cells. As a control, HDAC6 was transfected with GFP alone. HDAC6 proteins were then immunoprecipitated from cleared cell lysates and associated mDia2 revealed by immunoblotting with anti-GFP antibody. GFP-mDia2WT and GFP-mDIA2-ΔGBD were found in HDAC6 immunoprecipitates whereas GFP alone was not (Fig. 3B). To gain further insight into which HDAC6 domains were responsible for mDia2 binding, we cotransfected deletion mutants of HA-tagged HDAC6 together with GFP-mDia2WT. HDAC6 fragment proteins were immunoprecipitated with HA antibody and associated mDia2 was revealed by anti-GFP immunoblotting. We detected mDia2 in the DD1 (amino acids 85-428) and DD2 (aa 429-824) but not in the C-terminal (aa 825-1149) and N-terminal (aa 1-84) domain immunocomplexes (Fig. 3C). These results indicate that HDAC6 interacts with mDia2 in COS cells and that the two deacetylase domains, DD1 and DD2 are both able to interact with mDia2. Finally, to determine whether mDia2 was able to stimulate the deacetylase activity of HDAC6 in cells, we used an in vitro deacetylase assay (Zhang et al., 2003). COS cells were transfected with either HDAC6 alone, GFP-mDia2 alone or HDAC6 and GFP-mDia2 together. We then analysed the level of acetylated tubulin by western blotting of COS cell lysates (Fig. 3D). HDAC6 or GFP-mDia2 alone was not able to promote deacetylation of tubulin. However, when both proteins were expressed in cells, the level of acetylated tubulin was clearly reduced despite comparable amounts of tubulin in the samples. Moreover, transfecting twice the amount of GFP-mDia2 still reduced the level of acetylated tubulin indicating that mDia2 is able to activate HDAC6 deacetylase activity.

Formation of podosome belts in maturing osteoclasts correlates with microtubule acetylation

Our results described above clearly indicated that, in osteoclasts, Rho downregulation is required for podosome belt stabilisation, microtubule acetylation and stabilisation. We have previously reported that during in vitro osteoclastogenesis, podosome patterning evolves from microtubule-independent clusters and rings to microtubule-dependent belts (Destaing et al., 2003). We then reasoned that osteoclast maturation during osteoclastogenesis should be accompanied by an increase in microtubule acetylation. To investigate this possibility, we compared the Ac-MT pattern in macrophages, as well as in immature and mature osteoclasts seeded on glass. In macrophages, Ac-MT staining was concentrated in punctate structures resembling centrosomes (Fig. 4A). Immature osteoclasts exhibiting podosome rings

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

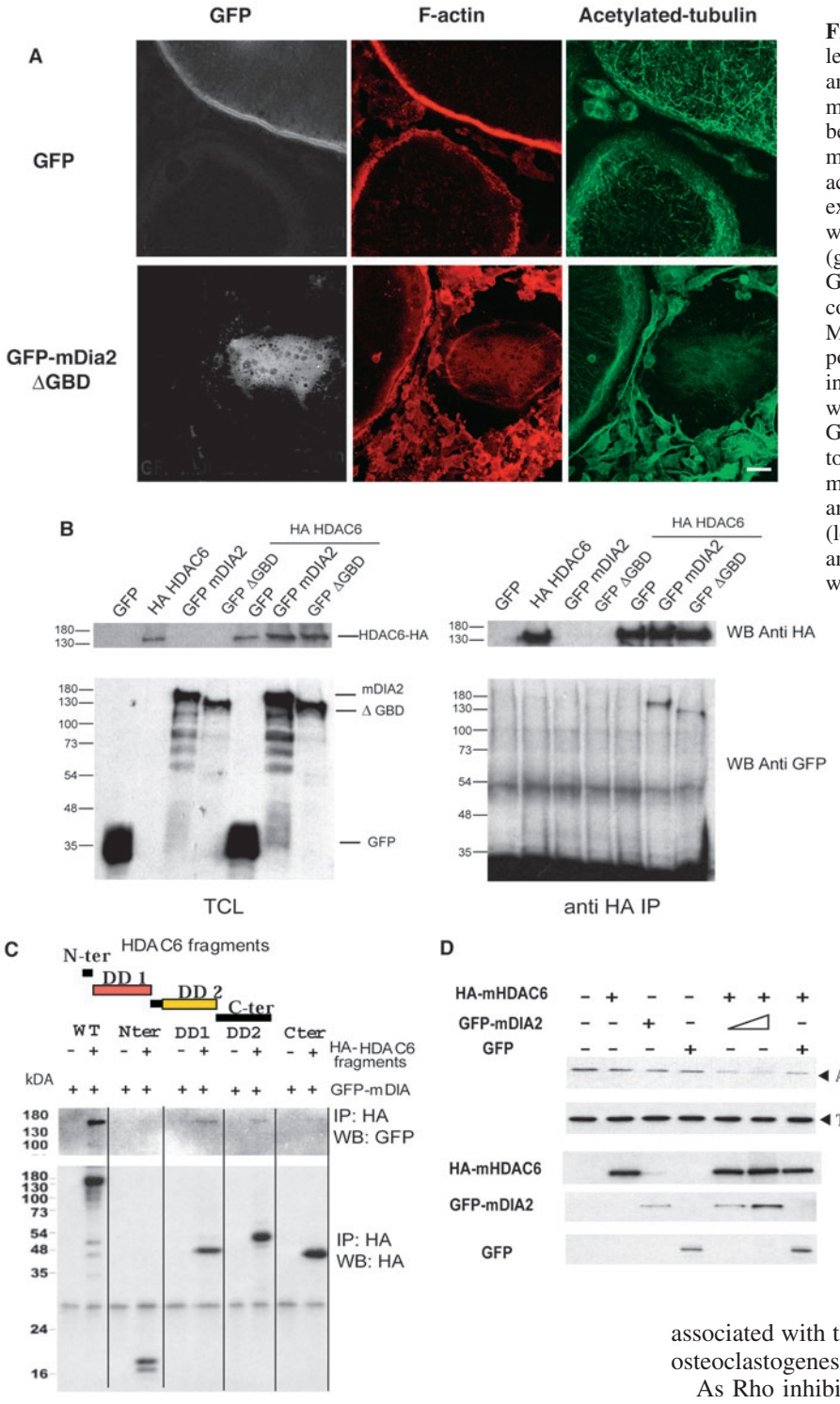


Fig. 3. mDIA2 mediates the action of Rho at the level of acetylated microtubules by interacting with and activating HDAC6. (A) Constitutively active mDia2 blocks tubulin acetylation and podosome belt formation. One nucleus per osteoclast was microinjected with either GFP or a constitutively activated form of mDIA2, GFP-mDIA2 ΔGBD expression vectors. 6 hours later, acetylated tubulin was detected by indirect immunofluorescence (green) and F-actin with phalloidin-RITC (red). In GFP-mDIA2 ΔGBD-expressing osteoclasts compared to GFP-expressing osteoclasts, the Ac-MT level was dramatically decreased and the podosome belt disrupted. (B) HDAC6 and mDia2 interact together. COS cells were either transfected with GFP alone, HA-HDAC6, GFP-mDIA2 WT, GFP-mDIA2 ΔGBD vectors or co-transfected together with HDAC6. Transfected HDAC6 or mDia2 were revealed in total cell lysate (TCL) by an anti-HA or an anti-GFP antibody respectively (left panel). HDAC6 was immunoprecipitated with an anti-HA antibody and mDia2-associated proteins were revealed with an anti-GFP antibody (right panel). Both the wild type and activated mDia2 co-precipitated with HA-tagged HDAC6. (C) Mapping of HDAC6 domain interaction with mDia2. To determine the domains of HDAC6 implicated in the interaction with GFP-mDIA2 WT, COS cells were transfected with GFP-mDIA2 WT and with the N-terminal domain, the deacetylase domain 1 (DD1), the deacetylase domain 2 (DD2) or the C-terminal domain of HDAC6, using HA-tagged expression vectors. Cell lysates of transfected cells were immunoprecipitated with a monoclonal anti-HA antibody. (D) mDia2 increases HDAC6 deacetylase activity. In a tubulin deacetylase in vitro assay, COS cells were transfected with mHDAC6-HA WT, lysed at room temperature for 15 minutes and the ratio of acetylated tubulin/tubulin monitored by western blotting. When GFP-mDIA2 WT was transfected with mHDAC6-HA WT, this increased the deacetylase activity of the enzyme whereas GFP-mDIA2 WT alone had no effect on the level of this PTM. Positions of protein standards in kDa are indicated on the left-hand side of blots.

contained only a low level of Ac-MT (Fig. 4B) whereas mature osteoclasts, with a podosome belt, had much higher levels of Ac-MT which were found mostly associated with the actin podosome belt (Fig. 4C, arrowhead). This was further assessed by comparing acetylated tubulin levels in cultures of osteoclasts after 6 or 8 days of differentiation containing 40% or 80% respectively, of osteoclasts exhibiting podosome belts (Fig. 4D). We could conclude that microtubule acetylation is associated with the formation of stable podosome belts during osteoclastogenesis.

As Rho inhibition is crucial for maintaining the podosome belt at the cell periphery, we expected that Rho inhibition in immature osteoclasts (D6) should accelerate the formation of podosome belts. Macrophages were differentiated into osteoclasts and at day 6, TAT-GFP or TAT-C3 was added to the differentiation medium for 6 hours. The number of osteoclasts with podosome rings (Fig. 4E, arrowhead) or podosome belts (Fig. 4E, arrows) was then quantified and compared to cells maintained in differentiation medium alone. At day 6, only 40% of osteoclasts in untreated or TAT-GFP-treated osteoclasts exhibited podosome belts versus 70% in TAT-C3-treated

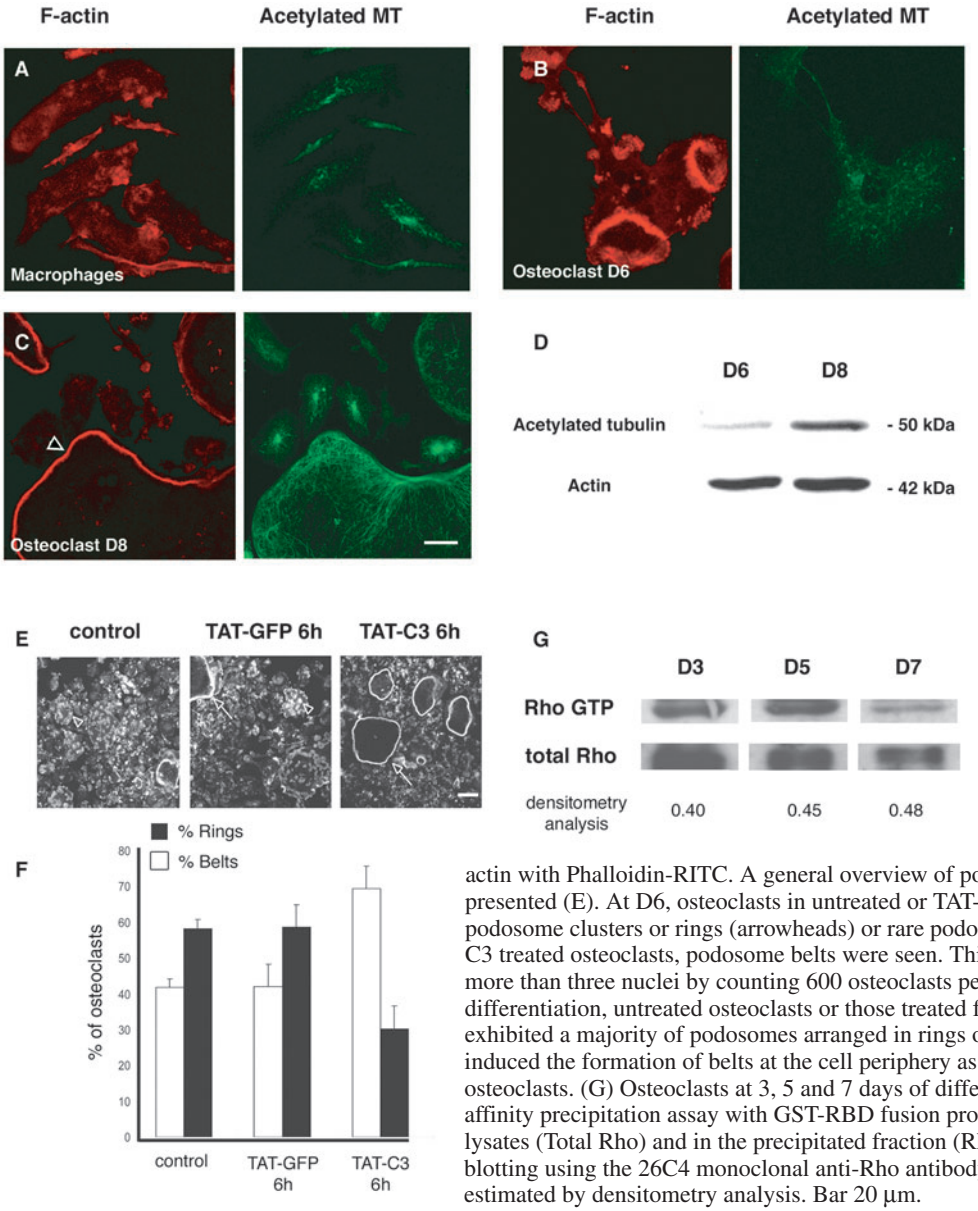


Fig. 4. The level of microtubule acetylation in mature osteoclasts correlates with stabilisation of podosomes into belts. (A,B) Macrophages and immature osteoclasts, differentiated for 6 days in the presence of RANK-L + M-CSF, with podosome rings, presented a low level of acetylated tubulin. (C) Mature osteoclasts differentiated for 8 days in the presence of RANK-L + M-CSF presented specific accumulations of acetylated microtubules just behind the podosome belt (arrowhead). (D) This specific accumulation of acetylated microtubules during the transition period between podosome rings and belt, the last step of podosome patterning, was confirmed by western blot analysis on osteoclast populations differentiated for 6 (D6) or 8 (D8) days. Standard protein markers are indicated in kDa. (E,F) Rho inhibition accelerates the podosome ring to belt transition in immature osteoclasts. Spleen leukocytes were differentiated in the presence of RANKL and M-CSF for 6 days, and then treated or not with TAT-GFP or TAT-C3 for 6 hours before being fixed, and stained for F-actin with Phalloidin-RITC. A general overview of podosome organisation in osteoclasts is presented (E). At D6, osteoclasts in untreated or TAT-GFP treated cultures exhibited mostly podosome clusters or rings (arrowheads) or rare podosome belt (arrows). In contrast, in TAT-C3 treated osteoclasts, podosome belts were seen. This was quantified in osteoclasts containing more than three nuclei by counting 600 osteoclasts per condition (F). At this stage of differentiation, untreated osteoclasts or those treated for 6 hours with TAT-GFP (0.5 μM) exhibited a majority of podosomes arranged in rings or clusters, whereas TAT-C3 (0.5 μM) induced the formation of belts at the cell periphery as usually found in more mature osteoclasts. (G) Osteoclasts at 3, 5 and 7 days of differentiation were lysed to perform an affinity precipitation assay with GST-RBD fusion proteins. The amount of Rho in total cell lysates (Total Rho) and in the precipitated fraction (RhoGTP) was determined by western blotting using the 26C4 monoclonal anti-Rho antibody. The ratio of RhoGTP/total Rho was estimated by densitometry analysis. Bar 20 μm.

osteoclasts (Fig. 4F). In an attempt to confirm the relation between the level of Rho activation, microtubule deacetylation and the podosome belt formation we performed GST-pull down experiments to evaluate the RhoGTP levels along osteoclastogenesis. Unfortunately, we could not detect any significant variation of the ratio of RhoGTP versus total Rho (Fig. 4G). This may indicate that the localisation of activated Rho is more important to mediate its effect than the overall Rho activity. Nevertheless, altogether our results in osteoclasts indicate that Rho is involved in podosome belt formation as well as in cytoskeleton maturation process by promoting a switch from podosome rings to podosome belts, although its precise mode of action remains to be elucidated.

Bone resorbing osteoclasts exhibit high levels of acetylated microtubules within the sealing zone

As microtubule acetylation is an essential process in osteoclast maturation, we reasoned that this could be important in osteoclast function, namely bone resorption. When resorbing bone, osteoclasts rearrange their actin cytoskeleton into a sealing zone, a large band of actin that delineates the resorption pit. We have recently shown that osteoclasts alternate between resorbing phases with a sealing zone and migrating phases without any specific actin structures (Saltel et al., 2004). To determine whether microtubule acetylation could be correlated with osteoclast function, we cultured osteoclasts on coverslips coated with an apatite/collagen matrix known to mimic the bone surface (Shibutani et al., 2000; Saltel et al., 2004). Ac-MTs and detyrosinated microtubules were analysed with F-actin by immunostaining and confocal microscopy. Ac-MTs were barely detectable in migrating osteoclasts (Fig. 5B), but increased drastically in resorbing osteoclasts (Fig. 5A). Interestingly, resorbing or non-resorbing osteoclasts did not show any accumulation of detyrosinated microtubules (Fig. 5A,B), suggesting that microtubule acetylation may reflect a

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

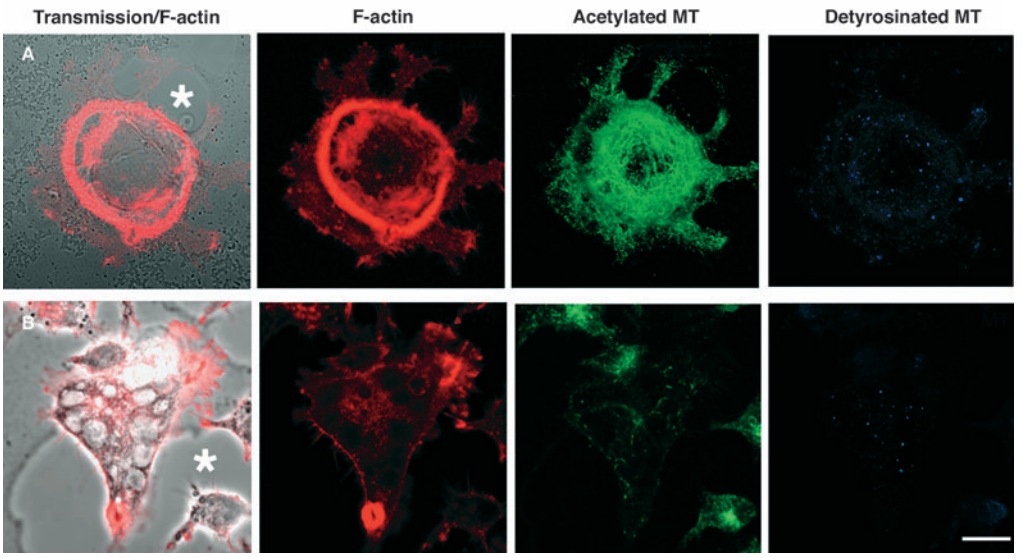


Fig. 5. Formation of the sealing zone in bone resorbing osteoclasts is associated with the dynamic regulations of tubulin acetylation. (A,B) Osteoclasts were differentiated in the presence of RANK-L + M-CSF for 8 days, detached, spread on mineralised matrix (ACC, Apatite Collagen Complex) substrate, which mimics dentin slices, fixed and immunostained with phalloidin-RITC and monoclonal anti-acetylated and polyclonal anti-detyrosinated tubulin antibodies. These two osteoclasts are associated with a resorption pit (*). The osteoclast presented in A is still resorbing, as it exhibits a sealing zone, a large band of F-actin, and has a large number of acetylated but undetectable detyrosinated microtubules. The osteoclast in B is a migrating osteoclast without a sealing zone and showed neither acetylated nor detyrosinated microtubules. Bar, 20 μm.

specific post-translational modification of microtubules in active osteoclasts.

Discussion

We previously reported that osteoclast differentiation was accompanied by a change in podosome patterning. Immature osteoclasts present dynamic podosome rings and mature osteoclasts contain a stable peripheral podosome belt (Destaing et al., 2003). In an attempt to understand the molecular mechanisms underlying podosome patterning, we found that Rho inhibition both delayed podosome belt disruption after nocodazole treatment and accelerated the switch from unstable podosome rings to a stable peripheral podosome belt, mimicking the maturation process. We also described for the first time that during the differentiation of osteoclasts and their resorption cycle on mineralised matrix, microtubules became acetylated, and not detyrosinated, indicating that microtubule acetylation may have a specific function in osteoclasts. Furthermore, stabilisation of the podosome belt was correlated with two events: increases in microtubule acetylation and Rho inhibition. This led us to identify a new Rho-dependent pathway in which the recently discovered microtubule acetylase HDAC6 (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003) was activated by Rho and its effector mDia2. Microinjection of either activated RhoA or mDia2 triggered microtubule deacetylation together with podosome belt disruption. On the other hand, Rho inhibition promoted microtubule acetylation. In vitro assays confirmed that mDia2 activates the microtubule deacetylase activity of HDAC6 and this may be explained by the presence of HDAC6 and mDia2 in the same protein complex as revealed by immunoprecipitation experiments. Altogether, our results indicate that microtubule acetylation levels are controlled by Rho proteins, and that this may be crucial for osteoclast differentiation and function.

The fact that, in our study, TAT-C3-mediated Rho inhibition promoted podosome belt assembly during osteoclast maturation is rather surprising. Indeed, exoenzyme C3 has been reported to disrupt the sealing zone and to block osteoclast resorption on bone (Zhang et al., 1995; Saltel et al., 2004) as well as disrupting isolated podosomes in macrophage polykaryons (Chellaiah et al., 2000; Ory et al., 2000). In src-transformed cells, Rho inhibition also disrupted the podosome whereas activated Rho has been found localised in podosomes (Berdeaux et al., 2004). However, inconsistent with a function of Rho in podosome formation, and in contrast to Cdc42 (Dutartre et al., 1996; Moreau et al., 2003), activated Rho or, interestingly activated mDia, do not lead to typical podosome formation but rather to their disruption (Burgstaller and Gimona, 2004; Chellaiah et al., 2000; Ory et al., 2000) indicating that the Rho activation pathway by itself is not sufficient for podosome formation. However, as revealed by our recent study (Saltel et al., 2004), Rho inhibition in osteoclasts cultured on bone-like substrate led to the loss of both their resorptive function and their apico-basal polarity. Interestingly, under these conditions, F-actin reorganised into a podosome belt, mimicking the actin organisation found in osteoclasts seeded on glass, an organisation never seen in osteoclasts seeded on bone-like substrate in normal conditions. Together with the present study, it indicates that Rho activity is not required for the podosome belt formation. However, despite what we were expecting, we could not observe any RhoGTP level variation along osteoclastogenesis indicating that to get more insight into the function of Rho in such large multinucleated cells, the subcellular localisation of activated Rho should be investigated. It would be more informative than the overall activity measured by pull-down assay. Indeed, we should expect Rho to be only locally inhibited as its full inhibition by exoenzyme C3 triggered not only the podosome belt stabilisation, but also excessive spreading and loss of cell polarity (Ory et al., 2000; Saltel et al., 2004). This may engage local regulation of Rho activity, variations of which may be insufficient to discriminate it from the overall Rho activity in cells. This idea is also supported by the fact that acetylation of microtubules was mainly observed on a subset of microtubules localised in the vicinity of the podosome belt in differentiated

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

osteoclasts. This suggests that a local change in microtubule properties is occurring, and consequently, a local change in signalling events leading to microtubule acetylation.

Microtubule acetylation during osteoclast differentiation

Our results have shown that podosome belt and sealing zone formation during osteoclast maturation and bone resorption, respectively, are associated with an increase in tubulin acetylation corresponding to microtubule stabilisation. Interestingly, observations of increases in stable microtubules have been made in other differentiated cell types (Bulinski and Gundersen, 1991). For example, in muscle cell differentiation, which involves the fusion of myoblasts to form multinucleated myotubes, detyrosinated microtubules accumulate in myogenic precursors shortly before the fusion events. Detyrosinated microtubules are maintained in myotubes but acetylation is only observed at a later stage (Gundersen et al., 1989). Unlike myogenesis (Chang et al., 2002), osteoclastogenesis is not associated with detyrosination of microtubules, as we did not detect any significant changes in the levels of detyrosinated microtubules. However, as in myotubes, acetylated microtubules increased at a later stage in mature osteoclasts. These observations indicate that, although PTMs take place on stable microtubules, they are not necessarily occurring at the same time during the differentiation process, suggesting that they are dependent on their subcellular micro-environment and do not have the same biological functions. Differences in the function of post-translational tubulin modifications have been well exemplified in *Tetrahymena thermophila* in which the endogenous β-tubulin gene has been replaced by mutated forms preventing either acetylation or polyglycylation PTMs. Although there were no detectable abnormalities when non-acetylatable tubulin was expressed (Gaertig et al., 1995), preventing the polyglycylation of β-tubulin, in contrast, had an affect on cytokinesis and was lethal (Thazhath et al., 2002).

Although both the underlying molecular mechanisms of PTM and the function of microtubule acetylation remain to be elucidated, recent reports have highlighted an intriguing property of detyrosinated microtubules. In mammalian cells, kinesins have a stronger affinity for detyrosinated tubulin and may be preferentially recruited on stable detyrosinated microtubules (Gurland and Gundersen, 1995; Kreitzer et al., 1999). Whether a similar function can be attributed to acetylation remains to be seen, but microtubule acetylation is highly regulated in osteoclast resorption function and podosome patterning.

Rho activates HDAC6 through mDia2 and controls microtubule quality

HDAC6 has been recently characterised as a cytoplasmic tubulin deacetylase (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003). We found that Rho inhibition increased microtubule acetylation. Conversely, Rho activation as well as microinjection of activated mDia2, promoted microtubule deacetylation whereas no changes in the levels of microtubule acetylation were observed with the ROCK inhibitor Y27632 (data not shown). These results indicate that mDia2 is the specific Rho effector involved in microtubule deacetylation. This hypothesis is reinforced by the fact that mDia2 coprecipitated with and activated HDAC6 in COS cells. Thus, we propose that Rho activates mDia2, which in turn stimulates HDAC6. However, the precise mechanism by which HDAC6 is activated will require more experiments. Indeed, we noticed that deacetylation of microtubules was not significantly different when HDAC6 was cotransfected with either the constitutively activated form of mDia2 (GFP-mDIA2-ΔGBD) or its wild-type counterpart. Together with the fact that mDia2 partially colocalised with HDAC6 on microtubules in osteoclasts (data not shown), we propose that an mDia2/HDAC6 complex is constitutively formed and that Rho activation localises that complex on microtubules to promote its in vivo deacetylation. Knowing where Rho is activated in this context is of major importance. Finally, mDia2 binding requires the cooperation of the deacetylase domains, DD1 and DD2 of HDAC6, which are also required for HDAC6 to bind tubulin (Zhang et al., 2003). Whether that complex is dependent upon tubulin binding to be assembled and/or active remains to be answered. Nonetheless, our results highlight the requirement for a fine control of Rho-dependent microtubule acetylation in osteoclasts. It would be of interest to analyse osteoclast podosome patterning in an HDAC6$^{-/-}$ background.

O.D. and F.S. are recipients of MENRT and FRM grants. We are grateful to Sandrine Etienne-Manneville for helpful discussions and sharing unpublished data. We wish to thank Art Alberts and Klaus Aktories for giving us precious reagents and also Jan R. De Mey and Edith Bonnely for stimulating discussions. B.G. is a recipient of a PhD fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de l'Isère. We are grateful to Sandrine Curtet-Benitski for technical assistance. This work was also supported by grants from CNRS (dynamique et réactivité du vivant), INSERM and the Ligue contre le Cancer du Rhône.

References

Berdeaux, R. L., Diaz, B., Kim, L. and Martin, G. S. (2004). Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell Biol.* **166**, 317-323.

Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**, 337-342.

Bulinski, J. C. and Gundersen, G. G. (1991). Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *BioEssays* **13**, 285-293.

Burgstaller, G. and Gimona, M. (2004). Actin cytoskeleton remodelling via local inhibition of contractility at discrete microdomains. *J. Cell Sci.* **117**, 223-231.

Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L. and Jones, G. E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood* **98**, 1142-1149.

Chang, W., Webster, D. R., Salam, A. A., Gruber, D., Prasad, A., Eiserich, J. P. and Bulinski, J. C. (2002). Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **277**, 30690-30698.

Chellaiah, M. A., Soga, N., Swanson, S., McAllister, S., Alvarez, U., Wang, D., Dowdy, S. F. and Hruska, K. A. (2000). Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J. Biol. Chem.* **275**, 11993-12002.

Coleman, M. L., Sahai, E. A., Yeo, M., Bosch, M., Dewar, A. and Olson, M. F. (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339-345.

Cook, T. A., Nagasaki, T. and Gundersen, G. G. (1998). Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* **141**, 175-185.

Destaing, O., Saltel, F., Geminard, J. C., Jurdic, P. and Bard, F. (2003). Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006
Journal of Cell Science

osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol. Biol. Cell.* **14**, 407-416.

Dutartre, H., Davoust, J., Gorvel, J. P. and Chavrier, P. (1996). Cytokinesis arrest and redistribution of actin-cytoskeleton regulatory components in cells expressing the Rho GTPase CDC42Hs. *J. Cell Sci.* **109**, 367-377.

Enomoto, T. (1996). Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct. Funct.* **21**, 317-326.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753-756.

Evans, J. G., Correia, I., Krasavina, O., Watson, N. and Matsudaira, P. (2003). Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation. *J. Cell Biol.* **161**, 697-705.

Gaertig, J., Cruz, M. A., Bowen, J., Gu, L., Pennock, D. G. and Gorovsky, M. A. (1995). Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in Tetrahymena thermophila. *J. Cell Biol.* **129**, 1301-1310.

Gundersen, G. G., Khawaja, S. and Bulinski, J. C. (1989). Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* **109**, 2275-2288.

Gurland, G. and Gundersen, G. G. (1995). Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. *J. Cell Biol.* **131**, 1275-1290.

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.

Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T. and Narumiya, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat. Cell Biol.* **3**, 8-14.

Kaverina, I., Krylyshkina, O. and Small, J. V. (1999). Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J. Cell Biol.* **146**, 1033-1044.

Kreitzer, G., Liao, G. and Gundersen, G. G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 1105-1118.

Linder, S. and Aepfelbacher, M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **13**, 376-385.

Linder, S., Hufner, K., Wintergerst, U. and Aepfelbacher, M. (2000). Microtubule-dependent formation of podosomal adhesion structures in primary human macrophages. *J. Cell Sci.* **113**, 4165-4176.

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.

Moreau, V., Tatin, F., Varon, C. and Genot, E (2003). Actin can reorganize into podosomes in aortic endothelial cells, a process controlled by Cdc42 and RhoA. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6809-6822.

Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat. Med.* **4**, 1449-1452.

Ory, S., Munari-Silem, Y., Fort, P. and Jurdic, P. (2000). Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage-derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J. Cell Sci.* **113**, 1177-1188.

Ory, S., Destaing, O. and Jurdic, P. (2002). Microtubule dynamics differentially regulates Rho and Rac activity and triggers Rho-independent stress fiber formation in macrophage polykaryons. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 351-362.

Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S. and Gundersen, G. G. (2001a). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* **3**, 723-729.

Palazzo, A. F., Joseph, H. L., Chen, Y. J., Dujardin, D. L., Alberts, A. S., Pfister, K. K., Vallee, R. B. and Gundersen, G. G. (2001b). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.* **11**, 1536-1541.

Ren, X. D., Kiosses, W. B. and Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578-585.

Rosenbaum, J. (2000). Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr. Biol.* **10**, R801-R803.

Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. and Jurdic, P. (2004). Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 5231-5241.

Saxton, W. M., Stemple, D. L., Leslie, R. J., Salmon, E. D., Zavortink, M. and McIntosh, J. R. (1984). Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. *J. Cell Biol.* **99**, 2175-2186.

Schulze, E. and Kirschner, M. (1986). Microtubule dynamics in interphase cells. *J. Cell Biol.* **102**, 1020-1031.

Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A. and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* **285**, 1569-1572.

Seigneurin-Berny, D., Verdel, A., Curtet, S., Lemercier, 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.

Shibutani, T., Iwanaga, H., Imai, K., Kitago, M., Doi, Y. and Iwayama, Y. (2000). Use of glass slides coated with apatite-collagen complexes for measurement of osteoclastic resorption activity. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 153-159.

Thazhath, R., Liu, C. and Gaertig, J. (2002). Polyglycylation domain of beta-tubulin maintains axonemal architecture and affects cytokinesis in Tetrahymena. *Nat. Cell Biol.* **4**, 256-259.

Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M. and Halleen, J. M. (2000). The cell biology of osteoclast function. *J. Cell Sci.* **113**, 377-381.

Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. and Borisy, G. G. (1987a). Assembly and turnover of detyrosinated tubulin in vivo. *J. Cell Biol.* **105**, 265-276.

Webster, D. R., Gundersen, G. G., Bulinski, J. C. and Borisy, G. G. (1987b). Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 9040-9044.

Zhang, D., Udagawa, N., Nakamura, I., Murakami, H., Saito, S., Yamasaki, K., Shibasaki, Y., Morii, N., Narumiya, S., Takahashi, N. et al. (1995). The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J. Cell Sci.* **108**, 2285-2292.

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.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Discussion générale

Depuis sa découverte en 1999 avec d'autres membres de la classe II des HDACs, la protéine HDAC6 a aussitôt suscité un engouement fort de la part des équipes de recherche afin de comprendre ses fonctions et sa localisation particulière.

Protéine particulière de part sa localisation exclusivement cytoplasmique alors qu'elle est décrite comme une "histone déacétylase", il apparaît nettement que cette protéine joue un rôle clé dans des processus cellulaires liés à l'acétylation et à l'ubiquitination des protéines. Ceci est dû à la présence d'un double domaine déacétylase et d'un domaine fixant l'ubiquitine.

La découverte de sa fonction de tubuline déacétylase est le premier rôle de cette enzyme multifonctionnelle capable aussi bien d'agir au niveau de la lysine 40 de la tubuline acétylée que dans la prise en charge des protéines ubiquitinées lors de la formation d'agrésomes. Elle peut également déacétyler les histones pour une action répressive au niveau du promoteur P21 ou exercer une activité catalytique sur la protéine HSP90 afin d'intervenir dans la maturation des récepteurs de stéroïdes.

HDAC6 et son domaine fixant l'ubiquitine

L'identification du domaine Znf-UBP a orienté les travaux de recherche vers une participation d'HDAC6 aux processus d'ubiquitination et de dégradation par le protéasome, dans le but de découvrir des fonctions inédites à cette déacétylase.

Les premières idées véhiculées ont décrit une collaboration d'HDAC6 à l'interface entre acétylation et ubiquitination des protéines grâce à la présence de ses domaines respectifs. L'hypothèse avancée montre la protéine HDAC6 comme une enzyme capable de retirer les

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

groupements acétylés sur une lysine particulière, et cet acide aminé libre, est remplaçable par une autre modification post-traductionnelle (telle que l'ubiquitine ou la protéine sumo).
Par son domaine ZnF-UBP, HDAC6 se fixe à une protéine mono ou polyubiquitinée, exerce une action catalytique sur une ou plusieurs lysines acétylées adjacentes, pour par exemple, permettre leur ubiquitination. (Seigneurin-Berny et al., 2001).
Cette balance entre ubiquitination et acétylation est bien décrite dans la littérature et les cas pour favoriser ou défavoriser une ubiquitination après une acétylation sont nombreux (Caron et al., 2005).
Par exemple, l'acétylation du régulateur transcriptionnel Smad7 est décrite comme une protection de Smad7 contre l'ubiquitination par la E3 ligase Smurf. La même lysine est la cible d'une compétition entre ces deux types de modification (Gronroos et al., 2002) et la participation d'HDAC1 pour retirer le groupement acétyl de Smad7 favorise sa dégradation (Simonsson et al., 2005).
A l'inverse, dans des conditions d'hypoxie, l'acétylation d'Hif1α par la protéine Ard1 permet d'améliorer le recrutement du complexe VHL afin d'induire son ubiquitination. L'acétylation d'Hif1α par Ard1 favorise sa dégradation par le protéasome (Jeong et al., 2002).
Les résidus lysines servent "d'interrupteurs" moléculaires critiques pouvant répondre aux signaux de voies spécifiques. Beaucoup de facteurs de transcriptions contiennent des résidus lysines et peuvent subir de multiples modifications séquentielles ou simultanées.

Bien qu'HDAC6 interagisse avec des protéines liées au processus d'ubiquitination et que l'hypothèse d'une participation de cette enzyme à l'établissement d'un lien entre acétylation et ubiquitination soit envisageable, ce mécanisme n'a pas encore été confirmé pour HDAC6 sur une protéine en particulier.

Un rôle supplémentaire pour le domaine fixant l'ubiquitine est décrit en 2003 et implique HDAC6 dans la prise en charge et le traitement des protéines ubiquitinées. Lorsque la quantité de ces protéines est trop importante, la cellule forme une structure péri-nucléaire appelée agrésome. HDAC6 est un acteur direct dans ces mécanismes car il fait le lien entre les protéines ubiquitinées et le moteur de dynéine acheminant et formant les agrésomes (Hideshima et al., 2005; Kawaguchi et al., 2003).
Cette fonction d'HDAC6 est possible car le domaine ZnF-UBP, très similaire à des déubiquitinases, n'a pas d'action isopeptidasique. Il sert uniquement de domaine d'interaction avec les protéines ubiquitinées pour permettre leur acheminement.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

L'implication d'HDAC6 dans les mécanismes d'activation des gènes HSPs apporte une fonction additionnelle au domaine fixant l'ubiquitine.
Dans sa participation à la réponse au stress thermique, HDAC6 devient un acteur indirect, mais tout de fois nécessaire, du devenir de la protéine HSF1 dans le contrôle de l'activation des gènes HSPs. La déacétylase est le "baromètre" dans la réponse au stress. L'hypothèse serait qu'elle participe à la fois à l'activation et au temps de réponse après un stress.

Les modèles de régulation de la réponse au choc thermique élaborés jusqu'à maintenant décrivent un mécanisme lié à la quantité de protéines mal-conformées présentes à l'intérieur de la cellule. Si une grande quantité de protéines dénaturées est augmentée d'une manière significative à cause d'un stress quelconque alors le pool de la protéine HSP90 en complexe avec HSF1, peut libérer ce facteur, et prendre en charge à la place les protéines mal-conformées (Voellmy, 2004). La réponse au stress est régulée par la quantité de protéines dénaturées uniquement.
A la vue des résultats obtenus dans l'article I, le mécanisme semble en réalité plus compliqué et fait également intervenir les protéines ubiquitinées. L'utilisation d'un mutant ponctuel d'HDAC6 sur son domaine liant l'ubiquitine n'a plus la capacité d'activer les gènes HSP25 après une exposition au stress thermique.
Le schéma envisagé serait que le mécanisme de régulation et de réponse au stress soit dépendant à la fois de la quantité de protéines mal-conformées et de celles ubiquitinées. Dans ce processus, HDAC6 apparaît comme un acteur nécessaire mais pas suffisant. C'est un contrôle supplémentaire mis en place dans la cellule pour réguler plus finement la réponse à un stress.

Intérêts de la participation d'HDAC6 dans la réponse au stress

Pour la cellule, les avantages de l'utilisation d'HDAC6 sont multiples.
Un tel système permet d'aboutir automatiquement à une réponse qui s'autorégule. Tant qu'il y a des protéines ubiquitinées, HDAC6 ne favorise pas le retour à l'état normal et inversement. Ceci indique qu'HSF1 ne revient pas dans le complexe répressif et peut activer de nouveau la transcription. Celle-ci est maintenue tant qu'HDAC6 est titrée par les protéines ubiquitinées.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

La réponse sera toujours proportionnée par rapport à l'intensité et à la durée du stress subi. C'est un avantage certain dans cette régulation car elle permet une réponse rapide, multiple et variée.
Simultanément pendant un stress, HSF1 est libéré et active les gènes HSPs, HSP90 exerce immédiatement son activité de chaperonne sur les protéines mal repliées et HDAC6 interagit avec les chaînes de polyubiquitines afin de protéger les protéines de la dégradation par le protéasome (données non publiées), ou d'aider à la formation des agrésomes si le système devient saturé en protéines ubiquitinées.
Ce modèle apporte également des éléments sur le mécanisme permettant l'observation une réponse rapide dans l'induction des gènes HSPs après l'augmentation de la quantité de protéines ubiquitinées dans la cellule (Lee and Goldberg, 1998; Stangl et al., 2002).

Différence avec le système de prise en charge des "protéines clientes"

Le système de prise en charge des" protéines clientes" semble très proche de celui utilisé pour réprimer HSF1 et dans les deux cas, HDAC6 participe à ce mécanisme (Kovacs et al., 2005).
Le dispositif s'avère similaire mais pas identique puisque dans le processus d'activation d'HSF1, l'absence d'HDAC6 n'influence pas le mécanisme d'activation des gènes HSPs. Or, dans la prise en charge des récepteurs aux glucocorticoïdes, si HDAC6 est absent, la maturation du récepteur est alors compromise à cause d'un défaut de fixation entre le récepteur et la protéine HSP90.

Localisation cytoplasmique d'HDAC6

Directement liée à sa spécificité de substrat, la régulation nucléocytoplasmique d'HDAC6 est un point important à considérer. Présente pour déacétyler des protéines dans le cytoplasme, l'enzyme HDAC6 dispose d'un système d'import et d'export nucléaire utilisant les protéines importines et exportines. A la différence des autres HDACs de la classe IIa, HDAC6 ne possède pas un mécanisme de rétention cytoplasmique impliquant la protéine 14-3-3.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Pourquoi existe-t-il un mécanisme supplémentaire dans la localisation cytoplasmique de hHDAC6 par rapport aux autres HDAC6 ?

La présence du domaine SE 14 dans la protéine humaine est un élément supplémentaire dans la régulation d'HDAC6. Il renforce sa localisation cytoplasmique malgré l'existence d'un système d'export nucléaire fonctionnel grâce aux deux séquences NES situées du coté N- et C-terminal (figure 4 et 6 de l'article II).

L'intérêt pour la cellule de maintenir la position cytoplasmique d'HDAC6 est double.
Dans un premier temps, il permet à la déacétylase d'être présente en plus grande quantité dans ce compartiment cellulaire et d'être immédiatement disponible pour ses activités catalytiques. Ceci favorise des interactions avec des substrats majoritairement cytoplasmiques.
Par exemple, l'α-tubuline acétylée, découverte comme substrat d'HDAC6, est une protéine exclusivement cytoplasmique (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002). De même, l'intervention d'HDAC6 dans sa participation lors d'un stress thermique doit être rapide de façon à éviter une issue défavorable voire létale pour la cellule. Sa position cytoplasmique permet instantanément la titration de l'enzyme par les protéines ubiquitinées et a pour conséquence de favoriser la libération du facteur HSF1 du complexe répressif de chaperonnes et co-chaperonnes situé dans le cytoplasme (voir article I).
Dans un deuxième temps, il a été montré qu'HDAC6 possède également une activité catalytique sur les histones. Il ne faut donc pas exclure que la présence continue d'HDAC6 dans le noyau peut avoir des conséquences sur les mécanismes finement contrôlés de régulation transcriptionnelle (dans la répression de certains gènes par exemple). Renforcer l'exclusion systématique de la protéine HDAC6 par un système supplémentaire de rétention cytoplasmique est un moyen efficace pour éviter toute interférence dans l'activation transcriptionnelle de certains gènes.

Intervention du domaine SE14 dans la rétention cytoplasmique

La localisation cytoplasmique de hHDAC6 est résistante au traitement à la leptomycine B. Le domaine répétitif SE14 est responsable de cette résistance et révèle qu'il est à la base d'un mécanisme additionnel dans la rétention cytoplasmique de l'enzyme.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

À la vue des résultats présentés dans l'article II, il est difficile de savoir comment ce domaine SE14 intervient dans cette rétention cytoplasmique.
Plusieurs hypothèses sont envisageables. La plus probable est qu'HDAC6 ne puisse plus se localiser dans le noyau parce que le domaine SE14 provoque une structure particulière ne permettant plus le passage de la membrane nucléaire. Ceci est corroboré par les résultats obtenus dans des expériences sur chromatographie par exclusion de taille (Fig. 2 de l'article II). Ces résultats indiquent que le domaine SE14 peut former une structure inhabituelle affectant l'agencement complet de hHDAC6 sans atteindre ses activités connues de déacétylation et de fixation d'ubiquitine (figures 3 et 4 de l'article II).

Une autre hypothèse serait que le contrôle de la localisation intracellulaire d'hHDAC6 puisse s'effectuée par l'interaction du domaine SE14 avec une protéine exclusivement cytoplasmique capable de retenir l'enzyme. En faveur de cette hypothèse, la construction contenant le domaine SE14 associée au peptide GFP montre en immunofluorescence une légère capacité à cibler les microtubules acétylés.
Cependant, la recherche d'un tel partenaire n'a pas aboutie. Il semble qu'aucune protéine ne soit associée à hHDAC6. Ceci n'exclut pas néanmoins un problème de détection dans les expériences pour découvrir ses partenaires.

Une dernière hypothèse à envisager serait que ce domaine intervient dans un processus actif. Il serait alors la cible d'une interaction avec une ou plusieurs protéines capables d'exporter HDAC6 du noyau vers le cytoplasme. Ce mécanisme serait indépendant de la protéine CRM1 et permettrait de renforcer la position cytoplasmique d'HDAC6 dans les cellules humaines. Effectivement, une construction exprimant la protéine GFP est légèrement localisée dans le noyau alors que l'addition du domaine SE14 à cette même protéine permet sa localisation dans le cytoplasme. Cette observation suggère que cette région pourrait intervenir dans un transport nucléocytoplasmique.
Dans le but d'élucider un tel mécanisme, il serait intéressant de réaliser un test double hybride en prenant le domaine SE14 comme appât afin de trouver des partenaires potentiels interagissant spécifiquement avec cette région.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Le domaine SE14 est-il présent dans d'autres protéines ?

Une recherche de protéines possédant la même région dans des banques de données a été réalisée, mais aucune séquence homologue significative du domaine SE14 n'a été retrouvée dans une autre protéine qu'hHDAC6. La structure primaire ne suffit pas à extraire une protéine en particulier et la structure tridimensionnelle est sûrement la clé de la découverte de ce même type de domaine chez d'autres protéines.
Les seules informations intéressantes sur ce domaine sont issues d'une recherche informatique indiquant la présence de sérines potentiellement phosphorylables par la caséine kinase II. Cette phosphorylation pourrait jouer un rôle dans la rétention cytoplasmique d'hHDAC6.

Les domaines déacétylases en tandem d'HDAC6

La présence d'un double domaine déacétylase chez HDAC6 est une des particularités remarquables de cette protéine. Assez conservés au cours de l'évolution, les domaines catalytiques ont un arrangement spatial primordial important pour l'activité déacétylase de cette enzyme.

Pourquoi deux domaines déacétylases dans une même protéine ?

La première idée survenant après la découverte de deux domaines déacétylases fonctionnels sur une même protéine est la notion d'un gain en productivité. Il est facilement envisageable de penser qu'après une seule interaction avec le substrat, deux réactions de déacétylation peuvent être réalisées simultanément.
Toutefois, la protéine HDAC6 n'apparaît pas comme une enzyme capable de déacétyler plus facilement les différentes lysines des queues N-terminales des histones : substrat potentiellement idéale car multi-acétylé.
Une activité enzymatique peut être décrite *in vitro* sur les histones acétylés mais celle-ci est moins importante en quantité et en spécificité de substrat que celle observée chez les HDACs de classe I (Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Une des hypothèses supplémentaires pour expliquer la présence de ces deux domaines déacétylases est liée à la découverte des autres substrats d'HDAC6 (exemples : l'α-tubuline acétylée et HSP90 acétylée). Le premier domaine catalytique agit plutôt sur un type de substrat alors que le deuxième agit sur un autre.
La protéine HDAC6 peut alors exercer une activité enzymatique sur plusieurs substrats sans perdre en spécificité (et ceci pour une même protéine). Les légères différences observées entre les domaines déacétylases 1 et 2 sont le signe d'une spécificité propre à chaque substrat et la découverte de nouveaux inhibiteurs comme la tubacine inhibant uniquement l'activité tubuline déacétylase va dans le sens de cette explication (Haggarty et al., 2003).

Dans la plupart des études décrites dans la littérature, il apparaît nettement que les domaines déacétylases ne sont pas uniquement des régions possédant une activité catalytique. Ce sont également des régions d'interaction avec d'autres protéines.
La séquence ER retrouvée dans les domaines HATs et HDACs est à la base des contacts histones-enzymes (Adachi et al., 2002), et les interactions entre HDAC6 et des protéines comme la β-tubuline, mDIA2, la dynéine, sont décelées uniquement sur les domaines déacétylases (Destaing et al., 2005; Kawaguchi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Ceux-ci ont donc une double fonction : ils sont capables à la fois d'avoir une activité enzymatique mais aussi de positionner correctement les différents substrats pour une activité et une spécificité optimale.

Les domaines fonctionnent-ils d'une manière dépendante ou indépendante ?

Les résultats obtenus par l'équipe de Stuart Schreiber lors de la découverte d'HDAC6 humaine décrivent une activité catalytique indépendante des deux domaines déacétylases. En d'autres termes, un domaine déacétylase peut fonctionner alors que le deuxième est inactivé.
Contrairement à ceux présentés dans l'article III, ces résultats ont été obtenus après des tests *in vitro* d'activité déacétylase sur des histones acétylés et vont à l'inverse des observations de plusieurs autres laboratoires.
Dans un premier temps, les mutants d'HDAC6 ne possédant qu'un seul domaine déacétylase ne disposent plus d'activité catalytique détectable (Zhang et al., 2003).
Deuxièmement, les expériences d'immunofluorescence utilisant les mutants ponctuels sur l'un ou l'autre des domaines montrent une perte complète de l'activité tubuline déacétylase.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Enfin, sans même toucher au site actif des deux domaines déacétylases, les expériences agissant sur la réduction ou l'augmentation de l'espace entre deux régions ont un effet drastique sur l'activité tubuline déacétylase d'HDAC6, suggérant ainsi que les deux domaines doivent être à la fois fonctionnels et bien positionnés dans l'espace.

Cette divergence de résultats est peut être liée à l'utilisation de mutants ponctuels différents entre les deux études.

Développement de nouveaux inhibiteurs

In vivo, les histones déacétylases se retrouvent le plus souvent en complexes afin d'exercer leur activité catalytique (voir introduction et discussion de l'article III). Dans un même complexe, la présence de deux HDACs correctement agencées est la clé d'une activité catalytique optimale sur les substrats.
Pour inhiber complètement et simultanément les activités des deux domaines catalytiques des HDACs retrouvées in vivo, il faudrait connaître leur arrangement spatial dans le complexe protéique. Cependant, cet objectif est ambitieux car il nécessite de cristalliser l'ensemble du complexe.
Or, dans le cas d'HDAC6, les deux domaines déacétylases sont présents sur la même protéine et leur arrangement dans l'espace est très important pour une activité déacétylase optimale. Ainsi, HDAC6 apparaît comme un excellent modèle pour le développement de nouvelles molécules capables d'interagir simultanément avec ces deux domaines déacétylases. Ces molécules pourraient ensuite être appliquées aux autres HDACs en complexes.
Facilement envisageable, ce genre d'inhibiteurs pourraient être construits à partir de molécules déjà utilisées (comme la TSA, la trapoxine ou la tubacine) liées par un groupement alkyl par exemple. Ces molécules auraient, à des concentrations minimes, une action spécifique sur HDAC6 et *in fine* sur tous les complexes d'HDACs connus présents *in vivo*.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

HDAC6 et le cytosquelette

Identifiée par plusieurs équipes de recherche, la première fonction d'HDAC6 décrite est sa participation dans la déacétylation de la lysine 40 de l'α-tubuline (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002; Zhang et al., 2003).
Cette activité sur la tubuline - et indirectement le rôle d'HDAC6 - est liée à la régulation du pool dynamique des microtubules et intervient dans la mobilité cellulaire.

Une des conséquences fonctionnelles d'une hypo ou d'une hyperacétylation des microtubules se traduit par une action sur la stabilité et le pool dynamique de ces microfilaments.
Dans leur étude, Matsuyama et ses collègues observent qu'une hyperacétylation des microtubules après un traitement à la TSA, réduit le taux de dépolymérisation des microfilaments après l'utilisation d'agents dépolymérisants. La déacétylation de l'α-tubuline par HDAC6 favorise le temps de désassemblage et régule la dynamique des microtubules (Matsuyama et al., 2002; Saji et al., 2005).
Cette notion de régulateur de la dynamique des microtubules est liée aux observations faites sur la mobilité cellulaire. Des fibroblastes surexprimant HDAC6 sont quatre fois plus mobiles que des cellules contrôles : cette déacétylase est impliquée dans le chimiotactisme et dans la migration cellulaire (Hubbert et al., 2002).
Toutefois, d'autres laboratoires ne partagent pas ces conclusions. le parallèle entre mobilité cellulaire, dynamique des microtubules et acétylation de la tubuline ne peut être directement établi (Maruta et al., 1986; Palazzo et al., 2003). Pour ces laboratoires, l'action d'HDAC6 sur la mobilité cellulaire est liée au degré d'acétylation de la tubuline mais n'est aucunement reliée à la formation de microtubules stables (Palazzo et al., 2003).

Cas de la protéine SIRT2

Brian North dans ses travaux sur SIRT2 a également montré que cette déacétylase de la classe III des HDACs est une tubuline déacétylase (North et al., 2003). Ces résultats semblent surprenants puisque sur des cellules KO pour la protéine HDAC6 ou sur des cellules traitées avec la TSA - inhibiteur des HDACs de classe I et II et mais pas de SIRT2 - une hyperacétylation de la tubuline est toujours observée. Ceci suggère qu'HDAC6 est la

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

principale tubuline déacétylase cellulaire. L'activité de la protéine SIRT2 est peut être minime par rapport à celle d'HDAC6 ou très activement réprimée dans les lignées étudiées. Il serait intéressant de voir si cette activité de tubuline déacétylase dépend de l'action de différentes drogues ou de différents stress.

Incidence sur des processus cellulaires

Le rôle d'HDAC6 via son activité catalytique sur la tubuline a des conséquences sur plusieurs systèmes cellulaires.
La première observation décrite est la fonction d'HDAC6, et indirectement de la tubuline acétylée, dans l'organisation de la synapse immunitaire (Serrador et al., 2004). De même, l'intervention de l'enzyme dans la maturation et le développement des ostéoclastes (article IV) et son implication dans l'infection du virus HIV-1 (Valenzuela-Fernandez et al., 2005) prouve que l'état de la tubuline acétylée contrôlé par HDAC6 peut avoir des incidences importantes dans ces processus cellulaires.

Lors de la maturation des ostéoclastes, l'interaction entre HDAC6 et mDIA2 permet de contrôler à la fois, le niveau d'acétylation des microtubules et l'organisation de l'actine. Cette notion de coopération, de lien entre les deux types de microfilaments semble émerger progressivement.

Effectivement, la protéine mDIA2 n'est pas la seule protéine de cette famille capable d'interagir avec HDAC6. Les travaux du laboratoire d'Alexander Bershadsky montrent que la protéine mDIA1 (de la même famille que mDIA2 : la famille des Formines) peut également interagir avec HDAC6.
Les caractéristiques majeures de mDIA1 et de l'ensemble de la famille des Formines restent leur capacité à interagir avec la protéine Rho activée et à contrôler la polymérisation de l'actine (Evangelista et al., 2003; Higgs, 2005; Zigmond, 2004).
Une protéine mDIA1 constitutivement active interagit avec HDAC6 et diminue l'élongation des microtubules. Cet effet est très lié à l'état des microfilaments d'actine et l'interaction est nécessaire pour moduler l'action de mDIA1 sur la croissance des microtubules.
Ces deux protéines sont la base d'un lien dynamique dans un nouveau mécanisme moléculaire complexe entre les filaments d'actines et les microtubules (ballestrem et al, soumis).

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Perspectives de recherche sur HDAC6

Il subsiste encore beaucoup d'interrogations sur le mécanisme d'intervention d'HDAC6 dans la réponse au stress thermique. Elles concernent notamment la découverte de la déacétylase capable d'agir d'une manière redondante à HDAC6, et la compréhension précise des étapes successives de prise en charge du facteur HSF1 dans l'induction et la récupération après un choc thermique. De plus, il reste à savoir si HDAC6 déacétyle une autre protéine du complexe répressif, comprendre l'effet de l'hyperacétylation d'HSP90 et évaluer clairement si l'induction d'HSP25 est un mécanisme dépendant d'HDAC6.
Grâce à l'utilisation de drogues spécifiques et au développement d'une grande variété d'outils moléculaires, la prospection de nouveaux substrats d'HDAC6 est une perspective de recherche envisageable à court terme qui permettrait d'aboutir à la découverte de nouvelles fonctions de cette déacétylase.

Les processus d'ubiquitination ne sont pas automatiquement liés à une action de dégradation par le protéasome. Cette modification post-traductionnelle, et particulièrement la monoubiquitination, intervient également dans le trafic vésiculaire (Welchman et al., 2005). Par le biais de son domaine ZnF-UBP capable de se fixer aux protéines monoubiquitinées, il serait intéressant d'évaluer le rôle d'HDAC6 dans les mécanismes d'endocytoses ou d'exocytoses.

La découverte de la structure cristallographique de cette protéine apporterait des données très précieuses qui permettraient d'aboutir à la compréhension des mécanismes d'action de cette enzyme et au développement de nouvelles drogues.
De plus, il faudrait éventuellement se focaliser sur les domaines déacétylases seuls ou en association avec des substrats ou sur le domaine ZnF-UBP en association avec l'ubiquitine dans le but de multiplier les résultats et comprendre son arrangement spatial.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Conclusion générale

Les travaux présentés ici ont permis de découvrir de nouveaux mécanismes de régulation et des fonctions inédites impliquant HDAC6.

Cette thèse décrit le rôle et la contribution d'HDAC6 dans la réponse au stress ; et plus particulièrement sa participation dans le complexe répressif de chaperonnes durant les processus de prise en charge du facteur HSF1.
Grâce à son domaine déacétylase et à son domaine liant l'ubiquitine, HDAC6 contribue aussi bien à l'exclusion d'HSF1 du complexe répressif lors d'un stress qu'à sa recapture durant la récupération cellulaire. Ainsi, HDAC6 détermine le temps de réponse après un stress.

L'examen plus approfondi de la séquence protéique a permis de mettre à jour un nouveau domaine nommé SE14 et des domaines importants dans l'export et l'import nucléaire chez hHDAC6. Retrouvée uniquement dans la protéine humaine, la région SE14 participe à la localisation cytoplasmique de l'enzyme. Sans toucher à l'activité déacétylase ou à la fixation de l'ubiquitine, elle renforce l'effet des séquences NES fonctionnelles.

Le mécanisme de déacétylation a également été élucidé de façon détaillée afin de comprendre comment HDAC6, seul membre des histones déacétylases possédant deux domaines catalytiques fonctionnels, peut exécuter la déacétylation de ses substrats.
Cette protéine a absolument besoin de ses deux domaines déacétylases fonctionnels pour déacétyler ses substrats. L'arrangement spatial de ses deux régions est également important pour accéder à l'activité catalytique optimale sur les histones ou la tubuline acétylées.

Finalement, HDAC6 participe dans le processus de maturation des ostéoclastes par le biais de son action sur la tubuline acétylée. En coopération avec mDIA2, l'activité enzymatique de la déacétylase est amplifiée par Rho permettant ainsi une régulation fine et une action concertée entre acétylation des microtubules et organisation de l'actine dans le développement ostéoclastique.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Conclusion générale

Tous les développements présentés dans ce travail de thèse renforcent l'idée que la protéine HDAC6 est une enzyme multifonctionnelle, finement régulée, essentielle dans des mécanismes où les processus d'acétylation et d'ubiquitination sont importants. La recherche de nouveaux substrats devrait aboutir à la découverte de nouvelles fonctions pour cette protéine. Fonctions qu'il reste à élucider.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Annexe

En annexe, un article publié dans "the Journal of Biological Chemistry"en octobre 2002.
Cet article est le résultat d'un travail effectué dans le laboratoire au cours d'un stage pré doctoral.

Titre : Contrôle de l'acétylation des protéines par la protéine transactivatrice Tat du HIV-1.

La protéine transactivatrice Tat du HIV-1 est une protéine régulatrice absolument nécessaire à la réplication et la progression du virus. L'activité transcriptionnelle de Tat sur le promoteur viral est étroitement régulée par des facteurs cellulaires comprenant, entre autres, des histones acétyltransférases (HAT). Nous avons étudié l'effet de Tat sur des histones acétyltransférases, et avons montré *in vivo* et *in vitro* que Tat inhibe de façon générale l'activité HAT de ces enzymes.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 277, No. 40, Issue of October 4, pp. 37955–37960, 2002
© 2002 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.
Printed in U.S.A.

Tat-controlled Protein Acetylation*

Received for publication, July 6, 2002, and in revised form, July 30, 2002
Published, JBC Papers in Press, August 1, 2002, DOI 10.1074/jbc.M206694200

Edwige Col‡, Benoit Gilquin‡§, Cécile Caron¶, and Saadi Khochbin¶

From the 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 Cedex, France

Human immunodeficiency virus, type 1-encoded transactivator protein Tat is known to be a substrate of and to interact with several nuclear histone acetyltransferases (HATs). Here we show that Tat is a general inhibitor of histone acetylation by cellular HATs and that for at least one of them, the CREB-binding protein (CBP), it induces a substrate selectivity. Indeed, in the presence of Tat, the acetylation of histones by CBP was severely inhibited, while that of p53 and MyoD remained unaffected. The C-terminal domain of Tat, dispensable for the activation of viral transcription, was found to be necessary and sufficient to interfere with histone acetylation. These results demonstrate that Tat is able to selectively modulate cellular protein acetylation by nuclear HATs and therefore to take over this specific signaling system in cells.

Recent investigations have shown that HIV[1]-encoded transactivator protein Tat targets at least five different nuclear histone acetyltransferases (HATs) (1–5). Depending on the nature of the HAT involved, this interaction may have different functional consequences. In the case of Tip60 and $TAF_{II}250$, Tat seems to inhibit their HAT activity and consequently modulate the expression of cellular genes (5, 6). When it interacts with P/CAF, p300/CBP and GCN5, an increase in the transactivator potential of Tat on the HIV-1 LTR has been observed. In this latter case, it has also been shown that Tat is itself a substrate for these HATs (2, 7–9). Indeed, GCN5 and p300/CBP can acetylate Tat on its lysines 50 (Lys^{50}) and 51 (Lys^{51}) while P/CAF acetylates the viral protein on its lysine 28 (Lys^{28}). The acetylation of these specific lysines on Tat seems to create a signal, which helps Tat in its diverse activities. The acetylation of Lys^{28} of Tat by P/CAF enhances its interaction with the positive transcription elongation factor complex b (8). The Tat-mediated recruitment of positive transcription elongation factor complex b and its interaction with the transactivation-responsive region (TAR) RNA enhance the processivity of the RNA polymerase II elongation complex leading to a considerable increase in viral RNA production (reviewed in (10)). The acetylation of Lys^{50} leads to the dissociation of Tat from TAR (reviewed in Ref. 11). Moreover, it has recently been shown that the acetylation of Lys^{50} of Tat creates a strong binding site for the P/CAF bromodomain (12, 13). In this case, the bromodomain of P/CAF effectively competes with the TAR RNA and helps the removal of Tat from TAR. The acetylation of different lysines of Tat therefore appears to create a code reminiscent of the histone code (14, 15), finely regulating the activity of the protein. Although the functional significance of Tat acetylation is relatively well understood, the consequence of the interaction of Tat with different HATs on their activities remains obscure.

Here we investigated this issue and found that Tat is a general inhibitor of histone acetylation by the cellular HATs. We have also found that in at least one case, that of CBP, Tat controls the choice of its potential substrates. Our data show that Tat, while remaining a substrate for these HATs, inhibits the acetylation of histones but not that of other specific cellular factors. The C-terminal part of Tat was found to be responsible for the selective inhibition of the HAT activity of GCN5 and CBP. These data strongly suggest that Tat largely uses the cellular acetylation signaling system to enhance the viral gene expression and to modulate that of some cellular genes.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid Constructs—Gal4-GCN5 fusion construct was prepared by cloning the coding sequence of GCN5 generated by PCR and digested by *Eco*RI and *Xba*I restriction enzymes in pcDNA-Gal4 digested by the same enzymes. Primers used were: 5′-GCGAATTCATGCTGGAGGAGGAGATCTATGG-3′ (5′ primer) and 5′-GACCTCTAGACTACTTGTCAATGAGGCCTCCC-3′ (3′ primer). GST-Tat M6 and M7 fusion constructs were prepared by cloning the coding sequence of Tat mutants in pGEX5X3 vector as follows. Tat mutants (M6 = 67–101 and M7 = 87–101) were produced by PCR using appropriate primers: 5′-GGGGATCCCAGCTTCTCTATCAAAGCAACC-3′/5′-GGGGATCCCATCGAAGAAGAAGGTGGAGAG-3′ (5′ primers for M6 and M7 respectively) and 5′-GGAATTCTAATCGAACGGATCTGTCTC-3′ (3′ primer). PCR products were digested by *Bam*HI (for 5′ end) and *Eco*RI restriction enzymes and cloned in pGEX5X3 vector digested by the same enzymes. Tat M6 and M7 constructs were prepared by cloning the coding sequence of Tat mutants in pcDNA vector as follows. Tat mutants (M6 = amino acids 67–101 and M7 = amino acids 87–101) were produced by PCR using the appropriate primers: 5′-GGGGAAGCTTACCATGGCTTCTCTATCAAAGCAACCC-3′/5′-GGGGAAGCTTACCATGGAATCGAAGAAGAAGGTGGAG-3′ (5′ primers for M6 and M7, respectively) and 5′-GGAATTCTAATCGAACGGATCTGTCTC-3′ (3′ primer). PCR products were digested by *Hin*dIII (for 5′ end) and *Eco*RI and cloned in pcDNA digested by the same enzymes.

In Vitro Acetylation—HAT assays were performed as described previously (6) by incubating recombinant HATs with their substrate as mentioned in the legends of the figures, in a 40-μl reaction buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 10% glycerol, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and 0.1 μCi of [^{14}C]acetyl-CoA). Protein acetylation was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography or by "filter binding method": reactions were loaded on filter paper pieces, washed three times with 50 mM $NaHCO_3$/Na2CO3,

* This work was supported by an Agence Nationale de Recherches sur le SIDA postdoctoral fellowship (to E. C.) and by the Sidaction contract AO10-1 (to S. K.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ These two authors contributed equally to this work.

§ Recipient of a fellowship from the "Ligue Nationale Contre le Cancer, Comité de l'Isère."

¶ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-4-76-54-95-83; Fax: 33-4-76-54-95-95; E-mail: khochbin@ujf-grenoble.fr or cecile.caron@ujf-grenoble.fr.

[1] The abbreviations used are: HIV, human immunodeficiency virus; HAT, histone acetyltransferase; CREB, cyclic AMP response element-binding protein; CBP, CREB-binding protein; GST, glutathione *S*-transferase; TAR, trans-activation responsive; LTR, long terminal repeat; aa, amino acids; TSA, trichostatin A.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

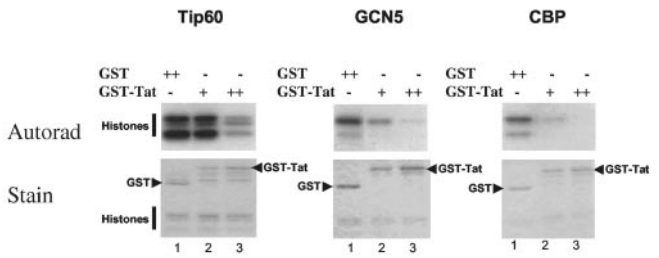


FIG. 1. **Tat interferes with the HAT activity of Tip60, GCN5, and CBP *in vitro*.** *In vitro* HAT assays were performed by incubating purified total histones (0.33 μM) and [^{14}C]acetyl-CoA, with recombinant Tip60 (*left*), GCN5 (*middle*), or CBP (*right*) and with 450 nM recombinant purified GST or increasing amounts of GST-Tat: 150 or 300 nM (+ and ++, respectively). Histone acetylation was analyzed on a 14% SDS-PAGE (the Coomassie Blue-stained gel is shown in the *lower panels* and the corresponding autoradiography in the *upper panels*).

pH 8.5, dried, and counted in scintillation liquid. *In vitro* acetylation using HeLa nuclear extracts was performed as follows: 25 μg of HeLa nuclear extracts (*in vitro* transcription grade, Promega) were incubated with 0.1 μCi of [^{14}C]acetyl-CoA, 1.5 μM purified histones, and 50 ng/ml of trichostatin A (TSA), in the presence of indicated amounts of either GST or GST fused to wild type Tat or Tat mutants. After 30 min at 30 °C the reaction was stopped by the addition of SDS-PAGE loading buffer, and histone acetylation was analyzed by autoradiography. The same amounts of HeLa nuclear extracts and GST or GST-Tat were used to monitor kinase activity in the extracts and the histones in the presence of 2 μCi of [γ-^{32}P]ATP in a buffer, pH 7.3, containing 80 mM β-glycerophosphate, 20 mM EGTA, 15 mM $MgCl_2$, and 1 mM dithiothreitol.

Action of Tat on Jurkat Cells—Jurkat cells, seeded at 5.10^5 cells/ml, were incubated for 20 h with 100 nM GST or GST-Tat and treated 6 h with TSA (50 ng/ml). The cells were then pelleted, washed in PBS, and sonicated in SDS-PAGE loading buffer. Equivalent amounts of extracts were used to obtain a Western blot, which was then probed with an anti-acetylated histone H4 antibody (Upstate Biotechnology).

Gene Reporter Assays—HeLa cells were transfected by calcium phosphate co-precipitation method, with reporter plasmids pGal4-luciferase and p-renilla-luciferase (as an internal control), and expression vectors for Gal4-HATs and Tat as indicated in the legends of Figs. 3 and 6. Luciferase activities (firefly and renilla) were measured on HeLa extracts using a dual luciferase reporter assay system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase values were normalized with respect to renilla luciferase values.

GST Pull-down Assays—GST and GST-Tat fusion proteins were produced in *Escherichia coli* BL21 strain as described previously (2) and retained on glutathione-Sepharose beads. Beads were incubated (1 h, 4 °C) with 100 μl of a buffer (20% glycerol, 3 mM $MgCl_2$, 50 mM Hepes, pH 7.9, 250 mM KCl, 0.1% Nonidet-P40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μM acetyl-CoA) containing 5 μg of purified, recombinant GCN5. After three washes in the same buffer, complexes were recovered in gel loading buffer and resolved by polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were then revealed by Western blot using anti-His antibody (Qiagen).

RESULTS

Tat Inhibits the HAT Activity of CBP and GCN5—An *in vitro* HAT assay was set up using recombinant GCN5 and CBP, in the presence of GST or increasing amounts of GST-Tat. Tip60, whose HAT activity was previously shown to be inhibited by Tat (6), was used as a control. Fig. 1 shows that GST-Tat, but not GST, greatly reduced the HAT activity not only of Tip60 but also of GCN5 and CBP (*Autorad panels*). These results suggested that Tat could be a general inhibitor of histone acetylation by nuclear HATs. These data also suggest that Tat may have a dramatic effect on general histone acetylation and prompted us to investigate the effect of Tat on histone acetylation *in vivo* and *in vitro*.

General Inhibition of HAT Activity by Tat in Vivo and in Vitro—To investigate whether Tat was capable of interfering with the general cellular HAT activity, a series of experiments was set up. Purified GST-Tat, capable of entering cells, was incubated overnight with Jurkat cells. Cells were then treated 6 h with TSA to inhibit histone deacetylases, and the level of histone acetylation was monitored in the total cell extracts using an anti-acetylated H4 antibody. Fig. 2*A* shows that in the presence of Tat, the level of *in vivo* TSA-induced histone acetylation was significantly lower than that observed in the control

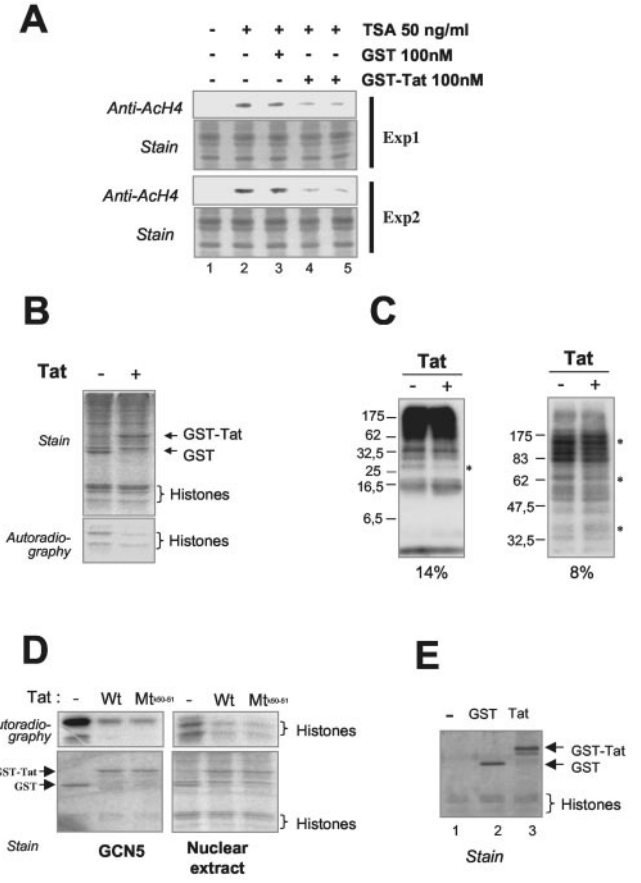


FIG. 2. **Tat interferes with general HAT activity *in vivo* and *in vitro*.** *A*, Tat represses TSA-induced histone H4 acetylation *in vivo*. Jurkat cells were incubated with 100 nM purified GST or GST-Tat. The cells were treated with 50 ng/ml of TSA for 6 h and then lysed. Histone H4 acetylation was monitored using a specific anti-acetylated histone H4 antibody (*anti-AcH4 panel*). The amount of histones in each extract is also shown (*Stain panel*). The results of two independent experiments are shown (*Exp1* and *Exp2*, respectively). In each experiment, the treatment with GST-Tat was performed in duplicate (*lanes 4* and *5*, respectively). *B*, Tat represses general HAT activity *in vitro*. 25 μg of HeLa nuclear extracts were incubated with 450 nM GST or GST-Tat (300 nM) (− and + Tat, respectively) in the presence of [^{14}C]acetyl-coA and 1.5 μM purified histones. A fraction of the reaction was run on a gel that was then stained (*Stain panel*) and dried, and histone acetylation was visualized after autoradiography (*Autoradiography panel*). The position of GST, GST-Tat, and histones is indicated. *C*, Tat does not interfere with the general kinase activity in the HeLa nuclear extracts. 25 μg of HeLa nuclear extracts were incubated with [γ-^{32}P]ATP and purified histones, and protein phosphorylation was monitored in the presence of 450 nM GST (−) or 300 nM GST-Tat (+) by autoradiography as above. Two different gels were run (14 and 8% SDS-PAGE) to visualize most of the phosphorylated proteins. *Asterisks* indicate the Tat-dependent variation of protein phosphorylation. *D*, Tat mutated at lysines 50 and 51 (Mt k50–51) is capable of inhibiting histone acetylation by GCN5 or by HATs of HeLa nuclear extracts. Histone acetylation by recombinant GCN5 or by HATs in HeLa nuclear extracts was monitored in the presence of GST (−) or GST-wild type or GST-mutated Tat as described above by autoradiography (*Autoradiography panel*). The position of the added proteins is indicated (*Stain panel*). *E*, Tat does not show a specific histone binding activity in the HAT assay conditions. Glutathione beads (−) or beads covered by GST (*GST*) or GST-Tat (*Tat*) were incubated with purified histones (0.33 μM) in the HAT buffer containing cold acetyl-CoA, and retained histones were analyzed by SDS-PAGE. The panel shows the Coomassie-stained gel.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

cells (two independent experiments are shown, *Exp1* and *Exp2*, respectively). These experiments strongly suggested that Tat was also capable of inhibiting the nuclear HAT activity *in vivo*. The inhibition of general HAT activity by Tat was also confirmed *in vitro*. HeLa nuclear extracts, competent for *in vitro* transcription and rich in HAT activity, were used to evaluate the ability of Tat to interfere with the general HAT activity present in the extract. The extracts were incubated with [^{14}C]acetyl-CoA and purified histones in the presence of either recombinant GST-Tat or GST as a control. Fig. 2*B* shows that Tat interfered with the acetylation of histones by the nuclear HATs present in the extract. To show that this action of Tat was specific on the HATs and not on another unrelated enzymatic activity present in the extract, we tested the effect of Tat on global kinase activity by incubating the extract with [γ-^{32}P]ATP and either GST or GST-Tat (Fig. 2*C*). Interestingly, Tat seemed to activate or repress the phosphorylation of a few proteins present in the extract but there was no global inhibition of the kinase activities on the nuclear proteins in the presence of Tat. These experiments support the notion that the repression of histone acetylation by Tat is due to a specific action of the viral protein on the nuclear HATs present in the extract. To rule out the possibility of artifacts, we designed two additional experiments. First, Tat is itself a substrate of several HATs including GCN5 and CBP. One could argue that Tat would compete with the histones for acetylation by the HATs and therefore inhibit histone acetylation. To exclude this possibility, we tested the HAT inhibitory effect of a Tat mutated on lysines 50 and 51, the target lysines of both GCN5 and CBP, and compared it with the inhibitory effect of a wild type protein. Fig. 2*D* shows that this mutant inhibits the HAT activity of GCN5 (*left panel*) as well as that present in HeLa nuclear extracts (*right panel*) as efficiently as the wild type Tat. This result suggests that Tat does not inhibit histone acetylation through a substrate-based competition mechanism. Another reason for the repression of HAT by Tat could be the histone masking effect of Tat. Indeed, a Tat-histone interaction might hinder the access of the enzyme to the histones. This is very unlikely, because in cells or in nuclear extracts, the nonspecific binding of hundreds of other nuclear proteins with Tat would greatly reduce this nonspecific binding of Tat to histones. Nevertheless, to completely exclude this artifact, the interaction of Tat with histones under our HAT assay conditions was investigated. Fig. 2*E* shows that histone retention is comparable between GST and GST-Tat and is also identical to the background level of interaction of histones with Sepharose beads alone (*lane 1*). This experiment rules out the involvement of histone binding by Tat in inhibiting nuclear HAT enzymatic activity.

Tat Interferes with the HAT-dependent Transcriptional Activation in Vivo—Considering these data, we also predicted that Tat should interfere with the HAT-dependent transcriptional activation *in vivo*. To test this hypothesis, we took advantage of the fact that the HAT activity of CBP and P/CAF is directly involved in the activation of transcription when these enzymes are targeted to a promoter (16). Vectors encoding parts of CBP, P/CAF, or GCN5, including their HAT domain, fused to the DNA-binding domain of Gal4 were co-transfected with a reporter plasmid containing five Gal4-binding sites cloned upstream of the thymidine kinase promoter controlling the expression of a luciferase gene (Fig. 3*A*). As expected, compared with the Gal4-DNA-binding domain alone, the transcription of the reporter gene was activated by the HAT domain of CBP (Fig. 3*B*, compare *lanes 4* and *5*) and to a lesser extent by that of P/CAF and GCN5 (compare *lane 7* with *lane 8* and *lane 10* with *lane 11*). The co-expression of Tat significantly decreased

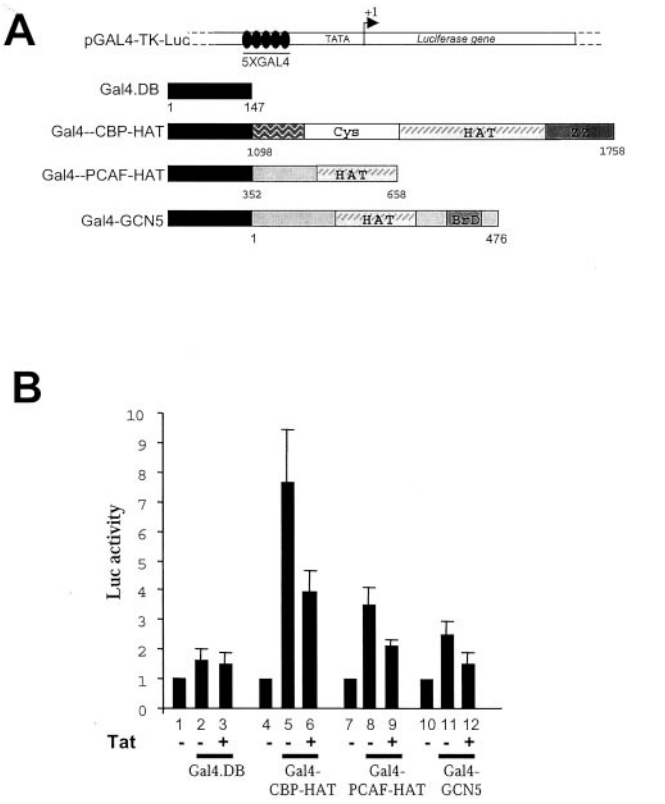


FIG. 3. **Tat interferes with the transcriptional activation by CBP, P/CAF, and GCN5 *in vivo*.** *A*, schematic representations of the reporter gene and the expression vectors used are shown. Gal4.DB represents the 147-amino acid DNA-binding domain of yeast GAL4 transcription factor. The indicated regions of CBP, P/CAF, and GCN5 were fused to the Gal4.DB. *Cys* and *ZZ* indicate putative zinc finger domains of CBP and *BrD* the bromodomain of GCN5. *B*, HeLa cells were co-transfected with 1 μg of the reporter plasmids pG4-TK-luc (containing five Gal4-binding sites cloned upstream of the thymidin kinase promoter) and p-renilla-luc (also driven by thymidin kinase promoter) as an internal control, 200 ng of expression vectors for the indicated Gal4-HAT fusion proteins, or Gal4-DNA-binding domain (Gal4.DB) alone in the absence or presence of 200 ng of the Tat expression vector (pCMV-Tat). The total amounts of DNA in each transfection were maintained constant by addition of empty control vector. Luciferase activities were measured and normalized with respect to that of renilla luciferase. Mean values of at least four independent assays are represented.

this transcription activation. From these experiments we conclude that Tat is capable of inhibiting the activity of CBP, P/CAF, and GCN5 *in vitro* as well as *in vivo*.

Tat Induces a Substrate Selectivity for CBP—Since several HATs have been shown to acetylate substrates other than histones, we also monitored the effect of Tat on the protein acetyltransferase activity of these enzymes. CBP appeared as a good candidate because it specifically acetylates several transcription factors such as MyoD (17) and p53 (18) in addition to histones. Purified p53 and histones were used as substrates for bacterially expressed CBP in the presence of GST alone or GST-Tat. Fig. 4*A* shows that CBP can efficiently acetylate both histones and p53 (Fig. 4*A*, *lanes 2* and *3*). The addition of GST-Tat specifically inhibited the acetylation of histones while that of p53 remained unaffected (Fig. 4*A*, *lanes 4* and *5*). The ability of CBP to acetylate MyoD in the absence and presence of Tat was also tested. Here again, while Tat efficiently inhibited histone acetylation, it slightly affected the ability of CBP to acetylate MyoD (Fig. 4*A*, *lane 7*). A mixture of p53 and MyoD remained acetylated by CBP in the presence of Tat, while the acetylation of histones was dramatically reduced (Fig. 4*A*, *lane 9*). Finally, we have also shown that, while Tat inhibits histone

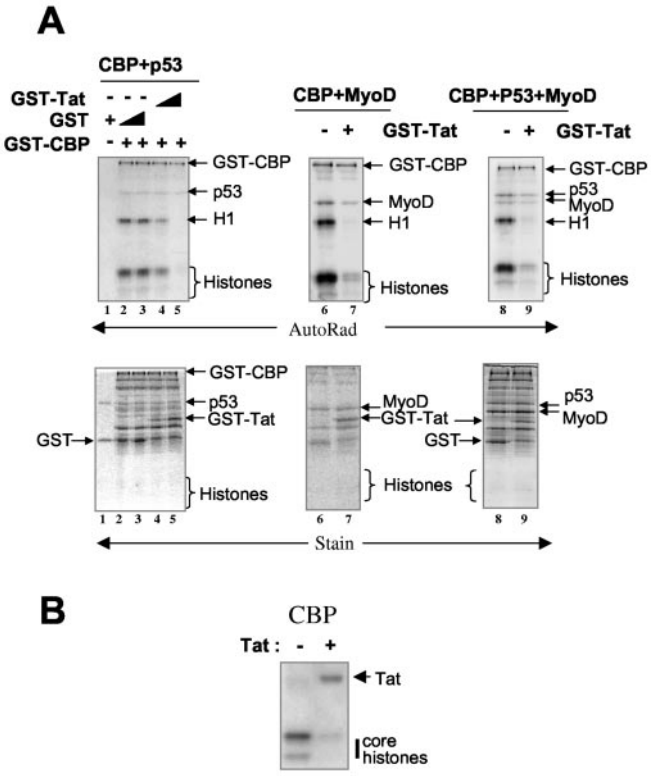


FIG. 4. **Tat induces a substrate selectivity for CBP.** *A*, Tat inhibits histone acetylation but not p53 and MyoD acetylation by CBP. *In vitro* HAT assays were performed by incubating 165 nM total histones, 75 nM recombinant p53, in the presence of increasing amounts of GST or GST-Tat (75 and 150 nM, respectively). The acetylation of MyoD (180 nM) and of a mixture of p53 and MyoD (150 nM p53 and 180 nM MyoD) was also measured in the presence of GST or GST-Tat (130 nM). *Lane 1* shows a mixture of GST and p53 incubated with labeled acetyl-CoA in the absence of CBP. Acetylation of histones, p53, and MyoD were analyzed on 14% SDS-PAGE by autoradiography (*upper panels*: *Autorad*). The stain panel shows the position of the various proteins used. *B*, Tat inhibits histone acetylation by CBP but not its own acetylation. Core histone (165 nM) and Tat acetylation by CBP was monitored in the presence of 130 nM GST (−) or the same amount of GST-Tat (+). Acetylation of histones and GST-Tat was analyzed on 14% SDS-PAGE by autoradiography.

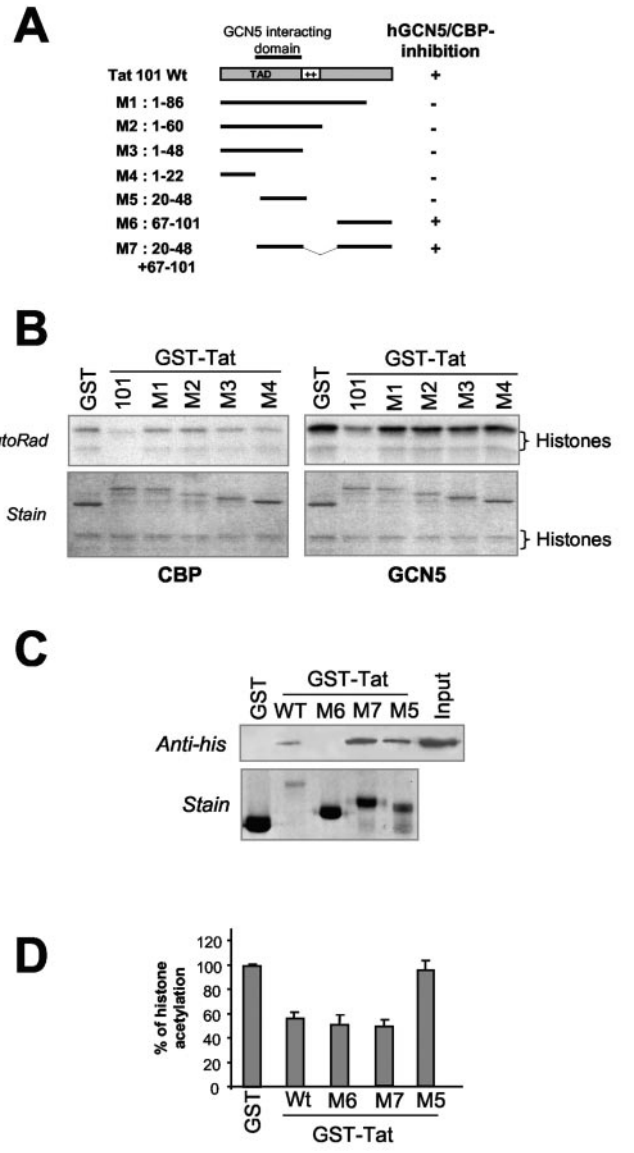


FIG. 5. **The C-terminal domain of Tat is necessary and sufficient to inhibit GCN5 and CBP HAT activity *in vitro*.** *A*, schematic representations of Tat wild type (*WT*) and deletion mutants used are shown. *TAD* indicates the minimal transactivating domain. "++" indicates the RNA-binding positively charged basic residues. The region responsible for the interaction with GCN5 is also indicated. *B*, Tat C-terminal domain is required for the inhibition of CBP and GCN5 HAT activities. *In vitro* HAT assays were performed as described in the legend of Fig. 1 with recombinant HATs, GCN5 (*right panel*), and CBP (*left panel*) in the presence of GST-Tat wild type (*101*) or mutants M1–M4. Histone acetylation level was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (*upper panels*). Coomassie-stained gels (*lower panels*) show the quantities of histones and GST or GST-Tat derivatives used in each assay. *C*, the inhibitory C-terminal domain of Tat does not stably interact with GCN5. A GST pull-down was performed on His-tagged recombinant GCN5 incubated with the glutathione beads covered with GST (*GST*) or with GST fused to wild type Tat or to the indicated Tat mutant (see *A*). The retained His-GCN5 was visualized by an anti-His antibody (*Anti-his panel*). The stained gel shows the amount of GST and GST fusion proteins used in each pull-down experiments. Input lane shows 10% of the His-GCN5 used in each pull down. *D*, the C-terminal domain of Tat but not its GCN5-interacting domain is necessary for the inhibition of GCN5 HAT activity. *In vitro* HAT assays were performed with recombinant GCN5-HAT domain in the presence of GST or GST-Tat wild type (*WT*) or mutants M5, M6, and M7 as indicated. The acetylation of histones was analyzed by filter binding assay. The mean values of three experiments are represented.

acetylation by CBP, it does not interfere with its own acetylation by this enzyme (Fig. 4*B*). These data suggest that in the presence of Tat, CBP is able to discriminate between its potential substrates.

The C-terminal Domain of Tat Is Necessary and Sufficient to Inhibit Histone Acetylation by GCN5 and CBP—To have a better insight into the mechanism involved in the Tat-dependent inhibition of histone acetylation by CBP and GCN5, *in vitro* tests were first used to map the regions of Tat mediating this inhibitory activity. A series of recombinant Tat deletion mutants were tested for their effect on the HAT activity of CBP and GCN5 in an *in vitro* assay (Fig. 5*A*). The results obtained with mutants M1 to M4, harboring progressive C-terminal deletions, showed that a deletion of the C-terminal 86–101 amino acids of Tat (M1 mutant) completely abolished the repression of GCN5 and CBP HAT activities by Tat (Fig. 5*B*). The C-terminal domain of Tat seems then involved in the inhibition of these HATs. However, we had shown previously that this domain was dispensable for the Tat-GCN5 interaction and that the amino acids 20–48 region of Tat was necessary and sufficient to interact with GCN5 (2). To characterize more precisely the respective role of the GCN5-interacting (aa 20–48) and the C-terminal (aa 67–101) domains of Tat in its interaction with GCN5 and in the inhibition of the GCN5 HAT activity, a series

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

of GST-Tat mutant proteins was produced. These mutants are: M5, containing aa 20–48 region of Tat (GCN5-interacting domain); M6, aa 67–101 (HAT inhibitory domain); and M7, aa 20–48 fused to 67–101 (Fig. 5*A*). A GST pull-down assay confirmed the interaction between Tat aa 20–48 (M5) and GCN5 (Fig. 5*C*). A construct containing the C terminus of Tat fused to the GCN5-interacting domain also interacted efficiently with GCN5 (Fig. 5*C*, *M7*). Interestingly, the C-terminal inhibitory domain of Tat did not show any stable interaction with GCN5 (Fig. 5C, M6). A quantitative HAT assay was performed using the GCN5 HAT domain and the GST-Tat mutants described above were tested for their inhibitory effects on histone acetylation by GCN5. Surprisingly, we found that the C-terminal domain of Tat was as efficient as the full-length protein in inhibiting GCN5 (Fig. 5*D*, compare *M6* to *WT*) and that the fusion of the GCN5-binding domain of Tat to this inhibitory domain did not increase the inhibition of histone acetylation by GCN5 (Fig. 5*D*, *M7* mutant). The GCN5 interaction domain of Tat alone could not inhibit histone acetylation by GCN5 (Fig. 5*D*, *M5* mutant). Taken altogether, these results show that the C-terminal domain of Tat, which is not involved in a stable interaction with GCN5, is necessary and sufficient to repress the HAT activity of GCN5.

The Repression of Histone Acetylation by Tat Is Not Required for the Tat-dependent Activation of Transcription from HIV-1 5′ LTR—The *in vivo* Gal4 targeting test was also used to evaluate the role of the Tat C-terminal domain in interfering with the activities of CBP, P/CAF, and GCN5. Interestingly, *in vivo* a larger deletion of the C-terminal domain of Tat was necessary to relieve the repressive activity of Tat than *in vitro*. Indeed, while the full-length Tat and M1 mutant (aa 1–86) repressed the transcriptional activity of CBP, Tat M2 mutant (aa 1–60) was unable to interfere with the CBP activity (Fig. 6*A*, compare *lane 5* with *lanes 3* and *4*). However, for P/CAF and GCN5, the *in vivo* results approached those obtained *in vitro*, since the M1 mutant of Tat was not as efficient as the full-length protein in repressing the activity of these enzymes (Fig. 6*A*, compare *lanes 9* and *14* with *lanes 8* and *13*, respectively). We could also show that in these experiments both M1 and M2 mutants were as efficient as the wild type Tat in inducing HIV-1 LTR transcriptional activity (Fig. 6*B*). These data demonstrate that the two mutants are efficiently produced and, most importantly, that the capacity of Tat to repress histone acetylation by the nuclear HATs is not required for and does not interfere with the Tat-dependent activation from HIV-1 LTR.

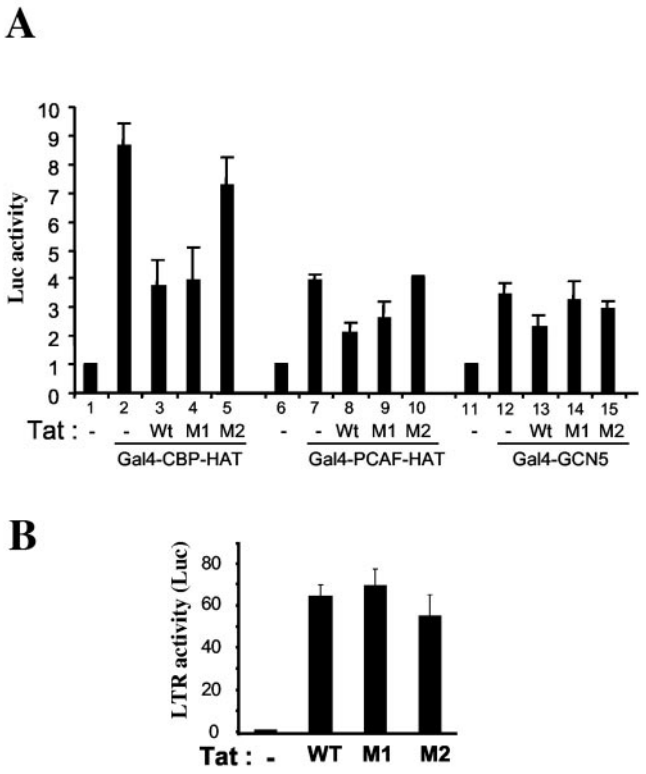


FIG. 6. *A*, the C-terminal domain of Tat is necessary to repress HAT-dependent transcriptional activation *in vivo*. Gene reporter assays were performed as described in the legend of Fig. 1*C* by co-transfecting reporter plamids pG4-TK-Luc, the internal control p-renilla-luc, and 200 ng of expression vector for Gal4-HATs fusion proteins and 200 ng of expression vectors (pCMV-Tat) encoding either wild type (*WT*) Tat or mutants (*M1* and *M2*). The mean values of at least three independent assays are represented. *B*, the Tat-dependent repression of cellular HATs is not involved in the activation of HIV-1 LTR. HeLa cells were co-transfected with 50 ng of reporter plasmid pLTR-Luc (luciferase gene under LTR control), 0 or 10 ng of the Tat wild type, capable of repressing cellular HAT activities, or M1 and M2 mutants, not efficient in inhibiting HATs. Total amounts of DNA for transfections were maintained constant by addition of empty control vector. Luciferase activity was measured and normalized as indicated above. Mean values of at least three independent assays are represented.

DISCUSSION

The recent literature strongly suggests that HIV-1 encoded transactivator, Tat, largely uses the acetylation signaling system to optimally accomplish its various functions. The most studied aspect of this phenomenon is the gain of function by Tat on the HIV LTR, consecutive to its interaction with HATs or to its acetylation. However, Tat seems to also modulate the activity of the cellular HATs, which may in turn control many cellular events regulated by protein acetylation. The present study strengthens this hypothesis by showing the inhibitory effect of Tat on the histone acetyltransferase activity of three specific HATs: Tip60, CBP, and GCN5. Moreover, the general action of Tat on the cellular HATs was further confirmed by demonstrating that Tat could specifically inhibit the use of histones as substrates by these HATs *in vitro* as well as *in vivo*. Indeed, Tat is not a mere inhibitor of the catalytic activity of these cellular HATs but is capable of conferring them a substrate specificity. This phenomenon was clearly demonstrated in the case of CBP, which showed a selective inhibition of histone acetylation compared with the non-histone substrates, p53 and MyoD. These observations suggest that Tat may block the access of histones but not of other substrates to the catalytic site of CBP. This hypothesis predicts not only that the inhibitory action of Tat would be dependent on the structure of the substrate but also that Tat may induce a change in the conformation of the targeted enzyme. A modification of the conformation of CBP/p300 by the Tat had also been suggested, since the HAT had a better interaction with the basal transcription factors TBP and TFIIB in the presence of Tat peptide 41–45 (7). Interestingly, this Tat-induced change of conformation may as well be involved in a better recognition of certain substrates by p300/CBP, since in the presence of Tat, the enzyme efficiently acetylates the p50 subunit of NF-kB (19). Our investigations show that the C-terminal domain of Tat is involved in the control of the enzymatic activity of the targeted HATs. The same domain has been shown to be involved in the inhibition of histone acetylation by $TAF_{II}250$ (5). Interestingly, in this case also, the C-terminal inhibitory region of Tat interacted with a much lower affinity with $TAF_{II}250$ than the aa 18–36 region of Tat (20).

Deng and colleagues (7) have recently reported that Tat had no effect on the acetylation of free histone H4 by p300/CBP. This apparent discrepancy with the results presented here can be explained by our demonstration of the specific involvement of the 15 C-terminal amino acids of Tat in the inhibition of

histone acetylation by CBP and GCN5. Indeed, in their studies these authors used a Tat lacking these critical 15 amino acids of Tat 101, which were shown here to be necessary for the inhibition. Interestingly, our data also show that the inhibition of the cellular HAT activity by Tat is not involved in the capacity of Tat to stimulate transcription from HIV-1 5′ LTR. Indeed, M2 Tat mutant lacking the C-terminal HAT-repressor domain is as efficient as the wild type Tat in inducing transcription from the HIV-1 LTR. This observation suggests that the Tat-dependent inhibition of cellular HAT aims at the modulation of cellular gene expression rather than directly controlling viral gene transcription.

The ability to induce a general inhibition of histone acetylation has also been reported for several specific viral proteins. Indeed, Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus-encoded protein, v-IRF, directly interacts with p300 and suppresses its enzymatic activity on histones, leading to a hypoacetylation of histones H4 and H3 *in vivo* (21). p300 is also the target of Epstein-Barr virus-encoded protein EBNA3C. The interaction of the viral protein with p300 leads to the inhibition of p300 HAT activity and consequently to histone hypoacetylation also *in vivo* (22). A hypoacetylation of histone H4 is also induced by the bovine herpes virus-1 VP22 protein (23). However these studies have not investigated whether, like Tat, these viral proteins were capable of inducing a substrate selectivity.

The Tat-induced HAT substrate selectivity described here is not unique, since several papers have also reported that the adenovirus-encoded protein E1A is capable of directly modulating the catalytic activity of several HATs. For instance, in the cases of p300/CBP and P/CAF, E1A not only modulates histone acetylation (24–28) but also, like what was reported here for HIV-1 Tat, induces a substrate selectivity (27, 29). Indeed, interestingly, a concentration of E1A able to induce an *in vitro* acetylation of histones and MyoD by p300/CBP inhibits the acetylation of transcription factors TR/RXR, TFIIEβ, and TFIIF/Rap74 (27). E1A also inhibits the p300-mediated acetylation of the transcriptional activators p53 (25, 29) and E2F (29), as well as that of the high mobility group proteins HMG I/Y and HMG 14 (28). Considering the data presented here, we postulate that many viruses could have developed the capacity to target the cellular HATs and take over the acetylation signaling in infected cells to successfully accomplish their life cycle.

Acknowledgments—We are grateful to Dr. Tony Kouzarides for the gift of Gal4-CBP and Gal4-P/CAF expression vectors, to Dr. Jacques Baudier for the gift of purified p53 and MyoD, and to Dr. A. Harel-Bellan and Dr. S. Ait-si-Ali for the gift of CBP expression vector. We are also grateful to Dr. Sophie Rousseaux for the critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Benkirane, M., Chun, R. F., Xiao, H., Ogryzko, V. V., Howard, B. H., Nakatani, Y., and Jeang, K. T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273,** 24898–24905
2. Col, E., Caron, C., Seigneurin-Berny, D., Gracia, J., Favier, A., and Khochbin, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276,** 28179–28184
3. Kamine, J., Elangovan, B., Subramanian, T., Coleman, D., and Chinnadurai, G. (1996) *Virology* **216,** 357–366
4. Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M. I., and Giacca, M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 13519–13524
5. Weissman, J. D., Brown, J. A., Howcroft, T. K., Hwang, J., Chawla, A., Roche, P. A., Schiltz, L., Nakatani, Y., and Singer, D. S. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 11601–11606
6. Creaven, M., Hans, F., Mutskov, V., Col, E., Caron, C., Dimitrov, S., and Khochbin, S. (1999) *Biochemistry* **38,** 8826–8830
7. Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J. D., Lambert, P., Li, H., Lee, C. G., and Kashanchi, F. (2000) *Virology* **277,** 278–295
8. Kiernan, R. E., Vanhulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K. T., Benkirane, M., and Van Lint, C. (1999) *EMBO J.* **18,** 6106–6118
9. Ott, M., Schnolzer, M., Garnica, J., Fischle, W., Emiliani, S., Rackwitz, H. R., and Verdin, E. (1999) *Curr. Biol.* **9,** 1489–1492
10. Karn, J. (1999) *J. Mol. Biol.* **293,** 235–254
11. Nakatani, Y. (2002) *Structure* (*Camb.*) **10,** 443–444
12. Dorr, A., Kiermer, V., Pedal, A., Rackwitz, H. R., Henklein, P., Schubert, U., Zhou, M. M., Verdin, E., and Ott, M. (2002) *EMBO J.* **21,** 2715–2723
13. Mujtaba, S., He, Y., Zeng, L., Farooq, A., Carlson, J. E., Ott, M., Verdin, E., and Zhou, M. M. (2002) *Mol. Cell* **9,** 575–586
14. Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000) *Nature* **403,** 41–45
15. Turner, B. M. (2000) *Bioessays* **22,** 836–845
16. Martinez-Balbas, M. A., Bannister, A. J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998) *EMBO J.* **17,** 2886–2893
17. Polesskaya, A., Naguibneva, I., Duquet, A., Bengal, E., Robin, P., and Harel-Bellan, A. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21,** 5312–5320
18. Gu, W., and Roeder, R. G. (1997) *Cell* **90,** 595–606
19. Furia, B., Deng, L., Wu, K., Baylor, S., Kehn, K., Li, H., Donnelly, R., Coleman, T., and Kashanchi, F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277,** 4973–4980
20. Weissman, J. D., Hwang, J. R., and Singer, D. S. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1546,** 156–163
21. Li, M., Damania, B., Alvarez, X., Ogryzko, V., Ozato, K., and Jung, J. U. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20,** 8254–8263
22. Cotter, M. A., and Robertson, E. S. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20,** 5722–5735
23. Ren, X., Harms, J. S., and Splitter, G. A. (2001) *J. Virol.* **75,** 8251–8258
24. Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F. X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J. A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L. L., Ducommun, B., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. (1998) *Nature* **396,** 184–186
25. Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H. Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R. M. (1999) *Cell* **96,** 393–403
26. Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P. L., Wu, H. Y., Wang, J. Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999) *Cell* **96,** 405–413
27. Li, Q., Imhof, A., Collingwood, T. N., Urnov, F. D., and Wolffe, A. P. (1999) *EMBO J.* **18,** 5634–5652
28. Perissi, V., Dasen, J. S., Kurokawa, R., Wang, Z., Korzus, E., Rose, D. W., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 3652–3657
29. Chan, H. M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C., and La Thangue, N. B. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3,** 667–674

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Bibliographie

Adachi, N., A. Kimura, and M. Horikoshi. 2002. A conserved motif common to the histone acetyltransferase Esa1 and the histone deacetylase Rpd3. *J Biol Chem*. 277:35688-95.

Afshar, G., and J.P. Murnane. 1999. Characterization of a human gene with sequence homology to Saccharomyces cerevisiae SIR2. *Gene*. 234:161-8.

Aguilar, R.C., and B. Wendland. 2003. Ubiquitin: not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol*. 15:184-90.

Aguilera, C., R. Hoya-Arias, G. Haegeman, L. Espinosa, and A. Bigas. 2004. Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:16537-42.

Ali, A., S. Bharadwaj, R. O'Carroll, and N. Ovsenek. 1998. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in Xenopus oocytes. *Mol Cell Biol*. 18:4949-60.

Allfrey, V.G., R. Faulkner, and A.E. Mirsky. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 51:786-94.

Amerik, A.Y., S.J. Li, and M. Hochstrasser. 2000. Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Biol Chem*. 381:981-92.

Amin, J., J. Ananthan, and R. Voellmy. 1988. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol*. 8:3761-9.

Aoyagi, S., and T.K. Archer. 2005. Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. *Trends Cell Biol*.

Arrigo, A.P., J.P. Suhan, and W.J. Welch. 1988. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol*. 8:5059-71.

Avalos, J.L., K.M. Bever, and C. Wolberger. 2005. Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell*. 17:855-68.

Avalos, J.L., I. Celic, S. Muhammad, M.S. Cosgrove, J.D. Boeke, and C. Wolberger. 2002. Structure of a Sir2 enzyme bound to an acetylated p53 peptide. *Mol Cell*. 10:523-35.

Bakin, R.E., and M.O. Jung. 2004. Cytoplasmic sequestration of HDAC7 from mitochondrial and nuclear compartments upon initiation of apoptosis. *J Biol Chem*. 279:51218-25.

Bali, P., M. Pranpat, J. Bradner, M. Balasis, W. Fiskus, F. Guo, K. Rocha, S. Kumaraswamy, S. Boyapalle, P. Atadja, E. Seto, and K. Bhalla. 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*. 280:26729-34.

Ballinger, C.A., P. Connell, Y. Wu, Z. Hu, L.J. Thompson, L.Y. Yin, and C. Patterson. 1999. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*. 19:4535-45.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Bardwell, V.J., and R. Treisman. 1994. The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev*. 8:1664-77.

Bedalov, A., T. Gatbonton, W.P. Irvine, D.E. Gottschling, and J.A. Simon. 2001. Identification of a small molecule inhibitor of Sir2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:15113-8.

Beere, H.M. 2004. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*. 117:2641-51.

Belinsky, S.A., D.M. Klinge, C.A. Stidley, J.P. Issa, J.G. Herman, T.H. March, and S.B. Baylin. 2003. Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Res*. 63:7089-93.

Benndorf, R., K. Hayess, S. Ryazantsev, M. Wieske, J. Behlke, and G. Lutsch. 1994. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem*. 269:20780-4.

Berger, I., C. Bieniossek, C. Schaffitzel, M. Hassler, E. Santelli, and T.J. Richmond. 2003. Direct interaction of Ca2+/calmodulin inhibits histone deacetylase 5 repressor core binding to myocyte enhancer factor 2. *J Biol Chem*. 278:17625-35.

Berger, S.L. 2001. Molecular biology. The histone modification circus. *Science*. 292:64-5.

Bertos, N.R., B. Gilquin, G.K. Chan, T.J. Yen, S. Khochbin, and X.J. Yang. 2004. Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem*. 279:48246-54.

Bertos, N.R., A.H. Wang, and X.J. Yang. 2001. Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol*. 79:243-52.

Bharadwaj, S., A. Ali, and N. Ovsenek. 1999. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol*. 19:8033-41.

Bhattacharyya, T., A.N. Karnezis, S.P. Murphy, T. Hoang, B.C. Freeman, B. Phillips, and R.I. Morimoto. 1995. Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J Biol Chem*. 270:1705-10.

Bitterman, K.J., R.M. Anderson, H.Y. Cohen, M. Latorre-Esteves, and D.A. Sinclair. 2002. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*. 277:45099-107.

Black, B.L., and E.N. Olson. 1998. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:167-96.

Blackburn, R.V., S.S. Galoforo, C.M. Berns, P.M. Corry, R. Klemenz, and Y.J. Lee. 1997. Examination of the molecular basis for the lack of alphaB-crystallin expression in L929 cells. *Mol Cell Biochem*. 170:31-42.

Blaheta, R.A., H. Nau, M. Michaelis, and J. Cinatl, Jr. 2002. Valproate and valproate-analogues: potent tools to fight against cancer. *Curr Med Chem*. 9:1417-33.

Blanchard, N., and C. Hivroz. 2002. The immunological synapse: the more you look the less you know. *Biol Cell*. 94:345-54.

Blander, G., and L. Guarente. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*. 73:417-35.

Bogerd, H.P., R.A. Fridell, R.E. Benson, J. Hua, and B.R. Cullen. 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*. 16:4207-14.

Borghi, S., S. Molinari, G. Razzini, F. Parise, R. Battini, and S. Ferrari. 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*. 114:4477-83.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey. 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423:337-42.

Brehm, A., E.A. Miska, D.J. McCance, J.L. Reid, A.J. Bannister, and T. Kouzarides. 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 391:597-601.

Brownell, J.E., J. Zhou, T. Ranalli, R. Kobayashi, D.G. Edmondson, S.Y. Roth, and C.D. Allis. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell*. 84:843-51.

Bruey, J.M., C. Ducasse, P. Bonniaud, L. Ravagnan, S.A. Susin, C. Diaz-Latoud, S. Gurbuxani, A.P. Arrigo, G. Kroemer, E. Solary, and C. Garrido. 2000. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*. 2:645-52.

Buggy, J.J., M.L. Sideris, P. Mak, D.D. Lorimer, B. McIntosh, and J.M. Clark. 2000. Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *Biochem J*. 350 Pt 1:199-205.

Bukau, B., and A.L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. 92:351-66.

Burgers, W.A., F. Fuks, and T. Kouzarides. 2002. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet*. 18:275-7.

Burke, L.J., and A. Baniahmad. 2000. Co-repressors 2000. *Faseb J*. 14:1876-88.

Cameron, E.E., K.E. Bachman, S. Myohanen, J.G. Herman, and S.B. Baylin. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*. 21:103-7.

Cao, D., Z. Wang, C.L. Zhang, J. Oh, W. Xing, S. Li, J.A. Richardson, D.Z. Wang, and E.N. Olson. 2005. Modulation of smooth muscle gene expression by association of histone acetyltransferases and deacetylases with myocardin. *Mol Cell Biol*. 25:364-76.

Carmen, A.A., P.R. Griffin, J.R. Calaycay, S.E. Rundlett, Y. Suka, and M. Grunstein. 1999. Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:12356-61.

Caron, C., C. Boyault, and S. Khochbin. 2005. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays*. 27:408-15.

Castelli, C., A.M. Ciupitu, F. Rini, L. Rivoltini, A. Mazzocchi, R. Kiessling, and G. Parmiani. 2001. Human heat shock protein 70 peptide complexes specifically activate antimelanoma T cells. *Cancer Res*. 61:222-7.

Castet, A., A. Boulahtouf, G. Versini, S. Bonnet, P. Augereau, F. Vignon, S. Khochbin, S. Jalaguier, and V. Cavailles. 2004. Multiple domains of the Receptor-Interacting Protein 140 contribute to transcription inhibition. *Nucleic Acids Res*. 32:1957-66.

Champagne, N., N.R. Bertos, N. Pelletier, A.H. Wang, M. Vezmar, Y. Yang, H.H. Heng, and X.J. Yang. 1999. Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem*. 274:28528-36.

Chan, H.M., M. Krstic-Demonacos, L. Smith, C. Demonacos, and N.B. La Thangue. 2001. Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol*. 3:667-74.

Chan, J.K., L. Sun, X.J. Yang, G. Zhu, and Z. Wu. 2003. Functional characterization of an amino-terminal region of HDAC4 that possesses MEF2 binding and transcriptional repressive activity. *J Biol Chem*. 278:23515-21.

Chang, L., S.S. Loranger, C. Mizzen, S.G. Ernst, C.D. Allis, and A.T. Annunziato. 1997. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry*. 36:469-80.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Chang, S., T.A. McKinsey, C.L. Zhang, J.A. Richardson, J.A. Hill, and E.N. Olson. 2004. Histone deacetylases 5 and 9 govern responsiveness of the heart to a subset of stress signals and play redundant roles in heart development. *Mol Cell Biol*. 24:8467-76.

Chassaing, N., P. De Mas, M. Tauber, M.C. Vincent, S. Julia, G. Bourrouillou, P. Calvas, and E. Bieth. 2004. Molecular characterization of a cryptic 2q37 deletion in a patient with Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Am J Med Genet A*. 128:410-3.

Chauchereau, A., M. Mathieu, J. de Saintignon, R. Ferreira, L.L. Pritchard, Z. Mishal, A. Dejean, and A. Harel-Bellan. 2004. HDAC4 mediates transcriptional repression by the acute promyelocytic leukaemia-associated protein PLZF. *Oncogene*. 23:8777-84.

Chawla, S., P. Vanhoutte, F.J. Arnold, C.L. Huang, and H. Bading. 2003. Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J Neurochem*. 85:151-9.

Cheng, H.L., R. Mostoslavsky, S. Saito, J.P. Manis, Y. Gu, P. Patel, R. Bronson, E. Appella, F.W. Alt, and K.F. Chua. 2003. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10794-9.

Chinkers, M. 2001. Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab*. 12:28-32.

Choi, K.Y., Y.J. Ji, C. Jee, H. Kim do, and J. Ahnn. 2002. Characterization of CeHDA-7, a class II histone deacetylase interacting with MEF-2 in Caenorhabditis elegans. *Biochem Biophys Res Commun*. 293:1295-300.

Chu, B., F. Soncin, B.D. Price, M.A. Stevenson, and S.K. Calderwood. 1996. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J Biol Chem*. 271:30847-57.

Chu, B., R. Zhong, F. Soncin, M.A. Stevenson, and S.K. Calderwood. 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*. 273:18640-6.

Ciocca, D.R., S. Oesterreich, G.C. Chamness, W.L. McGuire, and S.A. Fuqua. 1993. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst*. 85:1558-70.

Coffey, D.C., M.C. Kutko, R.D. Glick, L.M. Butler, G. Heller, R.A. Rifkind, P.A. Marks, V.M. Richon, and M.P. La Quaglia. 2001. The histone deacetylase inhibitor, CBHA, inhibits growth of human neuroblastoma xenografts in vivo, alone and synergistically with all-trans retinoic acid. *Cancer Res*. 61:3591-4.

Conde, R., J. Xavier, C. McLoughlin, M. Chinkers, and N. Ovsenek. 2005. Protein phosphatase 5 is a negative modulator of heat shock factor 1. *J Biol Chem*. 280:28989-96.

Connell, P., C.A. Ballinger, J. Jiang, Y. Wu, L.J. Thompson, J. Hohfeld, and C. Patterson. 2001. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol*. 3:93-6.

Cosgrove, M.S., J.D. Boeke, and C. Wolberger. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol*. 11:1037-43.

Crabtree, G.R., and E.N. Olson. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 109 Suppl:S67-79.

Craig, E.A., and C.A. Gross. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem Sci*. 16:135-40.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Cress, W.D., and E. Seto. 2000. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*. 184:1-16.

Cuesta, R., G. Laroia, and R.J. Schneider. 2000. Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev*. 14:1460-70.

Czermin, B., G. Schotta, B.B. Hulsmann, A. Brehm, P.B. Becker, G. Reuter, and A. Imhof. 2001. Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in Drosophila. *EMBO Rep*. 2:915-9.

Dai, Q., C. Zhang, Y. Wu, H. McDonough, R.A. Whaley, V. Godfrey, H.H. Li, N. Madamanchi, W. Xu, L. Neckers, D. Cyr, and C. Patterson. 2003. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *Embo J*. 22:5446-58.

Datta, J., K. Ghoshal, S.M. Sharma, S. Tajima, and S.T. Jacob. 2003. Biochemical fractionation reveals association of DNA methyltransferase (Dnmt) 3b with Dnmt1 and that of Dnmt 3a with a histone H3 methyltransferase and Hdac1. *J Cell Biochem*. 88:855-64.

Davis, F.J., M. Gupta, B. Camoretti-Mercado, R.J. Schwartz, and M.P. Gupta. 2003. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy. *J Biol Chem*. 278:20047-58.

Defossez, P.A., S.J. Lin, and D.S. McNabb. 2001. Sound silencing: the Sir2 protein and cellular senescence. *Bioessays*. 23:327-32.

DeFranco, D.B., C. Ramakrishnan, and Y. Tang. 1998. Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 65:51-8.

Dequiedt, F., H. Kasler, W. Fischle, V. Kiermer, M. Weinstein, B.G. Herndier, and E. Verdin. 2003. HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity*. 18:687-98.

Destaing, O., F. Saltel, J.C. Geminard, P. Jurdic, and F. Bard. 2003. Podosomes display actin turnover and dynamic self-organization in osteoclasts expressing actin-green fluorescent protein. *Mol Biol Cell*. 14:407-16.

Destaing, O., F. Saltel, B. Gilquin, A. Chabadel, S. Khochbin, S. Ory, and P. Jurdic. 2005. A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci*. 118:2901-11.

Dressel, U., P.J. Bailey, S.C. Wang, M. Downes, R.M. Evans, and G.E. Muscat. 2001. A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J Biol Chem*. 276:17007-13.

Dryden, S.C., F.A. Nahhas, J.E. Nowak, A.S. Goustin, and M.A. Tainsky. 2003. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol*. 23:3173-85.

Ducy, P., T. Schinke, and G. Karsenty. 2000. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 289:1501-4.

Duncan, R.F., and J.W. Hershey. 1989. Protein synthesis and protein phosphorylation during heat stress, recovery, and adaptation. *J Cell Biol*. 109:1467-81.

Durst, K.L., B. Lutterbach, T. Kummalue, A.D. Friedman, and S.W. Hiebert. 2003. The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol*. 23:607-19.

Dustin, M.L., and J.A. Cooper. 2000. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol*. 1:23-9.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Ehrnsperger, M., S. Graber, M. Gaestel, and J. Buchner. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *Embo J*. 16:221-9.

Ehrnsperger, M., H. Lilie, M. Gaestel, and J. Buchner. 1999. The dynamics of Hsp25 quaternary structure. Structure and function of different oligomeric species. *J Biol Chem*. 274:14867-74.

Erickson, J.W., and C.A. Gross. 1989. Identification of the sigma E subunit of Escherichia coli RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev*. 3:1462-71.

Evangelista, M., S. Zigmond, and C. Boone. 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci*. 116:2603-11.

Fernandes, I., Y. Bastien, T. Wai, K. Nygard, R. Lin, O. Cormier, H.S. Lee, F. Eng, N.R. Bertos, N. Pelletier, S. Mader, V.K. Han, X.J. Yang, and J.H. White. 2003. Ligand-dependent nuclear receptor corepressor LCoR functions by histone deacetylase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell*. 11:139-50.

Fink, A.L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*. 79:425-49.

Finnin, M.S., J.R. Donigian, A. Cohen, V.M. Richon, R.A. Rifkind, P.A. Marks, R. Breslow, and N.P. Pavletich. 1999. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*. 401:188-93.

Finnin, M.S., J.R. Donigian, and N.P. Pavletich. 2001. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat Struct Biol*. 8:621-5.

Finzer, P., C. Kuntzen, U. Soto, H. zur Hausen, and F. Rosl. 2001. Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene*. 20:4768-76.

Fischer, D.D., R. Cai, U. Bhatia, F.A. Asselbergs, C. Song, R. Terry, N. Trogani, R. Widmer, P. Atadja, and D. Cohen. 2002. Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem*. 277:6656-66.

Fischle, W., F. Dequiedt, M. Fillion, M.J. Hendzel, W. Voelter, and E. Verdin. 2001. Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J Biol Chem*. 276:35826-35.

Fischle, W., S. Emiliani, M.J. Hendzel, T. Nagase, N. Nomura, W. Voelter, and E. Verdin. 1999. A new family of human histone deacetylases related to Saccharomyces cerevisiae HDA1p. *J Biol Chem*. 274:11713-20.

Flaherty, K.M., C. DeLuca-Flaherty, and D.B. McKay. 1990. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. 346:623-8.

Flaherty, K.M., D.B. McKay, W. Kabsch, and K.C. Holmes. 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*. 88:5041-5.

Franco, P.J., M. Farooqui, E. Seto, and L.N. Wei. 2001. The orphan nuclear receptor TR2 interacts directly with both class I and class II histone deacetylases. *Mol Endocrinol*. 15:1318-28.

Freiman, R.N., and R. Tjian. 2003. Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. *Cell*. 112:11-7.

Freshney, N.W., L. Rawlinson, F. Guesdon, E. Jones, S. Cowley, J. Hsuan, and J. Saklatvala. 1994. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 78:1039-49.

Frydman, J., E. Nimmesgern, K. Ohtsuka, and F.U. Hartl. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature*. 370:111-7.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Frye, R.A. 2000. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 273:793-8.

Fuino, L., P. Bali, S. Wittmann, S. Donapaty, F. Guo, H. Yamaguchi, H.G. Wang, P. Atadja, and K. Bhalla. 2003. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B. *Mol Cancer Ther*. 2:971-84.

Fujita, N., and A. Ishihama. 1987. Heat-shock induction of RNA polymerase sigma-32 synthesis in Escherichia coli: transcriptional control and a multiple promoter system. *Mol Gen Genet*. 210:10-5.

Fuks, F., W.A. Burgers, N. Godin, M. Kasai, and T. Kouzarides. 2001. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J*. 20:2536-44.

Fulco, M., R.L. Schiltz, S. Iezzi, M.T. King, P. Zhao, Y. Kashiwaya, E. Hoffman, R.L. Veech, and V. Sartorelli. 2003. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*. 12:51-62.

Fuller, K.J., R.D. Issels, D.O. Slosman, J.G. Guillet, T. Soussi, and B.S. Polla. 1994. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer*. 30A:1884-91.

Furumai, R., Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 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.

Galasinski, S.C., K.A. Resing, J.A. Goodrich, and N.G. Ahn. 2002. Phosphatase inhibition leads to histone deacetylases 1 and 2 phosphorylation and disruption of corepressor interactions. *J Biol Chem*. 277:19618-26.

Gao, L., M.A. Cueto, F. Asselbergs, and P. Atadja. 2002. Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*. 277:25748-55.

Garrido, C., J.M. Bruey, A. Fromentin, A. Hammann, A.P. Arrigo, and E. Solary. 1999. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *Faseb J*. 13:2061-70.

Garrido, C., S. Gurbuxani, L. Ravagnan, and G. Kroemer. 2001. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 286:433-42.

Georgopoulos, C., and W.J. Welch. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol*. 9:601-34.

Gernold, M., U. Knauf, M. Gaestel, J. Stahl, and P.M. Kloetzel. 1993. Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. *Dev Genet*. 14:103-11.

Ghislain, M., R.J. Dohmen, F. Levy, and A. Varshavsky. 1996. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in Saccharomyces cerevisiae. *Embo J*. 15:4884-99.

Gill, G. 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*. 18:2046-59.

Girdwood, D., D. Bumpass, O.A. Vaughan, A. Thain, L.A. Anderson, A.W. Snowden, E. Garcia-Wilson, N.D. Perkins, and R.T. Hay. 2003. P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell*. 11:1043-54.

Giuliano, M., M. Lauricella, G. Calvaruso, M. Carabillo, S. Emanuele, R. Vento, and G. Tesoriere. 1999. The apoptotic effects and synergistic interaction of sodium butyrate and MG132 in human retinoblastoma Y79 cells. *Cancer Res*. 59:5586-95.

Glaser, K.B., M.J. Staver, J.F. Waring, J. Stender, R.G. Ulrich, and S.K. Davidsen. 2003. Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors:

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2:151-63.

Glover, J.R., and S. Lindquist. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. 94:73-82.

Grant, P.A., L. Duggan, J. Cote, S.M. Roberts, J.E. Brownell, R. Candau, R. Ohba, T. Owen-Hughes, C.D. Allis, F. Winston, S.L. Berger, and J.L. Workman. 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes Dev*. 11:1640-50.

Green, M., T.J. Schuetz, E.K. Sullivan, and R.E. Kingston. 1995. A heat shock-responsive domain of human HSF1 that regulates transcription activation domain function. *Mol Cell Biol*. 15:3354-62.

Gregoretti, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson. 2004. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*. 338:17-31.

Gronroos, E., U. Hellman, C.H. Heldin, and J. Ericsson. 2002. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell*. 10:483-93.

Grozinger, C.M., E.D. Chao, H.E. Blackwell, D. Moazed, and S.L. Schreiber. 2001. Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J Biol Chem*. 276:38837-43.

Grozinger, C.M., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber. 1999. Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4868-73.

Grozinger, C.M., and S.L. Schreiber. 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*. 97:7835-40.

Grozinger, C.M., and S.L. Schreiber. 2002. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol*. 9:3-16.

Gu, W., and R.G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 90:595-606.

Guan, Z., M. Giustetto, S. Lomvardas, J.H. Kim, M.C. Miniaci, J.H. Schwartz, D. Thanos, and E.R. Kandel. 2002. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*. 111:483-93.

Guardiola, A.R., and T.P. Yao. 2002. Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem*. 277:3350-6.

Guarente, L. 2000. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev*. 14:1021-6.

Guenther, M.G., O. Barak, and M.A. Lazar. 2001. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol*. 21:6091-101.

Guo, Y., T. Guettouche, M. Fenna, F. Boellmann, W.B. Pratt, D.O. Toft, D.F. Smith, and R. Voellmy. 2001. Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J Biol Chem*. 276:45791-9.

Haggarty, S.J., K.M. Koeller, J.C. Wong, C.M. Grozinger, and S.L. Schreiber. 2003. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:4389-94.

Hahn, G.M., and G.C. Li. 1982. Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. *Radiat Res*. 92:452-7.

Halkidou, K., S. Cook, H.Y. Leung, D.E. Neal, and C.N. Robson. 2004. Nuclear accumulation of histone deacetylase 4 (HDAC4) coincides with the loss of androgen

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

sensitivity in hormone refractory cancer of the prostate. *Eur Urol*. 45:382-9; author reply 389.

Han, A., J. He, Y. Wu, J.O. Liu, and L. Chen. 2005. Mechanism of recruitment of class II histone deacetylases by myocyte enhancer factor-2. *J Mol Biol*. 345:91-102.

Han, A., F. Pan, J.C. Stroud, H.D. Youn, J.O. Liu, and L. Chen. 2003. Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor-2. *Nature*. 422:730-4.

Han, J., and J.D. Molkentin. 2000. Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends Cardiovasc Med*. 10:19-22.

Han, J.W., S.H. Ahn, S.H. Park, S.Y. Wang, G.U. Bae, D.W. Seo, H.K. Kwon, S. Hong, H.Y. Lee, Y.W. Lee, and H.W. Lee. 2000a. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res*. 60:6068-74.

Han, S.I., K.S. Ha, K.I. Kang, H.D. Kim, and H.S. Kang. 2000b. 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*. 24:447-57.

Harrison, B.C., C.R. Roberts, D.B. Hood, M. Sweeney, J.M. Gould, E.W. Bush, and T.A. McKinsey. 2004. The CRM1 nuclear export receptor controls pathological cardiac gene expression. *Mol Cell Biol*. 24:10636-49.

Hayashi, S.I., H. Eguchi, K. Tanimoto, T. Yoshida, Y. Omoto, A. Inoue, N. Yoshida, and Y. Yamaguchi. 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.

Heinzel, T., R.M. Lavinsky, T.M. Mullen, M. Soderstrom, C.D. Laherty, J. Torchia, W.M. Yang, G. Brard, S.D. Ngo, J.R. Davie, E. Seto, R.N. Eisenman, D.W. Rose, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 1997. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*. 387:43-8.

Hemmingsen, S.M., C. Woolford, S.M. van der Vies, K. Tilly, D.T. Dennis, C.P. Georgopoulos, R.W. Hendrix, and R.J. Ellis. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*. 333:330-4.

Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 67:425-79.

Hershko, A., and G.M. Tomkins. 1971. Studies on the degradation of tyrosine aminotransferase in hepatoma cells in culture. Influence of the composition of the medium and adenosine triphosphate dependence. *J Biol Chem*. 246:710-4.

Hideshima, T., J.E. Bradner, J. Wong, D. Chauhan, P. Richardson, S.L. Schreiber, and K.C. Anderson. 2005. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:8567-72.

Higgs, H.N. 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*. 30:342-53.

Hilfiker, A., D. Hilfiker-Kleiner, A. Pannuti, and J.C. Lucchesi. 1997. mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in Drosophila. *Embo J*. 16:2054-60.

Hiratsuka, M., T. Inoue, T. Toda, N. Kimura, Y. Shirayoshi, H. Kamitani, T. Watanabe, E. Ohama, C.G. Tahimic, A. Kurimasa, and M. Oshimura. 2003. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 309:558-66.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Holmberg, C.I., V. Hietakangas, A. Mikhailov, J.O. Rantanen, M. Kallio, A. Meinander, J. Hellman, N. Morrice, C. MacKintosh, R.I. Morimoto, J.E. Eriksson, and L. Sistonen. 2001. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *Embo J*. 20:3800-10.

Hook, S.S., A. Orian, S.M. Cowley, and R.N. Eisenman. 2002. Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13425-30.

Hsieh, Y.J., T.K. Kundu, Z. Wang, R. Kovelman, and R.G. Roeder. 1999. The TFIIIC90 subunit of TFIIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*. 19:7697-704.

Hu, E., Z. Chen, T. Fredrickson, Y. Zhu, R. Kirkpatrick, G.F. Zhang, K. Johanson, C.M. Sung, R. Liu, and J. Winkler. 2000. Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem*. 275:15254-64.

Huang, E.Y., J. Zhang, E.A. Miska, M.G. Guenther, T. Kouzarides, and M.A. Lazar. 2000a. Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev*. 14:45-54.

Huang, L., Y. Sowa, T. Sakai, and A.B. Pardee. 2000b. Activation of the p21WAF1/CIP1 promoter independent of p53 by the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) through the Sp1 sites. *Oncogene*. 19:5712-9.

Hubbert, C., A. Guardiola, R. Shao, Y. Kawaguchi, A. Ito, A. Nixon, M. Yoshida, X.F. Wang, and T.P. Yao. 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 417:455-8.

Huot, J., F. Houle, D.R. Spitz, and J. Landry. 1996. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res*. 56:273-9.

Huynh, K.D., W. Fischle, E. Verdin, and V.J. Bardwell. 2000. BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev*. 14:1810-23.

Im, S.H., and A. Rao. 2004. Activation and deactivation of gene expression by Ca2+/calcineurin-NFAT-mediated signaling. *Mol Cells*. 18:1-9.

Imai, S., C.M. Armstrong, M. Kaeberlein, and L. Guarente. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 403:795-800.

Inoue, A., N. Yoshida, Y. Omoto, S. Oguchi, T. Yamori, R. Kiyama, and S. Hayashi. 2002. Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J Mol Endocrinol*. 29:175-92.

Ito, Y. 2004. Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. *Oncogene*. 23:4198-208.

Iyengar, S., J.E. Hildreth, and D.H. Schwartz. 1998. Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol*. 72:5251-5.

Jakob, U., and J. Buchner. 1994. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Trends Biochem Sci*. 19:205-11.

Jeong, B.C., C.Y. Hong, S. Chattopadhyay, J.H. Park, E.Y. Gong, H.J. Kim, S.Y. Chun, and K. Lee. 2004. Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol*. 18:13-25.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Jeong, J.W., M.K. Bae, M.Y. Ahn, S.H. Kim, T.K. Sohn, M.H. Bae, M.A. Yoo, E.J. Song, K.J. Lee, and K.W. Kim. 2002. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*. 111:709-20.

Jernigan, K.M., R. Blumenthal, and A. Puri. 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*. 474:246-51.

Jin, Y.H., E.J. Jeon, Q.L. Li, Y.H. Lee, J.K. Choi, W.J. Kim, K.Y. Lee, and S.C. Bae. 2004. Transforming growth factor-beta stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation. *J Biol Chem*. 279:29409-17.

Johnson, E.S., P.C. Ma, I.M. Ota, and A. Varshavsky. 1995. A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*. 270:17442-56.

Johnstone, R.W. 2002. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 1:287-99.

Jolly, C., A. Metz, J. Govin, M. Vigneron, B.M. Turner, S. Khochbin, and C. Vourc'h. 2004. Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol*. 164:25-33.

Jolly, C., R. Morimoto, M. Robert-Nicoud, and C. Vourc'h. 1997. HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J Cell Sci*. 110 (Pt 23):2935-41.

Jolly, C., and R.I. Morimoto. 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*. 92:1564-72.

Jolly, C., C. Vourc'h, M. Robert-Nicoud, and R.I. Morimoto. 1999. Intron-independent association of splicing factors with active genes. *J Cell Biol*. 145:1133-43.

Kaeberlein, M., M. McVey, and L. Guarente. 1999. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in Saccharomyces cerevisiae by two different mechanisms. *Genes Dev*. 13:2570-80.

Kamine, J., B. Elangovan, T. Subramanian, D. Coleman, and G. Chinnadurai. 1996. Identification of a cellular protein that specifically interacts with the essential cysteine region of the HIV-1 Tat transactivator. *Virology*. 216:357-66.

Kao, G.D., W.G. McKenna, M.G. Guenther, R.J. Muschel, M.A. Lazar, and T.J. Yen. 2003. Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol*. 160:1017-27.

Kao, H.Y., M. Downes, P. Ordentlich, and R.M. Evans. 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., C.H. Lee, A. Komarov, C.C. Han, and R.M. Evans. 2002. Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J Biol Chem*. 277:187-93.

Kao, H.Y., A. Verdel, C.C. Tsai, C. Simon, H. Juguilon, and S. Khochbin. 2001. Mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of histone deacetylase 7. *J Biol Chem*. 276:47496-507.

Kato, H., S. Tamamizu-Kato, and F. Shibasaki. 2004. Histone deacetylase 7 associates with hypoxia-inducible factor 1alpha and increases transcriptional activity. *J Biol Chem*. 279:41966-74.

Kato, K., K. Hasegawa, S. Goto, and Y. Inaguma. 1994. Dissociation as a result of phosphorylation of an aggregated form of the small stress protein, hsp27. *J Biol Chem*. 269:11274-8.

Kawaguchi, Y., J.J. Kovacs, A. McLaurin, J.M. Vance, A. Ito, and T.P. Yao. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 115:727-38.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Keen, J.C., L. Yan, K.M. Mack, C. Pettit, D. Smith, D. Sharma, and N.E. Davidson. 2003. A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine. *Breast Cancer Res Treat*. 81:177-86.

Kelly, W.K., O.A. O'Connor, L.M. Krug, J.H. Chiao, M. Heaney, T. Curley, B. MacGregore-Cortelli, W. Tong, J.P. Secrist, L. Schwartz, S. Richardson, E. Chu, S. Olgac, P.A. Marks, H. Scher, and V.M. Richon. 2005. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*. 23:3923-31.

Khochbin, S., A. Verdel, C. Lemercier, and D. Seigneurin-Berny. 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev*. 11:162-6.

Kim, J.S., S. Lee, T. Lee, Y.W. Lee, and J.B. Trepel. 2001. Transcriptional activation of p21(WAF1/CIP1) by apicidin, a novel histone deacetylase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 281:866-71.

Kim, K.I., S.H. Baek, and C.H. Chung. 2002. Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol*. 191:257-68.

Kim, M.S., M. Blake, J.H. Baek, G. Kohlhagen, Y. Pommier, and F. Carrier. 2003. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*. 63:7291-300.

Kim, Y.B., S.W. Ki, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 2000. Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J Antibiot (Tokyo)*. 53:1191-200.

Kirsh, O., J.S. Seeler, A. Pichler, A. Gast, S. Muller, E. Miska, M. Mathieu, A. Harel-Bellan, T. Kouzarides, F. Melchior, and A. Dejean. 2002. The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase. *Embo J*. 21:2682-91.

Kleff, S., E.D. Andrulis, C.W. Anderson, and R. Sternglanz. 1995. Identification of a gene encoding a yeast histone H4 acetyltransferase. *J Biol Chem*. 270:24674-7.

Kline, M.P., and R.I. Morimoto. 1997. Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 17:2107-15.

Knauf, U., E.M. Newton, J. Kyriakis, and R.E. Kingston. 1996. Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev*. 10:2782-93.

Komatsu, Y., K.Y. Tomizaki, M. Tsukamoto, T. Kato, N. Nishino, S. Sato, T. Yamori, T. Tsuruo, R. Furumai, M. Yoshida, S. Horinouchi, and H. Hayashi. 2001. Cyclic hydroxamic-acid-containing peptide 31, a potent synthetic histone deacetylase inhibitor with antitumor activity. *Cancer Res*. 61:4459-66.

Kopito, R.R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 10:524-30.

Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*. 12:198-209.

Kovacs, J.J., P.J. Murphy, S. Gaillard, X. Zhao, J.T. Wu, C.V. Nicchitta, M. Yoshida, D.O. Toft, W.B. Pratt, and T.P. Yao. 2005. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*. 18:601-7.

Kregel, K.C. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*. 92:2177-86.

Kuhl, N.M., J. Kunz, and L. Rensing. 2000. Heat shock-induced arrests in different cell cycle phases of rat C6-glioma cells are attenuated in heat shock-primed thermotolerant cells. *Cell Prolif*. 33:147-66.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Kuhl, N.M., and L. Rensing. 2000. Heat shock effects on cell cycle progression. *Cell Mol Life Sci*. 57:450-63.

Kuppner, M.C., R. Gastpar, S. Gelwer, E. Nossner, O. Ochmann, A. Scharner, and R.D. Issels. 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*. 31:1602-9.

Kurtev, V., R. Margueron, K. Kroboth, E. Ogris, V. Cavailles, and C. Seiser. 2004. Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *J Biol Chem*. 279:24834-43.

Landry, J., A. Sutton, S.T. Tafrov, R.C. Heller, J. Stebbins, L. Pillus, and R. Sternglanz. 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:5807-11.

Langley, E., M. Pearson, M. Faretta, U.M. Bauer, R.A. Frye, S. Minucci, P.G. Pelicci, and T. Kouzarides. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo J*. 21:2383-96.

Laskowska, E., D. Kuczynska-Wisnik, J. Skorko-Glonek, and A. Taylor. 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*. 22:555-71.

Lavoie, J.N., H. Lambert, E. Hickey, L.A. Weber, and J. Landry. 1995. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol*. 15:505-16.

Lee, D.H., and A.L. Goldberg. 1998. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*. 18:30-8.

Lee, H.J., M. Chun, and K.V. Kandror. 2001. Tip60 and HDAC7 interact with the endothelin receptor a and may be involved in downstream signaling. *J Biol Chem*. 276:16597-600.

Lee, J.H., S.R. Hart, and D.G. Skalnik. 2004. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis*. 38:32-8.

Lemercier, C., M.P. Brocard, F. Puvion-Dutilleul, H.Y. Kao, O. Albagli, and S. Khochbin. 2002. Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J Biol Chem*. 277:22045-52.

Lemercier, C., A. Verdel, B. Galloo, S. Curtet, M.P. Brocard, and S. Khochbin. 2000. mHDA1/HDAC5 histone deacetylase interacts with and represses MEF2A transcriptional activity. *J Biol Chem*. 275:15594-9.

Levinson, W., H. Oppermann, and J. Jackson. 1980. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*. 606:170-80.

Li, J., Q. Lin, W. Wang, P. Wade, and J. Wong. 2002. Specific targeting and constitutive association of histone deacetylase complexes during transcriptional repression. *Genes Dev*. 16:687-92.

Li, X., S. Song, Y. Liu, S.H. Ko, and H.Y. Kao. 2004. Phosphorylation of the histone deacetylase 7 modulates its stability and association with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem*. 279:34201-8.

Lin, S.J., P.A. Defossez, and L. Guarente. 2000. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. *Science*. 289:2126-8.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Linder, S., and M. Aepfelbacher. 2003. Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*. 13:376-85.

Lindquist, S., and E.A. Craig. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*. 22:631-77.

Linseman, D.A., C.M. Bartley, S.S. Le, T.A. Laessig, R.J. Bouchard, M.K. Meintzer, M. Li, and K.A. Heidenreich. 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*. 278:41472-81.

Liu, F., M. Dowling, X.J. Yang, and G.D. Kao. 2004. Caspase-mediated specific cleavage of human histone deacetylase 4. *J Biol Chem*. 279:34537-46.

Liu, J., and D.B. DeFranco. 1999. Chromatin recycling of glucocorticoid receptors: implications for multiple roles of heat shock protein 90. *Mol Endocrinol*. 13:355-65.

Liu, L., D.M. Scolnick, R.C. Trievel, H.B. Zhang, R. Marmorstein, T.D. Halazonetis, and S.L. Berger. 1999. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 19:1202-9.

Lomonte, P., J. Thomas, P. Texier, C. Caron, S. Khochbin, and A.L. Epstein. 2004. Functional interaction between class II histone deacetylases and ICP0 of herpes simplex virus type 1. *J Virol*. 78:6744-57.

Lu, J., T.A. McKinsey, R.L. Nicol, and E.N. Olson. 2000a. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:4070-5.

Lu, J., T.A. McKinsey, C.L. Zhang, and E.N. Olson. 2000b. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. *Mol Cell*. 6:233-44.

Luders, J., J. Demand, and J. Hohfeld. 2000. The ubiquitin-related BAG-1 provides a link between the molecular chaperones Hsc70/Hsp70 and the proteasome. *J Biol Chem*. 275:4613-7.

Luduena, R.F. 1998. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *Int Rev Cytol*. 178:207-75.

Luo, J., A.Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente, and W. Gu. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 107:137-48.

MacRae, T.H. 1997. Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem*. 244:265-78.

MacRae, T.H. 2000. Structure and function of small heat shock/alpha-crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cell Mol Life Sci*. 57:899-913.

Marchler, G., and C. Wu. 2001. Modulation of Drosophila heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1. *Embo J*. 20:499-509.

Marks, P., R.A. Rifkind, V.M. Richon, R. Breslow, T. Miller, and W.K. Kelly. 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 (Camb)*. 9:1127-33.

Marshall, J.L., N. Rizvi, J. Kauh, W. Dahut, M. Figuera, M.H. Kang, W.D. Figg, I. Wainer, C. Chaissang, M.Z. Li, and M.J. Hawkins. 2002. A phase I trial of depsipeptide (FR901228) in patients with advanced cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2:325-32.

Martinez, E., T.K. Kundu, J. Fu, and R.G. Roeder. 1998. A human SPT3-TAFII31-GCN5-L acetylase complex distinct from transcription factor IID. *J Biol Chem*. 273:23781-5.

Martinez-Balbas, M.A., U.M. Bauer, S.J. Nielsen, A. Brehm, and T. Kouzarides. 2000. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *Embo J*. 19:662-71.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Maruta, H., K. Greer, and J.L. Rosenbaum. 1986. The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol*. 103:571-9.

Matsuyama, A., T. Shimazu, Y. Sumida, A. Saito, Y. Yoshimatsu, D. Seigneurin-Berny, H. Osada, Y. Komatsu, N. Nishino, S. Khochbin, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2002. In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J*. 21:6820-31.

McBurney, M.W., X. Yang, K. Jardine, M. Bieman, J. Th'ng, and M. Lemieux. 2003a. The absence of SIR2alpha protein has no effect on global gene silencing in mouse embryonic stem cells. *Mol Cancer Res*. 1:402-9.

McBurney, M.W., X. Yang, K. Jardine, M. Hixon, K. Boekelheide, J.R. Webb, P.M. Lansdorp, and M. Lemieux. 2003b. The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Mol Cell Biol*. 23:38-54.

McDonough, H., and C. Patterson. 2003. CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones*. 8:303-8.

McKinsey, T.A., C.L. Zhang, J. Lu, and E.N. Olson. 2000a. Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation. *Nature*. 408:106-11.

McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson. 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*. 97:14400-5.

McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson. 2001. Identification of a signal-responsive nuclear export sequence in class II histone deacetylases. *Mol Cell Biol*. 21:6312-21.

McKinsey, T.A., C.L. Zhang, and E.N. Olson. 2002. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem Sci*. 27:40-7.

McLaughlin, F., P. Finn, and N.B. La Thangue. 2003. The cell cycle, chromatin and cancer: mechanism-based therapeutics come of age. *Drug Discov Today*. 8:793-802.

McMillan, D.R., X. Xiao, L. Shao, K. Graves, and I.J. Benjamin. 1998. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem*. 273:7523-8.

Mejat, A., F. Ramond, R. Bassel-Duby, S. Khochbin, E.N. Olson, and L. Schaeffer. 2005. Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat Neurosci*. 8:313-21.

Mercier, P.A., N.A. Winegarden, and J.T. Westwood. 1999. Human heat shock factor 1 is predominantly a nuclear protein before and after heat stress. *J Cell Sci*. 112 (Pt 16):2765-74.

Metz, A., J. Soret, C. Vourc'h, J. Tazi, and C. Jolly. 2004. A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci*. 117:4551-8.

Michishita, E., J.Y. Park, J.M. Burneskis, J.C. Barrett, and I. Horikawa. 2005. Evolutionarily Conserved and Nonconserved Cellular Localizations and Functions of Human SIRT Proteins. *Mol Biol Cell*.

Mifflin, L.C., and R.E. Cohen. 1994a. Characterization of denatured protein inducers of the heat shock (stress) response in Xenopus laevis oocytes. *J Biol Chem*. 269:15710-7.

Mifflin, L.C., and R.E. Cohen. 1994b. hsc70 moderates the heat shock (stress) response in Xenopus laevis oocytes and binds to denatured protein inducers. *J Biol Chem*. 269:15718-23.

Milarski, K.L., and R.I. Morimoto. 1986. Expression of human HSP70 during the synthetic phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:9517-21.

Min, J., J. Landry, R. Sternglanz, and R.M. Xu. 2001. Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell*. 105:269-79.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Miska, E.A., C. Karlsson, E. Langley, S.J. Nielsen, J. Pines, and T. Kouzarides. 1999. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *Embo J*. 18:5099-107.

Mitsiades, C.S., N.S. Mitsiades, C.J. McMullan, V. Poulaki, R. Shringarpure, T. Hideshima, M. Akiyama, D. Chauhan, N. Munshi, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T.A. Libermann, V.M. Richon, P.A. Marks, and K.C. Anderson. 2004. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:540-5.

Mizzen, C.A., X.J. Yang, T. Kokubo, J.E. Brownell, A.J. Bannister, T. Owen-Hughes, J. Workman, L. Wang, S.L. Berger, T. Kouzarides, Y. Nakatani, and C.D. Allis. 1996. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. 87:1261-70.

Moazed, D. 2001. Enzymatic activities of Sir2 and chromatin silencing. *Curr Opin Cell Biol*. 13:232-8.

Moore, J.P., A. Trkola, and T. Dragic. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol*. 9:551-62.

Muller, S., M. Berger, F. Lehembre, J.S. Seeler, Y. Haupt, and A. Dejean. 2000. c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J Biol Chem*. 275:13321-9.

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

Muth, V., S. Nadaud, I. Grummt, and R. Voit. 2001. Acetylation of TAF(I)68, a subunit of TIF-IB/SL1, activates RNA polymerase I transcription. *Embo J*. 20:1353-62.

Nemoto, T., Y. Ohara-Nemoto, M. Ota, T. Takagi, and K. Yokoyama. 1995. Mechanism of dimer formation of the 90-kDa heat-shock protein. *Eur J Biochem*. 233:1-8.

Newton, E.M., U. Knauf, M. Green, and R.E. Kingston. 1996. The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol Cell Biol*. 16:839-46.

Nicolas, E., S. Ait-Si-Ali, and D. Trouche. 2001. The histone deacetylase HDAC3 targets RbAp48 to the retinoblastoma protein. *Nucleic Acids Res*. 29:3131-6.

Nimmanapalli, R., L. Fuino, C. Stobaugh, V. Richon, and K. Bhalla. 2003. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Blood*. 101:3236-9.

Noma, K., C.D. Allis, and S.I. Grewal. 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*. 293:1150-5.

North, B.J., B.L. Marshall, M.T. Borra, J.M. Denu, and E. Verdin. 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD+-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*. 11:437-44.

Ogawa, E., M. Maruyama, H. Kagoshima, M. Inuzuka, J. Lu, M. Satake, K. Shigesada, and Y. Ito. 1993. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:6859-63.

Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*. 87:953-9.

Onyango, P., I. Celic, J.M. McCaffery, J.D. Boeke, and A.P. Feinberg. 2002. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13653-8.

Palazzo, A., B. Ackerman, and G.G. Gundersen. 2003. Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature*. 421:230.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Palladino, F., T. Laroche, E. Gilson, A. Axelrod, L. Pillus, and S.M. Gasser. 1993. SIR3 and SIR4 proteins are required for the positioning and integrity of yeast telomeres. *Cell*. 75:543-55.

Parcellier, A., E. Schmitt, S. Gurbuxani, D. Seigneurin-Berny, A. Pance, A. Chantome, S. Plenchette, S. Khochbin, E. Solary, and C. Garrido. 2003. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I-kappaBalpha proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*. 23:5790-802.

Paroni, G., M. Mizzau, C. Henderson, G. Del Sal, C. Schneider, and C. Brancolini. 2004. Caspase-dependent regulation of histone deacetylase 4 nuclear-cytoplasmic shuttling promotes apoptosis. *Mol Biol Cell*. 15:2804-18.

Parra, M., H. Kasler, T.A. McKinsey, E.N. Olson, and E. Verdin. 2005. Protein kinase D1 phosphorylates HDAC7 and induces its nuclear export after T-cell receptor activation. *J Biol Chem*. 280:13762-70.

Parsell, D.A., J. Taulien, and S. Lindquist. 1993. The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 339:279-85; discussion 285-6.

Parthun, M.R., J. Widom, and D.E. Gottschling. 1996. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell*. 87:85-94.

Paul, C., F. Manero, S. Gonin, C. Kretz-Remy, S. Virot, and A.P. Arrigo. 2002. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. *Mol Cell Biol*. 22:816-34.

Perrod, S., M.M. Cockell, T. Laroche, H. Renauld, A.L. Ducrest, C. Bonnard, and S.M. Gasser. 2001. A cytosolic NAD-dependent deacetylase, Hst2p, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast. *Embo J*. 20:197-209.

Peteranderl, R., and H.C. Nelson. 1992. Trimerization of the heat shock transcription factor by a triple-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry*. 31:12272-6.

Petrie, K., F. Guidez, L. Howell, L. Healy, S. Waxman, M. Greaves, and A. Zelent. 2003. The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *J Biol Chem*. 278:16059-72.

Pflum, M.K., J.K. Tong, W.S. Lane, and S.L. Schreiber. 2001. Histone deacetylase 1 phosphorylation promotes enzymatic activity and complex formation. *J Biol Chem*. 276:47733-41.

Phiel, C.J., F. Zhang, E.Y. Huang, M.G. Guenther, M.A. Lazar, and P.S. Klein. 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*. 276:36734-41.

Phippen, T.M., A.L. Sweigart, M. Moniwa, A. Krumm, J.R. Davie, and S.M. Parkhurst. 2000. Drosophila C-terminal binding protein functions as a context-dependent transcriptional co-factor and interferes with both mad and groucho transcriptional repression. *J Biol Chem*. 275:37628-37.

Pickart, C.M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*. 70:503-33.

Pijnappel, W.W., D. Schaft, A. Roguev, A. Shevchenko, H. Tekotte, M. Wilm, G. Rigaut, B. Seraphin, R. Aasland, and A.F. Stewart. 2001. The S. cerevisiae SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev*. 15:2991-3004.

Pinto, M., M. Morange, and O. Bensaude. 1991. Denaturation of proteins during heat shock. In vivo recovery of solubility and activity of reporter enzymes. *J Biol Chem*. 266:13941-6.

Pirkkala, L., P. Nykanen, and L. Sistonen. 2001. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J*. 15:1118-31.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Polevoda, B., and F. Sherman. 2003. N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *J Mol Biol*. 325:595-622.

Prakash, S., B.J. Foster, M. Meyer, A. Wozniak, L.K. Heilbrun, L. Flaherty, M. Zalupski, L. Radulovic, M. Valdivieso, and P.M. LoRusso. 2001. Chronic oral administration of CI-994: a phase 1 study. *Invest New Drugs*. 19:1-11.

Pratt, W.B. 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 268:21455-8.

Primeau, M., J. Gagnon, and R.L. Momparler. 2003. Synergistic antineoplastic action of DNA methylation inhibitor 5-AZA-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor depsipeptide on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer*. 103:177-84.

Rahmani, M., E. Reese, Y. Dai, C. Bauer, L.B. Kramer, M. Huang, R. Jove, P. Dent, and S. Grant. 2005. Cotreatment with suberanoylanilide hydroxamic acid and 17-allylamino 17-demethoxygeldanamycin synergistically induces apoptosis in Bcr-Abl+ Cells sensitive and resistant to STI571 (imatinib mesylate) in association with down-regulation of Bcr-Abl, abrogation of signal transducer and activator of transcription 5 activity, and Bax conformational change. *Mol Pharmacol*. 67:1166-76.

Rahmani, M., C. Yu, Y. Dai, E. Reese, W. Ahmed, P. Dent, and S. Grant. 2003a. Coadministration of the heat shock protein 90 antagonist 17-allylamino- 17-demethoxygeldanamycin with suberoylanilide hydroxamic acid or sodium butyrate synergistically induces apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res*. 63:8420-7.

Rahmani, M., C. Yu, E. Reese, W. Ahmed, K. Hirsch, P. Dent, and S. Grant. 2003b. Inhibition of PI-3 kinase sensitizes human leukemic cells to histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis through p44/42 MAP kinase inactivation and abrogation of p21(CIP1/WAF1) induction rather than AKT inhibition. *Oncogene*. 22:6231-42.

Rajapandi, T., L.E. Greene, and E. Eisenberg. 2000. The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J Biol Chem*. 275:22597-604.

Rashid, S.F., J.S. Moore, E. Walker, P.M. Driver, J. Engel, C.E. Edwards, G. Brown, M.R. Uskokovic, and M.J. Campbell. 2001. Synergistic growth inhibition of prostate cancer cells by 1 alpha,25 Dihydroxyvitamin D(3) and its 19-nor-hexafluoride analogs in combination with either sodium butyrate or trichostatin A. *Oncogene*. 20:1860-72.

Reading, D.S., R.L. Hallberg, and A.M. Myers. 1989. Characterization of the yeast HSP60 gene coding for a mitochondrial assembly factor. *Nature*. 337:655-9.

Richon, V.M., T.W. Sandhoff, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:10014-9.

Rosato, R.R., and S. Grant. 2004. Histone deacetylase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig Drugs*. 13:21-38.

Ross, S., J.L. Best, L.I. Zon, and G. Gill. 2002. SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell*. 10:831-42.

Roy, H., M. Bloom, P. Milos, and M. Monroe. 1982. Studies on the assembly of large subunits of ribulose bisphosphate carboxylase in isolated pea chloroplasts. *J Cell Biol*. 94:20-27.

Rundlett, S.E., A.A. Carmen, R. Kobayashi, S. Bavykin, B.M. Turner, and M. Grunstein. 1996. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:14503-8.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Saito, A., T. Yamashita, Y. Mariko, Y. Nosaka, K. Tsuchiya, T. Ando, T. Suzuki, T. Tsuruo, and O. Nakanishi. 1999. A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:4592-7.

Saji, S., M. Kawakami, S. Hayashi, N. Yoshida, M. Hirose, S. Horiguchi, A. Itoh, N. Funata, S.L. Schreiber, M. Yoshida, and M. Toi. 2005. Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*. 24:4531-9.

Sakaguchi, K., J.E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C.W. Anderson, and E. Appella. 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. 12:2831-41.

Samali, A., and S. Orrenius. 1998. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 3:228-36.

Sandor, V., S. Bakke, R.W. Robey, M.H. Kang, M.V. Blagosklonny, J. Bender, R. Brooks, R.L. Piekarz, E. Tucker, W.D. Figg, K.K. Chan, B. Goldspiel, A.T. Fojo, S.P. Balcerzak, and S.E. Bates. 2002. Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res*. 8:718-28.

Satyal, S.H., D. Chen, S.G. Fox, J.M. Kramer, and R.I. Morimoto. 1998. Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev*. 12:1962-74.

Schaeper, U., J.M. Boyd, S. Verma, E. Uhlmann, T. Subramanian, and G. Chinnadurai. 1995. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:10467-71.

Scharf, K.D., H. Heider, I. Hohfeld, R. Lyck, E. Schmidt, and L. Nover. 1998. The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol*. 18:2240-51.

Schwer, B., B.J. North, R.A. Frye, M. Ott, and E. Verdin. 2002. The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*. 158:647-57.

Seigneurin-Berny, D., A. Verdel, S. Curtet, C. Lemercier, J. Garin, S. Rousseaux, and S. Khochbin. 2001. Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol*. 21:8035-44.

Senawong, T., V.J. Peterson, D. Avram, D.M. Shepherd, R.A. Frye, S. Minucci, and M. Leid. 2003. Involvement of the histone deacetylase SIRT1 in chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF)-interacting protein 2-mediated transcriptional repression. *J Biol Chem*. 278:43041-50.

Sengupta, N., and E. Seto. 2004. Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem*. 93:57-67.

Serrador, J.M., J.R. Cabrero, D. Sancho, M. Mittelbrunn, A. Urzainqui, and F. Sanchez-Madrid. 2004. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*. 20:417-28.

Shaffer, A.L., X. Yu, Y. He, J. Boldrick, E.P. Chan, and L.M. Staudt. 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 13:199-212.

Sherman, J.M., E.M. Stone, L.L. Freeman-Cook, C.B. Brachmann, J.D. Boeke, and L. Pillus. 1999. The conserved core of a human SIR2 homologue functions in yeast silencing. *Mol Biol Cell*. 10:3045-59.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Shi, Y., D.D. Mosser, and R.I. Morimoto. 1998. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*. 12:654-66.

Simon, M.M., A. Reikerstorfer, A. Schwarz, C. Krone, T.A. Luger, M. Jaattela, and T. Schwarz. 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*. 95:926-33.

Simonsson, M., C.H. Heldin, J. Ericsson, and E. Gronroos. 2005. The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *J Biol Chem*. 280:21797-803.

Smith, E.R., A. Eisen, W. Gu, M. Sattah, A. Pannuti, J. Zhou, R.G. Cook, J.C. Lucchesi, and C.D. Allis. 1998. ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:3561-5.

Somoza, J.R., R.J. Skene, B.A. Katz, C. Mol, J.D. Ho, A.J. Jennings, C. Luong, A. Arvai, J.J. Buggy, E. Chi, J. Tang, B.C. Sang, E. Verner, R. Wynands, E.M. Leahy, D.R. Dougan, G. Snell, M. Navre, M.W. Knuth, R.V. Swanson, D.E. McRee, and L.W. Tari. 2004. Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases. *Structure (Camb)*. 12:1325-34.

Soncin, F., X. Zhang, B. Chu, X. Wang, A. Asea, M. Ann Stevenson, D.B. Sacks, and S.K. Calderwood. 2003. Transcriptional activity and DNA binding of heat shock factor-1 involve phosphorylation on threonine 142 by CK2. *Biochem Biophys Res Commun*. 303:700-6.

Sorger, P.K., and H.C. Nelson. 1989. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell*. 59:807-13.

Sorger, P.K., and H.R. Pelham. 1988. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell*. 54:855-64.

Sparrow, D.B., E.A. Miska, E. Langley, S. Reynaud-Deonauth, S. Kotecha, N. Towers, G. Spohr, T. Kouzarides, and T.J. Mohun. 1999. MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *Embo J*. 18:5085-98.

Spiro, I.J., D.L. Denman, and W.C. Dewey. 1982. Effect of hyperthermia on CHO DNA polymerases alpha and beta. *Radiat Res*. 89:134-49.

Stangl, K., C. Gunther, T. Frank, M. Lorenz, S. Meiners, T. Ropke, L. Stelter, M. Moobed, G. Baumann, P.M. Kloetzel, and V. Stangl. 2002. Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection. *Biochem Biophys Res Commun*. 291:542-9.

Sterner, D.E., and S.L. Berger. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:435-59.

Stewart, G.R., and D.B. Young. 2004. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. *Curr Opin Immunol*. 16:506-10.

Storz, G. 1999. An RNA thermometer. *Genes Dev*. 13:633-6.

Strahl, B.D., and C.D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-5.

Straus, D., W. Walter, and C.A. Gross. 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*. 4:2202-9.

Straus, D.B., W.A. Walter, and C.A. Gross. 1987. The heat shock response of E. coli is regulated by changes in the concentration of sigma 32. *Nature*. 329:348-51.

Strudwick, S., and K.L. Borden. 2002. Finding a role for PML in APL pathogenesis: a critical assessment of potential PML activities. *Leukemia*. 16:1906-17.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Takata, T., and F. Ishikawa. 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*. 301:250-7.

Tanguay, R.M., Y. Wu, and E.W. Khandjian. 1993. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet*. 14:112-8.

Tanner, K.G., J. Landry, R. Sternglanz, and J.M. Denu. 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*. 97:14178-82.

Tatham, M.H., E. Jaffray, O.A. Vaughan, J.M. Desterro, C.H. Botting, J.H. Naismith, and R.T. Hay. 2001. Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem*. 276:35368-74.

Taunton, J., C.A. Hassig, and S.L. Schreiber. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*. 272:408-11.

Taylor, J.P., J. Hardy, and K.H. Fischbeck. 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*. 296:1991-5.

Tilly, K., H. Murialdo, and C. Georgopoulos. 1981. Identification of a second Escherichia coli groE gene whose product is necessary for bacteriophage morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:1629-33.

Tong, J.J., J. Liu, N.R. Bertos, and X.J. Yang. 2002. Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res*. 30:1114-23.

Turner, J., and M. Crossley. 1998. Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *Embo J*. 17:5129-40.

Vaananen, H.K., H. Zhao, M. Mulari, and J.M. Halleen. 2000. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci*. 113 (Pt 3):377-81.

Valenzuela-Fernandez, A., S. Alvarez, M. Gordon-Alonso, M. Barrero, A. Ursa, J.R. Cabrero, G. Fernandez, S. Naranjo-Suarez, M. Yanez-Mo, J.M. Serrador, M.A. Munoz-Fernandez, and F. Sanchez-Madrid. 2005. Histone Deacetylase 6 Regulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *Mol Biol Cell*.

Van Lint, C., S. Emiliani, and E. Verdin. 1996. The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr*. 5:245-53.

Vannini, A., C. Volpari, G. Filocamo, E.C. Casavola, M. Brunetti, D. Renzoni, P. Chakravarty, C. Paolini, R. De Francesco, P. Gallinari, C. Steinkuhler, and S. Di Marco. 2004. Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:15064-9.

Vaziri, H., S.K. Dessain, E. Ng Eaton, S.I. Imai, R.A. Frye, T.K. Pandita, L. Guarente, and R.A. Weinberg. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*. 107:149-59.

Vega, R.B., B.C. Harrison, E. Meadows, C.R. Roberts, P.J. Papst, E.N. Olson, and T.A. McKinsey. 2004a. Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5. *Mol Cell Biol*. 24:8374-85.

Vega, R.B., K. Matsuda, J. Oh, A.C. Barbosa, X. Yang, E. Meadows, J. McAnally, C. Pomajzl, J.M. Shelton, J.A. Richardson, G. Karsenty, and E.N. Olson. 2004b. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*. 119:555-66.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Verdel, A., S. Curtet, M.P. Brocard, S. Rousseaux, C. Lemercier, M. Yoshida, and S. Khochbin. 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*. 10:747-9.

Verdel, A., and S. Khochbin. 1999. Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem*. 274:2440-5.

Verdin, E., F. Dequiedt, and H.G. Kasler. 2003. Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*. 19:286-93.

Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, E.V. Koonin, and R.J. Deshaies. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. 298:611-5.

Voellmy, R. 2004. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones*. 9:122-33.

Voelter-Mahlknecht, S., A.D. Ho, and U. Mahlknecht. 2005. Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med*. 16:589-98.

Wade, P.A. 2001. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. *Hum Mol Genet*. 10:693-8.

Waltregny, D., W. Glenisson, S.L. Tran, B.J. North, E. Verdin, A. Colige, and V. Castronovo. 2005. Histone deacetylase HDAC8 associates with smooth muscle alpha-actin and is essential for smooth muscle cell contractility. *Faseb J*. 19:966-8.

Wang, A.H., N.R. Bertos, M. Vezmar, N. Pelletier, M. Crosato, H.H. Heng, J. Th'ng, J. Han, and X.J. Yang. 1999. HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol Cell Biol*. 19:7816-27.

Wang, A.H., M.J. Kruhlak, J. Wu, N.R. Bertos, M. Vezmar, B.I. Posner, D.P. Bazett-Jones, and X.J. Yang. 2000. Regulation of histone deacetylase 4 by binding of 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol*. 20:6904-12.

Wang, A.H., and X.J. Yang. 2001. Histone deacetylase 4 possesses intrinsic nuclear import and export signals. *Mol Cell Biol*. 21:5992-6005.

Wang, L., C. Fan, S.E. Topol, E.J. Topol, and Q. Wang. 2003. Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science*. 302:1578-81.

Wang, L., T.V. Nguyen, R.W. McLaughlin, L.A. Sikkink, M. Ramirez-Alvarado, and R.M. Weinshilboum. 2005. Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:9394-9.

Wang, X., N. Grammatikakis, A. Siganou, M.A. Stevenson, and S.K. Calderwood. 2004. Interactions between extracellular signal-regulated protein kinase 1, 14-3-3epsilon, and heat shock factor 1 during stress. *J Biol Chem*. 279:49460-9.

Watamoto, K., M. Towatari, Y. Ozawa, Y. Miyata, M. Okamoto, A. Abe, T. Naoe, and H. Saito. 2003. Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*. 22:9176-84.

Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:169-78.

Welchman, R.L., C. Gordon, and R.J. Mayer. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:599-609.

Westendorf, J.J., and S.W. Hiebert. 1999. Mammalian runt-domain proteins and their roles in hematopoiesis, osteogenesis, and leukemia. *J Cell Biochem*. Suppl 32-33:51-8.

Westendorf, J.J., S.K. Zaidi, J.E. Cascino, R. Kahler, A.J. van Wijnen, J.B. Lian, M. Yoshida, G.S. Stein, and X. Li. 2002. Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol*. 22:7982-92.

Westwood, J.T., and R.A. Steinhardt. 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., E.G. Mimnaugh, B. De Costa, C.E. Myers, and L.M. Neckers. 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*. 91:8324-8.

Wickner, S., M.R. Maurizi, and S. Gottesman. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*. 286:1888-93.

Wiech, H., J. Buchner, R. Zimmermann, and U. Jakob. 1992. Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*. 358:169-70.

Wiederrecht, G., D. Seto, and C.S. Parker. 1988. Isolation of the gene encoding the S. cerevisiae heat shock transcription factor. *Cell*. 54:841-53.

Witzig, T.E., M. Timm, M. Stenson, P.A. Svingen, and S.H. Kaufmann. 2000. Induction of apoptosis in malignant B cells by phenylbutyrate or phenylacetate in combination with chemotherapeutic agents. *Clin Cancer Res*. 6:681-92.

Wu, C. 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11:441-69.

Xavier, I.J., P.A. Mercier, C.M. McLoughlin, A. Ali, J.R. Woodgett, and N. Ovsenek. 2000. Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem*. 275:29147-52.

Xia, W., and R. Voellmy. 1997. Hyperphosphorylation of heat shock transcription factor 1 is correlated with transcriptional competence and slow dissociation of active factor trimers. *J Biol Chem*. 272:4094-102.

Xiao, X., X. Zuo, A.A. Davis, D.R. McMillan, B.B. Curry, J.A. Richardson, and I.J. Benjamin. 1999. HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *Embo J*. 18:5943-52.

Yang, J., S.M. Roe, M.J. Cliff, M.A. Williams, J.E. Ladbury, P.T. Cohen, and D. Barford. 2005. Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *Embo J*. 24:1-10.

Yang, R.C., H.C. Jao, L.J. Huang, S.J. Wang, and C. Hsu. 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*. 296:276-84.

Yang, W.M., S.C. Tsai, Y.D. Wen, G. Fejer, and E. Seto. 2002. Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem*. 277:9447-54.

Yang, X.J., and S. Gregoire. 2005. Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Mol Cell Biol*. 25:2873-84.

Yang, X.J., V.V. Ogryzko, J. Nishikawa, B.H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*. 382:319-24.

Yao, Y.L., W.M. Yang, and E. Seto. 2001. Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*. 21:5979-91.

Yoshida, M., R. Furumai, M. Nishiyama, Y. Komatsu, N. Nishino, and S. Horinouchi. 2001. Histone deacetylase as a new target for cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 48 Suppl 1:S20-6.

You, A., J.K. Tong, C.M. Grozinger, and S.L. Schreiber. 2001. CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1454-8.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Youn, H.D., C.M. Grozinger, and J.O. Liu. 2000. Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. *J Biol Chem*. 275:22563-7.

Yu, C., M. Rahmani, D. Conrad, M. Subler, P. Dent, and S. Grant. 2003. The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood*. 102:3765-74.

Yuki, Y., I. Imoto, M. Imaizumi, S. Hibi, Y. Kaneko, T. Amagasa, and J. Inazawa. 2004. Identification of a novel fusion gene in a pre-B acute lymphoblastic leukemia with t(1;19)(q23;p13). *Cancer Sci*. 95:503-7.

Yura, T., H. Nagai, and H. Mori. 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 47:321-50.

Zaidi, S.K., A. Javed, J.Y. Choi, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, J.B. Lian, and G.S. Stein. 2001. A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J Cell Sci*. 114:3093-102.

Zeremski, M., J.R. Stricker, D. Fischer, S.B. Zusman, and D. Cohen. 2003. Histone deacetylase dHDAC4 is involved in segmentation of the Drosophila embryo and is regulated by gap and pair-rule genes. *Genesis*. 35:31-8.

Zhang, C.L., T.A. McKinsey, S. Chang, C.L. Antos, J.A. Hill, and E.N. Olson. 2002a. Class II histone deacetylases act as signal-responsive repressors of cardiac hypertrophy. *Cell*. 110:479-88.

Zhang, C.L., T.A. McKinsey, J.R. Lu, and E.N. Olson. 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*. 276:35-9.

Zhang, C.L., T.A. McKinsey, and E.N. Olson. 2001b. The transcriptional corepressor MITR is a signal-responsive inhibitor of myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:7354-9.

Zhang, C.L., T.A. McKinsey, and E.N. Olson. 2002b. Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation. *Mol Cell Biol*. 22:7302-12.

Zhang, Y., N. Li, C. Caron, G. Matthias, D. Hess, S. Khochbin, and P. Matthias. 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J*. 22:1168-79.

Zhang, Y., H.H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg. 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev*. 13:1924-35.

Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Omoto, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, S. Hayashi, and H. Iwase. 2004. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 10:6962-8.

Zhao, K., R. Harshaw, X. Chai, and R. Marmorstein. 2004. Structural basis for nicotinamide cleavage and ADP-ribose transfer by NAD(+)-dependent Sir2 histone/protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:8563-8.

Zhao, X., A. Ito, C.D. Kane, T.S. Liao, T.A. Bolger, S.M. Lemrow, A.R. Means, and T.P. Yao. 2001. The modular nature of histone deacetylase HDAC4 confers phosphorylation-dependent intracellular trafficking. *J Biol Chem*. 276:35042-8.

Zhou, X., P.A. Marks, R.A. Rifkind, and V.M. Richon. 2001. Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:10572-7.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Zhou, X., V.M. Richon, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 2000a. Identification of a transcriptional repressor related to the noncatalytic domain of histone deacetylases 4 and 5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1056-61.

Zhou, X., V.M. Richon, A.H. Wang, X.J. Yang, R.A. Rifkind, and P.A. Marks. 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*. 97:14329-33.

Zhu, W.G., and G.A. Otterson. 2003. The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*. 3:187-99.

Zigmond, S.H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 16:99-105.

Zou, J., Y. Guo, T. Guettouche, D.F. Smith, and R. Voellmy. 1998. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*. 94:471-80.

Zuo, J., D. Rungger, and R. Voellmy. 1995. Multiple layers of regulation of human heat shock transcription factor 1. *Mol Cell Biol*. 15:4319-30.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Summary

HDAC6 is a multifunctional enzyme composed of two tandem catalytic domains and an ubiquitin binding domain. It is found primarily in the cytoplasm and is associated with microtubules where it is able to deacetylate Tubulin on lysine 40. Furthermore, cellular management of misfolded proteins and aggresomes is modulated by its action. It also regulates the acetylation of various proteins, such as histones or HSP90, and is involved in several other cellular processes.

First of all, my work describes additional functions of HDAC6 in the stress response. I show that HDAC6 controls HSPs gene activation and the recovery process within the context of the cellular stress response.

The discovery of SE14 domain in the human HDAC6 is an original aspect of this study. This domain is a key element in the retention of human HDAC6 in the cytoplasm.

Moreover i*n vitro* and *in vivo* experiments have shown that the integrity of both deacetylation domains is required for HDAC6 activity.

Finally, I show that HDAC6 is involved in osteoclast differentiation. HDAC6 interacts with mDIA2 and is probably involved in the rearrangement of the Tubulin network during osteoclast maturation.

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

tel-00011701, version 1 - 1 Mar 2006

Résumé

L'histone déacétylase HDAC6 est une enzyme multifonctionnelle possédant deux domaines déacétylases en tandem et un domaine fixant l'ubiquitine. Localisée exclusivement dans le cytoplasme, cette protéine peut déacétyler les microtubules acétylés et participer à la prise en charge des protéines ubiquitinées lors de la formation d'agrésomes. Elle possède également une activité sur d'autres substrats comme les histones ou HSP90, et elle contribue à divers processus cellulaires.

Le travail présenté dans cette thèse décrit un rôle supplémentaire de cette déacétylase dans la réponse après un stress. Il vise à comprendre comment HDAC6 participe dans les mécanismes d'activation des gènes HSPs, et dans les processus de récupération cellulaire à la suite d'un choc thermique.

La découverte d'un nouveau domaine nommé SE14 chez la protéine HDAC6 humaine, présente un dispositif supplémentaire de régulation nucléocytoplasmique pour cette protéine. Ce domaine permet la rétention dans le cytoplasme de cette protéine en renforçant le mécanisme d'export nucléaire.

A coté de ce contrôle, le fonctionnement des deux domaines déacétylases est analysé. Des expériences *in vitro* et *in vivo* confirment l'importance de l'arrangement spatial des deux domaines dans la réaction de déacétylation.

Finalement, ce travail montre que la protéine HDAC6 intervient lors de la différenciation ostéoclastique. Par son activité catalytique sur les microtubules acétylés et grâce à son interaction avec l'effecteur mDIA2, cette déacétylase est impliquée dans la maturation des ostéoclastes.