

## **CAPÍTOL IV**

# CD, NMR AND FTIR ANALYSIS OF THE N-TERMINAL DOMAIN OF HISTONE H1°

## INTRODUCTION

The linker histone H1 has a role in the stabilisation of both the nucleosome and chromatin higher-order structure. Linker histones contain a globular domain flanked by highly basic amino- and carboxy-terminal tails (Hartman et al., 1977). The terminal domains have, in general, little structure in solution. The C-terminal domain acquires, however, a substantial amount of  $\alpha$ -helix in the presence of secondary structure inducers such as TFE and NaClO<sub>4</sub> (Clark et al., 1988), suggesting that binding to DNA could stabilize helical segments in the C-terminal domain. The structures of a turn and of a helix-turn motif belonging to the C-terminal domain have also been determined by high resolution NMR in the presence of inducers (Suzuki et al., 1993; Vila et al., 2000).

The involvement of H1 in the 300 Å chromatin fibre, which presumably limits the access of the transcriptional machinery, led to the proposal that H1 subtypes may function as generalised repressors. More recently, experiments *in vivo* have suggested that H1 may regulate transcription at a finer level, participating in complexes that either activate or repress specific genes (Zlatanova and Van Holde, 1992; Khochbin and Wolffe, 1994; Wolffe et al., 1997b; Bouvet et al., 1994; Shen and Gorovsky, 1996). Some gene-specific effects could be attributed only to the globular domain (Vermaak et al., 1998), while other effects were localised to the tail-like domains (Lee and Archer, 1998; Dou et al., 1999). The structure of the terminal domains of H1 when bound to the DNA is therefore of great importance to the understanding of H1 function.

We have used CD, high resolution NMR and IR spectroscopy to study the structure of the N-terminal domain of the H1 subtype H1° in aqueous and TFE solution and in the complexes with the DNA. The N-terminal domain of H1° presents two distinct subregions, which are also found in other H1 subtypes (Böhm and Mitchel, 1985). The distal half is devoid of basic residues, while the half immediately adjacent to the globular domain is highly basic. The basic cluster is apparently involved in the location and anchoring of the globular domain (Allan et al., 1985).

In order to define the structural features of the N-terminal domain, we have studied two peptides: NH-1, which coincides with the N-terminal domain as defined by trypsin cutting at Lys20, and NH-2, that extends ten residues into the globular domain, but that

lacks the first seven residues of the protein. The peptides have little structure in aqueous solution, but in TFE they acquire a high degree of helical structure, predominantly in the region containing the basic cluster. We show that the interaction with the DNA induces in both peptides an amount of  $\alpha$ -helical structure similar to that observed in TFE.

## MATERIALS AND METHODS

### *Peptide synthesis*

The peptides Ac-TENSTSAPAAKPKRAKASKK-NH<sub>2</sub> (NH-1), and Ac-PAAKPKRAKASKKSTDHPKYSDM-NH<sub>2</sub> (NH-2), were synthesized by standard methods (NH-1 by Neosystem Laboratoire, Strasbourg, France, and NH-2 by DiverDrugs, Barcelona, Spain). Peptide homogeneity was determined by HPLC on Nucleosil C18 (NH-1) and Kromasil C8 (NH-2). The peptide composition was confirmed by amino acid analysis and the molecular mass was checked by mass spectrometry. The sequence of NH-1 corresponds to residues 1 to 20 and that of NH-2 to residues 8 to 30 of histone H1°. The sequence 1-30 is common to the mouse and humans and presents two substitutions in the rat, at positions 7 (Ala → Thr) and 18 (Ser → Ala). The peptides were acetylated and amidated to remove the dipole destabilization effect.

### *Circular dichroism spectroscopy*

Samples for circular dichroism spectroscopy were  $3.7 \times 10^{-5}$  M solutions of the peptide in 10 mM NaCl, 5 mM sodium phosphate buffer, pH 3.5. Samples in aqueous and mixed solvent with different ratios (v/v) of trifluoroethanol/H<sub>2</sub>O were prepared. Spectra were obtained on a Jasco J-715 CD spectrometer in 1 mm cells at 20 °C. The results are expressed as mean residue molar ellipticities,  $[\theta]$ . The helical content was estimated from the ellipticity value at 222 nm,  $([\theta]_{222})$ , according to the empirical equation of Chen et al. (1974):

$$\% \text{helical content} = 100([\theta]_{222} / -39\,500 \times (1 - 2.57/n)),$$

where n is the number of peptide bonds in the helix. The helical length was determined from the NMR data.

### *<sup>1</sup>H NMR spectroscopy*

Samples were routinely prepared as approximately 2.7 mM solutions of the peptide in 90% deuterated TFE /10% H<sub>2</sub>O, 5 mM phosphate buffer, 10 mM NaCl. The pH was adjusted to 3.5 with minimal amounts of HCl or NaOH in water. Sodium 3-trimethylsilyl (2,2,3,3-<sup>2</sup>H<sub>4</sub>) propionate (TPS) was used as internal standard.

Spectra were recorded in a Bruker AMX-600 spectrometer. All 2-dimensional spectra were recorded in the phase-sensitive mode using time-proportional phase incrementation (Marion and Wüthrich, 1983) with presaturation of the water signal. COSY (Aue et al., 1976) and NOESY (Kumar et al., 1980) spectra were obtained using standard phase-cycling sequences. Short mixing times of 150 milliseconds were used in the NOESY experiments to avoid spin diffusion. Spectra were obtained at 25 °C. TOCSY (Bax and Davis, 1985) spectra were acquired using the standard MLEV16 spin-lock sequence with a mixing time of 80 milliseconds. The phase-shift was optimized for every spectrum.

The assignments of the  $^1\text{H}$ -NMR spectra were performed by standard two-dimensional sequence-specific methods (Wüthrich et al., 1984; Wüthrich, 1986).

Quantification of the helix populations on the basis of the up-field shifts of the  $\text{C}^\alpha\text{H}$   $\delta$ -values upon helix formation was carried out according to Jiménez et al. (1993). The average helical population per residue was calculated by dividing the average conformational shift,  $\Delta\delta = \Sigma(\delta_i^{\text{obs}} - \delta_i^{\text{RC}})/n$ , by the shift corresponding to 100% helix formation. Random coil values,  $\delta^{\text{RC}}$ , were those given by Wüthrich (1986). The random coil values used for Ala7, Lys11 and His24 were those given for amino acids followed by Pro (Wishart et al., 1995). A value of -0.39 p.p.m. was used as the shift for 100% helix formation (Wishart et al., 1991). The helical length,  $n$ , was determined on the basis of NOE crosspeaks and conformational shifts, and confirmed by structure calculations.

### *Structure calculations*

Calculations of peptide structures were carried out with the program for torsion angle dynamics DYANA (Güntert et al., 1997). Distance constraints were derived from the 150 ms NOESY spectrum acquired in 90% TFE at 25 °C, pH 3.5. The intensities of the observed NOEs were evaluated in a qualitative way and translated into upper limit distant constraints according to the following criteria: strong NOEs were set to distances lower than 0.3 nm; medium, lower than 0.35 nm, and weak, lower than 0.45 nm. Pseudo atom corrections were set to the sum of the van der Waals radii.  $\phi$  angles were constrained to the range -180° to 0°.

### *Infrared Measurements*

Peptide samples were measured at 4.6 mg/ml. Peptide-DNA complexes contained 6.7 mg/ml of DNA and the appropriate amount of peptide. Samples were measured in 10 mM HEPES, pD 7.0, plus 10 mM NaCl. Prior to sample preparation, the trifluoroacetate counterions were replaced with chlorine ions by five lyophilisations of the peptide in 10 mM HCl. To transfer the samples to D<sub>2</sub>O buffer, the aqueous solution was evaporated in a Speed-vac (Savant) evaporator and then reconstituted in D<sub>2</sub>O.

The spectra were recorded in a Nicolet Magna II 550 spectrometer equipped with a MCT detector using a demountable liquid cell (Harrick Scientific, Ossining, NY) with calcium fluoride windows and 50  $\mu$ m spacers. Typically, 1000 scans for each spectrum, background and sample, were collected and the spectra were obtained with a nominal resolution of 2 cm<sup>-1</sup>, at 22 °C.

Data treatment and band decomposition of the original amide I' have been described previously (Arrondo and Goñi, 1991). Briefly, for each component, four parameters were considered, band position, band height, band width, and band shape. The number and position of component bands was obtained through deconvolution. Initial heights were set at 90% of those of the original spectrum for the bands in the wings and for the most intense component and at 70% of the original intensity for the other bands. In decomposing the amide I' band Gaussian components were used. The baseline was removed before fitting. The curve-fitting procedure was accomplished in two steps: (i) The band position was fixed, allowing width and heights to approach final values, and (ii) band positions were left to change. Band decomposition was performed using CURVEFIT running under SpectraCalc (Galactic Inc., Salem, NH). The fitting result was evaluated visually by superimposing the reconstituted overall curve on the original spectrum and by examining the residual obtained by subtracting the fitting from the original curve. The procedure gave differences of less than 1% in band areas after the artificial spectra were subjected to the curve-fitting procedure.

### *Spectra of peptide-DNA complexes*

Complexes of the CH-1 and CH-2 peptides with mouse DNA and alternating poly[dA-dT]·poly[dA-dT] were prepared. The DNA contribution to the spectra was subtracted using a DNA sample of the same concentration. The symmetric component of the phosphate vibration at 1087 cm<sup>-1</sup> was used to check the accuracy of the subtraction, for this band shows no overlap with other vibrations, it is not substantially

affected by the interaction of the peptide and its intensity is proportional to the DNA concentration. The DNA spectrum was weighted so as to cancel the absorption at  $1087\text{ cm}^{-1}$  in the difference spectra. In addition, spectra of complexes of different peptide to DNA ratios (0.3 and 0.7, w/w) were recorded. The spectra of the peptide was independent of the peptide to DNA ratio of the complex inside the statistical error, indicating that the amide I' region was basically free of alterations due to DNA spectral changes.

## RESULTS

### *CD analysis of NH-1 and NH-2*

We have studied the peptides Ac-TENSTSAPAAKPKRAKASKK-NH<sub>2</sub> (NH-1), which corresponds to the complete N-terminal domain of the histone H1 subtype H1° (residues 1-20) and the peptide Ac-PAAKPKRAKASKKSTDHPKYSDM-NH<sub>2</sub> (NH-2), which partially overlaps with CH-1, but without the first seven residues and which extends ten residues into the adjacent globular domain (residues 8-30).

The CD spectrum of both peptides in H<sub>2</sub>O was dominated by the contribution of the random coil. The mean residue molar ellipticity at 222 nm ( $[\theta]_{222}$ ), taken as criterion of helix formation, was negligible in water. However, the small positive peak at 215 nm, characteristic of the random coil, was not observed, suggesting that a small amount of structure could be present in water (Figure 1). Addition of TFE, which stabilizes peptide secondary structure, increased the negative ellipticity at 222 nm. The helical content of the peptides as a function of TFE concentration was estimated by the method of Chen et al. (1974). CH-2 had a higher helical propensity than CH-1. In 90% TFE solution, the helical populations were estimated to be 17% for NH-1 and 29% for NH-2 (Figure 1).

### *NMR analysis of NH-1 and NH-2*

Figure 2 shows selected regions of the two-dimensional NOE spectrum of NH-2 in 90% TFE, where NOE correlations corresponding to medium-range interactions are indicated. Figure 3 and Tables 1 and 2 summarize all relevant NOE data for the peptides in 90% TFE. The figure also shows the plot of the conformational shifts of the C<sup>α</sup>H protons with respect to the random coil values.

The NMR analysis in 90% TFE confirmed the higher helical propensity of NH-2, as shown by more abundant non-sequential (i, i+3) and (i, i+4) connectivities in NH-2 than in NH-1. In NH-1, a stretch of  $\alpha$ N(i, i+3) connectivities spanned the basic cluster between Lys11 and Lys20. NOE connectivities  $\alpha$ N(i, i+3) between Pro12 and Lys16,  $\alpha$  $\beta$ (i, i+3) between Pro12 and Ala15, and  $\alpha$ N(i, i+4) between Lys11 and Arg14 were also present. The calculation of the amount of helical structure based on the C<sup>α</sup>H chemical shifts gave a value of 17 %. The negative values (about -0.08) of C<sup>α</sup>H<sub>7</sub> for the sequence Ala7-Ala9, together with an  $\alpha$ N(i, i+3) connectivity between Ala7 and Ala9 suggest that the peptide could have a slight helical propensity between Ala7 and



the beginning of the basic cluster at Lys11. However, as shown below, structure calculations based on the distance constraints arising from observed NOE cross-correlations predict helical structure only in the second half of NH-1. Accordingly, we chose Lys11 and Lys19 as the limits of the helical region of CH-1.

The higher helical propensity of NH-2 over NH-1 suggested that the helical element in NH-1 could extend beyond the limit of the N-terminal domain as defined by trypsin cutting at Lys20. Indeed, in NH-2 stretches of  $\alpha\text{N}(i, i+3)$ ,  $\alpha\beta(i, i+3)$ , and  $\alpha\text{N}(i, i+4)$  NOE connectivities, spanning from Lys11 to His24 were observed. The abundance of  $\alpha\text{N}(i, i+4)$  correlations between Lys11 to His24 unequivocally showed the presence of  $\alpha$ -helical structure in this region. The  $\text{C}^\alpha\text{H}$  between Lys19 and His24 were less negative than would be expected from the abundance of medium range cross-correlations in this region. This was probably due to the ring current shift effect produced by the histidine ring system, and precluded accurate calculation of the amount of helical structure of this peptide based on the  $\text{C}^\alpha\text{H}$  chemical shifts.

#### *Structure calculations*

The structure calculations were performed on the basis of the NOE cross-correlations observed in 90% TFE. A set of 42 distance constraints, composed of 25 sequential and 17 medium-range constraints, was used to calculate the three dimensional structure of NH-1. In NH-2, 53 distance constraints, 26 sequential and 27 medium-range, were used. A number of structures were generated for each peptide by using the distance geometry program DYANA (Güntert et al., 1997). The best 20 converged structures were chosen for each peptide. The global RMS deviation of the backbone atoms for this set of structures, excluding the first and last residues, was  $0.322 \pm 0.095$  nm for NH-1 and  $0.230 \pm 0.071$  nm for NH-2. The maximum NOE violations were 0.052 nm and 0.020 nm for NH-1 and NH-2, respectively. A superposition of the backbones of the best 20 selected structures of each peptide is shown in Figure 4.

In NH-1 the region spanning from Lys11 to Lys19 adopts a well defined  $\alpha$ -helical structure. In NH-2, the  $\alpha$ -helical conformation spans from Lys11 to Asp23, with his24 as Ccap. His24 presents an  $\alpha\text{N}(i, i+4)$  cross-correlation with Lys20, but its torsion  $\phi$  ( $-31.7 \pm 1.9$ ) indicates that the  $\alpha$  carbon departs slightly from the helix cylinder, while torsion  $\psi$  is proper of an extended configuration ( $\psi = +95.3 \pm 0.1$ ).

Figure 5a shows a view down the helix axis of the helical region of one of the calculated structures of NH-2. The helix is clearly not amphipathic overall. However, a more careful consideration of the distribution of the basic residues shows that the first three, Lys11, Lys13 and Arg14, are clustered on one side of the helix, while the next three, Lys16, Lys19 and Lys20, are clustered on the other side (Figure 5b).

Some of the calculated structures show the folding in  $\alpha$ -helical conformation of the sequence Lys26-Met30, which is part of the globular domain Helix I (Figure 8a).

#### *Infrared spectroscopy analysis of the NH-1 and NH-2 peptides in solution*

We have used FTIR spectroscopy to study the conformation of NH-1 and NH-2, both in solution and in the complexes with the DNA. IR spectroscopy is particularly well suited to the study of the complexes of DNA with basic peptides since is not affected by turbidity. The number and initial position of the amide I' component bands were obtained by Fourier deconvolution as described (Arrondo and Goñi, 1999) (Figures 6 and 7). Values corresponding to band position and percentage area are given in Tables 3 and 4.

In aqueous ( $D_2O$ ) solution, the amide I' of both NH-1 and NH-2 was dominated by the random coil band at  $1641\text{ cm}^{-1}$  (representing 42% of the total amide I' intensity in NH-1 and 44% in NH-2) (Byler and Susi, 1986). The other main component (29% of the total amide I' intensity in NH-1 and 24% in NH-2) at  $1661\text{ cm}^{-1}$  was assigned to turns. Minor components at  $1674\text{ cm}^{-1}$  were also attributed to turns. Small amounts of  $\alpha$ -helix at  $1651\text{ cm}^{-1}$  were also present (6% in NH-1 and 8% in NH-2).

The amount of  $\alpha$ -helix increased considerably in TFE solution, both in NH-1 and NH-2. In NH-1, the  $\alpha$ -helix amounts to 22% of the total amide I' intensity, while in NH-2 it amounts to 30%. These values are compatible with those estimated by CD. The random coil component decreased reciprocally with the increase of  $\alpha$ -helix. In TFE, the turn components increased moderately in NH-1, while they remained approximately constant in NH-2. The relative intensities of the different turn components varied in the two peptides.

#### *Infrared spectroscopy analysis of the NH-1 and NH-2 peptides bound to the DNA*

We have studied the structure of NH-1 and NH-2 bound to mouse DNA and alternating poly[dA-dT]. poly[dA-dT] (Figures 6 and 7). In the peptide/DNA

complexes, the  $\alpha$ -helix ( $1651\text{ cm}^{-1}$ ) amounts to 18-20% of the total amide I' intensity in NH-1 and 25-26% in NH-2. As the amount of  $\alpha$ -helix in aqueous solution was only 6-8 %, this results indicate that interaction with the DNA stabilizes the helical structure of the peptides. The amounts of helical structure observed in the complexes with the DNA are similar to those observed in TFE solution, by both IR and CD. The contribution of the random coil band at  $1641\text{ cm}^{-1}$  in the complexes was 17-20 %, which is similar to that observed in TFE solution. Turn components were observed at  $1662\text{ cm}^{-1}$ ,  $1672\text{ cm}^{-1}$  and  $1682\text{ cm}^{-1}$ . They amount to between 32% and 40%, depending on the peptide. The complexes of both peptides present a component at  $1630\text{ cm}^{-1}$ , which amounts to 16-17% of the total amide I' intensity. Vibrations at this wavenumber are usually attributed to  $\beta$ -sheets (Surewicz et al., 1993), although they have also been assigned to extended structures (Byler and Susi, 1986) and even to  $\alpha$ -helix vibrations (Tori and Tasumi, 1992). The type of DNA does not appear to affect significantly the properties of the complexes, as the percentages and positions of the different components of the amide I' were similar with poly[dA-dT], poly[dA-dT] and mouse DNA.

## DISCUSSION

The N- and C-terminal domains of histone H1 have little structure in aqueous solution. However, the C-terminal domain of several H1 subtypes acquire variable amounts of  $\alpha$ -helical structure in the presence of TFE and other secondary structure inducers. We have previously characterized by high resolution NMR a helix-turn motif in the C-terminal domain of histone H1<sup>o</sup> (Vila et al., 2000). The structure of the N-terminal domain had not been addressed before, neither in solution nor in the complexes with the DNA. Here, we show that the interaction with the DNA induces a significant amount of  $\alpha$ -helical structure in the N-terminal domain of H1<sup>o</sup>.

The first half of the N-terminal domain of H1<sup>o</sup> is devoid of basic residues, and it is thus not expected to interact strongly with the DNA. In contrast, the second half of the domain is highly basic, with 1 Arg and 5 Lys residues. The proximity of this region to the globular domain suggests that it may contribute to the binding stability of the globular domain in chromatin. The clustering of the basic residues of the N-terminal domain in the vicinity of the globular domain, leaving the rest of the domain free of basic residues, is a common feature of H1 subtypes (Böhm and Mitchell, 1985).

We have studied two peptides: one comprising the twenty residues of the N-terminal domain (NH-1), as defined by trypsin cutting at Lys20, and the other of twenty-three residues, spanning ten residues into the globular domain, and lacking the first seven residues of the protein (NH-2). NH-1 and NH-2 have little structure in aqueous solution. The IR spectrum of both peptides is dominated by the random coil and to a lesser extent by turn conformations, probably in rapid equilibrium with the unfolded state. Small amounts of  $\alpha$ -helix are also present. TFE induces a significant increase in the amount of  $\alpha$ -helical structure in both peptides. NH-2 has a much higher helical propensity than NH-1, with 30% helical structure compared to the 18% of NH-1. When the amount of  $\alpha$ -helix for the entire NH-2 peptide is corrected for the length of the helical region (13 residues), a fractional helicity of 57% is obtained. This relatively high helical propensity explains the abundance of medium range NOE cross-correlations in this region.

The NMR analysis shows that the  $\alpha$ -helix is induced in the positively charged second half of the N-terminal domain. In NH-1, the helical region spans from Lys11 to Arg19. In NH-2, the helical element also begins at Lys11, but it spans until Asp23, with His 24

as Ccap, surpassing the limit of the globular domain as defined by trypsin cutting at Lys20. The N-terminal helix element is thus close to Helix I of the globular domain, which starts at Lys26. The extension of the structural limit of the N-terminal domain beyond the proteolytic limit, together with the proximity of the N-terminal helical element to Helix I reinforces the view that the N-terminal basic cluster and the globular domain of H1 act in concert in chromatin structure (Allan et al., 1986). It is also in favour of considering Helix I as the beginning of the globular domain. The proximity of the N-terminal basic cluster to the DNA at the entry/exit point of the nucleosome is supported by the cross-linking of His25 of histone H5, an avian H1 subtype closely related to H1<sup>o</sup> (Doenecke and Tönjes, 1986), to the terminal regions of chromosomal DNA (Mirzabekov et al., 1990). Figure 8b shows a model structure with the N-terminal domain of H1<sup>o</sup> connected to the globular domain of H5 (Ramakrishnan et al., 1993).

The distribution of the basic residues in the N-terminal helix is not amphipathic overall. However, the basic residues are distributed so that the first three basic residues are on one face of the helix and the next three on the other face. Basic residues are thus distributed in two clusters with opposite orientation. This arrangement, which is generated by helical compaction, seems suited to the cross-linking of non-consecutive segments of DNA and could have a role in the organization of the nucleosomal or the linker DNA in chromatin.

The question is whether the interaction with the DNA induces a significant increase in the helicity of the N-terminal peptides. IR spectroscopy shows that it is indeed the case. The percentages of  $\alpha$ -helix of NH-1 and NH-2 in the complexes are 18-20% and 27-29%, respectively. These percentages are close to those observed in TFE solution and agree well with the different helical propensities of the two peptides. They reflect an important stabilization of the helical structure when compared with the low percentages present in water (6-7%), and demonstrate that the DNA displaces the coil (disordered)\_helix equilibrium towards helix formation. As a low resolution technique, IR spectroscopy cannot, in general, specify which particular residues are in helical conformation, but, since coulombic interactions between basic residues and DNA phosphates promote helical compaction in model and natural peptides (Johnson et al., 1994; Padmanabhan et al., 1997; Vila et al., 2000), it is likely that the minimal region with helical structure in NH-2 is that containing the basic cluster, between Lys11 and Lys20, although, as in TFE, the helical structure could extend to Asp23.

Significant as they are, the percentages of  $\alpha$ -helix in the complexes are, nevertheless, indicative of the presence of alternative modes of binding. Indeed, if the helical elements as defined by NMR in TFE solution were always in a helical conformation in the complexes, the amount of  $\alpha$ -helix should be about 45% for NH-1 and about 56% for NH-2, instead of about 20% and 30%, respectively. These other modes of binding could be at the origin of the component band at  $1630\text{ cm}^{-1}$ , and contribute to those attributed to turns. A possible explanation of the observed values of fractional helicity would be that DNA can only partially mimic the nucleosome environment of the N-terminal domain. However, it cannot be ruled out that the conformational versatility of H1 N-terminal sequences could be operative in chromatin conformational dynamics.

Residue 1	Residue 2	Intensity
$\beta\beta'$ Asn3	NHThr5	Weak
$\beta\beta'$ Asn3	NHSer6	Weak
$\alpha$ Ala9	$\delta$ Pro12	Weak
$\alpha$ Ala9	$\delta'$ Pro12	Weak
$\alpha$ Lys11	$\delta\delta'$ Arg14	Weak
$\delta\delta'$ Lys16	NHSer18	Weak
$\epsilon\epsilon'$ Lys16	NHSer18	Weak

**Table 1.** Summary of side-chain to side-chain and side-chain to main-chain NOE connectivities other than those expected for regular helices ( $\alpha\beta_{i,i+3}$ ) found for the NH-1 peptide in 90% TFE.

Residue 1	Residue 2	Intensity
$\alpha$ Lys19	$\gamma$ H <sub>3</sub> Thr22	Medium
$\alpha$ Ser21	$\delta$ His24	Weak
$\alpha$ Thr22	$\delta$ His24	Weak
$\beta$ Thr22	$\delta$ His24	Weak
$\alpha$ Thr22	$\epsilon$ His24	Weak
$\beta$ Thr22	$\epsilon$ His24	Weak
$\alpha$ Pro25	$\beta\beta'$ Asp29	Medium
NHLys26	$\beta\beta'$ Asp29	Weak
$\alpha$ Tyr27	$\gamma$ Met30	Weak
$\alpha$ Tyr27	$\gamma$ Met30	Weak

**Table 2.** Summary of side-chain to side-chain and side-chain to main-chain NOE connectivities other than those expected for regular helices ( $\alpha\beta_{i,i+3}$ ) found for the NH-2 peptide in 90% TFE.

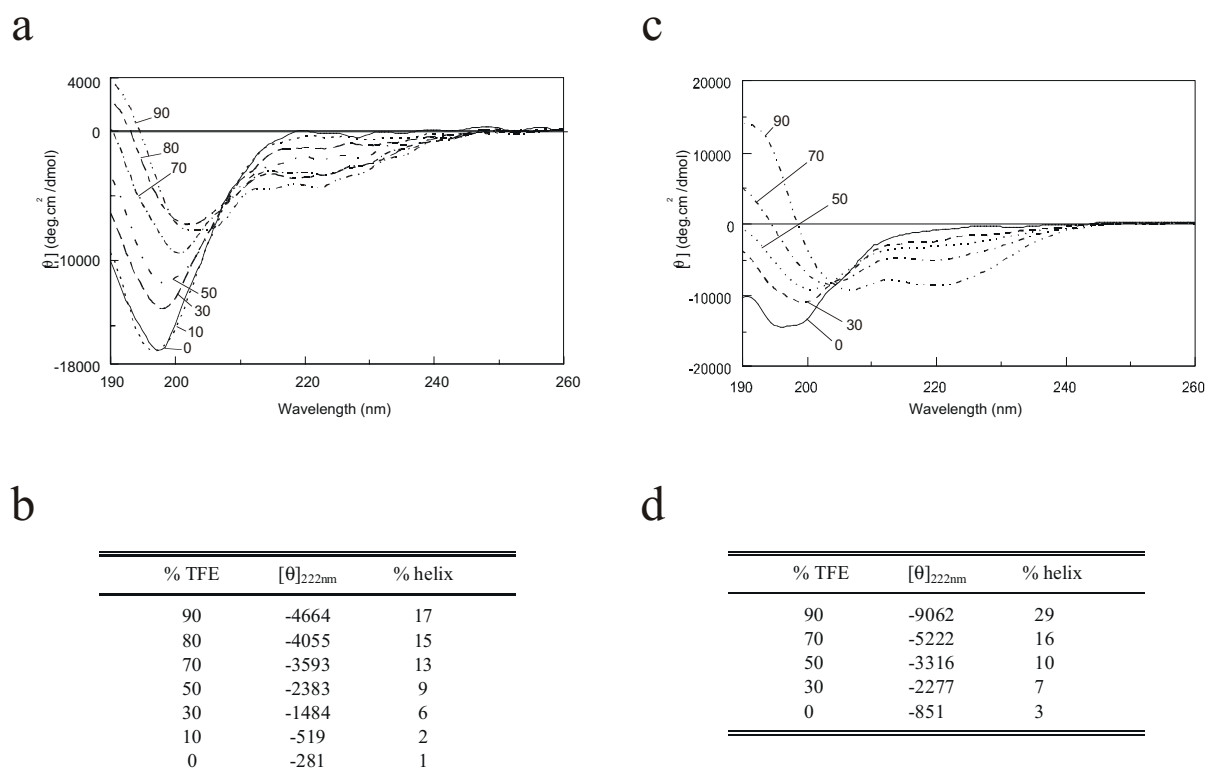


assignment	band position (cm <sup>-1</sup> )	band area (%)			
		D <sub>2</sub> O	90% TFE	NH1 / Mouse DNA	NH1 /p[dA-dT]· p[dA-dT]
β-structure	1632	0	0	17	17
random	1641-42	42	17	18	20
α-helix	1651-53	6	22	18	18
turns	1661-63	29	25	17	17
turns	1672-74	7	19	16	15
turns	1682-85	2	13	8	7

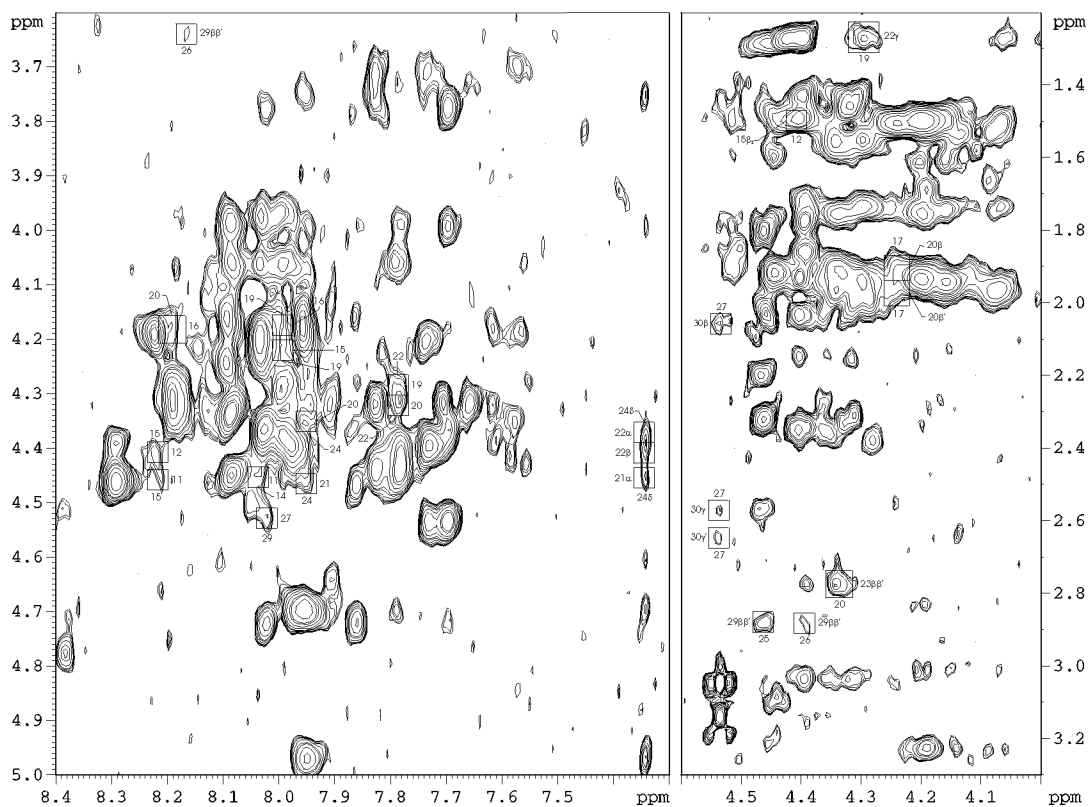
**Table 3:** Band position (cm<sup>-1</sup>) and percentage area (%) corresponding to the assigned components obtained after curve fitting of the amide I' band of the NH-1 peptide in aqueous (D<sub>2</sub>O) and TFE solution and in the complexes with the DNA.

assignment	band position (cm <sup>-1</sup> )	band area (%)			
		D <sub>2</sub> O	90% TFE	NH2 / Mouse DNA	NH2 /p[dA-dT]· p[dA-dT]
β-structure	1629-30	0	9	14	18
random	1640-44	44	25	19	16
α-helix	1651-55	8	32	29	27
turns	1663	24	8	20	17
turns	1672-74	6	16	10	9
turns	1681-84	3	2	6	5

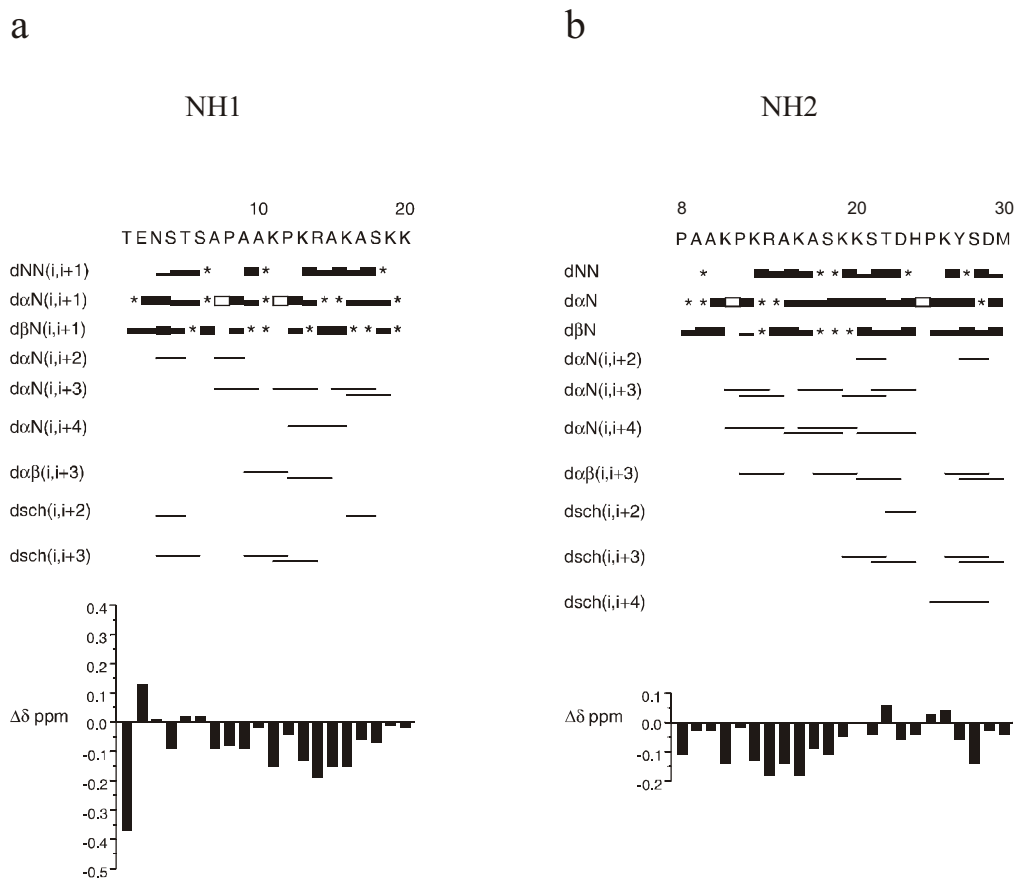
**Table 4:** Band position (cm<sup>-1</sup>) and percentage area (%) corresponding to the assigned components obtained after curve fitting of the amide I' band of the NH-2 peptide in aqueous (D<sub>2</sub>O) and TFE solution and in the complexes with the DNA.



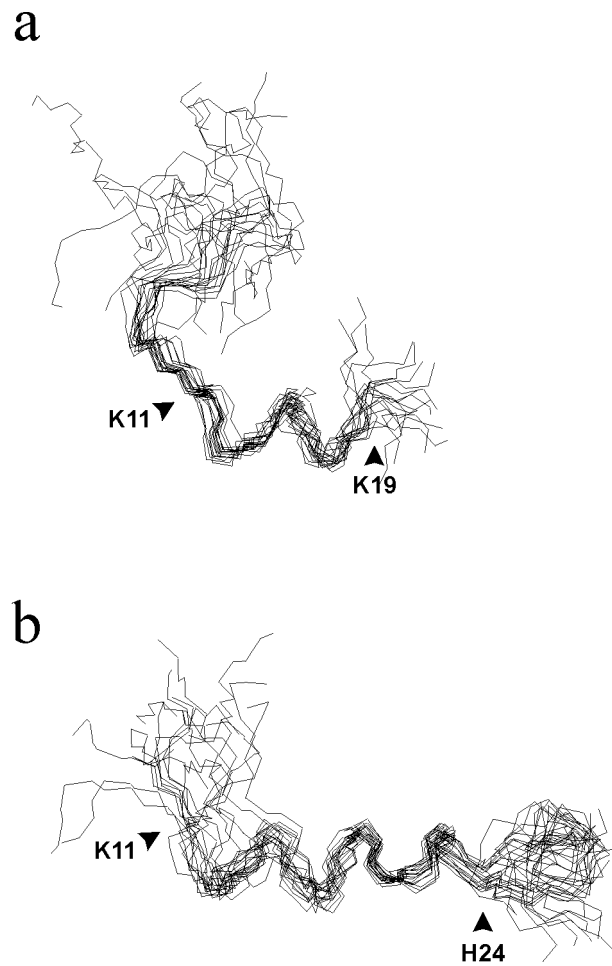
**Figure 1.** TFE-dependent conformational transition of the NH-1 and NH-2 peptides measured by CD. Far ultraviolet CD spectra in the presence of various concentrations of TFE in phosphate buffer 5mM, pH 3.5 at 5 °C. The numbers refer to the TFE concentration in percentage by volume. **a:** NH-1 peptide. **c:** NH-2 peptide. Variation of the mean residue molar ellipticity ( $[\theta]$ ,  $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ) at 222 nm with added TFE. The percentage of helical structure, calculated as described in Materials and Methods is also indicated. **b:** CH-1, **d:** CH-2.



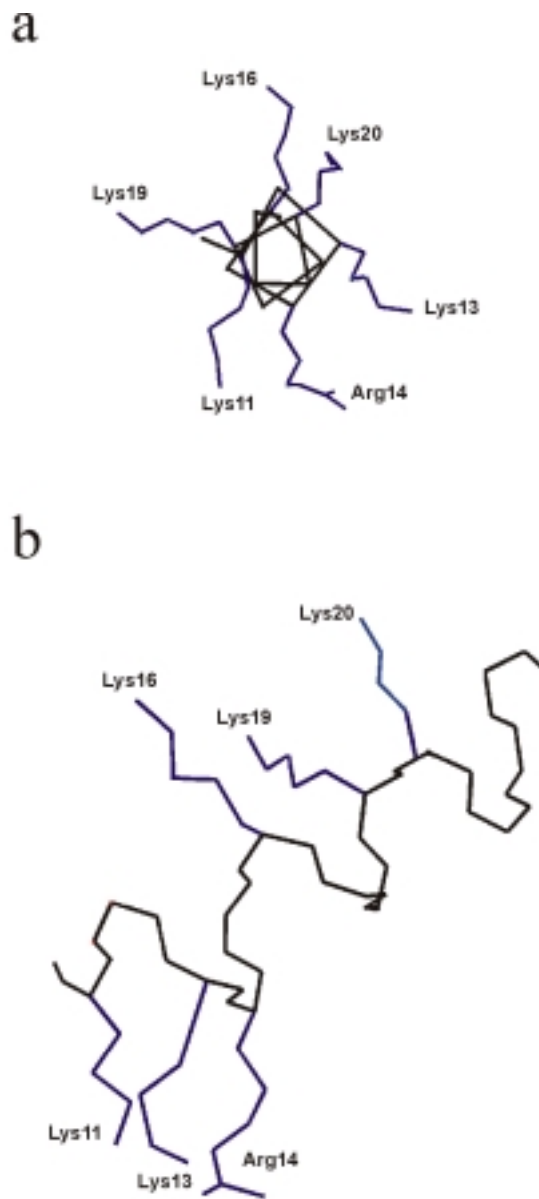
**Figure 2.** Selected regions of the 2-dimensional NOE spectrum of peptide NH-2. The peptide was 2.7 mM, in 90% TFE/10% H<sub>2</sub>O, 10 mM NaCl, 5 mM phosphate buffer, pH 3.5, 25 °C. Mixing time 150 ms. Medium range NOE connectivities are boxed. Left: NOE correlations of C<sup>α</sup>H protons with amide or aromatic resonances. Right: NOE correlations of C<sup>α</sup>H protons with other aliphatic protons.



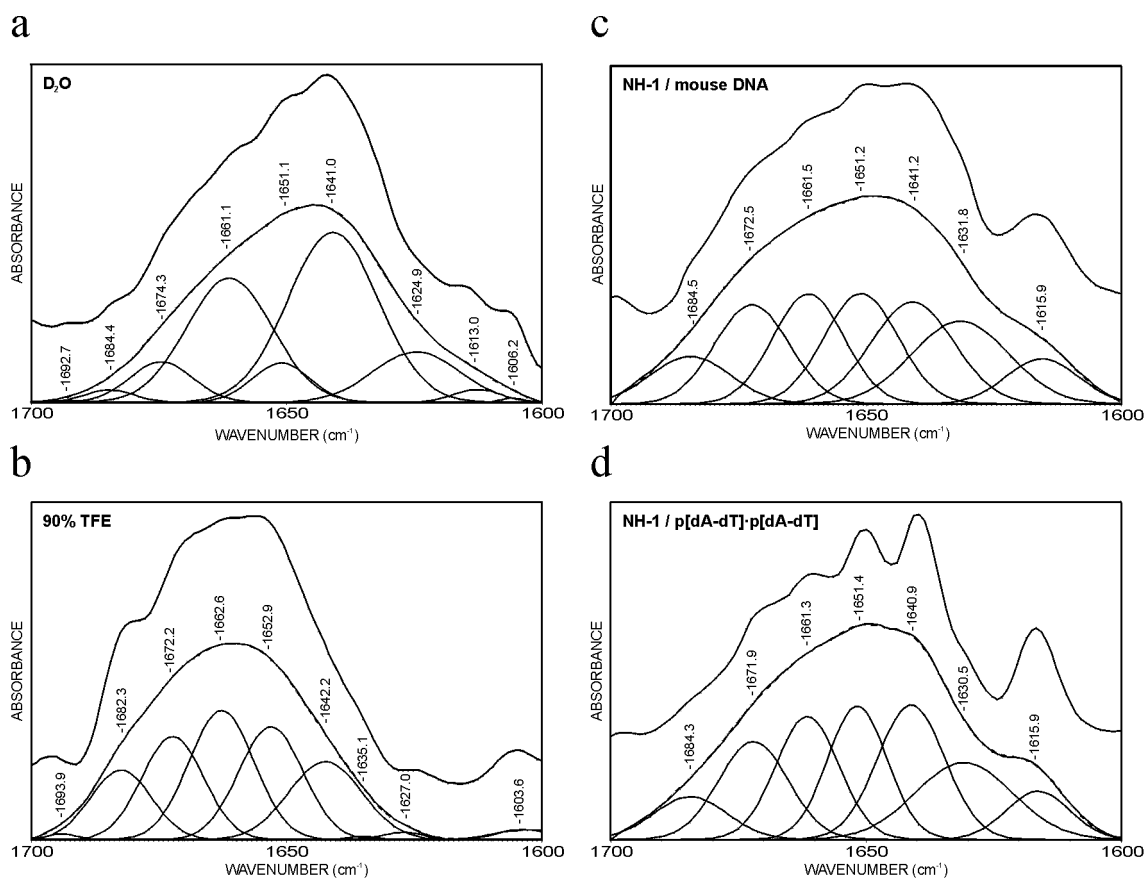
**Figure 3.** NH-1 (left) and NH-2 (right). Sequence and summary of NOE connectivities observed in 90% TFE solution (25 °C, pH 3.5). The thickness of the lines reflects the intensity of the sequential NOE connectivities, i.e., weak, medium, and strong. An asterisk (\*) indicates an unobserved NOE connectivity due to signal overlapping, closeness to the diagonal or overlapping with the solvent signal. An open box indicates a  $d\alpha\delta$  (i, i+1) NOE connectivity, where i+1 is proline, dsch indicates NOE connectivities involving side chains. The aminoacids of the two peptides have been numbered according to the protein.



**Figure 4.** Superposition of the best 20 converged structures calculated with the torsion angle dynamics program DYANA on the basis of the distance constraints derived from observed NOE cross-correlations. a: peptide NH-1. b: peptide NH-2. The limits of the helical conformation are indicated by arrowheads.

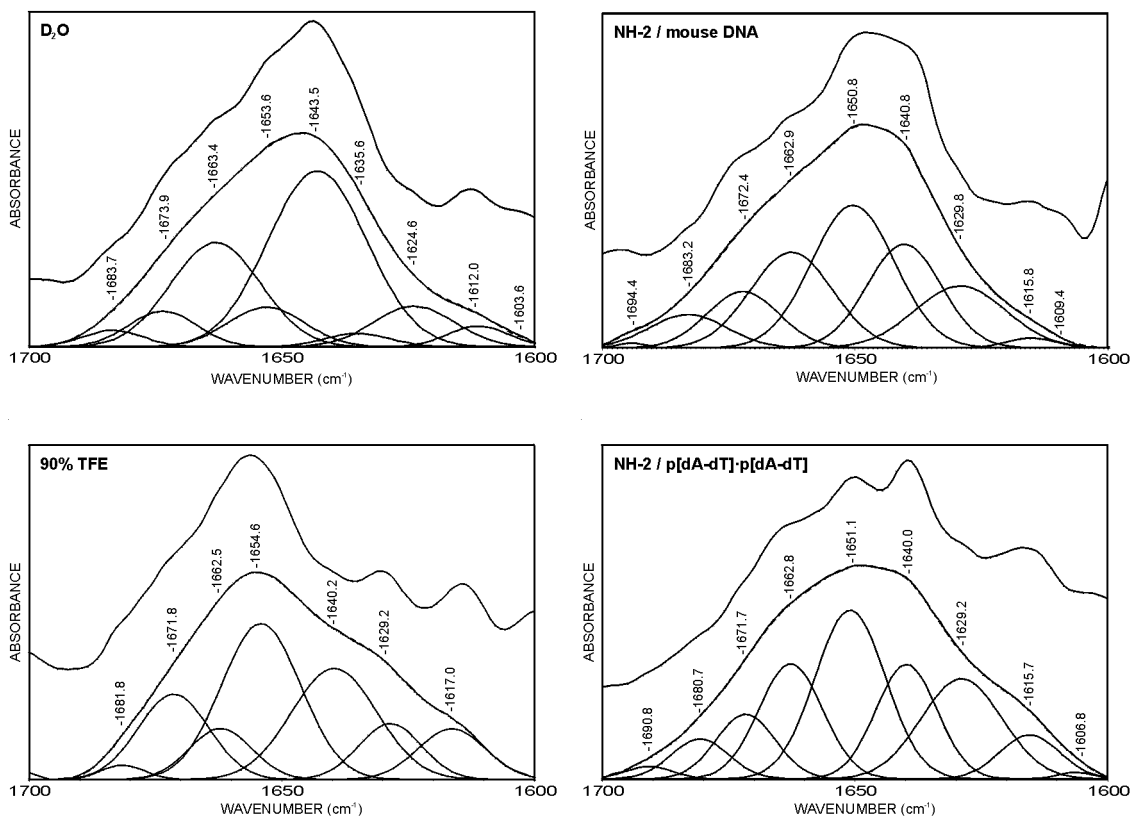


**Figure 5.** Distribution of the basic residues in the helical region of CH-2. a: End view down the helix axis of one of the calculated structures of CH-2. b: Clustering of the basic residues on opposite faces of the helix.



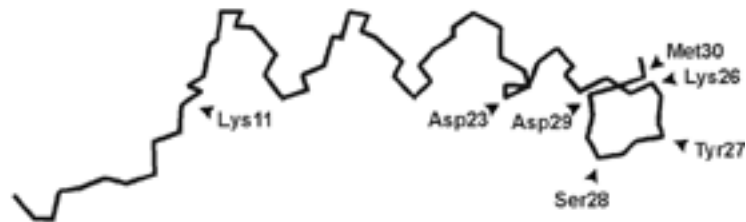
**Figure 6.** Amide I' decomposition of the spectra of the free NH-1 peptide showing the component bands, the envelope and, in dashed lines, the reconstitution of the amide I' band from the components. a: Peptide in D<sub>2</sub>O buffer. b: Peptide in 90% TFE solution. c: Difference spectrum of the complex with mouse DNA. d: Difference spectrum of the complex with poly[dA-dT]. poly[dA-dT]. The dashed and continuous lines are virtually superimposed, because of the goodness of the fit. The Fourier deconvolution of the absorption spectra, that was used to fix the position of the component bands, is included.



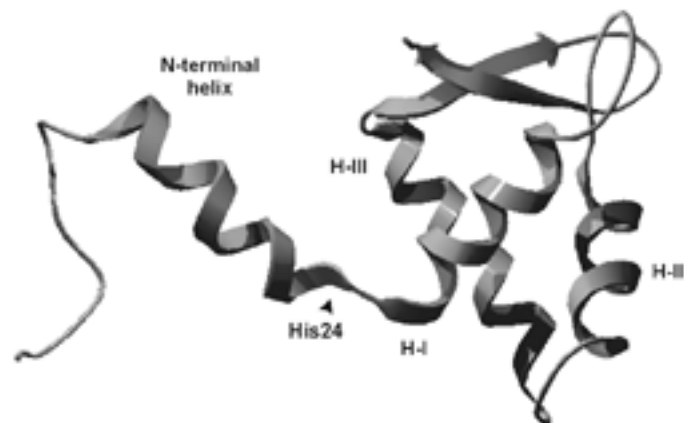


**Figure 7.** Amide I' decomposition of the spectra of the free NH-2 peptide showing the component bands, the envelope and, in dashed lines, the reconstitution of the amide I' band from the components. a: Peptide in D<sub>2</sub>O buffer. b: Peptide in 90% TFE solution. c: Difference spectrum of the complex with mouse DNA. d: Difference spectrum of the complex with poly[dA-dT]. poly[dA-dT]. The dashed and continuous lines are virtually superimposed, because of the goodness of the fit. The Fourier deconvolution of the absorption spectra, that was used to fix the position of the component bands, is included.

a



b



**Figure 8.** Connection of the N-terminal and globular domains. a: View of one of the calculated structures of NH-2 showing the N-terminal helix (Lys11-Asp23) and the first turn of Helix I of the globular domain (Lys26-Met30). b: Model structure of the N-terminal domain of H1 connected to the crystal structure of the globular domain of H5.

**DISCUSSION**

## DISCUSSIÓ

En aquest apartat es pretén, no tant repetir els resultats de cada pèptid, que ja es troben explicats en els capítols anteriors, sinó referir-los de forma conjunta i realitzar una discussió general que els relacioni entre ells i amb la literatura existent. També es formulen algunes hipòtesis sobre el sentit que poden tenir els nostres resultats per a l'estructura de la cromatina.

### **Zones estudiades:**

Els pèptids estudiats ens han permès conèixer l'estructura induïda per TFE i DNA d'algunes zones dels dominis terminals de les histones H1<sup>o</sup> i H1e. Concretament, els pèptids cobreixen les següents regions:

- Tot el domini N-terminal de la histona H1<sup>o</sup>, incloent la seva connexió amb el domini globular. (Pèptids NH1 i NH2).

- La part bàsica del domini N-terminal de la histona H1e, que és la que probablement s'uneix al DNA i la que amb major seguretat té capacitat d'estructurar-se. (Pèptid NHe-1).

- La regió del domini C-terminal de la histona H1<sup>o</sup>, de 23 residus, que segueix al domini globular. Aquesta zona inclou el tram més llarg sense prolina del domini C-terminal. (Pèptid CH1).



Figura 23: Situació dels pèptids estudiats en l'estructura en dominis de les histones H1<sup>o</sup> i H1e.

Les seqüències dels pèptids són les següents:

**NH1** (20 residus): Thr-Glu-Asn-Ser-Ala-Pro-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Arg-Ala-Lys-Ala-Ser-Lys-Lys. Correspon a tot el domini N-terminal de la H1°, idèntic en ratolí i humà.

**NH2** (23 residus): Ac-Pro-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-Arg-Ala-Lys-Ala-Ser-Lys-Lys-Ser-Thr-Asp-His-Pro-Lys-Tyr-Ser-Asp-Met-NH<sub>2</sub>. Correspon als residus 8-30 del domini N-terminal de la H1°, idèntics en ratolí i humà.

**CH1** (23 residus): Ac-Glu-Pro-Lys-Arg-Ser-Val-Ala-Phe-Lys-Lys-Thr-Lys-Lys-Glu-Val-Lys-Lys-Val-Ala-Thr-Pro-Lys-Lys. Correspon als residus 99-121, inclosos en el domini C-terminal de la H1°, idèntics en ratolí i rata.

**NHe-1** (22 residus): Ac-Glu-Lys-Thr-Pro-Val-Lys-Lys-Lys-Ala-Arg-Lys-Ala-Ala-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Lys-Thr-Ser-Gly-NH<sub>2</sub>. Correspon als residus 15-36 del domini N-terminal de la H1° de ratolí.

**Zones que no s'estructuren:**

El comportament dels diferents pèptids estudiats és similar en el sentit que es troben desestructurats en solució aquosa i adquireixen percentatges apreciables d'estructura secundària en presència de TFE. Tanmateix, persisteixen algunes regions aparentment desestructurades fins i tot en 90% de TFE. És el cas dels dos o tres residus dels extrems dels pèptids, com és normal donat que la fluctuació conformacional tèrmica dificulta el manteniment d'una estructura definida en aquesta zona. Per tant, hem de tenir en compte els possibles efectes de tall que poden tenir lloc en els pèptids abans d'emetre veredictes sobre l'estructura d'aquestes regions. És a dir, la llargada de la que es poden extreure conclusions és en general una mica més petita que la llargada del pèptid. També es troben desestructurades regions que separen estructures secundàries, normalment de molts pocs residus. La flexibilitat d'aquestes regions pot ser més o menys gran, essent un cas extrem la gran flexibilitat del doblet de glicines que separa dues hèlixs  $\alpha$  en el domini N-terminal de la histona H1e.

En el domini N-terminal de la H1° s'aprecia una regió d'almenys 6 residus, sense estructura secundària aparent fins i tot en 90% de TFE. Aquesta zona, que coincideix

amb l'extrem N-terminal de la proteïna, no presenta residus bàsics ni prolines. Això fa que probablement no tingui la capacitat d'unir-se al DNA i que probablement tingui una altra funció. No sembla que aquesta regió dirigeixi la localització subcel·lular de la histona (la histona H1 es sintetitza en els ribosomes citoplasmàtics i ha de ser transportada fins el compartiment nuclear). Sembla que és el domini C-terminal el que conté múltiples senyals de transport al nucli en forma de grups de residus bàsics reconeguts pel sistema de transport de les importines (Schwamborn *et al.*, 1998). Concretament, les H1 són dirigides al nucli pel receptor heterodímer importina  $\beta$  / importina 7 (Jakel *et al.*, 1999). També el domini globular sembla ser capaç de dirigir el transport al nucli, però no està clar quins elements ho determinen ni a través de quin sistema. En qualsevol cas, no sembla que el domini N-terminal es trobi implicat en aquesta tasca i la funció de la regió no carregada és desconeguda. En els altres subtipus de la H1 de mamífer s'aprecia també una regió neutre a l'extrem N-terminal (Böhm i Mitchell, 1985), com, per exemple, els 14 residus inicials de la histona H1e, que no hem estudiat perquè probablement tampoc s'estructuren.

La manca d'estructura secundària definida quan els pèptids són estudiats en absència de TFE es pot predir correctament amb el programa de predicció d'hèlixs AGADIR, que es basa en informació sobre la conformació de pèptids en dissolució aquosa (Muñoz i Serrano, 1994). Per contra, quan s'usa el mètode de Chou i Fasman (1974), que es basa en informació conformacional de proteïnes, es prediu que els pèptids s'estructurarien en hèlix  $\alpha$ . Aquesta disparitat de resultats s'explica perquè estem tractant amb motius estructurals induïbles.

Els pèptids aïllats en solució aquosa produeixen espectres que s'allunyen lleugerament dels espectres típics de pèptids totalment desestructurats, amb una llibertat conformacional total. Això s'observa en la forma dels espectres de DC i en la presència de connectivitats NOE dNN ( $i, i + 1$ ) de certa intensitat en RMN. Es tracta de pèptids amb moltes cadenes laterals carregades positivament que lògicament produeixen una repulsió entre elles i limiten la llibertat conformacional del pèptid, com també ho fa la presència de residus apolars que tenen tendència a exposar al mínim les seves cadenes laterals al medi.

### **Amfipaticitat de les hèlixs:**

En totes les regions estudiades, les estructures que observem en presència de TFE són hèlixs, en un cas acompanyada per un gir. Es tracta d'hèlixs  $\alpha$ , excepte els primers quatre residus de l'hèlix estudiada pel domini C-terminal de la H1<sup>o</sup>, que probablement s'estructuren en una hèlix  $3_{10}$ . Les hèlixs no solen incloure prolina excepte entre els seus primers residus, com és habitual segons les estadístiques dels aminoàcids components de les hèlixs (Richardson i Richardson, 1988).

Les hèlixs del domini N-terminal de la H1e i del domini C-terminal de la H1<sup>o</sup> són amfipàtiques, amb totes les cadenes laterals dels residus bàsics situades en una cara de l'hèlix i totes les dels residus apolars en l'altra. En canvi, l'hèlix del domini N-terminal de la histona H1<sup>o</sup> presenta les cadenes laterals dels seus residus bàsics agrupades en dos triplets, un a cada cara de l'hèlix. Aquests dos grups de residus bàsics constitueixen molt possiblement llocs d'unió al DNA, concretament a la cadena de fosfats carregats negativament, donat el seu potencial electrostàtic local tant positiu. El fet que es trobin en dues cares de l'hèlix podria facilitar la unió simultània a dues cadenes de DNA, potser a la cadena que entra i a la que surt del nucleosoma o a dues voltes del DNA nucleosomal per la part externa. No es disposa actualment de cap informació sobre el lloc d'unió precís del domini N-terminal de les H1 que permeti proposar una hipòtesi més concreta. Els dominis N-terminals de la H1 són els dominis més oblidats, tant a nivell funcional, la seva funció concreta és desconeguda, com a nivell estructural, no es coneix res de la seva estructura. En aquesta tesi hem demostrat que els dominis N-terminals de la H1<sup>o</sup> i de la H1e tenen capacitat d'estructurar-se en hèlix  $\alpha$  en regions definides, en presència de TFE i de DNA.

El caràcter amfipàtic de les hèlixs de la majoria dels pèptids, pot ser molt important per a la unió al DNA, ja que s'ha demostrat que la formació d'hèlixs  $\alpha$  induïdes per la unió al DNA en pèptids sintètics curts compostos d'Ala i Lys, requereix que el pèptid pugui formar hèlixs amfipàtiques (Johnson *et al.*, 1994). La concentració de residus bàsics a un costat de l'hèlix defineix, doncs, un lloc d'unió potencial al DNA, probablement al solc ample.

### **El gir TPKK:**

En el domini C-terminal de la histona H1°, s'aprecia un gir induït pel TFE que segueix l'hèlix amfipàtica. El gir inclou residus bàsics i sembla ser un motiu d'unió al DNA. És especialment interessant perquè es tracta d'un motiu TPKK. S'ha demostrat prèviament que les seqüències del tipus (S/T)P(K/R)(K/R) poden adoptar conformacions en gir en pèptids en solució formats per un o dos d'aquests motius (Suzuki *et al.*, 1993). Hem demostrat que el motiu TPKK també adopta una conformació en gir quan es troba a continuació d'una seqüència d'H1 nativa. Per RMN a 90% de TFE s'observen connectivitats NOE característiques d'un gir  $\beta$  tipus (I) i també connectivitats típiques d'un gir  $\sigma$ . Els girs  $\beta$  i  $\sigma$  es podrien trobar en una interconversió dinàmica o combinar-se formant un gir  $\beta\sigma$  amb dos ponts d'hidrogen. Les connectivitats NOE característiques d'un gir  $\sigma$  no s'havien observat en el pèptid TPKK a 90% DMSO. S'observaren, en canvi, en pèptids que començaven per serina i que contenien dues repeticions del motiu (Suzuki *et al.*, 1993). Els nostres resultats suggereixen que les seqüències TPXX també poden adoptar la conformació en gir  $\sigma$ , que no seria, per tant, exclusiva de seqüències que comencen per serina. Això és interessant perquè les seqüències TPXX es troben amb molta freqüència en els subtipus de la H1. Existeixen models per a la unió de motius (S/T)PXX, tant per la conformació de gir  $\beta$  com per la de gir  $\sigma$ , al solc menor del DNA (Suzuki, 1989; Reeves i Nissen, 1990; Suzuki *et al.*, 1993).

Fins ara s'havia proposat que el domini C-terminal de la H1 podia contenir, un cop unit al DNA, hèlixs  $\alpha$  (Clark *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 1989) i girs  $\beta$  (Erard *et al.*, 1990). Els nostres resultats amb CH-1, on es troben presents ambdós elements estructurals, afavoreixen la idea de que tots dos tipus d'estructures secundàries podrien coexistir en el domini C-terminal. Com que les hèlixs  $\alpha$  generalment s'uneixen al solc ample del DNA, i es creu que els motius (S/T)P(K/R)(K/R) s'uneixen al solc estret (Suzuki, 1989; Erard *et al.*, 1990), els nostres resultats suggereixen que el domini C-terminal de la H1° podria unir-se simultàniament al solc ample i a l'estret del DNA.



### **Mecanisme d'acció del TFE:**

Els efectes del TFE en la cadena polipeptídica són variats ja que, si bé presenta una capacitat helicogènica especial, també és capaç de permetre l'estructuració en girs i en estructures  $\beta$  (Buck, 1998). Està actualment ben establert que, per les estructures helicoidals, el TFE revela les tendències conformacionals de la seqüència primària i que l'estructura que adopta un pèptid en TFE sol ser similar a la que adopta quan forma part de la proteïna. En el nostre cas, el TFE també és capaç de revelar l'estructura que adopta el pèptid en unir-se al DNA. Els possibles mecanismes a través dels quals actua el TFE, afectant l'estructura polipeptídica, són: reforçament dels ponts d'hidrogen interns, trencament de l'estructura de l'aigua i solvatació preferent de certs grups de la cadena polipeptídica. En estudis previs amb molècules senceres d'H1 i amb pèptids model, es va assumir que la repulsió entre càrregues positives de les cadenes laterals dels residus devia contrarestar la tendència cap a formar hèlix  $\alpha$  (Walters i Kaiser, 1985; Clark *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1994). Aquesta podria ser la causa de que els pèptids rics en Lys i Arg no s'estructurin plenament fins un 90% de TFE, mentre que, normalment, la resta de pèptids assoleixen la seva màxima estructuració a un 30 o 40% de TFE. La neutralització de les càrregues, però, no sembla suficient per a estructurar plenament els pèptids dels dominis terminals. La naturalesa amfipàtica de les hèlixs suggereix que, en la cromatina condensada, la cara hidrofòbica del pèptid podria participar en interaccions proteïna-proteïna. Barrejat amb l'aigua, el substituent  $CF_3$  del TFE és hidrofòbic. S'ha suggerit que el TFE podria associar-se cooperativament a superfícies hidrofòbiques d'hèlixs amfipàtiques (Buck, 1998), imitant d'aquesta manera un entorn deshidratat.

### **Els límits dels dominis estructurals:**

Tradicionalment s'han definit els dominis estructurals a partir de la digestió tròptica (Hartman *et al.*, 1977). La tripsina talla per residus bàsics, però no pot accedir a l'interior de la zona globular. Definit d'aquesta manera, el domini globular de la H1<sup>o</sup> de ratolí comprèn del residu 21 al 96 i el de la H1e de ratolí del residu 33 al 108. Després d'aquests residus, no existeix cap altre residu bàsic fins al final de l'hèlix I del domini globular. Per tant, la definició tròptica dels dominis és necessàriament poc precisa i pot no respondre exactament a la realitat estructural de la proteïna. En aquest sentit, els nostres resultats demostren que l'hèlix induïble del domini terminal de la H1<sup>o</sup> acaba en el residu 24 i que la segona hèlix del domini N-terminal de la H1e inclou el residu 34 i

probablement també el 35. Després d'aquests residus segueix una prolina en la seqüència de la H1<sup>o</sup> i dues prolines en la H1e, començant a continuació l'hèlix I del domini globular. Nosaltres proposem que aquestes prolines, residus que normalment trenquen les hèlixs  $\alpha$ , defineixen el límit entre els dominis N-terminal i globular. Val a dir que aquesta nova definició dels dominis amb una base més estructural, s'ajusta bastant a algunes definicions dels dominis realitzades a partir d'alineaments múltiples (Sullivan *et al.*, 2000).

### **Estudis de FTIR:**

Els resultats de FTIR dels pèptids de les regions N- i C-terminal de la H1<sup>o</sup> en dissolució aquosa i en presència de TFE coincideixen amb els resultats de DC i RMN. El fet de conèixer les estructures amb alta resolució per RMN, ens han permès realitzar les assignacions de pics de FTIR a estructures concretes amb una major seguretat. El fet que els complexos pèptid-DNA siguin insolubles obliga a l'ús de FTIR i no permet un estudi d'alta resolució. En els espectres dels pèptids en presència de DNA s'observen la majoria de pics importants atribuïts a estructures en TFE, de forma que podem extreure la conclusió general que les estructures que adopten els pèptids quan es troben units al DNA són semblants a les que es poden estudiar a alta resolució en presència de TFE. Varis motius ens porten a poder afirmar això: en primer lloc, els pics principals en TFE i amb DNA coincideixen de forma general en la seva posició i en la seva àrea. Les excepcions a aquesta afirmació són perfectament explicables. Per exemple, la banda a  $1654\text{ cm}^{-1}$  del pèptid CH-1 en 90% TFE, atribuïda a hèlix  $\alpha$ , sembla que sofreix una divisió en dues bandes en presència de DNA, concretament a  $1647$  i  $1657\text{ cm}^{-1}$ . Aquestes dues bandes també són atribuïdes a hèlix  $\alpha$  i les seves àrees sumades s'aproximen a la de l'hèlix en TFE. Una explicació probable és que, en tractar-se d'una hèlix amfipàtica, una cara es troba unida al DNA i presenta unes característiques vibracionals diferents de l'altra, donant lloc cadascuna d'elles a una banda de vibració diferent. És un antecedent en aquest sentit l'aparició simultània de d'una banda a  $1646\text{ cm}^{-1}$  i d'una altra a  $1656\text{ cm}^{-1}$ , ambdues assignades a hèlix  $\alpha$ , en la proteïna GroEL (Galán *et al.*, 2001). En segon lloc, els resultats en presència de DNA són l'estructuració en hèlixs  $\alpha$  i girs en uns percentatges que no donen gaire marge en quant a les regions possibles, si tenim en compte que l'estructuració en hèlixs de menys d'una volta no té sentit i que els extrems dels pèptids difícilment s'estructuraran. Si, a més,

acceptem que probablement s'estructuraran per DNA les regions que s'hi uneixen físicament, és a dir, que disposen de residus bàsics, pràcticament reduïm les possibilitats a les regions estructurades en TFE i estudiades en profunditat per RMN. També és important tenir en compte que el TFE és un potent inductor de l'estructura en hèlix  $\alpha$ , de forma que difícilment una regió que tingui capacitat d'estructurar-se en hèlix no ho farà en 90% de TFE i, si així fos, tindria una propensió a estructurar-se molt menor que les que són detectades.

Per altra banda, sempre es pot argüir que en l'espectre final dels complexos potser existeix una contribució del DNA que no ha estat eliminada. Això podria donar-se per un factor de resta inadequat o perquè l'espectre del DNA sofreixi canvis en presència del pèptid. S'han realitzat tota una sèrie de passos i controls amb la finalitat de poder afirmar que, si existeix una contribució del DNA en l'espectre final tractat, aquesta és tant petita que no influeix en les nostres conclusions. En aquest sentit, les nostres conclusions es basen en característiques més aviat generals dels espectres i mai en canvis petits en la posició i àrea dels pics. Les restes s'han realitzat sempre utilitzant com a referència interna la component simètrica de la vibració dels fosfats, que apareix com una banda a  $1087\text{ cm}^{-1}$  que és proporcional a la concentració del DNA, no es superposa amb altres vibracions i no és fonamentalment afectada per la interacció amb el pèptid. S'ha realitzat varies vegades la prova de sobreestar i subestar lleugerament el DNA, sempre en referència a la banda de la vibració simètica dels fosfats, per comprovar que els efectes en la zona d'absorció del pèptid són molt petits. També s'ha utilitzat DNA de seqüències diferents, obtenint-se uns resultats finals molt semblants, amb diferències despreciables per les nostres conclusions. Això és important si es té en compte que els diferents DNA utilitzats aïllats donen espectres de FTIR característics i diferents entre ells, de forma que, si contribuïssin en l'espectre final del complex, la seva influència seria probablement diferent. Un altre control ha estat realitzar l'espectre, i tot el tractament posterior, de complexos a diferent relació pèptid/DNA. Els resultats són pràcticament idèntics, descartant-se una altra vegada influència del DNA, exceptuant el pic a  $1616\text{ cm}^{-1}$  en NH1 i NH2, que varia en la seva àrea. Aquest resultat indica una possible contribució en aquest pic del DNA, pic que de tota manera no és atribuïble a cap estructura secundària del pèptid.

Dels resultats de FTIR amb els complexos pèptid-DNA se n'extreu la conclusió que els dominis terminals de la H1°, tant el carboxi- com l'aminoterminal, s'estructuren en unir-se al DNA, almenys en les condicions estudiades. Aquesta conclusió és

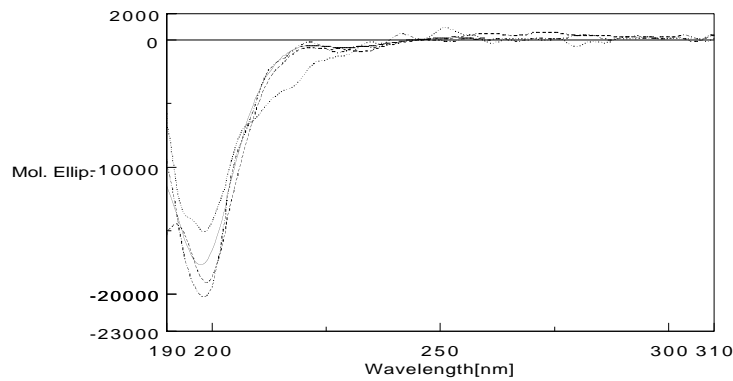
perfectament lògica si tenim en compte la funció principal d'aquests dominis, almenys del carboxi-terminal, que és unir-se al DNA internucleosomal i provocar la condensació de la cromatina. El pas de la fibra d'11nm a la de 30nm és sinònim de l'ordenació i orientació del DNA internucleosomal, que adquireix una estructura desconeguda però necessàriament més limitada que en la fibra d'11nm. Això, al seu torn sembla que hagi d'implicar que els dominis terminals de les histones H1, que estan units a aquest DNA i en provoquen el canvi estructural, també s'estructurin.

### **Naturalesa dels complexos pèptid-DNA:**

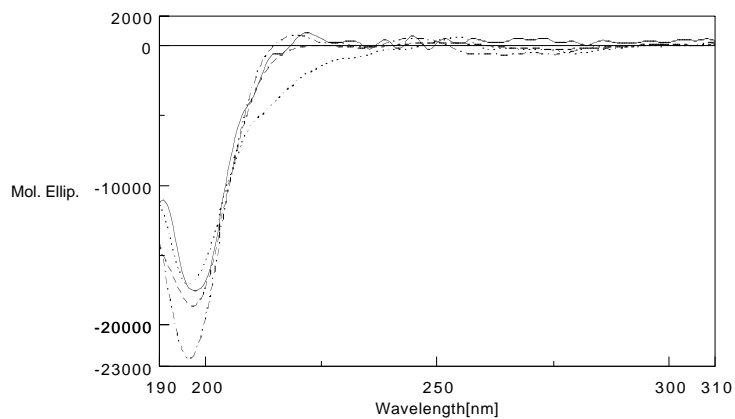
Espectres de DC de diferència de complexos pèptid/DNA realitzats per diferents autors (Wellman, 1996; Böhm i Creemers, 1993; Erard *et al.*, 1990; Creemers *et al.*, 1992; Khadake *et al.*, 1997a; Verdaguer *et al.*, 1993) utilitzant diferents pèptids de dominis terminals d'histona H1 mostren sempre que els pèptids s'uneixen de forma desestructurada, amb espectres molt similars als dels pèptids lliures o amb molt petites variacions, que en cap cas s'aproximen als espectres dels pèptids en TFE. Amb els pèptids que estudiem en aquesta tesi i amb pèptids d'altres de regions terminals d'histona H1 en presència de DNA, hem realitzat múltiples experiments de DC en una gran varietat de condicions i no hem observat una estructuració comparable a la que produeix el TFE (resultats presentats anteriorment en la tesina. Es mostren a continuació exemples d'espectres pels pèptids CH-1 i NH-1 en presència de DNA (Figura 24)).

S'ha de tenir en compte que els experiments de DC es realitzen amb mostres a una concentració molt més baixa que els de FTIR i que a relacions baixes pèptid/DNA el complex es manté soluble. En canvi, a relacions pèptid/DNA majors, es produeix el mateix agregat observat en els experiments de FTIR i l'espectre de DC canvia totalment, sense permetre cap interpretació sobre l'estructura del pèptid. Per tant, sembla que els pèptids també es poden unir de forma desestructurada al DNA nu, concretament a baixes concentracions de complex i a relacions pèptid/DNA baixes, és a dir, mentre el complex es manté soluble.

A)



B)



**Figura 24:** Espectres de DC de diferència dels pèptids (A) CH-1 i (B) NH-1 sols (línia contínua) i units a diferents tipus de DNA: DNA de salmó (línia discontinua); DNA p[dA].p[dT] (línia puntejada) i DNA p[dA-dT].p[dA-dT] (línia de punts i ratlles). En tots els casos la concentració dels pèptids és de 0,125g/l i la relació pèptid/DNA en pes de 0,5. Tots els espectres s'han realitzat en tampó fosfat 5mM, pH 7,0 i 10mM NaCl a 5°C. Les unitats dels eixos de les ordenades són  $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$  de residu.

Resumint, sembla que els pèptids es poden unir al DNA desestructurats (no estructurats en hèlix ni estructures  $\beta$ ) o estructurats en hèlixs i girs; si ho fan estructurats, es produeix un agregat insoluble. És una dada interessant el fet que hem

observat per tots els pèptids que l'agregació del complex es produeix invariablement a partir de relacions pèptid/DNA que permeten la neutralització de càrregues, és a dir, a una relació de càrrega positiva/càrrega negativa d'aproximadament 1. És conegut que al produir-se una neutralització de càrregues total del DNA, aquest precipita espontàniament. Els pèptids estirats difícilment permeten una neutralització eficaç de les càrregues dels fosfats del DNA, perquè presenten les càrregues positives de les seves cadenes laterals separades per distàncies molt majors que la distància fosfat-fosfat. En canvi, els pèptids estructurats s'escurcen com una molla i les càrregues positives s'agrupen a una cara de les hèlixs amfipàtiques de forma que es pot produir fàcilment la neutralització de càrregues d'una regió curta de DNA.

Això no explicaria, però, que els pèptids no siguin capaços d'estructurar-se a relacions baixes de pèptid/DNA. L'explicació pot ser la següent: si un pèptid s'estructura en una hèlix amfipàtica i s'uneix al DNA, la cara hidrofòbica de l'hèlix quedarà exposada al medi, produint-se un gran cost entròpic en l'estructura. El pèptid només podria estructurar-se si la seva concentració fos suficient com per a que fàcilment dos pèptids estructurats aproximïn les seves regions hidrofòbiques, amagant-les del medi. Això produiria un entrecreuament de cadenes de DNA que explicaria l'agregació. Aquesta hipòtesi implicaria que l'estructuració dels dominis terminals de la H1 en hèlixs amfipàtiques requereix la neutralització de la cara bàsica i la no exposició al medi aquós de la cara hidrofòbica. Ja hem comentat que el TFE pot tenir un efecte en aquests dos sentits.

Quines serien les implicacions d'aquest model d'unió al DNA per la funció *in vivo* dels dominis terminals, especialment pel carboxi-terminal, la funció del qual està més clara? En primer lloc, l'entorn en el que els dominis terminals de la H1 realitzen la seva funció són similars als que afavoreixen l'estructuració dels pèptids: presència de DNA nu, el DNA internucleosomal, i altíssimes concentracions locals de pèptid i DNA. La condensació de la cromatina provoca probablement una exclusió de molècules d'aigua, de forma que les cares hidrofòbiques es trobarien en un medi més adequat, amb la presència d'altres proteïnes molt properes i dominis terminals d'altres H1 que permetrien interaccions proteïna-proteïna. La condensació de la cromatina no deixa de ser una agregació ordenada.

El fet que els dominis terminals de la H1 es trobin habitualment desestructurats i s'estructurin per a realitzar la seva funció pot respondre a la seqüència temporal de la funció en dominis de la histona. En primer lloc ha d'actuar el domini globular, que

posseeix una preferència d'unió pel DNA nucleosomal. És molt important que aquest domini s'uneixi exactament allí on ho ha de fer, damunt de la partícula nucli i posteriorment facin la seva funció els dominis terminals, unint-se al DNA internucleosomal. Per tant, és el domini globular el que dirigeix la interacció amb el DNA i presenta el lloc exacte d'unió als dominis terminals. Si els dominis terminals es trobessin constantment estructurats, la seva concentració local de càrregues positives produiria una alta afinitat inespecífica pel DNA que resultaria en la unió de la H1 a qualsevol regió del DNA, impedit la funció del domini globular. En canvi, els dominis terminals desestructurats presenten les càrregues més repartides i, en conseqüència, una afinitat menor pel DNA que potser no interfereix amb la selectivitat d'unió del domini globular. La correlació entre major afinitat pel DNA i major densitat de càrrega del lligand lliure ha estat profundament estudiada amb pèptids model rics en lisina (Padmanabhan *et al.*, 1997).

El model que hem anat perfilant i que estaria d'acord amb els nostres resultats seria, resumint, el següent: la histona H1 en solució presentaria els dominis terminals desestructurats i el domini globular dirigiria la unió específica amb el DNA nucleosomal. Un cop unida la histona, els dominis terminals, tot el C-terminal i probablement també la regió del N-terminal propera al domini globular, s'unirien al DNA internucleosomal. Tot i que en determinades condicions aquests dominis terminals es podrien unir al DNA de forma desestructurada, en la cromatina i en condicions fisiològiques s'unirien al DNA de forma estructurada. S'estructurarien en hèlixs bàsiques amfipàtiques o que mostren grups de lisines i en girs amb residus bàsics. Les hèlixs probablement s'unirien al solc ample del DNA internucleosomal i els girs al solc estret. La unió dels dominis terminals estructurats desencadenaria la condensació de la cromatina, probablement a través d'una sèrie de processos i reorganitzacions estructurals en els que estarien implicades moltes propietats de tots els components de la cromatina.