

---

# 4

---

## RESULTADOS

---

### 4.1 PURIFICACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1

#### 4.1.1. Purificación salina de las histonas H1 por cromatografía de intercambio catiónico.

La histona H1 ha sido extraída selectivamente de núcleos lisados, por diferentes métodos que incluyen extracción con protaminas, tRNA y ácidos. La extracción más usada es la ácida, pero puede tener efectos sobre su estructura y afectar las propiedades de condensación de la cromatina (Khadake and Rao, 1995). Para evitar este tipo de efectos, en esta tesis se ha puesto a punto un método de extracción salina basado en el método descrito por García-Ramírez *et al.* (1990), en el cual se introdujeron varias modificaciones. Los primeros ensayos de purificación de la H1 total se realizaron con núcleos de hígado de rata; a pesar del uso de inhibidores, las proteasas degradaban una gran proporción de las proteínas, por esta razón se decidió realizar la purificación a partir de núcleos de cerebro de rata que presentan menor actividad proteolítica.

Estudios previos sobre los cambios de las proporciones de los subtipos de la H1 durante el desarrollo postnatal (Piña *et al.* 1984; Piña *et al.* 1987) mostraron que los subtipos H1a y H1b se encuentran en mayor proporción en el cerebro de ratas jóvenes, mientras que su contenido disminuye considerablemente en ratas de más de 30 días. La H1<sup>o</sup> se acumula en neuronas en proceso de diferenciación; es decir, a partir de 10 días. Los subtipos H1c, d y e, aunque también se encuentran en diferente proporción según el grado de desarrollo del tejido, son los más abundantes a cualquier edad. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se purificaron los núcleos de cerebro de dos

grupos de edad (ratas albinas de la cepa OFA, Sprague Dawley), de 15 días para la posterior purificación de H1a y H1b y 30 días o más para purificar la H1°.

Los núcleos, obtenidos tal como se indica en Materiales y Métodos, se resuspendieron en CM x 1 con CaCl<sub>2</sub> mM para comprobar con el microscopio que se encontraran en buen estado. En este paso siempre se tomó una alícuota de la disolución de núcleos para medir la absorbancia del DNA a 260 nm para calcular su concentración y controlar el rendimiento de la purificación de la proteína.

La concentración del DNA se calculó con la fórmula  $[DNA] = [A_{260} - 1.83 (A_{320})] / 20$  mg/ml, que tiene en cuenta la turbidez de la muestra. Las digestiones se realizaron con 5µl de nucleasa micrococcal (0.5 unidades/µl) durante 10 minutos a 37 °C. Si el tiempo de digestión se prolonga, baja el rendimiento de la purificación.

Con el propósito de romper los núcleos y liberar la cromatina, los núcleos se resuspendieron en EDTA 1mM/Tris 10 mM a pH 7.4 y se realizó una diálisis frente al mismo tampón durante toda la noche.

Después de recuperar la cromatina soluble en el sobrenadante por centrifugación, con el microscopio se observaban los restos nucleares del sedimento y se comprobó que en éste sedimento todavía quedaban algunos núcleos sin romper. Con el fin de mejorar el rendimiento el sedimento se resuspendió en el tampón de diálisis, se sonicó y se prosiguió con la separación de las histonas.

Se ajustó la concentración de la cromatina solubilizada a 0.35 M NaCl y se añadió CM-Sephadex C-25 para desplazar de la cromatina las proteínas cargadas positivamente. Se realizaron varios ensayos para determinar la cantidad adecuada de gel, que fue de 24 mg/ml de suspensión. El CM-Sephadex C-25 siempre se añadió hidratado.

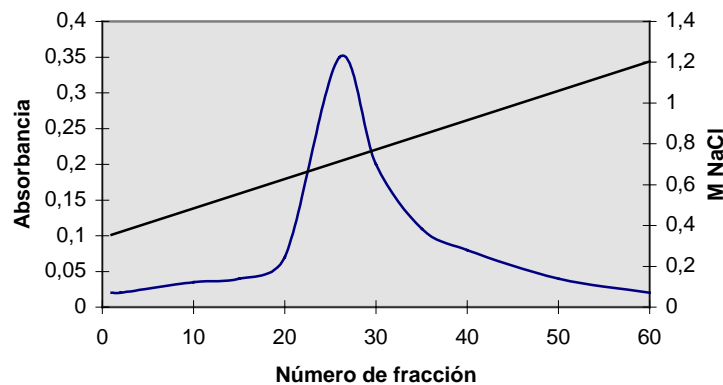
Después de lavar las bolas de CM-Sephadex C-25 cuatro o cinco veces con NaCl 0.35 M/Tris 10 mM, éstas se cargaron en una columna de Sephadex G-25, previamente equilibrada con NaCl 0.35 M/Tris 10 mM/pH 8.8.

La elución de las proteínas se realizó con un gradiente lineal de 0.35 M NaCl a 1.2 M NaCl con un flujo de 1 ml/min. El perfil de elución se registró a 226 nm (con un detector Unicord SII de Pharmacia-Biotech) (Fig. 4.1 a). Se observa un solo pico que eluye a partir de 0.6 M NaCl, teniendo el máximo a 0.7 M.

Se recogieron fracciones de 1 ml que se analizaron en geles de poliacrilamida con SDS. Las bandas más intensas corresponden al máximo del pico observado en el perfil de elución, (carril 9, 10 Fig.4.1 b).

a)

## Perfil de elución de la H1 total



b)



Figura 4.1. a) Perfil de la cromatografía de intercambio catiónico en columna de CM-Sephadex de la separación la H1 total del cerebro de rata. La elución se realizó con un gradiente lineal de 0.35 M a 1.2 M NaCl/Tris 10 mM, pH 8.8; se recogieron fracciones de 1ml. b) Análisis en SDS-PAGE (15% de poliacrilamida) de las histonas eluidas del CM-Sephadex

En el patrón de bandas observado en el gel de poliacrilamida con SDS, la banda con menor movilidad electroforética contiene los subtipos H1b, H1d y H1e. Por debajo de ésta corre, con una movilidad ligeramente superior, la H1a. La siguiente banda corresponde a la H1c y por último aparece la H1°. Aunque la electroforesis en geles que contienen SDS separa proteínas de acuerdo a su peso molecular, las histonas realizan contribuciones sustanciales a la carga de sus complejos con SDS y tienen un comportamiento anómalo. Las histonas H1 con un verdadero peso molecular entre 20 y 22 Kd, migran como un grupo de bandas de peso molecular aparente entre 30 y 35 Kd. La electroforesis se realizó en geles del 15 % de acrilamida; a esta concentración se obtiene una mejor resolución de las histonas H1 de rata y humanos (Lennox and Cohen,

1989), mientras que las de ratón se resuelven mejor al 12%, además otras concentraciones pueden ser útiles para separar histonas H1 de otras especies.

Es interesante observar que la H1a (carril 8 Fig.1b) eluye a una concentración 0.6 M NaCl, mientras que la H1° eluye al final del pico, a concentración 0.8 M (carriles 12, 13, 14 de la figura 1b). La elución más rápida de la histona H1a indica una menor afinidad de este subtipo por el CM-Sephadex; indicando un mecanismo de separación electrostático, con la mayor carga positiva en los subtipos que eluyen al final. Si en la cromatografía de intercambio catiónico las proteínas son eluidas en orden creciente de la carga neta positiva, nosotros ensayamos gradientes más planos con el fin de separar algún subtipo, pero no fue posible obtenerlo con suficiente pureza.

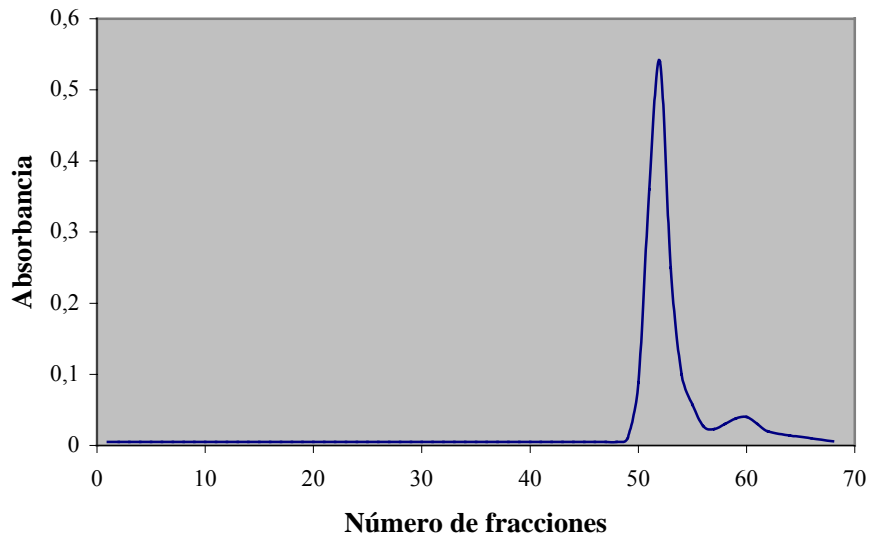
Después del análisis electroforético las histonas se dializaron frente a ácido acético al 1%, se liofilizaron y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Siempre se tuvo la precaución de abrir los tubos únicamente cuando era necesaria la utilización de las histonas, con el propósito de evitar posibles alteraciones o deterioro ocasionados por la condensación de humedad (Cole, 1989).

### **4.1.2. Purificación de la H1° por filtración en gel**

La separación de la H1° se realizó a partir de H1 total purificada de cerebro de ratas de 30 días ó más, en los cuales la H1° se encuentra en mayor proporción (Piña *et al.* 1987). Para separar la H1° de la mezcla de H1 total se utilizó una columna de Biogel P100 de 160 cm de longitud y un diámetro de 2 cm. Se cargaron entre 1.25 y 3 mg de H1 total disueltos en 2 ml de urea 4 M/HCl 10mM. La elución se realizó con HCl 10 mM/azida 0.02%, a temperatura ambiente, un flujo de 10 ml/hora y se recogieron fracciones de 3.5 ml. El perfil de elución se registró a 226 nm, con un registrador REC 101 de Pharmacia-Biotech, (Fig. 2a) y las fracciones eluidas se analizaron en geles de poliacrilamida con SDS (Fig. 2 b). La mezcla de histonas H1a,b,c,d,e se observa en los carriles 4, 5, 6, 7, 8. La H1° se observa en los carriles 11, 12, 13 y 14. la mezcla de histonas (excepto la H1°) empezó a eluir a los 166 ml y se recogió en un volumen de 17ml (fracciones 50-54); la H1° empezó a eluir a los 190 ml y se recogió en un volumen de 14 ml (fracciones 57- 60). Posteriormente la H1° así purificada se dializó frente a tampón fosfato y se liofilizó.

La H1° se disolvió en H<sub>2</sub>O. Al centrifugar se observó la presencia de precipitados. Posiblemente como consecuencia de la purificación con ácido clorhídrico, el dominio globular de la proteína se desnaturalizó y originó agregados. Para asegurar la correcta

a)

**Perfil de elución de la H1°**

b)

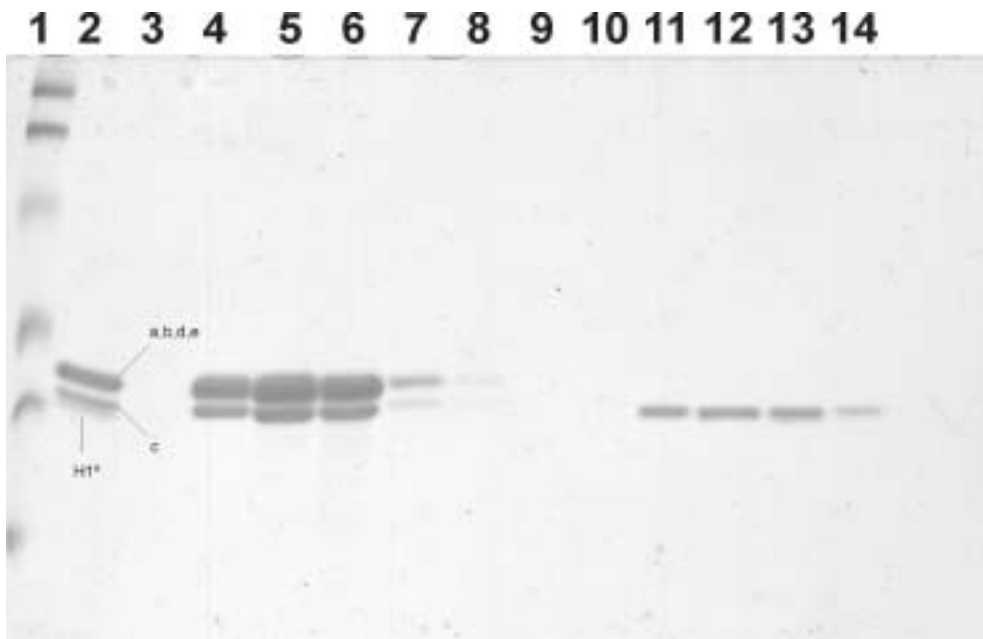


Figura 4.2. a) Perfil de elución de la purificación de la H1° por gel filtración usando Biogel P100. La elución se realizó con HCl 10mM/azida sódica 0.02% a un flujo de 10 ml/hora. Se recogieron fracciones de 3.5 ml. El primer pico corresponde a la mezcla de histonas H1a,b,c,d,e y el segundo pico corresponde a la H1°. b) Análisis en SDS-PAGE de la H1°. Las fracciones 50-54 corresponden a los carriles 4,5,6,7,8 (primer pico). Las fracciones 57 a 60 corresponden a los carriles 11,12,13,14 (2° pico).

conformación y evitar la formación de agregados se procedió a realizar un proceso convencional de desnaturalización con urea 6 M y renaturalización por diálisis frente a concentraciones decrecientes de urea, (6 M; 3 M; 1.5 M; 0.75 M; 0.3 M y finalmente tampón fosfato 10 mM). Con este proceso se recuperó la estructura de la histona y desaparecieron los precipitados. Este proceso de renaturalización lo comprobamos por DC, antes de la renaturalización la proteína no presentaba estructura en  $\alpha$ -hélice, mientras que después de la renaturalización presentaba 6.7 % de  $\alpha$ -hélice en tampón fosfato y 29% en presencia de 60 % de TFE que induce la formación de  $\alpha$ -hélice (Orrego *et al.* 1999).

### **4.1.3. Purificación de las histonas H1a,b,c,d,e por RP-HPLC**

La separación de las H1a,b,c,d,e se realizó a partir de H1 total purificada de cerebro de rata de 15 días, cuando la H1a,b se encuentran en mayor proporción (Piña *et al.* 1987). La cromatografía se realizó en un sistema modular Waters que consiste en dos bombas (modelo 150), un inyector de líquido (UGK) y un detector de absorbancia modelo 490E. El sistema fue controlado por el programa Máxima 820 (Dynamic solution, Division of Millipore Corp). Se usó una columna Vydac C18 de 28 cm.

Las histonas H1 procedentes de la purificación salina se disolvieron en 1 ml de Tampón A (TFA 0.1%). Luego se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos para eliminar cualquier material particulado antes de inyectar la muestra en el sistema de HPLC. Posteriormente se realizó la inyección manual de la muestra.

La elución de las proteínas se realizó durante 140 minutos a un flujo de 0.7 ml/min con el gradiente descrito en Materiales y Métodos. El perfil de elución se registró a 214 nm y 280 nm, las fracciones correspondientes a los picos registrados se recogieron manualmente.

Las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida de urea-acético de alta resolución para identificar los subtipos. El gel separador que contenía 15% de acrilamida, urea 2.5 M, ácido acético 0.9 M, persulfato de amonio y Temed se dejó polimerizar durante 3 horas a temperatura ambiente. Se añadió luego el gel de apilamiento que contenía acrilamida al 7%, urea 2.5 M, ácido acético 0.9 M, persulfato de amonio al 0.5% y 400  $\mu$ l de TEMED.

Se realizó una pre-electroforesis a 200 v durante 12 horas a 4 °C, para eliminar los iones persulfato (Lennox and Cohen, 1989), usando ácido acético 0.9 M como tampón de recorrido. Después de la pre-electroforesis, el tampón se cambió por ácido acético 0.9 M fresco y se cargaron las muestras. Previamente un volumen de 50 µl de cada muestra fue evaporado y disuelto en 10 µl de tampón de muestras. Las muestras deben cargarse en un volumen muy pequeño para no perjudicar la resolución, además la cantidad de proteína en cada banda puede alterar drásticamente la resolución de la electroforesis; dependiendo del número de componentes se recomienda cargar entre 0.2 y 1.5 µg de proteína (Lennox and Cohen, 1989). La electroforesis se corrió a 320 v durante 29 horas, tiempo necesario para lograr una buena separación de las diferentes bandas.

El gel se sumergió en una disolución de metanol/agua/acético (5:5:1) durante 30 minutos con el fin de fijar las proteínas y luego se tiñó durante toda la noche. El gel se destiñó con una disolución de metanol/agua/acético (45:45:10)

En la figura 3b se observa que el subtipo con menor movilidad es la H1a seguida de la H1b y la H1d, luego se observa la banda con la H1c y la H1e que tienen la misma movilidad y por último la H1° que se separa en sus dos componentes H1°a y H1°b.

El análisis en gel de urea-acético muestra que la H1b es el primer subtipo en eluir de la columna a los 90 minutos, la H1a eluye en segundo lugar a los 104 minutos, luego la H1e a los 107 minutos; a los 110 minutos se observa un pico en el cual se solapan en gran porcentaje la H1c y la H1d. La H1c puede ser recuperada prácticamente pura al final del pico, mientras que la H1d se recoge al principio del pico con una contaminación del 1-2% de H1c; en este caso se recoge el pico manualmente.

Como en el gel de urea-acético la H1e y la H1c tienen la misma movilidad electroforética, se separaron en un gel de poliacrilamida con SDS para comprobar que realmente estaban separadas de los demás subtipos (Figura.3c). En este gel se observa que la H1e se ubica en la primera banda de acuerdo con su movilidad electroforética característica (carril 4) y la H1c se encuentra en la segunda (carril 7). En este gel también se puede observar el grado de pureza y la movilidad electroforética característica de cada uno de los subtipos.

En la bibliografía se han descrito distintos protocolos de purificación por RP-HPLC. Linder *et al.* (1993) utilizando un gradiente de acetonitrilo y ácido perclórico lograron separar las H1a,c,d,e y H1t de células germinales de rata. Para separar las H1° y H1b se debe realizar otra cromatografía.

A partir de células 3T3 de ratón se han separado por HPLC las H1<sup>o</sup>, H1b,c,e (Brown *et al.* 1996). De células de glioma C6 de rata se han podido separar las H1<sup>o</sup>, H1a,b,e y de células de fibroblastos NIH de ratón se han separado las H1<sup>o</sup>, H1a,b,c. (Talaszi *et al.* 1993). En ninguno de estos casos se ha logrado la purificación completa de los 5 subtipos. En cada uno de los trabajos el material de partida es diferente, esto puede influir en la proporción de cada uno de los subtipos y en las modificaciones postraduccionales de estos. Como consecuencia parece lógico que los protocolos de purificación por HPLC varíen, siendo necesaria su optimización en cada caso.

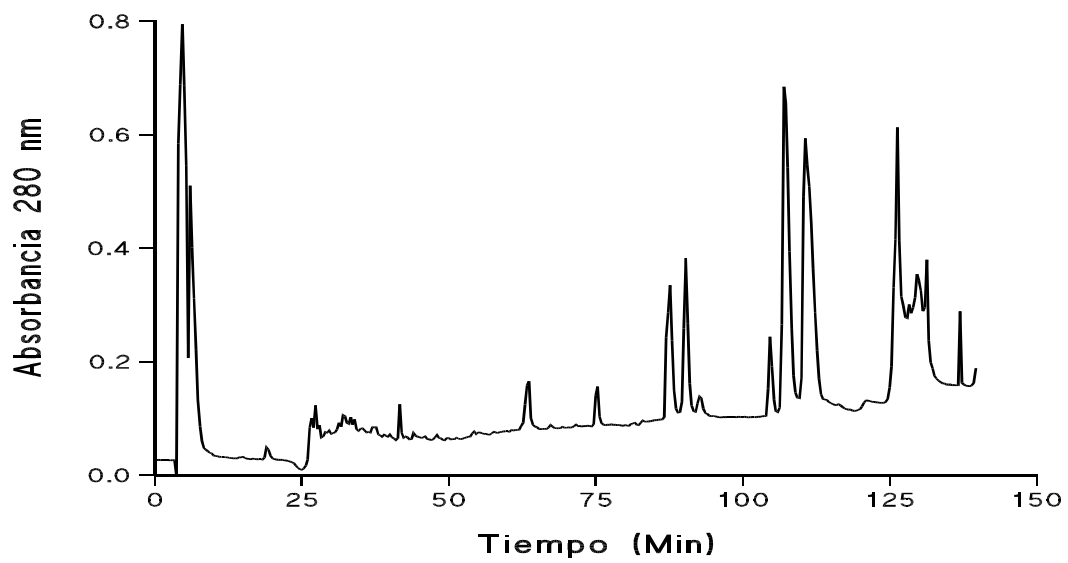
En nuestro caso, se ha optimizado un protocolo que nos permite la separación de los 5 subtipos H1a, H1b, H1c, H1d, H1e procedentes de núcleos de cerebro de rata.

Aunque se ha logrado la purificación de los subtipos H1a-e y la H1<sup>o</sup> y se han podido realizar los experimentos propuestos en este trabajo, se presentan dificultades para obtener grandes cantidades de cada uno de los subtipos, en el grupo se ha iniciado un enfoque alternativo para la obtención de cada uno de los subtipos de la histona H1 de ratón, mediante su clonaje en vectores de expresión, su transformación en *E. coli* y su posterior inducción y purificación. Se debe considerar que en el caso de rata no todos los subtipos han sido secuenciados. Sólo se conoce la secuencia de la H1<sup>o</sup> (Martínez *et al.* 1995) y la H1e (Bharath *et al.* 1998), lo cual hace necesario el clonaje y secuenciación de los demás subtipos, antes de poderlos expresar.

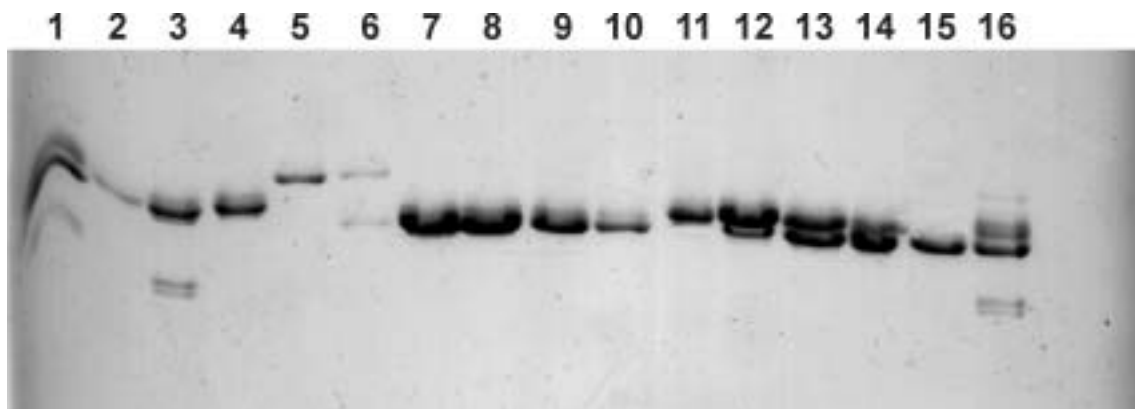
En resumen, se sabe que las técnicas cromatográficas no permiten la purificación simultánea de todos los subtipos de histonas H1 y sus formas modificadas, generalmente se requieren sistemas cromatográficos combinados. En este trabajo hemos realizado diferentes tipos de cromatografía para la purificación de los subtipos H1a,b,c,d,e y H1<sup>o</sup>. Primero utilizamos la cromatografía de intercambio catiónico con CM-sephadex para purificar la H1 total a partir de cerebro de rata, ya se mencionó que en este tejido la actividad catalítica de las proteasas es menor que en tejidos como el hepático. La purificación por éste método, utilizando el gradiente lineal de NaCl evita el tratamiento de las proteínas con ácido perclórico o ácido clorhídrico, sistemas más usados para su extracción, protegiendo de esta manera de la desestructuración del dominio globular (Khadake and Rao, 1995).



a)



b)



c)

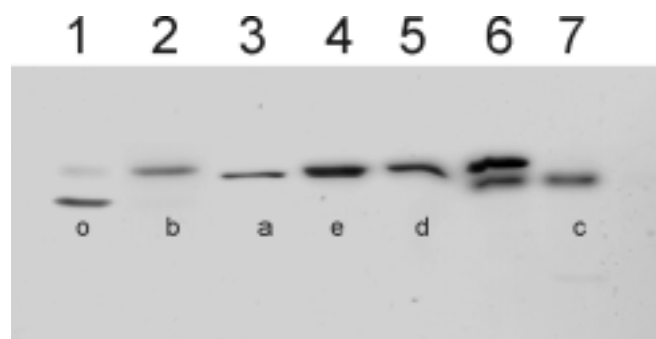


Figura 4.3. Perfil de elución de la separación de las histonas H1a,b,c y e por RP-HPLC en una columna C-18 con un gradiente de acetonitrilo. b) Análisis en AU-PAGE de las histonas H1a,b,c,e, separadas por RP-HPLC. El gel se corrió durante 29 horas a 4 °C y a 320 v. c) Análisis en SDS-PAGE de las histonas H1a,b,c,e. El gel se corrió durante 4 horas a 4 °C a 200 v.

En segundo lugar se utilizó la cromatografía de filtración en gel, la cual permitió la separación de la histona H1<sup>o</sup> de las demás histonas de manera completamente pura. La pureza de la proteína facilita el desarrollo de los experimentos propuestos con este subtipo. Se tuvo en cuenta la edad de las ratas para poder obtener una mayor cantidad de este subtipo, 30 días o mas, tiempo del desarrollo durante el cual se acumula mayor cantidad de H1<sup>o</sup> en neuronas en proceso de diferenciación (Piña, *et al.* 1987).

Por ultimo se uso RP-HPLC para la purificación de las H1a,b,c,d,e. Se ha descrito como un método que permite la separación de formas modificadas y no modificadas de las histonas y también la separación parcial de varios subtipos de H1 y sus formas fosforiladas ( Lennox, Oshima and Cohen, 1982). En comparación con el proceso de gel filtración para purificar la H1<sup>o</sup>, la RP-HPLC tiene importantes ventajas como son el tiempo de duración de la cromatografía y los componentes de la fase móvil que protegen las proteínas de procesos de desnaturalización.

## 4.2. INTERACCIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 CON EL DNA

Para determinar las afinidades relativas de los subtipos de la histona H1 por el DNA, se realizaron experimentos de competición entre cantidades iguales (w/ w) de dos subtipos diferentes por una cantidad limitada de DNA, a concentración de NaCl fisiológica (0.14 M), en la cual la unión al DNA es cooperativa (Khochbin, S. and Wolffe, A.P. 1994).

Se realizaron dos series de experimentos, una con la SAR del grupo de histonas de *Drosophila*, de 657 pb (74.5 % AT) (Izurralde, E., *et al* 1989) y otra con un fragmento HaeIII / HaeIII del pUC19 de 587 pb ( 56 % AT).

Un exceso de proteína 6:1 fue usado rutinariamente. Los complejos fueron preparados por gradiente de diálisis de NaCl y su composición no cambió con incubación adicional. La composición en subtipos de los complejos fue considerada como de equilibrio o muy cercana al equilibrio. A continuación se describen los resultados para cada pareja de subtipos.

### 4.2.1. Experimentos de competición entre las histonas (H1a-e y H1°) por una cantidad limitada de DNA

Se mezclaron un total de 4.2 µg de proteína, consistente en cantidades iguales de dos subtipos, con 0.7 µg de SAR o con 0.7 µg del fragmento del pUC19. Los complejos DNA-proteína se formaron por gradiente de diálisis desde 1 M hasta 0.15 M NaCl, en 0.01 M de tampón fosfato, pH 7 y 5% de glicerol. Los complejos DNA-histona se recuperaron en los precipitados por centrifugación durante 10 minutos a 14000 r.p.m. y las proteínas no unidas al DNA en el sobrenadante. Las fracciones se analizaron en geles de poliacrilamida con SDS.

Con los seis subtipos H1a-e y H1° pueden formarse 15 parejas distintas. Sin embargo, con 5 parejas es suficiente para determinar las afinidades relativas de los seis subtipos. Las parejas adicionales permiten obtener una estimación del error asociado a la estimación de estas afinidades. En la estimación de las afinidades por la SAR se emplearon 9 parejas, mientras que en el caso de pUC19 fueron 8 parejas. En ambos casos se realizó una serie de 5 competencias de los subtipos H1a-e frente a un mismo subtipo, la H1°. Además, se realizaron experimentos cruzados de competición entre parejas de subtipos de afinidad intermedia (H1b y H1c) y la H1a de afinidad baja. Otros

experimentos se realizaron entre un subtipo de afinidad intermedia (H1c) y subtipos de afinidad más alta (H1d y H1e). En concreto, para el fragmento SAR se realizaron las competencias H1b/H1a, H1c/H1a, H1d/H1c, H1e/H1c y para el fragmento pUC19, H1c/H1a, H1d/H1c, H1e/H1c, además de la serie de competencias con la H1° en ambos casos.

Se puede observar que cuando la H1° compite con H1a, H1b, H1c o H1e por el fragmento SAR o el fragmento del pUC19 el subtipo mayoritario en los complejos DNA-histona (precipitados) corresponde en todos los casos a la H1°; mientras que en los sobrenadantes queda una mayor proporción de H1a, H1b, H1c y He sin interactuar con el DNA (figuras 4.4 y 4.5).

Cuando la H1° compite con la H1d por el fragmento SAR o el fragmento del pUC19, contrariamente a los casos anteriores, se observa que el subtipo mayoritario en el precipitado corresponde a la H1d en ambos complejos (carriles 2 y 5 figura 4.6).

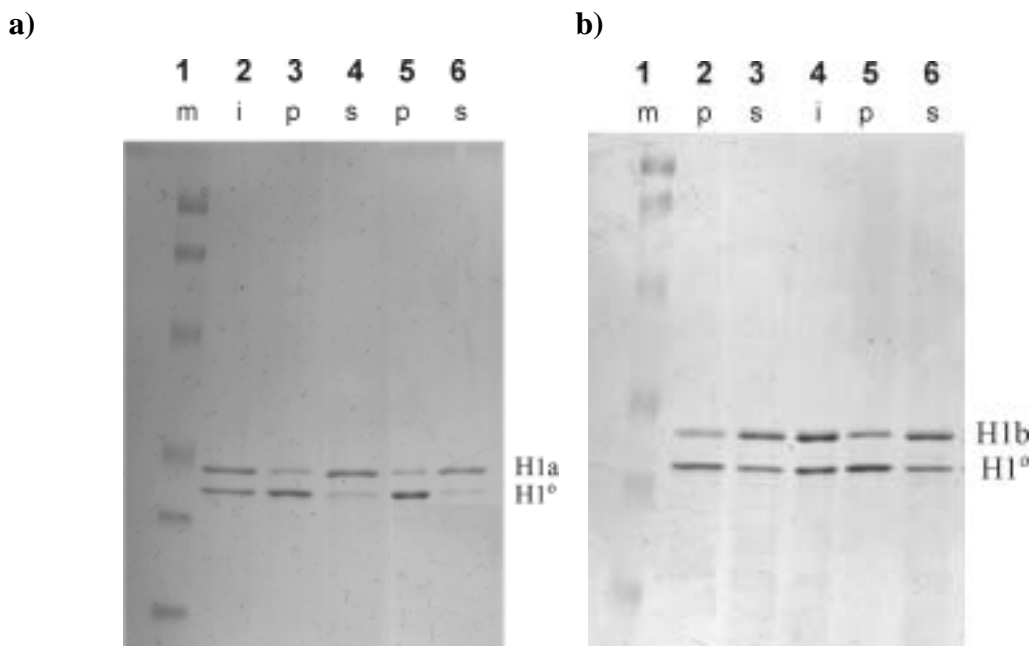
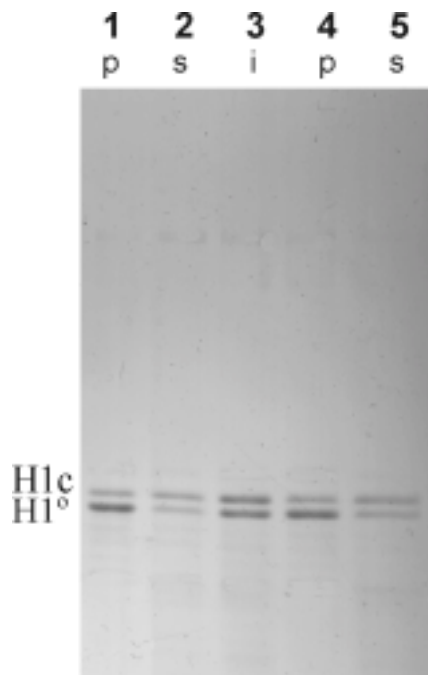


Figura 4.4. Experimentos de competición en el equilibrio entre H1°/H1a y H1°/H1b por SAR y pUC19. a) Carriles 3 y 5, complejos en el equilibrio H1°/H1a/SAR, H1°/H1a/pUC19, respectivamente; carriles 4 y 6, proteínas no unidas; m, marcador de peso molecular; i, imput mezcla de subtipos; p, precipitado; s, sobrenadante. b) Carriles 2 y 5, complejos en el equilibrio H1°/H1b/SAR, H1°/H1b/pUC19, respectivamente; carriles 3 y 6, proteínas no unidas; m: marcador de peso molecular; i: imput mezcla de subtipos; p, precipitado; s, sobrenadante.

a)



b)

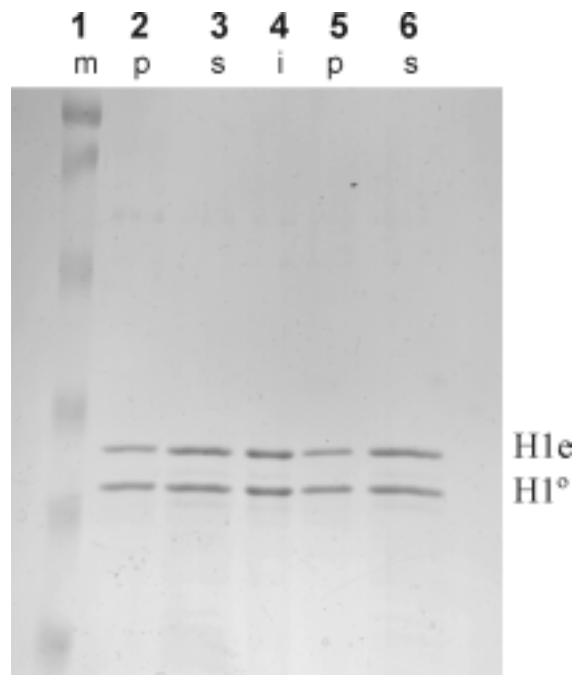


Figura 4.5. Competencia entre H1°/H1c y H1°/H1e por SAR y pUC19. a) Carriles 1 y 4, complejos en el equilibrio H1°/H1c/SAR, H1°/H1c/pUC19, respectivamente; carriles 2 y 5, proteínas no unidas; i, imput; p, precipitado; s, sobrenadante. b) Carriles 2 y 5, complejos en el equilibrio H1°/H1e/SAR, H1°/H1e/pUC 19 respectivamente; carriles 3 y 6, proteínas no unidas; i, imput; m, marcador de peso molecular; p, precipitado; s, sobrenadante.

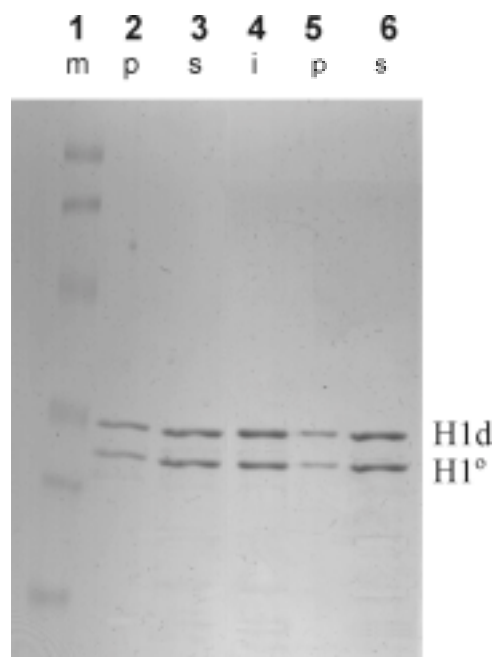


Figura 4.6. Competencia entre H1° y H1d por SAR y pUC19. Carriles 2 y 5, complejos en el equilibrio H1°/H1d/SAR, H1°/H1d/pUC19, respectivamente; carriles 3 y 6, proteínas no unidas; m, marcador de peso molecular; i, input.

En la figura 4.7 se muestran los experimentos de competición entre H1c y H1e y entre H1c y H1a. Se observa que en los precipitados SAR/H1e/H1c y pUC19/H1e/H1c el subtipo más abundante es la H1e (carriles 2 y 5 figura 4.7.a), mientras que en los sobrenadantes el subtipo más abundante es la H1c (carriles 3 y 6 figura 4.7.a). La proporción de cada subtipo en los complejos fue de un 74 % de H1e y un 26 % de H1c en ambos complejos.

En los complejos SAR/H1c/H1a y pUC19/H1c/H1a el subtipo más abundante es la H1c, mientras que en los sobrenadantes el más abundante es la H1a. En el complejo SAR/H1c/H1a hay un 74 % de H1c y un 26% de H1a; en el complejo pUC19/H1c/H1a hay un 80 % de H1c y un 20 % de H1a.

Estos experimentos permiten comprobar que la H1e tiene mayor afinidad por el DNA que la H1c y a su vez que la H1e tiene menor afinidad que la H1<sup>o</sup>; también que la H1c tiene mayor afinidad por el DNA que la H1a. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la primera serie de competencias realizadas respecto a la H1<sup>o</sup>.

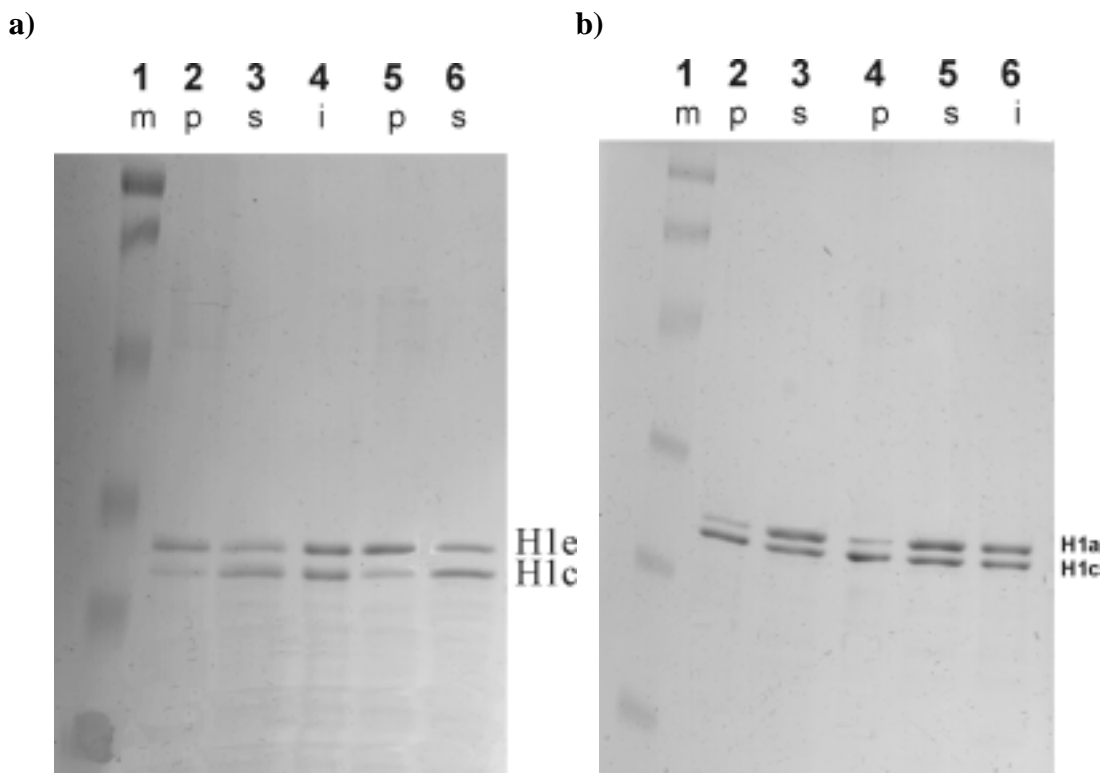


Figura 4.7. a) Competencia entre H1e y H1c por SAR y pUC19. Carriles 2 y 5, complejos en el equilibrio H1e/H1c/SAR y H1e/H1c/pUC19, respectivamente; carriles 3 y 6, proteínas no unidas; i, input; m, marcador de peso molecular; p, precipitado; s, sobrenadante. b) Competencia entre H1a y H1c por SAR y pUC19. Carriles 2 y 4, complejos en el equilibrio H1a/H1c/SAR y H1a/H1c/pUC19 respectivamente; carriles 3 y 5, proteínas no unidas; i, input; m, marcador de peso molecular; p, precipitado; s, sobrenadante

La proporción de cada subtipo en los complejos y en los sobrenadantes se determinó a partir de los geles de poliacrilamida con SDS, teñidos con Negro Amido. Las

Subtipo	Competición por SAR				Competición por pUC19			
	Intensidad		Proporción		Intensidad		Proporción	
	P	S	P	S	P	S	P	S
H1 <sup>o</sup>	0.93	0.19	81	20	1.26	0.15	83	18
H1a	0.21	0.77	19	80	0.25	0.67	17	82
H1 <sup>o</sup>	1.24	0.25	82	19	1.53	0.19	84	16
H1a	0.27	1.09	18	81	0.29	0.99	16	84
H1 <sup>o</sup>	1.12	0,74	68	38	1.35	0,72	68	38
H1b	0,53	1.19	32	62	0,65	1.19	32	62
H1 <sup>o</sup>	1.24	0,83	69	38	1.24	0,66	68	38
H1b	0,56	1.34	31	62	0,58	1.09	32	62
H1 <sup>o</sup>	0,99	0,19	72	34	0,97	0,28	73	38
H1c	0,39	0,37	28	66	0,35	0,46	27	62
H1 <sup>o</sup>	0,43	0,97	43	46	0,25	1.12	41	46
H1d	0,57	1.15	57	54	0,36	1.29	59	54
H1 <sup>o</sup>	0.39	0.87	43	43	0.37	0.87	43	46
H1d	0.51	1.13	57	57	0.50	1.02	57	54
H1 <sup>o</sup>	1.01	1.43	58	49	0.97	1.59	58	50
H1e	0.74	1.47	42	51	0.69	1.61	42	50
H1e	0.62	0.50	74	43	1.22	0.81	72	44
H1c	0.22	0.67	26	57	0.47	1.03	28	56
H1c	0.99	1.04	74	44	0.94	0.99	80	43
H1a	0.34	1.35	26	56	0.23	1.30	20	57
H1d	0.95	0.56	77	42	3.15	0.28	68	33
H1c	0.28	0.78	23	58	1.48	0.58	32	67
H1b	0.72	0.05	64	26				
H1a	0.40	0.14	36	74				

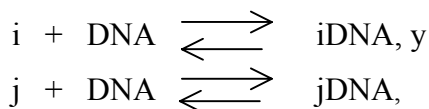
Tabla 4.1. Intensidades y proporciones de equilibrio correspondientes a los experimentos de competición de parejas de los subtipos de la histona H1 por los fragmentos de DNA SAR y pUC19 P: intensidad de las bandas, de cada pareja de subtipos en el precipitado (complejos DNA-histona). S: intensidad de las bandas, de cada pareja de subtipos, en el sobrenadante (histonas no unidas al DNA).

intensidades de las proteínas se muestran en la tabla 4.1. A partir de las intensidades de los subtipos presentes en los complejos SAR/H1 y pUC19/H1 se obtuvieron los porcentajes de cada uno de los subtipos asociados a la SAR y al pUC19. Estos porcentajes se muestran en esta misma tabla

#### 4.2.2. Determinación de las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por el DNA

Las afinidades relativas de los subtipos por la SAR y por el pUC19 se determinaron a partir de las intensidades de las bandas de los subtipos en los precipitados (complejos) y en los sobrenadantes (proteínas libres después de la competición) en PAGE (tabla 4.1).

Los equilibrios para cada uno de los subtipos en un experimento de competición, son:



donde (i) y (j) son los subtipos que compiten en un experimento por una cantidad limitada de DNA; y jDNA y iDNA, los correspondientes complejos.

Las expresiones de equilibrio son:

$$k_{\text{DNA}}^i = [\text{iDNA}] / [\text{i}] [\text{DNA}] \text{ y}$$

$$k_{\text{DNA}}^j = [\text{jDNA}] / [\text{j}] [\text{DNA}]$$

La relación  $k_{\text{DNA}}^i / k_{\text{DNA}}^j$  es:

$$k_{\text{DNA}}^i / k_{\text{DNA}}^j = ([\text{iDNA}] / [\text{i}] [\text{DNA}]) / ([\text{jDNA}] / [\text{j}] [\text{DNA}])$$

En la mezcla las constantes de afinidad relativa no dependen de la concentración de DNA libre porque es la misma para ambos equilibrios, por lo tanto podemos escribir que la afinidad relativa de un subtipo (i) por el DNA respecto a otro subtipo (j) es:

$$k_{\text{DNA}}^{i/j} = k_{\text{DNA}}^i / k_{\text{DNA}}^j = [\text{iDNA}] [\text{j}] / [\text{jDNA}] [\text{i}]$$

Utilizando la ecuación anterior como expresión de la constante de afinidad relativa se obtuvieron las afinidades relativas de los subtipos H1a-e y H1° por la SAR y el pUC19.

Por ejemplo para calcular la afinidad relativa de la H1a por SAR respecto a la H1°, utilizando los valores de la Tabla 4.1

$$k_{\text{sar}}^{a/o} = [\text{aSAR}] [\text{o}] / [\text{oSAR}] [\text{a}]$$

$$k_{\text{sar}}^{a/o} = [0.21] [0.19] / [0.93] [0.77]$$

$$k_{\text{sar}}^{a/o} = 0.055$$

donde los términos en la expresión son:  $K_{\text{sar}}^{a/o}$ , afinidad de la H1a por SAR respecto a la H1°; aSAR y oSAR intensidad de los subtipos H1a y H1° en el complejo con la SAR (precipitado); a y o intensidad de la H1a y H1° en el sobrenadante (no unidas a la SAR)



De igual forma, la afinidad de la H1a por pUC19 respecto a la H1° es:

$$k_{\text{pUC19}}^{a/o} = [\text{apUC19}] [\text{o}] / [\text{opUC19}] [\text{a}]$$

$$k_{\text{pUC19}}^{a/o} = [0.27] [0.15] / [1.22] [0.67]$$

$$k_{\text{pUC19}}^{a/o} = 0.049$$

donde apUC19 y opUC19 son las intensidades de la H1a y H1° en los complejos con pUC19 ; o, la intensidad de la H1° en la sobrenadante y a, la intensidad de la H1a en el sobrenadante

Repetiendo este calculo con los valores de las intensidades de la tabla 4.1 se obtienen las afinidades relativas de cada pareja de subtipos analizada, cuyos valores se muestran en la tabla 4.2

$k_{\text{DNA}}^{i/j}$	Afinidad por SAR		Afinidad por pUC19	
a/o	0.042	0.056	0.041	0.051
b/o	0.294	0.280	0.291	0.283
c/o	0.202		0.220	
d/o	1.007	1.118	1.250	1.153
e/o	0.713		0.703	
e/c	3.776		3.301	
c/a	3.780		5.367	
d/c	4.726		4.409	
b/a	5.040			

Tabla 4.2. Valores de las afinidades relativas entre los subtipos de la H1

#### 4.2.2.1 Estimación de las afinidades relativas entre los subtipos de la H1 a partir de experimentos por parejas.

La competición entre subtipos permite estimar con precisión las afinidades relativas de los subtipos. En este capítulo se describe el método estadístico utilizado para realizar la estimación de las cinco afinidades relativas necesarias para poder comparar y analizar las afinidades de los seis subtipos analizados. Esta estimación se realiza a partir de las afinidades relativas obtenidas con los experimentos de competición (tabla 4.2).

Este método estadístico se basa en considerar la estimación del valor de  $n$  parámetros, (que en nuestro caso serían las constantes absolutas de cada subtipo por un determinado DNA)

$$k_i (i = 1 \dots n)$$

A partir de diversas medidas experimentales de sus cocientes (en nuestro caso las afinidades relativas obtenidas a partir de los experimentos de competición)

$$k_i/k_j (i \neq j) \sim k^{i/j}$$

Naturalmente, esta información no permitirá estimar el valor absoluto de las  $k_i$ , pues habrá siempre la indeterminación de un factor multiplicativo. Para eliminar esta indeterminación impondremos la condición

$$k_1 = 1 \tag{1}$$

También supondremos que una medida experimental  $k_i/k_j$  es equivalente a una medida  $k_j/k_i$ . En general, las medidas experimentales no tienen porqué incluir todas las parejas posibles  $i, j$ . También es posible que para una misma pareja  $i, j$  se disponga de varias medidas experimentales.  $w_{ij}$  representa el número de medidas experimentales existentes para  $k_i/k_j$  ( $w_{ij} \geq 0$ ;  $w_{ij} = w_{ji}$ ), y  $a_{ijq}$  ( $q = 1 \dots w_{ij}$ ) los valores de estas medidas ( $a_{ijq} = 1/a_{jiq}$ ). En el caso que nos ocupa la estimación de los parámetros  $k_i$  está sobredeterminada, es decir hay más datos que parámetros y los datos combinan todos los índices  $i$ .

Si las medidas experimentales fuesen exactas se cumpliría

$$k_i/k_j = a_{ijq} \tag{2}$$

Mediante los cambios de variable

$$x_i = \ln k_i$$

$$b_{ijq} = \ln a_{ijq}$$

las relaciones (2) y (1) se traducen en el sistema lineal

$$x_i - x_j = b_{ij} \tag{3a}$$

$$x_1 = 0 \tag{3b}$$

Debido a los errores experimentales en general el sistema (3) no será compatible. Desde un punto de vista estadístico, podemos considerar que para cada pareja  $i, j$  los valores  $b_{ijq}$  son observaciones de una variable aleatoria  $X_{ij}$  de media  $x_i - x_j$ . A falta de más información al respecto, supondremos que estas variables tienen todas la misma desviación típica  $\sigma$ . El problema consiste, pues, en estimar los parámetros  $x_i$  a partir de los valores  $b_{ijq}$  considerados como observaciones de unas variables aleatorias de media  $x_i - x_j$  y desviación típica  $\sigma$ .

Como es habitual en estos casos tomaremos como estimación de los  $x_i$  ( $i > 1$ ) los valores  $x_i$  que minimicen el error cuadrático medio. Para ello hemos utilizado la aplicación de regresión múltiple del programa EXCEL en la opción de análisis de datos.

Con los seis subtipos H1a-e y H1° pueden formarse 15 parejas distintas. Sin embargo, con 5 parejas es suficiente para determinar las afinidades relativas de los seis subtipos.

En la estimación de las afinidades por la SAR se emplearon 9 parejas, mientras que en el caso del pUC19 fueron 8 parejas; en ambos casos algunas parejas están repetidas (total de 12 valores para la SAR y 11 para el pUC) (tabla 4.2). En la tabla 4.3 se muestran los valores estimados de las afinidades relativas de los subtipos H1a-e respecto al subtipo H1°. Los errores han sido calculados con un nivel de confianza del 95%. Los errores se calculan a partir de la transformación logarítmica de los valores de  $k_i$  y  $a_{ijq}$ , por lo tanto los errores por encima y por debajo del valor medio resultan ligeramente distintos una vez invertida la transformación logarítmica. En la tabla 4.3 se indica el valor promedio del error junto con los valores superior e inferior.

Afinidad por SAR					
$k_{\text{SAR}}^{ij}$	estimación	inferior 95%	superior 95%	factor 95%	Error promedio( $\pm$ , %)
a/o	0.051	0.045	0.058	1.141	12.745
b/o	0.277	0.239	0.321	1.157	14.801
c/o	0.202	0.175	0.232	1.152	14.108
d/o	1.024	0.884	1.186	1.159	14.745
e/o	0.737	0.612	0.886	1.203	18.585

Afinidad por pUC19					
$k_{\text{pUC19}}^{ij}$	estimación	inferior 95%	superior 95%	factor 95%	Error promedio( $\pm$ , %)
a/o	0.045	0.040	0.050	1.127	11.111
b/o	0.287	0.250	0.329	1.148	13.763
c/o	0.235	0.210	0.264	1.123	11.489
d/o	1.144	1.015	1.288	1.127	11.931
e/o	0.739	0.612	0.859	1.162	15.087

Tabla 4.3. Estimación de los valores de las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la SAR y pUC19.

Las afinidades relativas pueden estimarse del mismo modo para las 15 parejas posibles, como se muestra en la tabla 4.4.

Afinidades estimadas por SAR							
$k_{\text{SAR}}^{ij}$	a	b	c	d	e	o	(i)
a	1	5.406	3.935	19.977	14.378	19.513	
b	0.180	1	0.728	3.695	2.660	3.610	
c	0.254	1.374	1	5.076	3.654	4.959	
d	0.050	0.271	0.197	1	0.720	0.977	
e	0.070	0.376	0.274	1.389	1	1.357	
o	0.051	0.277	0.202	1.024	0.737	1	
(j)							

Afinidades estimadas por pUC19							
$k_{pUC19}^{i/j}$	a	b	c	d	e	o	(i)
a	1	6.358	5.229	25.360	16.396	22.156	
b	0.157	1	0.822	3.989	2.579	3.485	
c	0.191	1.216	1	4.850	3.136	4.237	
d	0.039	0.251	0.206	1	0.647	0.874	
e	0.061	0.388	0.319	1.547	1	1.351	
o	0.045	0.287	0.236	1.145	0.740	1	
(j)							

Tabla 4.4. Estimación de los valores de las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la SAR y pUC19.

En la tabla 4.5 se muestran los errores correspondientes para cada estimación. Puede observarse que todos los  $k_{i/j}$  tienen un error ( $\pm$ ) entre un 12 y un 20%. Este valor es pequeño en relación con las diferencias entre las  $k_{i/j}$  de los diferentes subtipos.

Porcentaje de error ( $\pm$ ) de las afinidades relativas por la SAR							
$k_{SAR}^{i/j}$	a	b	c	d	e	o	(i)
a		15.088	14.917	17.245	19.705	12.059	
b	15.088		17.836	18.758	21.296	13.371	
c	14.917	17.836		15.426	16.943	12.981	
d	17.245	18.758	15.426		20.356	13.466	
e	19.705	21.296	16.943	20.356		16.943	
o	12.059	13.371	12.981	13.466	16.943		
(j)							

Porcentaje de error ( $\pm$ ) de las afinidades relativas por el pUC19							
$k_{pUC19}^{i/j}$	a	b	c	d	e	o	(i)
a		19.214	14.363	16.771	18.884	12.511	
b	19.214		18.994	19.214	21.490	14.507	
c	14.363	18.994		14.363	15.745	12.176	
d	16.771	19.214	14.363		18.884	12.511	
e	18.884	21.490	15.745	18.884		15.745	
o	12.511	14.507	12.176	12.511	15.745		
(j)							

Tabla 4.5. Estimación de los porcentajes de error ( $\pm$ ) asociados a los valores de afinidad relativa de los subtipos de la H1 por la SAR y pUC19

En definitiva, la competición entre los subtipos permitió estimar con precisión las afinidades relativas por ambos DNAs. El orden de afinidades por la SAR de menor a mayor afinidad es:

**H1a (1.0) < H1c (3.94) < H1b (5.41) < H1e (14.38) < H1° (19.51) < H1d (19.98).**

El orden de afinidades por el pUC19 es:

**H1a (1.0) < H1c (5.26) < H1b (6.41) < H1e (16.50) < H1° (22.32) < H1d (25.53).**

Los valores en paréntesis indican las afinidades de los subtipos en relación con el subtipo unido más débilmente, el cual en ambas series es la H1a. La diferencia de afinidad relativa entre el subtipo más débilmente unido, H1a, y del subtipo más fuertemente unido, H1d, es cerca de 20 para el fragmento SAR y 25 para el pUC19. Los subtipos pueden ser clasificados en tres grupos: H1a con la más baja afinidad, H1b y H1c con afinidades intermedias, y H1d, H1e y H1° con las afinidades más fuertes.

#### **4.2.3. Experimentos de desplazamiento entre los subtipos H1a-e y H1°**

Para confirmar las afinidades relativas, establecidas en los experimentos de equilibrio, se realizaron experimentos de desplazamiento, en los cuales se formó un complejo inicial entre cada fragmento de DNA y un exceso de uno de los subtipos, antes de añadir una cantidad igual de un segundo subtipo. Se realizaron dos series de desplazamiento. En la primera serie de experimentos, los complejos formados con la H1° se hicieron competir con cada uno de los subtipos H1a-e, y en la segunda serie, los complejos formados con cada uno de los subtipos H1a-e se hicieron competir con la H1°; además, se realizó una competición entre H1e y H1c. Los complejos fueron analizados después de una hora de incubación.

##### **4.2.3.1. Desplazamiento de la H1° y la H1e de los complejos SAR/H1° y pUC19/H1° por los subtipos H1a-e**

En la primera serie de experimentos de desplazamiento, el complejo inicial formado por 2.1 µg de H1° y 0.7 µg de SAR o 0.7 µg del fragmento del pUC19 (3:1. histona:DNA) se incubó a 37° C durante 1 hora y después se añadió una cantidad igual (2.1 µg) de H1a, H1b, H1c, H1d o H1e. Después de incubar durante una hora adicional

a 37°C, las muestras se centrifugaron a 14000 r.p.m durante 10 minutos y se recuperaron los precipitados y los sobrenadantes. Las muestras se analizaron en geles de poliacrilamida con SDS y la tinción se realizó con Negro Amido.

La figura 4.8 muestra los resultados del primer tipo de desplazamiento, es decir complejos H1°/SAR y H1°/pUC19 desplazados por cada uno de los subtipos H1a-e.

En los experimentos de desplazamiento de la H1° de los complejos H1°/SAR y H1°/pUC19 por los subtipos H1a, H1b, H1c, H1d y H1e, se encontró que el subtipo más abundante en todos los precipitados era la H1°.

Las intensidades de las proteínas y sus proporciones en los complejos DNA/ proteína y en los sobrenadantes se muestran en la tabla 4.5.

Estos experimentos muestran que la H1a tiene muy poca capacidad de desplazar la H1° de los complejos con el DNA. La H1b es capaz de desplazar el 25 % de la H1° de los complejos H1°/SAR y H1°/ pUC19. La H1c desplaza el 22 % y el 24 % de la H1° de los complejos H1°/SAR y H1°/ pUC19, respectivamente. La H1d desplaza el 35 % y el 41 % de la H1° de los complejos con SAR y pUC19, respectivamente; mientras que la H1e desplaza el 32% y el 36 %.

Finalmente, en los desplazamientos de los complejos H1e /SAR y H1e/ pUC19 por H1c (figura 4.8), se observa que la H1c desplaza el 20 y el 26% de la H1e de los complejos con la SAR y el pUC19, respectivamente; mientras que en los sobrenadantes el subtipo H1c es el más abundante.

### **4.2.3.2. Desplazamiento de los subtipos H1a-e de los complejos SAR/H1a-e y pUC19/H1a-e por la H1° y la H1c**

En la segunda serie de desplazamientos, el complejo inicial se formó entre H1a, H1b, H1c, H1d o H1e y cada uno de los fragmentos de DNA (SAR y pUC19) e igualmente se incubó durante 1 hora a 37 °C; a continuación se añadió H1° como segundo subtipo y se prolongó la incubación durante 1 hora más, a la misma temperatura; después de separar por centrifugación precipitados y sobrenadantes, se analizaron las fracciones por PAGE-SDS, se tiñeron los geles con Negro Amido y se midieron las intensidades de las bandas en precipitados (complejos SAR/H1 y pUC19/H1) y en sobrenadantes (proteínas

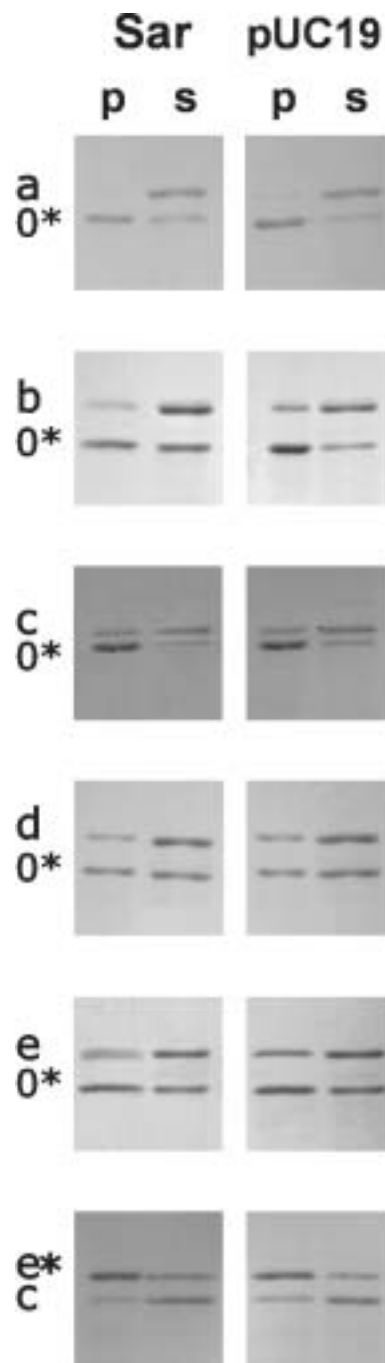


Figura 4.8. Experimentos de desplazamiento. El asterisco (\*) indica el subtipo que forma el complejo inicial (H1<sup>o</sup>,H1e), que es desplazado por otro subtipo (H1a-e). SAR, región de unión a la matriz nuclear del grupo de histonas de *Drosophila* (657 pb); pUC19, fragmento de pUC19, obtenido por digestión HaeIII/HaeIII (587 pb); p, precipitado; s, sobrenadante.

Desplazamiento de la H1° del complejo SAR/H1° por los subtipos H1a-e					Desplazamiento de la H1° del complejo pUC19/H1° por los subtipos H1a-e				
Subtipo	Intensidad		Proporción		Subtipo	Intensidad		Proporción	
	P	S	P	S		P	S	P	S
H1°	0.71	0.44	92	35	H1°	0.97	0.23	98	24
H1a	0.06	0.85	8	65	H1a	0.01	0.75	2	76
H1°	0.94	1.01	75	39	H1°	1.34	0.50	75	31
H1b	0.31	1.61	25	61	H1b	0.44	1.12	25	69
H1°	0.50	0.22	78	32	H1°	0.80	0.28	76	34
H1c	0.14	0.48	22	68	H1c	0.25	0.56	24	66
H1°	0.68	0.82	65	38	H1°	0.60	1.05	59	45
H1d	0.36	1.35	35	62	H1d	0.41	1.24	41	55
H1°	0.98	0.56	68	43	H1°	1.06	0.80	64	46
H1e	0.47	0.75	32	57	H1e	0.59	0.95	36	54
H1e	0.95	0.54	80	41	H1e	1.26	0.50	74	37
H1c	0.23	0.78	20	59	H1c	0.43	0.85	26	63

Tabla 4.5. Intensidad de las histonas H1 en los experimentos de desplazamiento de la H1° y la H1e de los complejos SAR/H1° y pUC19/H1° por los subtipos H1a-e. Intensidad P: intensidad de las bandas de cada pareja de subtipos en el precipitado (complejos DNA-histona). Intensidad S: intensidad de las bandas de cada pareja de subtipos en el sobrenadante (histonas no unidas al DNA). Proporción P: proporción de cada subtipo en el precipitado. Proporción S: proporción de cada subtipo en el sobrenadante.

no unidas a DNA). La figura 4.9 y la tabla 4.6 muestran los resultados de estos desplazamientos.

En los experimentos de desplazamiento de las H1a,b,c de los complejos con el DNA por la H1° se observa que el subtipo más abundante en todos los precipitados es la H1°, mientras que en los sobrenadantes los subtipos más abundantes son la H1a, H1b o H1c (figura 4.9). Estos experimentos muestran que la H1° puede desplazar la mayor parte de la H1a que formaba el complejo DNA-histona inicial; puede desplazar el 62 % y el 75 % de la H1b de los complejos H1b/SAR y H1b/pUC19, respectivamente; y puede desplazar , el 63 y el 64 % de la H1c de los complejos H1c/SAR y H1c/pUC19.



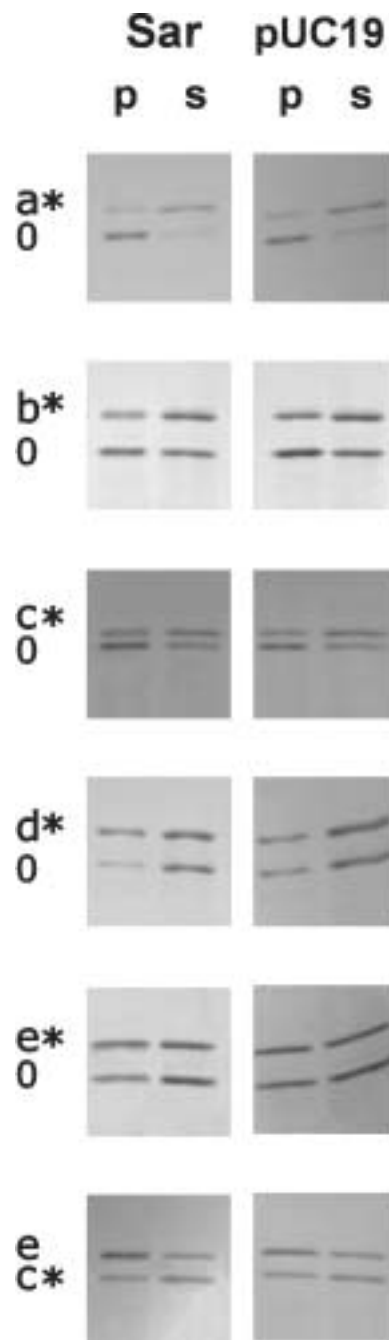


Figura 4.9. Experimentos de desplazamiento. El asterisco (\*) indica el subtipo que forma el complejo inicial (H1a-e) que es desplazado por el subtipo H1<sup>o</sup> o H1e. SAR región de unión a la matriz nuclear del grupo de histonas de *Drosophila* (657 pb); pUC19, fragmento de pUC19 obtenido por digestión HaeIII/HaeIII (587 pb); p, precipitado, proteínas unidas al DNA; s, sobrenadante, proteínas no unidas al DNA.

Subtipo	Desplazamiento de las H1a-e del complejo SAR/H1 por la H1°				Desplazamiento de las H1a-e del complejo pUC19/H1 por la H1°			
	Intensidad		Proporción		Intensidad		Proporción	
	P	S	P	S	P	S	P	S
H1a	0.22	0.58	19	75	0.16	0.72	15	72
H1°	0.93	0.19	81	25	0.88	0.28	85	28
H1b	0.58	1.19	38	58	0.44	1.12	25	69
H1°	0.95	0.88	62	42	1.34	0.50	75	31
H1c	0.32	0.43	27	54	0.31	0.47	36	57
H1°	0.56	0.36	63	46	0.56	0.35	64	43
H1d	0.64	1.11	74	56	0.49	1.43	51	53
H1°	0.22	0.88	26	44	0.47	1.26	49	47
H1e	0.67	0.79	60	45	0.67	0.94	52	51
H1°	0.44	0.97	40	55	0.63	1.16	48	49
H1c	0.42	0.63	32	60	0.44	0.48	35	48
H1e	0.89	0.42	68	40	0.80	0.52	65	52

Tabla 4.6. Intensidad de las histonas H1 en los experimentos de desplazamiento de las H1a-e de los complejos SAR/H1a-e y pUC19/H1a-e por la H1°. Intensidad P: intensidad de las bandas de cada pareja de subtipos en el precipitado (complejos DNA-histona). Intensidad S: intensidad de las bandas, de cada pareja de subtipos, en el sobrenadante (histonas no unidas al DNA). Proporción P: proporción de cada subtipo en el precipitado. Proporción S: proporción de cada subtipo en el sobrenadante.

En los experimentos de desplazamiento de la H1d por la H1° se puede observar con los dos DNA que la proteína más abundante en el precipitado es la H1d. La H1° desplaza el 26 % de la H1d del complejo H1d/SAR, mientras que desplaza el 49 % de la H1d del complejo H1d/pUC19.

En los precipitados de los desplazamientos H1e/SAR y H1e/pUC19 por la H1°, el subtipo más abundante es la H1e con un 60% en el complejo H1e/SAR y un 52 % en el complejo H1e/pUC19; la H1° desplaza el 40% y el 48 % de la H1e que formaba el complejo DNA-histona inicial. En los precipitados de los desplazamientos H1c/SAR y H1c/pUC19 por la H1e, el subtipo más abundante es la H1e con un 68% en el complejo H1c/SAR y un 65 % en el complejo H1c/pUC19.

Los complejos se analizaron después de una hora de incubación, tiempo que permitió alcanzar la composición de equilibrio solamente cuando el complejo inicial estaba formado con H1a, el subtipo de unión más débil. Con los otros subtipos, la cantidad de subtipo que se mantiene en el complejo inicial después de incubarlo con el segundo subtipo es proporcional a las afinidades relativas establecidas en los experimentos de equilibrio. La composición de los complejos con el fragmento de pUC19 se encuentra en general más cerca de la composición de equilibrio que la composición de los complejos con SAR. Ello refleja la menor afinidad de los subtipos de la H1 por el fragmento de pUC19 que por la SAR.

### 4.3. UNION PREFERENCIAL DE LOS SUBTIPOS DE LA H1 A SECUENCIAS DE DNA SAR

La histona H1 ha sido descrita como una proteína de unión a la SAR. La afinidad preferencial de la H1 por secuencias SAR fue originalmente establecida para la SAR del grupo de histonas de *Drosophila*, usando H1 total de hígado de rata, que esta compuesta mayoritariamente por H1e y H1c, y fragmentos de DNA de pBR322 como competidores (Izaurralde *et al.*, 1989).

Con objeto de averiguar si los 6 subtipos somáticos de mamífero eran proteínas de unión a las SAR, se realizaron experimentos de competición entre los fragmentos de SAR y de pUC19, usados en los experimentos anteriores, por una cantidad limitada de cada uno de los subtipos. Cantidades iguales de los fragmentos de SAR y de pUC19, se mezclaron con una cantidad limitada de cada uno de los subtipos (relaciones p/p proteína/DNA de 0.16 a 0.62). Los ensayos fueron realizados en condiciones de unión cooperativa (0.14 M NaCl), en las cuales la población de moléculas de DNA se reparte en moléculas totalmente saturadas de proteína y moléculas totalmente libres de proteína (Rodríguez *et al.*, 1991). El análisis del DNA en las fracciones solubles y no solubles mostró que virtualmente toda la H1 se unía a la SAR, mientras que el fragmento del pUC19 permanecía en el sobrenadante. El fragmento del pUC19 se encontró en los precipitados sólo cuando la relación proteína/DNA era mayor que 0.5, y la SAR estaba saturada, y por lo tanto ausente del sobrenadante (figura 4.10). Estos resultados muestran que la afinidad aparente de los seis subtipos por la SAR es superior en más de un orden de magnitud a la afinidad por el fragmento del pUC19.

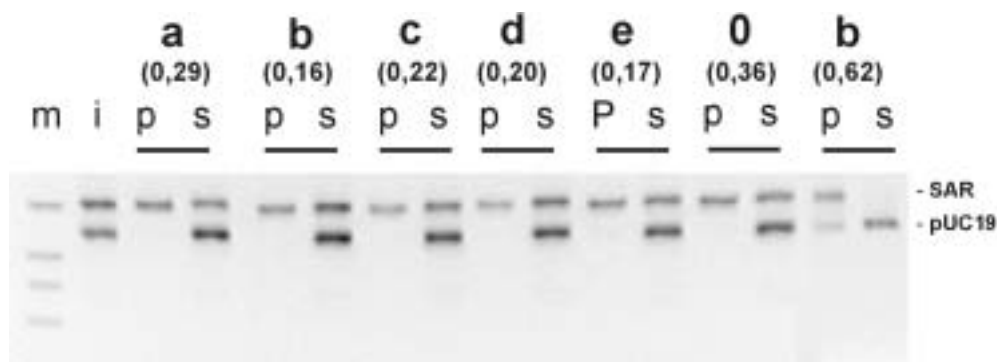


Figura 4.10. Competición de la SAR y el fragmento del pUC19 por una cantidad limitada de un subtipo de histona H1. Se indica la relación proteína/DNA (p/p). Los subtipos H1a-e y H1<sup>o</sup> están indicados en la parte superior (a-e,0), m, marcador de peso molecular; i, input, mezcla inicial de SAR y fragmento del pUC19; p, precipitado; s, sobrenadante.

Los subtipos poseen diferentes afinidades, aunque similares en términos relativos, tanto por el pUC19 como por las secuencias SAR. Al mismo tiempo todos los subtipos presentan una acusada preferencia por las secuencias SAR, ello indica que la afinidad de un subtipo por una determinada secuencia de DNA esta determinada a la vez por las características de cada subtipo individual y por las propiedades de la secuencia de DNA implicada en la interacción. La interacción de la H1 con el DNA es básicamente electrostática (Manning, 1979; Watanabe, 1986). Ello permite que la afinidad de un subtipo dado por una secuencia de DNA particular sea expresada como el producto coulombico  $\mu_{\text{prot}} \cdot \mu_{\text{DNA}}$ , donde  $\mu_{\text{prot}}$  y  $\mu_{\text{DNA}}$  son las contribuciones electrostáticas efectivas de la proteína y el DNA a la interacción. Los valores  $\mu_{\text{prot}}$  están limitados al número de subtipos, mientras que los posibles valores de  $\mu_{\text{DNA}}$  deben ser más grandes en número, debido al efecto de la modulación estructural sobre la afinidad dependiente de secuencia. Las preferencias de unión junto con las diferencias en la afinidad relativa de los subtipos por el DNA pueden, por lo tanto, dar lugar a una amplia variación en las afinidades de la H1 por el DNA, lo cual podría afectar el intercambio dinámico de la histona H1 en el núcleo celular (Thoma, 1981; Lever *et al.*, 2000; Misteli *et al.*, 2000).

## 4.4. INTERACCIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 CON LA CROMATINA

### 4.4.1. Purificación de cromatina de hígado de rata:

Nos propusimos determinar la afinidad de los subtipos somáticos de mamífero de la histona H1 por la cromatina. Con este propósito, purificamos fragmentos de cromatina a partir de hígado de rata. En la figura 4.11 a y b, se muestra una cinética de digestión de los núcleos purificados según se describe en Materiales y Métodos. Se analizaron por electroforesis los tamaños del DNA (figura 4.12) y de la cromatina (figura 4.13) y se escogió el tiempo de digestión óptimo para obtener mayoritariamente fragmentos de cromatina de aproximadamente 30 nucleosomas.

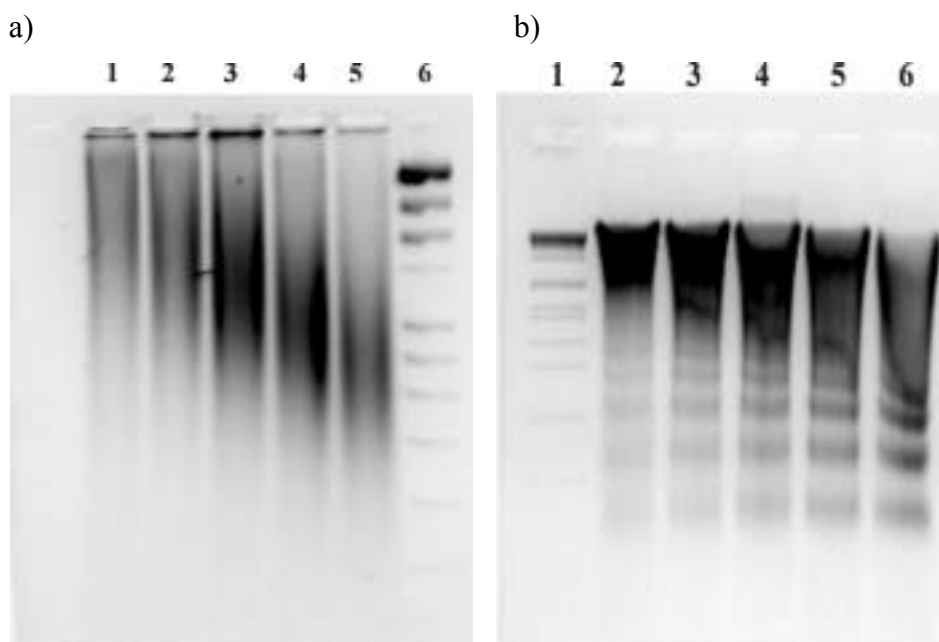


Figura 4.11. Cinética de digestión de la cromatina con Nucleasa Micrococcal. a) Electroforesis de cromatina; gel nativo de agarosa al 6%/TBE 0.5X; carriles 1, 2, 3, 4, 5, tiempos de digestión: 0, 30, 60, 90 y 180 segundos. Carril 6, marcador de peso molecular; b) Electroforesis del DNA de la cromatina; gel de agarosa al 1%/TBE 0.5 X; carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2, 3, 4, 5, 6, tiempos de digestión: 0, 30, 60, 90 y 180 segundos.

Es conveniente realizar la cinética de digestión de cada preparación diferente de núcleos para obtener los fragmentos de cromatina del tamaño deseado. Los núcleos, la edad de las ratas o la actividad de la nucleasa micrococcal pueden influir en el tiempo de digestión.

En la purificación de la cromatina, como se describe en Materiales y Métodos, hay que tener en cuenta algunos parámetros importantes, tales como, la concentración de DNA, que se ajustó a 2 mg/ml, ya que a mayor concentración se producía mayor cantidad de cromatina insoluble después de la digestión con nucleasa micrococcal. Otro aspecto importante en la purificación fue ajustar la concentración de sal a 70 mM de NaCl, a esta concentración de NaCl la cromatina se encuentra semicondensada.

En la figura 4.12 se muestra el análisis electroforético de los fragmentos de cromatina separados en un gradiente lineal de sacarosa. Este gradiente se realiza para seleccionar fragmentos de unos 30 nucleosomas.

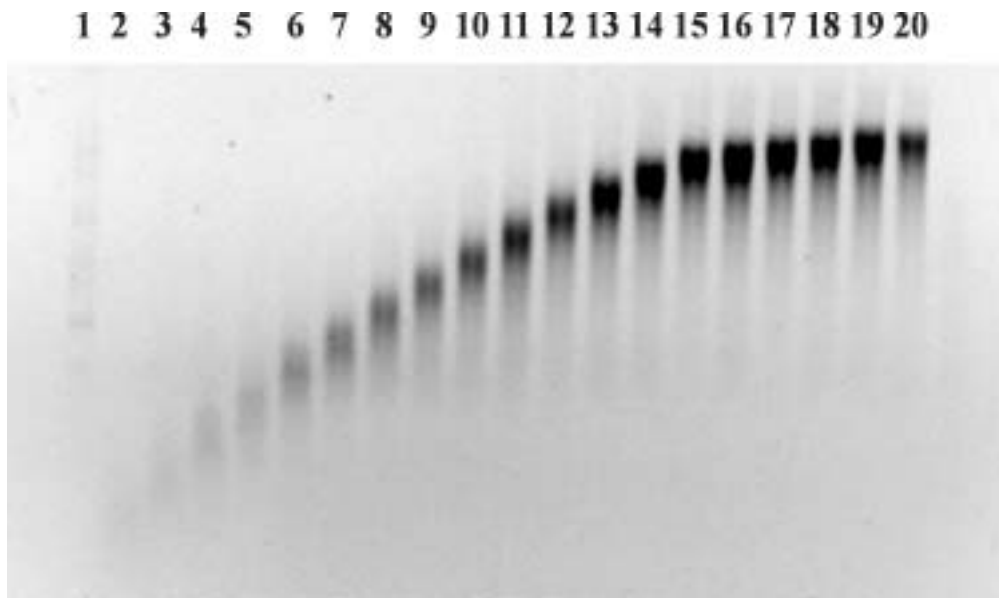


Figura 4.12. Electroforesis de los fragmentos de cromatina purificados. Gel de agarosa al 0.6 %/TBE 0.5X, corrido durante 15 horas a 20 voltios. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2 a 20, distintas fracciones del gradiente.

En la figura 4.13 se muestra la electroforesis del DNA de las fracciones anteriores.

El estado de las histonas se analizó en geles de poliacrilamida con SDS. Se puede observar en la figura 4.14 que no hay degradaciones de las histonas internas ni de las histonas H1.

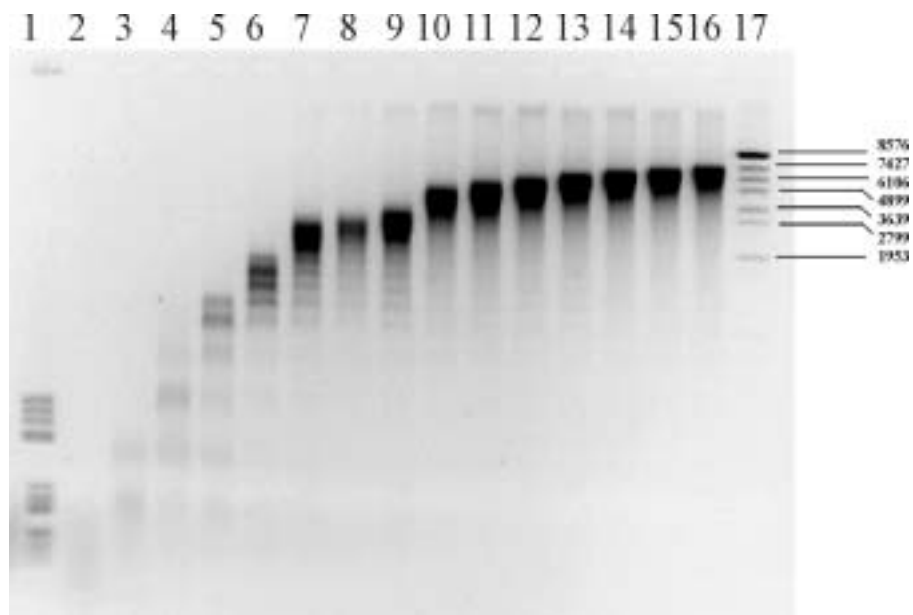


Figura 4.13. Electroforesis de los fragmentos de DNA de las fracciones de cromatina de la figura 4.2. Gel de agarosa al 0.6 %/TBE 0.5X, corrido durante 15 horas a 20 voltios. Carril 1, marcador de peso molecular; carriles 2 a 16: DNA de las fracciones de cromatina del gradiente; carril 1 y 17: marcadores de peso molecular.

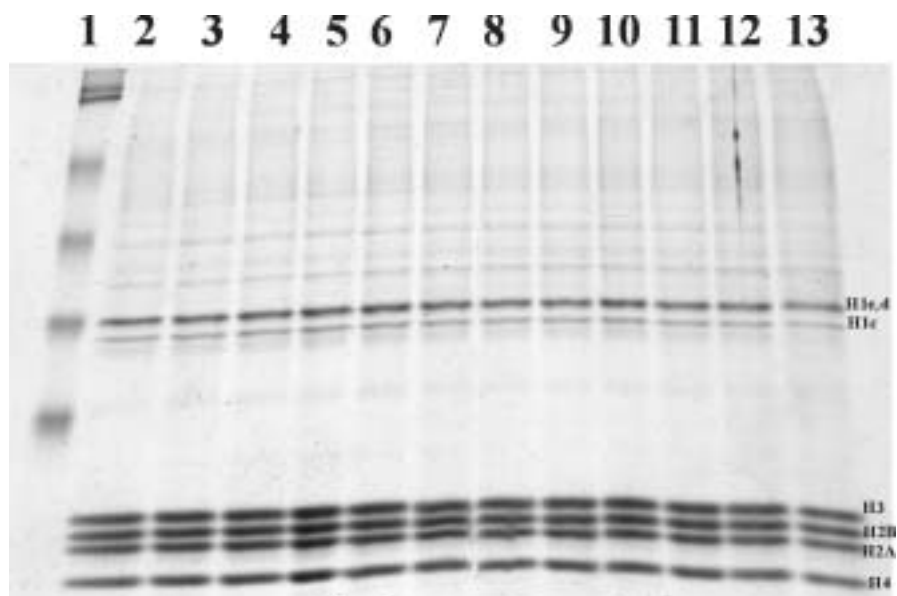


Figura 4.14. PAGE-SDS de las histonas en distintas fracciones del gradiente. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2 a 13, histonas de las fracciones de la cromatina.



#### 4.4.2. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y un exceso de un subtipo añadido.

Una vez establecido que los subtipos de la histonas H1 tienen afinidades diferentes por el DNA nos planteamos si estas diferencias también se mantenían en la cromatina. Esta posibilidad es de gran importancia fisiológica por sus posibles implicaciones en todos aquellos procesos en los cuales la estructura de la cromatina puede influir en la expresión génica.

Para averiguar si existen diferencias de afinidad entre los subtipos se perturbó el sistema (cromatina) añadiendo H1 exógena para forzar el intercambio entre los subtipos de la cromatina y la H1 exógena. Para realizar este tipo de manipulación hay que resolver el problema del exceso de H1 en el sistema. La histona H1 en exceso, por encima de una relación 1:1 (una molécula de H1/ nucleosoma), se une a sitios secundarios de menor afinidad en el nucleosoma (Thoma *et al.*, 1979) y, además, provoca la precipitación de la cromatina. Para mantener la estequiometría de la cromatina una vez añadido un exceso de H1 aproximadamente igual a la H1 presente en la cromatina nativa, impidiendo el uso de los sitios de unión secundarios, y a la vez evitando la precipitación de la cromatina, es necesario añadir un competidor de la unión de la H1 a la cromatina que actúe como secuestrante del exceso de H1.

Inicialmente, se ensayó el ácido poliglutámico como competidor potencialmente inespecífico. El ácido poliglutámico ha sido utilizado a menudo en la reconstitución de nucleosomas y cromatina a partir de componentes purificados (Pennings, Muyldermans and Wyns, 1986; Tomaszewski and Jerzmanowski, 1997). Cabría la posibilidad que los subtipos de la H1 interaccionasen de forma no selectiva con el ácido poliglutámico. Sin embargo, experimentos de competición de parejas de subtipos por una cantidad limitada de poliglutámico mostraron diferencias importantes de afinidad de los subtipos por el polipéptido. Además, los complejos H1/poliglutámico aparecían sistemáticamente contaminados con histonas internas debido a problemas de separación de estos complejos de la cromatina y/o desplazamiento de las histonas internas por el poliglutámico. En la figura 4.15 se muestra el resultado de un experimento de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y H1<sup>o</sup> añadida; se observa que una proporción de las histonas internas precipita con el poliglutámico y con las H1 que se han intercambiado. En la figura 4.16 se muestra un experimento de precipitación de las parejas de subtipos H1<sup>o</sup>/H1c y H1e/H1c con ácido poliglutámico; se puede observar en

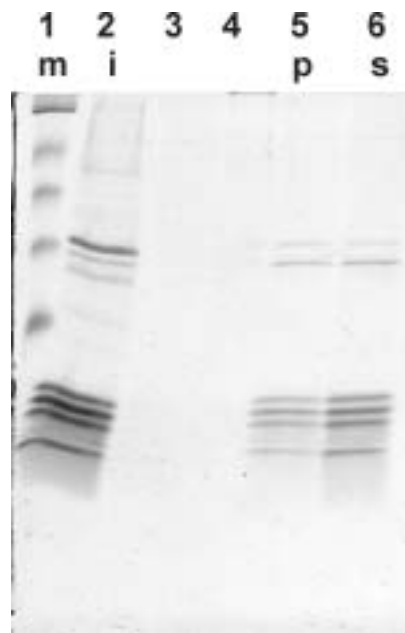


Figura 4.15. Experimento de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y H1° usando ácido poliglutámico como secuestrante del exceso de H1. Carriles 5 y 6, intercambio entre cromatina y H1°; m, marcador de peso molecular; i, input de cromatina; p, precipitado (histonas H1 e histonas internas unidas al poliglutámico); s, sobrenadante (cromatina soluble con la nueva composición de H1s).

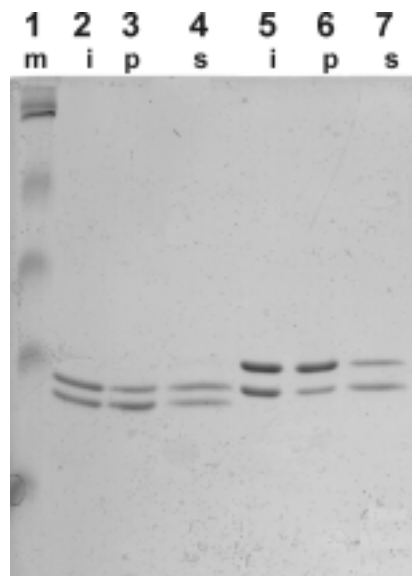


Figura 4.16. Experimentos de competición en el equilibrio entre H1° y H1c y entre H1e y H1c por ácido poliglutámico. Carriles 3 y 6, complejos H1°/H1c/poliglutámico y H1e/H1c/poliglutámico, respectivamente; carriles 4 y 7, proteínas no unidas en el equilibrio; m, marcador de peso molecular; i, input mezcla de subtipos; p, precipitado; s, sobrenadante

el gel de poliacrilamida con SDS que los subtipos más abundantes en los precipitados son la H1° y la H1e en cada caso, mientras que en los sobrenadantes el subtipo más abundante es la H1c, por lo tanto las afinidades no son iguales para todos los subtipos. Teniendo en cuenta los resultados anteriores y conociendo las afinidades de los subtipos por la secuencia SAR de 657 pb, decidimos diseñar experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y un subtipo de H1 añadida, utilizando la SAR como secuestrante del exceso de H1. En estos experimentos se mezcló cromatina purificada, uno de los subtipos de la H1 purificado (H1a-e o H1°) y DNA SAR, en una concentración fisiológica de sal, 0.14 M NaCl en 10 mM de tampón tris-HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA. En estas condiciones, los complejos SAR/H1 forman precipitados insolubles que pueden ser separados fácilmente de la cromatina por centrifugación.

En cada reacción de intercambio se mezclaron 10 µg de cromatina, con 3.35 µg de DNA SAR y 2.5 µg de uno de los subtipos H1a, H1b, H1c, H1d, H1e y H1° en experimentos independientes. La proporción de SAR añadida se ajustó por prueba y error para que no modificara substancialmente la estequiometría de la H1 en la cromatina nativa.

La reacción se agitó suavemente a 37° C durante 90 minutos; durante este período las histonas H1 de la cromatina se intercambian con la H1 añadida y con la SAR. Caron y Thomas (1981) demostraron que a 70 mM de NaCl las histonas H1, de fragmentos de cromatina de diferente tamaño, alcanzan rápido y completo equilibrio en menos de una hora de incubación y postulan que a fuerza iónica fisiológica el intercambio debe ser aún más rápido. En nuestros experimentos las reacciones de intercambio se realizaron a 140 mM de NaCl, concentración de NaCl fisiológica, para favorecer la cooperatividad en la unión y para asegurar que durante el tiempo de incubación de 90 minutos se logrará el equilibrio en la reacción de intercambio.

Después de la incubación, el precipitado y el sobrenadante se separaron por centrifugación aprovechando que la histona H1 forma precipitados con la SAR en condiciones de cooperatividad, mientras que el sobrenadante contiene la cromatina soluble. Las histonas H1 se extrajeron con HCl 0.25 M, del precipitado y del sobrenadante. La extracción ácida se realizó para evitar el manejo de volúmenes grandes al cargar los geles y para evitar que el DNA interfiriera en la movilidad electroforética de las proteínas. Posteriormente se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 20 % para su análisis en geles de poliacrilamida con SDS y en geles de urea-acético. Los geles se tiñeron con azul de coomassie.

En todos los experimentos de intercambio realizados (figura 4.17, 4.18 y 4.19) no se observa la presencia de histonas internas en los precipitados H1/SAR, lo cual indica que en nuestras condiciones de ensayo no se produce precipitación de las moléculas de cromatina.

Además, en cada uno de los experimentos realizados, se calculó la relación entre las intensidades de las histonas internas y la H1 en la cromatina inicial y en la cromatina después del intercambio. Esta relación no varió más de un 10%, lo que indica que la estequiometría de las histonas H1 en la cromatina no se altera substancialmente debido al intercambio de subtipos.

#### **4.4.2.1. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y los subtipos H1a-e y H1° purificados.**

A continuación se describen los resultados obtenidos en las reacciones de intercambio entre la cromatina y cada uno de los subtipos añadidos:

##### **Experimentos de intercambio entre la cromatina y la H1°, H1a, H1c.**

En el gel de SDS se observan tres bandas en el precipitado, (figura 4.17, carril 4): la de mayor movilidad corresponde a la proporción de H1° añadida que no se unió a la cromatina, las bandas con menor movilidad corresponden a las proporciones de H1c y H1e que se liberaron de la cromatina y se unieron a la SAR. En el sobrenadante (figura 4.17, carril 5,) se observa la nueva composición de las H1 de la cromatina; se incorporó H1° y hay menos cantidad de H1e y H1c. La relación entre las histonas internas y el total de H1 es similar a la de la cromatina de partida (carril 2), lo que indica que la H1 no se ha unido en exceso. Es importante destacar que en el precipitado H1/SAR no se observan histonas internas; por lo tanto, la cromatina no precipita durante el proceso de intercambio.

En el intercambio entre la cromatina y cada uno de los demás subtipos (H1a, H1b, H1c, H1d y H1e) se obtuvo un comportamiento parecido al observado en el intercambio con la H1°; en todos los casos se observa un incremento del subtipo añadido en detrimento de los demás subtipos en la cromatina (sobrenadante) y la presencia de éstos últimos en la SAR junto con el subtipo añadido (precipitado).

El experimento de intercambio entre la cromatina y la H1a se muestra en la figura 4.17. El gel de SDS permite observar en el precipitado las histonas H1c,e liberadas de la

cromatina y la H1a que no se unió a esta, mientras que en el sobrenadante se observa la disminución de H1c,e y el aumento del subtipo añadido.

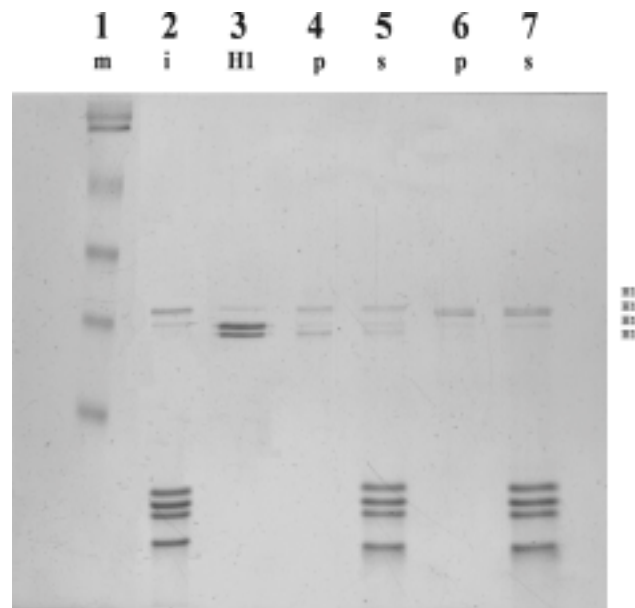


Figura 4.17. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y H1° o H1a purificadas. Las histonas fueron extraídas con ácido, analizadas en PAGE-SDS y teñidas con azul de coomassie. Carril 3, mezcla de H1° y H1a, Carriles 4 y 5, intercambio entre cromatina y H1°; Carriles 6 y 7, intercambio entre cromatina y H1a; m, marcador de peso molecular; i, input de cromatina; p, precipitado (proteínas unidas a la SAR); s, sobrenadante (cromatina soluble con la nueva composición de H1s).

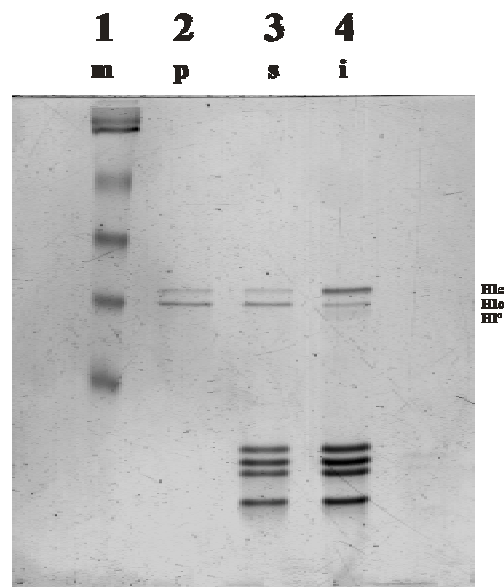


Figura 4.18. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y H1c purificada. Las histonas fueron extraídas con ácido analizadas en PAGE-SDS y teñidas con azul de coomassie. Carriles 2 y 3, intercambio entre cromatina y H1c; m, marcador de peso molecular; i, input de cromatina; p, precipitado (H1c no unida a la cromatina y proteínas liberadas de la cromatina); s, sobrenadante (cromatina soluble con la nueva composición de H1s).

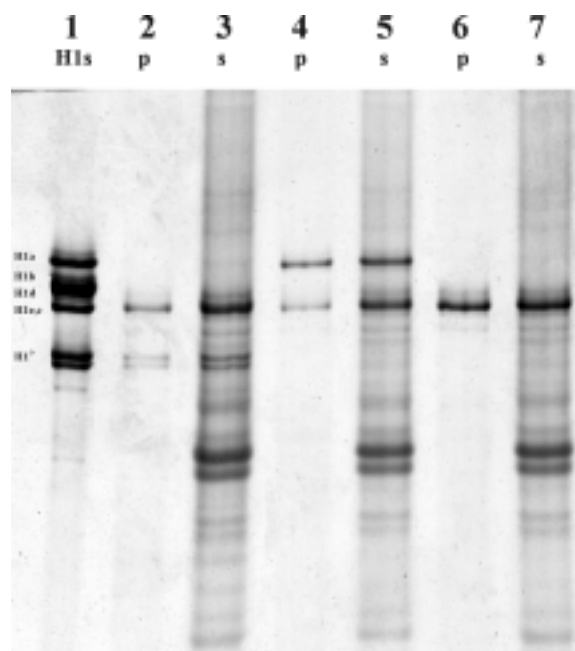


Figura 4.19. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y H1<sup>e</sup>, H1a ó H1c purificadas. Las histonas fueron extraídas con ácido y analizadas en gel de poliacrilamida con urea-acético y teñido con plata. Carril 1, H1s, mezcla de subtipos; Carriles 2 y 3, intercambio entre cromatina y H1<sup>e</sup>; Carriles 4 y 5, intercambio entre cromatina y H1a; Carriles 6 y 7, intercambio entre cromatina y H1c; p, precipitado (proteínas no unidas a la cromatina y proteínas liberadas de la cromatina); s, sobrenadante (cromatina soluble con la nueva composición de H1s).

La composición de las histonas en el experimento de intercambio entre la cromatina y la H1c se muestra en la figura 4.18. En el gel de SDS, en el precipitado (carril2, figura 4.18) se pueden observar dos bandas correspondientes a la H1e y la H1c (subtipo añadido); en la cromatina (carril 3) se observa mayor cantidad de H1c y menor cantidad de H1e.

El análisis de estos tres experimentos en geles de urea-acético (figura 4.19) nos permitió comprobar que la presencia de los subtipos H1d y H1b era inapreciable incluso cuando el gel se teñía con plata. Por tanto, es correcto considerar que la banda electroforética en los geles de SDS correspondiente a los subtipos H1e, H1d, H1b, (los tres subtipos tienen la misma movilidad), correspondían en estos casos íntegramente a la histona H1e. Para realizar los cálculos de afinidades relativas sólo se utilizaron las intensidades de los geles de SDS teñidos con azul de coomassie.

#### **Experimentos de intercambio entre la cromatina y la H1b, H1d, H1e.**

Los experimentos de intercambio entre la cromatina y las histonas H1b, H1d o H1e, se muestran en las figuras 4.20, gel de SDS, y 4.21, gel de urea-acético. Debido a que estos subtipos tienen idéntica movilidad electroforética en los geles de SDS fue

necesario analizar y cuantificar estos experimentos también en gel de urea-acético para poder determinar la cantidad de cada uno de los subtipos añadidos en los precipitados y en los sobrenadantes.

En los ensayos realizados entre la cromatina y la H1b, gel de SDS, se puede observar unida a la SAR la mezcla de H1e, H1b y H1d en una sola banda, la H1c y la H1°. En la cromatina (carril 3, figura 4.20) se observa la banda correspondiente a la mezcla de H1e, H1b y H1d y la banda correspondiente a la H1c.

En los intercambios entre cromatina y H1d o H1e (figura 4.20), se pueden observar en los precipitados, carriles 4 y 6, la mezcla de H1e y H1d, la H1c y la H1°. En el sobrenadante (carriles 5 y 7) se observa la banda correspondiente a la mezcla de H1e y H1d y los subtipos H1c y H1°, los cuales se ven menos intensos en la cromatina después del intercambio.

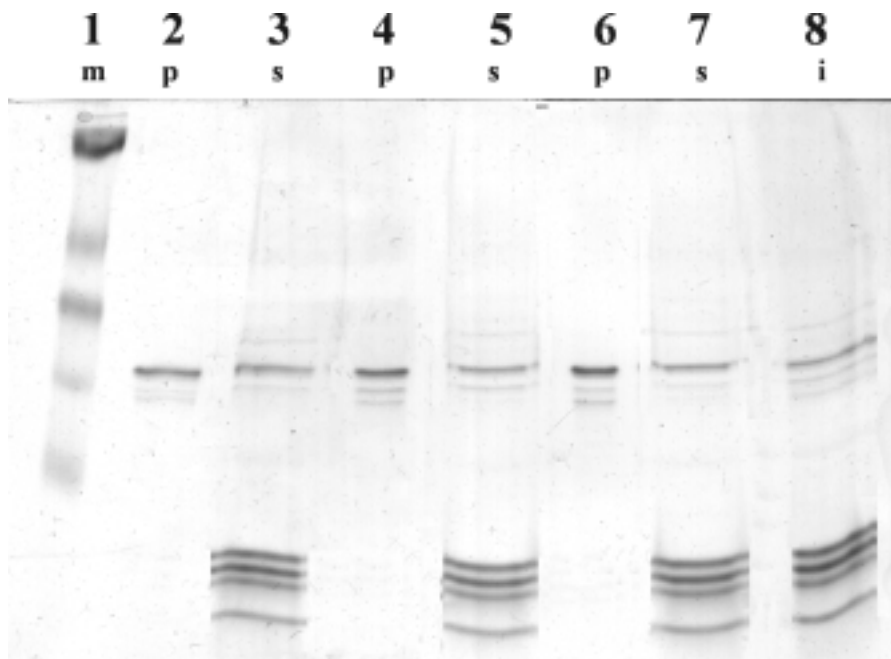


Figura 4.20. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y los subtipos H1b, H1d y H1e purificados. Las histonas fueron extraídas con ácido y analizadas en PAGE-SDS. Carriles 2 y 3, intercambio entre cromatina y H1b; carriles 4 y 5 intercambio entre cromatina y H1d; Carriles 6 y 7, intercambio entre cromatina y H1e; m, marcador de peso molecular; i, imput de cromatina; p, precipitado (proteínas no unidas a la cromatina y proteínas liberadas de la cromatina); s, sobrenadante (cromatina soluble con la nueva composición de H1s).

En el gel de urea-acético del intercambio con la H1 d (figura 4.21) en el precipitado y el sobrenadante (carriles 4 y 5) se observan la H1d, la mezcla H1e/H1c y en baja proporción H1°.

En el gel de urea-acético en el experimento de intercambio con H1e (figura 4.21), en el carril 6 se observan unidas a SAR la mezcla H1e/H1c y en baja proporción la H1°; en la cromatina (carril 7) se observa la mezcla H1e/H1c.

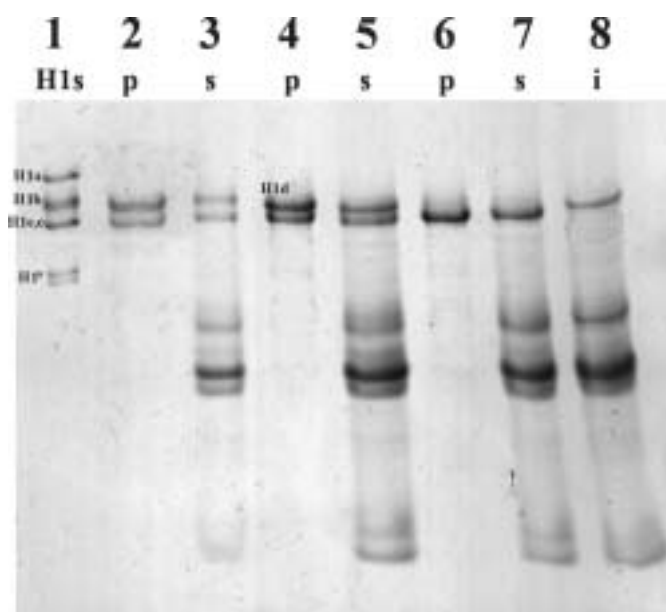


Figura 4.21. Experimentos de intercambio entre las histonas H1 de la cromatina y subtipos H1b, H1d y H1e purificadas. Las histonas fueron extraídas con ácido y analizadas en gels de poliacrilamida con urea-acético. Carril 1, mezcla de H1s; Carriles 2 y 3, intercambio entre cromatina y H1b; carriles 4 y 5, intercambio entre cromatina y H1d; Carriles 6 y 7, intercambio entre cromatina y H1e; Carril 8: imput de cromatina; p, precipitado (proteínas no unidas a la cromatina y proteínas liberadas de la cromatina); s, sobrenadante (cromatina soluble con la nueva composición de H1s).

En la tabla 4.7 se muestran las intensidades de las proteínas en los precipitados (proteína unida a la SAR) y en los sobrenadantes (proteína asociada a la cromatina soluble) de cada uno de los experimentos. En el caso de los experimentos con la H1b, H1d, y H1e, se han calculado la cantidad de cada uno de los subtipos por comparación de los gels de SDS y urea-acético. A partir de estas intensidades se realizan los cálculos para estimar las afinidades relativas de los diferentes subtipos de la histona H1 en la cromatina.



Intercambio de subtipos SAR/cromatina

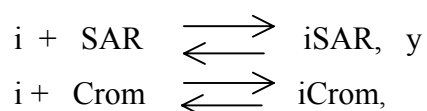
Subtipo añadido	Subtipo	Intensidad	Intensidad	Intensidad	Intensidad
		SAR	Crom	SAR	Crom
H1a	H1e	0,150	0.265		
	H1c	0.070	0.170		
	H1a	0.230	0.370		
H1b	H1e	0.321	0.420	0.440	0.180
	H1c	0.085	0.170	0.121	0.078
	H1b	0.678	0.639	0.950	0.290
H1c	H1e	0.120	0.075		
	H1c	0.240	0.220		
H1d	H1e	0.368	0.209	0.823	0.662
	H1c	0.165	0.133	0.335	0.381
	H1d	0.735	0.369	1.710	1.202
H1e	H1e	1.120	0.730	2.210	1.290
	H1c	0.090	0.090	0.150	0.130
H1°	H1e	0.170	0.210		
	H1c	0.070	0.130		
	H1°	0.161	0.159		

Tabla 4.7. Intensidades de los subtipos de la histona H1 correspondientes a los experimentos de intercambio de subtipos entre SAR y cromatina. SAR: intensidad de las bandas en el precipitado (complejos SAR-histona); S: intensidad de las bandas en el sobrenadante (histonas en la cromatina soluble).

#### 4.4.3 Determinación de la afinidad relativa de los subtipos de la H1 por la cromatina.

Las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la cromatina se obtuvieron a partir de la distribución de los subtipos entre la cromatina y la SAR después del intercambio y de las afinidades relativas de estos mismos subtipos por la SAR estimadas previamente.

Los equilibrios son:



donde (i) es uno de los subtipos H1a-e y H1°

Las expresiones de equilibrio son:

$$k_{\text{SAR}}^i = [\text{iSAR}] / [\text{i}] [\text{SAR}]$$

$$k_{\text{Crom}}^i = [\text{iCrom}] / [\text{i}] [\text{Crom}]$$

En la mezcla de reacción donde la proteína [i] puede unirse a la cromatina o a la SAR, las constantes de afinidad relativa no dependen de la concentración de proteína libre [i] porque es la misma para ambos equilibrios, por lo tanto podemos escribir:

$$k_{\text{Crom}}^i / k_{\text{SAR}}^i = [\text{iCrom}] [\text{SAR}] / [\text{iSAR}] [\text{Crom}]$$

Despejando  $k_{\text{Crom}}^i$ ,

$$k_{\text{Crom}}^i = k_{\text{SAR}}^i [\text{iCrom}] [\text{SAR}] / [\text{iSAR}] [\text{Crom}]$$

La relación  $[\text{SAR}] / [\text{Crom}]$  es la misma en las expresiones de equilibrio de todos los subtipos presentes en un ensayo determinado, por lo tanto es eliminada cuando  $k_{\text{Crom}}^i$  se expresa como constante de afinidad relativa,  $k_{\text{Crom}}^{i/j}$ , respecto a otro subtipo.

Por lo tanto:

$$k_{\text{Crom}}^{i/j} = k_{\text{Crom}}^i / k_{\text{Crom}}^j = k_{\text{SAR}}^i ( [\text{iCrom}] / [\text{iSAR}] ) / k_{\text{SAR}}^j ( [\text{jCrom}] / [\text{jSAR}] )$$

$$k_{\text{Crom}}^{i/j} = k_{\text{Crom}}^i / k_{\text{Crom}}^j = k_{\text{SAR}}^{i/j} ( [\text{iCrom}] / [\text{iSAR}] ) / ( [\text{jCrom}] / [\text{jSAR}] )$$

Los términos en la expresión son:

$$k_{\text{Crom}}^{i/j} = \text{afinidad del subtipo i respecto al subtipo j por la cromatina.}$$

$$k_{\text{SAR}}^{i/j} = \text{afinidad del subtipo i respecto al subtipo j por la SAR (tabla 4.4)}$$

$$\text{iCrom} = \text{intensidad de la H1i en la cromatina}$$

$$\text{iSAR} = \text{intensidad de la H1i en la SAR}$$

$$\text{jCrom} = \text{intensidad de la H1j en la cromatina}$$

$$\text{jSAR} = \text{intensidad de la H1j en la SAR}$$

Si consideramos un ejemplo numérico concreto, la afinidad relativa de la H1° por la cromatina respecto a la H1c, y tomando las intensidades correspondientes de la tabla 4.7 y el valor de  $k_{\text{SAR}}^{\text{o/c}}$  de la tabla 4.4, resulta:

$$k_{\text{Crom}}^{\text{o/c}} = k_{\text{SAR}}^{\text{o/c}} ( [\text{oCrom}] / [\text{oSAR}] ) / ( [\text{cCrom}] / [\text{cSAR}] )$$

$$k_{\text{Crom}}^{o/c} = 4.959 (0.159 / 0.161) / 3.93 (0.130 / 0.070)$$

$$k_{\text{Crom}}^{o/c} = 2.673$$

Repitiendo este cálculo con todos los valores de la tabla 4.7 se obtienen una serie de valores de afinidades relativas de los diferentes subtipos por la cromatina, que se resumen en la tabla 4.8 .

Afinidades relativas de los subtipos por la cromatina ( $k_{\text{Crom}}^{i/j}$ )							
a/e	b/c	b/e	d/c	d/e	e/c	o/c	o/e
0.063	0.647	0.271	3.166	1.228	2.662	2.673	1.098
	0.651	0.280	3.142	1.214	2.388		
					2.322		
					2.495		
					2.434		
					2.578		
					2.588		
					2.385		
					2.464		

Tabla 4.8. Valores de afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la cromatina.

A partir de esta tabla y usando el mismo método estadístico descrito en la sección 4.2.2.1 para el cálculo de las afinidades relativas por el DNA (ajuste por mínimos cuadrado de las diferencias de los logaritmos), se estiman los valores de las afinidades relativas de todas las parejas posibles que mejor se ajustan a los valores experimentales. Estos valores se muestran en la tabla 4.9, mientras que en la tabla 4.10 se muestran los porcentajes de error asociados a dicha estimación, calculados al igual que en el caso del DNA, a partir del promedio de las diferencias entre el valor estimado y los valores superior e inferior con un nivel de confianza de 0.95.

Estimación de las afinidades relativas de los subtipos por la cromatina							
$k_{\text{cro}}^{ij}$	a	b	c	d	e	o	(j)
a	1	4.098	6.152	19.018	15.268	16.603	
b	0.244	1	1.501	4.387	3.726	4.052	
c	0.163	0.660	1	3.092	2.482	2.699	
d	0.053	0.215	0.323	1	0.803	0.873	
e	0.065	0.268	0.403	1.246	1	1.087	
o	0.060	0.371	0.247	1.145	0.920	1	
(j)							

Tabla 4.9. Estimación de los valores de las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la cromatina.

Porcentaje de error asociado a la estimación de las afinidades relativas de los subtipos por la cromatina

$k_{cro}^{ij}$	a	b	c	d	e	0	(i)
a		5.752	6.904	6.904	5.752	7.974	
b	6.904		4.147	5.636	4.147	6.904	
c	5.752	4.147		4.147	2.300	5.752	
d	6.904	5.636	4.147		4.147	6.094	
e	5.752	4.147	2.300	4.147		5.752	
o	7.974	6.904	5.752	6.904	5.752		
(j)							

Tabla 4.10. Porcentaje de error asociado a la estimación de los valores de las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la cromatina.

El promedio de estos errores es de un 5%, Para estimar el error total asociado a estas estimaciones debemos considerar que en el calculo de las afinidades relativas para la cromatina hemos utilizado el valor de la afinidad relativa por la SAR. Estos valores de afinidad relativa por la SAR llevan asociado su propio porcentaje de error. La teoría de propagación de los errores nos indica que en este caso para obtener una estimación del error total debemos sumar ambos errores. En la tabla 4.11, se muestra el porcentaje de error total de las afinidades relativas de los subtipos por la cromatina, obtenido a partir de la suma de los errores asociados a las afinidades relativas por la SAR (tabla 4.5) y los errores asociados a la estimación de las afinidades relativas por la cromatina (tabla 4.10). Estos errores se mueven entre un 18.73 % y un 25.46 %, con un valor promedio del 22%.

Porcentaje de error total de las afinidades relativas de los subtipos por la cromatina

$k_{cro}^{ij}$	a	b	c	d	e	0	(i)
a		20.840	21.821	24.149	25.457	20.033	
b	21.992		21.983	24.394	25.443	20.275	
c	20.669	21.983		19.573	19.243	18.733	
d	24.149	24.394	19.573		24.503	20.370	
e	25.457	25.443	19.243	24.503		22.695	
o	20.033	20.275	18.733	20.370	22.695		
(j)							

Tabla 4.11. Porcentaje de error total asociado a las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por la cromatina.

Para poder comparar los resultados obtenidos con el DNA respecto a los obtenidos por la cromatina, nos interesa resaltar como queda ordenados los subtipos según las afinidades relativas de cada subtipo respecto a la H1a:

**H1a (1.0) < H1b(4.10) < H1c (6.15) < H1e (15.27) < H1° (16.60) < H1d (19.02)**

Si comparamos las afinidades relativas de los subtipos por el DNA y por la cromatina, observamos que en ambos casos el subtipo con menor afinidad por la SAR y por la cromatina es la H1a y el de mayor afinidad es la H1d. Se observan ligeras diferencias en las afinidades de H1b y H1c: la H1c tiene mayor afinidad por la cromatina que por

	Afinidad por SAR	Afinidad por cromatina
H1a	1.00	1.00
H1b	5.41	4.10
H1c	3.94	6.15
H1°	19.51	16.60
H1e	14.38	15.27
H1d	19.98	19.02

Tabla 4.12. Valores de afinidad relativa los subtipos H1°, H1a, H1c, H1b, H1d, H1e por cromatina y SAR

SAR, mientras que la H1b tiene más afinidad por SAR que por la cromatina; así mismo la H1° y la H1e presentan diferencias: la H1° presenta mayor afinidad por SAR que por la cromatina, mientras que la H1e tiene mayor afinidad por cromatina que por SAR.

#### 4.5 ESTUDIO DE DICROISMO CIRCULAR DE COMPLEJOS FORMADOS ENTRE SUBTIPOS DE LA HISTONA H1 Y EL DNA

La conformación de las moléculas biológicas juega un importante papel en la determinación de su función y actividad. A través de las transiciones conformacionales la actividad de las proteínas y el DNA determina el control y la regulación del genoma en el metabolismo celular, la replicación y el desarrollo. El dicroísmo circular es una de las técnicas físico-químicas disponibles para estudiar las conformaciones y transiciones conformacionales de las moléculas biológicas.

El DNA en disolución en condiciones fisiológicas presenta un espectro de DC conservativo, es decir, las contribuciones de elipticidad negativa y positiva son aproximadamente iguales. El espectro conservativo del DNA puede alterarse por la disminución de la polaridad del medio y por la asociación del DNA con algunas proteínas. Esta modificación consiste en la desaparición de los componentes positivos y en la aparición de una intensa banda negativa a 270 nm; este tipo de espectro se conoce como espectro  $\psi$  ( $\psi$ ). El espectro  $\psi$  se considera que tiene su origen en la agregación ordenada de las moléculas de DNA (Fasman et al., 1970, Jordan et al., 1972). La inducción del espectro  $\psi$  en el DNA depende de las condiciones del medio, como la fuerza iónica y la polaridad, de las características del DNA y de la presencia de moléculas inductoras. El objetivo de este capítulo es caracterizar la inducción de espectro  $\psi$  en tres fragmentos de DNA, de similar longitud, pero diferente secuencia, en distintas condiciones con objeto de analizar la importancia de cada una de las distintas variables que afectan a la inducción y a la intensidad del espectro  $\psi$ .

Los fragmentos de DNA utilizados fueron: la secuencia SAR de 657 pb, del grupo de genes de las histonas de *Drosophila* (Izaurre et al., 1989), con un porcentaje de A+T del 74.5 %; un fragmento de 587 pb obtenido del plásmido pUC19, con un 56% de A+T; y un fragmento de 650 pb obtenido del pBR322, con un contenido de A+T del 47 %.

En condiciones fisiológicas, los tres fragmentos tienen el espectro característico del DNA B (figura 4.22), con un máximo a 275 nm y un mínimo a 245 nm y un punto de cruce a 257 nm. Los valores de elipticidad molar a 275 nm para cada uno de los fragmentos son similares.

Nos referiremos al fragmento de 587 pb derivado de pUC19 como “pUC19”, al fragmento de 650 pb derivado de pBR322 como “pBR322” y al fragmento que contienen la secuencia SAR de 657 pb como “SAR”.

#### 4.5.1. Dicroísmo Circular de los complejos DNA/PEG.

El polietilenglicol (PEG) es un polímero neutro, que a altas concentraciones, 300 mg/ml, y en presencia de NaCl (0.3 M), es capaz de inducir el espectro  $\psi$  del DNA. Según Jordan *et al.* (1972), en estas condiciones el DNA se condensa, adquiriendo una estructura terciaria ordenada, como resultado del efecto de volumen excluido.

Los espectros con los tres fragmentos de DNA se registraron en 10 mM tampón fosfato, pH 7.0, 0.3M NaCl, 300 mg/ml de PEG. Se realizaron incubaciones de 15, 30, 60 minutos antes del registro del espectro de DC. Se pudo comprobar que los espectros no cambian significativamente en función del tiempo. Habitualmente, se utilizó un tiempo de incubación de 30 min. En la figura 4.23 se muestra que el PEG induce espectro  $\psi$  en los tres fragmentos de DNA; en los tres casos la banda de elipticidad positiva a 275 nm desaparece completamente y aparece la banda característica del espectro  $\psi$  a 270 nm. Se puede observar que el DNA que presenta elipticidad molar más negativa es el pUC19 /PEG, con una  $[\theta_{270}]$  de  $-273.252$ , seguido de SAR /PEG con una  $[\theta_{270}]$  de  $-184.502$  y, por último, el pBR322 con una  $[\theta_{270}]$  de  $-52.133$ .

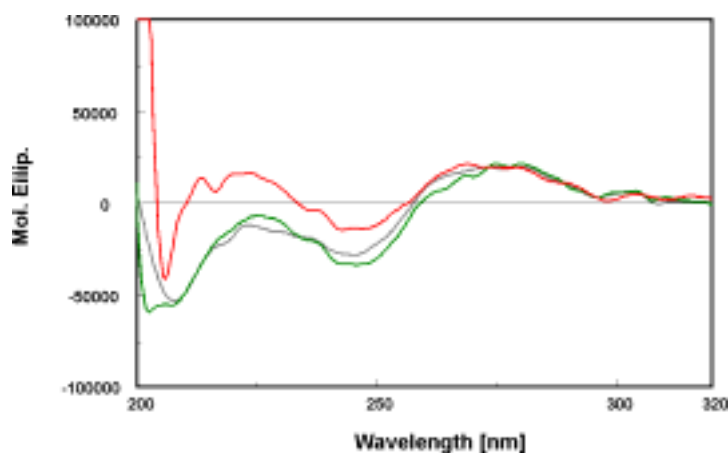


Figura 4.22. Espectros de DC de los DNAs. Espectro de DC de pBR322 \_\_\_\_, espectro de DC de pUC19 \_\_\_\_, y espectro de DC de SAR \_\_\_\_\_. Las unidades de las ordenadas son  $\text{deg. cm}^2 / \text{dmol de residuo}$ .

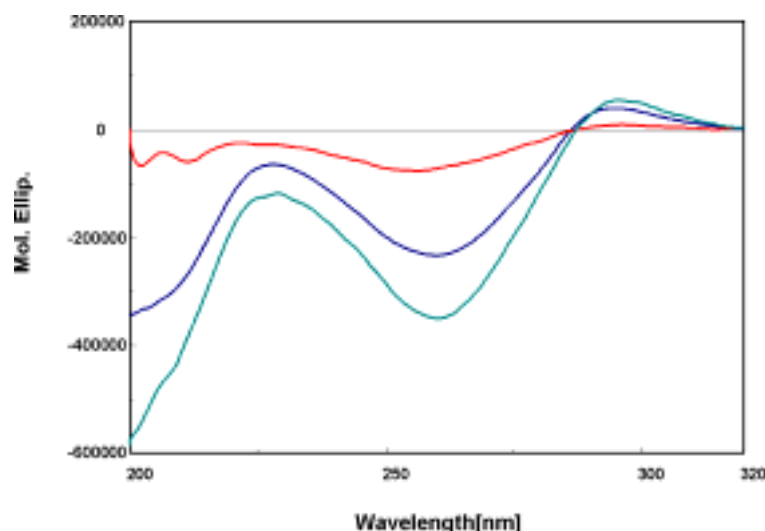


Figura 4.23. Espectros de DC de los complejos DNA / PEG. Se observa el espectro de DC del complejo pBR322 / PEG     , SAR/PEG     , y pUC19/PEG     . Todos los espectros se realizaron a una concentración de 300 mg/ml de PEG en 10 mM tampón fosfato, 0.3M NaCl, pH 7.0. El tiempo de incubación es de 30 minutos.

#### 4.5.2. Dicroísmo Circular de los complejos DNA/PEG/Distamicina

La distamicina A es un oligopéptido cuya actividad farmacológica ha sido correlacionada con la capacidad para unirse preferentemente a dominios ricos en AT en el surco menor del DNA (Hahn, 1977, Zimmer, 1975). Varios estudios han revelado que la distamicina es capaz de penetrar en el surco menor del DNA, donde abarca por lo menos cuatro pares de bases AT y forma complejos que son estabilizados por una combinación de puentes de hidrógeno, contactos de van der Waals e interacciones electrostáticas (Zimmer and Wahnert, 1986; Kopka et al.1985; Breslauer et al.,1988). La unión de distamicina a secuencias ricas en GC es impedida por choques estéricos entre los protones pirrólicos del ligando y los grupos amino de la guanina en el surco menor (Kopka et al 1985).

Primero se midió el espectro de cada uno de los fragmentos de DNA en presencia de PEG en las condiciones descritas anteriormente (10 mM tampón fosfato, pH 7.0, 0.3M NaCl, 300 mg/ml de PEG). A continuación, se añadió distamicina a concentraciones crecientes: 1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M, y finalmente 5  $\mu$ M, y se registraron los espectros de DC en cada una de las concentraciones. En la figura 4.24 se puede observar que la distamicina no afecta el espectro  $\psi$  del pUC19 /PEG y del pBR322 /PEG. En cambio, en el caso de la SAR/PEG a medida que aumenta la concentración de distamicina el espectro  $\psi$  se vuelve más negativo. En 5 mM de distamicina la banda negativa a 270 nm es un 80% más intensa que en ausencia de distamicina



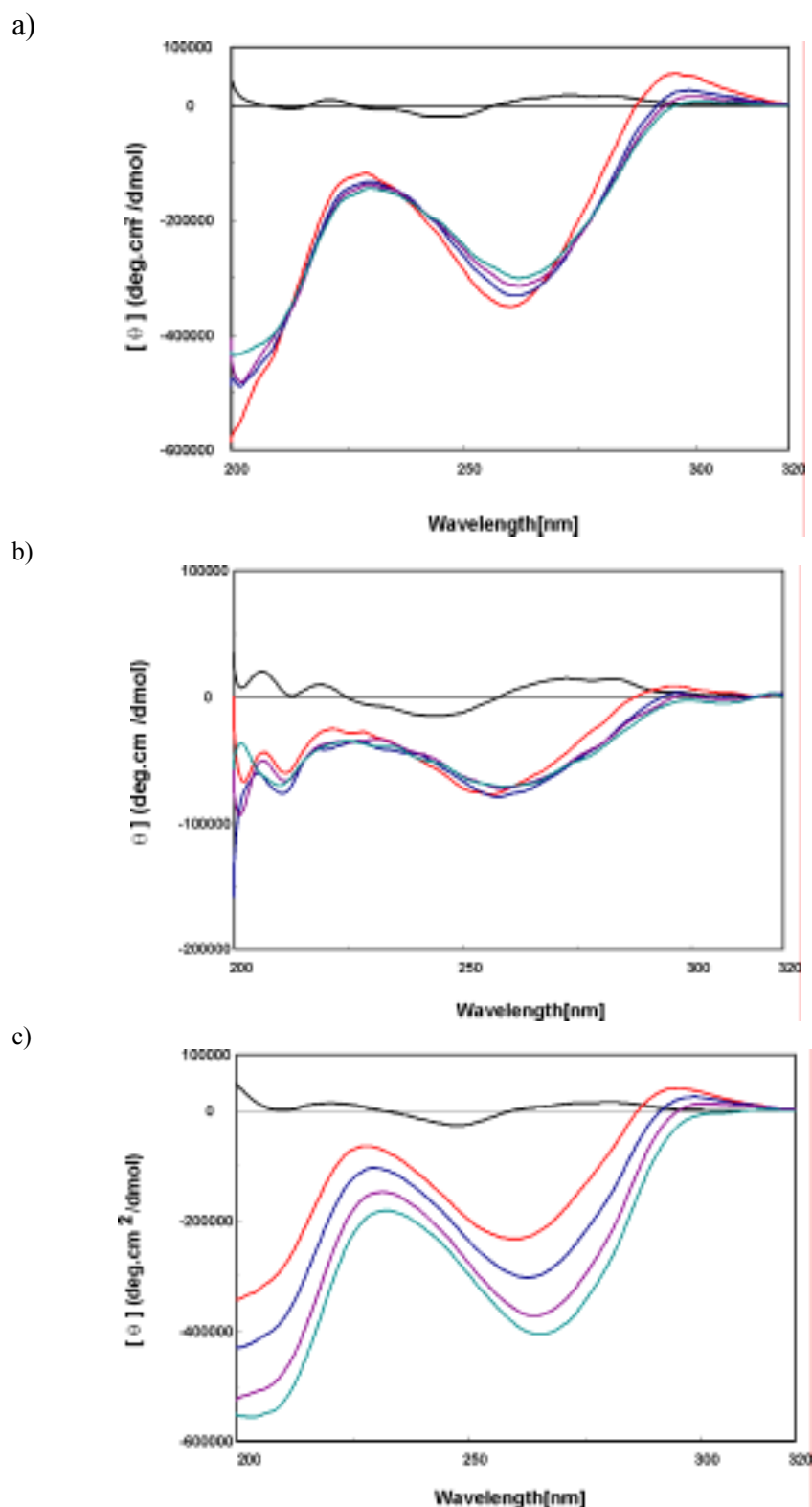


Figura 4.24. Espectros de DC de los complejos DNA/PEG/Distamicina. a) DC del complejo pUC19/PEG/Distamicina: DC pUC19       , DC pUC19/PEG       , DC pUC19/PEG/ 1 $\mu$ M distamicina       , DC pUC19/PEG/ 2.5  $\mu$ M distamicina        y DC pUC19/PEG/ 5 $\mu$ M distamicina       . b) DC del complejo pBR322/PEG/Distamicina: DC pBR322       , DC pBR322/PEG       , DC pBR322/PEG/1  $\mu$ M Distamicina       , DC pBR322/PEG/2.5  $\mu$ M        y DC pBR322/PEG/5  $\mu$ M Distamicina       . c) DC del complejo SAR/PEG/Distamicina: DC SAR       , DC SAR/PEG       , DC SAR/PEG/1 $\mu$ M Distamicina       , DC SAR/PEG/2.5  $\mu$ M        y DC del complejo SAR/PEG/5  $\mu$ M Distamicina       .

### 4.5.3. Dicroísmo Circular de los complejos Histona /DNA

La interacción de las histonas con el DNA induce el espectro  $\psi$ . Este efecto se observa con mayor intensidad con la histona H1 (Fasman 1970, 1978), particularmente con su dominio C-terminal (Moran et al. 1985).

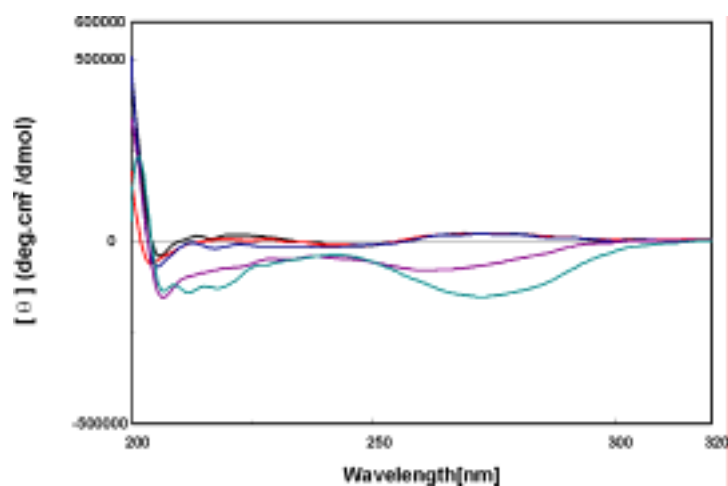
Se formaron los complejos de las histonas H1e y H1c con cada uno de los fragmentos de DNA en 0.14 M NaCl, 10 mM tampón fosfato, pH= 7.0, 0.01 % Nonidet P40 y se midieron los espectros de DC. Los complejos se realizaron con relaciones proteína /DNA (peso/peso) de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0.

En la figura 4.25 se muestran los espectros de DC para cada uno de los complejos formados entre los tres fragmentos de DNA y la histona H1e. En el complejo H1e/pBR322 se puede observar que en las relaciones proteína/DNA 0.25 y 0.5 no hay formación del espectro  $\psi$ , que si puede observarse en las relaciones 0.75 y 1.0. En los complejos SAR/H1e no hay formación del espectro  $\psi$  en la relación 0.25. En la relación 0.5 comienza a formarse, pero en una proporción muy baja. En el caso de los complejos formados entre el pUC19 y la H1e, el espectro  $\psi$  se observa en todas las relaciones proteína /DNA . Los valores de elipticidad molar se muestran en la tabla 4.12.

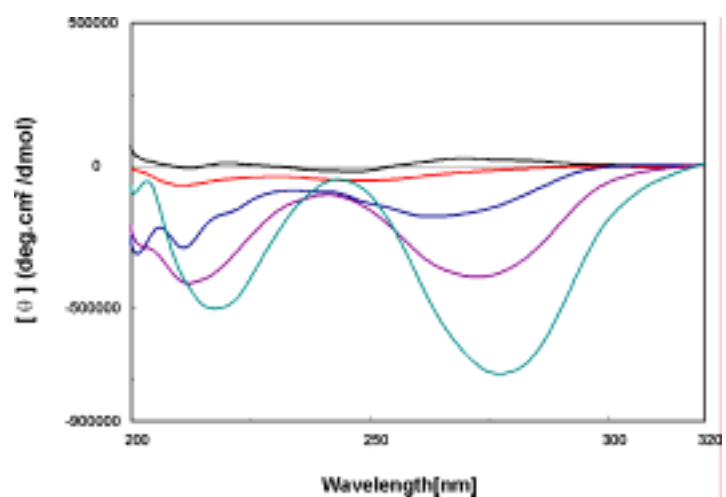
La comparación de los espectros de los complejos de la H1e con los tres fragmentos de DNA muestra que el espectro  $\psi$  más intenso es con el pUC19, seguido de la SAR y por último del pBR322 (Tabla 4.12).

En la figura 4.26 se muestran los espectros de DC de los complejos H1c/DNA: no se observa formación de espectro  $\psi$  entre la H1c y el fragmento pBR322 en ninguna de las relaciones proteína /DNA. En los complejos H1c/pUC19 se observa formación del espectro  $\psi$  en todas las relaciones proteína / DNA. El complejo H1c/SAR ocupa una posición intermedia, pues sólo se observa formación de espectro  $\psi$  a partir de una relación proteína /DNA de 0.5. Los valores de elipticidad molar se muestran en la tabla 4.12. Como en el caso de la H1e, la intensidad del espectro  $\psi$  de los complejos con H1c es mayor con el pUC19, seguido por la SAR y finalmente por el pBR322 (Tabla 4.12).

a)



b)



c)

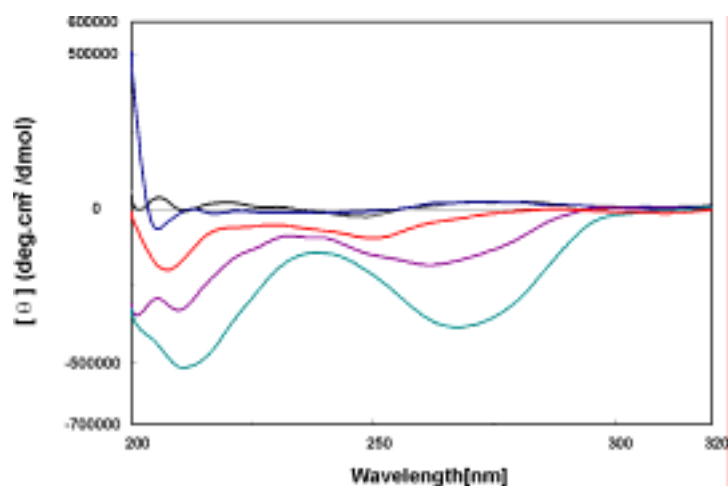


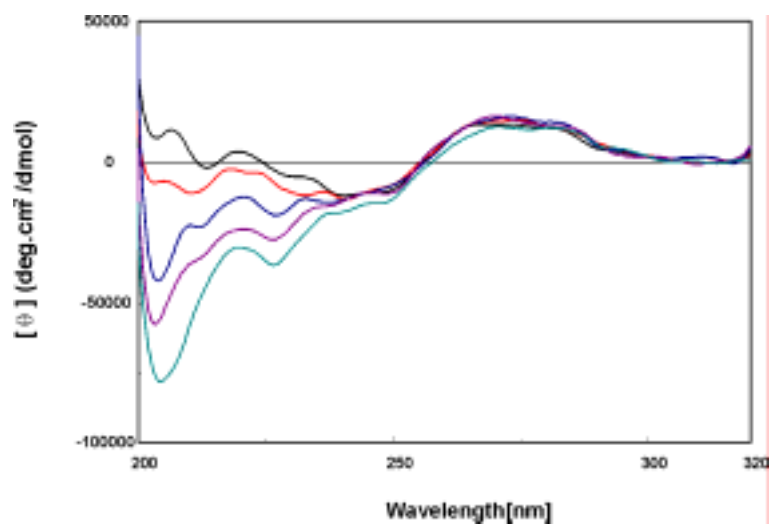
Figura 4.25. Espectros de DC de los complejos H1e/DNA. a) DC de los complejos H1e/pBR322: DC pBR322       , DC H1e/pBR322 relación 0.25       , DC H1e/pBR322, relación 0.5       , DC H1e/pBR322 relación 0.75       , DC H1e/pBR322, relación 1.0       . b) DC de los complejos H1e/pUC19: DC pUC19       , DC H1e/pUC19 relación 0.25       , DC H1e/pUC19, relación 0.5       , DC H1e/pUC19 relación 0.75       , DC H1e/pUC19, relación 1.0       . c) DC de los complejos H1e/SAR: DC SAR       , DC H1e/SAR relación 0.25       , DC H1e/SAR, relación 0.5       , DC H1e/pBR322 relación 0.75       , DC H1e/SAR, relación 1.0       .

Elipticidad molar de los complejos H1/DNA

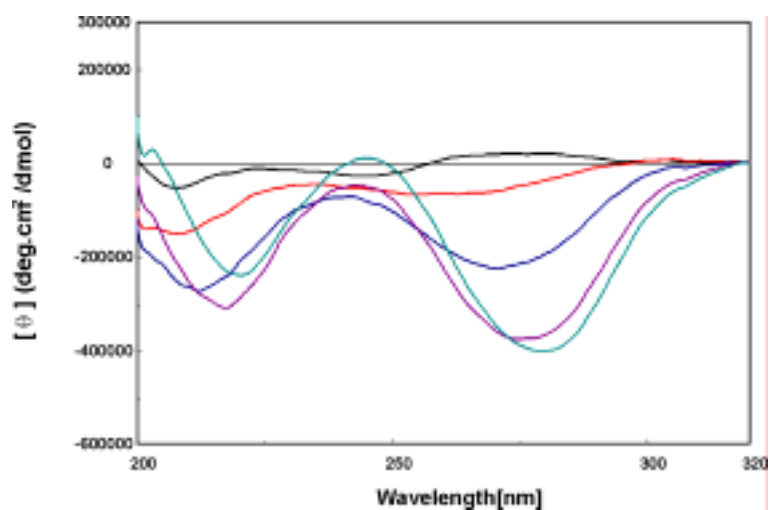
Muestra	Relación H1e /DNA	$[\theta_{270}]$	Muestra	Relación H1c /DNA	$[\theta_{270}]$
H1e /pBR322	0.25	20043	H1c /pBR322	0.25	14233
	0.5	18290		0.5	15225
	0.75	-72193		0.75	16165
	1.0	-150183		1.0	12359
H1e /pUC19	0.25	-24707	H1c /pUC19	0.25	-61549
	0.5	-169907		0.5	-225280
	0.75	-389308		0.75	-355487
	1.0	-661788		1.0	-342196
H1e /SAR	0.25	14810	H1c /SAR	0.25	12782
	0.5	-15365		0.5	-55449
	0.75	-160865		0.75	-201494
	1.0	-381482		1.0	-337635

Tabla 4.12. Valores de elipticidad molar de los complejos H1e/DNA y H1c/DNA con distintas relaciones proteína /DNA.

a)



b)



c)

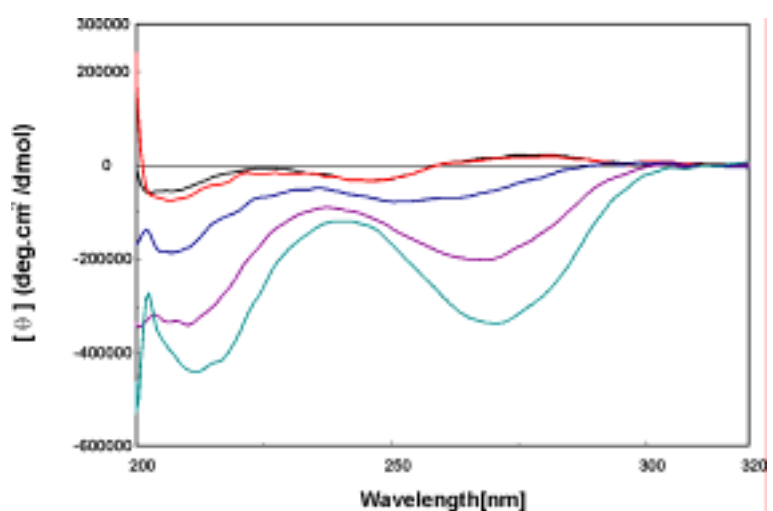


Figura 4.26. Espectros de DC de los complejos H1c/DNA. a) DC de los complejos H1c/pBR322: DC pBR322       , DC relación 0.25       , DC relación 0.5       , DC relación 0.75       , DC relación 1.0       . b) DC de los complejos H1e/pUC19: DC pUC19       , DC relación 0.25       , DC, relación 0.5       , DC relación 0.75       , DC relación 1.0       . c) DC de los complejos H1c/SAR: DC SAR       , DC relación 0.25       , DC relación 0.5       , DC relación 0.75       , DC relación 1.0       .

#### 4.5.4. Curvatura del DNA

Para contribuir a la comprensión del comportamiento de los fragmentos frente a los diferentes ligandos analizamos las diferencias en la curvatura de los tres fragmentos mediante análisis de la migración anómala por electroforesis en geles de poliacrilamida del 6% (figura 4.27). La SAR de 657 pb se desplaza como un fragmento de 1033 pb, mientras que el pUC19 experimenta solamente un ligero retraso y el pBR322 migra exactamente según su masa molecular (tabla 4.13).

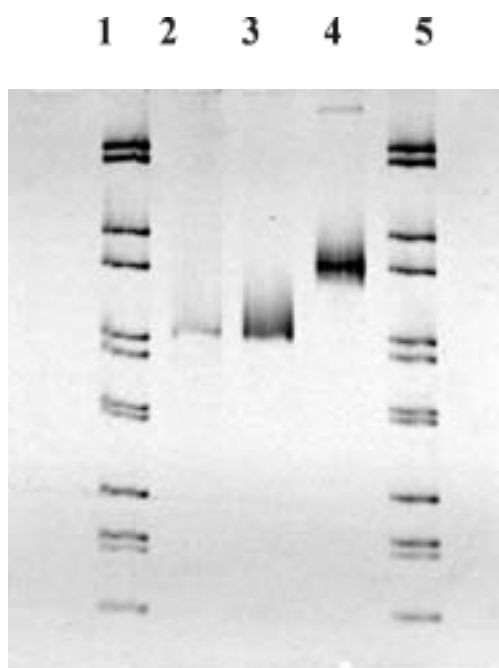


Figura 4.27. Análisis de la movilidad electroforética de los fragmentos de DNA. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%. Carril 1: pUC19; carril 2: pBR322; carril 3: SAR; m, marcador.

Si calculamos el índice de curvatura tal y como lo define Yaneva et al. (1995) (tamaño aparente/tamaño real), podemos constatar que el fragmento con mayor grado de curvatura es el fragmento SAR.

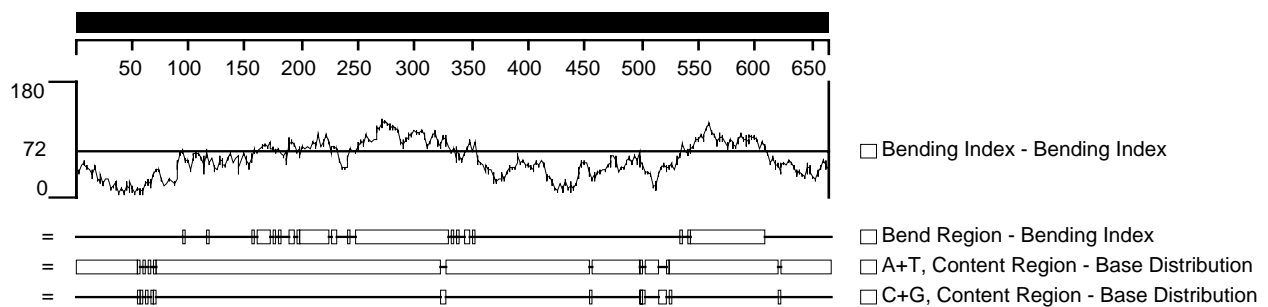
Curvatura de los fragmentos de DNA			
	Tamaño real	Tamaño aparente	Índice de curvatura
SAR	657	1033	1.57
pUC19	587	653	1.11
pBR322	650	653	1.00

Tabla 4.13. Tamaño real, tamaño aparente e índice de curvatura de los tres fragmentos de DNA.

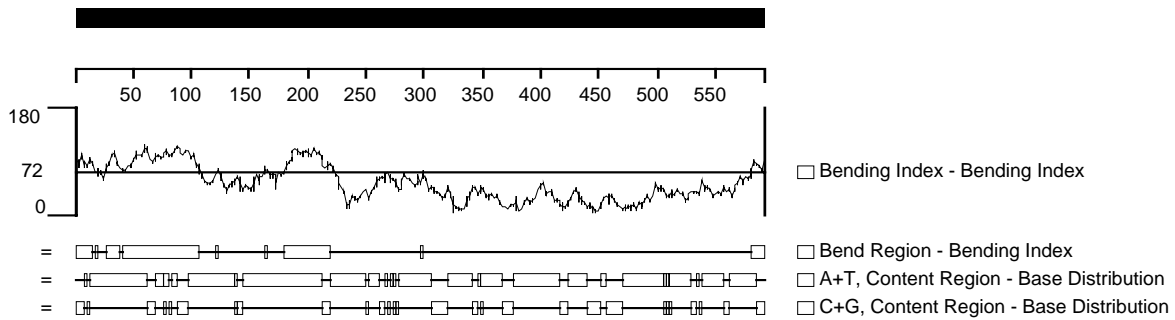
Se ha descrito la relación existente entre el retraso en la movilidad del DNA y su curvatura (Stellwagen, 2000). A mayor retraso en la movilidad, mayor curvatura en su estructura. La anomalía en la movilidad electroforética es característica de DNA curvado o doblado (Crothers et al 1990, Harrington, 1993, Koo and Crothers, 1988, Herrera and Chaires, 1993); los DNAs curvados o doblados necesitan poros relativamente más grandes para su migración, por esta razón se comportan electroforéticamente como si tuvieran un peso molecular mayor que el real. Además, la curvatura de los fragmentos de DNA está relacionada con el contenido en tramos de A y T homopoliméricos. Podemos concluir entonces que el fragmento con mayor curvatura es la SAR mientras que los otros dos fragmentos presentan poca (pUC19) o ninguna curvatura (pBR322).

Se dispone de programas de predicción de la curvatura del DNA, basados en la secuencia y en los ángulos de torsión. Se ha realizado una predicción de esta curvatura usando el programa DNA-star. Este programa calcula un índice de curvatura utilizando los “wedge angles” deducidos por Trifonov and Sussman (1980). Los resultados coinciden con los análisis electroforéticos. Se puede observar que el fragmento con mayor índice de curvatura es la SAR. Además, la región de mayor curvatura se encuentra localizada en el centro del fragmento, mientras que en el caso del pUC19, tan solo hay un poco de curvatura en un extremo y en el caso de pBR322 no existe prácticamente curvatura (figura 4.28).

SAR:



pUC19



pBR322

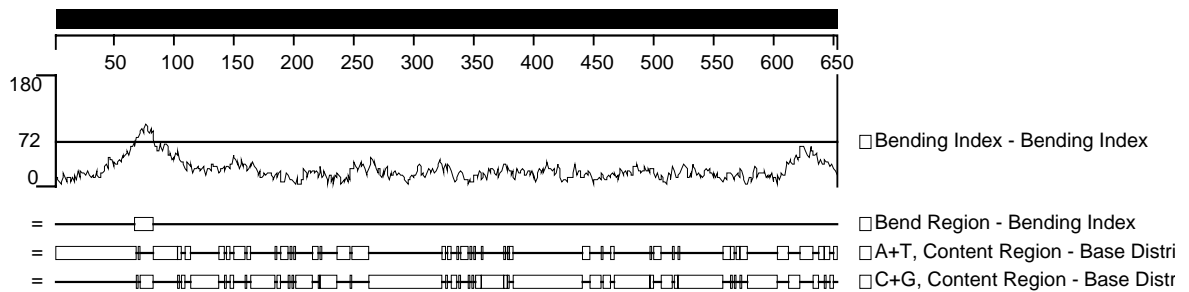


Figura 4.28. Predicción de la curvatura de los fragmentos de DNA con el programa DNA-star

Otros autores han utilizado programas basados en “wedge model” para calcular la estructura 3-D de algunas secuencias SAR (Yamamura and Nomura, 2001), entre ellas la secuencia SAR usada en este trabajo. Dichos autores muestran que esta es una de las SAR con mayor grado de curvatura.



---

# 5

## DISCUSIÓN

---

### 5.1 AFINIDAD DE LOS SUBTIPOS DE LA H1 POR EL DNA Y LA CROMATINA

La histona H1 se une al DNA internucleosomal en la fibra de cromatina. Se admite generalmente que la H1 podría contribuir a la regulación de la transcripción a través de su papel en la modulación de la superestructura de la cromatina. Otros mecanismos por los cuales la H1 podría contribuir a la regulación transcripcional serían la unión a secuencias promotoras, la unión a secuencias SAR y la participación en el posicionamiento de los nucleosomas. Experimentos *in vivo* indican que la H1 no funciona siempre como un represor transcripcional global, sino que forma parte de complejos que tanto pueden activar como reprimir genes específicos (Zlatanova end van Holde, 1992; Bouvet *et al.*, 1994; Khochbin and Wolffe, 1994; Shen and Gorovsky, 1996; Wolffe *et al.*, 1997<sup>a</sup>). Algunos de estos efectos han sido atribuidos al dominio globular (Vermaak *et al.*, 1998), mientras que otros lo han sido a los dominios terminales (Lee and Archer, 1998; Dou *et al.*, 1999).

La H1 presenta múltiples isoformas. Se dispone de más de un centenar de secuencias de H1 de plantas, invertebrados y vertebrados (Sullivan *et al.*, 2002). Las H1 de mamíferos son las mejor caracterizadas; se han identificado seis subtipos somáticos, H1a-e y H1<sup>o</sup>, un subtipo propio de la línea germinal masculina, H1t, y un subtipo específico de los oocitos, H1oo (Panyim and Chalkley, 1969; Bucci *et al.*, 1982; Lennox, 1984; Tanaka *et al.*, 2001). Los subtipos difieren en grado de fosforilación y en tasa de recambio

(Lennox *et al.*, 1982; Langan, 1982). Resultados *in vitro* sugieren que los subtipos tienen diferente capacidad de condensar la cromatina (Liao and Cole, 1981; Kadake and Rao, 1995; Talasz *et al.*, 1998). En los vertebrados, los subtipos difieren ampliamente en estabilidad evolutiva, lo cual sugiere que cada subtipo haya adquirido una función distinta (Lennox, 1984; Ponte *et al.*, 1998).

Con el objetivo de encontrar argumentos adicionales en favor de la diferenciación funcional de los subtipos y también de contribuir a una mejor caracterización de la interacción de las histonas H1 con el DNA, hemos determinado las afinidades relativas de los subtipos somáticos de la H1 de los mamíferos con el DNA y la cromatina.

Experimentos de competición de parejas de subtipos por una cantidad limitada de DNA han permitido estimar con precisión las afinidades relativas de los subtipos por el DNA. Los experimentos se han realizado en condiciones de concentración salina fisiológica (0,14 M de NaCl), en las cuales la interacción de la H1 con el DNA es cooperativa. Las afinidades relativas son similares para los dos fragmentos de DNA utilizados, el fragmento SAR y el fragmento del pUC19. El orden de afinidades por la SAR fue:

H1a (1,00)<H1c (3,94)<H1b (5,41)<H1e (14,38)<H1° (19,51)<H1d (19,98),

y para el pUC19:

H1a (1,00)<H1c (5,26)<H1b (6,41)<H1e (16,50)<H1° (22,32)<H1d (25,53).

El orden de afinidades pudo comprobarse cualitativamente mediante experimentos de desplazamiento. Los números entre paréntesis indican las afinidades relativas en relación con la H1a, el subtipo de menor afinidad. Es posible distinguir tres grupos de afinidad: la H1a de menor afinidad, la H1b y la H1c de afinidad intermedia y la H1e, H1d y H1° de mayor afinidad.

Se admite generalmente que las histonas H1 carecen de especificidad de secuencia en su unión al DNA, de acuerdo con su papel genérico en la condensación de la cromatina; sin embargo, diversos resultados muestran la preferencia de la H1 por secuencias ricas en A+T; en particular, la H1 ha sido caracterizada como una proteína de unión a las SAR (Laemmli *et al.*, 1992).

Hemos estudiado la unión de las histonas H1a-e y H1° a los fragmentos de DNA SAR y de pUC19 con el propósito de averiguar si todos los subtipos de la H1 son proteínas de unión a las SAR. Experimentos de competición entre estos dos fragmentos por una cantidad limitada de cada uno de los subtipos han mostrado que todos los subtipos ensayados se unen preferentemente a la SAR. Estos resultados muestran que las H1 poseen preferencias de secuencia, que dependen de las propiedades estructurales del

DNA. Se sabe que diferentes secuencias de DNA pueden diferir en la amplitud de los surcos, en la flexibilidad y en el potencial electrostático, entre otras propiedades, y que estas características pueden influir en la unión preferencial de la H1 (Wellman *et al.*, 1994).

Hemos analizado la curvatura de los fragmentos de DNA utilizados en este trabajo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Yaneva *et al.*, 1995). La SAR presenta movilidad anómala, que pone de manifiesto un importante grado de curvatura, mientras que el fragmento de pUC19 tiene según este mismo criterio mucha menos curvatura. Las SAR tienen propiedades especiales, los tramos de AT son conformacionalmente rígidos y tienen el surco menor estrecho (Nelson *et al.*, 1987), además, se han descrito motivos característicos de las SAR, como la secuencia consenso de la topoisomerasa II (Gasser and Laemmli, 1986a; Cockerill and Garrad, 1986), las cajas A- y T- (Gasser and Laemmli, 1986b) y el motivo ATATTT (Cockerill and Garrad, 1986; Mielke *et al.*, 1990). Estas características de las SAR, junto con la presencia de curvas estables, pueden ser causa de la unión preferente de la H1 a estas secuencias.

Conviene señalar que en este trabajo se han utilizado subtipos purificados, mientras otros estudios han sido realizados con H1 total de composición a menudo no definida.

Nuestros resultados están de acuerdo con otras investigaciones, como las de Sponar and Fric, (1972); Renz and Day, (1976) e Izaurralde *et al.* (1989) que muestran que la H1 se une preferentemente a DNA rico en AT. Además, la H1 se une preferentemente a las secuencias de DNA curvadas (Yaneva *et al.*, 1995). La importancia de la curvatura en la unión preferencial de la H1 ha sido mostrada en experimentos con distamicina A, pues en presencia de este compuesto, que “rectifica” al DNA, se pierde la unión selectiva al DNA, aunque hay que señalar que tal vez la distamicina compita con la H1 por la unión al DNA (Käs *et al.*, 1989).

La similitud de las afinidades relativas de los subtipos por la SAR y por el pUC19 indica que el grado de preferencia por las secuencias SAR es similar para todos los subtipos. Este resultado está de acuerdo con el carácter básicamente electrostático de la interacción de la H1 con el DNA. La coexistencia de diferentes afinidades relativas por el DNA con la unión preferencial a determinadas secuencias indica que la afinidad de los subtipos de la H1 por el DNA está determinada a la vez por las características de los subtipos individuales y por las secuencias de DNA implicadas en la interacción. De acuerdo con esto, la afinidad de un subtipo particular por una determinada secuencia de

DNA puede expresarse como proporcional al producto  $\mu_{\text{pro}} \cdot \mu_{\text{DNA}}$ , donde  $\mu_{\text{pro}}$  y  $\mu_{\text{DNA}}$  son las contribuciones electrostáticas efectivas de la proteína y del DNA a la interacción. Los valores de  $\mu_{\text{pro}}$  estarían limitados al número de subtipos; sin embargo, los valores de  $\mu_{\text{DNA}}$  serían mucho más numerosos debido a la modulación estructural dependiente de secuencia. Las preferencias de secuencia junto con las diferencias en afinidad relativa podrían, por tanto, dar lugar a una amplia variación en las afinidades de la H1 por el DNA, que podría afectar a la dinámica y a la ocupación de las secuencias de DNA por los diferentes subtipos.

La H1 está sometida a intercambio *in vivo* entre diferentes sitios de unión de la cromatina (Lever *et al.*, 2000; Misteli *et al.*, 2000). Las diferencias en los patrones de expresión y en las tasas de síntesis y degradación en células en división y en células quiescentes dan lugar a cambios en las proporciones relativas de las H1 durante el desarrollo y la maduración de los tejidos (Domínguez *et al.*, 1992).

Se ha descrito que *in vitro* en 0 mM de NaCl el intercambio de H1 entre los sitios de unión (entre fragmentos de cromatina) es muy escaso, pero aumenta con la fuerza iónica; a 30 mM se produce una redistribución parcial de la H1 y a 70 mM se produce un intercambio rápido, lográndose el equilibrio en una hora de incubación (Caron and Thomas, 1981). Hemos aprovechado el intercambio de las moléculas de H1 entre los sitios de unión de la cromatina para estimar las afinidades relativas de los subtipos por la cromatina. En nuestro caso, los experimentos se han realizado en condiciones de concentración salina fisiológica (0.14 M NaCl). Se añadieron a fragmentos de cromatina nativa de unos 30 nucleosomas el fragmento SAR y un subtipo purificado, en proporciones que no alterarían significativamente la estequiometría de la H1 en la cromatina. Los subtipos de la H1 se distribuyen entre la cromatina y la SAR según sus afinidades relativas por los sitios de unión a la cromatina y a la SAR. Conocidas las afinidades relativas por la SAR, es posible estimar las afinidades relativas por la cromatina. Los resultados muestran que las afinidades de los subtipos por la cromatina son similares a las encontradas para el DNA:

H1a (1,00) <H1b (4,10) <H1c (6,15) <H1e (15,27) <H1° (16,60) <H1d (19,02),  
donde los números entre paréntesis indican las afinidades relativas. Como en el caso del DNA, es posible clasificar los subtipos en tres grupos de afinidad: la H1a de débil afinidad, la H1b y la H1c de afinidad intermedia y la H1d, H1e y H1° de alta afinidad.

Un estudio anterior no detectó diferencias de afinidad entre los subtipos H1a,c,d,e,o por mononucleosomas con 210 pb de DNA, utilizando geles de retardo de baja fuerza iónica. En cambio, la H1b poseía mayor afinidad. Posiblemente, los mononucleosomas no sean el sustrato adecuado para estudiar la interacción de la H1, además de los problemas asociados al uso de fuerzas iónicas muy por debajo de la concentración fisiológica (Talasz *et al.*, 1998).

La semejanza de los valores de afinidad relativa de los subtipos por la cromatina y por el DNA sugiere que la interacción de la H1 con la cromatina es también básicamente de naturaleza electrostática. Las diferencias de afinidad entre subtipos habría que encontrarlas en los dominios N- y C-terminales, en particular en el C-terminal por su mayor longitud. Las diferencias entre los subtipos están concentradas en los dominios terminales; el dominio globular es prácticamente idéntico en el grupo H1a-e y algo más divergente en la H1°.

El carácter dinámico de la unión de la H1 a la cromatina es una característica esencial de las histonas de la clase H1, en relación con sus funciones reguladoras y estructurales. Disponer de las afinidades relativas de los subtipos de la H1 por el DNA y la cromatina puede ayudar a la comprensión de la condensación y descondensación de la cromatina y a explicar el papel de los diferentes subtipos en la replicación y en la transcripción, procesos todos que probablemente estén afectados por la afinidad de los subtipos y por sus patrones de expresión.

## **5.2 DICROISMO CIRCULAR DE AGREGADOS DE MOLÉCULAS DE DNA POR PEG Y H1**

Los espectros de DC de los tres fragmentos de DNA en presencia de PEG, que condensa el DNA por efectos del volumen excluido, son todos de tipo  $\psi$ ; sin embargo, la intensidad del espectro  $\psi$  es sustancialmente distinta en los tres DNA. Los valores de  $[\theta_{270}]$  son - 75000, - 230000 y - 340000, para el pBR322, la SAR y el pUC19, respectivamente. Los tres fragmentos de DNA no son, pues, igualmente condensables por el PEG. El fragmento menos condensable es el pBR322, el más fácilmente condensable es el pUC19, mientras que la SAR ocupa una posición intermedia.

La distamicina se une preferentemente a regiones ricas en AT, en particular a regiones AT homopoliméricas. La distamicina es capaz de eliminar la curvatura coherente de las moléculas de DNA asociada a segmentos de cuatro o cinco pares de bases AT homopoliméricos en fase con la periodicidad del DNA (Griffith *et al.*, 1986). La presencia de curvas cerradas estables podría obstaculizar la condensación de las moléculas de DNA que da lugar al espectro  $\psi$ . El análisis de las secuencias de los tres fragmentos de DNA mediante el programa DNA-star y el análisis de la movilidad electroforética en gel de poliacrilamida pone de manifiesto un alto grado de curvatura en la SAR, un ligero grado de curvatura en el pUC19 y una ausencia prácticamente total de curvatura en el pBR322. La distamicina produce un ligero incremento, del orden del 10%, en la intensidad del espectro  $\psi$ , en cambio, el efecto sobre la SAR es mucho mayor, del orden del 80%. Como consecuencia, en presencia de distamicina la intensidad del espectro  $\psi$  del pUC19 y la SAR resultan aproximadamente iguales;  $[\theta_{270}]_{SAR} = -375\ 000$  y  $[\theta_{270}]_{pUC19} = -400\ 000$ . Concluimos, pues, que la menor intensidad del espectro  $\psi$  de la SAR en relación con el pUC19 probablemente se deba a la presencia de curvas estables en la SAR; la distamicina las elimina, e iguala los espectros  $\psi$  de la SAR y el pUC19. Esta conclusión no puede generalizarse para explicar la baja intensidad del espectro  $\psi$  del fragmento de pBR322. En primer lugar el pBR322 no presenta curvas estables, a juzgar por el análisis de la secuencia con el programa DNA-star, y, sobre todo, por la total ausencia de movilidad anómala en electroforesis de poliacrilamida. En segundo lugar, de acuerdo con lo anterior, la distamicina no afecta al DC del pBR322. Las razones del débil espectro  $\psi$  del pBR322 en PEG y, por tanto, de su pobre condensación permanecen oscuras por el momento. Es posible que la secuencia de pBR322 sea particularmente rígida a causa de su elevado contenido en G+C, pues los tres puentes de hidrógeno de los pares GC confieren una mayor rigidez a la molécula. La mayor rigidez podría obstaculizar la condensación del DNA que da lugar al espectro  $\psi$ . Sin embargo, la riqueza en G+C por sí misma puede no ser suficiente para explicar las propiedades del fragmento de pBR322, que podrían depender de efectos de secuencia.

Las histonas, en particular la H1 y su dominio C-terminal, condensan el DNA y dan lugar a un espectro  $\psi$  similar al observado en PEG. La condensación responde, sin embargo, a principios distintos. Los polímeros como el PEG excluyen el DNA del

volumen de la disolución. La condensación disminuye el efecto entrópico desfavorable sobre la energía libre; aunque es necesario que la concentración de sal sea suficientemente alta ( $> 0.3 \text{ M}$ ) para estabilizar el DNA condensado. En el caso de las histonas, u otros agentes catiónicos, la neutralización de la carga del DNA es responsable de la condensación. La condensación ocurre cuando se ha neutralizado  $> 90\%$  de la carga del DNA.

Los espectros de DC obtenidos para los complejos de los tres fragmentos de DNA con la H1e y la H1c siguen las tendencias observadas con el PEG. Es decir, la distorsión del espectro conservativo del DNA es menor con el pBR322, mayor con la SAR, y máxima con el pUC19. Con la H1e, a  $r=1$  (p/p), los valores de  $[\theta_{270}]$  son  $-150\,000$ ,  $-380\,000$  y  $-750\,000$ , respectivamente. Estos resultados sugieren que las propiedades específicas de las diferentes secuencias de DNA son un factor determinante del grado de condensación del DNA. Para la interpretación correcta de los resultados de condensación con los subtipos de la H1 hay que tener presente que la afinidad de un determinado subtipo de la H1 por diferentes secuencias de DNA varía considerablemente. La afinidad entre el DNA y el ligando, así como las características específicas del ligando pueden tener un papel en la estructura de la forma condensada y, por tanto, en la intensidad del espectro  $\psi$ . La afinidad de la H1 por la SAR es al menos un orden de magnitud mayor que por el pUC19; no obstante, el espectro  $\psi$  es más intenso con el pUC19 que con la SAR. Ello muestra claramente que en cualquier caso la mayor afinidad de la H1 por la SAR no compensa la menor propensión de la SAR a condensarse ordenadamente, en relación con el pUC19. En el caso de los complejos de la H1e con pBR322, no es posible distinguir la contribución de una menor tendencia a la condensación, manifiesta en PEG, del posible efecto de una menor afinidad, pues la afinidad de la H1 por el pBR322 es aproximadamente un orden de magnitud menor que por el pUC19 y dos órdenes de magnitud menor que por la SAR (resultados no publicados).

Los resultados con la H1c confirman los resultados con la H1e. La H1c tiene una afinidad por el DNA unas tres veces menor que la H1e. Con el pBR322, la H1c no modifica el espectro conservativo del DNA ni siquiera a  $r=1$  (p/p). Con la H1e se induce espectro  $\psi$  entre 0.5 y 0.75. Como con la H1e, la intensidad del espectro  $\psi$  con el

pUC19 es mayor que con la SAR, a pesar de la mayor afinidad de la H1c por la SAR que por el pUC19. Las intensidades de los espectros de los complejos con cada uno de los fragmentos de DNA son generalmente menores en los complejos con H1c que en los complejos con H1e. Ello se debe probablemente a la menor afinidad de la H1c por el DNA, que la H1e, aunque podría haber efectos de secuencia no discernibles.

Tradicionalmente se ha considerado que la estructura de las formas compactas del DNA depende de la especie inductora de la condensación y/o de las condiciones del medio. Nuestros resultados muestran que el grado de condensación del DNA depende también en gran medida de algunas características del propio DNA dependientes de la secuencia. Hemos mostrado que la presencia de curvas estables en el DNA obstaculiza claramente condensación del DNA, sin embargo, otras características, entre las cuales tal vez se cuente la rigidez molecular, también dificultan la condensación. Estas conclusiones acerca de la importancia de las características del DNA se aplican tanto a la condensación por efecto del volumen excluido como por neutralización de carga.

La distinta susceptibilidad a la condensación de las diferentes secuencias de DNA podría tener importancia en la estructura de la cromatina: un mismo subtipo de la H1 podría tener efectos distintos sobre la estructura del DNA internucleosomal según la secuencia del propio DNA.



---

# 6

## CONCLUSIONES

---

- 1- Hemos estimado las afinidades relativas de los seis subtipos somáticos de mamífero, H1a-e y H1°, por la SAR del agrupamiento de los genes de las histonas de *Drosophila* y por un fragmento de pUC19 de similar longitud, mediante un ensayo de competición de dos subtipos presentes en similar concentración por una cantidad limitada de DNA. El orden de afinidades por la SAR fue H1a (1,0)<H1c (3,9)<H1b (5,4)<H1e (14,4)<H1° (19,5)<H1d (20,0), donde el número entre paréntesis es la afinidad relativa expresada en relación al subtipo de unión más débil, la H1a. El orden de afinidades por el fragmento de pUC19 fue H1a (1,0)<H1c (5,3)<H1b (6,4)<H1e (16,5)<H1° (22,3)<H1d (25,5). Las afinidades relativas de los subtipos por la SAR y el pUC19 son similares. Es posible distinguir tres grupos de afinidad: la H1a de baja afinidad, la H1b y la H1c de afinidad intermedia y la H1d, H1e y H1° de alta afinidad.
- 2- Los experimentos de desplazamiento de un subtipo unido al DNA por otro subtipo añadido posteriormente confirman cualitativamente el orden de afinidades obtenido de los experimentos de equilibrio.
- 3- Experimentos de competición entre el fragmento SAR y el fragmento de pUC19 por una cantidad limitada de uno de los subtipos de la H1 muestran que todos los

- subtipos somáticos, H1a-e y H1°, comparten el carácter de proteína de unión a las SAR.
- 4- Las afinidades de cada uno de los subtipos por el DNA están determinadas a la vez por las características de cada subtipo y de las secuencias de DNA a las que se unen.
  - 5- La perturbación del complemento de H1 de la cromatina nativa mediante la adición de subtipos de la H1 exógenos, en presencia de SAR para mantener la estequiometría de la H1 en la cromatina, ha permitido estimar las afinidades relativas de los subtipos H1a-e y H1° por la cromatina. El orden de afinidades expresado en relación a la H1a fue H1a (1.0)<H1b (4.1)<H1c (6.2)<H1e (15.3)<H1° (16.6)<H1d (19.0). Las afinidades relativas son similares a las obtenidas para el DNA. Como en el caso del DNA, es posible distinguir tres grupos de afinidad: la H1a de baja afinidad, la H1b y la H1c de afinidad intermedia y la H1d, H1e y H1° de alta afinidad.
  - 6- Los experimentos de condensación de los fragmentos de la SAR, el PUC19 y el pBR322 con PEG, que condensa el DNA por efecto del volumen excluido, demuestran que las características estructurales y/o mecanoelásticas del propio DNA determinan en gran medida la tendencia a la condensación ordenada que da lugar al espectro  $\psi$ . La condensación mediante ligandos catiónicos, histonas H1c y H1e, que neutralizan la carga de los fosfatos del DNA, confirma esta conclusión, pues la intensidad de los espectros  $\psi$  de los complejos de los diferentes DNA con estos ligandos es proporcional a la observada con PEG.
  - 7- En la condensación por neutralización la naturaleza del ligando también tiene un papel, que se manifiesta por la, en general, mayor intensidad del espectro  $\psi$  con la H1e que con la H1c, esta última con menor afinidad por el DNA.
  - 8- Las curvas estables, presentes en la SAR, ejercen un efecto desfavorable sobre la condensación. Este efecto desfavorable puede ser eliminado por la distamicina que “estira” el DNA.

## 7

## BIBLIOGRAFIA

- Adachi, Y., Kas, E. and Laemmli, U.K. (1989). Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions. *EMBO J.* 8, 3997-4006.
- Affolter, M., Côté, J., Renaud, J. and Ruiz-Carrillo, A. (1987). Regulation of histone and BA globin gene expression during differentiation of chicken erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3663-3672.
- Ajiro, K., Borun, T.W. and Cohen, L.H. (1981). Phosphorylation states of different histone H1 subtypes and their relationship to chromatin functions during the HeLa S-3 cell cycle. *Biochemistry* 20, 1445-1454.
- Ajiro, K., Nishimoto, T. and Takahashi, T. (1983). Histone H1 and H3 phosphorylation during premature chromosome condensation in a temperature-sensitive mutant (tsBN2) of baby hamster kidney cells. *J. Biol. Chem.* 258, 4534-4538.
- Albig, W., Drabent, B., Kunz, J., Kalff-Suske, M., Grzeschik, K.H. and Doenecke, D. (1993). All known human H1 histone genes except H1<sup>o</sup> gene are clustered on chromosome 6. *Genomics* 16, 649-654.
- Allan, J., Hartman, P.G., Crane-Robinson, C. and Avilés, F.X. (1980). The structure of histone H1 and its location in chromatin. *Nature* 288, 675-679.
- Alland, L., Muhle, R., Hou Jr., H., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. and De Pinho, R.A. (1997). Role of NCoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional and oncogenic repression. *Nature* 387, 49-55.

- Allfrey, V., Faulkner, R.M. and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 51, 786-794.
- Allis, C.D., and Gorovsky, M.A. (1981). Histone phosphorylation in macro- and micronuclei of *Tetrahymena thermophila*. *Biochemistry*. 20(13):3828-33.
- Almouzni, G., Khochbin, S., Dimitrov, S. and Wolffe, A.P. (1994). Histone acetylation influences both gene expression and development of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 165, 654-669.
- Amati, B.B., Gasser, S.M. (1988). Chromosomal ARS and CEN elements bind specifically to the yeast nuclear scaffold. *Cell*. 54, 967-978.
- An, W., Leuba, S.H., van Holde, K.E. and Zlatanova, J. (1998). Linker histone protects linker DNA on only one side of the core particle and in a sequence-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(7):3396-401.
- Annunziato, A.T., Eason, M.B. and Perry, C.A. (1995). Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry*. 34 (9):2916-24.
- Annunziato, A.T., Frado, L.L., Seale, R.L. and Woodcock, C.L. (1988). Treatment with sodium butyrate inhibits the complete condensation of interphase chromatin. *Chromosoma* 96, 132-138.
- Arents, G. and Moudrianakis, E.N. (1993). Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 10489-10493.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.W., Love, W.E. and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 10148-10152.
- Athey, B.D., Smith, M.F., Rankert, D.A., Williams, S.P., Langmore, J.P. (1990). The diameters of frozen-hydrated chromatin fibers increase with DNA linker length: evidence in support of variable diameter models for chromatin. *J Cell Biol.* 111(3): 795-806.
- Aubert, D., García, M., Benchaibi, M., Poncet, D., Chebloune, Y., Verdier, G., Nigon, V., Samarut, J. and Mura, C.V. (1991). Inhibition of proliferation of primary avian fibroblasts through expression of histone H5 depends on the degree of phosphorylation of the protein. *J. Cell Biol.* 11, 497-506.
- Ausio, J., Dong, F. and van Holde, K.E. (1989). Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone tails in the stabilization of the nucleosome. *J. Mol. Biol.* 206, 451-463.

- Bates, D.L. and Thomas, J.O. (1981). Histones H1 and H5: one or two molecules per nucleosome. *Nucleic. Acids Res.* 9, 5883-5894.
- Baxevanis, A.D., Bryant, S.H. and Landsman, D. (1995). Homology model building of the HMG-1 box structural domain. *Nucleic. Acids Res.* 23, 1604-1613.
- Bednar, J., Horowitz, R.A., Dubochet, J. and Woodcock, C.L. (1995). Chromatin conformation and salt induced compaction: three dimensional structural information from cryoelectron microscopy. *J. Cell Biol.* 131, 1365-1376.
- Benyajati, C. and Worcel, A. (1976). Isolation, characterization and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*. *Cell* 9, 393-407.
- Bharath, M.M.S., Khadake, J.R. and Rao, M.R.S. 1998. Expression of rat histone H1d in *Escherichia coli* and its purification. *Protein Expression and Purification.* 12, 38-44.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). Improved silver-staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis.* 8, 93-99.
- Bone, J.R., Lavender, J., Richman, R., Palmer, M.J., Turner, B.M., Kuroda, M.I. (1994). Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 8(1): 96-104.
- Gorousky, 1986, J., Gomez-Lira, M.J. and Schroter, H. (1983). Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated. *Eur. J. Biochem.* 130, 437-445.
- Böhm, E.L., Strickland, W.N., Strickland, M., Thwaites, B., Van der Westhuizen, D.R. and Von Holt, C. 1973. Purification of the five main calf thymus histone fractions by gel exclusion chromatography. *FEBS Lett.* 34, 217-221.
- Böhm, L. and Creemers, P.C. (1993). Folding of terminal histone-H1 peptides in the presence of the oligonucleotide 5'-(AT)<sub>6</sub>-3'. *Biochimica et Biophysica Acta* 1202, 230-234.
- Böhm, L. and Mitchell, T.C. (1985). Sequence conservation in the N-terminal domain of histone H1. *FEBS Letters* 193, 1-4.
- Boulikas, T., Wiseman, J.M. and Garrard, W.T. (1980). Points of contact between histone H1 and the histone octamer. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77, 127-131.
- Bouvet, P., Dimitrov, S. and Wolffe, A.P. (1994). Specific regulation of chromosomal 5S rRNA gene transcription *in vivo* by histone H1. *Genes Dev.* 8, 1147-1159.
- Boy de la Tour, E. and Laemmli, U.K. (1988). The metaphase scaffold is helically folded: sister chromatids have predominantly opposite helical handedness. *Cell* 55, 937-944.

- Boyes, J. and Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J.* 11, 327-333.
- Bradbury, E.M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *BioEssays* 14, 6-16.
- Bradbury, E.M., Cary, P.D., Chapman, G.E., Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Rattle, H.W., Boublik, M., Palau, J. and Avilés, F.J. (1975). Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 (F1) in eukaryote chromatin. The conformation of histone H1. *Eur. J. Biochem.* 52, 605-613.
- Bradbury, E.M., Danby, S.E., Rattle, H.W. and Giancotti, V. (1975). Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 (F1) in eukaryote chromatin. Histone H1 in chromatin and in H1 - DNA complexes. *Eur. J. Biochem.* 57, 97-105.
- Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. and Broach, J.R. (1993). Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced histone acetylation. *Genes Dev.* 7, 592-604.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, B.M. and Broach, J.R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin acetylation pattern. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4349-4356.
- Breneman, J.W., Yau, P., Teplitz, R.L. and Bradbury, E.M. (1993). A light microscope study of linker histone distribution in rat metaphase chromosomes and interphase nuclei. *Experimental Cell Research* 206, 16-26.
- Breslauer, K.J., Ferrante, R., Marky, L. A., Dervan, P.B. and Youngquist, R. S. (1988) in structure & expression, Vol 2: DNA and its Drug complexes (Sarma, R.H., and Sarma, M.H., Eds) p. 273-289, Adenine Press, Guilderland, N.Y.
- Brown, D.T., Gunjan, A., Alexander, B.T., Sittman, D.B. (1997). Differential effect of H1 variant overproduction on gene expression is due to differences in the central globular domain. *Nucleic Acids Res.* 25, 5003-5009.
- Brown, D.T., Alexander, B.T. and Sittman, D.B. (1996). Differential effect of H1 variant overexpression on cell cycle progression and gene expression. *Nucleic Acids Research.* 24,3, 486- 493
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Bucci, L.R., Brock, W.A., Meistrich, M.L. (1982). Distribution and synthesis of histone 1 subfractions during spermatogenesis in the rat. *Exp Cell Res.* 140(1):111-8.

- Buckle, R.S., Maman, J.D. and Allan, J. (1992). Site-directed mutagenesis studies on the binding of the globular domain of linker histone H5 to the nucleosome. *J. Mol. Biol.* 223, 651-659.
- Bustin, M. and Reeves, R. (1996). High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* 54, 35-100.
- Butler, P.J.G. (1984). A defined structure of the 30 nm chromatin fibre which accommodates different nucleosomal repeat lengths. *EMBO J.* 3, 2599-2604.
- Caron, F., and Thomas, J.O. (1981). Exchange H1 between segments of chromatin. *J. Mol. Biol.* 146, 513-537.
- Cerf, C., Lippens, G., Muyldermans, S., Segers, A., Ramakrishnan, V., Wodak, S.J., Hallenga, K. and Wyns, L. (1993). Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: Sequential assignment and secondary structure. *Biochemistry* 32, 11345-11351.
- Cerf, C., Lippens, G., Ramakrishnan, V., Muyldermans, S., Segers, A., Wyns, L., Wodak, S.J. and Hallenga, K. (1994). Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: Full assignment, tertiary structure, and comparison with the globular domain of histone H5. *Biochemistry* 33, 11079-11086.
- Chang, L., Loranger, S.S., Mizzen, C., Ernst, S.G., Allis, C.D. and Annunziato, A.T. (1997). Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry* 36, 469-480.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y. and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with PCAF and CBP /p300. *Cell* 90, 569-580.
- Chipev, C.C. and Wolffe, A.P. (1992). The chromosomal organization of *Xenopus laevis* 5S ribosomal RNA genes *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 45-55.
- Churchill, M.E.A. and Suzuki, M. (1989). 'SPKK' motifs prefer to bind to DNA at A/T-rich sites. *EMBO J.* 8, 4189-4195.
- Churchill, M.E.A. and Travers, A.A. (1991). Protein motifs that recognize structural features of DNA. *Trends Biochem. Sci.* 16, 92-97.
- Cirillo, L.A., McPherson, C.E., Bossard, P., Stevens, K., Cherian, S., Shim E.Y., Clark, K.L., Burley, S.K. and Zaret, K.S. (1998). Binding of the winged helix transcription factor HNF3 to a linker histone site on the nucleosome. *EMBO J.* 17, 244-254.
- Clark, D.J. and Kimura, T. (1990). Electrostatic mechanism of chromatin folding. *J. Mol. Biol.* 211, 883-896.

- Clark, D.J. and Thomas, J.O. (1986). Salt-dependent co-operative interaction of histone H1 with linker DNA. *J. Mol. Biol.* 187, 569-580.
- Clark, D.J., Hill, C.S., Martin, S.R. and Thomas, J.O. (1988).  $\alpha$ -Helix in the carboxy-terminal domain of histones H1 and H5. *EMBO J.* 7, 69-75.
- Clark, D.J., O'Neill, L.P. and Turner, B.M. (1993). Selective use of H4 acetylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 294, 557-561.
- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E. and Burley, S.K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364, 412-420.
- Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Nilges, M., Sukumaran, D.K. and Zarbock, J. (1987). The polypeptide fold of the globular domain of histone H5 in solution. A study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO J.* 6, 1833-1842.
- Cockerill, P.N. and Garrard, W.T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. *Cell* 44, 273-282.
- Cole, R.D. (1984). A mini review of microheterogeneity in H1 histone and its possible significance. *Anal. Biochem.* 136, 24-30.
- Cole, R.D. (1989). Purification and analysis of H1 histones. *Methods in enzymology* 170, 524-532.
- Collas, P., Courvalin, J.C. and Poccia, D. (1996). Targeting of membranes to sea urchin sperm chromatin is mediated by a Lamin B receptor-like integral membrane protein. *J. Cell Biol.* 135, 1715-1725.
- Cook, P.R. (1988). The nucleoskeleton: artefact, passive framework or active site? *J. Cell Sci.* 90, 1-6.
- Cook, P.R. and Brazell, I.A. (1975). Supercoils in human DNA. *J. Cell Sci.* 19, 261-279.
- Craig, J.M. and Bickmore, W.A. (1993). Chromosome bands-flavours to savour. *Bioessays* 15, 349-354.
- Craig, J.M., Boyle, S., Perry, P. and Bickmore, W.A. (1997). Scaffold attachments within the human genome. *J Cell Sci.* 110, 2673-82.
- Crane-Robinson, C. and Ptitsyn, O.B. (1989). Binding of the globular domain of linker histones H5/H1 to the nucleosome: a hypothesis. *Protein Eng.* 2, 577-582.
- Creemers, P., Monestier, M. and Böhm, L. (1992). Epitope recognition in histone H1 by SLE autoantibodies in the presence of a DNA-ligand. *Autoimmunity* 12, 167-174.



- Crippa, M.P., Alfonso, P.J. and Bustin, M. (1992). Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. *J. Mol. Biol.* 228, 442-449.
- Crippa, M.P., Trieschmann, L., Alfonso, P.J., Wolffe, A.P. and Bustin, M.(1993). Deposition of chromosomal protein HMG-17 during replication affects the nucleosomal ladder and transcriptional potential of nascent chromatin. *EMBO J.* 12, 3855-3864.
- Crothers, D.M., Haran, T.E., Nadeau, J.G. (1990). Intrinsically bent DNA. *J. Biol. Chem.* 265, 7093-7096.
- Csordas, A. (1990). On the biological role of histone acetylation. *Biochem. J.* 265, 23-38.
- Daban, J.-R. and Bermúdez, A. (1998). Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers. *Biochemistry* 37, 4299-4304.
- Dasso, M., Dimitrov, S. and Wolffe, A.P. (1994). Nuclear assembly is independent of linker histones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 12477-12481.
- Davey, C., Pennings, S., Meersseman, G., Wess, T.J. and Allan, J. (1995). Periodicity of strong nucleosome positioning sites around the chicken adult  $\beta$ -globin gene may encode regularly spaced chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 11210-11214.
- De Capoa, A., Febbo, F.R., Giovannelli, F., Niveleau, A., Zardo, G., Marenzi, S. and Caiafa, P. (1999). Reduced levels of poly(ADP-ribosylation) result in chromatin compaction and hypermethylation as shown by cell-by-cell computer-assisted quantitative analysis. *FASEB J.* 13, 89-93.
- De Lange, R.J., Farnbrough, D.M., Smith, E.L. and Bonner, J. (1969a). Calf and pea histone IV: the complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of N-acetyllysine. *J. Biol. Chem.* 244, 319-334.
- De Lange, R.J., Farnbrough, D.M., Smith, E.L. and Bonner, J. (1969b). Calf and pea histone IV: complete amino acid sequence of pea seedling histone IV; comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.* 244, 5669-5679.
- De Lange, T. (1992). Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J.* 11, 717-724.
- D'Erme, M., Zardo, G., Reale, A. and Caiafa, P. (1996). Cooperative interactions of oligonucleosomal DNA with the H1e histone variant and its poly(ADP-ribosyl)ated isoform. *Biochem. J.* 316, 475-480.
- Dimitrov, S., Almuzni, G., Dasso, M., and Wolffe, A.P. (1993). Chromatin transitions during early *Xenopus* embryogenesis: changes in histone H4 acetylation and in linker histone type. *Dev. Biol.* 160, 214-227.

- Dimitrov, S., Dasso, M.C. and Wolffe, A.P. (1994). Remodeling sperm chromatin in *Xenopus laevis* egg extracts: the role of core histone phosphorylation and linker histone B4 in chromatin assembly. *J. Cell Biol.* 126, 591-601.
- Dimitrov, S.I., Russanova, V.R. and Pashev, I.G. (1987). The globular domain of histone H5 is internally located in the 30nm fibre: an immunochemical study. *EMBO J.* 6, 2387-2392.
- DiNardo, S., Voelkel, K. and Sternglanz, R. (1984). DNA topoisomerase II is required for segregation of daughter molecules at the termination of DNA replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 81, 2616-2620.
- Ding, H.-F., Rimsky, S., Batson, S.C., Bustin, M. and Hansen, U. (1994). Stimulation of RNA polymerase II elongation by chromosomal protein HMG-4. *Science* 265, 796-799.
- Domínguez, V., Piña, B., Suau, P. (1992). Histone H1 synthesis in neurons and neuroblasts. *Development* 115, 181-185.
- Dou, Y., Mizzen, C.A., Abrams, M., Allis, C.D., Gorovsky, M.A. (1999). Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by mimicking H1 removal. *Mol Cell.* 4(4):641-7.
- Draves, P.H., Lowary, P.T. and Widom, J. (1992). Co-operative binding of the globular domain of histone H5 to DNA. *J. Mol. Biol.* 225, 1105-1121.
- Drew, H.R. and Travers, A.A. (1985). DNA bending and its relation to nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* 186, 773-790.
- Dunphy, W.G. and Newport, J.W. (1988). Unraveling of mitotic control mechanisms. *Cell* 55, 925-928.
- Earnshaw, W.C. (1988). Mitotic chromosome structure. *Bioessays* 9, 147-150.
- Earnshaw, W.C. (1991). Large scale chromosome structure and organization. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1, 237-244.
- Ebralidse, K.K., Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W. and Crane-Robinson, C. (1993). Nucleosomal structure at hyperacetylated loci probed in nuclei by DNA-histone crosslinking. *Nucleic. Acids Res.* 21, 4734-4738.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M. and Roth, S.Y. (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* 10, 1247-1259.
- Eickbusch, T.H. and Moudrianakis, E.N. (1978). The histone core complex: an octamer assembled by two sets of protein-protein interactions. *Biochemistry* 17, 4955.
- Einck, L. and Bustin, M. (1985). The intracellular distribution and function of the high mobility group chromosomal proteins. *Exp. Cell Res.* 156, 295-310.

- Erard, M., Lakhdar-Ghazal, F. and Amalric, F. (1990). Repeat peptide motifs which contain  $\beta$ -turns and modulate DNA condensation in chromatin. *Eur. J. Biochem.* 191, 19-26.
- Ernst, S.G., Miller, H., Brenner, G.A., Nocenta-McGrath, C., Francis, C. and McIsaac, R. (1987). Characterization of a cDNA clone coding for a sea urchin histone H2A variant related to the H2A.F /Z histone protein of vertebrates. *Nucleic. Acids Res.* 15, 4629-4644.
- Fasman, G.D. (1978). Circular dichroism analysis of chromatin and DNA--nuclear protein complexes. *Methods Cell Biol.* 1978; 18: 327-49.
- Fasman, G.D., Hoving, H., Timasheff, S.N. (1970). Circular dichroism of polypeptide and protein conformations. Film studies. *Biochemistry.* 9, 3316-3324.
- Fedoseeva, G., Srebrevna, L., Zlatanova, J. and Tsanev, R. (1983). Dynamic of H1<sup>o</sup> contents in rat liver after partial hepatectomy. *Int. J. Biochem.* 15, 1489-1491.
- Felsenfeld, Gary. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature.* 355 (6357):219-24. Review.
- Felsenfeld, G. and McGhee, J.D. (1986). Structure of the 30nm fibre. *Cell* 44, 375-377.
- Finch, J.T., Lutter, L.C., Rhodes, D., Brown, A.S., Rushton, B., Levitt, M. and Klug, A. (1977). Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature (London)* 269, 29-36.
- Fletcher, T.M. and Hansen, J.C. (1995). Core histone tail domains mediate oligonucleome folding and nucleosomal DNA organization through distinct molecular mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 25359-25362.
- Fletcher, T.M. and Hansen, J.C. (1996). The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit. Rev. in Euk. Gene Expression* 6, 149-188.
- Foisner, R. and Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73, 1267-1279.
- Franke, W.W. (1987). Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins: a growing multigene family. *Cell* 48, 3-4.
- García-Ramírez, M. and Leuba, S.H. (1990). One-step fractionation method for isolating H1 histones from chromatin under non-denaturing conditions. *Protein Expr. Purif.* 1, 40-44.
- García-Ramírez, M., Dong, F. and Ausio, J. (1992). Role of the histone 'tails' in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *J. Biol. Chem.* 267, 19587-19595.

- García-Ramírez, M., Rocchini, C. and Ausio, J. (1995). Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J. Biol. Chem.* 270, 17923-17928.
- García-Segura, L.M., Luquin, S., Martinez, P., Casas, M.T. and Suau, P. (1993). Differential expression and gonadal hormone regulation of histone H1<sup>o</sup> in de developing and adult rat brain. *Dev. Brain Res.* 73, 63-70.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986a). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46, 521-530.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986b). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* 5, 511-518.
- Gasser, S.M., Amati, B.B., Cardenas, M.E. and Hofmann, J.F. (1989). Studies on scaffold attachment sites and their relationship to genome function. *Int. Rev. Cytol.* 119, 57-96.
- Gjerset, R., Gorka, C., Hasthorpe, S., Lawrence, J.J. and Eisen, H. (1982). Developmental and hormonal regulation of protein H1<sup>o</sup> in rodents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2333-2337.
- Glass, J.R. and Gerace, L. (1990). Lamins A and C bind and assemble at the surface of mitotic chromosomes. *J. Cell. Biol.* 111, 1047-1057.
- Gobel, U., Maas, R., Clad, A. (1987). Quantitative electroelution of oligonucleotides and large DNA fragments from gels and purification by electro dialysis. *J Biochem Biophys Methods.* 14 (5):245-60.
- Godde, J.S. and Wolffe, A.P. (1996). Nucleosome assembly of CTG triplet repeats. *J. Biol. Chem.* 271, 15272-15279.
- Gorka, C., Fakan, S. and Lawrence, J.J. (1993). Light and electron immunocytochemical analysis of histone H1<sup>o</sup> distribution in the nucleus of Friend erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.* 205, 152-158.
- Gorovsky, M.A., Pleger, G.L., Keevert, J.B. and Johmann, C.A. (1973). Studies on histone fraction F2A1 in macro and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*. *J. Cell. Biol.* 57, 773-781.
- Gorovsky, M.A (1973). Macro- and micronuclei of *Tetrahymena pyriformis*: a model system for studying the structure and function of eukaryotic nuclei. *J Protozool.* 20(1): 19-25.
- Goytisolo, F.A., Gerchman, S.E., Yu, X., Rees, C., Graziano, V., Ramakrishnan, V. and Thomas, J.O. (1996). Identification of two DNA-binding sites on the globular domain of histone H5. *EMBO J.* 15, 3421-3429.
- Graziano, V., Gerchman, S.E., Schneider, D.K. and Ramakrishnan, V. (1994). Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30 nm filament. *Nature* 368, 351-354.

- Green, G.R. and Poccia, D.L. (1985). Phosphorylation of sea urchin sperm H1 and H2B histones precedes chromatin decondensation and H1 exchange during pronuclear formation. *Dev. Biol.* 108, 235-245.
- Griffith. J., Bleyman, M., Rauch, C.A, Kitchin, P.A., Englund, P.T. (1986). Visualization of the bent helix in kinetoplast DNA by electron microscopy. *Cell.* 46(5):717-24.
- Gurley, L.R., D'Anna, J.A., Barham, S.S., Deavan, L.L. and Tobey, R.A. (1978). Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur. J. Biochem.* 84, 1-15.
- Gurley, L.R., Walters, R.A. and Tobey, R.A. (1975). Sequential phosphorylation of histone subfractions in the Chinese hamster cell cycle. *J. Biol. Chem.* 250, 3936-3944.
- Guschin, D.Y., Ebralidse, K.K., and Mirzabekov, A.D. (1991). Structure of nucleosomes. Localization of the H2A and H2B histone segments interacting with DNA using DNA-protein crosslinking. *Mol Biol.* 25(5):1400-1411.
- Guschin, D., Chandler, S. and Wolffe, A.P. (1998). Asymmetric linker histone association directs the asymmetric rearrangement of core histone interactions in a positioned nucleosome containing a thyroid hormone response element. *Biochemistry* 37, 8629-8636.
- Hahn F.E. (1977). Modes of action of antimicrobial agents *Top Curr Chem.* 72:1-19.
- Halmer, L. and Gruss, C. (1996). Effects of cell cycle dependent histone H1 phosphorylation on chromatin structure and chromatin replication. *Nucl. Acids Res.* 24, 1420-1427.
- Hansen, J.C. and Wolffe, A.P. (1992). The influence of chromatin folding on transcription initiation and elongation by RNA polymerase III. *Biochemistry* 31, 7977-7988.
- Hansen, J.C., Ausio, J., Stanik, V.H. and van Holde, K.E. (1989). Homogenous reconstituted oligonucleosomes, evidence for salt-dependent folding in the absence of histone H1. *Biochemistry* 28, 9129-9136.
- Harrington, R.E. (1993). Studies of DNA bending and flexibility using gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 14, 732-746.
- Hart, C.H. and Laemmli, U.K. (1998). Facilitation of chromatin dynamics by SARs. *Current opinion in genetics and development* 8, 519-525.
- Hartman, P.G., Chapman, G.E., Moss, T. and Bradbury, E.M. (1977). Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryotic chromatin: the three structural regions of the histone H1 molecule. *Eur. J. Biochem.* 77, 45-51.

- Harvey, R.P., Whiting, J.A., Coles, L.S., Krieg, P.A. and Wells, J.R.E. (1983). H2A.F: an extremely variant histone H2A sequence expressed in the chicken embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80, 2819-2823.
- Hatch, C.L. and Bonner, W.M. (1988). Sequence of cDNAs for mammalian H2A.Z, an evolutionarily diverged but highly conserved basal histone H2A isoprotein species. *Nucleic Acids Res.* 16, 1113-1124.
- Hayes, J.J. (1996). Site-directed cleavage of DNA by a linker histone--Fe(II) EDTA conjugate: localization of a globular domain binding site within a nucleosome. *Biochemistry.* 35(37):11931-1197
- Hayes, J.J. and Wolffe, A.P. (1993). Preferential and asymmetric interaction of linker histones with 5S DNA in the nucleosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 6415-6419.
- Hayes, J.J., Clark, D.J. and Wolffe, A.P. (1991). Histone contribution to the structure of DNA in a nucleosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 6829-6833.
- Hayes, J.J., Kaplan, R., Ura, K., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1996). A putative DNA binding surface in the globular domain of a linker histone is not essential for specific binding to the nucleosome. *J. Biol. Chem.* 271, 25817-25822.
- Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1994). Histone domains required to assemble a chromatosome including the *Xenopus borealis* somatic 5S rRNA gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 7817-7821.
- Hayes, J.J., Tullius, T.D. and Wolffe, A.P. (1990). The structure of DNA in a nucleosome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 7405-7409.
- Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W. and Crane-Robinson, C. (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken  $\beta$ -globin chromosomal domain. *EMBO J.* 13, 1823-1830.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W., Clayton, A.L. and Crane-Robinson, C. (1992). Histone acetylation and globin gene switching. *Nucleic Acids Res.* 20, 1017-1022.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M., Grunstein, M. (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell.* 80(4):583-92.
- Heinzel, T., Laviusky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J.T., Yang, W.-M., Brard, C., Ngo, S.G., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.M., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1997). N-CoR, mSIN3, and histone deacetylase in a complex required for repression by nuclear receptors and Mad. *Nature* 387, 43-48.
- Herrera, J.E, Chaires, J.B. (1993). A premelting conformational transition in poly(dA)-Poly(dT) coupled to daunomycin binding. *Biochemistry.* 28, 1993-2000.

- Hill, C.S., Martin, S.R. and Thomas, J.O. (1989). A stable  $\alpha$ -helical element in the carboxy-terminal domain of free and chromatin-bound histone H1 from sea urchin sperm. *EMBO J.* 8, 2591-2599.
- Hill, C.S., Rimmer, J.M., Green, B.N., Finch, J.T. and Thomas, J.O. (1991). Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of Ser-Pro-X-Lys/ Arg-motifs. *EMBO J.* 10, 1939-1948.
- Hirano, T. and Mitchison, T.J. (1993). Topoisomerase II does not play a scaffolding role in the organization of mitotic chromosomes assembled in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell Biol.* 120, 601-612.
- Hirano, T. and Mitchison, T.J. (1994). A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation *in vitro*. *Cell* 79, 449-458.
- Hogan, M.E., Rooney, T.F. and Austin, R.H. (1987). Evidence for kinks in DNA folding in the nucleosome. *Nature (London)* 328, 554-557.
- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.
- Horowitz, R.A., Agard, D.A., Sedat, J.W. and Woodcock, C.L. (1994). The three dimensional architecture of chromatin *in situ*: electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon. *J. Cell Biol.* 125, 1-10.
- Hsieh, C.-L. (1994). Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5487-5494.
- Ichimura, S., Mita, K. and Zama, M. (1982). Essential role of arginine residues in the folding of deoxyribonucleic acid into nucleosome cores. *Biochemistry* 21, 5329-5334.
- Isenberg, I. (1979). Histones. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 159-191.
- Izaurralde, E., Kas, E. and Laemmli, U.K. (1989). Highly preferential nucleation of histone H1 assembly on scaffold-associated regions. *J. Mol. Biol.* 210, 573-585.
- Jackson, D.A., Dickinson, P. and Cook, P.R. (1990). The size of chromatin loops in HeLa cells. *EMBO J.* 9, 567-571.
- Jackson, D.A., Yuan, J. and Cook, P.R. (1988). A gentle method for preparing cyto- and nucleoskeletons and associated chromatin. *J. Cell Sci.* 90, 365-378.
- Jackson, J.B., Pollock Jr, J.M. and Rill, R.L. (1979). Chromatin fractionation procedure that yields nucleosomes containing near-stoichiometric amounts of high mobility group non histone chromosomal proteins. *Biochemistry* 18, 3739.

- Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N. and Chalkley, R. (1976). Modification to histones immediately after synthesis. *J. Mol. Biol.* 104, 471-483.
- Jeppesen, P. and Turner, B.M. (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74, 281-291.
- Johnson, W.C. Jr, Itzkowitz, M.S., Tinoco, I. Jr. (1972). Circular dichroism of polynucleotides: dimmers as a function of conformation. *Biopolymers.* 11(1):225-34.
- Jordan, C.F., Lerman, L.S., Venable, J.H. (1972). Structure and circular dichroism of DNA in concentrated polymer solutions. *Nat New Biol.* 236(64):67-70.
- Jost, J.-P. and Hofsteenge, J. (1992). The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially *in vitro* and *in vivo* to methylated non specific DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9499-9503.
- Kadosh, D. and Struhl, K. (1997). Repression by Ume6 involves recruitment of a complex containing Sin3 corepressor and Rpd3 histone deacetylase to target promoters. *Cell* 89, 365-371.
- Kandolf, H. (1994). The H1A histone variant is the *in vivo* repressor of oocyte-type 55 gene transcription in *Xenopus laevis* embryos. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 7257-7260.
- Karantza, V., Freire, E. and Moudrianakis, E.N. (1996). Thermodynamic studies of the core histones: pH and ionic strength effects on the stability of the (H3-H4)/(H3-H4)<sub>2</sub> system. *Biochemistry* 35, 2037-2046.
- Käs, E., Izaurralde, E. and Laemmli, U.K. (1989). Specific inhibition of DNA binding to nuclear scaffolds and histone H1 by distamycin: The role of oligo(dA)·oligo(dT) tracks. *J. Mol. Biol.* 210, 587-599.
- Kass, K.U., Goddard, J.P. and Adams, R.L.P. (1993). Inactive chromatin spreads from a focus of methylation. *Mol. Cell Biol.* 13, 7372-7379.
- Kaufman, P.D. and Botchan, M.R. (1994). Assembly of nucleosomes: do multiple assembly factors mean multiple mechanisms? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 229-235.
- Kerem, B.S., Goitein, R., Diamond, G., Cedar, H., Marcus M. (1984). Mapping of Dnase I sensitive regions on mitotic chromosomes. *Cell* 38, 493-499.
- Kermekchiev, M., Workman, J.L. and Pikaard, C.S. (1999). Nucleosome binding by the polymerase I transactivator upstream binding factor displaces linker histone H1. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5833-5842.
- Khadake, J.R., Rao, M.R. (1997). Condensation of DNA and chromatin by an SPKK-containing octapeptide repeat motif present in the C-terminus of histone H1. *Biochemistry.* 36(5):1041-51.



- Khadake, J.R. and Rao, M.R.S. (1997a). Condensation of DNA and chromatin by an SPKK-containing octapeptide repeat motif present in the C-terminus of histone H1. *Biochemistry* 36, 1041-1051.
- Khadake, J.R. and Rao, M.R.S. (1997b). Preferential condensation of SAR-DNA by histone H1 and its SPKK containing octapeptide repeat motif. *FEBS Letters* 400, 193-196.
- Khadake, J. and Rao, M.R.S. (1995). DNA and chromatin condensing properties of rat testes H1a and H1t compared to those of rat liver H1bdec: H1t is a poor condenser of chromatin. *Biochemistry*. 34, 15792-15801.
- Khochbin, S. and Wolffe, A.P. (1994). Developmentally regulated expression of linker-histone variants in vertebrates. *Eur J. Biochem.* 225, 501-510.
- Kleinschmidt, A.M. and Martison, H.G. (1981). Structure of nucleosome core particles containing uH2A. *Nucleic Acids Res.* 27, 565-574.
- Kleinschmidt, J.A. and Steinbeisser, H. (1991). DNA dependent phosphorylation of histone H2A.X during nucleosome assembly in *Xenopus laevis* oocytes: involvement of protein phosphorylation in nucleosome spacing. *EMBO J.* 10, 3043-3050.
- Kokubo, T., Gong, D.-W., Wootton, J.C., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1993). Molecular cloning, structural relationships and interactions of *Drosophila* TFIID subunits. *Nature* 367, 484-487.
- Koo, H.S., Crothers, D.M. (1988). Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. *Proc Natl Acad Sci USA.*85(6):1763-7.
- Kopka, M.L., Yoon, C., Goodsell, D., Pjura, P., Dickerson, R.E. (1985). The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(5):1376-80
- Kornberg, R. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
- Kornberg, R. and Thomas, J.O. (1974). Chromatin structure: oligomers of histones. *Science* 184, 865-88.
- Koshland, D. and Strunnikov, A. (1996). Mitotic chromosome segregation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 305-333.
- Kress, H., Tonjes, R. and Doenecke, D. (1986). Butyrate induced accumulation of a 2.3 kb polyadenylated histone H1<sup>o</sup> mRNA in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 14, 7189-7197.
- Kumar, N.M. and Walker, I.O. (1980). The binding of histones H1 and H5 to chromatin in chicken erythrocyte nuclei. *Nucleic Acids Res.* 8, 3535-3551.

- Kuo, M.-H., Brownell, J.E., Sobal, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269-272.
- Laemmli, U.K., Kas, E., Poljak, L. and Adachi, Y. (1992). Scaffold-associated regions: cis-acting determinants of chromatin structural loops and functional domains. *Current Opinion in Genetics and Development* 2, 275-285.
- Lafarga, M., García-Segura, L.M., Rodríguez, J.R. and Suau, P. (1995). Expression of histone H1<sup>o</sup> in transcriptionally activated supraoptic neurons. *Mol. Brain Res.* 29, 317-324.
- Laherty, C.D., Yang, W.M., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E. and Eisenman, R.M. (1997). Histone deacetylase associated with the mSin3 corepressor mediate Mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356.
- Lambert, S., Muyldermans, S., Baldwin, J., Kilner, J., Ibel, K. and Wijns, L. (1991). Neutron scattering studies of chromatosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 810-816.
- Langan, T.A. (1982). Characterization of highly phosphorylated subcomponents of rat thymus H1 histone. *J. Biol. Chem.* 257, 14835-14846.
- Langan, T.A., Gautier, J., Lohka, M., Hollingsworth, R., Moreno, S., Nurse, P., Maller, J. and Sclafani, R.A. (1989). Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of *cdc*<sup>2+</sup>/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3860-3868.
- Lavender, J.S., Birley, A.J., Palmer, M.J., Kuroda, M.I. and Turner, B.M. (1994). Histone H4 acetylated at lysine 16 and other components of the *Drosophila* dosage compensation pathway colocalize on the male X chromosome through mitosis. *Chromosome Res.* 2, 398-404.
- Laybourn, P.J. and Kadonaga, J.T. (1992). Threshold phenomena and long distance activation of transcription by RNA polymerase II. *Science* 257, 1682-1685.
- Laybourn, P.J. and Kadonaga, J.T. 1991. Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II. *Science.* 254, 238- 245.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor binding to nucleosomal DNA. *Cell* 72, 73-84.
- Lee, H.L. and Archer, T.K. (1998). Prolonged glucocorticoid exposure dephosphorylates histone H1 and inactivates the MMTV promoter. *EMBO J.* 17, 1454-1466.
- Lee, K.-M. and Hayes, J.J. (1997). The N-terminal tail of histone H2A binds to two distinct sites within the nucleosome core. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 8959-8964.

- Lee, K-M. and Hayes, J.J. (1998). Linker DNA and H1-dependent reorganization of histone-DNA interactions within the nucleosome. *Biochemistry* 37, 8622-8628.
- Leng, M., Felsenfeld, G. (1966). The preferential interactions of polylysine and polyarginine with specific base sequences in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 56(4):1325-1332
- Lennox, R.W. (1984). Differences in evolutionary stability among mammalian H1 subtypes. *J. Biol. Chem.* 259, 669-672.
- Lennox, R.W. and Cohen, L.H. (1983). The H1 complements of dividing and nondividing cells of the mouse. *J. Biol. Chem.* 258, 262-268.
- Lennox, R.W., and Cohen, L.H. (1989). Analysis of histone subtypes and their modified forms by polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in enzymology* 170, 532-549.
- Lennox, R.W., Oshima, R.G., and Cohen, L.H. (1982). The H1 histones and their interphase phosphorylated states in differentiated and undifferentiated cell lines derived from murine teratocarcinomas. *J. Biol. Chem.* 257, 5183.
- Leuba, S.H., Yang, G., Robert, C., Samori, B., van Holde, K., Zlatanova, J. and Bustamante, C. (1994). Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 11621-11625.
- Lever, M.A., Th'ng, J.P.H., Sun, X., Hendzel, M.J. (2000). Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature* 408, 873-876.
- Levinger, L. and Varshavsky, A. (1980). High-resolution fractionation of nucleosomes: minor particles 'whiskers' and separation of nucleosomes containing and lacking A24 semihistone. *Proc. Natl Sci. USA* 77, 3244-3248.
- Lewis, C.D. and Laemmli, U.K. (1982). Higher order metaphase chromosome structure: evidence for metalloprotein interactions. *Cell* 29, 171-181.
- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppensen, P., Klein, G. and Bird, A. (1992). Purification, sequence and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914.
- Liao, L.W., and Cole, R.D. (1981a). Differences among H1 histone subfractions in binding to Linear and Superhelical DNA. Sedimentation velocity studies. *The journal of biological chemistry* 256, 21, 11145-11150.
- Liao, L.W., and Cole, R.D. (1981b). Differences among subfractions of H1 histone in their interactions with Linear and Superhelical DNA. Circular Dichroism. *The journal of biological chemistry* 256, 13, 6751-6755.

- Lin, R., Cook, R.G. and Allis, C.D. (1991). Proteolytic removal of core histone amino termini and dephosphorylation of histone H1 correlate with the formation of condensed chromatin and transcriptional silencing during *Tetrahymena* macronuclear development. *Genes Dev.* 5, 1601-1610.
- Lin, R., Leone, J.W., Cook, R.G. and Allis, C.D. (1989). Antibodies specific to acetylated histones document the existence of deposition- and transcription-related histone acetylation in *Tetrahymena*. *J. Cell. Biol.* 108, 1577-1588.
- Lindner, H., Wurm, M., Dirschlmayer, A., Sarg B. and Helliger, W. 1993. Application of high-performance capillary electrophoresis to the analysis of H1 histones. *Electrophoresis.* 14, 480- 485.
- Lindsey, G.G., Orgeig, S., Thompson, P., Davies, N. and Maeder, D.L. (1991). Extended C-terminal tail of wheat histone H2A interacts with DNA of the linker region. *J. Mol. Biol.* 218, 805-813.
- Liu, K., Lauderdale, J.D. and Stein, A. (1993). Signals in chicken  $\beta$  globin DNA influence chromatin assembly *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 13, 7596-7603.
- Losa, R., Thoma, F. and Koller, T. (1984). Involvement of the globular domain of histone H1 in the higher order structures of chromatin. *J. Mol. Biol.* 175, 529-551.
- Lowary, P.T. and Widom, J. (1989). Higher-order structure of *Saccharomyces cerevisiae* chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 8266-8270.
- Luger, K. and Richmond, T. J. 1998. The histone tails of the nucleosome. *Current Opinion in genetics and development.* 8, 140- 146.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- Mahadevan, L.C., Willis, A.C. and Barrah, M.J. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65, 775-783.
- Manning, g.s. (1979). Theory of H1-mediated control of higher orders of structure in chromatin. *Biopolymers.* 12, 2929-2942.
- Mannironi, C., Bonner, W.M. and Hatch, C.L. (1989). H2A.X a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and poly A 3' processing signals. *Nucleic. Acids Res.* 17, 9113-9126.
- Mardian, J.K.W., Paton, A.E., Bunick, G.J. and Olins, D.E. (1980). Nucleosome cores have two specific binding sites for nonhistone chromosomal proteins HMG14 and HMG17. *Science* 209, 1534-1536.

- Marsh, W.H. and Fitzgerald, P.J. (1973). Pancreas acinar regeneration-XIII. Histone synthesis and modification. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 886-889.
- Martínez, P., Vidal, J.M., Monsalves, C., Pérez, M., Pucket, C., Ponte, I. and Suau, P. 1995. Cloning and analysis of the coding region of the histone H1<sup>o</sup>-encoding gene from rat PC12 cells. *Gene*. 166, 313- 316.
- Mathew C.G., Goodwin G.H., Wright C.A., Johns E.W. (1981) The high mobility group proteins and transcribed nucleosomes. *Cell Biol Int Rep.* 5(1):37-43.
- Mathis, D.J., Oudet, P., Waslyk, B. and Chambon, P. (1978). Effect of histone acetylation on structure and *in vitro* transcription of chromatin. *Nucleic. Acids Res.* 5, 3523-3547.
- Mathis, G. and Althaus, F.R. (1990). Uncoupling of DNA excision repair and nucleosomal unfolding in poly (ADP-ribose) depleted mammalian cells. *Carcinogenesis* 11, 1237-1239.
- Matsumoto, Y., Yasuda, H., Mita, S., Marunouchi, T. and Yamada, M. (1980). Evidence for the involvement of H1 histone phosphorylation in chromosome condensation. *Nature* 284, 181-183.
- McGhee, J.D. and Felsenfeld, G. (1979). Reaction of nucleosome DNA with dimethyl sulfate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76, 2133-2137.
- McGhee, J.D. and Felsenfeld, G. (1982). Reconstitution of nucleosome core particles containing glucosylated DNA. *J. Mol. Biol.* 158, 685-698.
- McKeon, F., Kirschner, M. and Caput, D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature (London)* 319, 463-468.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D. and Bird, A.P. (1992). Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic. Acids Res.* 20, 5085-5092.
- Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L. and Bird, A.P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58, 499-507.
- Meersseman, G., Pennings, S. and Bradbury, E.M. (1991). Chromosome positioning on assembled long chromatin. Linker histones affect nucleosome placement on 5S DNA. *J. Mol. Biol.* 220, 89-100.
- Megee, P.C., Morgan, B.A. and Smith, M.M. (1995). Histone H4 and the maintenance of genome integrity. *Genes Dev.* 9, 1716-1727.
- Mielke, C., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. (1990). Hierarchical binding of DNA fragments derived from scaffold-attached regions: Correlation of properties *in vitro* and function *in vivo*. *Biochemistry* 29, 7475-7485.

- Mirkovitch, J., Mirault, M.E., and Laemmli, U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*. 39(1):223-232
- Mirzabekov, A.D., Pruss, D.V. and Elbraldise, K.K. (1990). Chromatin superstructure-dependent cross-linking with DNA of the histone H5 residues Thr1, His25 and His62. *J. Mol. Biol.* 211, 479-491.
- Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., and Brown, D. (2000). Dinamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408, 877-881.
- Mizzen, C.A., Yang, X.J., Kokubo, T., Brownell, J.E., Bannister, A.J., Owen-Hughes, T., Workman, J., Wang, L., Berger, S.L., Kouzarides, T., Nakatani, Y., Allis, C.D. (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*. 87(7): 1261-70.
- Morán, F., Montero, F., Azorín, F. and Suau, P. (1985). Condensation of DNA by the C-terminal domain of histone H1. A circular dichroism study. *Biophysical Chemistry* 22, 125-129.
- Morán, F., Rodríguez, A.T., Suau, P Shrader, T.E. i Crothers, D.M. (1989). Artificial nucleosome positioning sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 7418-7422.
- Mueller, R.D., Yasuda, H., Bradbury, E.M. (1985). Phosphorylation of histone H1 through the cell cycle of *Physarum polycephalum*. 24 sites of phosphorylation at metaphase. *J. Biol. Chem.* 260, 5081-5086.
- Nan, X., Campoy, J. and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 1-11.
- Nan, X., Meehan, R.R. and Bird, A.P. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic. Acids Res.* 21, 4886-4892.
- Nan, X., Tate, P., Li, E. and Bird, A.P. (1996). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 16, 414-421.
- Nelson, H.C.M., Finch, J.T., Luisi, B.F, Klug, A, (1987) The structure of an oligo (dA).oligo (dT) tract and its biological implication. *Nature* 330, 221-226.
- Nelson, P.P., Albright, S.C., Wiseman, J.M. and Garrard, W.T. (1979). Reassociation of histone H1 with nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 254, 11751-11760.
- Newport, J. and Spann, T. (1987). Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 48, 219-230.
- Newport, J., Wilson, K.L. and Dunphy, W.G. (1990). A lamin-indepent pathway for nuclear envelope assembly. *J. Cell Biol.* 111, 2247-2259.

- Nightingale, K., Dimitrov, S., Reeves, R. and Wolffe, A.P. (1996). Evidence for a shared structural role for HMG1 and linker histones B4 and H1 in organizing chromatin. *EMBO J.* 15, 548-561.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
- Ohaviano, Y. and Gerace, L. (1985). Phosphorylation of the nuclear lamin during interphase and mitosis. *J. Biol. Chem.* 260, 624-632.
- Oliva, R., Bazett-Jones, D.P., Locklear, L. and Dixon, G.H. (1990). Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle. *Nucleic Acids Res.* 18, 2739-2747.
- Orrego, M., Ponte, I., Suau, P. (1999). Purificación y caracterización por dicroísmo circular de subtipos de la histona H1. Trabajo de investigación para optar título de Magíster.
- Panyim, S. and Chalkley, R. (1969). A new histone found only in mammalian tissues with little cell division. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 1042-1049.
- Panzeter, P.L., Realini, C.A. and Althaus, F.R. (1992). Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones. *Biochemistry* 31, 1379-1385.
- Parseghian, M.H., Hamkalo, B.A. (2001). A compendium of the histone H1 family of somatic subtypes: an elusive cast of characters and their characteristics. *Biochem Cell Biol.* 79(3):289-304. Review.
- Parthun, M.R., Widom, J. and Gottschling, D.E. (1996). The major cytoplasmic acetyltransferase in yeast: links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell* 87, 85-94.
- Paulson, J.R. and Laemmli, U.K. (1977). The structure of histone-depleted metaphase chromosomes. *Cell* 12, 817-828.
- Pehrson, J.R. (1989). Thymine dimer formation as a probe of the path of DNA in and between nucleosomes in intact chromatin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 9149-9153.
- Pehrson, J.R. and Cohen, L.H. (1992). Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation. *Nucleic Acids Res.* 20, 1321-1324.
- Pehrson, J.R. and Fried, V.A. (1992). Macro H2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science* 257, 1396-1400.
- Pehrson, J.R., Cole, R.D. (1982). Histone H1 subfractions and H10 turnover at different rates in nondividing cells. *Biochemistry.* 21(3): 456-60.

- Peizhi, L. and Baldwin, R. 1997. Mechanism of helix induction by trifluoroethanol: A framework for extrapolating the helix-forming properties of peptides from trifluoroethanol/water mixtures back to water. *Biochemistry*. 36, 8413- 8421.
- Pennings, S., Meersseman, G. and Bradbury, E.M. (1994). Linker histones H1 and H5 prevent the mobility of positioned nucleosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 10275-10279.
- Pennings, S., Muyldermans, S., and Wyns, L (1986). Limitations of the Poly(glutamic acid) Reconstitution Method in the Reassembly of Mono and Dinucleosomes. *Biochemistry* 25, 5043-5051.
- Perry, C.A., Allis, C.D. and Annunziato, A.T. (1993). Parental nucleosomes segregated to newly replicated chromatin are underacetylated relative to those assembled *de novo*. *Biochemistry* 32, 13615-13623.
- Peterson, C.L. and Tamkun, J.W. (1995). The SWI/SNF complex: a chromatin remodeling machine? *TIBS* 20, 143-146.
- Pherson, J.R. and Cole, R.D. (1982) Histone H1 subfractions and H1<sup>o</sup> turnover at different rates in nondividing cells. *Biochemistry* 21, 456-460.
- Piña, B., Martínez, P. and Suau, P. (1987). Changes in H1 complement in differentiating rat-brain cortical neurons. *Eur. J. Biochem.* 164, 71-76.
- Piña, B., Martínez, P., Simon, L. and Suau, P. (1984). Differential kinetics of histone H1<sup>o</sup> accumulation in neuronal and glial cells from rat cerebral cortex neurons during postnatal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 697-702.
- Pluta, A.F.; Cooke, C.A. and Earnshaw, W.C. (1990). Structure of the human centromere at metaphase. *Trends Biochem. Sci.* 15, 181-185.
- Poccia, D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int. Rev. Cytol.* 105, 1-65.
- Poirier, G.G. and Savard, P. (1980). ADP-ribosylation of pancreatic histone H1 and of other histones. *Can. J. Biochem.* 58, 509-515.
- Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C. and Mandel, P. (1982). Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3423-3427.
- Ponte, I., Vila, R., Suau, P. (2003). Sequence complexity of histone H1 subtypes. *Mol Biol Evol.* 20(3): 371-80.
- Ponte, I., Martínez, P., Ramírez, A., Jorcano, J.L., Monzó, M. and Suau, P. (1994). Transcriptional activation of histone H1<sup>o</sup> during neuronal terminal differentiation. *Dev. Brain Res.* 80, 35-44.



- Ponte, I., Vidal-Taboada, J.M. and Suau, P. (1998). Evolution of the vertebrate H1 histone class: evidence for the functional differentiation of the subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 15, 702-708.
- Prevelige, P.E., Jr. and Fasman, G.D. (1987). Structural studies of acetylated and control inner core histones. *Biochemistry* 26, 2944-2955.
- Pruss, D., Bartholomew, B., Persinger, J., Hayes, J., Arents, G., Moudrianakis, E.N. and Wolffe, A.P. (1996). An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres. *Science* 274, 614-617.
- Pruss, D., Bushman, F.D. and Wolffe, A.P. (1994). HIV integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 5913-5917.
- Pruss, D., Hayes, J.J. and Wolffe, A.P. (1995). Nucleosomal anatomy – where are the histones? *BioEssays* 17, 161-170.
- Puhl, H.L. and Behe, M.J. (1993). Structure of nucleosomal DNA at high salt concentration as probed by hydroxyl radical. *J. Mol. Biol.* 229, 827-832.
- Ramakrishnan, V., Finch, J.T., Graziano, V., Lee, P.L. and Sweet, R.M. (1993). Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362, 219-223.
- Ranjan, M., Wong, J, Shi, Y.B. (1994). Transcriptional repression of Xenopus TR beta gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site. *J.Biol.Chem.*269(40):24699-705
- Rattner, J.B. and Lin, C.C. (1985). Radical loops and helical coils coexist in metaphase chromosomes. *Cell* 42, 291-296.
- Reeves, R. and Nissen, M.S. (1990). The A·T-DNA binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 265, 8573-8582.
- Reik, W. and Surani, M.A. (1989). Cancer genetics. Genomic imprinting and embryonal tumours. *Nature* 338, 112-13.
- Renz, M., Nehls, P. and Hozier, J. (1977). Involvement of histone H1 in the organization of the chromosome fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1879-1883.
- Renz M, Day L.A. (1976). Transition from noncooperative to cooperative and selective binding of histone H1 to DNA. *Biochemistry.* 15(15):3220-8.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. and Klug, A. (1984). Structure of the nucleosome core particle at 7Å resolution. *Nature (London)* 311, 532-537.

- Rodríguez, A.T., Pérez, L., Morán, F., Montero, F. and Suau, P. (1991). Cooperative interaction of the C-terminal domain of histone H1 with DNA. *Biophysical Chemistry* 39, 145-152.
- Roth, S.Y., Schulman, I.G., Richman, R., Cook, R.G., Allis, C.D.(1988). Characterization of phosphorylation sites in histone H1 in the amitotic macronucleus of *Tetrahymena* during different physiological states. *J Cell Biol.* 107. 2473-82.
- Roth, S.Y. and Allis, C.D. (1992). H1 phosphorylation and chromatin condensation: exceptions which define the rule? *Trends Biochem. Sci.* 17, 93-98.
- Ruiz-Carrillo, A., Wangh, L.J. and Allfrey, V.G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science* 190, 117-128.
- Saitoh, N., Goldberg, I. and Earnshaw, W.C. (1995). The SMC proteins and the coming of age of the chromosome scaffold hypothesis. *BioEssays* 17, 759-766.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory press. Second edition. U.S.A.
- Sandeen, G., Wood, W.I. i Felsenfeld, G. (1980). The interaction of high mobility proteins HMG14 and 17 with nucleosomes. *Nucleic. Acids Res.* 8, 3757-3778.
- Sandman, K., Krzycki, J.A., Dobrinski, B., Lurz, R. and Reeve, J.N. (1990). Hmf, a DNA-binding protein isolated from the hyperthermophilic archaeon *Methanofermus fervidus*, is most closely related to histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1624-1628.
- Santisteban, M.S., Arents, G., Moudrianakis, E.N. and Smith, M.M. (1997). Histone octamer function *in vivo*: mutations in the dimer-tetramer interfaces disrupt both gene activation and repression. *EMBO J.* 16, 2493-2506.
- Satchwell, S.C. and Travers, A.A. (1989). Asymmetry and polarity of nucleosomes in chicken erythrocyte chromatin. *EMBO J.* 8, 229-238.
- Schild, C., Claret, F-X., Wahli, W. and Wolffe, A.P. (1993). A nucleosome-dependent static loop potentiates estrogen-regulated transcription from the *Xenopus* vitellogenin B1 promoter *in vitro*. *EMBO J.* 12, 423-433.
- Schwarz, P.M. and Hansen, J.C. (1994). Formation and stability of higher order chromatin structures. *J. Biochem.* 269, 16284-16298.
- Schwarz, P.M., Felthauer, A., Fletcher, T.M. and Hansen, J.C. (1996). Reversible oligonucleosome self-association: dependence on divalent cations and core histone tail domains. *Biochemistry* 35, 4009-4015.
- Sedat, J. and Manuelidis, L. (1978). A direct approach to the structure of mitotic chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 42, 331-350.

- Sera, T. and Wolffe, A.P. (1998). The role of histone H1 as an architectural determinant of chromatin structure and as a specific repressor of transcription on the *Xenopus* oocyte 5S rRNA gene. *Mol. Cell Biol.* 18, 3668-3680.
- Shelby, R.D., Vafa, O. and Sullivan, K.F. (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J. Cell Biol.* 136, 501-513.
- Shen, X. And Gorovsky, M.A. (1996). Linker histone H1 regulates specific gene expression but not global transcription in vivo. *Cell* 86, 475-483.
- Shim, E.Y., Woodcock, C. and Zaret, K.S. (1998). Nucleosome positioning by the winged helix transcription factor HNF3. *Genes Dev.* 12, 5-10.
- Shrader, T.E. and Crothers, D.M. (1989). Artificial nucleosome positioning sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 7418-7422.
- Siegfried, Z. and Cedar, H. (1997). DNA methylation: a molecular lock. *Curr. Biol.* 7, R305-R307.
- Simpson, R. T. (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin core particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17, 5524-5531.
- Singer, D.S. and Singer, M.F. (1976). Studies on the interaction of histone H1 with superhelical DNA: characterization of the recognition and binding regions of H1 histone. *Nucleic. Acids Res.* 3, 2531-2547.
- Sinha, S., Maity, S.N., Lu, J. and de Crombrughe, B. (1995). Recombinant rate CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 1624-1628.
- Sivolob, A.V. and Khrapunov, S.N. (1995). Translational positioning of nucleosomes on DNA: the role of sequence-dependent isotropic DNA bending stiffness. *J. Mol. Biol.* 247, 918-931.
- Smith, R.C., Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M.B. (1988). Expression of a histone H1-like protein is restricted to early *Xenopus* development. *Genes Dev.* 2(10): 1284-95.
- Sponar J, Fric I. (1972). Complexes of histone F1 with DNA in 0.15M NaCl. Circular dichroism and structure of the complexes. *Biopolymers.* 11(11):2317-30.
- Stambolova, M., Simeonova, V., Srebrevna, L., Zlatanova, J.S. and Tsanev, R. (1984). Histone H1<sup>o</sup> in developing rat brain cells. *Differentiation* 28, 1191-1194.

- Stargell, L.A., Bowen, J., Dadd, C.A., Dedon, P.A., Davis, M., Cook, R.G., Allis, C.D. and Gorovsky, M.A. (1993). Temporal and spatial association of histone H2A variant hv1 with transcriptionally competent chromatin during nuclear development in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.* 7, 2641-2651.
- Staynov, D.Z. and Crane-Robinson, C. (1988). Footprinting of linker histones H5 and H1 on the nucleosome. *EMBO J.* 7, 3685-3691.
- Stellwagen, N.C. (2000). Conformational isomers of curved DNA molecules can be observed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis.* 21(12):2327-34.
- Stoler, S., Keith, K.C., Curnick, K.E. and Fitzgerald-Hayes, M. (1995). A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin associated protein in yeast, causes chromatin non disjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* 9, 573-586.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strick, R., and Laemmli, U.K. (1995). Sars are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein. *Cell* 83, 1137-1148.
- Strunnikov, A.V., Hogan, E. and Koshland, D. (1995). SMC2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene essential for chromosome segregation and condensation defines a subgroup within the SMC-family. *Genes Dev.* 9, 587-599.
- Strunnikov, A.V., Larionov, V.L. and Koshland, D. (1993). SMC1: an essential yeast gene encoding a putative head-rod-tail protein is required for nuclear division and defines a new ubiquitous protein family. *J. Cell Biol.* 123, 1635-1648.
- Suau, P., Bradbury, E.M. and Baldwin, J.P. (1979). Higher-order structures of chromatin in solution. *Eur. J. Biochem.* 97, 593-602.
- Sugita, K., Koizumi, K. and Yoshida, M. (1992). Morphological reversion of sis-transformed NIH3T3 cells by trichostatin A. *Cancer Res.* 52, 168-172.
- Sullivan, S., Sink, D.W., Trout, K.L, Makalowska, I., Taylor, P.M., Baxevanis, A.D, Landsman, D. (2002). The Histone Database. *Nucleic Acids Res.* 30(1):341-2.
- Sullivan, K.F., Hechenberger, M. and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromer. *J. Cell Biol.* 127, 581-592.
- Sun, J.-M., Ali, Z., Lurz, R. and Ruiz-Carrillo, A. (1990). Replacement of histone H1 by H5 in vivo does not change the nucleosome repeat length of chromatin but increases its stability. *EMBO J.* 9, 1651-1658.
- Sun, J.-M., Wiaderkiewicz, R. and Ruiz-Carrillo, A. (1989). Histone H5 in the control of DNA synthesis and cell proliferation. *Science* 245, 68-71.

- Sung, M.T., Dixon, G.H. (1970). Modification of histones during spermiogenesis in trout: a molecular mechanism for altering histone binding to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 67(3):1616-23.
- Suzuki, M. (1989). SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone. *EMBO J.* 8, 797-804.
- Suzuki, M., Gerstein, M. and Johnson, T. (1993). An NMR study on the DNA-binding SPKK motif and a model for its interaction with DNA. *Protein Engineering.* 6, 565-574.
- Sweet, M.T., Jones, K., Allis, C.D. (1996). Phosphorylation of linker histone is associated with transcriptional activation in a normally silent nucleus. *J. Cell. Biol.* 135(5):1219-28
- Talasz, H., Sapojnikova, N., Helliger, W., Lindner, H., Puschendorf, B. . (1998). In vitro binding of H1 histone subtypes to nucleosomal organized mouse mammary tumor virus long terminal repeat promotor. *J Biol Chem.* 273(48):32236-43.
- Talasz, H., Helliger, W., Puschendorf, B. and Lindner, H. (1996). In vivo phosphorylation of histone H1 variants during the cell cycle. *Biochemistry* 35, 1761-1767.
- Talasz, H., Helliger, W. Puschendorf, B. and Lindner, H. (1993). G1 and S-phase synthesis of histone H1 subtypes from mouse NIH fibroblasts and rat C6 glioma cells. *Biochemistry.* 32, 1188-1193.
- Tanaka, M., Hennebold, J.D., Macfarlane, J., Adashi, E.Y. (2001). A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo: homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone (cs-H1) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development.* 128(5):655-64.
- Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L. (1995). A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with the core histones. *J. Cell Biol.* 131, 33-44.
- Taunton, J., Hassig, C.A. and Schreiber, S.L. (1996). A mammalian histone deacetylase related to a yeast transcriptional regulator Rpd3. *Science* 272, 408-411.
- Taylor, W. R., Chadee, D. N., Allis, C. D., Wright, J. A. and Davie, J. R. (1995). Fibroblasts transformed by combinations of ras, myc and mutant p53 exhibit increased phosphorylation of histone H1 that is independent of metastatic potential. *FEBS Letters* 377, 51-53.
- Thoma, F., Koller, T. and Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 402-427.
- Thoma, F., Losa, R. and Koller, T. (1983). Involvement of the domains of histones H1 and H5 in the structural organization of soluble chromatin. *J. Mol. Biol.* 167, 619-640.

- Thoma F, Koller T. (1981). Unravelling nucleosomes, nucleosome beads and higher order structures of chromatin: influence of non-histone components and histone H1. *J Mol Biol.* 149(4):709-33.
- Thomas, J.O. (1989). Chemical radiolabeling of lysines that interact strongly with DNA in chromatin. *Methods Enzymol.* 170, 369-385.
- Thomas, J.O. and Wilson, C.M. (1986). Selective radiolabelling and identification of a strong nucleosome binding site on the globular domain of histone H5. *EMBO J.* 5, 3531-3537.
- Thomas, J.O., Rees, C. and Finch, J.T. (1992). Cooperative binding of the globular domains of histones H1 and H5 to DNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 187-194.
- Tomaszewski, R. and Jerzmanowski, A. (1997). The AT-flanks of the oocyte-type 5S RNA gene of *Xenopus laevis* act as a strong signal for histone H1-mediated chromatin organization *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 25, 458-465.
- Thompson, R.J. (1973). Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. *J Neurochem.* 21(1): 19-40
- Travers, A.A. (1994). Chromatin structure and dynamics. *BioEssays* 16, 657-662.
- Travers, A.A. (1999). The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem Sci.* 24, 4-7.
- Tremethick, D.J and Drew, H.R. (1993). High mobility group proteins 14 and 17 can space nucleosomes *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 268, 11389-11393.
- Trifonov, E.N., Sussman, J.L. (1980). The pitch of chromatin DNA is reflected in its nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(7): 3816-20.
- Truss, M., Bartsch, J., Schelbert, A., Haché, R.J.G. and Beato, M. (1995). Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter *in vivo*. *EMBO J.* 14, 1737-1751.
- Turner, B.M. (1991). Histone acetylation and control of gene expression. *J. Cell. Sci.* 99,13-20.
- Turner, B.M., Birley, A.J. and Lavender, J. (1992). Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69, 375-384.
- Ura, K., Hayes, J.J. and Wolffe, A.P. (1995). A positive role for nucleosome mobility in the transcriptional activity of chromatin templates: restriction by linker histones. *EMBO J.* 14, 3752-3765.

- Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G., and Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation: influence on transcription by RNA polymerase, nucleosome mobility and positioning, and linker histone dependent transcriptional repression. *EMBO J.* 16, 2096-2107.
- Ura, K., Wolffe, A.P. and Hayes, J.J. (1994). Core histone acetylation does not block linker histone binding to a nucleosome including a *Xenopus borealis* 5S rRNA gene. *J. Biol. Chem.* 269, 27171-27174.
- Usachenko, S.I., Bavykin, S.G., Gavin, I.M., Bradbury, E.M. (1994). Rearrangement of the histone H2AC-terminal domain in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(15):6845-66849.
- Usachenko, S.I., Gavin, I.M. and Bavykin, S.G. (1996). Alterations in nucleosome core structure in linker histone-depleted chromatin. *J. Biol. Chem.* 271 3831-3836.
- van Daal, A. and Elgin, S.C.R. (1992). A histone variant, H2AvD, is essential in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Cell.* 3, 593-602.
- van Daal, A., White, E.M., Gorovsky, M.A. and Elgin, S.C.R. (1988). *Drosophila* has a single copy of the gene encoding a highly conserved histone H2A variant of the H2A.F/Z type. *Nucleic. Acids Res.* 16, 7487-7497.
- van Holde, K. and Zlatanova, J. (1996). What determines the folding of the chromatin fiber. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 10548-10555.
- van Holde, K.E. (1988). *Chromatin*. Springer-Verlag, New York.
- van Holde, K.E. and Zlatanova, J. (1995). Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J. Biol. Chem.* 270, 8373-8376.
- Varga-Weisz, P., Zlatanova, J., Leuba, S.H., Schroth, G.P. and van Holde, K. (1994). Binding of histones H1 and H5 and their globular domains to four way junction DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 91, 3525-3529.
- Verdaguer, N., Perelló, M., Palau, J. and Subirana, J.A. (1993). Helical structure of basic proteins from spermatozoa. Comparison with model peptides. *Eur. J. Biochem.* 214, 879-887.
- Vermaak, D., Steinbach, O.C., Dimitrov, S., Rupp, R.A.W. and Wolffe, A.P. (1998). The globular domain of histone H1 is sufficient to direct specific gene repression in early *Xenopus* embryos. *Current Biology* 8, 533-536.
- Vernet, G., Sala-Rovira, M., Maeder, M., Jacques, F. and Herzog, M. (1990). Basic nuclear proteins of the histone less eukaryote *Gypthecodinium cohnii* (Pyrrhophyta): two dimensional electrophoresis and DNA binding properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1048, 281-289.

- Vettesse-Dadey, M., Grant, P.A., Hebbes, R.T., Crane-Robinson, C., Allis, C.D., and Workman, J.L. (1996). Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA *in vitro*. *EMBO J.* 15, 2508-2518.
- Vila R, Ponte I, Jimenez MA, Rico M, Suau P. (2000). A helix-turn motif in the C-terminal domain of histone H1. *Protein Science* 9, 627-636.
- Vila, R., Ponte, I., Collado, M., Arrondo, J.L., Suau, P. (2001a). Induction of secondary structure in a COOH-terminal peptide of histone H1 by interaction with the DNA: an infrared spectroscopy study. *J Biol Chem.* 276(33):30898-30903
- Vila, R., Ponte, I., Collado, M., Arrondo, J.L., Jimenez, M.A., Rico, M., Suau, P. (2001b). DNA-induced alpha-helical structure in the NH2-terminal domain of histone H1. *J Biol Chem.* 276, 46429-46435.
- Vila, R., Ponte, I., Jimenez, M.A., Rico, M., Suau, P. (2002). An inducible helix-Gly-Gly-helix motif in the N-terminal domain of histone H1e: a CD and NMR study. *Biochemistry* 34, 2916-2924.
- Wade, P.A., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1997). Histone acetylation: chromatin in action. *Trends Biochem. Sci.* 22, 128-132.
- Wang, X., Moore, S.C., Laszckzak, M. and Ausió, J. (2000). Acetylation increases the alpha-helical content of the histone tails of the nucleosome. *J Biol Chem.* 275, 35013-35020.
- Wang, Y.H., Amirhaeri, S., Kang, S., Wells, R.D. and Griffith, J.D. (1994). Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 265, 1709-1712.
- Warburton, P.E. and Earnshaw, W.C. (1997). Untangling the role of DNA topoisomerase II in mitotic chromosome structure and function. *BioEssays* 19, 97-99.
- Watanabe, F. (1986). Cooperative interaction of histone H1 with DNA. *Nucleic Acids Res.* 14, 3573-85
- Wellman, S.E. (1996). Carboxyl-terminal peptides from histone H1 variants: DNA binding characteristics and solution conformation. *Biopolymers* 39, 491-501.
- Wellman, S.E., Sittman, D.B., Chaires, J.B. (1994). Preferential binding of H1e histone to GC-rich DNA. *Biochemistry.* 33(1):384-8.
- Welsh, S.L. and Cole, R.D. (1979). Differences between subfractions of H1 histone in their interactions with DNA. *J. Biol. Chem.* 254, 662-665.
- Welsh, S.L. and Cole, R.D. (1980). Differences among subfractions of H1 histone in retention of linear and superhelical DNA on filters. *J. Biol. Chem.* 255, 4516-4518.
- West, M.H.P. and Bonner, W.M. (1980). Histone H2B can be modified by the attachment of ubiquitin. *Nucleic Acids Res.* 8, 4671-4680.



- Williams, S.P. and Langmore, J.P. (1991). Small angle x-ray scattering of chromatin. *Biophys. J.* 69, 606-618.
- Wolffe, A.P., Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell.* 84(6):817-9. Review
- Wolffe, A.P. (1998). Packaging principle: how DNA methylation and histone acetylation control the transcriptional activity of chromatin. *J Exp Zool.* 282(1-2):239-244. Review.
- Wolffe, A.P., Wong, J. and Pruss, D. (1997a). Activators and repressors: making use of chromatin to regulate transcription. *Genes to Cells* 2, 291-302.
- Wolffe, A.P. (1997). Histone H1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1463- 1466.
- Wolffe, A.P. (1992). Chromatin: Structure and Function. Academic Press.. Cambridge. 213 p.(4-60)
- Wong, J., Shi, Y.-B. and Wolffe, A.P. (1995). A role for nucleosome assembly in both silencing and activation of the *Xenopus* TR $\beta$ A gene by the thyroid hormone receptor. *Genes Dev.* 9, 2696-2711.
- Wong, J., Shi, Y.-B. and Wolffe, A.P. (1997). Determinants of chromatin disruption and transcriptional regulation instigated by the thyroid hormone receptor: hormone regulated chromatin disruption is not sufficient for transcriptional activation. *EMBO J.* 16, 3158-3171.
- Woodcock, C.L. (1994). Chromatin fibers observed *in situ* in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. *J. Cell Biol.* 125, 11-19.
- Woodcock, C.L., Frado, L.L. and Rattner, J.B. (1984). The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J. Cell Biol.* 99, 42-52.
- Woodcock, C.L., Grigoryer, S.A., Horowitz, R.A. and Whitaker, N. (1993). A folding model for chromatin that incorporates linker DNA variability produces fibers that mimic the native structures. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 9021-9025.
- Yamamura, J., Nomura, K. (2001). Analysis of sequence-dependent curvature in matrix attachment regions. *FEBS Lett.* 489(2-3): 166-70.
- Yang, G., Leuba, S.H., Bustamente, C., Zlatanova, J. and van Holde, K. (1994). Role of linker histones in extended fibre structure. *Nature Struct. Biol.* 1, 761-763.
- Yang, X.-J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J.-I., Howard, B. and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral E1A oncoprotein. *Nature* 382, 319-324.

- Yaneva, J., Schroth, G.P., van Holde, K.E., Zlatanova, J. (1995). High-affinity binding sites for histone H1 in plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(15):7060-4.
- Yasuda, H., Matsumoto, Y., Mita, S., Marunouchi, T. and Yamada, M. (1981). A mouse temperature-sensitive mutant defective in H1 histone phosphorylation is defective in deoxyribonucleic acid synthesis and chromosome condensation. *Biochemistry* 20, 4414-4419.
- Yoshida, M., Nomura, S. and Beppu, T. (1987). Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* 47, 3688-3691.
- Zarbock, J., Clore, G.M. and Gronenborn, A.M. (1986). Nuclear magnetic resonance study of the globular domain of chicken histone H5: resonance assignment and secondary structure. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83, 7628-7632.
- Zardo, G. and Caiafa, P. (1998). The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblasts depends on the poly(ADP-ribosyl)ation process. *J. Biol. Chem.* 273, 16517-16520.
- Zentgraf, H. and Franke, W.W. (1984). Differences of supra nucleosomal organization in different kinds of chromatin: cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes. *J. Cell Biol.* 99, 272-286.
- Zhao, K., Käs, E., Gonzalez, E., Laemmli, U.K. (1993). SAR dependent mobilization of histone H1 by HMG-I/Y in vitro: HMG-I/Y is enriched in H1 depleted chromatin. *Embo J.* 12, 3237-3247.
- Zhou, Y.B., Gerchman, S.E., Ramakrishnan, V., Travers, A. and Muyldermans, S. (1998). Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome. *Nature* 395, 402-405.
- Zimmer, C.(1975).Effects of the antibiotics netropsin and distamycin A on the structure and function of nucleic acids. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 15, 285-318
- Zimmer, C.,and Wahnert, U. (1986). Nonintercalating DNA-binding ligands: specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material. *Prog Biophys Mol Biol.* 47, 31-112
- Zlatanova, J. and van Holde, K. (1996). The linker histones and chromatin structure: new twists. *Prog. Nucleic. Acids Res. Mol. Biol.* 52, 217-259.
- Zlatanova, J., and Van Holde, K. (1992). Histone H1 and transcription: still an enigma?. *J. of Cell Science* 103, 889- 895.
- Zweidler, A. (1992). Role of individual histone tyrosines in the formation of the nucleosome complex. *Biochemistry* 31, 9205-9211.