



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Biociències
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Efectes de la fosforilació sobre l'estructura i la interacció amb el DNA de la histona H1 i el seu domini C-terminal.

Memòria presentada per Núria Teruel Romia per obtenir el grau de Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular.

Treball realitzat en la Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona sota la direcció de el Dr. Pere Suau León i la Dra. Imma Ponte Marull.

Núria Teruel Romia

Dra. Imma Ponte Marull

Dr. Pere Suau León

Bellaterra, juliol de 2011

Índex

Abreviatures.....	1
Resum.....	5
1. Introducció.....	9
1.1. La cromatina	11
1.1.1. El nucleosoma	11
1.1.2. Models d'organització de la cromatina	12
1.2. El codi de les histones	17
1.3. Les histones internes	19
1.3.1. Posicionament de les histones internes en el nucleosoma.....	20
1.3.2. Modificacions post-traduccionals de les histones internes.....	22
1.3.2.1. Fosforilació	24
1.3.2.2. Acetilació	25
1.3.2.3. Metilació	26
1.3.2.4. Deiminació.....	27
1.3.2.5. ADP-Ribosilació	28
1.3.2.6. Ubiquïtinació.....	28
1.3.2.7. Sumoilació.....	29
1.4. La histona H1	29
1.4.1. Subtipus de la histona H1.....	30
1.4.2. Estructura de la histona H1	32
1.4.2.1. El domini globular.....	33
1.4.2.2. Domini amino-terminal	35
1.4.2.3. Domini carboxi-terminal.....	36
1.4.3. Posicionament de la histona H1 en el nucleosoma.....	39
1.4.4. Interacció de la histona H1 amb la cromatina i el DNA	40
1.4.4.1. Preferència per les regions SAR.....	45
1.4.4.2. Motius SPKK	46
1.4.5. Modificacions post-traduccionals de la histona H1	48
1.4.5.1. Fosforilació	48
1.4.5.2. Acetilació	50
1.4.5.3. Metilació	51
1.4.5.4. Deimidació.....	51
1.4.5.5. Ubiquïtinació.....	51
1.4.5.6. ADP-ribosilació.....	51
1.4.5.7. Formilació.....	52
1.5. La histona H1 en el nucli cel·lular	52
1.6. Altres efectes de la fosforilació de la histona H1	54
1.7. Les histones en la senyalització cel·lular i el sistema immunitari innat	55
1.7.1. La histona H1 com agent terapèutic.....	57
2. Objectius	59

3. Materials i mètodes	63
3.1. Obtenció dels fragments de DNA i de les proteïnes.....	65
3.1.1. Soques bacterianes.....	65
3.1.2. Plasmidis	65
3.1.3. Obtenció dels fragments de DNA.....	65
3.1.4. Obtenció de les histones H1 ⁰ i H1e recombinants i dels seus respectius dominis C-terminal CH1 ⁰ i CH1e	66
3.1.5. Obtenció dels mutants de la histona H1e de rata per als llocs de fosforilació de l'enzim CDK2.....	67
3.1.6. Fosforilació <i>in vitro</i>	68
3.1.6.1. Espectrometria de masses.....	68
3.2. Assaigs d'unió DNA-Histona.....	69
3.2.1. Assaig d'unió del domini C-terminal de la histona H1 ⁰ a DNA.....	69
3.2.2. Assaig de preferència per la seqüència SAR del domini C-terminal de la histona H1 ⁰	70
3.2.3. Assaig de competició del domini C-terminal de la histona H1 ⁰ no fosforilat i fosforilat per una quantitat limitada de DNA.....	70
3.2.4. Estimació de les afinitats relatives pel DNA de la histona H1e i dels seus mutants amb diferents graus de fosforilació.....	70
3.2.5. Capacitat d'agregació de DNA de la histona H1e i del seu domini C-terminal	71
3.4. Dicroisme circular de complexos DNA-proteïna.....	72
3.4.1. Fonaments teòrics	72
3.4.2. Aplicacions biològiques del dicroisme circular	72
3.4.3. Adquisició d'espectres.....	74
3.5. Espectroscòpia d'infraroig FTIR.....	74
3.5.1. Fonaments teòrics	74
3.5.2. Funcionament d'un espectròmetre d'infraroig.....	75
3.5.3. Estudi de l'estructura de proteïnes mitjançant FTIR	76
3.5.4. Preparació de les mostres.....	77
3.5.5. Adquisició d'espectres i tractament de les dades	78
4. Resultats	79
4.1. Efectes de la fosforilació del domini C-terminal de la histona H1 ⁰ sobre la interacció amb el DNA.	81
4.1.1. Unió cooperativa del domini C-terminal de la histona H1 ⁰ fosforilat	83
4.1.2. Diferències d'afinitat pel DNA del domini C-terminal no fosforilat i fosforilat de la histona H1 ⁰	87
4.1.3. Dicroisme circular: inducció de l'espectre ψ del domini C-terminal de la histona H1 ⁰ unit a DNA.....	90
4.1.4. Preferència d'unió del domini C-terminal de la histona H1 ⁰ per les seqüències de DNA tipus SAR.....	93

4.2. Estudi de l'efecte de la fosforilació en l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e per espectroscòpia FTIR.	97
4.2.1. Estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e de rata no fosforilat unit a DNA.....	100
4.2.2. Estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e de rata fosforilat unit a DNA a una relació proteïna/DNA ($r,w/w$) de $r=0'5$	101
4.2.3. Estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e fosforilat de rata unit a DNA a una relació proteïna/DNA ($r,w/w$) de $r=0'7$	102
4.3. Estudi de l'efecte de la fosforilació en l'estructura secundària de la histona H1e per espectroscòpia FTIR.....	105
4.3.1. Estimació de l'estructura secundària de la histona H1e de rata	108
4.3.2. Estructura secundària de la histona H1e no fosforilada en dissolució.....	111
4.3.3. Estructura secundària de la histona H1e fosforilada en dissolució.....	112
4.3.4. Estructura secundària de la histona H1e no fosforilada unida a DNA	113
4.3.5. Estructura secundària de la histona H1e fosforilada unida a DNA	115
4.4. Caracterització de la interacció amb el DNA de la histona H1e i les seves espècies fosforilades.....	119
4.4.1. Capacitat d'agregació del DNA de les espècies fosforilades de la histona H1e i del seu domini C-terminal	121
4.4.2. Determinació de l'afinitat relativa pel DNA de la histona H1e i les seves espècies fosforilades	124
4.4.2.1. Estimació de les afinitats relatives de la histona H1e i les seves espècies fosforilades a partir d'experiments per parelles.	128
5. Discussió general.....	133
6. Conclusions	143
7. Bibliografia.....	147
8. Annex.....	173

Abreviatures

AFM: microscòpia de força atòmica
ADP: Adenosina difosfat
ATP: Adenosina trifosfat
AU-PAGE: Electroforesi de poliacrilamida amb urea i àcid acètic
CAP: Proteïna activadora per catabòlit
CD: Dicroisme circular
CDK: Quinasa dependent de ciclina
ChIP on CHIP: Immunoprecipitació de cromatina més hibridació en xip de DNA
CH1e: Domini C-terminal de la histona H1e
CH1⁰: Domini C-terminal de la histona H1⁰
DMSO: Dimetilsulfòxid
DNA: Àcid desoxiribonucleic
EDTA: Àcid etilendiaminotetraacètic
FRAP: Recuperació de la fluorescència després del fotoblanqueig
FRET: Transferència d'energia de fluorocroms
FTIR: espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier
GH1: domini globular de la histona H1
GH5: domini globular de la histona H5
HAT: Histona acetiltransferasa
HEPES: Àcid N-2-Hidroxiètilpiperacina-N'-2'-Etanesulfònic
HDAC: Histona desacetilasa
HMG: Grup de proteïnes d'alta mobilitat
HMT: Histona metiltransferasa
HNF-3 γ : Factor nuclear d'hepatòcit 3 γ
HP1: Proteïna d'unió a heterocromatina 1
IDP: Proteïnes intrínsecament desordenades
IPTG: Isopropil β -D tiogalactòsid
KDM: Histona demetilasa específica de lisina
KMT: Histona metiltransferasa específica de lisina
MALDI-TOF: ionització per desorció làser assistida per matriu
MeCP2: Proteïna d'unió a CpG metilat
MENT: Proteïna de terminació específica d'etapa mieloide i eritroide nuclear
MUMPs: Proteïnes murines microbicides
NK: Cèl·lules citotòxiques o *natural killers*
NLR: Repetició de la llargada nucleosomal
NuRCs: complexos de remodelatge de la cromatina
PARP-1: Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1
PCR: Reacció en cadena de la polimerasa
RMN: Ressonància magnètica nuclear
SAR: Regions associades a la matriu nuclear o *scaffold*

Abreviatures

SDS: Sodi dodecil sulfat

SDS-PAGE: Electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

TFE: 2,2,2-trifluoroetanol

Resum

Els diferents subtipus de la histona H1 tenen un paper molt important en la condensació de la cromatina i en la regulació gènica. En mamífers s'han identificat sis subtipus somàtics, H1a-e, dos subtipus específics de línies germinals, H1t i H1oo i dos subtipus associats a diferenciació H1⁰ i H1x. Els subtipus d'H1 difereixen en el grau de fosforilació, en el *turnover* i en el grau de conservació evolutiva. També s'ha vist que alguns subtipus presenten diferent habilitat per a condensar el DNA *in vitro*. Aquestes propietats suggereixen l'existència de diferències funcionals entre els diferents subtipus.

La histona H1 està formada per tres dominis, un domini globular d'uns 80 aminoàcids flanquejat per un domini amino-terminal d'uns 20-35 aminoàcids i un domini carboxi-terminal d'uns 100 aminoàcids. Tots dos dominis terminals es troben poc estructurats en dissolució aquosa.

Les histones H1 s'han caracteritzat com a proteïnes d'unió a seqüències de tipus SAR, seqüències riques en adenina i timina (>70 %). La unió d'H1 és altament cooperativa i dependent de NaCl. El domini C-terminal va ser identificat com el màxim responsable de la unió de la histona H1 a les seqüències SAR. En aquest treball varem caracteritzar l'efecte de la fosforilació sobre la interacció amb el DNA del domini C-terminal de la histona H1⁰. Es comprovà com el domini C-terminal de la histona H1⁰ total i parcialment fosforilat manté la preferència d'unió per les seqüències tipus SAR.

El domini trifosforilat continua mantenint la cooperativitat d'unió al DNA, tot i que requereix relacions proteïna/DNA més elevades que el C-terminal no fosforilat. També s'ha pogut constatar la importància de la presència de força iònica en el medi per afavorir la unió cooperativa al DNA, més evident en el cas del C-terminal fosforilat. La disminució de la cooperativitat en el C-terminal trifosforilat també es mostra en fragments petits de DNA (50 pb). El domini C-terminal fosforilat manté una forma d'interacció amb el DNA diferent. Segons s'ha interpretat en la literatura, l'espectre ψ apareix per l'agregació ordenada de les molècules de DNA i la seva inducció depèn de les condicions del medi (força iònica, polaritat, etc.), de les característiques del DNA i de la presència de molècules inductores. Es va analitzar el domini C-terminal de la histona H1⁰ i les seves espècies fosforilades amb diferents fragments de DNA. Tots els DNAs van induir l'espectre ψ , excepte el fragment de 50 pb. Amb aquest fragment, les espècies fosforilades no són capaces de formar l'espectre ψ ja que interaccionen de diferent manera amb els fragments petits de DNA, fet que s'observa tant en els espectres de difracció circular com en les corbes de precipitació. Pel que fa als DNAs de major mida, s'observa que a una mateixa relació proteïna/DNA, les espècies fosforilades són capaces d'induir un espectre ψ més intens que el domini no fosforilat, mostrant una major capacitat d'agregació ordenada del DNA.

Els experiments de competició entre el domini C-terminal no fosforilat i el C-terminal trifosforilat, ens varen permetre quantificar la menor afinitat d'aquest últim pel DNA. L'afinitat relativa pel DNA disminueix aproximadament en un factor de 3.

En la segona part d'aquest treball es va estudiar l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e (CH1e) i de l'H1e sencera per espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier (FTIR).

El CH1e de rata conté 4 motius S/T-P-X-Z fosforilables per la quinasa CDK2. La fosforilació d'aquests motius quan el domini està unit a DNA provoca una disminució d'hèlix α i un augment de fulla β . S'observà que l'increment d'estructuració en forma de fulla β del CH1e trifosforilat i tetrafosforilat és dependent de la relació proteïna/DNA dels complexos.

Pel que fa a l'H1e sencera, la unió a DNA té efectes desiguals depenent de si la proteïna està o no fosforilada. En l'H1e no fosforilada, la formació de complexos amb el DNA indueix l'augment de l'hèlix α , en canvi en la proteïna fosforilada indueix l'augment de la fulla β . En la proteïna fosforilada en dissolució, la unió del DNA no té efecte sobre l'hèlix α però sí sobre la fulla β .

La fosforilació de la histona H1e provoca un canvi estructural en la proteïna: la disminució d'hèlix α i l'augment de fulla β . L'efecte més important és en els complexos on la fosforilació provoca que l'hèlix α disminueixi a la meitat i la fulla β augmenti el doble respecte a les proteïnes no fosforilades unides a DNA. L'espècie monofosforilada en la posició 186 (186P) de l'H1e sencera és la que adquireix major estructuració en fulla β , tant en dissolució com en els complexos. La fosforilació d'aquesta posició no produeix aquest augment de fulla β en el domini C-terminal aïllat. La segona espècie amb més fulla β és la trifosforilada. Dels resultats obtinguts deduïm que el grau d'estructuració secundària depèn de la posició i del nombre de fosfats.

La fosforilació té efectes diferencials sobre la capacitat d'agregació del DNA de la histona H1e, del seu domini C-terminal i de les seves espècies fosforilades. En el cas del CH1e, les espècies que més capacitat d'agregació mostren són la trifosforilada (3P) i la tetrafosforilada (4P). En la proteïna sencera, també les espècies més fosforilades (3P, 4P i 5P) i la monofosforilada 186P mostren major capacitat d'agregació que la resta d'espècies monofosforilades i la difosforilada. L'espècie 186P del CH1e no mostra cap comportament diferent de les altres espècies monofosforilades.

Els experiments de competició entre els subtipus i les diferents espècies fosforilades ens va permetre estimar amb precisió les afinitats relatives pel DNA. S'observa una correlació directa entre el grau de fosforilació i l'afinitat pel DNA. A major grau de fosforilació, menor afinitat pel DNA. La diferència d'afinitat relativa entre l'espècie fosforilada amb menor afinitat, l'H1e 5P, i la de major, l'H1e 0P, és d'aproximadament 39.

Les espècies amb més grau de fosforilació mostren una menor afinitat pel DNA però també una major capacitat d'agregació d'aquest. A la vegada, aquestes mateixes espècies són les que contenen més estructuració en forma de fulla β , fet que afavoriria la formació d'agregats DNA-proteïna, en els quals les interaccions proteïna-proteïna hi tindrien un paper important.

1. Introducció

1.1. LA CROMATINA

1.1.1. El nucleosoma

En els organismes eucariotes el DNA es troba en el nucli de la cèl·lula en forma de cromatina. La cromatina és una fibra formada per complexos de DNA i proteïnes histones i no histones. Així s'aconsegueix la condensació i l'organització necessària per permetre processos com la replicació, la transcripció i la regulació gènica¹⁷.

La unitat bàsica de la fibra de cromatina és el nucleosoma¹ (Fig. 1). El nucleosoma està format pel DNA, les histones internes (H2A, H2B, H3 i H4) i la histona H1. Dins el nucleosoma trobem la partícula nucli: dues còpies de cada histona interna formant un octàmer al voltant del qual s'hi enrotlla, levògiramet, 146 pb de DNA. La histona H1 s'uneix a la partícula nucli i al DNA internucleosomal o "DNA linker", protegint així, 20 pb de DNA addicionals de la digestió amb nucleasa micrococcal.

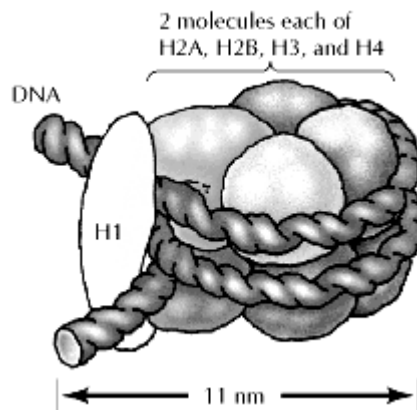


Figura 1. El nucleosoma.

Els nucleosomes units pel DNA internucleosomal formen la fibra de 10 nm. En unir-s'hi la histona H1 es produeix la compactació de la fibra de 10 nm en una fibra de 30 nm, la qual és majoritària durant la interfase. Tot i que, existeixen diversos models per explicar aquesta estructura, sembla clar que la fibra de 30 nm s'organitza en grans dominis anomenats llaços que estan ancorats a un esquelet proteic. Aquests llaços, de longitud variable (entre 30 i 100 kb), podrien constituir grans dominis transcripcionals dinàmics regulats topològicament².

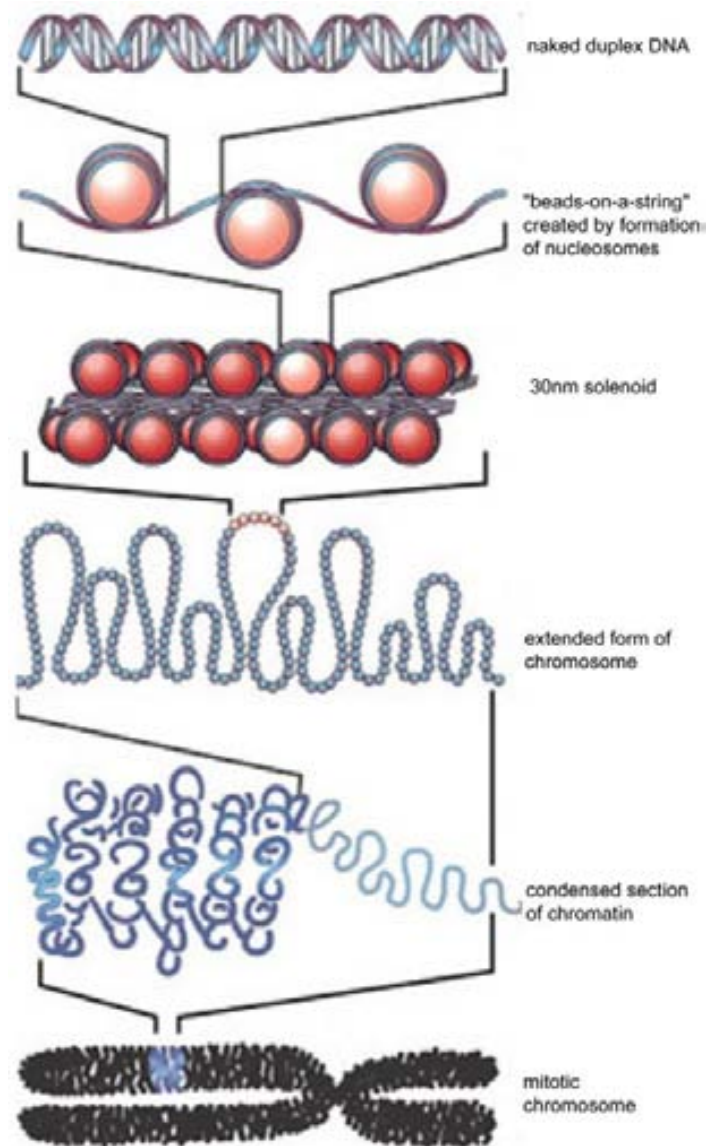


Figura 2. Empaquetament de la cromatina ³⁵³.

La cromatina és una estructura molt dinàmica, en la qual les proteïnes nuclears estan contínuament associant-s'hi i dissociant-s'hi. Així, la transcripció d'un gen depèn d'una seqüència d'esdeveniments dinàmics, cada un amb una probabilitat determinada ³. També s'ha observat que l'accessibilitat d'aquestes proteïnes decreix progressivament al llarg del DNA des de la perifèria al centre del nucleosoma ⁴.

1.1.2. Models d'organització de la cromatina

Existeixen diversos models per explicar l'estructuració de la fibra de 30 nm de cromatina ja que és un tema sobre el qual sempre han existit importants discrepàncies ⁵⁻⁸. Tots els models però

mantenen tres paràmetres: la fibra de cromatina compactada és d'aproximadament 30 nm de diàmetre, requereix la histona H1 i presenta estructura helicoidal.

Malgrat les seves diferències, tots els diferents models proposats poden ser classificats en dues classes (Fig. 3):

- *Single-start helix*: sovint són solenoides. Els nucleosomes estan estretament empaquetats formant una hèlix i l'estructura està estabilitzada per les interaccions internucleosomals. Cada nucleosoma, n , contacta amb els nucleosomes $n+1$ i $n-1$. Per permetre el necessari estret contacte entre nucleosomes, el DNA internucleosomal s'ha de corbar cap a l'interior de la fibra. En aquest grup hi trobem per exemple, el model de Thoma i col.⁵, el model de Felsenfeld i McGhee⁹ i el model de Daban i Bermúdez⁸.
- *Two-start helix*: el DNA internucleosomal connecta dues hèlix de nucleosomes de manera que cada nucleosoma n contacta amb els nucleosomes $n+2$ i $n-2$. La dimensió de la hèlix dependrà de la llargada del DNA internucleosomal i, per tant, no necessàriament serà un solenoide. Es classifica en aquest grup, entre altres, el model de Woodcock i col.^{6,7}.

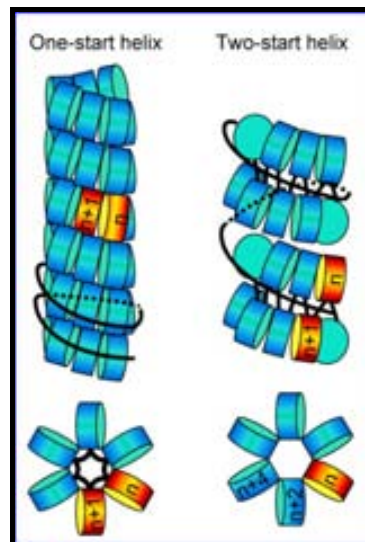


Figura 3. Models d'organització de la fibra de cromatina de 30 nm¹⁰.

S'han observat una sèrie de característiques de la fibra de cromatina que actualment són generalment acceptades: els nucleosomes estan situats en la fibra perifèricament formant una cadena en zig-zag a baixa força iònica; la histona H1 està situada a l'interior de la fibra i és essencial per a la compactació i per últim, les interaccions nucleosoma-nucleosoma possibiliten la compactació o contribueixen a la estabilitat de la fibra compactada.

Entre els diferents models destaquen el model del solenoide de Thoma i col.⁵, el model helicoïdal dels nucleosomes en zig-zag de Woodcock i col.^{6,7} i el model del solenoide postulat per Dabán i col.⁸

El model proposat per Thoma i col. per a l'estructura de la fibra de 30 nm consisteix en una cadena de nucleosomes que es compactaria enrotllant-se en una estructura solenoïdal simple. El resultat seria una hèlix de nucleosomes amb sis nucleosomes per volta i un pas de rosca d'uns 11 nm (Fig. 4).



Figura 4. Model del solenoide de la fibra de cromatina⁵.

Una part implícita i important d'aquest model és que el plegament de la cadena de nucleosomes pot ser provocat per la interacció entre histones H1 que es trobarien en l'eix de la fibra. Les histones H1 presenten cooperativitat en la unió al DNA nu i podria ser que aquesta propietat també s'expressés en la cromatina¹¹⁻¹³. També podria ser, però, que el plegament de la cadena de nucleosomes fos exclusivament a través d'interaccions entre les histones H1 i el DNA internucleosomal en un procés local no cooperatiu. Aquest és un tema subjecte a fortes controvèrsies. Estudis de dispersió de neutrons indiquen clarament que la histona H1 es trobaria localitzada cap a l'interior de la fibra de cromatina¹⁴. A més, experiments que mesuren l'accessibilitat de les histones H1 a anticossos i proteases, demostren una accessibilitat reduïda quan una cadena de nucleosomes es compacta^{15,16}.

Woodcock i col. proposaren un model alternatiu, basat en l'observació de l'existència de cadenes de nucleosomes en zig-zag en dissolucions a baixa força iònica (Fig. 5). El plegament estaria dirigit per la histona H1 i la cadena en zig-zag formaria una cinta condensada que contindria dues files paral·leles de nucleosomes. L'enrotllament d'aquesta cinta generaria la fibra de 30 nm⁶.

Varis resultats experimentals apunten cap a l'existència d'una cadena asimètrica en zig-zag de nucleosomes i DNA internucleosomal en un primer pas del plegament de la cromatina¹⁷⁻²⁰. Per exemple, mitjançant la tècnica de la criomicroscòpia electrònica en seccions de nuclis, s'observen fibres de cromatina formades pel que semblen estructures en zig-zag²¹.



Figura 5. Model helicoidal de la cadena de nucleosomes en zig-zag ²².

Un model de Felsenfeld i McGhee representa una modificació del model del solenoide en el que les histones H1 no es trobarien formant l'eix de la fibra de 30 nm, sinó que es trobarien disposades de forma helicoidal seguint la pròpia cadena de nucleosomes (Fig. 6). Aquest model s'anomena model del DNA internucleosomal enrotllat (*coiled linker model*) ⁹.

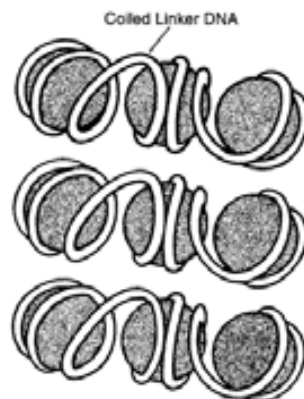


Figura 6. Model del DNA internucleosomal enrotllat de la fibra de cromatina. Només es mostren tres voltes d'un sol costat de la fibra ²².

Un model molt més recent és l'anomenat model del solenoide interdigitat de Daban i Bermúdez (Fig. 7). Aquest model s'ha creat a partir de dades experimentals de fibres de cromatina altament compactades i podria representar un nivell superior de condensació assolit a partir d'un dels models descrits anteriorment. El model del solenoide interdigitat està format per una hèlix primària amb un nombre no sencer igual o inferior a 6 nucleosomes per volta que s'anirien apilant sobre els de la volta anterior, formant hèlixs secundàries visibles externament ⁸.

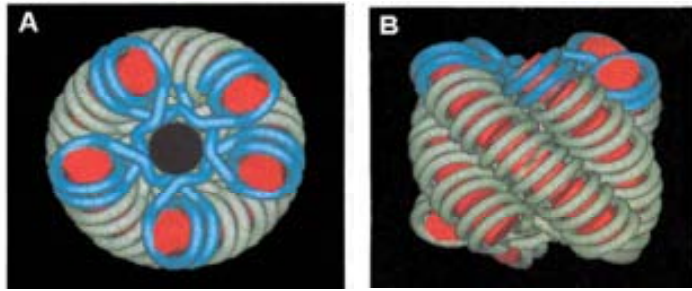


Figura 7. Model del solenoide interdigitat per a la fibra de cromatina. (A) vista axial. (B) vista lateral⁸.

Per a alguns d'aquests models la llargada de la repetició nucleosomal (NLR), i per tant del DNA internucleosomal, és molt important. Això és degut a que si el DNA internucleosomal és massa curt limita la disposició d'un nucleosoma respecte el següent i si és massa llarg pot produir problemes estèrics. La llargada de la repetició nucleosomal dels diferents organismes i dels diferents teixits varia considerablement. En *Saccharomyces cerevisiae* la llargada de la repetició nucleosomal és de 165 pb de promig, mentre que en la majoria de línies cel·lulars de mamífers és de 180-200 pb i de 260 pb en l'esperma d'eriçó de mar²³.

La cromatina nativa no té un espaiat regular entre nucleosomes i per tant, la longitud del DNA internucleosomal és heterogènia, inclòs en una mateixa fibra. Aquesta heterogeneïtat pot afectar a l'orientació dels nucleosomes i per tant, a les seves interaccions.

Alguns estudis afirmen que tant l'estequiometria H1/nucleosoma com la NRL determinen la compactació de la fibra de cromatina. La formació d'una fibra de cromatina de 30 nm amb característiques de compactació similars a la cromatina nativa requereix un DNA internucleosomal suficientment llarg com per permetre la unió de la histona H1 en l'estequiometria adequada²⁴. Sembla ser que hi ha una clara relació lineal entre l'estequiometria de l'H1 i la NRL per tal de mantenir un balanç de la càrrega electrostàtica intranuclear. Si la quantitat d'H1 per nucleosoma es redueix, la càrrega electrostàtica tendeix a equilibrar-se disminuint l'espaiat nucleosomal. S'ha calculat que la pèrdua d'una H1 és equivalent a la reducció d'uns 37 pb del DNA internucleosomal, ja que una molècula d'H1 conté aproximadament 60 càrregues positives i 37 pb del DNA internucleosomal conté unes 74 càrregues negatives²⁵.

Desafortunadament, gairebé tots els models proposats són basats en observacions *in vitro* i assumeixen que la fibra de cromatina té un espaiat regular entre nucleosomes o que les interaccions entre nucleosomes poden amortir les irregularitats del DNA internucleosomal²⁶.

En els darrers anys, el desenvolupament de noves tècniques i la millora d'altres de més antigues han permès una millor aproximació al problema de l'estructura de la fibra de cromatina. Algunes d'aquestes millores són la construcció de clons de DNA que contenen múltiples repeticions de seqüències posicionants de nucleosomes, tècniques com la criomicroscòpia, la microscòpia de força atòmica (AFM) o la difracció de raigs X d'oligonucleosomes a alta resolució. En aquesta línia s'han publicat recentment dos estudis. El primer, de Schalch i col.²⁷ descriu l'anàlisi cristal·logràfic per difracció de raigs X (amb una resolució de 0,9 nm) de un tetranucleosoma reconstituït. Varen observar una estructura del

tipus *two-start helix* similar a la proposada per Woodcock i col.⁶ El segon estudi de Robinson i col.²⁸ combina tècniques de reconstitució de cromatina i microscòpia electrònica i conclou que l'estructura de la fibra de cromatina és solenoïdal. Ens trobem davant de dues conclusions oposades obtingudes a partir de dos sistemes experimentals diferents, per tant, l'estructura de la fibra de cromatina continua sense resoldre's.

Cal considerar diversos factors pel que fa als estudis *in vivo*. Un dels principals problemes és l'ambient dinàmic que es dona en el nucli de les cèl·lules eucariotes, el qual té un gran efecte sobre la conformació de la cromatina. Una altra consideració a tenir en compte són les condicions en el nucli d'aglomeració macromolecular (*crowding*)²⁹ i una elevada concentració de DNA nuclear.

Recentment, s'ha proposat una hipòtesi en la qual el mecanisme per a la formació de la fibra de cromatina compactada és totalment diferent. Aquesta hipòtesi proposa una transició conformacional (*gaping*) del nucleosoma que permetria interaccions d'apilament entre nucleosomes més fortes i una densitat d'empaquetament en la fibra de 30 nm més elevada³⁰.

³¹.

1.2. EL CODI DE LES HISTONES

Les histones pateixen modificacions post-traduccionals tant a nivell local com a nivell genòmic i aquestes estan relacionades amb els processos nuclears. Aquest fet ha donat lloc a la hipòtesi del "codi de les histones", segons la qual, múltiples modificacions en les histones, actuant en combinació o de manera seqüencial en una o varies cues d'histones, poden modular l'afinitat per la cromatina de les proteïnes que s'hi uneixen i que a la vegada, regulen l'accés al DNA, el grau de compactació de la cromatina i l'expressió gènica. Les modificacions de les histones són interdependents i poden tan afavorir com reprimir altres modificacions^{32, 33}.

L'ús combinat de modificacions pot actuar com un sistema de marcatge que és reconegut per proteïnes reguladores. A part, aquestes modificacions poden afectar directament a l'estructura de la cromatina. Aquestes modificacions inclouen processos tan variats com la progressió del cicle cel·lular, la replicació o la reparació del DNA.

Sembla ser que els enzims que catalitzen les modificacions de les histones i les proteïnes que interpreten aquest codi, actuen de manera concertada i interdependent (Fig. 8). Aquestes proteïnes efectores s'uneixen a modificacions específiques i capten altres factors reguladors o de remodelatge que a la vegada, ajudaran a mantenir una determinada estructura de la cromatina regulant així l'activitat transcripcional³⁴. Els moduladors de cromatina que catalitzen o reorganitzen les modificacions de les histones posseeixen una sèrie de dominis conservats, com per exemple, el bromo- o el cromodomini³⁵. Els bromodominis reconeixen les histones amb les cues acetilades i els cromodominis, les metilades.

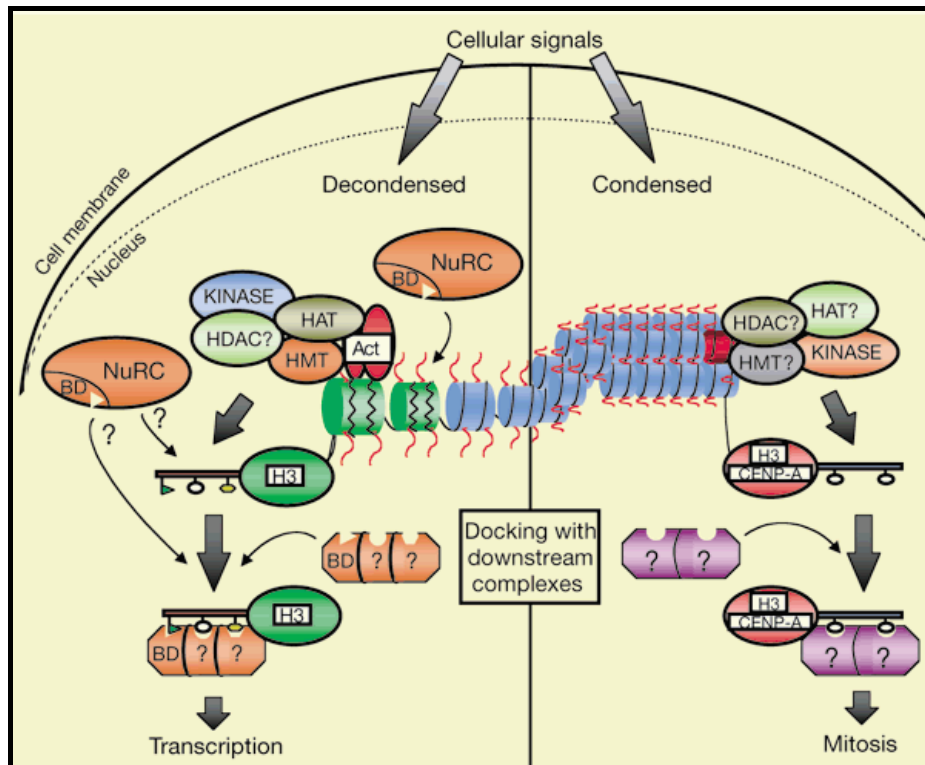


Figura 8. Reclutament coordinat de les proteïnes i complexos que intervien en les modificacions de les histones. Proteïnes i altres factors que intervien en les modificacions de les histones treballen coordinadament amb els complexos de remodelatge de la cromatina (NuRCs, com per exemple Swi/Snf, RSC, NURF) per remodelar la cromatina. També es mostra la interacció de CARM1, una histona metiltransferasa (HMT), amb una histona acetiltransferasa (HAT) que conté coactivadors que interactuen a la vegada amb receptors nuclears (Act) i amb la Rsk quinasa. A més de remodelar els nucleosomes (representats per un DNA en zig-zag), els NuRCs poden modificar químicament i/o unir-se a les cues de les histones. La unió d'un complex NuRC o HAT a la cua de la histona és mitjançant un bromodomini (BD) ³².

La majoria dels complexos identificats fins a l'actualitat estan implicats en processos que afavoreixen la transcripció (Fig. 8, panell esquerra, nucleosomes verds) però existeixen complexos similars que condueixen a la condensació de la cromatina (Fig. 8, panell dret, nucleosoma vermell). Aquestes modificacions tenen un efecte biològic ja sigui pels canvis causats en l'estructura de la cromatina condensada o per un efecte *downstream* de reclutament i interacció amb proteïnes d'acoblament o complexos que encara no han estat identificats.

L'existència de múltiples modificacions en una mateixa cua d'histona fa que moltes d'elles estiguin tan pròximes unes de les altres com per influenciar, positiva o negativament, els mateixos enzims que catalitzen les modificacions. La modificació d'una cua per un enzim influeix l'eficiència amb la que actuarà un segon enzim sobre aquest mateix substrat ara modificat ³².

Per assegurar l'herència epigenètica, és a dir, dels patrons d'expressió gènica en la divisió cel·lular, la cèl·lula no només ha de replicar el seu DNA sinó que també ha de replicar l'estructura de la cromatina i el seu alt grau d'empaquetament en el nucli. La informació epigenètica també ha de ser duplicada en cada cicle cel·lular ³⁶. Els mecanismes que

mantenen la complexa estructura de la cromatina i l'estat epigenètic de la cèl·lula (la replicació de la cromatina) actuen simultàniament a la replicació del DNA durant la fase S del cicle cel·lular.

La transmissió de les modificacions de les histones d'una generació a una altra podria explicar-se a través del mecanisme pel qual s'hereten els nucleosomes. Durant la fase S els nucleosomes són dissociats quedant tetràmers H3-H4 i dímers H2A-H2B³⁷, l'acetilació dels quals no es veu afectada³⁸. Després de la síntesi de nou DNA, es produeix l'assemblatge dels nous tetràmers H3-H4 amb dímers H2A-H2B existents i dels nous dímers H2A-H2B amb tetràmers H3-H4 existents^{39, 40}. Aquesta distribució semiconservativa assegura que cada nucleosoma nou tingui un determinat nombre de subunitats que portin les modificacions preexistents i que a la vegada, facilitaran la restauració de totes les modificacions originals. Per exemple, la ubiquitinació de la H2B dirigeix la metilació de la lisina 79 de la H3, senyal que la cromatina està transcripcionalment activa^{41, 42}.

Així, com cada cadena de DNA parental assegura l'herència del genoma dictant la seqüència de bases en la nova cadena, les modificacions de les histones parentals asseguren l'herència epigenètica dictant les aquestes modificacions a les noves histones⁴³.

Aquestes modificacions post-traduccionals són àmpliament explicades en apartats posteriors.

1.3. LES HISTONES INTERNES

Els nucleosomes contenen dues còpies de cada histona interna, H2A, H2B, H3 i H4 (Fig. 9). Són proteïnes bàsiques de baix pes molecular (11-16 kDa) amb més d'un 20 % d'aminoàcids bàsics. Les histones H2A i H2B contenen més lisines i les histones H3 i H4 contenen més arginines²³. Són proteïnes altament conservades tan en longitud com en seqüència aminoacídica. Les histones més conservades són l'H3 i l'H4⁴⁴, les quals tenen un paper central en el nucleosoma i en molts processos cromosòmics. Aquestes restriccions funcionals i estructurals expliquen la conservació de la seva seqüència.

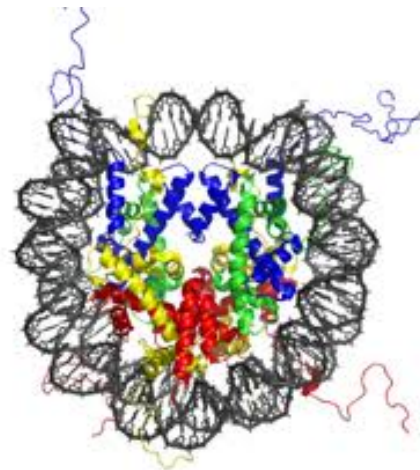


Figura 9. Partícula nuclear. Dues còpies de cada histona interna formant un octàmer al voltant del qual s'hi enrotlla el DNA.

Les quatre histones presenten un domini globular del tipus denominat precisament “plegament d’histona” (*histone fold*) en l’extrem carboxi-terminal de la proteïna, a través del qual es produeixen les principals interaccions histona-histona i histona-DNA. Presenten també un domini amino-terminal que conté la major part de lisines i arginines ⁴⁵ (Fig.10).

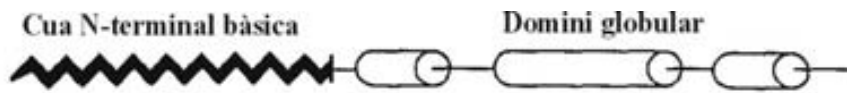


Figura 10. Estructura en dominis de les histones internes ²².

El domini tipus “plegament d’histona” de l’extrem C-terminal conté tres hèlix α . L’hèlix central és la més gran i està flanquejada per dos llaços que la connecten amb dos hèlix més petites en els extrems del domini. Aquest domini està conservat evolutivament degut a la seva importància en l’estructuració del nucleosoma. Les cues N-terminals que també es troben conservades, pateixen diverses modificacions post-traduccionals en aminoàcids específics, sovint per part de proteïnes reguladores de la transcripció i per diferents enzims que modifiquen l’estructura de la cromatina ⁴⁶. Aquesta és una de les explicacions de la conservació evolutiva de la seqüència de les cues, a més de la importància en la interacció amb altres components estructurals de la cromatina ^{47, 48}. S’ha observat que aquests dominis terminals són capaços d’estructurar-se lleugerament en hèlix α en presència d’inductors d’estructura secundària com el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). L’acetilació d’aquests dominis incrementa el percentatge d’hèlix α que poden adquirir i a més, aquest increment no depèn de la interacció amb el DNA ^{49, 50}.

1.3.1. Posicionament de les histones internes en el nucleosoma

La disposició final de les histones internes en l’octàmer consisteix en un tetràmer (H3,H4) ⁵¹ central flanquejat per dos dímers (H2A, H2B) ⁵². Les quatre histones internes tenen interaccions molt específiques entre elles. Les histones H2A i H2B formen un heterodímer. La zona d’unió entre els dos dímers (H3,H4) és més petit i estable que la zona d’unió entre els dímers (H3,H4) i (H2A, H2B) ^{53, 54}. Les histones H3 i H4 són les que inicien l’associació del nucleosoma al DNA. Aquesta estructura crea uns solcs en la seva superfície que formen una rampa helicoidal levogira sobre la que s’enrotlla el DNA.

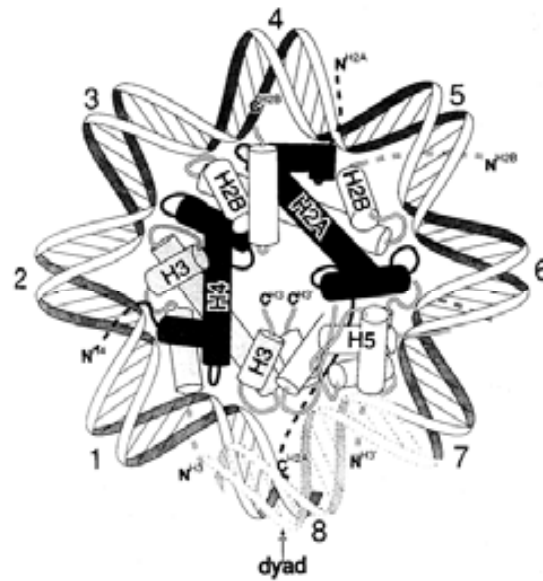


Figura 11. Dibuix del nucleosoma en el que s'aprecia la disposició de les histones internes, del DNA i un possible lloc d'unió de la histona H5 ²².

Dins d'aquesta rampa queden exposats 16 llaços de les histones internes, que queden paral·lels formant 8 ponts β (β -bridges) paral·lels. Cada pont β presenta com a mínim dos residus carregats positivament capaços d'interaccionar amb els fosfats del DNA en la superfície del l'octàmer d'histones ⁵⁵ (Fig.12).

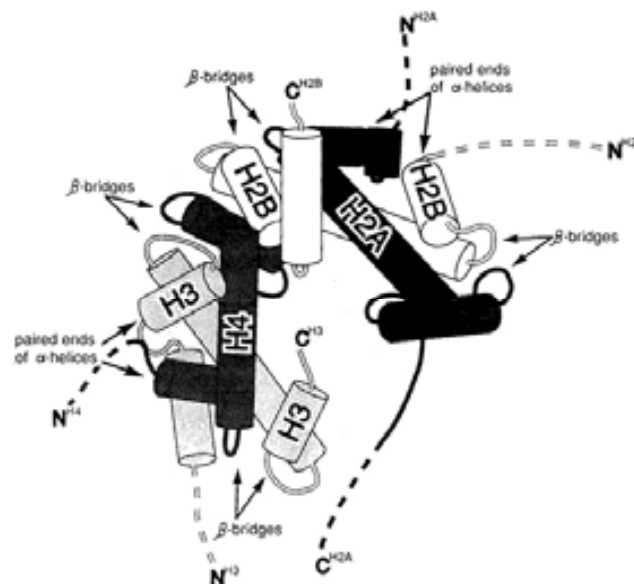


Figura 12. Heterodímers d'H2A/H2B i d'H3/H4. Els llocs d'interacció amb el DNA estan indicats ²².

Vàries evidències indiquen que les interaccions electrostàtiques dels residus d'arginina de les histones internes amb la cadena fosfodièster del DNA són les més importants en l'organització del DNA en el nucleosoma. Efectivament, només 14 residus concrets d'arginina són suficients per a mantenir el DNA enrotllat en el nucleosoma. El paper fonamental de les arginines podria venir donat per la seva capacitat de formar ponts d'hidrogen, a més d'interaccions electrostàtiques, amb els fosfats del DNA ⁵⁶. Varis estudis indiquen que les cues N-terminals altament carregades de les histones internes no contribueixen de forma significativa en l'enrotllament inicial del DNA en el nucleosoma ⁵⁷ i que no tenen un paper essencial en mantenir la integritat del nucleosoma ⁵⁸. Modificacions post-traduccionals d'aquestes cues poden alterar aspectes més subtils de la conformació del nucleosoma i de les interaccions histona-DNA. A més, tot i que alguns experiments suggereixen que les cues N-terminals de les histones internes no presenten interaccions estables amb el solc ample del DNA en el nucleosoma ⁵⁹⁻⁶¹, altres resultats indiquen un entrecruament químic molt específic entre el la cua N-terminal de l'H2A i el DNA ⁶². A més de qualsevol paper específic en l'estructura del nucleosoma, les cues N-terminals de les histones internes intervien en interaccions proteïna-proteïna fora del nucleosoma.

1.3.2. Modificacions post-traduccionals de les histones internes

Les histones internes tenen un important paper en la regulació gènica. Modificacions en la seva estequiometria, en la seqüència, així com les modificacions post-traduccionals, impliquen canvis d'expressió en gran nombre de gens ⁶³.

Les modificacions post-traduccionals en les histones internes es donen majoritàriament en les cues amino-terminals que sobresurten del nucleosoma (principalment acetilacions, fosforilacions i metilacions) catalitzades per complexos de remodelatge ^{64, 65} (Fig.13).

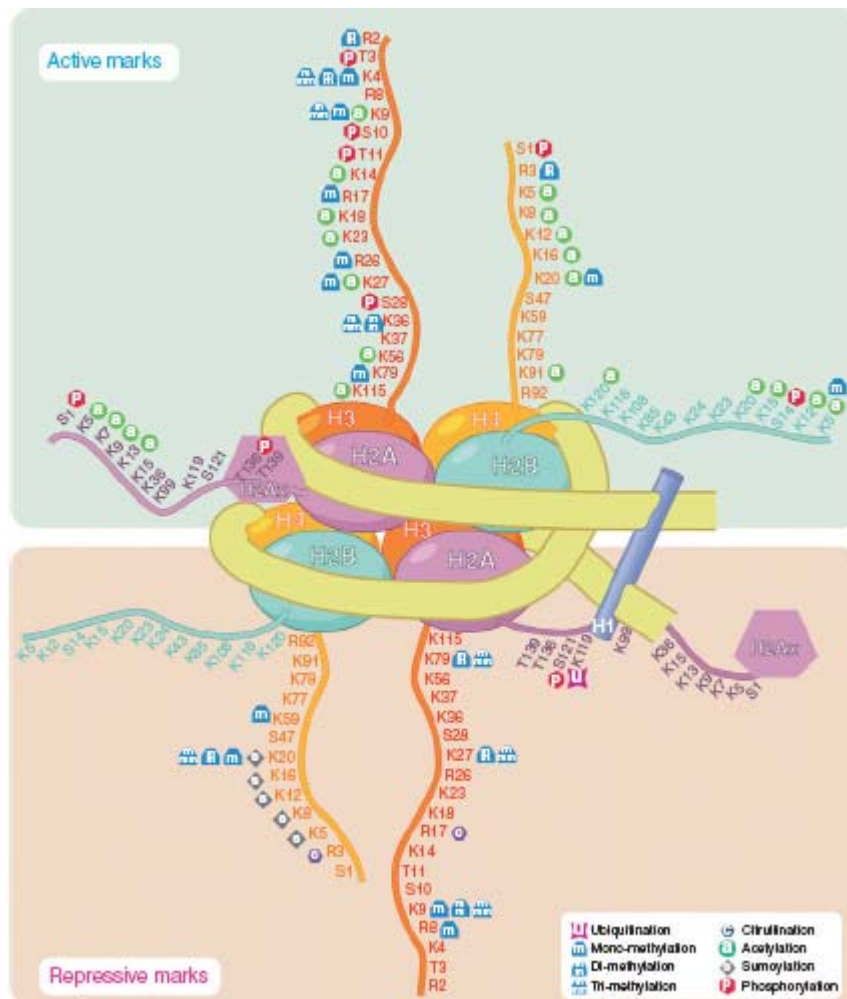


Figura 13. Principals modificacions post-traduccionals de les histones internes en mamífers. En els dominis terminals de les histones internes s'indiquen les diferents modificacions post-traduccionals específiques de cada aminoàcid. Les modificacions activadores de l'expressió gènica són representades en la part superior i les modificacions repressores en la part inferior⁶⁶.

El domini amino-terminal activa o reprimeix la transcripció de determinats gens⁶⁷, ja que els nucleosomes poden formar part de complexos proteics reguladors. Els factors de transcripció interaccionen específicament amb les histones.

Les modificacions post-traduccionals poden actuar delimitant els dominis de la cromatina: eucromatina i heterocromatina. Determinen la superestructura de la cromatina i poden dirigir el reclutament ordenat de complexos enzimàtics efectors dels processos metabòlics relacionats amb el DNA, incloent la transcripció, la replicació, la reparació i la condensació dels cromosomes. El terme "codi de les histones" descriu el paper de les modificacions en aquests processos^{32, 33, 68}.

Estudis mitjançant espectrometria de masses i de ChIP on CHIP (Chromatin Immunoprecipitation on DNA Chip) han identificat acetil·lació, metil·lació, fosforil·lació, ubiquitinació, sumoylació, ADP-ribosilació i deiminació⁶⁸⁻⁷¹. Algunes d'aquestes modificacions són específiques pel tipus d'histona i de les etapes del cicle cel·lular (Fig. 14).

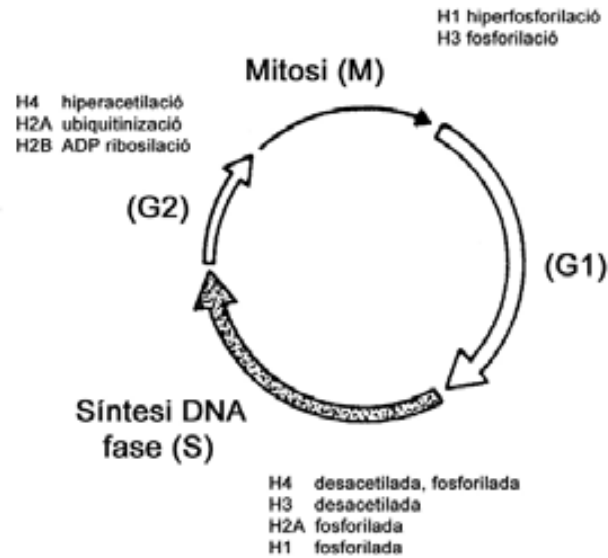


Figura 14. Modificacions post-traduccionals de les histones internes i la histona H1 al llarg del cicle cel·lular (Adaptat de Wolffe ²²).

1.3.2.1. Fosforilació

La fosforilació afecta a totes les classes d'histones del core. La histona H3 és ràpidament fosforilada en residus serina del seu domini amino-terminal quan senyals extracel·lulars com factors de creixement o èsters de forbol estimulen cèl·lules quiescents a proliferar ⁷². La fosforilació de la H3 és màxima en mitosi, moment en que es fosforila la serina 10 (S10) del domini amino-terminal relacionada amb la condensació dels cromosomes. Aquesta fosforilació modularia la interacció entre la cua de la histona H3 i el DNA, permetent l'accés de factors condensants ^{73, 74}. Cèl·lules mancades de gens supressors de tumors o que expressen oncogens, presenten alts nivells de histones H1 i H3 fosforilades, les quals serien responsables de la menor estructuració de la cromatina i de la expressió gènica aberrant ⁷⁵. La proteïna quinasa Aurora B encarregada de la fosforilació de l'H3 és sobreexpressada en moltes línies cancerígenes i fosforila la S10 (H3S10). La hiperfosforilació s'associa a la inestabilitat cromosòmica observada en cèl·lules malignes ^{76, 77}.

La fosforilació de la H3S10 també s'associa a la inducció de la transcripció en resposta al shock tèrmic ⁷⁸, a l'activació de c-Fos, c-jun i dels gens regulats per NF-kB ⁶⁸. Una altra fosforilació, la H3T3, és necessària per a la correcta alineació dels cromosomes metafàsics ⁷⁹.

La fosforilació *in vivo* de les histones H4 i H2A es dona en el citoplasma poc després de la seva síntesi ⁸⁰⁻⁸².

La fosforilació d'aquestes histones, juntament amb l'acetilació de la histona H4, podrien dirigir-les selectivament cap a les xaperones moleculars involucrades en la formació del nucleosoma i de la forquilla de replicació ^{83, 84}.

Una de les respostes associades a dany en el DNA és la fosforilació de la variant γ de la histona H2A en mamífers. Aquesta fosforilació s'estén varies kilobases al voltant del lloc danyat

i en llevat, recluta el complex INO80 que presenta activitat remodeladora depenent d'ATP. Les fosforilacions H2AS129 i H4S1 s'han relacionat amb la reparació dels trencaments de doble cadena per la via de la unió d'extremes no homòlegs. La fosforilació H4S1 també està involucrada en la regulació de l'esperulació en llevat i es conserva en la espermiogènesi de mosca i de ratolí ⁸⁵.

El grau de fosforilació de les histones internes sembla augmentar en iniciar-se l'apoptosi, en especial de la H2A i la H2B. La fosforilació del subtipus H2.X en S139 sembla associada al inici de la fragmentació del DNA en línies cel·lulars ⁸⁶.

L'eliminació de la fosforilació de les histones internes mitjançant fosfatases no influeix en l'espaiat dels nucleosomes ⁸² i la funció de la fosforilació en la constitució de la cromatina continua sent subjecte d'estudi.

1.3.2.2. Acetilació

L'acetilació de les histones internes té un paper molt important en el procés de la regulació de la transcripció. Concretament, s'aceten els residus lisina de les cues amino-terminals carregades, de manera que cada grup acetat afegit a la histona redueix la seva càrrega neta positiva en 1. S'ha observat acetilació de les quatre histones internes en totes les espècies d'animals i plantes examinades ⁸⁷ (Fig. 15).

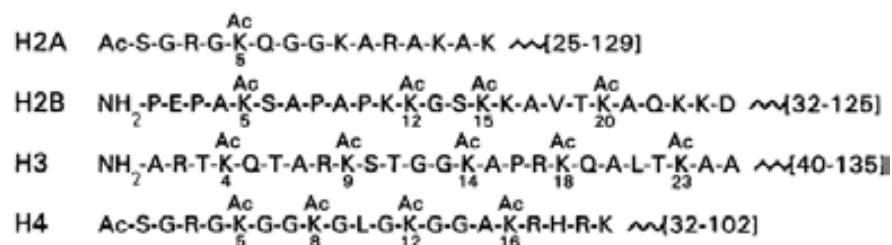


Figura 15. Seqüència dels dominis N-terminals de les histones internes de ratolí amb els punts d'acetilació indicats ²².

Alguns activadors transcripcionals presenten activitat histona acetiltransferasa (HATs) ⁸⁸ i alguns repressors transcripcionals són histona desacetilases (HDACs) ⁸⁹. El nombre de residus lisina acetilats en una molècula d'histona depèn d'un equilibri entre les histona acetilases i desacetilases. Sembla que en el nucli d'una cèl·lula en particular existeixen dues poblacions d'histones acetilades: histones hiperacetilades i histones hipoacetilades. El patró de residus de lisina específics que es troben acetilats en la cua N-terminal varia entre espècies. El fet que no s'observi una acetilació a l'atzar dels residus de lisina fa pensar que les acetilases i desacetilases deuen presentar una especificitat de seqüència considerable ⁹⁰.

L'acetilació sembla augmentar el percentatge d'hèlix α que són capaços d'adquirir els dominis N-terminals de les histones internes^{49, 50}. En aquest sentit, s'ha postulat que l'espaiat entre les lisines acetilables de les cues de les histones H3 i H4 recorda el pas de rosca d'una hèlix α ^{32, 80}.

L'acetilació de histones internes ajuda a la relaxació de la cromatina i permet transitòriament l'accessibilitat al DNA, però sembla que les conseqüències més importants d'aquesta modificació rauen en les interaccions proteïna-proteïna, bé entre nucleosomes, bé amb la histona H1 o amb proteïnes no histones⁹¹.

Hi ha una correlació entre l'acetilació de les histones i l'activitat transcripcional de la cromatina^{64, 92}. Els dominis de la cromatina que es transcriuen activament o que són potencialment actius, són rics en histones hiperacetilades, mentre que la cromatina transcripcionalment inactiva conté histones hipoacetilades. També existeixen zones específiques de major o menor acetilació en els gens activament transcrits⁶⁸.

Tant l'acetilació com l'eliminació de les cues N-terminals de les histones internes de nucleosomes que contenen llocs de reconeixement per a factors de transcripció, faciliten l'accés dels factors a les seves dianes^{93, 94}; resultat que indica un paper regulador important del procés de transcripció per a l'acetilació de les histones.

Observacions *in vitro* suggereixen que l'acetilació de les histones internes no influeix directament en l'associació de la histona H1 amb els nucleosomes⁹⁵, però sembla ser que les regions acetilades són molt pobres en H1 i l'acetilació causa una moderada relaxació de la fibra de cromatina en la interfase⁹⁶.

L'acetilació té també un paper important en la reparació del DNA. En llevats, l'acetilació de la histona H3 en K56 es dona en histones recent sintetitzades durant la fase S i desapareix en G2. En situació de dany en el DNA, aquesta modificació es manté⁹⁷. En els llocs de reparació es troba l'acetilasa Hat1 que acetila la lisina 12 de l'H4⁹⁸.

En resum, el paper de l'acetilació de les histones tant en la transcripció com en altres processos, indica una importància biològica central en la cromatina per a aquesta modificació post-traducciona regulable, comparable a la importància de la fosforilació en les cadenes de transducció de senyals⁶⁸.

1.3.2.3. Metilació

Les histones internes són metilades en residus lisina i arginina. La posició i el grau de metilació de les histones s'ha relacionat amb l'expressió gènica. Estudis recents del patró de modificacions epigenètiques i la seva importància en processos cel·lulars i desenvolupament de malalties com el càncer, indicarien que la metilació de les histones tenen un paper decisiu en aquests fenòmens⁹⁹.

Els patrons de metilació de les histones s'estableixen a través de variats mecanismes que inclouen la interacció dels complexos de les histona metiltransferases específiques de lisina

(KMTs) amb factors de transcripció específics, amb la cromatina modificada, amb RNA polimerasa II o per la unió directa a seqüències específiques de DNA. Les demetilases específiques de lisina (KDMs) treballen en coordinació amb les KMTs per mantenir els patrons de metilació ¹⁰⁰.

La metilació de les lisines comença després de la formació dels nucleosomes i és màxima durant la mitosi. Durant la interfase, la metilació de les histones es dona amb preferència en les histones H3 i H4 que ja han estat acetilades. Tanmateix, això pot reflectir només la major accessibilitat de les cues N-terminals acetilades.

En vertebrats, la majoria de les metilacions de la H3 es donen en les lisines 9 i 27 (K9 i K27), les quals incorporen fins a tres grups metil ¹⁰¹. Aquestes metilacions estan associades a repressió transcripcional. La metilació en K9 és important per al reclutament de la proteïna de heterocromatina HP1. Aquesta proteïna és alliberada en mitosi quan es fosforila S10, establint-se un mecanisme regulador que involucra dues modificacions post-traduccionals adjacents, una metilació estable i una fosforilació dinàmica, anomenat "*methyl-phos switch*" ¹⁰².

La histona H3 també es metila en les lisines 4, 36 i 79. Aquestes posicions metilades són característiques de zones transcripcionalment actives de la cromatina ^{103, 104}.

Una altra funció important de la metilació de les lisines es la delimitació dels dominis d'eucromatina i heterocromatina. Les fronteres de l'heterocromatina es mantenen amb la presència de les metilacions H3K4 i H3K9 en els dominis adjacents d'eucromatina. L'heterocromatina s'associa a baixos nivells d'acetilació i a les metilacions H3K9, H3K27 i H4K20, associades a repressió transcripcional. La metilació H3K9 sembla important en el manteniment de la heterocromatina pericentromèrica ⁶⁸.

La histona H4 es metila en la lisina 20 incorporant com a màxim dos grups metil. Sembla ser que la funció d'aquesta metilació és marcar el DNA danyat per a ser reconegut pels complexos de reparació ¹⁰⁵.

La metilació de les arginines està poc caracteritzada. Pot activar o reprimir la transcripció i preferentment s'ubica en regions promotores. En el promotor pS2 regulat per estrògens la metilació de les arginines és cíclica (apareixen i desapareixen) en el procés d'activació ¹⁰⁶. Aquest fenomen podria ser degut a la necessitat de que els promotors regulats per estrògens responguin ràpidament a estímuls externs i que per tant, la cromatina hagi de romandre a punt per a una possible repressió transcripcional immediata ⁶⁸.

1.3.2.4. Deiminació

La deiminació consisteix en la conversió de l'arginina en citrulina. Aquesta modificació pot impedir la metilació de l'arginina ja que la citrulina no pot ser metilada ¹⁰⁷. Les arginines de la H3 i la H4 poden ser convertides a citrulina per l'enzim PADI4.

La conversió de la citrulina en arginina no s'ha descrit però en el promotor pS2 els nivells de citrulina són també cíclics, indicant que el procés de deiminació és reversible ¹⁰⁸.

1.3.2.5. ADP-Ribosilació

Aquesta modificació post-traducciona consisteix en l'addició d'unitats ADP-ribosa a algun residu aminoacídic de la proteïna. Els enzims que ho catalitzen són mono-ADP-ribosiltransferasa i poli-ADP-ribosiltransferasa, segons incorporin una o més unitats d'ADP-ribosa respectivament. Hi ha molts estudis sobre la ADP-ribosilació de les histones, però de moment només s'ha caracteritzat la H2BEar1, on el residu d'ADP-ribosa s'incorpora al glutàmic 2⁶⁸.

Algunes evidències suggereixen que l'ADP-ribosilació de les histones internes pot donar lloc a la descondensació localitzada de la fibra de cromatina. L'ADP-ribosilació pot tenir un paper important en la reparació del DNA¹⁰⁹. La síntesi de llargues cadenes d'ADP-ribosa carregades negativament poden facilitar la disrupció dels nucleosomes, potser a través de l'intercanvi d'histones cap a aquest polianió competidor.

1.3.2.6. Ubiquitinació

La histona H3, la H2B i especialment la H2A poden ser també modificades per l'addició de la ubiquitina, una petita proteïna de 76 residus¹¹⁰. És conegut que la ubiquitina participa en regular la degradació de les proteïnes. La ubiquitina és unida covalentment, a través d'una reacció dependent d'ATP, a una proteïna que ha de ser marcada per a la seva proteòlisi. Concretament és unida a l'extrem C-terminal de les histones H2A i H2B. La ubiquitinació en aquest cas no sembla estar relacionada amb la degradació de la proteïna. S'ha observat que la histona H2A ubiquitinada s'incorpora als nucleosomes sense canvis importants aparents en l'organització de la partícula nucli¹¹¹. Com que l'extrem C-terminal de la histona H2A contacta amb el DNA nucleosomal en l'eix de simetria binari^{112, 113}, la seva ubiquitinació molt probablement deu impedir la interacció de les histones H1 amb el DNA nucleosomal. També deu impedir, donat el volum de la ubiquitina, els contactes entre nucleosomes i, per tant, la condensació de la cromatina. Les histones ubiquitinades podrien trobar-se en zones del DNA transcripcionalment actives impeding la compactació de la cromatina.

La ubiquitinació de la histona H3 i H4 s'ha relacionat amb la reparació del DNA danyat per UV, ja que és important en el reclutament de la proteïna de reparació XPC (*xeroderma pigmentosum group C protein complex*). En aquest mateix procés està implicada la mono-ubiquitinació de l'H2A⁶⁸.

També s'ha observat en llevats que per a la trimetilació de H3K4 (anteriorment esmentada) és necessària la mono-ubiquitinació de la histona H2B en la lisina 123¹¹⁴.

1.3.2.7. Sumoilació

SUMO és una proteïna modificadora (d'aproximadament 100 aminoàcids) relacionada amb la ubiquitina i conservada en els organismes eucariotes. La conjugació de les histones amb la proteïna SUMO és una modificació voluminosa, com la ubiquitinació. Les modificacions descrites fins ara en llevats són: la K126 en el domini C-terminal de la H2A; la K6, 7, 16 i 17 en el domini N-terminal de la H2B i les cinc lisines del domini N-terminal de la H4. No hi ha dades concretes sobre la H3.

Aquesta modificació, a diferència de l'acetilació i la ubiquitinació, produeix repressió transcripcional^{68, 115}.

1.4. LA HISTONA H1

La histona H1 s'uneix al nucleosoma i al DNA internucleosomal permetent la compactació de la cromatina, passant de la fibra de 10 nm a la fibra de 30 nm.

Les H1 estan implicades en la formació de la superestructura de la cromatina^{5, 14} i en la regulació gènica. Les H1 podrien tenir un paper regulador de la transcripció a través de la modulació de la condensació de la cromatina i participant en complexos que activin o reprimeixin gens específics¹¹⁶⁻¹¹⁹. Altres mecanismes amb els quals contribueix a la regulació transcripcional són la participació en el posicionament del nucleosoma¹²⁰, l'estabilització de les dues voltes de DNA nucleosomal al voltant de l'octàmer en entrar i sortir del nucleosoma¹¹⁹, la unió a regions SAR (*scaffold-associated regions*)¹²¹, etc.

La modulació de l'expressió gènica per part de l'H1 pot ser deguda a la modificació de l'accessibilitat de seqüències promotores o potenciadores als factors de transcripció, fet que podria provocar impediments estèrics d'unió als factors de transcripció; limitació de la mobilitat dels nucleosomes; reducció de l'exposició transitòria del DNA en la superfície del nucleosoma i promoció de la condensació de la cromatina en estructures d'ordre superior de compactació.

La histona H1 té múltiples isoformes o subtipus. En mamífers trobem els subtipus somàtics H1a-e, els subtipus específics de les línies germinals H1oo i H1t i els subtipus associats a diferenciació H1⁰ i H1x. En l'evolució de les H1 de vertebrats, la taxa de substitució d'aminoàcids entre els subtipus varia com a mínim en un ordre de magnitud, indicant una possible funcionalitat específica dels subtipus¹²².

A diferència de les histones internes que tenen una sola nomenclatura, en la literatura trobem fins a 12 nomenclatures diferents per les histones H1¹²³, fet pel qual de vegades es troben publicacions on s'assignen erròniament característiques específiques d'un subtipus a un altre subtipus.

Les nomenclatures més usades per a les histones H1 són: la nomenclatura numèrica de Doenecke¹²⁴, la nomenclatura alfabètica de Lennox¹²⁵ o la nomenclatura alfa-numèrica de Parseghian i Hamkalo¹²³ (Taula 1). En aquest treball s'ha utilitzat la nomenclatura de Lennox.

Taula 1. Nomenclatures més utilitzades per als subtipus de la histona H1		
Doenecke	Lennox	Hamkalo
H1.1	H1a	H1a
H1.2	H1c	H1 ^s .1
H1.3	H1d	H1 ^s .2
H1.4	H1e	H1 ^s .4
H1.5	H1b	H1 ^s .3

Comparat amb les histones internes, les histones H1 (juntament amb la histona H5) tenen un temps de residència en el DNA més curt. Per estudis de FRAP (*Flourescence Recovery After Photobleaching*) s'ha observat que existeixen dos grups de subtipus d'histones H1 segons el seu temps de residència. L'H1a i l'H1c tenen un temps de residència d'entre 1 i 2 minuts. Per a l'H1⁰ és de varis minuts i per als subtipus H1b, H1d i H1e, el temps de residència és de com a mínim 15 minuts ¹²⁶. Els subtipus amb temps de residència més llarg s'associen a heterocromatina ^{126, 127}. Tot i així, els factors de transcripció com HMGB1, Fos i Jun, tenen un temps de residència molt més curt, d'1 a 30 segons ^{128, 129}.

1.4.1. Subtipus de la histona H1

Com s'ha dit anteriorment, en mamífers s'han identificat sis subtipus somàtics H1a–e, els subtipus específics de línies germinals H1oo i H1t i els subtipus associats a diferenciació H1⁰ i H1x. Els subtipus d'H1 difereixen en el grau de fosforilació, en el *turnover* i en el grau de conservació evolutiva ¹²⁵. També s'ha vist que alguns subtipus presenten diferent habilitat per a condensar el DNA *in vitro* ^{130- 132}. Aquestes propietats suggereixen l'existència de diferències funcionals entre els diferents subtipus ¹²².

Tot i així, alguns estudis descriuen un alt grau de redundància funcional entre els diferents subtipus d'H1 i sembla ser més important la quantitat global d'histona H1 que la quantitat relativa de cada subtipus. Ratolins *knockout* per a un o dos subtipus d'histona H1 somàtics es desenvolupen amb normalitat ^{133, 134}. Aparentment, la capacitat de síntesi dels gens de còpia única dels diferents subtipus, és suficientment flexible com per compensar les pèrdues dels gens inactivats i per mantenir la correcta estequiometria nucleosoma-H1. Una pèrdua de més del 50 % de la quantitat normal d'H1 comporta importants canvis en l'estructura de la cromatina i causa la mort de l'embrió ¹³⁵.

Més recentment, es realitzà un estudi *in vivo* en cèl·lules tumorals de càncer de pulmó (T47D) on mitjançant un sistema d'expressió induïble de RNAs d'interferència es reduïa individualment cada subtipus de la histona H1. L'estudi va revelar que els rols dels diferents subtipus de la

histona H1 no són totalment redundants i que tenen diferents funcions pel que a fa al control de l'expressió gènica, la regulació de l'espaiat nucleosomal i altres esdeveniments cel·lulars importants com la proliferació. A diferència de l'estudi anterior, aquest sistema d'expressió induïble de RNAs d'interferència evita l'efecte compensatori de la sobreexpressió dels altres subtipus d'H1 o l'adaptació epigenètica als canvis estructurals de la cromatina. La reducció de cada subtipus d'H1 causà l'alteració de l'expressió d'un nombre limitat de gens diferent en cada *knock-down*. El 79 % dels gens estudiats es veien afectats per un sol subtipus *knock-down*, indicant que cada subtipus té una funció específica. El 13 % dels gens es veien afectats per dos dels subtipus i l'1 % pels cinc subtipus, indicant també que hi ha una lleugera redundància en la regulació de l'expressió. A més, també es va concloure que l'efecte de la reducció de cada subtipus d'H1 és específic de cada tipus cel·lular ¹³⁶.

Els cinc subtipus somàtics són constitutius, malgrat que les seves proporcions variïn àmpliament al llarg del cicle cel·lular i l'ontogènesi. Els subtipus més abundants en l'individu adult són l'H1e i l'H1c ^{137, 138}. L'H1a la trobem en abundància en cèl·lules en divisió. L'H1⁰ es troba en teixits amb poca o nul·la proliferació cel·lular ^{139, 140}. L'H1t es troba en la línia germinal masculina i l'H1oo en oòcits.

Els subtipus somàtics H1a-d disminueixen exponencialment durant el desenvolupament postnatal i són parcial o totalment substituïts per l'H1e, que com dèiem, esdevé el subtipus majoritari en l'adult, arribant a representar el 70 % de l'H1 total ¹⁴¹.

El subtipus H1⁰ de mamífer, també trobat en *Xenopus laevis*, i les histones H5 d'eritrocits nucleats de les aus, es troben evolutivament relacionats i formen un grup lleugerament diferenciat de la resta de subtipus de l'H1. Durant la maduració dels eritrocits de les aus, la histona H5 substitueix l'H1 ¹⁴². Totes dues histones sembla que tenen, parlant en general, una funció similar, però la H5 s'uneix més fortament al nucleosoma, produint en conseqüència una major estabilitat de la cromatina i una disminució de l'expressió gènica ¹⁴³.

La histona H1x es transcriu gairebé en tots els teixits, però només s'ha pogut detectar la proteïna en cultius cel·lulars ¹⁴⁴. Com l'H1⁰, es localitza en regions de la cromatina que són menys sensibles a la digestió amb nucleasa micrococcal. El seu gen es localitza en una regió aïllada i es transcriu donant lloc a un RNA poliadenilat, a diferència dels RNAs de les altres histones H1a-e que no tenen la cua poli-A. Tot i les semblances entre ambdós subtipus, la inducció de l'expressió i la regulació, són diferents ¹⁴⁵.

Els subtipus de la histona H1 són codificats per una família multigènica. El gen de l'H1⁰ i el de l'H1x no es troba localitzat en el mateix bloc de gens que les altres histones. L'H1⁰ és codificada per un gen de còpia única en el cromosoma 22 en humans mentre la resta d'histones es troben codificades en múltiples còpies en el cromosoma 6.

Els subtipus de la histona H1 es classifiquen en tres classes segons el tipus i el grau de diferenciació de la cèl·lula en la qual s'estan expressant ^{146, 147}:

Classe I. S'expressen específicament en cèl·lules de la línia germinal. S'expressen en alts nivells per tenir-ne grans reserves per tal de ser utilitzades en la embriogènesi primerenca ^{148, 149}. En oòcits trobem l' H1o en ratolins i humans, la CS H1 en eriçons de mar i la H1M i la B4 en granotes. En la línia germinal masculina trobem H1t i dues proteïnes *histone-like*, H1T2 ^{150, 151} i HILS1 ¹⁵².

Classe II. S'expressen en cèl·lules somàtiques i tenen un patró dependent del cicle cel·lular. Els seus gens estan agrupats en una regió del genoma anomenada "cluster d'histones", que inclou també l'H1t. En humans està ubicada en el cromosoma 6 ¹⁵³ i en ratolins en el cromosoma 13 ¹⁵⁴. L'H1a, l'H1c i l'H1t formen part d'un segment de 80 kb que conté les histones internes. L'H1d i l'H1e pertanyen a un segon segment i l'H1b es troba en un segment allunyat 500 kb que conté 14 gens d'histones internes ¹⁵⁵.

Classe III. Són variants específiques de diferenciació. Hi trobem l'H1⁰, l'H5 i la més recentment descoberta, H1x ¹⁴⁵. L'H5 s'expressa en eritròcits de pollastre. L'H1⁰ s'expressa en cèl·lules diferenciades terminalment i el seu gen es troba aïllat de la resta dels gens de les histones. En humans el trobem en el cromosoma 22 ¹⁵³ i en ratolins en el 15 ¹⁵⁸. Contenen seqüències promotores de teixit ¹⁴⁷ i elements reguladors particulars que responen segons el tipus de teixit i l'estadi de desenvolupament.

1.4.2. Estructura de la histona H1

Les histones H1 de metazous tenen tres dominis estructurals: un domini amino-terminal (20-35 aminoàcids), un domini globular central (d'uns 80 aminoàcids) i un domini carboxi-terminal (d'uns 100 aminoàcids) (Fig.16).

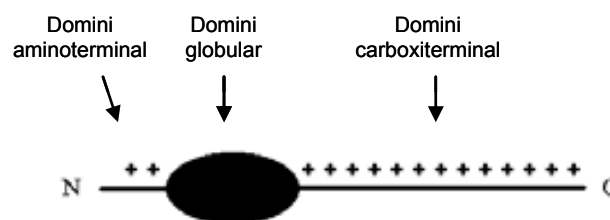


Figura 16. Estructura en dominis de la histona H1.

Els dominis amino- i carboxi-terminal són de caràcter bàsic, especialment el domini C-terminal, el qual pot contenir fins un 40% de lisines. Els dominis terminals són de longitud més variable i

tenen una menor complexitat de seqüència tan a nivell de nucleòtids com d'aminoàcids que el domini globular.

Aquesta estructuració en tres dominis podria tenir funcions específiques en l'estructura de la cromatina. El domini amino-terminal estabilitzaria la unió del domini globular, el domini globular localitzaria la histona H1 en el nucleosoma i el domini carboxi-terminal, s'uniria al DNA internucleosomal neutralitzant-ne les càrregues i permetent així, la compactació de la cromatina

¹⁴⁶

Les histones H1 de llevat i de protozous com *Tetrahymena* no tenen aquesta estructura tripartida descrita. En llevats, l'H1 té dos dominis globulars (amb una homologia de seqüència significativa amb el domini globular dels metazous) separats entre ells per un segment de 42 aminoàcids (ric en lisina, alanina i prolina com el domini C-terminal dels metazous). En *Tetrahymena*, l'H1 consisteix en un polipèptid de 163 aminoàcids de composició semblant al domini C-terminal dels metazous sense domini globular.

1.4.2.1. El domini globular

El domini globular central consta d'aproximadament 80 residus. S'uneix a l'exterior de cada nucleosoma més o menys a prop del punt en què entra i surt el DNA, la posició exacta no està clara, protegint en aquesta regió 20 pb addicionals de DNA de la digestió amb nucleasa micrococcal ¹⁵⁹. Aquest domini és el més conservat evolutivament, fins al punt de ser bàsicament idèntic entre alguns subtipus i entre espècies diferents ¹²².

La seva estructura es coneix amb detall gràcies a estudis de ressonància magnètica nuclear de doble dimensió realitzats amb el domini globular de l'H5 (GH5) d'eritròcit nucleat de pollastre i el domini globular de l'H1 (GH1) també de pollastre ¹⁶⁰, i a estudis de difracció de raigs X del mateix domini de l'H5 amb una resolució de 2'5 Å ¹⁶¹.

El domini globular consta en tots els casos de tres hèlixs α i una fulla β antiparal·lela en l'extrem terminal carboxílic (Fig. 17).

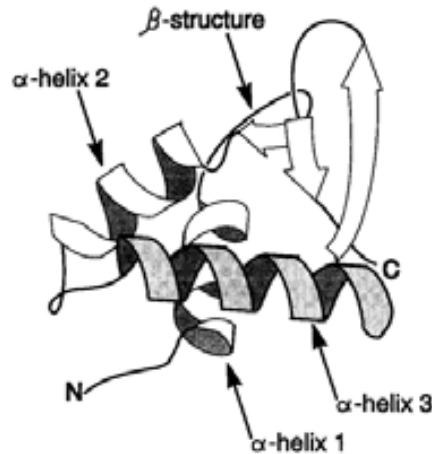


Figura 17. Estructura del domini globular de la histona H5 ²².

Aquesta estructura sembla que li permet unir-se al DNA de la mateixa manera que ho fa la classe de proteïnes amb motius hèlix-gir-hèlix. És molt notable la gran similitud estructural existent de GH1 i GH5 amb els factors de transcripció CAP (*catabolite gene activator protein*) i HNF-3 γ (*hepatocyte nuclear factor-3*), ambdues proteïnes amb el motiu hèlix-gir-hèlix. L'estructura de l'H1 de pollastre determinada per RMN també pertany a aquest grup. A partir d'aquesta similitud, és raonable assumir que el mateix patró estructural existeix en tots els dominis globulars de les H1 de mamífer.

El domini globular conté dos llocs d'unió a DNA nucleosomal. Estudis *in vitro* proposen que el lloc principal d'unió al DNA és l'hèlix III, o hèlix de reconeixement, que junt amb el gir β adjacent s'unirien al solc major del DNA, possiblement, a prop de l'extrem del DNA del cromatosoma. Els aminoàcids K69 i R73 de l'hèlix III i el K85 del llaç β , que es conserven en totes les variants estudiades, formarien un dels llocs d'unió a DNA. Tot i així, existeixen diferències de seqüència en la hèlix III, fet que podria afectar a la interacció amb el DNA i determinar algunes preferències de seqüència ^{161, 162}. El lloc d'unió secundari al DNA interacciona amb el solc menor i estaria format per les posicions K40 i R42 situades entre les hèlix I i II, K52 de la hèlix II i R94 del llaç β . Aquests aminoàcids també es conserven en les variants de les histones de mamífers a excepció de l'H1t ¹⁶³. En H1t en la posició equivalent a K52 s'hi troba una glutamina. Aquest canvi és present en l'H1t de rata, ratolí, porc i humà, fet que fa pensar que es tracta un canvi específic de subtipus.

Estudis *in vivo* més recents indiquen que el domini globular es posiciona via interacció per un dels llocs d'unió amb el solc major del DNA en l'eix de simetria del nucleosoma. Aquest lloc és més gran i comprèn els residus H25, R47, K69, K73, R74 i K85. El segon lloc d'unió interacciona amb el DNA internucleosomal adjacent al nucleosoma, és més petit i comprèn els residus R42, R94 i K97, tots situats en regions flexibles. A més, tots els residus excepte un, no inclosos en els llocs d'unió o amb poca contribució a l'afinitat d'unió en general es localitzen en una ampla regió separada dels llocs d'unió en l'altre cara del domini ¹⁶⁴ (Fig. 18).

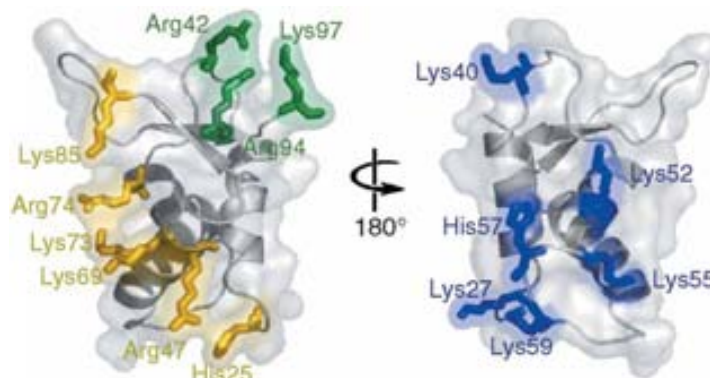


Figura 18. Mapa de la superfície d'interacció de l'H1⁰. En groc, els residus del lloc d'unió 1; en verd, els residus del lloc d'unió 2; en blau, residus no inclosos en el lloc d'unió ¹⁶⁴.

1.4.2.2. Domini amino-terminal

El domini N-terminal té aproximadament uns 30 aminoàcids. Presenta dues regions diferents conservades en la majoria de subtipus coneguts ¹⁶⁵. La regió més pròxima a l'extrem N-terminal no conté residus bàsics i té un marcat caràcter apolar, ja que està formada principalment per residus alanina i prolina. L'altra regió del domini N-terminal, adjacent al domini globular, és similar al domini C-terminal pel que fa a la composició aminoacídica. Conté, en efecte, molts residus bàsics, especialment lisina.

En dissolució aquosa el domini es troba desestructurat, però en presència de DNA o d'inductors d'estructura secundària com el TFE, adquireix una important proporció d'hèlix α ¹⁶⁶.

Estudis de RMN-2D amb pèptids de les dues regions del domini N-terminal de la histona H1⁰ de ratolí, NH-1 (aminoàcids 1-20) i NH-2 (aminoàcids 8-29), van mostrar que la regió bàsica del domini adquiria estructura helicoïdal en presència de TFE al 90%. L'espectroscòpia per infraroig (FTIR) dels complexos amb DNA, mostren que la estructura del domini N-terminal unit al DNA és similar a la obtinguda en TFE ¹⁶⁶.

L'estudi d'un pèptid corresponent a la regió bàsica del domini N-terminal de l'H1e per dicromisme circular i per RMN mostra que el pèptid en presència de TFE adquireix un 40 % d'hèlix α i està estructurat en dues hèlix anfigèniques separades per un motiu Gly-Gly que funciona com una frontissa entre les dues hèlixs. La primera hèlix abarca els residus 17-27 i la segona els residus 29-34, quedant així pràcticament tot el pèptid en hèlix α ¹⁶⁷ (Fig. 19).

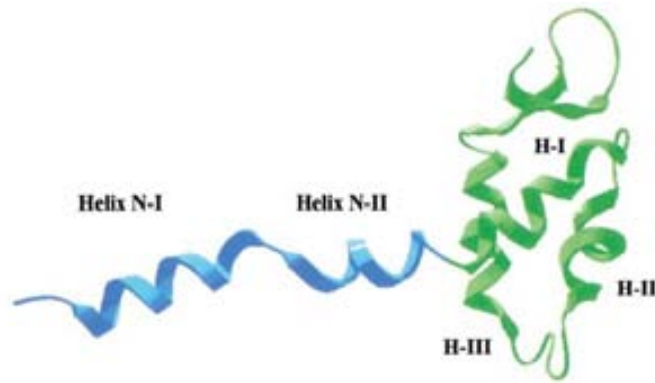


Figura 19. Model estructural del domini N-terminal de la H1e connectat amb el domini globular ¹⁶⁷.

1.4.2.3. Domini carboxi-terminal

El domini C-terminal presenta al voltant d'un 40% de residus bàsics, majoritàriament lisina. També conté bastants residus d'alanina (en alguns subtipus gairebé un 30%), serina i prolina. Per exemple, de 97 residus de que consta l'H1^o de ratolí, 40 són lisina, 16 alanina, 12 prolina, 9 valina, 7 serina i 5 treonina. Aquest domini és molt variable entre els diferents subtipus d'histona però malgrat les diferències de seqüència d'aminoàcids, en totes, la distribució de la càrrega és relativament uniforme ¹⁶⁸.

La distribució dels residus lisina provoca una densitat de càrrega força uniforme al llarg de la major part d'aquesta regió de la molècula. Els residus lisina tendeixen a estar isolats o formant dobles i només rarament es troben tres residus bàsics junts. Això fa que no es donin regions carregades i no carregades, a diferència de les protamines que sovint presenten grups de tres a nou residus bàsics seguits ¹⁶⁸.

Tant el domini C-terminal com la regió bàsica del domini N-terminal tenen la capacitat d'unir-se al DNA. Concretament, es creu que la cua C-terminal s'uneix al DNA internucleosomal, que uneix dos nucleosomes veïns ⁹. Efectivament, aquest domini possiblement contribueix a la torsió del DNA internucleosomal en el filament de 30 nm ^{169, 170}. A més, resultats d'estudis de dicromisme circular demostren que la condensació del DNA per H1 en condicions de força iònica fisiològiques és deguda principalment al domini C-terminal ^{171, 172}.

Donada la riquesa del domini C-terminal en residus de prolina, residus disruptors de l'hèlix α que es troben de forma ben repartida per tot el domini, es proposà un model de trams curts en estructura d'hèlix α limitats per prolina. D'aquesta manera, la prolina induiria un canvi de direcció en l'hèlix, que s'aniria torçant i podria seguir la torsió del DNA, probablement al llarg del seu solc ample ¹⁷⁰.

Sembla ser que la condensació de la cromatina es dona per la neutralització de les càrregues negatives dels fosfats del DNA internucleosomal per les lisines del domini C-terminal. En estudis recents, s'ha postulat l'existència de subdominis dins del domini C-terminal que serien els responsables de l'alteració del DNA internucleosomal i l'estabilització d'estructures de

cromatina condensada. Segons aquests estudis, la majoria de funcions del domini C-terminal es localitzen en dues regions discontinues (subdominis 1 i 3) d'uns 24 aminoàcids ¹⁷³. Sembla ser més important el contingut global d'aminoàcids que la seqüència primària de la proteïna. Aquesta hipòtesi és recolzada per dades que indiquen que els diferents subtipus d'H1, malgrat les seves diferents seqüències, funcionen de manera similar en la condensació de la cromatina ¹⁷⁴. La composició aminoacídica d'aquests subdominis permetrien la formació d'hèlix curtes quan el domini C-terminal s'uneix a DNA ¹⁷⁰.

En l'H1e de rata s'ha identificat un fragment de 34 aminoàcids com la regió necessària per a la condensació de la cromatina. Aquest fragment compren els aminoàcids 145-178 i conté tres dels quatre motius SPKK presents en el domini C-terminal ¹⁷⁵ (Fig. 20).

KKAASGEAKPKAKKAGAAKAKKPAGAAKKPKKATGTATPKKSTKKTPKKAKKPAAGAKKAK
 SPKKAKATKAKKAPKSPAKARAVKPKAAKPKTSKPKAAKPKKTAAKKK

Figura 20. Seqüència del domini C-terminal de la histona H1e de rata. Ressaltat en gris el fragment de 34 aa responsable de la condensació del DNA. En vermell els motius SPKK.

Els motius SPKK estan ubicats en repeticions imperfectes d'un octapèptid que és capaç de mimetitzar les propietats condensants del domini C-terminal de la histona H1 ¹⁷⁶. Cal remarcar que dos dels tres motius SPKK del domini C-terminal de l'H1⁰ de ratolí estan situats en els dos subdominis del domini C-terminal implicats en la condensació de la cromatina detectats per Hansen i col. ¹⁷³.

El domini C-terminal, com el domini N-terminal, es troba desestructurat en dissolució aquosa i està inclòs en el grup de proteïnes intrínsecament desordenades (IDP) ¹⁷⁷⁻¹⁸⁰. En presència de TFE adquireix un important grau d'estructuració en hèlix α ^{181, 182}.

Aquesta estructuració induïda per estabilitzants d'estructura secundària va fer pensar que la interacció amb el DNA podia induir també a que el domini C-terminal adquirís estructura en hèlix α , al menys parcialment. La interacció amb el DNA produiria una neutralització de les cadenes laterals carregades positivament, evitant-se així la repulsió entre elles. En aquest sentit, en alguns estudis amb pèptids s'ha intentat determinar mitjançant dicromisme circular de diferència, si la unió al DNA induïx estructura en hèlix α . En cap cas s'ha observat una inducció clara d'aquesta estructura que fos comparable a la que produeix el TFE. En alguns casos apareix un espectre tipus Ψ , molt intens, que és degut a l'ordenació suprahelicoidal de les molècules de DNA i que impedeix totalment realitzar espectres de diferència. Aquesta capacitat de condensar el DNA, que ja s'havia observat amb l'H1 sencera i amb el domini C-terminal sencer ¹⁷¹, es manté per tant en alguns d'aquests pèptids. En els casos en que no apareix l'espectre Ψ , només s'observa una molt lleugera variació dels espectres, molt probablement deguda a canvis en l'estructura del DNA.

Es va estudiar per espectrometria d'infraroig (FTIR) la interacció d'un pèptid amb DNA. Aquest pèptid contenia la seqüència del domini C-terminal de la histona H1⁰ de ratolí (residus del 99 al 121) adjacent al domini globular. La interacció amb el DNA induïa l'estructuració del pèptid. La component majoritària és l'hèlix α , un 43 % distribuït en dos pics (1647 i 1657 cm^{-1}), seguit d'un 20 % d'hèlix 3_{10} (a 1637 cm^{-1}) i un 20 % de girs (a 1670 cm^{-1}), atribuït als motius SPKK¹⁸³.

Posteriorment, es va estudiar també per FTIR el domini C-terminal de la histona H1⁰ i de la H1t. És important l'ús del tot el domini C-terminal complet, a diferència de l'estudi anterior, per a l'estudi de propietats que no es troben localitzades en un subdomini concret sinó que estan determinades pel domini sencer. La interacció amb el DNA induïa l'estructuració del domini i a més, aquesta estructuració era dependent de la concentració de sal. A 10 mM de NaCl, el domini C-terminal de l'H1⁰ contenia un 19 % d'hèlix α , un 25 % de fulla β , un 27 % de girs, un 18 % de llaços oberts i un 7 % d'estructura desordenada. A 140 mM de NaCl, el domini s'estructurava completament, desapareixent l'estructura desordenada. Així, s'obtenia un 24 % d'hèlix α , un 25 % de fulla β , un 18 % de llaços oberts i un 33 % de girs. Malgrat només compartir un 30 % d'identitat de seqüència, el domini C-terminal de l'H1⁰ i el de l'H1t, tenen similars components estructurals secundaris. Aquest fet seria indicatiu que la pressió selectiva preserva aquesta estructura secundària d'unió a DNA en els diferents subtipus de la histona H1¹⁷⁷.

A més l'estructuració del domini C-terminal induïda pel DNA és extremadament estable. Aquesta elevada estabilitat podria ser per l'augment d'hidrofobicitat donada per la compensació de les càrregues positives de la proteïna pels grups fosfat del DNA¹⁷⁷.

En aquesta línia, experiments de FRET indiquen que el domini C-terminal en dissolució està desestructurat i amb els dos extrems ben distanciats entre ells però en unir-se a DNA, els extrems s'aproximen suggerint un plegament del domini¹⁸⁴ (Fig. 21).

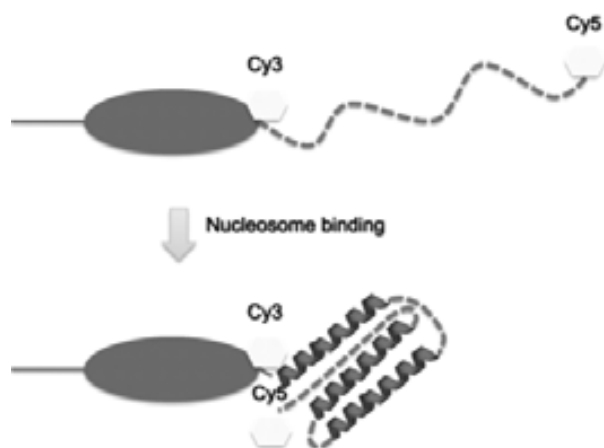


Figura 21. Model de plegament del domini C-terminal en unir-se a DNA obtingut per experiments de FRET¹⁸⁴.

1.4.3. Posicionament de la histona H1 en el nucleosoma

La hipòtesi, llargament acceptada, de que el domini globular de la histona H1 s'uneix directament damunt el DNA en l'eix binari de simetria ^{159, 185}, presenta problemes d'interpretació de les noves dades experimentals de que es disposa, fins al punt que l'opinió clàssica sobre la posició de la histona H1 en el nucleosoma ha estat seriosament qüestionada ^{186, 187}. Per exemple, cap de les noves dades estructurals suggereix una interacció forta del domini globular de la histona H1 amb el solc estret del DNA ^{161, 188}, interacció que s'hauria d'observar en cas que la hipòtesi clàssica fos correcta. Durant algun temps va existir la hipòtesi de que podria tenir lloc una interacció simètrica de la histona H1 amb el DNA que entra i surt del nucleosoma, però separada de la volta central de DNA en el centre binari de simetria (Fig. 22).

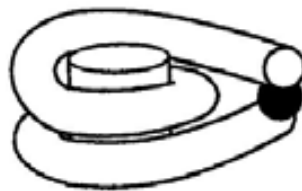


Figura 22. Hipòtesi de la histona H1 situada simètricament però separada de l'octàmer ²²

Aquesta hipòtesi simètrica alternativa, però, xoca amb resultats que indiquen una posició de la histona H1 molt propera a la superfície de l'octàmer central. En aquest sentit apunten els resultats de dispersió de neutrons de cromatosomes ¹⁸⁹ i l'observació d'entrecruament químic proteïna-proteïna entre parts del domini globular de la histona H2A i del domini globular de la histona H1 ¹⁹⁰.

Actualment existeixen tres models principals per a la unió de la H1 al nucleosoma. El model clàssic, totalment simètric (Fig. 23 B), situa el domini globular centrat en l'eix de simetria binari del nucleosoma. El model anomenat "*bridging model*" ¹⁶² postula que el domini globular de l'H1 s'uneix entre dues voltes superhelicoidals del DNA, concretament entre un extrem del DNA nucleosomal i el centre de simetria (Fig. 23 C). Segons els autors, aquest model podria explicar tant la protecció simètrica del DNA nucleosomal com l'asimètrica, si bé recorren a explicacions que impliquen reordenacions de les histones internes. El tercer model és clarament asimètric i proposa que el domini globular es situa a l'interior d'una volta del DNA, 65 pb enllà del centre de simetria ¹⁹¹ (Fig. 23 D).

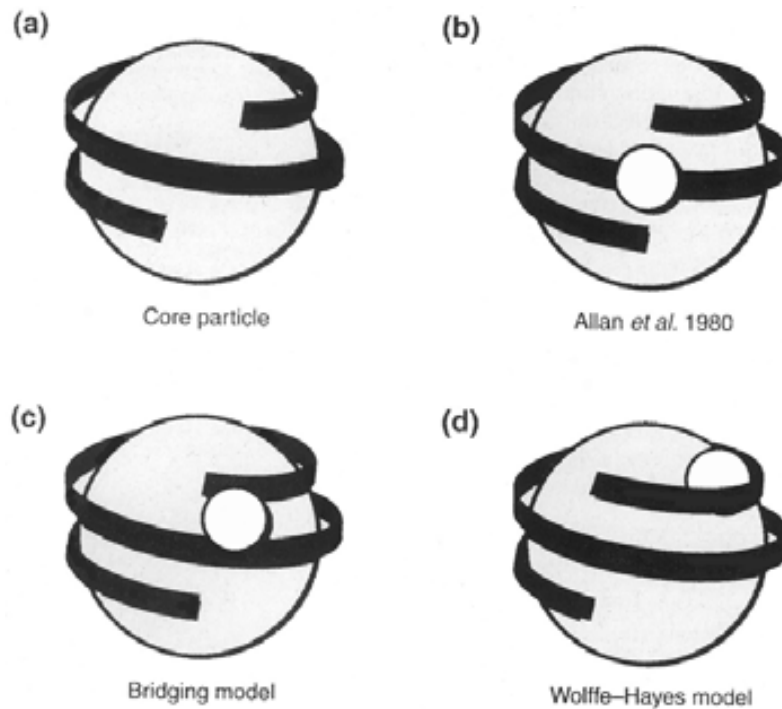


Figura 23. Les tres hipòtesis principals sobre la posició de la histona H1 en el nucleosoma ¹⁹².

Experiments d'entrecruament químic proteïna-DNA de les histones internes en nucleosomes amb i sense histones H1 revelen canvis importants en els contactes de les histones H3 i H2A amb el DNA ¹⁹³⁻¹⁹⁵. Aquest fet suggereix que l'associació de la histona H1 pot causar canvis al·lostèrics en el plegament de l'octàmer que podrien resultar en l'estabilització de les interaccions histona-DNA ^{185, 196}. Tots els models de la situació de l'H1 en el nucleosoma existents fins ara estan creats basant-se en l'estructura de la partícula nucli, que pot ser lleugerament diferent de la del nucleosoma, degut a la pròpia unió de l'H1.

1.4.4. Interacció de la histona H1 amb la cromatina i el DNA

Les histones H1 estan en constant moviment i intercanviant-se entre els llocs d'unió a la cromatina ¹⁹⁷. Brown i col. ¹⁶⁴ suggereixen que la unió de la histona H1 amb la cromatina es dóna en diferents passos. Inicialment, el domini C-terminal s'uneix dèbilment i inespecíficament al DNA internucleosomal principalment a través d'interaccions electrostàtiques. Aquesta unió facilita el correcte i específic posicionament del domini globular en l'eix binari de simetria del nucleosoma, estabilitzant-lo i induint canvis conformacionals dels dominis N- i C-terminals. Aquests reposicionaments dels dominis N- i C-terminals afecten a la repetició nucleosomal ²⁵ i estabilitzen la cromatina altament estructurada (Fig. 24).

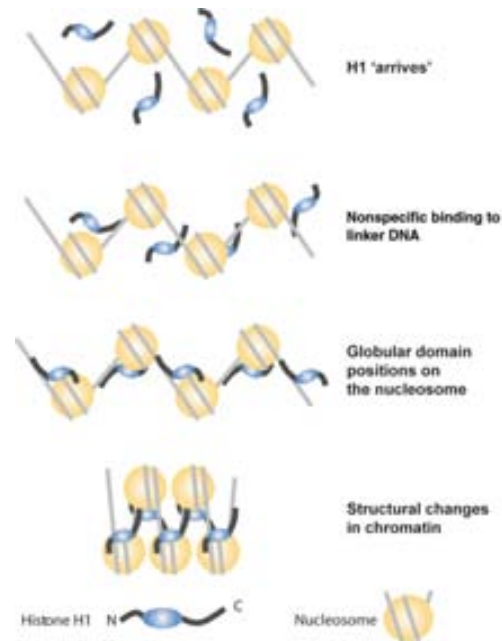


Figura 24. Unió de la histona H1 a la cromatina ¹⁹⁸.

El DNA nucleosomal ha de ser accessible a les maquinàries moleculars de replicació, transcripció, reparació o recombinació del DNA i a altres factors proteics que regulen aquests processos. Recentment, es va proposar un model integral en el que el nucleosoma és una entitat activa i dinàmica i en el que l'accessibilitat és controlada per diferents proteïnes d'unió al punt d'entrada i sortida del DNA ¹⁹⁹. Aquest model es basa en la teoria proposada per Marky i Manning ²⁰⁰ en la que es donen moviments espontanis del DNA per a permetre l'accessibilitat al DNA nucleosomal i en el model de "site exposure" de Polach i Widom ²⁰¹.

S'ha suggerit que les modificacions post-traduccionals de les histones unides al DNA tenen un paper modulador de la dinàmica del nucleosoma ²⁰².

Segons aquest nou model, el DNA nucleosomal transitòriament queda en estats més oberts per permetre l'accés de proteïnes i altres factors a llocs que normalment queden amagats dins la partícula nucli. Estan descrits dos tipus de moviments del DNA que impliquen la interrupció del contacte histones-DNA a determinada distància, la respiració i la obertura. La respiració implica un allunyament de 10-30 pb distància i sembla ser que el DNA manté una trajectòria estable. En canvi, l'obertura implicaria distàncies de fins a 70-80 pb i tindria un comportament en dos estats, completament enrotllat o completament desenrotllat, sense intermediaris estables ^{200, 203}.

Taula 2. Proteïnes d'unió a DNA en el punt d'entrada/sortida del nucleosoma per regular l'accés al DNA nucleosomal. Adaptat de Zlatanova i col. ¹⁹⁹	
Proteïna	Funció en el control de l'accessibilitat al DNA nucleosomal
Histones H1	Anomenades també <i>linker histones</i> (LH). Bloquegen l'entrada al nucleosoma i reprimeixen la transcripció.
HMG1 i HMG2	S'uneix al punt d'entrada/sortida competint directament amb les LHs. No impedeix la transcripció.
PARP-1	S'uneix al punt d'entrada/sortida competint directament amb les LHs. No impedeix la transcripció.
Histona H5	Menbre de la família de les LH específica d'eritròcits nucleats. S'uneix amb molta afinitat al punt d'entrada/sortida reprimint la transcripció.
MeCP2	Proteïna d'unió al DNA metilat. S'uneix al punt d'entrada/sortida possiblement competint directament amb les LHs. Bloqueja l'accés irreversiblement i reprimeix la transcripció.
HP1	Es desconeix la localització exacta d'unió al DNA. Interactua específicament amb les histones H3, H4 i H1. Involucrada en el silenciament d'heterocromatina.
MENT	Interactua amb H3K9me
Abreviacions: HMG, Grup de proteïnes d'alta mobilitat; PARP-1, Poli(ADP-ribosa) polimerasa 1; MeCP2, proteïna d'unió a CpG metilat; HP1, Proteïna d'unió a heterocromatina 1; MENT, Proteïna de terminació específica d'etapa mieloide i eritroide nuclear	

L'accessibilitat als llocs d'unió amagats en el DNA nucleosomal és el factor més important en el control de totes les transaccions del DNA en les cèl·lules eucariotes. Els canvis estocàstics d'aquesta accessibilitat són regulats en un primer nivell per proteïnes que s'uneixen al DNA en el punt d'entrada i sortida del nucleosoma amb diferents afinitats i amb diferents dinàmiques (Taula 2). Algunes d'aquestes proteïnes tanquen l'accés al nucleosoma i l'immobilitzen, no s'hi podrà unir cap altra proteïna. Altres proteïnes poden immobilitzar el DNA linker per un dels costats del nucleosoma, deixant la "porta" entreoberta i permetent que altres proteïnes s'uneixin al DNA linker lliure. I un últim grup de proteïnes amb molt elevada afinitat pel DNA que tanquen l'accés establement i impedeixen la unió d'altres proteïnes al DNA nucleosomal (Fig. 25).

Un segon nivell de regulació és el control de l'intercanvi entre aquestes proteïnes d'unió, el qual pot ser executat per xaperones o per complexos de remodelatge, els quals a la vegada són regulats per interaccions específiques amb altres proteïnes o per modificacions post-traduccionals ¹⁹⁹.

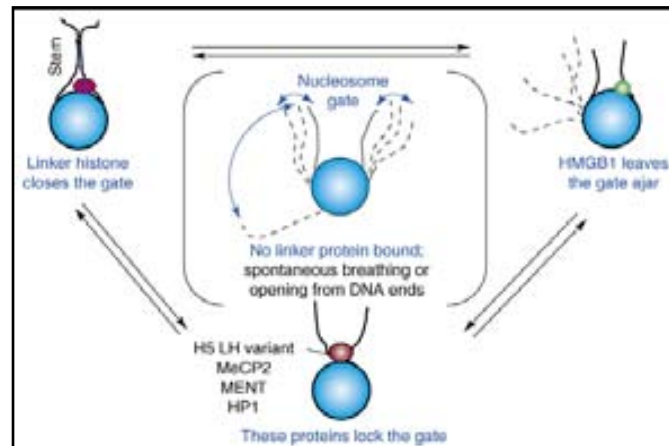


Figura 25. El nucleosoma situat al centre és una estructura dinàmica en el qual els extrems del DNA nucleosomal es separen transitòriament de l'octàmer d'histones. Diverses proteïnes s'uneixen al DNA en l'entrada/sortida del nucleosoma amb diferent afinitat i en diferent manera, variant l'accessibilitat al DNA nucleosomal. El nucleosoma és representat amb una esfera blava; el DNA linker en línies negres, contínues per a la trajectòria més probable i discontinues per als moviments espontanis del DNA en separar-se de l'octàmer d'histones ¹⁹⁹.

Les diferències entre els subtipus de la histona H1 s'observen en la localització nuclear i l'afinitat pel DNA i la cromatina. Experiments d'immunolocalització amb fibroblasts humans, on pràcticament no hi ha expressió d'H1a i H1⁰, van mostrar que els subtipus H1e i H1d són més abundants en l'heterocromatina i que l'H1b predomina en els gens actius. S'ha proposat que l'H1c proporcionaria el nivell basal de condensació de la cromatina que permet el posterior intercanvi amb els altres subtipus ¹²⁶.

Estudis realitzats en el nostre grup van permetre classificar els diferents subtipus en tres grups d'afinitats: afinitat alta, H1d, H1e i H1⁰; afinitat intermèdia, H1b i H1c; i afinitat baixa, H1a. L'afinitat menor i la major difereixen en un factor de 19. Aquests mateixos grups d'afinitat es van confirmar en experiments realitzats en DNA nu, on les afinitats tot i no ser idèntiques dins el mateix grup, es mantenen els mateixos grups d'afinitat ²⁰⁴.

De les proteïnes que s'uneixen al DNA, n'hi ha que tenen una especificitat de seqüència com factors de transcripció, repressors i enzims de restricció. El reconeixement es dona per motius proteics del tipus hèlix-gir-hèlix, cremallera de leucines o dits de zinc que contacten amb el DNA majoritàriament pel solc major ²⁰⁵.

Altres proteïnes i algunes drogues tenen una baixa o nul·la especificitat de seqüència i s'uneixen al DNA generalment pel solc menor. És el cas de les histones, la DNasa I, les proteïnes HU i moltes altres ²⁰⁵. Els motius estructurals que intervenen en aquestes unions són molt variats, per exemple, hèlix α ²⁰⁶, fulla β antiparal·lela ²⁰⁷ i el motiu SPKK ²⁰⁷.

Tot i la baixa especificitat de seqüència, algunes d'aquestes proteïnes mostren preferència per alguns tipus de seqüència. Per exemple, l'H1 mostra preferència pel DNA metilat, estructures cruciformes i seqüències riques en A/T ²⁰⁸. Entre aquestes últimes trobem les seqüències SAR (Scaffold Associated Regions), de gran importància biològica ¹²¹.

Com s'ha dit, la histona H1 mostra preferència pel DNA metilat, i aquesta augmenta a major grau de metilació^{209, 210}. La metilació és la modificació més abundant en el DNA. Més del 60% dels motius CpG estan metilats. La metilació d'aquests motius s'associa a repressió transcripcional²¹¹. Tot i així, és important mencionar que la preferència de l'H1 pel DNA metilat és objecte de controvèrsia ja que hi ha estudis que contradiuen aquestes observacions²¹¹⁻²¹³.

Estudis amb cromatina reconstituïda han demostrat que la cadena de nucleosomes pot ser compactada simplement variant la concentració de cations mono- i divalents presents en la solució²¹⁴⁻²¹⁷. En les condicions apropiades és possible condensar la cromatina fins un nivell aproximat al que s'observa *in vivo*²¹⁸. Aquests resultats indiquen que el grau d'apantallament de les càrregues negatives al llarg de la cadena fosfodièster del DNA és un factor limitant en la condensació de la cromatina. Tanmateix, la condensació de la cromatina *in vivo* implica més aspectes que una simple neutralització de càrregues. La condensació de la cromatina induïda per concentració salina és facilitada per la presència d'histones H1²¹⁷⁻²²¹.

Amb concentracions creixents de sal, el nucleosoma o el complex H1/DNA canvien i es tornen més compactes²²²⁻²²⁵. A altes concentracions de sal el DNA superenrotllat és molt compacte, corbat i rígid, mentre que a baixes concentracions, és molt més obert, lax i dinàmic²²⁶. A elevades concentracions de sal les càrregues negatives del DNA queden neutralitzades pels cations, permetent així, contactes més propers entre diferents segments del DNA o entre nucleosomes. En canvi, a baixes concentracions de sal no es donen aquestes aproximacions a causa de la repulsió de les càrregues. El diàmetre de la doble hèlix decreix aproximadament dues vegades amb concentracions creixents de Na⁺ de 10 a 60 mM o de Mg⁺² de 0'5 a 5 mM²²⁷.

La histona H1 neutralitza part de les càrregues dels fosfats del DNA facilitant l'aproximació entre les cadenes del DNA. Però tot i així, la histona H1 té unes 55 càrregues positives a pH neutre i no pot per ella mateixa compensar la càrrega del DNA a baixes concentracions de sal. De fet, els efectes de la sal i de la histona H1 podrien ser additius. Així mateix també s'ha observat que altes concentracions de sal poden desplaçar a la histona H1 del nucleosoma o del DNA superenrotllat²²⁷.

Es formen dos tipus de complexos: a baixa força iònica i a baixa relació H1/DNA, les molècules d'H1 es distribueixen al llarg de tot el DNA o del nucleosoma formant complexos solubles. A alta força iònica i a alta relació H1/DNA, es formen complexos insolubles²²⁷.

Tot i que fins ara tots els estudis han afirmat que la unió de la histona H1 al DNA és cooperativa en presència de sals (a partir d'una concentració de 20-50 mM)^{121, 222, 228, 229}, un recent estudi conclou que no existeixen interaccions favorables proteïna-proteïna en la unió al DNA. Aquesta aparent cooperativitat en la interacció de l'H1 amb el DNA s'explica amb un model al·lostèric en el qual l'elevada afinitat de la proteïna per una conformació determinada del DNA (forma 1) conduiria a una transició al·lostèrica cap una altra conformació del DNA (forma 2) amb encara més afinitat²³⁰.

1.4.4.1. Preferència per les regions SAR

Les histones H1 s'uneixen al DNA de forma inespecífica, tot i que, *in vitro* s'han trobat preferències per les seqüències riques en A/T com les seqüències SAR ¹²¹. Aquesta unió és altament cooperativa i depenent de NaCl ²³¹.

Les seqüències SAR tenen varis centenars de parell de bases i són molt riques en A/T (>70%) organitzades en trams homopolimèrics poli(dA)-poli(dT) (A-tracks) ²³². S'uneixen específicament a les proteïnes que formen la bastida o *scaffold* nuclear i estan implicades en la delimitació estructural dels llaços de cromatina. Aquests llaços contenen de 50 a 100 Kb de DNA i poden ser considerats com a subunitats estructurals i dinàmiques dels cromosomes. Es considera que les regions SAR poden ser elements en *cis* implicats en la dinàmica dels cromosomes, tan en la determinació de la forma estructural com en el manteniment d'aquesta ^{233, 234} (Fig. 26).

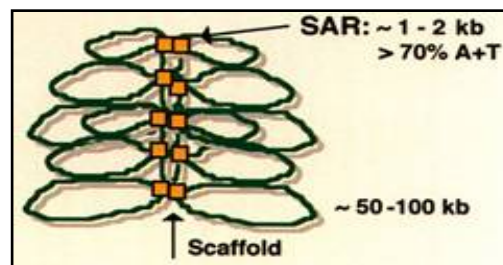


Figura 26. Representació de les regions SAR en els cromosomes metafàsics.

L'organització estructural dels cromosomes és altament ordenada i es manté per la unió a l'*scaffold*. Aquesta organització permet els moviments dinàmics de la cromatina durant processos com la recombinació i la condensació dels cromosomes. Elements en *cis* permeten l'ancoratge de la cromatina a l'*scaffold* i actuen com a punts de senyalització a partir dels quals s'estenen els estats de cromatina oberta, tancada o heterocromatina.

Les seqüències SAR no es troben localitzades a l'atzar sinó que estan separades per distàncies variables permetent la formació de llaços més curts en les bandes Q dels cromosomes i llaços més llargs en les bandes R, que contenen la majoria de gens constitutius (*housekeeping genes*) ²³⁵. La longitud relativa dels llaços es coherent amb el fet que les bandes Q tenen una major proporció de DNA SAR que les bandes R ²³⁶ (Fig.27).

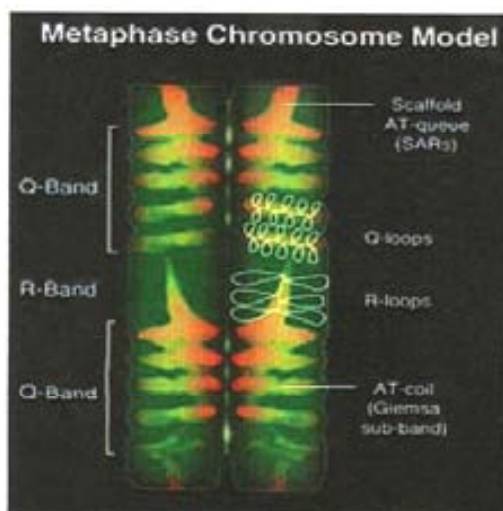


Figura 27. Model del cromosoma metafàsic ²³³.

Per aquest tipus de seqüències hi ha nombroses proteïnes que mostren preferència, entre elles, la topoisomerasa II, la qual competiria amb l'H1 per la unió ²³⁵. La distamicina A és un antibiòtic amb elevada selectivitat pels *A-tracks* de DNA que s'uneix al solc menor. En presència de distamicina, les proteïnes que s'uneixen al DNA en el solc menor, com la histona H1, perden la preferència per les seqüències SAR ^{157, 237}. Els possibles motius de la preferència pel solc menor del DNA és l'afavoriment de millors forces de van der Waals entre les parets del solc menor i els lligands i la major densitat local de càrrega negativa que s'origina ^{237, 238}.

1.4.4.2. Motius SPKK

El motiu SPKK va ser descobert en la seqüència de les histones de l'eriqó de mar (*Strongylocentrotus nodus*) determinades per von Holt ²³⁹, qui postulà que aquestes seqüències presentaven repeticions d'un pentapèptid començat en prolina. Posteriorment, Suzuki senyalà que en realitat el motiu repetitiu era S/TPKK i que s'estructurava en forma de gir β ²⁴⁰.

El gir format pel motiu SPKK està estabilitzat per ponts d'hidrogen entre el grup OH del residu *i*, que pot ser treonina, serina, àcid aspàrtic o asparagina, i el residu *i+2*. Aquest enllaç produeix un gir conegut com a gir σ . L'altre pont d'hidrogen uneix el grup carbonil del residu *i* amb el grup NH del residu *i+3*, produint un gir β . S'ha observat la formació de girs en seqüències del tipus SPXK, on X és un residu hidrofílic o alanina. Aquesta estructura del motiu SPKK ha estat observada per Suzuki i col. en estudis de RMN en pèptids en 90% de DMSO i també en el nostre grup, on s'ha trobat aquesta estructura en un pèptid derivat del domini C-terminal de la histona H1 en 90% de TFE ²⁴¹ (Fig.28).

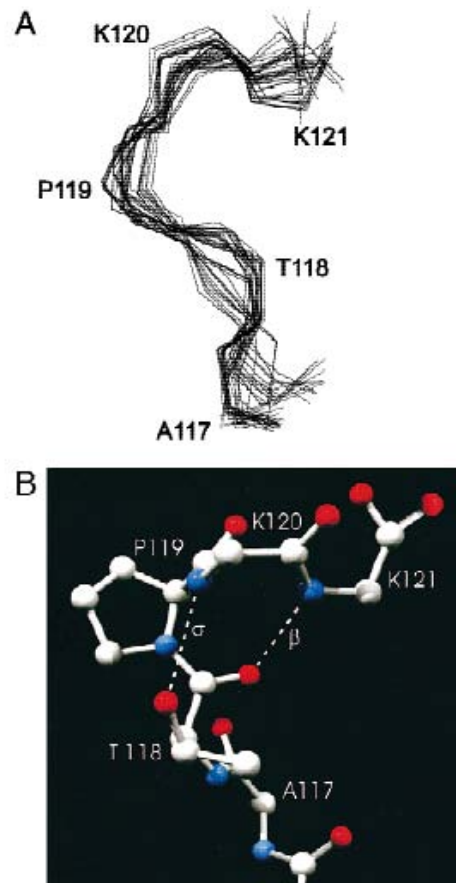


Figura 28. Gir adoptat pel motiu SPKK en el domini C-terminal de la histona H1. Les línies discontinues indiquen possibles ponts d'hidrogen, del tipus β i del tipus σ ²⁴¹.

La interacció d'aquest motiu amb el DNA es dona en el solc menor, substituint la doble capa de molècules d'aigua que estableixen el DNA-B coneguda com a espina d'hidratació¹⁷⁶. Aquesta hipòtesi es recolza en la protecció que ofereix el motiu SPKK en la metilació de les adenines que es dona en el N3 situat en el solc menor i la protecció contra el footprinting pel radical hidroxil de les seqüències riques en AT, suggerint un model de interacció similar al Hoecht²⁰⁸. Aquest tipus de interacció també s'ha vist per a drogues d'unió al DNA i la netropepsina, molècules que posseeixen grups amida que s'uneixen al DNA per ponts d'hidrogen desplaçant a l'aigua. L'hidrogen unit al nitrogen de la serina del motiu SPKK no està implicat en la formació del gir β/σ , possibilitant així la formació d'aquests ponts d'hidrogen²⁰⁷.

Segons aquest model hi hauria una unitat de SPKK per a cada parell de bases amb dues càrregues positives per compensar les càrregues negatives del fosfat.

Els motius SPKK mostren una preferència d'unió a DNA amb seqüències riques en A/T. L'estructura d'un DNA ric en A/T és diferent d'una seqüència de DNA aleatòria, té el solc menor més estret^{237, 238, 242}. Aquesta menor amplada fa que també variïn altres característiques del solc menor com la distribució de càrregues, la forma i la profunditat i la posició dels donadors i

acceptors dels ponts d'hidrogen ^{237, 238}. Per tant, aquests motius reconeixen una conformació estructural característica del DNA i no una determinada seqüència ²⁰⁸.

A més, els motius SPKK tenen el potencial de neutralitzar les càrregues negatives de l'interior de la superhèlix de DNA i així estabilitzar la curvatura superhelicoidal.

La fosforilació dels motius SPKK disminueix l'habilitat per neutralitzar les càrregues negatives del DNA i per tant, en disminueix la força d'unió ²⁴³. Aquest fet representa un avantatge en la regulació de la unió a DNA ²⁰⁷.

1.4.5. Modificacions post-traduccionals de la histona H1

A nivell post-traduccional, l'H1 és modificada principalment per fosforilació reversible, però també per acetilació, metilació, deiminació, ubiquitinació, ADP-ribosilació, i formilació. La fosforilació és considerada una modificació de vital importància en l'H1 ja que es dona en múltiples llocs en la molècula i està associada al cicle cel·lular.

1.4.5.1. Fosforilació

La fosforilació de proteïnes és un procés de regulació importantíssim en les cèl·lules eucariotes. La fosforilació modula l'activitat de nombroses proteïnes involucrades en la transducció de senyals, regula l'afinitat d'unió de factors de transcripció als seus coactivadors i al DNA, alterant l'expressió gènica, el creixement cel·lular i la diferenciació ²⁴⁴. S'estima que, com a mínim, un terç de les proteïnes són fosforilades de forma reversible ²⁴⁵.

El control del cicle cel·lular per fosforilació es produeix per proteïnes quinases dependents de ciclines (CDKs), les quals es componen per una subunitat catalítica i una altra reguladora (Taula 3). La seva activitat es regula mitjançant modificacions post-traduccionals i per associació a inhibidors ²⁴⁶.

Etapa del cicle	CDK	Ciclina	Inhibidors
G1	CDK4/6	D	p21, p27, p15*, p16*
G1/S	CDK2	E	p21, p27
S	CDK2	A	p21
G2/M	cdc2	A	p21
M	cdc2	A, B	

* Els inhibidors p15 i p16 s'uneixen a la CDK4/6 impeding la unió de la ciclina D

La fosforilació de la histona H1 és dependent del cicle cel·lular. Els nivells de fosforilació d'H1 són baixos en G1 i augmenten durant la fase S i la mitosi. És màxima en cèl·lules que es divideixen ràpidament i decreix en cèl·lules que no proliferen. Els diferents subtipus d'H1 de mamífer difereixen en el seu nivell de fosforilació al llarg del cicle cel·lular ²⁴⁸.

S'ha proposat l'existència d'una relació causal directa entre la hiperfosforilació d'H1 i la condensació cromosòmica, però encara no està clara ja que la condensació de la cromatina es pot donar sense la fosforilació de l'H1 o fins i tot, sense l'H1 ²⁴⁹⁻²⁵¹. Podria ser que la hiperfosforilació d'H1 disminuís l'associació entre l'H1 i la cromatina permetent a altres factors inductors de la condensació unir-se a la cromatina. Estudis realitzats indiquen que l'H1 hiperfosforilada s'uneix amb menys força que l'H1 hipofosforilada ^{252, 253}.

Els graus de fosforilació intermedis durant la interfase afavoriria la descondensació necessària de la cromatina per a la replicació i la transcripció del DNA ¹¹⁷.

Una altra possibilitat podria ser que no es necessités *per se* la hiperfosforilació de l'H1 sinó que fos necessària per mantenir l'estructura específica de la cromatina i així promoure l'expressió de gens en la interfase següent ²²⁴.

Durant la mitosi, la hiperfosforilació de l'H1 permetria la unió de factors específics de condensació de cromatina ²⁵⁴. Així, es correlacionaria l'augment dels nivells de fosforilació amb l'augment de la condensació a partir de la fase G2 fins a arribar al seu màxim grau d'empaquetament, els cromosomes metafàsics.

L'estat global de fosforilació de l'H1 és el resultat del balanç entre les activitats de la quinasa CDK2/cdc2 i la proteïna fosfatasa 1 ²⁵⁵.

La fosforilació de l'H1 es produeix en els dominis bàsics N- i C- terminals, particularment en seqüències conservades del tipus (S/T)-P-X-Z (on X és qualsevol aminoàcid i Z és un aminoàcid bàsic). Els residus serina i treonina són els acceptors dels grups fosfat. Aquesta seqüència inclou els motius SPKK, seqüències consens de fosforilació per les quinases de la família cdc ²⁵⁶. També es van trobar altres setis de fosforilació que no tenen aquesta seqüència consens ¹⁴⁴ i que serien fosforilats per altres proteïnes quinases com la quinasa A. La histona H1 és substrat tant de la CDK2 com de la cdc2. Estudis *in vitro* han mostrat que ambdues proteïnes són capaces de fosforilar tots els motius del tipus S/T)-P-X-Z, fet que indica que les variacions del nivell de fosforilació durant el cicle cel·lular no es deu a la especificitat de la quinasa ²⁵⁷.

La histona H1e pot ser fosforilada en la serina 27 (S27) en el domini N-terminal. S'ha vist que l'H1e és l'únic subtipus d'histona H1 que és diana de la quinasa Aurora B, la qual fosforila exclusivament a la S27. Els autors de l'estudi suggereixen que aquesta fosforilació tindria un paper en la regulació de la mobilitat de l'H1e i en la unió d'aquesta a la cromatina durant la mitosi. A més, també s'ha observat que la fosforilació de S27 pot ser regulada a través de la dimetilació de la lisina 26 ²⁵⁸.

Es dona el fet de que els nivells màxims de fosforilació de cada subtipus solen coincidir amb el nombre de motius SPKK que presenten. Per alguns subtipus cal diferenciar entre la interfase, on només són fosforilats els residus de serina, i la mitosi, en la que la fosforilació es produeix

en les treonines. En funció del subtipus, la fosforilació serà únicament en el domini C-terminal, o addicionalment també, en el domini N-terminal. Un estudi sobre l'H1b va mostrar que la primera fosforilació casi sempre era en S17 en el domini N-terminal, seguida de S172 i per últim, S188. En la mitosi arriba a pentafofosforilar-se. La fosforilació es donava en T10 (lloc de seqüència no consens) i en una de les posicions restants, en T137 o T154 ²⁵⁹.

En la histona H1 també trobem fosforilació dependent de cAMP ²³ en llocs propers al domini globular o en l'inici d'aquest. S'ha trobat en el fetge en regeneració, però és absent en la interfase i en cèl·lules bloquejades en mitosi ²⁵⁷.

La fosforilació es dona freqüentment en regions de proteïna intrínsecament desordenades. Les proteïnes intrínsecament desordenades sovint estan implicades en processos biològics vitals com el control del cicle cel·lular, transcripció, traducció, transport, transducció de senyals, etc ²⁶⁰. També sovint estan implicades en el reconeixement molecular i modificacions post-traduccionals de proteïnes com la fosforilació ²⁶¹. Poques regions desordenades han estat caracteritzades però d'aquestes, un percentatge significatiu contenen llocs de fosforilació ²⁶¹. Les regions desordenades tenen una freqüència de llocs de fosforilació molt més elevada que altres regions, indicant una clara preferència dels llocs de fosforilació per localitzar-se en regions desordenades ²⁴⁵. Les quinases requereixen de la formació de ponts d'hidrogen per associar-se amb els seus substrats. Aquestes unions no es podrien realitzar si els llocs de fosforilació es localitzessin en regions ordenades ²⁶². Aquestes dades suggereixen que els substrats de les quinases han de ser desordenats.

1.4.5.2. Acetilació

En la histona H1 s'hi donen dos tipus diferents d'acetilació: l'acetilació del residu N-terminal i l'acetilació del grup ϵ -amino de les lisines.

La majoria de proteïnes eucariotes perden la metionina N-terminal i l'aminoàcid que queda en el seu lloc al principi de la cadena és acetilat. Aquesta modificació es dona cotraduccionament i no té una seqüència específica però el 95% dels residus acetilats són: serina, alanina, metionina, glicina i treonina. Estudis en línies cel·lulars i teixits van trobar també una petita proporció del domini N-terminal processat però sense acetilar ^{144, 263}.

L'acetilació del grup ϵ -amino de les lisines es dona majoritàriament en el domini globular, en residus considerats implicats directament en la unió al DNA com són K52, K64, K85 i K97 ²⁶⁴. La presència de residus acetilats pot interferir en la unió al DNA, conferint a alguns subtipus propietats específiques en la cromatina.

1.4.5.3. Metilació

La lisina i l'arginina poden metilar-se en les seves cadenes laterals. En estudis recents s'han descrit múltiples llocs de metilació, alguns acoblats a acetilació i altres a metilació de residus adjacents ¹⁴⁴.

Una de les metilacions que s'han trobat en l'H1e de cèl·lules HeLa és la lisina 25, adjacent a la serina 26 fosforilada. Aquestes modificacions formen un "methyl-phos switch" en el qual, mentre està metilada la lisina, aquesta està unida a la proteïna HP1 però en fosforilar-se la serina 26, es bloqueja aquesta unió ²⁶³.

També s'ha trobat metilada la lisina 26 de la histona H1b en fibroblasts de ratolí. La metilació és requerida per a la interacció d'aquest subtipus amb les variants de la HP1 β i 1 γ . Com en el cas de la interacció amb la HP1 α , la fosforilació de la H1 actua com a senyal d'interrupció de la interacció ²⁶⁵.

1.4.5.4. Deimidació

La deimidació és la incorporació d'una càrrega negativa a la seqüència d'aminoàcids. Succeeix en els residus asparagina i glutamina donant com a resultat la formació àcid aspàrtic i àcid glutàmic, respectivament. Generalment, és un procés no enzimàtic ^{266, 267}.

Alguns estudis suggereixen que la deimidació augmenta amb l'edat en proteïnes amb poca o nul·la taxa de recanvi durant el cicle cel·lular, com per exemple succeeix en la histona H1⁰ on la deimidació es dona en l'asparagina en la posició 3 ²⁶⁸.

1.4.5.5. Ubiquïtinació

Actualment s'han identificat dues lisines ubiquïtinades en la histona H1, la K46 en l'H1c, d, e i la K116 en l'H1a ¹⁴⁴. En les histones del core, aquesta modificació s'associa amb l'augment de l'expressió ²⁶⁸, però en les H1 encara estan per determinar-ne els efectes.

1.4.5.6. ADP-ribosilació

La ADP-ribosilació de l'H1 pot involucrar la unió covalent de la ADP-ribosa, amb 8-10 ADP-riboses per H1 o la unió no covalent de polímers ramificats d'ADP-ribosa amb fins a 100-200 unitats per H1. La unió no covalent d'ADP-ribosa és resistent a l'acció d'àcids forts, detergents, agents cautròpics i condicions d'elevada força iònica ²⁶⁹. La presència d'aquests polímers en l'H1 canvia la seva càrrega, afectant a la interacció H1-DNA i H1-H1. *In vitro* aquesta modificació implica una relaxació significativa de la cromatina però no desplaça l'H1 del DNA

^{270, 271}. *In vivo*, podria regular la protecció del patró de metilació del DNA, ja que s'ha trobat que és necessària pel manteniment de l'estat no metilat de les illes CpG del promotor del gen Htf9 de fibroblasts ^{272, 273}.

1.4.5.7. Formilació

Aquesta modificació s'ha trobat en alguns residus de lisina i només en teixit de ratolí, però no en línies cel·lulars ¹⁴⁴. La seva funció potencial és desconeguda. La formilació pot ser catalitzada a partir del formiltetrat o a partir del formaldehid alliberat en la dimetilació de la lisina mitjançant un enzim específic o la LSD1 dimetilasa en la reacció inversa ²⁷⁴.

1.5. La histona H1 en el nucli cel·lular

Les histones H1 tenen gran varietat de funcions en la cèl·lula: la formació de la superestructura de cromatina ^{5, 14}, l'estabilització de fins a dues voltes de DNA nucleosomal al voltant de l'octàmer d'histones internes per la interacció amb el DNA en l'entrada i la sortida del nucleosoma ²⁷⁵, la regulació transcripcional i la participació en altres processos cel·lulars. Tot i així, no se sap la seva posició exacta en el cromatosoma ni el seu paper en la regulació transcripcional.

Els mecanismes exactes pels quals les histones H1 realitzen l'alt grau d'empaquetament de la cromatina i el paper de cada subtipus en el procés, també són encara força desconeguts. Les diferències funcionals de cada subtipus d'H1 es deuen a diferències en la taxa de renovació, on i quan són sintetitzats i fosforilats, i la seva habilitat per condensar el DNA ^{256, 276, 277}.

Inicialment es pensava que les histones H1 eren repressors generals de la transcripció ²⁷⁸. Estudis *in vitro* senyalaven que l'H1 era un repressor transcripcional i que alguns factors de transcripció actuaven com a antirepressors. Altres estudis han descrit una acció més específica de l'H1 sobre determinats gens que pot implicar tant la repressió com l'activació de la transcripció, suggerint un paper molt més complex de la histona H1.

La modificació de l'estructura d'ordre superior de la cromatina causada per la unió preferencial de la histona H1 a regions SAR i la seva participació en el posicionament dels nucleosomes, podrien intervenir en la regulació de la transcripció ¹²¹. Aquesta regulació també podria ser per la modificació de l'accessibilitat dels factors de transcripció a seqüències promotores o seqüències potenciadores.

L'estructura de la cromatina i la seva activitat transcripcional estan estretament relacionades. La compactació del DNA en la fibra de cromatina representa una barrera per a la maquinària transcripcional. En molts promotors o *enhancers*, els llocs d'unió estan ocults en l'estructura nucleosomal. Tot i així, alguns factors són capaços d'unir-se al DNA enrotllat en els nucleosomes ²⁷⁹. És possible que el nucleosoma s'elimini per permetre l'inici de la transcripció,

però en la majoria dels casos aquest roman al seu lloc, tot i que alterat, permetent l'accés als factors de transcripció.

Un dels mecanismes per permetre l'accés de la maquinària de transcripció consisteix en el desenrotllament parcial del DNA al voltant del *core* nucleosomal. Aquest fenomen es dona espontàniament en la cromatina sense H1 ¹⁹.

La replicació també està regulada per les histones H1. Les histones H1 somàtiques poden inhibir l'iniciació de la replicació limitant l'acoblament dels complexos de pre-replicació en la cromatina espermàtica. En experiments de reconstitució de cromatina es va mostrar com la reconstitució de cromatina d'esperma de *Xenopus* amb un subtipus somàtic produïa la inhibició de la replicació, però en reconstituir-la amb el seu subtipus específic, la H1t, no es produïa una inhibició significativa ²⁸⁰. Les diferències d'inhibició es deuen a l'afinitat d'unió a la cromatina i a més, aquesta diferència d'afinitat és responsabilitat del domini C-terminal. La diferència entre la càrrega neta del domini C-terminal provoca diferent neutralització de la càrrega del DNA i per tant, diferent afinitat d'unió. Sembla ser que les H1 somàtiques tenen una afinitat més elevada pel DNA ²⁸¹.

Les modificacions de les histones internes i de la pròpia H1 estan activament implicades en la modificació de la afinitat de la H1 per la cromatina i la regulació de la transcripció ¹¹⁸.

Concordant amb aquestes premisses, els subtipus amb menor afinitat d'unió al DNA induïrien una conformació de cromatina més oberta i més accessible, on els factors de replicació en *trans* tindrien un accés més fàcil als orígens de replicació ²⁸¹.

La metilació del DNA està implicada en el silenciament transcripcional, en part, per inducció de la compactació de la cromatina. S'ha demostrat que aquesta compactació només es dona en presència de histones H1 ²⁸².

La reducció d'histones H1 causa importants canvis en l'estructura de la cromatina com la disminució de l'espaiament entre nucleosomes, la reducció de la compactació local de la cromatina i la disminució de certes modificacions en les histones internes. Tot i així, només un petit nombre de gens veuen afectada la seva expressió. Molts d'aquests gens són imprimtats o es localitzen al cromosoma X, i per tant, normalment estan regulats per metilació del DNA. Tot i que la metilació global no canvia, la metilació específica d'illes CpG de regions reguladores en gens regulats per la histona H1 es veu reduïda. Aquests fets indicarien que les histones H1 poden participar en la regulació epigenètica de l'expressió de gens contribuint al manteniment o establiment de patrons de metilació específics del DNA ²⁸³.

En mamífers s'ha observat que la histona H1 i la proteïna d'heterocromatina 1 α (HP1 α) interaccionen tan *in vitro* com *in vivo*. La HP1 α s'associa majoritàriament a heterocromatina centromèrica i sembla ser que el seu paper seria controlar la formació i propagació de l'heterocromatina mitjançant la interacció amb la histona H3 metilada en K9 ²⁸⁴. La histona H1 no fosforilada (que pot unir-se a HP1 α) unida a cromatina impedeix la progressió de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular. La fosforilació específica de la histona H1 per la quinasa CDK2 durant la fase G1 tardana/S pot trencar la interacció de la HP1 α amb la H1 produint la relaxació de la fibra de cromatina necessària per dur a terme la replicació ²⁸⁵. A més, també s'ha

demostrat que la interacció HP1 α amb el domini C-terminal de l'H1 depèn de les càrregues i que la interrupció de la interacció no depèn de la fosforilació en un lloc en concret però si presenta un efecte acumulatiu pel nombre de llocs fosforilats. Així doncs, la fosforilació de l'H1 disminueix l'afinitat de la HP1 α per la cromatina i podria actuar com un senyal primari per a la descondensació de la fibra de cromatina altament estructurada (l'heterocromatina) durant la interfase ²⁸⁶.

1.6. Altres efectes de la fosforilació de la histona H1

La fosforilació de la histona H1 també s'ha relacionat amb alguns processos com la remodelació de la cromatina dependent d'ATP ²⁵¹, la reparació ²⁸⁷, la diferenciació cel·lular ²⁸⁸ i l'apoptosi ²⁸⁹.

La histona H1 fosforilada afecta a l'activitat dels complexos de remodelació de la cromatina dependent d'ATP. Aquests complexos són de vital importància en la regulació de la transcripció, el desenvolupament, la reparació del DNA i la regulació del cicle cel·lular.

La fosforilació de la histona H1 per la cdc2/ciclina B restaura l'activitat dels complexos de remodelació, suggerint un control global de la histona H1 sobre la remodelació de la cromatina i la necessitat de l'acoblament entre l'activitat de les quinases de l'H1 i els enzims de remodelatge dependents d'ATP ²⁵¹.

L'H1 fosforilada participa en la lligació d'extrems de doble cadena no homòlegs. Aquest tipus de lligació *in vivo* requereix la presència de la proteïna quinasa dependent d'ATP (DNA-PK) i la DNA lligasa (LX). *In vitro*, l'activitat de la LX es veu reduïda substancialment per l'addició de la H1. Quan s'afegeix la DNA-PK, que catalitza la fosforilació de l'H1, l'activitat de LX es recupera. Aquest fet fa pensar que *in vivo* la DNA-PK fosforilaria l'H1 al voltant del lloc de tall en el DNA, provocant la sortida de l'H1 i permetent a la LX lligar els extrems de doble cadena ²⁸⁷.

La diferenciació terminal de la majoria dels tipus cel·lulars està associada a canvis estructurals en la conformació de la cromatina. La fosforilació redueix l'afinitat de l'H1 per la cromatina, però no la seva alliberació immediata. Per tant, l'efecte de la fosforilació podria estar relacionat amb canvis estructurals globals en la cromatina mentre l'H1 es manté unida a ella ²⁸⁸.

S'ha observat que durant les fases S i M del cicle cel·lular, la histona H1 fosforilada és translocada al citoplasma ²⁹⁰. En malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer i el Parkinson s'ha trobat una activació de la CDK5, una quinasa dependent de ciclina semblant a la cdc2. Aquesta proteïna és capaç de fosforilar en el cervell ²⁹¹. L'augment de la fosforilació de l'H1 per part de la CDK5 podria explicar l'augment de l'H1 citoplasmàtica en neurones i astròcits en afectats per Alzheimer i Parkinson ²⁹².

La histona H1 citoplasmàtica interacciona preferentment amb les proteïnes $\alpha\beta$ -amiloide i amb la α -synucleïna en forma amiloide, principals causants de l'Alzheimer i el Parkinson, respectivament. L'H1 s'ha trobat associada *in vivo* en les plaques amiloides i les fibres amiloides intracel·lulars. La fosforilació anormal de l'H1 i el canvi de patró de localització

intracel·lular podria explicar l'entrada en cicle de les neurones en malalts d'Alzheimer i Parkinson i de l'activació de la apoptosi. La inhibició de la interacció entre l'H1 i les proteïnes amiloides podria constituir una diana terapèutica en el tractament d'aquestes malalties ²⁹².

1.7. Les histones en la senyalització cel·lular i el sistema immunitari innat

Les histones no es troben únicament en el nucli cel·lular, també són presents en el citoplasma i en la membrana cel·lular (Fig.29).

Ja en 1990, Zlatanova i col. ²⁹³ havia identificat per mitjà de tècniques d'immunofluorescència, histona H1 citoplasmàtica en fetge de ratolí. Posteriorment, estudis d'apoptosi van confirmar que la histona H1 estava present en el citoplasma i que tenia un paper actiu en la senyalització intracel·lular ²⁹⁴.

Es va identificar la histona H1c transportada del nucli cap al citoplasma com un component necessari per l'alliberació Bak-dependent del citocrom c de mitocondris durant l'apoptosi. Aquesta H1 s'allibera en situacions on es produeixen trencaments de doble cadena del DNA, els quals tendeixen a produir-se en regions de cromatina de conformació oberta i on l'H1c és el subtipus més abundant. L'alliberació del nucli és p53 dependent. Aquest subtipus és una senyal apoptòtica per només un tipus de dany cel·lular, els trencaments de doble cadena. Dos altres subtipus també associats a regions de cromatina conformacionalment oberta ²⁹⁵, H1a i H1b, alliberen citocrom c però no tan efectivament com l'H1c. En canvi l'H1e, associada a heterocromatina, no és capaç d'induir l'alliberació del citocrom c ²⁹⁴. És clar que la histona H1c no és l'únic subtipus alliberat en situació d'apoptosi. Wu i col. ²⁹⁶ varen demostrar que en apoptosi per fragmentació del DNA per DFF-40 (*DNA fragmentation factor 40*), s'alliberaven tots els subtipus d'histona. També es va observar aquest mateix fet en experiments amb limfoblasts apoptòtics. Es va trobar presents en el citoplasma, tot i que, en quantitats insignificants totes les classes d'histona i fins i tot, nucleosomes ²⁹⁷.

També es va observar en cèl·lules humanes leucèmiques que després de l'apoptosi es dona una defosforilació general de les H1, inclòs subtipus que són hiperfosforilats durant el cicle cel·lular (com per exemple l'H1b i l'H1e) queden di-, mono- o totalment defosforilats ²⁹⁸.

En situació d'apoptosi, histones i fragments de cromatina són exposats a la superfície de la cèl·lula. S'ha suggerit la hipòtesi que proteïnes del sèrum com són la DNasa I i la proteasa plasmina, participarien en la degradació del material cel·lular exposat ²⁹⁹ i que una fallada en el sistema de neteja de les cèl·lules mortes o el trencament d'aquestes estructures nucleosomals de la superfície cel·lular, podria induir al desenvolupament de malalties autoimmunitàries ³⁰⁰.

No només trobem histones en la superfície cel·lular durant l'apoptosi, també les trobem en cèl·lules viables. La tiroglobulina és un lligand que interactua amb les histones, especialment amb les H1. Aquesta, és secretada per les cèl·lules epitelials tiroidees i eliminada del sistema per les cèl·lules de Kupffer, els macròfags del fetge. Un cop s'uneix la tiroglobulina a les H1 de

la superfície cel·lular, aquestes són internalitzades en les vesícules endocítiques dels macròfags ³⁰¹.

Un dels mecanismes dels macròfags per fagocitar els microbis i eliminar-los és mitjançant l'alliberació intracel·lular d'agents antimicrobians emmagatzemats en grànuls. Es van trobar tres proteïnes murines microbicides (MUMPs) ³⁰² que posteriorment van ser identificades com a histones.

La presència de la histona H1 en el sistema immune no es limita als macròfags, les trobem també en les cèl·lules citotòxiques o *natural killers* (NK). Les cèl·lules NK reconeixen i eliminen bacteris, protozous, cèl·lules virals i fins i tot, cèl·lules tumorals. En teleostis, un dels receptors de proteïna de membrana identificat en aquestes cèl·lules és la histona H1x, la qual encara no té una funció clara. Aquesta histona, també trobada en macròfags de ratolí, és filogenèticament molt divergent de la resta dels subtipus de les H1 ³⁰³.

Un altre exemple on trobem histones extranuclears és l'intestí prim, on les H1 actuen com un potent agent antimicrobià de vital importància per a la salut del tracte gastrointestinal. Tant hi trobem la proteïna sencera com fragments peptídics d'aquesta ³⁰⁴.

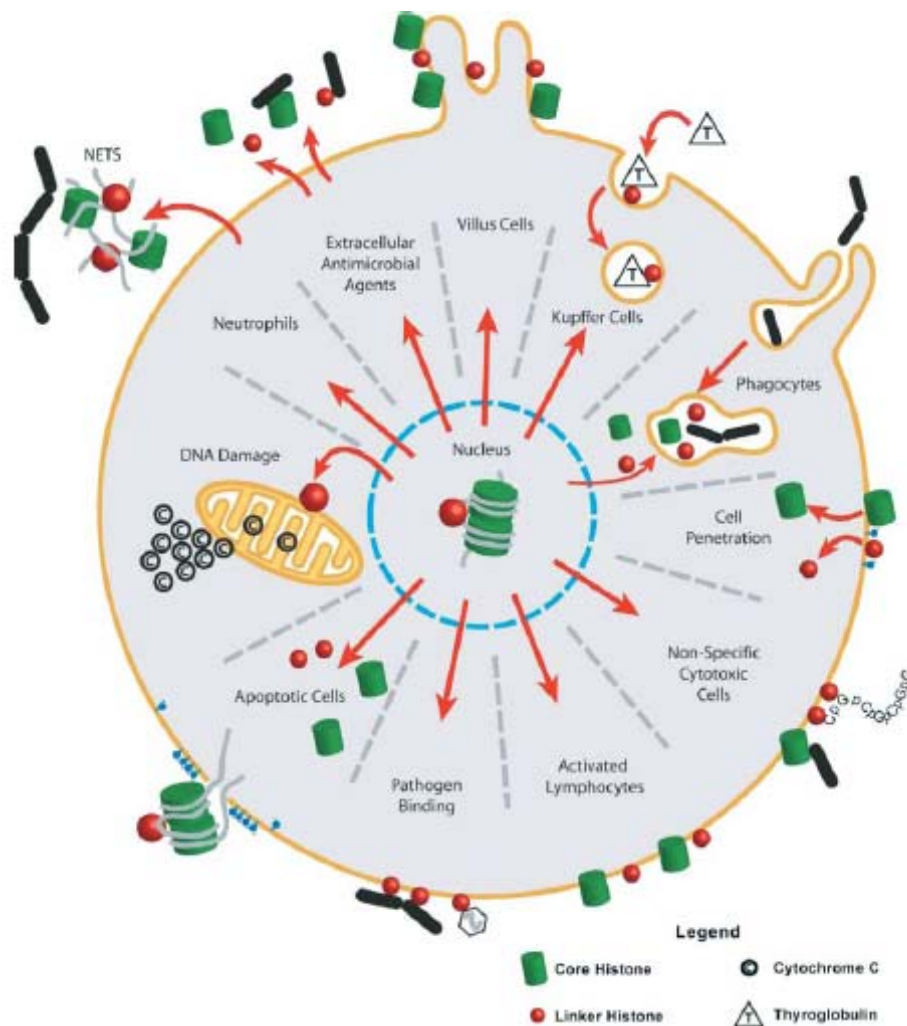


Figura 29. Funcions de la histona H1 en el sistema immunitari ³⁰⁰.

Els patògens tenen mecanismes per utilitzar els receptors de la cèl·lula infectada per al seu benefici, encara que siguin receptors antimicrobians. *Escherichia coli* expressa un complex multiproteic d'adhesió a superfície anomenat Fimbriae 987P, que s'uneix a la histona H1. Així, *E. coli* s'adheriria a l'epiteli intestinal abans de la colonització i infecció ³⁰⁵.

A més de bacteris, també hi ha virus que interactuen amb les histones H1. El virus de Norwalk, principal causant de gastroenteritis aguda, s'uneix a les H1 solubles amb notable fermesa, inhibint així, que s'uneixi a gran varietat de cèl·lules humanes ³⁰⁶.

L'acció antimicrobiana de la histona H1 pot ser per la proteïna sencera o per fragments discrets. Aquests pèptids són efectius contra bacteris grampositius i gramnegatius, contra *Saccharomyces cerevisiae* i paràsits com *Amyloodinium ocellatum* ³⁰⁷. Aquests pèptids requereixen una conformació estructural específica per a l'activitat antimicrobiana, no és simplement per l'elevada quantitat de residus bàsics ³⁰⁸.

1.7.1. La histona H1 com agent terapèutic

La implicació de la histona H1 en el sistema immunitari fa pensar que podria ser un important agent terapèutic per al tractament de malalties infeccioses, càncer o rebuig en transplantaments ³⁰⁰.

La leishmaniosis és una malaltia infecciosa causada per un protozou les histones H1 del qual, han evolucionat molt divergentment respecte a les H1 de vertebrats, fins al punt que han perdut el domini globular central tan conservat ³⁰⁹. Aprofitant aquest fet, aquesta H1 s'ha utilitzat com antigen en una vacuna contra *Leishmania*. Els 60 primers residus de la proteïna són suficients per conferir protecció parcial contra la malaltia ³¹⁰ i disminuir notablement les lesions cutànies ³¹¹.

L'ús d'histones com agents inespecífics del sistema immunitari innat no es redueix només a vertebrats, també s'ha observat en invertebrats com la gamba blanca del Pacífic ³¹².

També s'ha utilitzat l'H1 en la teràpia contra la zona necròtica de tumors (*Tumor Necrosis Therapy*). En aquesta teràpia s'utilitzen anticossos anti-H1 acoblats a una molècula efectora com el I¹³¹. Els anticossos són dirigits a la zona necròtica del tumor i la molècula efectora elimina les cèl·lules adjacents, atacant el tumor de dins cap a fora. Actualment, aquesta teràpia s'utilitza en el tractament de tumors cerebrals ³¹³ i de pulmó ³¹⁴.

Els anticossos contra la histona H1 són candidats a ser utilitzats en el tractament per a evitar el rebuig en transplantaments ja que són el component principal dels anticossos autoreactius que apareixen de forma transitòria a les dues o tres setmanes després d'un transplantament i ajuden a la inhibició de la proliferació de les cèl·lules T que causen el rebuig ³¹⁵.

2. OBJECTIUS

La histona H1 té un paper essencial en l'estructura de la cromatina i participa en la regulació gènica. L'H1 està formada per tres dominis: un domini N-terminal amb uns 20-35 residus, un domini globular central amb uns 80 residus i un domini C-terminal amb aproximadament 100 residus.

El domini C-terminal s'uneix al DNA internucleosomal i contribueix a la condensació de la cromatina. Aquest domini conté la majoria dels llocs de fosforilació de la proteïna per la quinasa CDK2. La fosforilació és la principal modificació post-traducciona en les H1.

L'objectiu general d'aquest treball és l'estudi de l'efecte de la fosforilació sobre l'estructura i la interacció amb el DNA de la histona H1 i el seu domini C-terminal.

Aquest objectiu general es desglossa en els següents objectius concrets:

1. Caracteritzar l'efecte de la fosforilació sobre la interacció amb el DNA del domini C-terminal de la histona H1⁰ en relació a la cooperativitat d'unió a DNA, la preferència d'unió a seqüències de tipus SAR, la inducció de l'espectre ψ del domini en unir-se a DNA i l'afinitat relativa pel DNA.
2. Determinar l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i de la histona H1e sencera, i de les seves espècies fosforilades, per espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier (FTIR).
3. Determinar l'efecte de la fosforilació dels motius S/T-P-X-Z sobre la capacitat d'agregació del DNA del domini C-terminal de la histona H1e i de la histona H1e sencera.
4. Estimar les afinitats relatives pel DNA de les diferents espècies fosforilades de la histona H1e.

3. Materials i mètodes

3.1. Obtenció dels fragments de DNA i de les proteïnes

3.1.1. Soques bacterianes

-*E.coli* M15 (Qiagen): Utilitzada per a l'expressió de proteïnes recombinants. Soca derivada de *E.coli* K12, que conté el plàsmid pREP4 per a l'expressió de gens sota el control de l'operador lac.

-*E.coli* BL21(DE3): Utilitzada per la seva elevada capacitat d'expressió de gens clonats en vectors d'expressió sota control del promotor del bacteriòfag T7. El bacteriòfag λ DE3, integrat en el cromosoma de BL21, conté la T7 RNA polimerasa.

3.1.2. Plasmidis

- pUC19: plasmidi de *E.coli*. Porta el gen de resistència a ampicil·lina, un lloc de clonatge múltiple (MCS) i el gen *lacZ*.

- p1314: construcció que porta un fragment de DNA tipus SAR de 657 pb del clúster d'histones de *Drosophila melanogaster* inserit en el plasmidi pUC19¹²¹.

- pH1e: plasmidi d'expressió que conté la histona H1e de rata inserit en el vector pET21a(+) (Novagen). El vector té una mida de 5443 pb i és ampicil·lina resistent. Conté el promotor T7 i una cua de sis histidines en l'extrem C-terminal del lloc de clonatge. El plasmidi recombinant es transforma en cèl·lules BL21 de *E. coli*.

- pH1⁰, pCTCH1⁰, pCH1e-20: plasmidis d'expressió que contenen la histona H1⁰ de ratolí, el domini C-terminal de la histona H1⁰ de ratolí i el domini C-terminal de la histona H1e de rata, respectivament, inserits en el vector pQE60 (Qiagen). Aquest vector és de 3431 pb i conté el gen de resistència a ampicil·lina, el promotor T5 i una cua de sis histidines en l'extrem C-terminal del lloc de clonatge. El plasmidi recombinant es transforma en cèl·lules M15 de *E. coli*.

3.1.3. Obtenció dels fragments de DNA

Per obtenir els fragments de DNA SAR (p1314) i pUC19 es realitza una mega-purificació utilitzant el kit de Qiagen Plasmid Purification (Qiagen). S'inocula a partir d'una colònia aïllada o d'un stock glicerinat, 3 ml de medi LB amb 3 μ l d'ampicil·lina (100 μ g/ μ l). S'incuba en agitació a 250 rpm tota la nit a 37 °C. Posteriorment, s'inocula aquest cultiu a un litre de medi LB més ampicil·lina i es deixa créixer en agitació fins a obtenir una densitat aproximada de 3-4 x 10⁹ cèl·lules/ml de cultiu (DO=0'8). A partir d'aquí es segueix el protocol establert pel kit.

Posteriorment, es digereixen els plasmidis per tal d'obtenir els fragments de DNA d'interès. El plasmidi p1314 es digereix amb BamH I i Kpn I per obtenir el fragment de SAR de 657 pb. El plasmidi pUC19 amb l'enzim de restricció Hae III per obtenir un fragment de 587 pb el qual

conté un 60 % d'A/T. Es selecciona el fragment d'interès fent una electroforesi en gel d'agarosa (1%) i tallant la banda corresponent al fragment directament del gel.

A continuació es purifica el DNA digerit a partir dels fragments d'agarosa amb el GFX PCR DNA and gel band purification kit d'Amersham o per electroelució amb les membranes de diàlisi Biotrap de Schleicher & Schuell.

Per tal de purificar el DNA es procedeix a l'extracció amb fenol:cloroform (v:v). Es precipita a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 2 a 12 hores afegint NaCl a una concentració final de 150 mM i dos volums i mig d'etanol absolut fred. Es centrifuga a 12.000 g durant 15 minuts. Es descarta el sobrenedant, s'inverteix el tub per assecat-lo i es resuspèn en aigua o el tampó desitjat.

Alternativament, també es varen obtenir els fragments de DNA per PCR. La reacció conté 10 ng del plasmidi d'interès, 50 pmols de cada encebador, 200 μM de dNTPs, el tampó específic per a la DNA polimerasa 1x, MgCl_2 (2'5 mM), 5 unitats de la Taq polimerasa (Biotherm) i aigua estèril fins a completar el volum final de 50 μl . Després de la PCR es segueix amb l'extracció amb fenol:cloroform i a la precipitació del DNA com s'ha descrit anteriorment.

Per a l'obtenció del fragment de pUC19 de 763 pb es segueix el programa següent: desnaturalització inicial, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; 30 cicles d'amplificació, 30 segons, $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 segons; extensió final, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 7 min. Els encebadors utilitzats varen ser:

pUC 7-5: 5'- GCG GTT AGC TCC TTC GGT CCT C -3'

pUC 7-3: 5'- CAC CCG CTG ACG CGC CCT GAC G -3'

El fragment de doble cadena de DNA de 50 pb es va obtenir per hibridació de l'oligòmer de 50 pb 5'- CTATGATATATAGATAGTTAATGTAATATGATATAGATATAGGGATCC -3' amb la seva seqüència complementària.

3.1.4. Obtenció de les histones H1⁰ i H1e recombinants i dels seus respectius dominis C-terminals CH1⁰ i CH1e

S'inocula medi LB amb 1/20 de cultiu de la soca portadora del plasmidi crescut tota la nit, es fa créixer fins a una $\text{OD}_{\lambda 600\text{nm}} = 0,8$ i s'afegeix isopropil β -D tiogalactòsid (IPTG) 1 mM per induir l'expressió de la proteïna. Es deixa créixer quatre hores més. Es centrifuga el cultiu 15 min a 4300 g i a 4°C .

El sediment de cultiu es resuspèn en tampó NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 750 mM, imidazol 20 mM, pH 8 més clorur de guanidini 4 M i es centrifuga a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 min a 20000 g. Es recull la fase soluble i es purifica per cromatografia de quelants metàl·lics i per cromatografia de gel filtració.

Per a la cromatografia de quelants metàl·lics s'utilitza una columna Hi-trap de 5 ml (Pharmacia) carregada amb NiSO_4 100 mM. Es fan rentats amb el tampó anterior però amb quantitats creixents d'imidazol (40, 60 i 80 mM) i finalment, s'elueix amb tampó de 250 mM d'imidazol. Seguidament es fa la cromatografia de filtració en gel amb una columna de 30 ml amb Sephadex G-25 per eliminar les sals i l'imidazol. La mostra eluïda de la columna en aigua es congela en N_2 líquid o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i es liofilitza a una pressió de 12 millitorr i a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liofilitzador Virtis).

3.1.5. Obtenció dels mutants de la histona H1e de rata per als llocs de fosforilació de l'enzim CDK2

La histona H1e conté 5 motius del tipus S/T-P-X-Z fosforilables, un localitzat en el domini N-terminal i els altres quatre en el domini C-terminal (Fig. 30).

```
MSETAPAAPA APAPAEKTPI KKKKARKAAGG AKRKASGPPV SELITKAVAA SKERSGVSLA
ALKKALAAAG YDVEKNNSRI KLGLKSLVSK GTLVQTKGTG ASGSFKLNKK AASGEAKPKA
KKAGAAKAKK PAGAAKPKK ATGTATTPKKS TKKTPKKAKK PAAAAGAKKA KSPKKAKATK
AKKAPKSPAK ARAVKPAAK PKTSKPAAK PKKTAAKKK
```

Figura 30. Seqüència de la histona H1e de rata. En negreta, els motius del tipus S/T-P-X-Z.

Els clons mutants pels llocs de fosforilació de l'enzim CDK2 de la H1e es van obtenir per PCR amb el QuickChange Multi Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies).

Els encebadors (Isogen) utilitzats contenien una mutació en el lloc de fosforilació, canviant el residu serina o treonina per un d'alanina i eren els següents (s'especifica una de les cadenes i es ressaltava en negreta les bases que introdueixen la mutació):

H1e17: 5'- CC CCC GCA GAG AAG **GCA** CCC ATA AAG AAG AAG G -3'
H1e145: 5'- GGA ACA GCC **GCA** CCC AAG AAG AGC ACT AAG AA -3'
H1e153: 5'- C ACT AAG AAG **GCA** CCA AAG AAA GCA AAG AAG CCG G -3'
H1e171: 5'- CC AAA AAA GCT AAA **GCC** CCG AAA AAA GCA AAA GC -3'
H1e186: 5'- GCT AAG AAG GCC CCC AAA **GCA** CCT GCC AAG GC -3'

Programa per a la PCR: Desnaturalització inicial, 95 °C 1 min; 30 cicles d'amplificació, 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 65 °C 12 min.

Seguidament, es digerix el DNA parental amb l'enzim Dpn I i es transforma en les cèl·lules supercompetents XL1-Blue seguint el protocol indicat pel kit.

Els doble, triple i quàdruples mutants s'obtingueren per successives rondes de PCR.

Així, els mutants amb els que es va treballar els trobem a la taula 4 i 5:

Taula 4. Mutants del domini C-terminal de la histona H1e de rata fosforilats			
nº fosforilacions	mutant no fosforilat	posicions mutades	espècie fosforilada
monofosforilats	CH1e m 145-153-171	145-153-171	CH1e p 186
	CH1e m 145-153-186	145-153-186	CH1e p 171
	CH1e m 145-171-186	145-171-186	CH1e p 153
difosforilat	CH1e m 145-186	145-186	CH1e p 153-171
trifosforilat	CH1e m 145	145	CH1e p 153-171-186

Taula 5. Mutants de la histona H1e de rata fosforilats			
nº fosforilacions	mutant no fosforilat	posicions mutades	espècie fosforilada
monofosforilats	H1e m 17-145-153-171	17-145-153-171	H1e p 186
	H1e m 17-145-153-186	17-145-153-186	H1e p 171
	H1e m 17-145-171-186	17-145-171-186	H1e p 153
	H1e m 17-153-171-186	17-153-171-186	H1e p 145
difosforilat	H1e m 17-145-153	17-145-153	H1e p 171-186
trifosforilat	H1e m 17-145	17-145	H1e p 153-171-186
tetrafosforilat	H1e m 17	17	H1e p 145-153-171-186

La correcta introducció de les mutacions es va comprovar per seqüenciació dels clons recombinants al Servei de Genòmica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.1.6. Fosforilació *in vitro*

Els diferents subtipus de la histona H1 van ser fosforilats *in vitro* amb l'enzim quinasa CDK2-ciclina A (Sigma). La reacció de fosforilació es duu a terme en tampó Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, EGTA 0'1 mM, dithiotreitol 2 mM, pH 7'5 més ATP 200 µM i 1 U de CDK2-ciclina A per 200 ng de proteïna. S'incubà 1 h a 30 °C i s'eliminà el tampó de la reacció per cromatografia de gel filtració en una columna Hi-trap desalting de 5 ml (GE Healthcare).

Per a fer el marcatge radioactiu es suplementà la reacció amb ATP marcat en γ amb ³²P i amb una activitat específica de 500 µCi/µmol (GE Healthcare). L'ATP marcat no incorporat s'eliminà amb la cromatografia de gel filtració.

Es comprovà la correcta fosforilació per espectrometria de masses MALDI-TOF.

3.1.6.1. Espectrometria de masses

Les anàlisis per espectrometria de masses es van realitzar al Servei de Proteòmica i de Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona. Els espectres es van adquirir en un espectròmetre Bruker Daltonics Ultraflex MALDI-TOF usant un mètode en modus lineal i un voltatge d'acceleració de 20 kv. La matriu utilitzada era DHB en fosfòric 1%.

La incorporació de cada grup fosfat augmenta 80 Da la massa molecular de la proteïna. Com a control es pren la massa molecular de la proteïna corresponent sense fosforilar. En la figura 30 es pot observar l'espectre de la histona H1e mutada en tres posicions (d'un total de cinc) sense fosforilar amb un pes de 22809 Da (A) i l'espectre de la mateixa proteïna mutant fosforilada amb un pes de 22974 Da (B). Aquesta diferència de pes molecular correspondria a l'incorporació de dos grups fosfats.

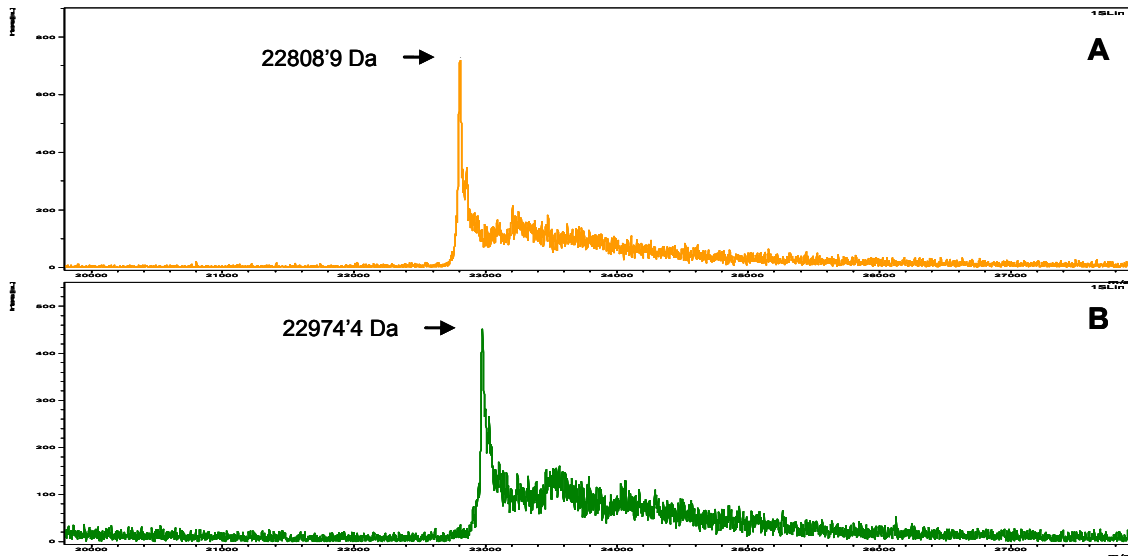


Figura 30. Espectrometria de masses per Maldi. A) espectre de la histona H1e(T→A17/145/153) no fosforilada. B) espectre de la histona H1e-p-171/186 difosforilada.

3.2. Assaigs d'unió DNA-Histona

3.2.1. Assaig d'unió del domini C-terminal de la histona H1⁰ a DNA

Aquest assaig es realitzà amb tres fragments de DNA diferents: un fragment de tipus SAR de 657 pb, un fragment de 587 pb de pUC19 i un oligòmer de 50 pb (5'-CTATGATATATAGATAGTTAATGTAATATGATATAGATATAGGGATCC-3').

S'assajà la unió de cada fragment de DNA amb cada domini C-terminal de la H1⁰, fosforilat i no fosforilat, a unes relacions creixents proteïna/DNA (pes/pes) de 0'1, 0'15, 0'3, 0'6, 0'75, 0'9, 1, 1'5 i 1'75.

Els assaigs s'incubaren 1h a 37 °C en tampó fosfat (10 mM, pH 7), glicerol 5 % i variant la força iònica, suplementant el tampó fosfat amb NaCl (70 i 140 mM). Un cop formats els complexos proteïna-DNA es van centrifugar 15 min a 13000 g per separar precipitat i sobrenedant. Els precipitats es sotmeteren a digestió amb proteinasa K (0'5 µg/µl de concentració final) en tampó Tris 10 mM pH 7'8, EDTA 5 mM, SDS 0,5 % tota la nit a 37 °C. El resultat es visualitzà per electroforesi en agarosa a l'1 %. La intensitat de les bandes es va quantificar amb el programa Quantity One (Bio-Rad).

3.2.2. Assaig de preferència per la seqüència SAR del domini C-terminal de la histona H1⁰

Es va fer competir els fragments de DNA SAR i pUC19 junts i en quantitats estequiomètriques limitades per cada domini C-terminal de la H1⁰, fosforilat total, fosforilats parcials i no fosforilat. Utilitzarem unes relacions proteïna/DNA (pes/pes) de 0'2, 0'25, 0'3 i en algun cas també 0'4. L'assaig es realitzà com en l'apartat anterior 3.2.1. i el resultat es visualitzà per electroforesi en agarosa metaphor al 3 %. La intensitat de les bandes es quantificà amb el programa Quantity One (Bio-Rad).

3.2.3. Assaig de competició del domini C-terminal de la histona H1⁰ no fosforilat i fosforilat per una quantitat limitada de DNA

Es realitzà un assaig de competició en el que CH1⁰ o CH1⁰-P competien amb un CH1⁰ marcat radioactivament amb ³²P (CH1⁰-³²P) pel fragment SAR de 657 pb.

En l'assaig es mantingueren fixes les quantitats de DNA i de CH1⁰-³²P i s'afegiren quantitats creixents de CH1⁰ o CH1⁰-P obtenint unes relacions CH1⁰/CH1⁰-³²P i CH1⁰-P/CH1⁰-³²P (pes/pes) de 0, 0'06, 0'12 i 0'24. Així, cada reacció contenia 60 ng de DNA SAR, 100 µg de CH1⁰-³²P i 0, 6, 12 i 24 ng de CH1⁰ o CH1⁰-P. S'incubaren en tampó fosfat 10 mM, 140 mM NaCl, pH 7 i glicerol 5 % a 37 °C 1h. Un cop formats els complexos DNA-proteïna es van centrifugar 15 min a 13000 g per separar precipitat i sobrenedant i es carregaren en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Es va tenyir el gel amb coomassie brilliant blue com a control de la quantitat de proteïna precipitada per a cada relació. Per visualitzar el resultat s'exposà el gel amb una autoradiografia (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) o en el Personal Molecular Imager (Biorad). Quantificarem les bandes obtingudes amb el programa Quantity One (Biorad).

3.2.4. Estimació de les afinitats relatives pel DNA de la histona H1e i dels seus mutants amb diferents graus de fosforilació

Per determinar les afinitats relatives dels diferents mutants de la histona H1e fosforilats es van realitzar assaigs de competició entre un dels mutants fosforilats de la histona H1e i un altre subtipus d'histona amb diferent mobilitat electroforètica (H1⁰ i H1c) o la mateixa H1e no fosforilada, per una quantitat limitada de DNA, el fragment SAR.

Es posà a incubar una hora a 37 °C 1 µg de cada proteïna a competir i 0'7 µg de SAR en tampó fosfat 100 mM, NaCl 140 mM pH 7 i glicerol 5 %.

Seguidament, es centrifugà 15 min a 13.400 g per tal separar la proteïna lliure (sobrenedant) dels complexos proteïna-DNA (precipitat). El precipitat es va resuspendre en el mateix tampó fosfat.

Es va analitzar precipitat, sobrenedant i la barreja inicial de les proteïnes a competir (input) en un gel al 15 % d'acrilamida/bisacrilamida en SDS-PAGE. La tinció del gel va ser en coomassie brilliant blue.

En els assaigs on la competició era entre la histona H1e sense fosforilar i una de les espècies fosforilades, es van augmentar les quantitats de proteïna i de DNA, ja que posteriorment havien de ser analitzats per electroforesi AU-PAGE: gel d'acrilamida/bisacrilamida al 15 % en urea 2'5 M i àcid acètic 0'9 M. Aquesta tècnica adaptada de Piña i col.¹⁴¹ que permet distingir la densitat de càrrega, era necessària quan fèiem competir l'H1e no fosforilada amb una de les seves espècies fosforilades ja que la diferència de pes és molt petita. En el cas de les espècies monofosforilades la diferència és només de 80 Da, el pes corresponent a un grup fosfat.

La intensitat de les bandes obtingudes en els gels es quantificà amb el programa Quantity One (Bio-Rad).

Tal com s'explica més detalladament en el capítol quatre de Resultats, a partir de les quantificacions de les bandes dels gels es van determinar les afinitats relatives de la histona H1e i de les seves espècies fosforilades pel DNA, com expressió de la constant d'afinitat relativa d'un mutant *i* pel DNA respecte a l'altre mutant *j* amb la següent equació²⁰⁴:

$$\frac{K_{DNAi}}{K_{DNAj}} = \frac{[iDNA] \times [j]}{[i] \times [jDNA]}$$

Un cop obtingudes les afinitats relatives s'utilitzà l'aplicació de regressió múltiple de l'opció anàlisi de dades del programa Excel (Microsoft), mètode que permet minimitzar l'error quadràtic mig²¹³.

3.2.5. Capacitat d'agregació de DNA de la histona H1e i del seu domini C-terminal

La capacitat d'agregació del DNA de la histona H1e i els seus diferents mutants fosforilats es va estudiar per mitjà d'electroforesi en gels de retard.

Amb el domini C-terminal els complexos proteïna/DNA (pes/pes) es van realitzar a relació $r=0'45$ i a $r=0'5$. Amb la proteïna sencera la relació utilitzada va ser $r=1'05$.

Els complexos es van formar en tampó fosfat 10 mM, 140 mM NaCl, pH 7 i incubats 30 minuts a temperatura ambient. Seguidament es van analitzar en un gel d'agarosa a l'1 %. El tampó d'electroforesi utilitzat, amb més força iònica de l'habitual, era Tris 36 mM, NaH_2PO_4 30 mM, 1 mM EDTA, pH 7.7³¹⁶ i el gel era tenyit en Bromur d'Etidi.

El fragment de doble cadena de DNA dels complexos es va obtenir per hibridació de l'oligòmer de 50 pb 5'- CTATGATATATAGATAGTTAATGTAATATGATATAGATATAGGGATCC-3' amb la seva seqüència complementària.

3.4. Dicroisme circular de complexos DNA-proteïna

3.4.1. Fonaments teòrics

El dicroisme circular (CD) és una tècnica físico-química per estudiar les conformacions i transicions conformacionals de les molècules biològiques. El CD mesura la capacitat de molècules òpticament actives d'absorbir diferencialment la llum polaritzada circularment a esquerra i a dreta.

Un raig de llum polaritzat en un pla pot considerar-se format per dos components polaritzats circularment, un a la dreta i l'altre a l'esquerra. Aquests components estan en fase i són de la mateixa amplitud.

En passar per un medi òpticament actiu, cada component interactua de diferent manera amb els centres quirals de les molècules presents. La interacció de la radiació amb la mostra causa un desfasament i un canvi de magnitud diferencials en els dos components circularment polaritzats de la llum. Aquests fenòmens provoquen una rotació del pla de polarització en un angle α i la torsió d'aquest pla genera una el·lipse (Fig. 31).

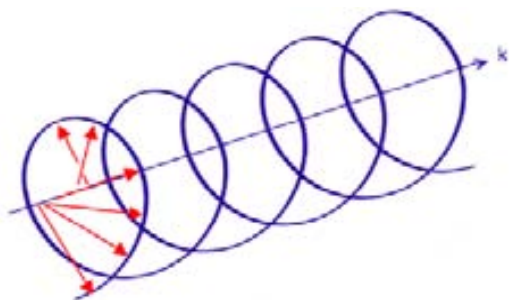


Figura 31. Polarització del pla de polarització de la llum.

La rotació del pla i la diferent absorció dels components circularment polaritzats (dicroisme circular) varien d'acord amb la longitud d'ona. La diferència d'absorbència (dependent de la longitud d'ona) entre els dos components és mesurada i dona lloc a l'espectre de CD de la mostra.

La mesura obtinguda no és simplement una propietat intrínseca a la molècula, depèn també de la conformació molecular, de la temperatura, la concentració i l'ambient químic.

La representació gràfica dels espectres obtinguts relaciona la rotació o el·lipticitat molar amb la longitud d'ona.

3.4.2. Aplicacions biològiques del dicroisme circular

Per a l'estudi de proteïnes, els espectres de CD s'obtenen generalment en les regions de l'ultraviolat llunyà (180 a 250 nm) i proper (250 a 350 nm) de la radiació electromagnètica.

En la regió de l'ultraviolat llunyà, els espectres es deuen principalment als enllaços amida que uneixen els aminoàcids entre si. Els espectres obtinguts permeten interpretar el contingut

d'estructura secundària de la proteïna, és a dir, el percentatge de residus en cada conformació estructural (hèlix α , fulla β i cabdell estadístic) ^{317, 318}.

En la regió de l'ultraviolat proper són els grups aromàtics de les cadenes laterals del triptòfan, la tirosina i la fenilalanina que donen els espectres de CD. Com aquests residus aromàtics estan distribuïts per tota la molècula, els espectres obtinguts ens serveixen per obtenir informació sobre la conformació global de la proteïna. A més, senyals en aquesta regió són extremadament sensibles a canvis en la conformació. Algunes de les aplicacions del CD en l'UV proper són estudis de canvis estructurals d'una molècula en funció de la temperatura o en presència d'agents desnaturants com la urea o el clorur de guanidini, obtenint-se així, informació termodinàmica sobre la molècula. Una altra aplicació és l'obtenció d'informació estructural de grups prostètics de proteïnes com el grup hemo o el citocrom c.

També es realitza CD en la zona de llum visible en estudis d'interacció proteïna-metall. Els espectres de CD en aquesta regió només es produeixen quan un ió metàl·lic es troba en un ambient quiral, ja que els ions metàl·lics lliures en dissolució no es detecten ³¹⁹.

Els àcids nucleics són molècules asimètriques a causa de la naturalesa quiral dels sucres que formen els nucleòtids. Els espectres de CD dels àcids nucleics són característics de la conformació de cada DNA i dependran de la composició de bases per que cada base té una diferent transició dipolar.

Podem diferenciar les diferents conformacions del DNA pels seus espectres de CD. El B-DNA de 10.4 pb per volta és la conformació normal del DNA en solució aquosa en concentració salina moderada. El seu espectre es caracteritza per tenir un CD positiu i un CD negatiu de similar intensitat a 280 i a 240 nm, respectivament, i un CD positiu molt intens al voltant de 190 nm. El B-DNA de 10.2 pb es troba en solució aquosa en altes concentracions de sals o metanol i en el DNA que envolta les histones internes. Es caracteritza pel col·lapse de la seva llarga longitud d'ona a 280 nm. L'A-DNA és similar a l'RNA de doble cadena i es caracteritza per un CD positiu a 270 nm, un CD negatiu a 210 nm i un CD positiu molt intens 185 nm. El Z-DNA, una hèlix levògira que es troba en determinades condicions de sal o alcohol, té un intens CD negatiu al voltant de 195 nm ³²⁰.

La unió de proteïnes pot modificar l'espectre característic del DNA. Aquesta modificació consisteix en la desaparició dels components positius i en l'aparició d'una intensa banda negativa a 270 nm, coneguda com l'espectre ψ . L'espectre ψ apareix per l'agregació ordenada de les molècules de DNA ²⁰⁴ i la seva inducció depèn de les condicions del medi (força iònica, polaritat, etc.), de les característiques del DNA i de la presència de molècules inductores.

Entre les seves aplicacions hi ha l'estudi d'isomeritzacions conformacionals del DNA, canvis en l'estructura secundària en funció de la temperatura o agents desnaturalitzants (per exemple, càlcul de la T_m) o la verificació del correcte aparellament de bases (per exemple, una cadena modificada amb la seva cadena complementària).

3.4.3. Adquisició d'espectres

S'utilitzà un espectropolarímetre JASCO J-715 amb termostatització i s'analitzà amb el programa "Standard analysis" de JASCO, que permet realitzar els espectres de diferència, el canvi d'unitats a el·lipticitat molar ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2/\text{dmol}$ de residu) i la reducció del soroll de fons.

Es va utilitzar una cubeta de quarç de 0'1 cm.

Els paràmetres de mesura són:

-rang: 310 -190 nm	-sensibilitat: 100 mdeg
-amplitud de la banda: 2.0 nm	-temps de resposta: 2 s
-resolució: 0.5 nm	-velocitat: 50 nm/min
-acomulació: 2	

Amb aquesta tècnica s'han analitzat els espectres dels complexos DNA-proteïna, comparant el domini C-terminal de la H1^o fosforilat i no fosforilat. El DNA utilitzat és el pUC19 en unes relacions proteïna/DNA (pes/pes) de 0'2 a 0'5. Cada incubació de DNA amb proteïna era de 10 min.

3.5. Espectroscòpia d'infraroig FTIR

3.5.1. Fonaments teòrics

Les tècniques espectroscòpiques es basen en la interacció de la matèria amb la radiació electromagnètica o amb la propagació oscil·latòria de camps elèctrics i/o magnètics en l'espai, els quals fan variar l'energia de la molècula a causa de les transicions electròniques.

L'espectroscòpia d'infraroig es basa en l'absorció de la radiació infraroja en les molècules, donant-se així variacions de l'estat energètic que produeixen la vibració del nucli respecte a altres nuclis pròxims. La radiació d'infraroig (Fig. 32) es troba en la regió de l'espectre electromagnètic entre 14000 i 200 cm^{-1} però només la zona entre 4000 i 1000 cm^{-1} presenta aplicabilitat biològica. En aquesta regió és on les macromolècules absorbeixen.

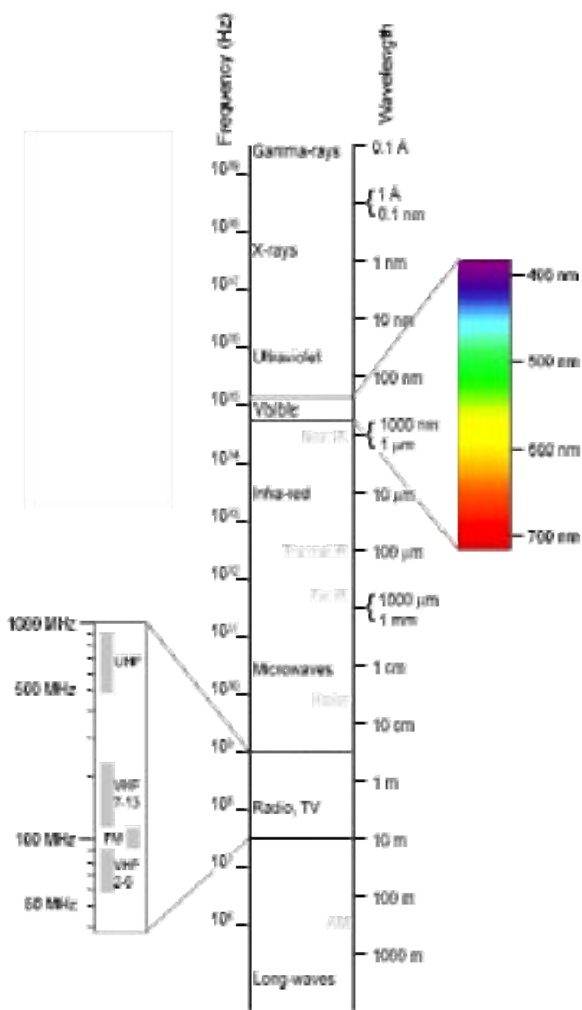


Figura 32. Espectre electromagnètic de la llum.

Aquesta tècnica treballa a llargues longituds d'ona (λ) i associada a baixes energies.

Per a que hi hagi absorció de llum infraroja és necessari que l'energia de la radiació electromagnètica del feix incident tingui una longitud d'ona adequada per a que permeti que les molècules passin a un estat excitat. L'energia del feix incident ha de coincidir amb l'augment energètic de la molècula entre dos estats vibracionals i així, es produeixi un canvi en el moment dipolar de l'enllaç que absorbeix la radiació.

La vibració d'un enllaç depèn de la massa dels àtoms que intervenen i de la magnitud de la força que s'estableix entre ells. Es poden diferenciar dos modes vibracionals: de tensió o *stretching*, en els que els àtoms vibren en la direcció de l'enllaç, i de flexió o *bending*, on es produeix un canvi d'angle en la vibració dels àtoms. A la vegada, la vibració pot ser simètrica o asimètrica.

La freqüència de vibració d'un enllaç (ν) es pot definir com:

$$\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

on h és la constant de Plank; K , la constant de la força de l'enllaç i μ , la massa reduïda dels àtoms que participen en l'enllaç.

Quan es tracta de macromolècules, el nombre d'enllaços i els tipus de vibració poden arribar a ser molt diferents i la freqüència vibracional pot ser alterada pel propi grup químic i pel seu entorn. Són factors que determinaran la posició de les bandes obtingudes.

3.5.2. Funcionament d'un espectròmetre d'infraroig

Existeixen dos tipus d'espectròmetres que permeten l'obtenció d'espectres d'IR: els espectròmetres dispersius i els espectròmetres amb transformada de Fourier (FTIR). Aquests últims es basen en l'interferòmetre de Michelson, en lloc d'utilitzar un monocromador com els espectròmetres dispersius.

L'interferòmetre de Michelson consta d'un joc de tres miralls: un fix, un mòbil i un divisor o *beam splitter*. La meitat de la radiació de la font d'IR és reflectida cap al mirall fix i l'altre meitat cap al mirall mòbil. Els feixos són reflectits en els miralls i viatgen de nou cap al mirall divisor, on es recombinen i la meitat d'ells seran reflectits cap a la font d'IR i l'altre meitat passarà a través de la mostra fins arribar al detector (Fig. 33). El senyal recollit és un interferograma. Aplicant la transformada de Fourier, s'obté un espectre de la intensitat d'absorció de la mostra en funció del número d'ona.

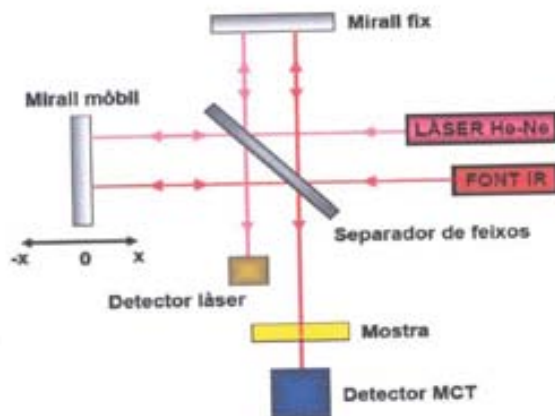


Figura 33. Esquema del funcionament d'un interferòmetre de Michelson.

3.5.3. Estudi de l'estructura de proteïnes mitjançant FTIR

L'espectroscòpia d'infraroig és una de les tècniques més utilitzades per a la determinació de l'estructura secundària de les proteïnes ja que permet el seu anàlisi en condicions molt diverses ^{177, 321-326}. El grup químic analitzat és l'enllaç peptídic o amida, que és el més abundant.

L'enllaç amida presenta dues formes vibracionals principals: l'amida-I, que dona lloc a una banda característica en l'espectre d'infraroig entre 1700 i 1600 cm^{-1} que correspon, majoritàriament, a la vibració de tensió de l'enllaç $\text{C}=\text{O}$; i l'amida II, el qual dona una banda entre 1600 i 1500 cm^{-1} que correspon principalment, a la vibració de flexió de l'enllaç $\text{N}-\text{H}$. També trobem una banda intensa a 3300 cm^{-1} , l'amida A, també per la vibració de flexió de l'enllaç $\text{N}-\text{H}$ ^{321, 323, 327} (Fig. 34).

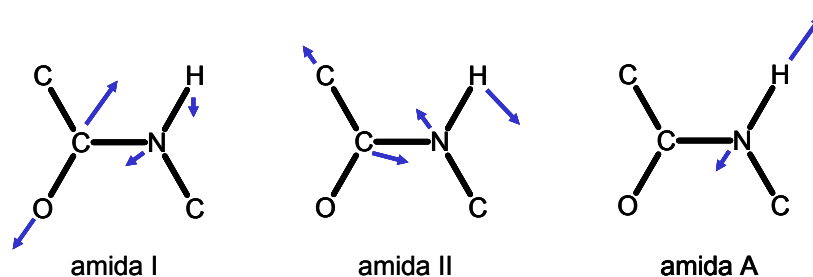


Figura 34. Modes vibracionals de l'enllaç amida.

Segons el tipus d'estructura secundària de la proteïna, les bandes de vibració d'aquests enllaços poden aparèixer en diferent posició dins la regió de l'espectre d'infraroig. L'estudi de proteïnes es basa principalment, en la interpretació dels pics de la banda de l'amida-I ja que és la que dona major senyal ^{327, 328} (Taula 6).

Taula 6. Assignació d'estructura secundària en la regió amida-I.	
components estructurals	rang de l'espectre (cm ⁻¹)
girs	1700-1680
girs	1680-1658
girs	1658-1657
hèlix α	1656-1647
estructura desordenada	1647-1639
fulla β	1638-1628
fulla β de baixa freqüència	1627-1617

Assignació de cada component estructural corresponent als diferents rangs de la regió de l'amida-I de l'espectre obtinguda per espectroscòpia d'infraroig (FTIR) de proteïnes en D₂O. Adaptat d'Arrondo i col.³²⁸

3.5.4. Preparació de les mostres

A causa de la vibració de l'enllaç O-H, l'aigua dóna una banda característica a 3400 cm⁻¹ i una altra banda força intensa a 1650 cm⁻¹. Aquesta segona banda pot emascarar la banda de l'Amida-I i impedir la obtenció d'informació sobre l'estructura secundària de la proteïna estudiada.

L'àtom de deuteri és més pesat que el d'hidrogen i l'enllaç vibra a una freqüència menor. En dissolucions deuterades aquestes dues bandes queden desplaçades cap a un número d'ona més baix, prop de 2400 cm⁻¹ i 1200 cm⁻¹, i per tant, la banda de l'amida-I no queda emmascarada (Fig. 35).

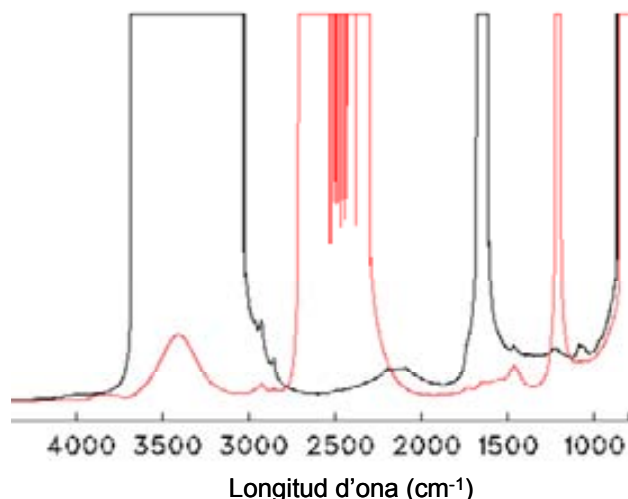


Figura 35. Espectre de l'aigua i de l'aigua deuterada obtinguts per FTIR. En negre, espectre de l'aigua. En vermell, espectre de l'aigua deuterada.

Per intercanviar els protons intercanviables de l'hidrogen de l'aigua de la mostra pels del deuteri es van evaporar en un evaporador Speed-vac (Savant) per separat les mostres de proteïna, DNA i tampó en dissolució aquosa per posteriorment resuspendre'ls amb l'aigua deuterada.

Proteïna i DNA es resuspenen per separat just abans de l'anàlisi. Els complexos es formen directament sobre la cel·la de mesura.

Les mostres de proteïna estaven a una concentració de 5 mg/ml en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH 7.0. Els complexos de proteïna/DNA es van mesurar a dues relacions, $r=0.5$ i $r=0.7$, on $r=\text{proteïna/DNA (pes/pes)}$. El DNA era d'esperma de salmó sonicat de 500 pb aproximadament.

3.5.5. Adquisició d'espectres i tractament de les dades

Per analitzar la mostra, es va utilitzar una cel·la desmuntable per a mostres líquides amb dues finestres de fluorur de calci separades per un espaiador de 50 μm . L'espectròmetre d'infraroig amb transformada de Fourier i equipat amb un detector MCT (mercuri-cadmi-tel·luri) era el model Varian 660-IR.

Es van adquirir 1000 espectres (*scans*) per al background i per a cada mostra, en el rang de 1000 a 4000 cm^{-1} , amb una resolució nominal de 2 cm^{-1} i a 22 °C. El programa informàtic utilitzat va ser el Resolutions Pro (versió 5.1.0.822) de Variant, Inc. Per evitar la interferència del vapor d'aigua en la regió de l'amida I es va purgar l'equip amb $\text{N}_2(\text{g})$.

La contribució del tampó i del DNA es va restar dels espectres de la proteïna sola o dels complexos proteïna-DNA adquirint espectres d'aquests en les mateixes condicions però en absència de proteïna. Per restar la contribució del DNA s'elimina la component simètrica de vibració dels fosfats al voltant de 1087 cm^{-1} als espectres dels complexos de proteïna/DNA¹⁷⁶. Per eliminar les petites traces de vapor d'aigua que hi pogués haver, també es va restar un espectre de vapor. Totes les restes es van realitzar amb el programa informàtic OMNIC 7.2 (Thermo Nicolet).

La deconvolució de l'espectre global va permetre obtenir la posició i el nombre de pics components amb el programa RAMOP.N. L'ajust dels components es va realitzar pel mètode de *curve fitting* d'aproximació de corbes gaussianes amb el programa informàtic Curvefit de Spectracalc (Galactic Inc.). En l'ajust dels components es van considerar unes alçades inicials del 90% de l'espectre d'origen per al màxim i els extrems i del 70% per a la resta de components. Les amplituds de banda inicials eren de 12 cm^{-1} pels extrems, 16 cm^{-1} pel màxim i 14 cm^{-1} per la resta de components. Amb el programa Grams32 Spectral Notebook es va comprovar el resultat visualitzant la superposició de la corba reconstituïda sobre l'espectre original¹⁶⁶.

4. Resultats

Capítol 1

Efectes de la fosforilació del domini C-terminal de la histona H1⁰ sobre la interacció amb el DNA.

Les histones H1 presenten una estructura formada per tres dominis: un domini globular central flanquejat per un domini N-terminal i un domini C-terminal molt bàsics³²⁹. El domini N-terminal és més curt que el C-terminal. El domini C-terminal representa gairebé el 50 % de la proteïna. La distribució de les càrregues en el domini C-terminal és molt uniforme malgrat la variació de la seqüència del domini dels diferents subtipus d'H1¹⁶⁸.

El domini C-terminal de la histona H1⁰ de ratolí conté tres llocs de fosforilació (motius del tipus S/T-P-X-Z) per l'enzim CDK2 (Fig. 36). Aquestes posicions respecte a la proteïna sencera són T118, T140 i T152.

MDEPKRSVAF KKTKEVKKV **ATPKKAAKPK** KAASKAPSKK PKAT**TPVKKAK**
 KKPAAT**PKKA** KKPVVVKVP VKASKPKKAK TVKPKAKSSA KRASKKK

Figura 36. Seqüència del domini C-terminal histona H1⁰ de ratolí. En negreta, els motius del tipus S/T-P-X-Z.

4.1.1. Unió cooperativa del domini C-terminal de la histona H1⁰ fosforilat

La cooperativitat és l'efecte pel qual la unió d'una molècula a un seti, en aquest cas, la unió del domini C-terminal de la histona H1⁰ al DNA, provoca un augment d'afinitat pels setis contigus. Aquest fet provoca l'aparició de dues poblacions de DNA completament diferents: una, on el DNA està saturat de C-terminal i que precipita, i l'altra, on no hi ha C-terminal en el DNA i per tant, no precipita. Si no hi ha un efecte cooperatiu, només es troba un tipus de població de DNA on la proteïna està distribuïda uniformement per tot el DNA²³¹.

Es realitzaren assaigs d'unió amb els DNAs SAR i pUC19 (3.1.3. de Materials i mètodes) per separat tant amb el C-terminal no fosforilat (CH1⁰) com amb el C-terminal trifosforilat (CH1⁰-3P), per tal d'observar si la fosforilació afecta a la cooperativitat d'unió al DNA.

Tal com s'ha explicat a l'apartat 3.2.1. de Materials i Mètodes, a una determinada quantitat de DNA, ja sigui SAR o pUC19, se li va afegir quantitats creixents de domini C-terminal, o CH1⁰ o CH1⁰-3P. Es formaren així, agregats insolubles de DNA i proteïna que van ser recuperats per centrifugació i analitzats per electroforesi en gel d'agarosa. Les relacions proteïna/DNA (pes/pes) van de 0'1 fins a 1'75. A més, cada un d'aquests assaigs es realitzà a diferents forces iòniques, 140, 70 i 0 mM de NaCl (tampó fosfat 10 mM, a pH 7).

A continuació es mostren els precipitats i els sobrenedants de les diferents relacions de DNA-proteïna amb SAR (Fig. 37) i pUC19 (Fig. 38) dels assaigs realitzats en les diferents forces iòniques.

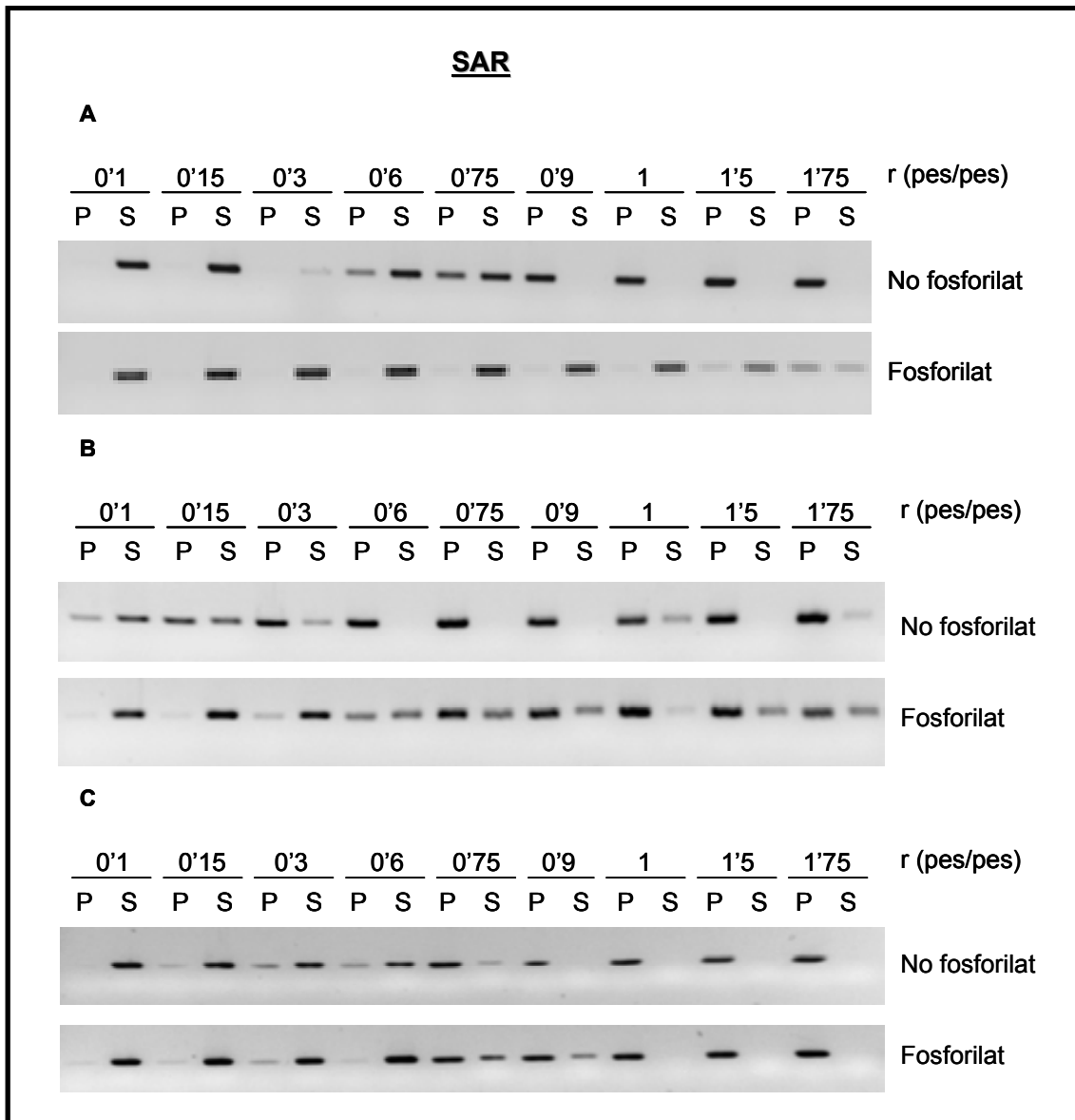


Figura 37. Assaig d'unió de SAR amb el CH1⁰ i CH1⁰-3P. r, relació proteïna/DNA en pes. **A**, 0 mM de NaCl. **B**, 70 mM de NaCl, **C**, 140 mM.

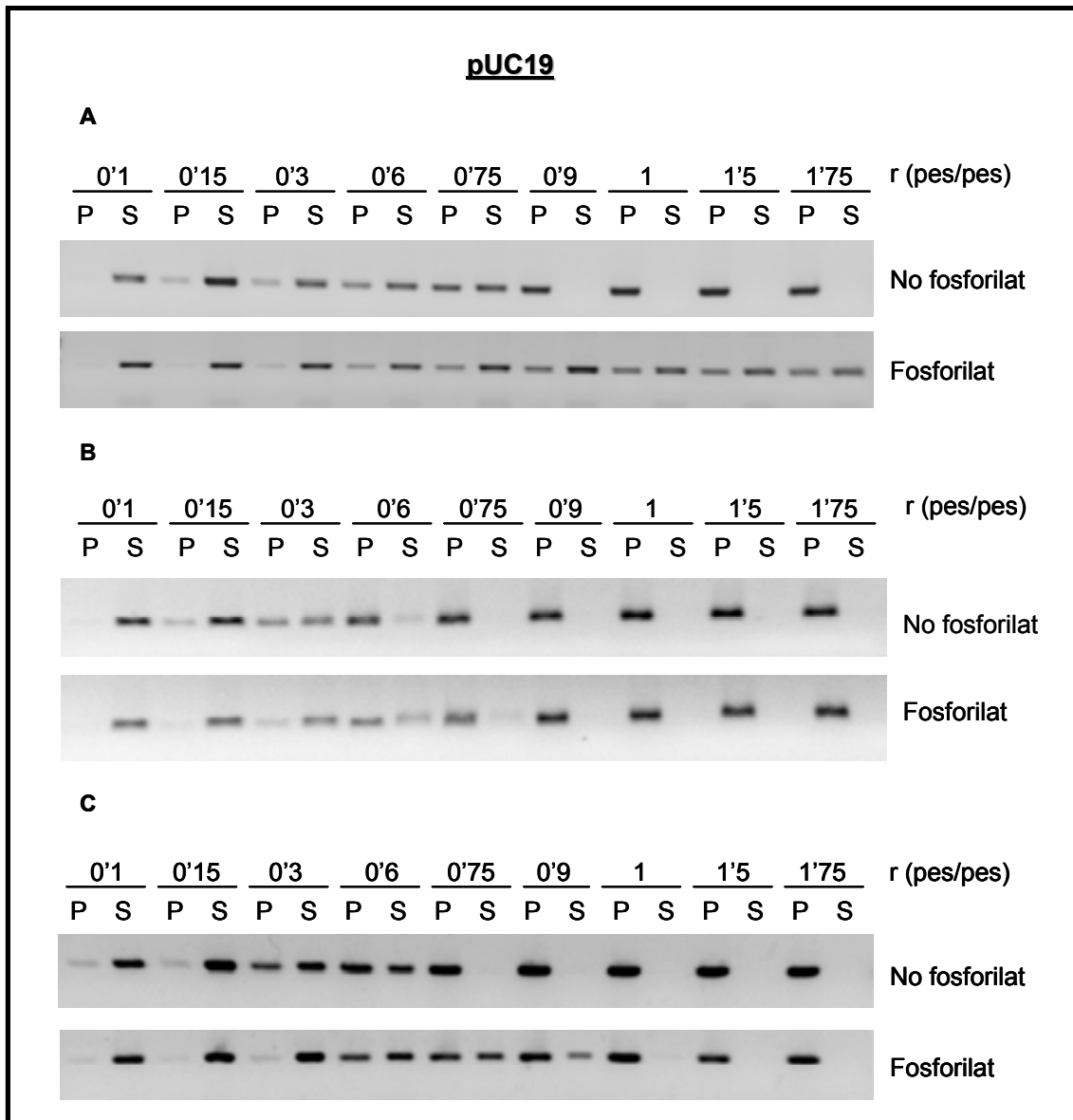


Figura 38. Assaig d'unió de pUC19 amb el CH1⁰ i CH1⁰-3P. r, relació proteïna/DNA en pes. **A**, 0 mM de NaCl. **B**, 70 mM de NaCl, **C**, 140 mM.

Es va quantificar el DNA unit a la proteïna que precipita i el que queda en el sobrenedant sense unir-se a proteïna o formant complexos incapaços de precipitar per tal de representar els gràfics de la figura 39. No s'aprecien grans diferències entre SAR i pUC19 però sí en comparar el CH1⁰ no fosforilat i trifosforilat. A una força iònica de 70 i 140 mM NaCl s'observa que, a una mateixa relació, el CH1⁰-3P sempre precipita menys. La precipitació total del DNA tant amb SAR com pUC19 s'aconsegueix a una o dues relacions superiors en el CH1⁰ fosforilat. Es tracta de cinètiques d'unió cooperativa ja que el DNA precipita de manera proporcional en anar afegint proteïna.

En absència de sal (Fig. 39, A i D) s'obté una cinètica totalment diferent. Amb el CH1⁰, tot i aconseguir la precipitació total del DNA a una relació de 0'9, a relacions menors la quantitat de DNA precipitat és menor comparat amb els casos on hi ha força iònica. Amb el CH1⁰-3P no

Resultats

s'aconsegueix precipitar totalment el DNA a cap relació de les analitzades. Per tant, queda palesa la importància de presència de força iònica en el medi per afavorir la unió cooperativa del C-terminal al DNA, necessitat més evident en el cas del CH1⁰-3P a causa de la seva menor afinitat pel DNA, ja sigui pUC19 o SAR. La pèrdua de cooperativitat és menor en SAR que en pUC19 ja que a 1'75, la relació màxima utilitzada, queda aproximadament un 40 % de SAR per precipitar i encara un 56 % de pUC19.

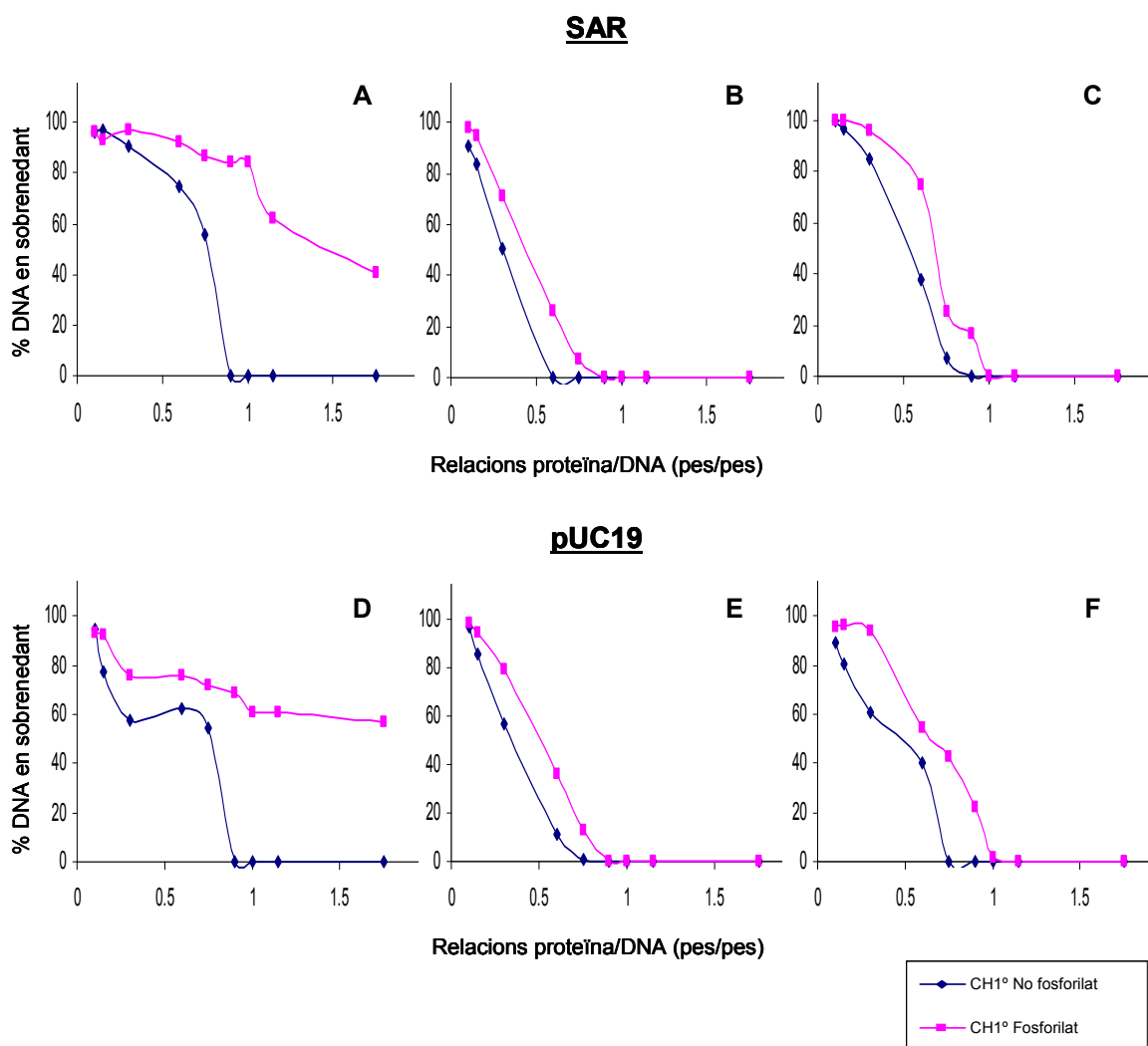


Figura 39. Corbes de precipitació de SAR i pUC19 amb el CH1⁰-3P. **A i D.** 0 mM NaCl. **B i E.** 70 mM NaCl. **C i F.** 140 mM de NaCl.

Per tal de comprovar si aquest comportament cooperatiu està influenciat per la mida del DNA es realitzà un assaig d'unió com els anteriors a una força iònica de 140 mM i amb un oligòmer de 50 pb ric en AT³³⁰ descrit en l'apartat 3.1.3. de Materials i mètodes. Els resultats d'aquest assaig es mostren a la figura 40.

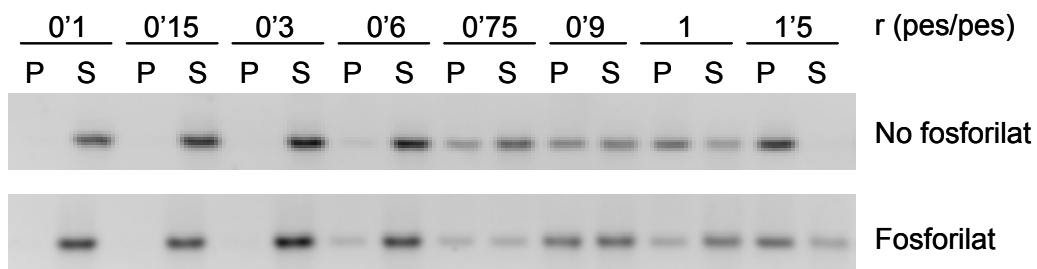


Figura 40. Assaig d'unió amb l'oligòmer de 50 pb a 140 mM de NaCl amb el CH1⁰ i CH1⁰-3P. r, relació proteïna/DNA en pes.

El CH1⁰ té un binding site d'uns 22 pb³³¹, per tant, en l'oligòmer de 50 pb s'hi podran unir només 2 CH1⁰ formant un complex molt petit i difícil de fer precipitar. En la figura 41 s'observa com CH1⁰ i CH1⁰-3P van precipitant de manera similar fins a una relació de 0'75, a partir de la qual, el CH1⁰ continua precipitant fins a la totalitat en la relació 1'5 i el CH1⁰-3P s'estabilitza i no arriba a precipitar totalment en les relacions utilitzades. A 1'5 encara queda el 50 % del DNA per precipitar. El CH1⁰ manté una cinètica cooperativa amb l'oligòmer de 50 pb, tot i que precipitant a partir de majors relacions que SAR i pUC19.

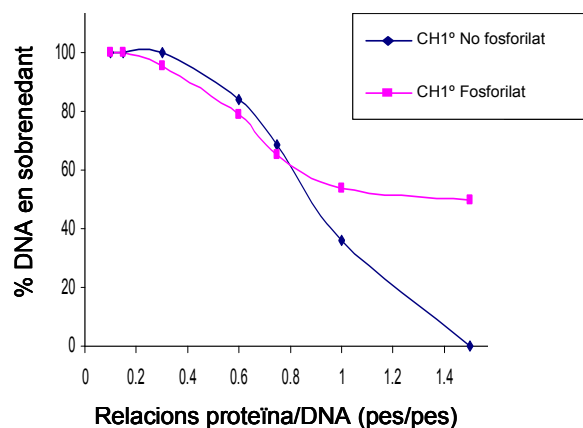


Figura 41. Corba de precipitació de l'oligòmer de 50 pb a 140 mM de NaCl.

4.1.2. Diferències d'afinitat pel DNA del domini C-terminal no fosforilat i fosforilat de la histona H1⁰

Es realitzaren experiments de competició per comprovar les diferències d'afinitat d'unió al DNA del domini C-terminal de la histona H1⁰ fosforilat i no fosforilat. En l'assaig es mantenia constant la quantitat de DNA (SAR) i de CH1⁰ trifosforilat radioactiu (CH1⁰-3P³²) i s'observà com aquest últim era desplaçat pel CH1⁰ i pel CH1⁰-3P no radioactiu (per separat).

Resultats

Inicialment, es realitzà una titració per saber a quina quantitat de $\text{CH1}^0\text{-3P}^{32}$ es treballaria en l'assaig. Es mantingué una quantitat fixa de DNA i s'afegí en quantitats creixents el domini C-terminal fosforilat radioactivament. La reacció es donà en les mateixes condicions que l'assaig (descriu en el punt 3.2.3. de Material i Mètodes) i es visualitzà en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE. La quantitat de C-terminal radioactiu més adequada per a realitzar l'assaig és quan s'observa el 50 % del $\text{CH1}^0\text{-3P}^{32}$ precipitat i l'altre 50 % està en el sobrenedant. En la titració mostrada en la figura 42 correspondria al carril número 3.

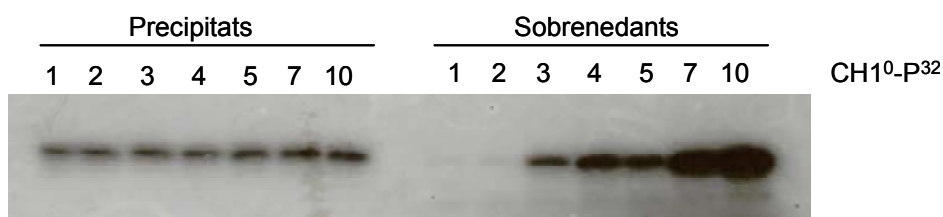


Figura 42. Titració del $\text{CH1}^0\text{-P}^{32}$. Precipitats i sobrenedants de les quantitats creixents de $\text{CH1}^0\text{-P}^{32}$.

Amb aquesta relació es realitzà l'assaig de competició entre el CH1^0 no fosforilat i el $\text{CH1}^0\text{-3P}^{32}$ i entre el $\text{CH1}^0\text{-3P}$ i el $\text{CH1}^0\text{-3P}^{32}$. La competició entre el $\text{CH1}^0\text{-3P}$ no marcat i $\text{CH1}^0\text{-3P}$ marcat ens serveix de control ja que en estar tots dos C-terminals fosforilats, l'afinitat pel DNA és la mateixa i la radioactivitat decau gradualment a mesura que augmenta la quantitat de $\text{CH1}^0\text{-P}$ que s'afegeix. El CH1^0 té més afinitat pel DNA, per tant, li és més fàcil desplaçar el $\text{CH1}^0\text{-3P}^{32}$. Tal com es veu en la autoradiografia de la figura 43, la radioactivitat decau molt ràpidament des del primer moment de la competició.

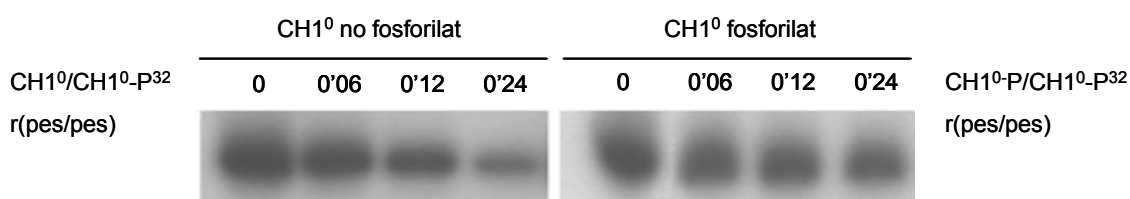


Figura 43. Assaig de competició de $\text{CH1}^0\text{-P}^{32}$ amb el CH1^0 i el $\text{CH1}^0\text{-P}$. Les relacions (pes/pes) indicades en la part superior de la imatge són $\text{CH1}^0/\text{CH1}^0\text{-P}^{32}$ i $\text{CH1}^0\text{-P}/\text{CH1}^0\text{-P}^{32}$.

El gel es tenyí amb coomassie brilliant blue com a control de que la quantitat de proteïna precipitada en cada relació era la mateixa, ja que la quantitat de DNA es mantenia fixa (Fig. 44).

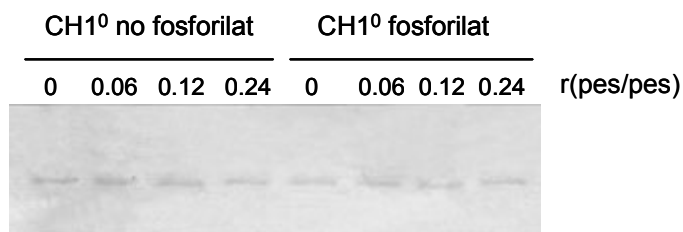


Figura 44. Control de la quantitat de proteïna precipitada, CH1⁰ i CH1⁰ fosforilat, per a cada relació en l'assaig de competició. Les relacions (pes/pes) indicades en la part superior són CH1⁰/CH1⁰-3P³² i CH1⁰-3P/CH1⁰-3P³².

Les quantificacions de les bandes del gel dels precipitats obtinguts en els assaigs de competició de CH1⁰-3P³² amb el CH1⁰ i el CH1⁰-3P (Taula 7) s'expressaren en tant per 1 per tal d'obtenir les cinètiques de CH1⁰ i CH1⁰-3P sobre CH1⁰-3P³² (Taula 8) i es representà en el gràfic de la figura 45. Els valors corresponen als promitjos d'experiments independents.

Taula 7. Quantificació de les bandes dels precipitats obtinguts en els assaigs de competició de CH1⁰-P³² amb el CH1⁰ i el CH1⁰-3P			
CH1 ⁰ /CH1 ⁰ -P ³²		CH1 ⁰ -3P/CH1 ⁰ -P ³²	
relació	CH1 ⁰	relació	CH1 ⁰ -P
0	22,57	0	22,57
0,06	16,32	0,06	21,00
0,12	12,87	0,12	20,00
0,24	7,33	0,24	17,92

Taula 8. Cinètiques de competició de CH1⁰ i CH1⁰-3P sobre CH1⁰-P³²			
Cinètica de CH1 ⁰ sobre CH1 ⁰ -P ³²		Cinètica de CH1 ⁰ -P sobre CH1 ⁰ -P ³²	
CH1 ⁰ /CH1 ⁰ -P ³²	Complex DNA-CH1 ⁰ -P ³²	CH1 ⁰ -3P/CH1 ⁰ -P ³²	Complex DNA-CH1 ⁰ -P ³²
0	1,00	0	1,00
0,06	0,72	0,06	0,93
0,12	0,57	0,12	0,89
0,24	0,32	0,24	0,79

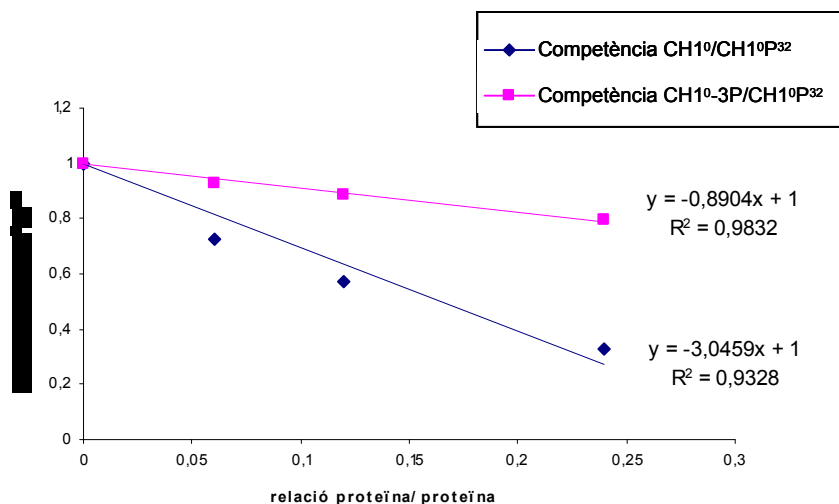


Figura 45. Representació de les cinètiques de competència de CH1⁰/CH1⁰-3P³² i CH1⁰-3P/CH1⁰-3P³². Es mostren els pendents i el quocient de correlació de cada cinètica.

Ajustant les cinètiques a una recta per tal d'obtenir-ne els pendents i fer-ne el quocient s'obté un valor de 3'3. És a dir, el CH1⁰ té aproximadament 3 vegades més afinitat pel DNA que el CH1⁰-3P. Aquest resultat coincideix amb resultats publicats pel nostre grup ³³².

4.1.3. Dicroisme circular: inducció de l'espectre ψ del domini C-terminal de la histona H1⁰ unit a DNA

El DNA en condicions fisiològiques presenta un espectre de dicroisme circular (DC) conservatiu, és a dir, les contribucions d'el·lipticitat negativa i positiva són aproximadament iguals. L'espectre conservatiu pot alterar-se per la disminució de polaritat del medi i per la unió de proteïnes al DNA. Aquesta modificació consisteix en la desaparició dels components positius i en l'aparició d'una intensa banda negativa a 270 nm, coneguda com l'espectre ψ . L'espectre ψ apareix per l'agregació ordenada de les molècules de DNA ^{333, 334} i la seva inducció depèn de les condicions del medi (força iònica, polaritat, etc.), de les característiques del DNA i de la presència de molècules inductores.

El CH1⁰ induïx en el DNA la formació de l'espectre ψ . En aquest apartat es va comprovar si el CH1⁰ fosforilat, total i parcialment, també era capaç d'induir-lo.

Les espècies parcialment fosforilades s'obtingueren fosforilant dos mutants del domini C-terminal de l'H1⁰ per als llocs de fosforilació de l'enzim CDK2 ³³². Així, utilitzarem un CH1⁰ monofosforilat i un CH1⁰ difosforilat (Taula 9).

Taula 9. Mutants del domini C-terminal de la histona H1⁰ de ratolí fosforilats* ³³²			
nº fosforilacions	mutant no fosforilat	posicions mutades	espècie fosforilada
monofosforilat	CH1 ⁰ m 140-152	140-152	CH1 ⁰ p 118
difosforilat	CH1 ⁰ m 152	152	CH1 ⁰ p 118-140
*Les posicions són respecte a la proteïna sencera			

L'assaig es va fer amb fragments de DNA de diferent mida: un fragment de 50 pb, DNA mononucleosomal (d'aproximadament 140 pb), DNA de salmó sonicat (d'aproximadament 500 pb) i el fragment de pUC19 (anteriorment descrit). Com en els experiments anteriors, es mantingué fixa la quantitat de DNA, i es van anar afegint quantitats creixents de proteïna. La força iònica es mantingué a 140 mM.

Amb el fragment de 50 pb només es va observar la formació d'espectre ψ amb el CH1⁰ no fosforilat. Amb les altres espècies fosforilades no hi havia ni formació de l'espectre ψ ni diferències entre els espectres obtinguts en les diferents relacions (espectres no mostrats).

Amb el DNA mononucleosomal, el DNA de salmó i el pUC19 s'observà la formació de l'espectre ψ i amb diferents intensitats segons la relació proteïna/DNA (pes/pes). Descrivim com a màxima intensitat de l'espectre ψ com l'espectre amb el valor mínim d'el·lipticitat molar més negatiu.

Els espectres obtinguts d'aquests DNAs de major mida mostraven que tant el CH1⁰ com el CH1⁰-3P eren capaços d'induir l'espectre ψ i la seva intensitat augmentava a major relació proteïna/DNA fins a una relació màxima a partir de la qual, l'espectre comença a disminuir. En el pUC19, l'espectre ψ induït pel CH1⁰ anava augmentant fins a relació 0'6 (míxim d'el·lipticitat molar = -676740) però en el cas del CH1⁰-3P, fins a 0'5 (míxim d'el·lipticitat molar = -572466). A relacions més altes l'espectre anava desapareixent progressivament a causa de la formació d'agregats proteïna-DNA, la qual és també afavorida per l'elevada força iònica (140 mM NaCl). Aquests agregats formats a relacions altes no generen espectre ψ probablement a causa de la dispersió de llum que es dona per la formació d'agregats massa grans. Es perd absorbància i no es visualitza l'espectre ψ .

Amb el DNA de salmó també s'aconseguia l'espectre ψ més intens amb el CH1⁰ no fosforilat a relació 0'6 (míxim d'el·lipticitat molar = -696069). A relació 0'7, l'espectre era força menys intens. Amb les espècies fosforilades els espectres ψ més intensos s'aconseguien a menors relacions, r=0'4 i r=0'5 (Taula 10). En la figura 46 es mostren els espectres del DNA de salmó, els quals són representatius dels espectres obtinguts amb els altres DNAs (excepte del fragment de 50 pb).

De totes les proteïnes analitzades, la que mostrà l'espectre ψ més intens amb tots els DNAs va ser el CH1⁰ no fosforilat a r=0'6. Però a menors relacions proteïna/DNA les espècies fosforilades varen ser capaces d'induir un espectre ψ més intens que el CH1⁰ (Taula 10).

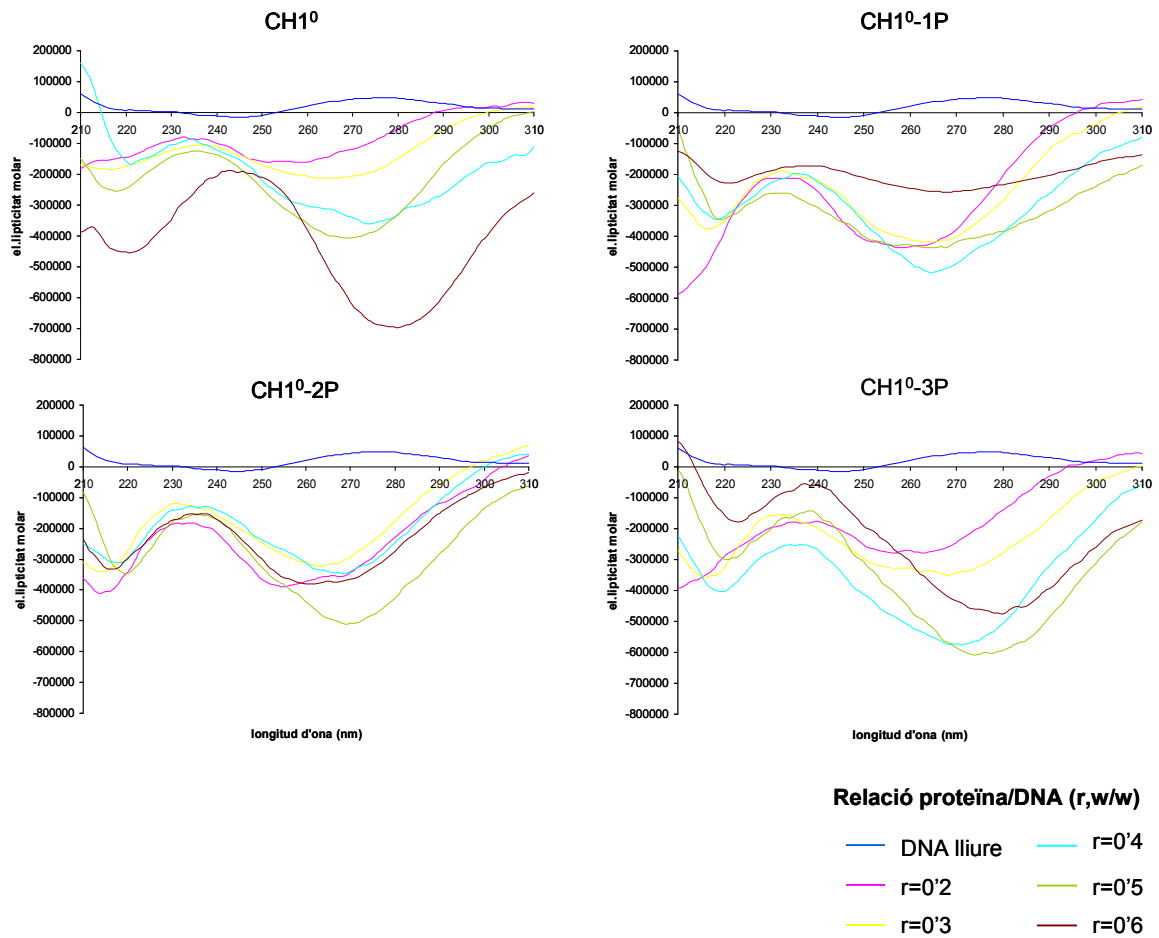


Figura 46. Inducció de l'espectre ψ del DNA de salmó pel domini C-terminal de la histona H1⁰ i les seves espècies fosforilades. Espectres obtinguts per dicroisme circular. Sota els gràfics es mostra la llegenda de les relacions proteïna/DNA (r,w/w). CH1⁰, domini C-terminal de l'H1⁰ no fosforilat. CH1⁰-1P, domini C-terminal de l'H1⁰ monofosforilat. CH1⁰-2P, domini C-terminal de l'H1⁰ difosforilat. CH1⁰-3P, domini C-terminal de l'H1⁰ trifosforilat.

En la taula 10 es mostra a quina relació s'obté el mínim d'el·lipicitat molar dels espectres ψ del DNA de salmó induït pel CH1⁰ i les seves espècies fosforilades. Ressaltats en negreta s'indiquen els valors mínims d'el·lipicitat molar de cada proteïna, els quals es donen a diferents relacions.

Taula 10. Mínims d'el·lipticitat molar dels espectres ψ del DNA de salmó induïts pel domini C-terminal de la histona H1⁰ i les seves espècies fosforilades obtinguts per dicroisme circular

DNA	relació proteïna/DNA (r, w/w)				
	0'2	0'3	0'4	0'5	0'6
CH1 ⁰	-161265	-212639	-360498	-405583	-696069
CH1 ⁰ -1P	-436919	-419521	-517215	-437044	-257427
CH1 ⁰ -2P	-388180	-323089	-348091	-512018	-380017
CH1 ⁰ -3P	-279079	-351124	-575137	-610160	-474319

Ressaltats en negreta s'indiquen els valors mínims d'el·lipticitat molar de cada proteïna. CH1⁰, domini C-terminal de l'H1⁰ no fosforilat. CH1⁰-1P, domini C-terminal de l'H1⁰ monofosforilat. CH1⁰-2P, domini C-terminal de l'H1⁰ difosforilat. CH1⁰-3P, domini C-terminal de l'H1⁰ trifosforilat.

4.1.4. Preferència d'unió del domini C-terminal de la histona H1⁰ per les seqüències de DNA tipus SAR

La histona H1 s'ha caracteritzat com una proteïna d'unió a les regions SAR¹²¹, seqüències riques en A/T en trams homopolimèrics (*A-tracts*)²³². S'ha proposat que aquestes seqüències estan implicades en la dinàmica dels cromosomes²³⁴ i que la unió o dissociació regulada de les H1 a SAR està implicada en l'obertura o tancament localitzat dels *loops* de la cromatina i en conseqüència, contribueix a la regulació transcripcional¹²¹.

Per estudis anteriors del nostre grup es coneix que la unió preferencial de les H1⁰ per SAR ve determinada pel seu domini C-terminal³³⁰. Experiments amb els dominis d'H1⁰ aïllats mostren que mentre el domini C-terminal manté una unió forta i preferencial per les seqüències SAR, els dominis N-terminal i globular mostren una unió dèbil i una pobre especificitat. El domini C-terminal s'uneix primer a SAR i només quan aquesta està saturada, s'uneix a pUC19³³¹.

Per tal de conèixer si aquesta preferència es continua mantenint quan el domini C-terminal es troba fosforilat, es realitzaren una sèrie d'assaigs d'unió on es feien competir SAR i pUC19 en quantitats estequiomètriques afegint el domini C-terminal en quantitats limitades. Les relacions proteïna/DNA (pes/pes) foren de 0'2, 0'25 i 0'3. Com en l'apartat anterior s'obtingué de cada relació un precipitat i un sobrenedant que s'analitzaren en un gel d'agarosa.

En la figura 47 es mostren precipitats i sobrenedants obtinguts amb el CH1⁰. S'observa com a una relació de 0'25 amb el CH1⁰, SAR ja ha precipitat aproximadament en un 90 %, mentre que amb el CH1⁰-3P només n'ha precipitat aproximadament un 10 % (Fig. 48)

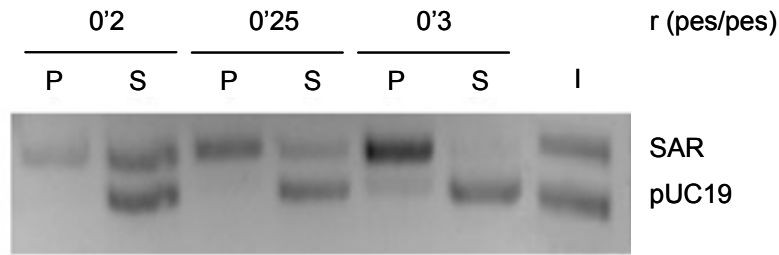


Figura 47. Assaig d'unió SAR/pUC19 amb CH1⁰. r, relació proteïna/DNA en pes. P, precipitat. S, sobrenedant. I, input.

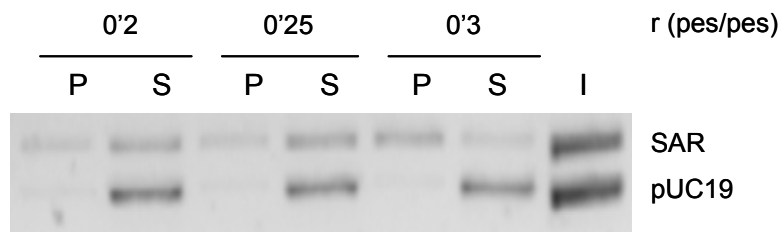


Figura 48. Assaig d'unió SAR/pUC19 amb CH1⁰-3P. r, relació proteïna/DNA en pes. P, precipitat. S, sobrenedant. I, input.

Una altra diferència es produeix en la relació de 0'3. En el cas del CH1⁰ s'aconsegueix fer precipitar gairebé tota la SAR, mentre que el pUC19, continua majoritàriament en el sobrenedant. En canvi, quan es tracta del CH1⁰-3P, a relació 0'3, encara queda SAR en el sobrenedant, i el pUC19 pràcticament no ha precipitat. A tots dos DNAs els costa més precipitar.

Es comprova com el CH1⁰-3P té una menor afinitat aparent pel DNA, però tot i així, es continua demostrant que la preferència per SAR no desapareix. Amb ambdós C-terminal, fins que no ha precipitat tota o gairebé tota la SAR no comença a precipitar el pUC19.

Per descartar que la major precipitació de SAR sigui deguda a la mida lleugerament més gran de SAR, es realitzà el mateix experiment comparant SAR amb un fragment de pUC19 més gran que l'anterior. En aquest cas s'utilitzà un fragment de 763 pb obtingut per PCR. S'observà que es continuava mantenint la preferència per SAR (Fig. 49).

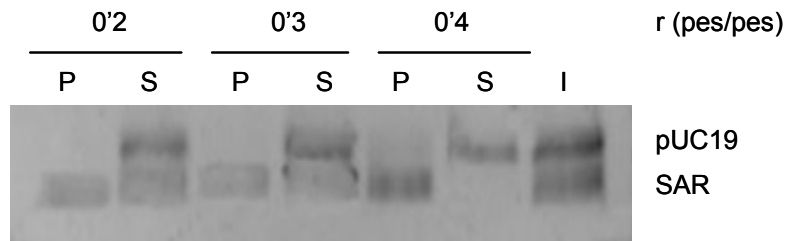


Figura 49. Assaig d'unió SAR/pUC19 de 763 pb amb CH1⁰-3P. r, relació proteïna/DNA en pes. P, precipitat. S, sobrenedant. I, input

Per últim, es repetí l'assaig amb les dues espècies parcialment fosforilades del domini C-terminal de l'H1⁰ descrites en l'apartat anterior (Taula 9). Així, utilitzàrem un CH1⁰ monofosforilat i un CH1⁰ difosforilat. L'assaig es realitzà a una relació proteïna/DNA (pes/pes) de 0'3 (Fig. 50).

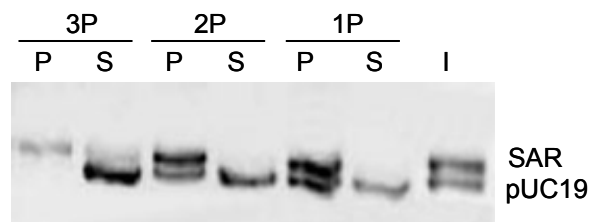


Figura 50. Assaig d'unió SAR/pUC19 amb CH1⁰ i els seus mutants fosforilats. 3P, CH1⁰ totalment fosforilat. 2P, CH1⁰ difosforilat 1P, CH1⁰ monofosforilat. P, precipitat. S, sobrenedant. I, input.

S'observà que les proteïnes parcialment fosforilades (mono- i difosforilada), com en el cas de CH1⁰-3P, tampoc es perdia la preferència per les seqüències de DNA tipus SAR.

Capítol 2

Estudi de l'efecte de la fosforilació en l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e per espectroscòpia FTIR.

Es va estudiar l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e de rata unit a DNA i l'efecte que té la fosforilació sobre aquest per espectroscòpia de FTIR.

Estudis previs realitzats amb la histona H1⁰ sencera i el seu domini C-terminal van demostrar que la fosforilació induïx canvis en l'estructura secundària de la proteïna i, a més, que aquests efectes depenen del nombre i de la posició dels fosfats introduïts ^{332, 335}.

El domini C-terminal en dissolució es troba molt poc estructurat ¹⁷⁷, per aquest motiu i havent-se comprovat per estudis previs amb el domini C-terminal de la histona H1⁰ que les mutacions introduïdes no induïen canvis en l'estructura secundària del domini ³³², ens centrarem en analitzar l'efecte de la fosforilació en complexos de proteïna/DNA.

Els diferents complexos es van formar a relació proteïna/DNA (r,w/w) de r=0'5 i r=0'7. Estudis anteriors amb histona H1 de ratolí havien mostrat un efecte de la relació proteïna/DNA associat a la fosforilació completa en determinats casos. En el domini C-terminal de l'H1e trifosforilat, en passar d'una relació proteïna/DNA de r=0'25 a r=0'7, es mostrava un augment de fulla β del 26 % ³³². En la histona H1⁰ trifosforilada, tant en la proteïna sencera com en el domini C-terminal aïllat, en passar de r=0'5 a r=0'7, el percentatge d'estructura β augmentava un 18% en la proteïna sencera ³³⁵ i un 21% en el domini C-terminal ³³².

El domini C-terminal de la histona H1e de rata conté 4 motius (S/T)-P-X-Z fosforilables per l'enzim CDK2. Es van obtenir una sèrie de mutants que ens van permetre obtenir el domini amb diferents llocs fosforilats (taula 4 de Materials i mètodes). En la figura 51 es mostra un esquema dels mutants obtinguts:



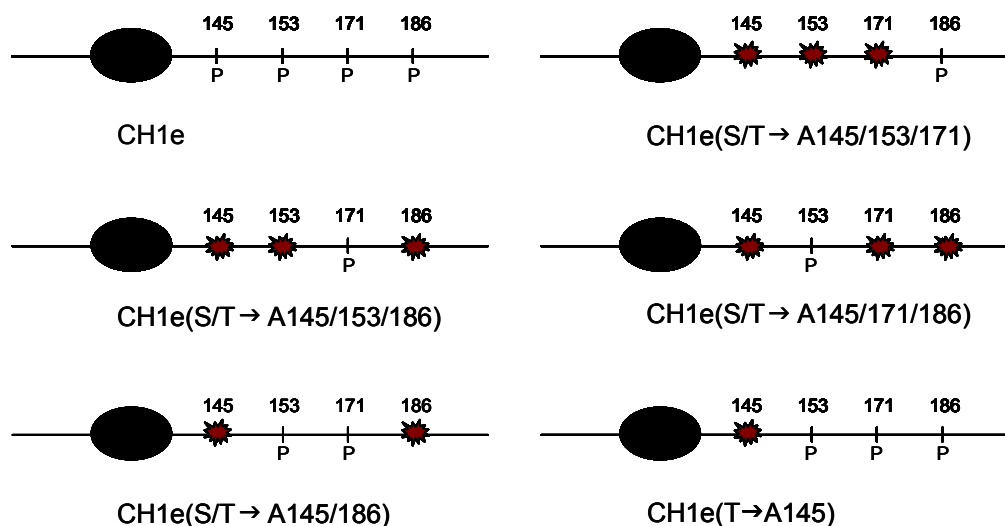


Figura 51. Esquema dels mutants del domini C-terminal de la histona H1e per als llocs de fosforilació de l'enzim CDK2 que s'han obtingut. El símbol vermell indica la mutació S/T→A. P indica les posicions fosforilades de la proteïna.

4.2.1. Estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e de rata no fosforilat unit a DNA

Es realitzà l'anàlisi de l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e (CH1e) no fosforilat a dues relacions de proteïna/DNA ($r,w/w$): $r=0'5$ i $r=0'7$ (Taula 11, Fig. 52).

Taula 11. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i els seus mutants T→A units a DNA

components estructurals	posicions mutades											
	145/153/171		145/153/186		145/171/186		145/186		145		CH1e	
	0'5	0'7	0'5	0'7	0'5	0'7	0'5	0'7	0'5	0'7	0'5	0'7
girs	21	31	21	20	20	22	33	25	21	21	24	20
hèlix α	34	33	28	30	27	28	27	33	34	33	30	32
estructura desordenada	24	14	31	30	32	30	17	24	28	28	26	27
fulla β	21	22	20	20	21	20	23	18	17	18	20	21

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0'5$ i $r=0'7$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm^{-1}) dels espectres s'inclouen en les taules 1 i 2 de l'annex.

El domini C-terminal contenia un 30-32 % d'hèlix α i un 20-21 % de fulla β en totes dues relacions proteïna/DNA ($r,w/w$). La resta de mutants presentaven uns percentatges d'hèlix α i fulla β molt similars al domini i tampoc presentaven diferències significatives en cap de les dues relacions proteïna/DNA. Els percentatges de l'hèlix α estaven entre el 27 i el 34% i la fulla β

entre el 17 i el 23% (Taula 11). En la figura 52 es mostra la descomposició de la regió de l'amida I de l'espectre obtingut per FTIR del domini C-terminal de l'H1e i els seus mutants no fosforilats a $r=0.7$. Aquests espectres són representatius de la relació $r=0.5$, ja que com dèiem, tenen un contingut en hèlix α i fulla β molt similar.

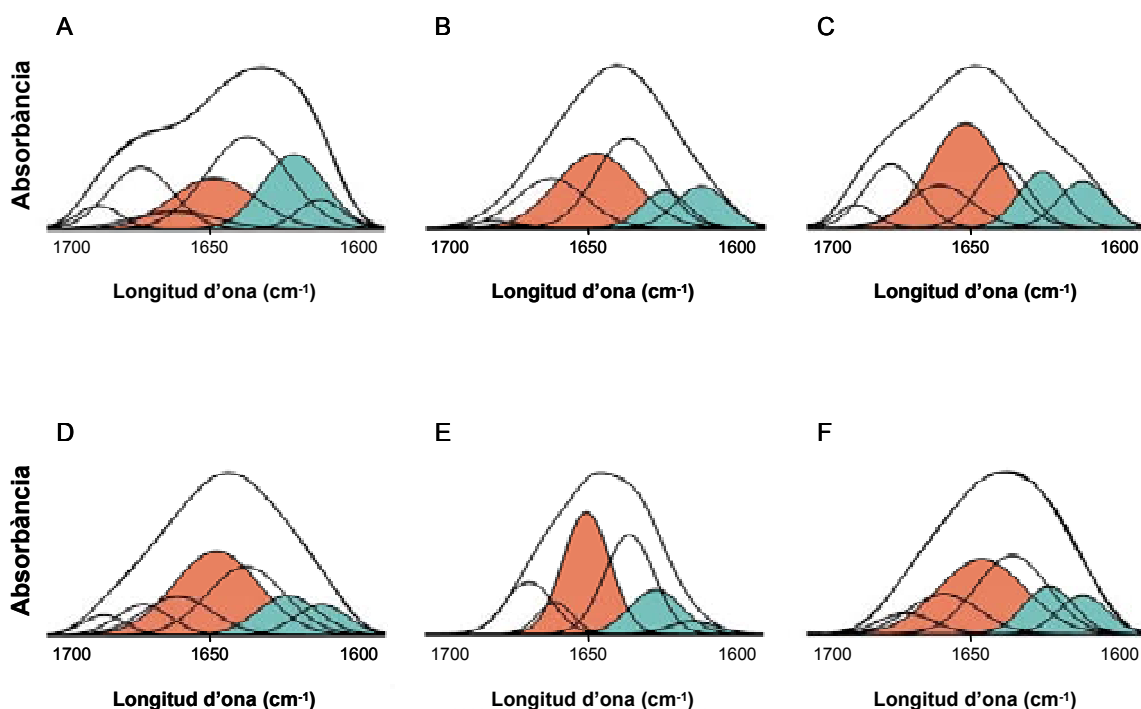


Figura 52. Descomposició de la regió de l'Amida I del domini C-terminal de la histona H1e en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.7$. Espectre obtingut per FTIR, mesurat en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7, i descompost pel mètode de *curvefitting*. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. S'indica en color taronja, el component estructural d'hèlix α i en color blau, la fulla β . A, CH1e(T→A145/153/171). B, CH1e(T→A145/153/186). C, CH1e(T→A145/171/186). D, CH1e(T→A145/186). E, CH1e(T→A145). F, CH1e.

Així, es va comprovar que les diferents mutacions introduïdes a la proteïna no afectaven l'estructura ni feien variar-ne el percentatge dels components estructurals de forma significativa (variabilitat inferior al 5 %). Per tant, no es mostra un efecte de la relació proteïna/DNA pel que fa a l'hèlix α ni a la fulla β .

4.2.2. Estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e de rata fosforilat unit a DNA a una relació proteïna/DNA ($r,w/w$) de $r=0.5$

Un cop obtinguda l'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e de rata i dels seus mutants units a DNA, es procedí a la seva fosforilació per tal d'analitzar els efectes que pogués tenir aquesta sobre la seva estructura.

En l'anàlisi del domini C-terminal de l'H1e totalment fosforilat (4P) i formant complexos a una relació proteïna/DNA de $r=0'5$ contenia un 19 % d'hèlix α i un 29 % de fulla β (Taula 12).

Taula 12. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA ($r=0'5$)

components estructurals	posicions fosforilades						
	0	186P	171P	153P	2P	3P	4P
girs	24	24	22	25	35	20	35
hèlix α	30	29	21	19	15	25	19
estructura desordenada	26	24	27	29	22	21	17
fulla β	20	23	30	27	28	34	29

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0'5$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D_2O en tampó HEPPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm^{-1}) dels espectres s'inclouen en la taula 3 de l'annex. 2P, 153-171P; 3P, 153-171-186P; 4P, 145-153-171-186P.

En comparar els valors obtinguts de les espècies fosforilades amb les no fosforilades, s'observa en general, una disminució de l'hèlix α i un augment de la fulla β . Veiem però, que la fosforilació té efectes diferents en cada espècie fosforilada.

Així, l'hèlix α pateix una disminució del 9-11 % en les espècies monofosforilades en la posició 171 i 153 i la tetrafosforilada (4P). La baixada més destacable és del 15 % en l'espècie difosforilada (2P). L'espècie 186P i la 3P no pateixen cap canvi significatiu (Taula 12).

Pel que fa a la fulla β , respecte a les proteïnes no fosforilades, tampoc mostra un efecte uniforme. L'espècie monofosforilada 186P no pateix cap canvi. En les espècies 153P, 2P i 4P es dona un lleuger augment (7-9 %). La 3P mostra un increment més evident, un 14 % (Taula 12).

4.2.3. Estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e fosforilat de rata unit a DNA a una relació proteïna/DNA ($r,w/w$) de $r=0'7$

Com en l'apartat anterior, es procedí a analitzar els efectes de la fosforilació en el domini C-terminal de l'H1e i en les seves espècies fosforilades formant complexos amb el DNA. En aquest cas la relació proteïna/DNA ($r,w/w$) era $r=0'7$ (Fig. 53).

En els complexos de proteïna/DNA a $r=0'7$, el domini C-terminal totalment fosforilat (4P) contenia uns percentatges d'hèlix α del 17 % i de fulla β del 42% (Taula 13).

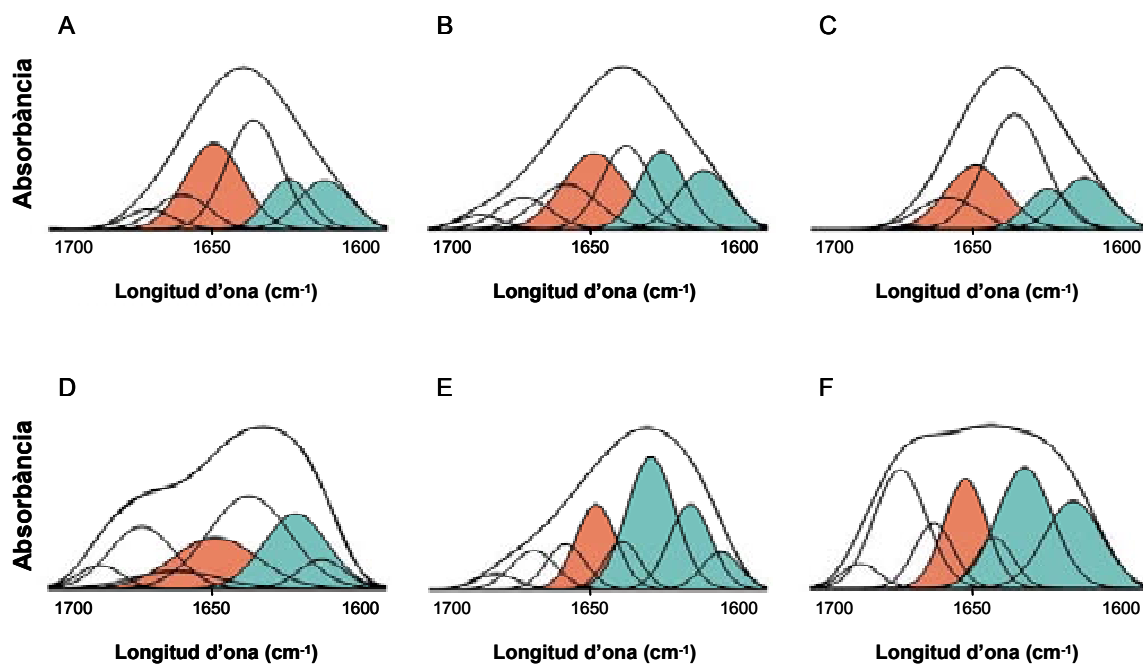


Figura 53. Descomposició de la regió de l'Amida I del domini C-terminal de la histona H1e fosforilat en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.7$. Espectre obtingut per FTIR, mesurat en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7, i descompost pel mètode de *curvefitting*. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. S'indica en color taronja, el component estructural d'hèlix α i en color blau, la fulla. A, 186P. B, 171P. C, 153P. D, 2P. E, 3P. F, 4P.

La fosforilació de les proteïnes dels complexos de DNA a una relació de $r=0.7$, com en la relació de $r=0.5$, no afectà per igual a tots els mutants. Es produí una disminució de l'hèlix α en totes les espècies, més lleugera en les espècies monofosforilades (9-10%) i més notable en les espècies 2P, 3P i 4P (14-15 %). L'espècie 186P no mostra cap variació significativa (Taula 13).

Taula 13. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA ($r=0.7$)

components estructurals	posicions fosforilades						
	0	186P	171P	153P	2P	3P	4P
girs	20	15	25	12	26	20	34
hèlix α	32	27	23	22	18	17	17
estructura desordenada	27	32	20	40	31	8	7
fulla β	21	26	32	26	25	55	42

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.7$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm^{-1}) dels espectres s'inclouen en la taula 4 de l'annex. 2P, 153-171P; 3P, 153-171-186P; 4P, 145-153-171-186P.

La fulla β va patir un augment no significatiu en les espècies 186P, 153P i 2P. En la 171P la fulla β arribà fins al 32% (un augment de l'11%). Més destacable és l'augment en la 4P on l'augment era del 21 % amb un contingut de fulla β final del 42 %. L'augment més important va ser del 34 % en l'espècie 3P, arribant a un total del 55 % (Taula 13, Fig. 53 E).

En comparar les dues relacions proteïna/DNA, $r=0'5$ i $r=0'7$, trobem dos casos en els que s'observà un clar efecte de la relació proteïna/DNA. En l'espècie 3P a $r=0'7$ el valor de la fulla β era un 21 % superior al que es trobà a $r=0'5$. També en el 4P s'observà un augment del 13 % en passar de $r=0'5$ a $r=0'7$. En la resta d'espècies no hi ha una variació significativa.

Així doncs, la fosforilació té un efecte sobre l'estructuració del domini C-terminal de l'H1e. En general s'observa un lleuger descens de l'hèlix α i un augment de la fulla β . Les espècies fosforilades que més fulla β adquireixen són la 3P i la 4P, en les quals aquest increment d'estructuració en forma de fulla β és dependent de la relació proteïna/DNA dels complexos. A major relació proteïna/DNA, més fulla β adquireix la proteïna.

Capítol 3

Estudi de l'efecte de la fosforilació en l'estructura secundària de la histona H1e per espectroscòpia FTIR.

Com comentàvem en el capítol anterior, mostrarem que la fosforilació induïx canvis en l'estructura secundària de l'H1e. Estudis previs realitzats amb la histona H1⁰ sencera i el seu domini C-terminal van demostrar a més, que aquests efectes depenen del nombre i de la posició dels fosfats introduïts ^{336, 337}.

Mitjançant l'espectroscòpia d'infraroig varem estudiar l'estructura secundària de la proteïna H1e i l'efecte que la fosforilació té sobre aquesta.

A partir de la histona H1e es van obtenir una sèrie de mutants per als motius (S/T)-P-X-Z del domini C-terminal que ens permeten obtenir proteïnes amb diferent nombre i llocs de fosforilació (Fig. 54; taula 5 de Materials i mètodes):

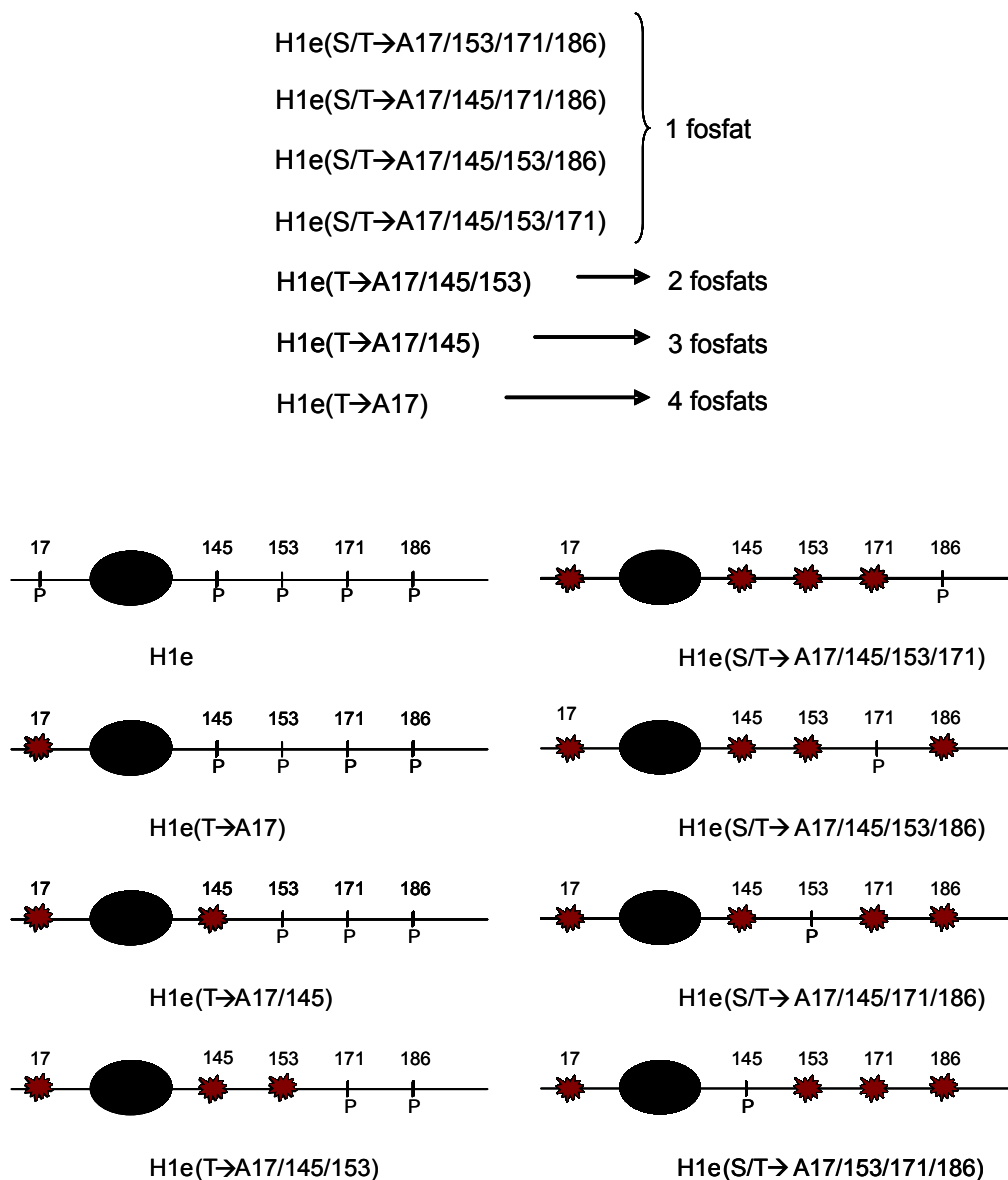


Figura 54. Esquema dels mutants per als llocs de fosforilació de l'enzim CDK2. El símbol vermell indica la mutació S/T→A. P indica les posicions fosforilades de la proteïna.

Les diferents formes fosforilades i no fosforilades es van analitzar en dissolució (tampó 10 mM HEPES, 140mM NaCl) i en presència de DNA. Per estudis previs es coneixia que els dominis N-terminal i C-terminal de la histona H1 en dissolució estan molt poc estructurats, malgrat tenir un elevat contingut de conformacions *turn-like* en ràpid equilibri amb un estat de desplegament. En canvi, en interaccionar amb DNA en condicions salines fisiològiques (140mM de NaCl) adquireixen una total estructuració ^{166, 177}.

Es va estudiar l'estructura secundària dels diferents complexos proteïna-DNA a una relació proteïna/DNA (r,w/w) de r=0'5 i r=0'7. Com es comentava en l'apartat anterior, estudis previs havien descrit un efecte de la relació proteïna/DNA en el cas de la histona H1⁰ trifosforilada, tant en la proteïna sencera com en el domini C-terminal aïllat ^{332, 335}. Contràriament al domini C-terminal de la histona H1e aïllat de l'apartat anterior, en el cas de la histona H1e sencera no varem trobar diferències significatives per efecte de la relació proteïna/DNA, per tant, ens varem centrar en la relació r=0'7.

4.3.1. Estimació de l'estructura secundària de la histona H1e de rata

La histona H1e recombinant conté en total 227 aminoàcids. Els 40 primers residus corresponen al domini N-terminal, els residus 41 a 118 corresponen al domini globular i la resta al domini C-terminal. És a dir, el domini N-terminal representa un 18 % de la proteïna, el domini globular un 30 % i el domini C-terminal un 52 %. Els dominis terminals en dissolució presenten poca estructuració i és en interaccionar amb DNA o inductors d'estructura secundària com el TFE o el NaClO₄ que n'adquireixen ^{167, 170, 177, 240, 241}. El domini globular, en canvi, en dissolució ja conté una elevada estructuració. Està format per tres hèlixs α i una fulla β antiparal·lela molt estables ^{160, 161}.

Previ a l'estudi experimental de l'estructura de la histona H1e per espectroscòpia de FTIR, varem fer un anàlisi estimatiu del contingut en hèlix α i fulla β de l'estructura dels seus dominis aïllats (Taula 16). Per poder fer aquest anàlisi varem recórrer a diversos estudis de cristal·lografia, ressonància magnètica nuclear (RMN) o dicromisme circular publicats en la literatura i estudis de FTIR realitzats en el capítol anterior d'aquest treball..

El domini N-terminal conté dues subregions ¹⁶⁵. La part distal és rica en alanina i prolina i és altament hidrofòbica. Cap dels 14 primers residus de la proteïna té càrrega. En canvi la regió adjacent al domini globular conté molts residus bàsics. Vila i col. ¹⁶⁷ varen descriure l'estructura del domini N-terminal mitjançant el disseny d'un pèptid que correspon a la regió positivament carregada adjacent al domini globular de la histona H1e de ratolí (residus 15-36). Tant per estudis de dicromisme circular com per RMN van concloure que el pèptid en presència del 90 % de TFE s'estructura en dues hèlixs α , l'hèlix N-I que va de T17 a A27 i l'hèlix N-II, de G29 a T34. Dels 22 residus del pèptid, 17 s'estructuren en hèlix α . Les dues hèlixs es troben separades per un motiu Gly-Gly que actua com a motiu d'unió flexible. Aquest motiu Gly-Gly és conservat en molts subtipus de la histona H1 de vertebrats en la mateixa posició ³³⁸. Aquest pèptid

corresponent a la seqüència de ratolí presenta dues substitucions en rata, en la posició 19 (de V a I) i en la posició 34 (de T a A) (Fig. 55). Aquesta elevada homologia en la seqüència dels dos pèptids ens permet utilitzar els valors dels residus aminoacídics estructurats per a l'estimació de l'estructura secundària del domini N-terminal (Taula 14).

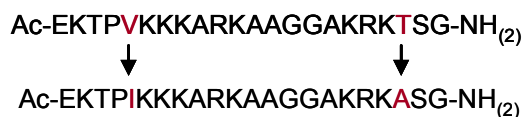


Figura 55. Pèptid del domini N-terminal de ratolí (dalt) i de rata (baix). En vermell, els aminoàcids que varien entre les dues seqüències.

Pel que fa al domini globular, trobem descrits en la literatura el domini globular de la histona H5 (GH5) d'eritròcit de pollastre per espectroscòpia de RMN^{339, 340} i per cristal·lografia de raigs X (171) i el domini globular de la histona H1 (GH1) de pollastre per espectroscòpia bidimensional de RMN¹⁶⁰.

L'estructura cristal·logràfica de GH5 conté tres hèlix α , un β -hairpin en l'extrem C-terminal i tres residus en fulla β entre l'hèlix I i II (residus 44-46), que juntament amb el β -hairpin formen una fulla β antiparalela¹⁶¹. L'estructura cristal·logràfica concorda amb la descrita per RMN³⁴⁰ en la topologia de les hèlix i l'assignació dels residus però difereixen en l'orientació de les hèlix.

En l'estudi de GH1 de pollastre es va sintetitzar un pèptid de 75 residus (residu Met + residus 40-113) que té una seqüència compartida per dominis globulars de diferents subtipus de la histona H1. El pèptid contenia tres hèlix α (T7-S17, L25-Y37, E40-k56), sumant un total de 40 residus i un β -hairpin (L59-L73) de 13 residus. Aquest elevat contingut en hèlix α ja va ser predit teòricament per van Helden³⁴¹ i altres evidències experimentals^{336, 337}.

Existeix una forta homologia estructural entre GH5 i GH1 en la regió de les tres hèlix malgrat haver-hi només un 25 % de identitat de seqüència, reflex de l'elevada pressió selectiva per seleccionar certes característiques estructurals. Donat l'alt grau de similitud entre GH1 i GH5 en les seves estructures secundàries, és raonable assumir un plegament similar pels dos dominis¹⁶⁰.

El domini globular de la histona H1e de rata (objecte del nostre estudi) presenta una homologia de seqüència aminoacídica del 86,7 % amb el domini globular de la histona H1 de pollastre (Fig. 56). Per aquest motiu utilitzem els seus percentatges de contingut en hèlix α i fulla β en la taula 14.

Resultats

		10	20	30	
1	A S G P P V S E L I T K A V A A S K E R S G V S L A A L K K				GH1e rata
1	M A G P S V T E L I T K A V S A S K E R K G L S L A A L K K				GH1 pollastre
		40	50	60	
31	A L A A A G Y D V E K N N S R I K L G L K S L V S K G T L V				GH1e rata
31	A L A A G G Y D V E K N N S R I K L G L K S L V S K G T L V				GH1 pollastre
		70			
61	Q T K G T G A S G S F K L N K				GH1e rata
61	Q T K G T G A S G S F R L S K				GH1 pollastre

Figura 56. Alineament de les seqüències aminoacídiques del domini globular de la histona H1e de rata i de la histona H1 de pollastre. En verd els residus en hèlix α ; en blau els residus en fulla β .

L'estructura secundària del domini C-terminal s'ha obtingut per espectroscòpia d'infraroig analitzant el domini C-terminal de la histona H1e de rata descrit en l'apartat 4.2.1. El nombre d'aminoàcids estructurats en hèlix α i fulla β consten a la taula 14.

En la taula 14 s'expressa el nombre d'aminoàcids corresponents a l'estructuració en hèlix α i fulla β de cada domini de la histona H1e, el total d'aminoàcids i el percentatge total d'aminoàcids estructurats respecte a la proteïna sencera.

Taula 14. Contingut en hèlix α i fulla β de l'estimació d'estructura secundària per dominis i total de la histona H1e de rata no fosforilada i fosforilada (5P)

H1e no fosforilada	component estructural	n° d'aminoàcids				% Total
		N-terminal	Globular	C-terminal	Total	
Tampó [†]	α	0	40	10	50	22
	β	0	13	18	31	14
DNA [‡]	α	17	40	32	94	41
	β	0	13	21	38	17
H1e fosforilada						
Tampó [†]	α	0	40	7	47	21
	β	0	13	41	54	24
DNA [‡]	α	17	40	17	74	33
	β	0	13	42	55	24

[†] Tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH 7.
[‡] Relacions proteïna/DNA r=0'7.

4.3.2. Estructura secundària de la histona H1e no fosforilada en dissolució

En l'anàlisi per FTIR de l'estructura secundària de la histona H1e en dissolució s'obtingué un percentatge del 20 % d'hèlix α i un 22 % de fulla β (Fig. 57 A i C). Segons l'estimació d'estructura secundària que havíem realitzat prèviament (Taula 14), s'obtindria un percentatge de fulla β del 14 %, i en canvi experimentalment, va resultar ser del 22 %. Cal tenir en compte que els percentatges s'han estimat considerant els tres dominis de la proteïna aïllats i el nostre valor experimental prové de la proteïna sencera. Els valors de l'hèlix α estan d'acord amb l'estimació (22 %).

Els altres mutants mostraven uns continguts molt similars, entre 20 i 23 % d'hèlix α i entre 20 i 24 % de fulla β (Taula 17). També es pot apreciar com les bandes dels diferents components de l'estructura tenien posicions pràcticament idèntiques (Taula 5 de l'Annex).

Taula 15. Percentatges (%) d'estructura secundària en dissolució de la histona H1e i els seus mutants T→A

components estructurals	posicions mutades			
	17/153/171/186	17/145/171/186	17/145/153/186	17/145/153/171
girs	27	35	35	40
hèlix α	23	20	20	21
estructura desordenada	30	21	21	15
fulla β	20	24	24	24

components estructurals	posicions mutades			
	17/145/153	17/145	17	H1e
girs	30	29	33	38
hèlix α	23	23	20	20
estructura desordenada	27	25	23	20
fulla β	20	23	24	22

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e en dissolució. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM NaCl, 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm⁻¹) dels espectres s'inclouen en la taula 5 de l'annex.

Es comprovà així que les diferents mutacions introduïdes a la proteïna no n'afectaven l'estructura secundària ni feien variar-ne el percentatge dels components estructurals. En tots els casos els percentatges d'hèlix α i fulla β eren similars (amb una variabilitat inferior al 5 %).

Com els valors d'estructura β obtinguts experimentalment amb la proteïna sencera són més elevats que els valors de l'estimació calculada considerant els tres dominis per separat, semblaria ser que el fet de tenir la proteïna sencera dóna estabilitat al domini C-terminal i li permet adquirir més estructuració.

4.3.3. Estructura secundària de la histona H1e fosforilada en dissolució

En fosforilar la proteïna i analitzar-la per FTIR en dissolució vam observar dos efectes generals: una disminució d'hèlix α i un augment destacable de la fulla β . Aquests efectes s'observaren en totes les espècies i en especial, en l'espècie monofosforilada en la posició 186 (186P). En la figura 57 es pot observar la descomposició de la regió de l'amida I de l'espectre obtingut per FTIR de la histona H1e i de l'H1e 186P en dissolució, no fosforilades i fosforilades.

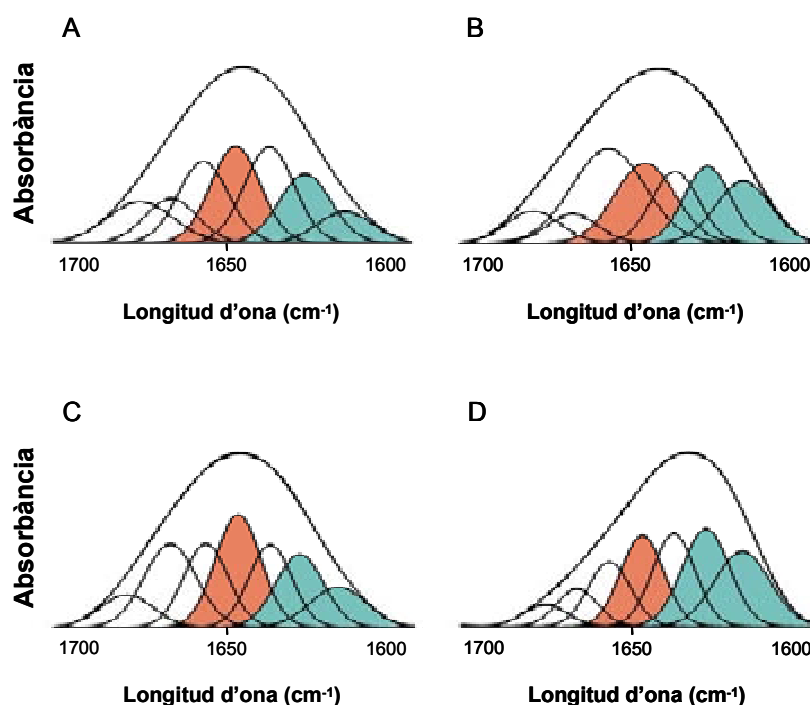


Figura 57. Descomposició de la regió de l'Amida I de la histona H1e en dissolució. Espectre obtingut per FTIR, mesurat en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7 i descompost pel mètode de *curvefitting*. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. S'indica en color taronja, el component estructural d'hèlix α i en color blau, la fulla β . A, H1e no fosforilada. B, H1e fosforilada (5P). C, H1e(T→A17/145/153/171). D, H1e 186P.

Respecte a les proteïnes no fosforilades en dissolució es donà una lleugera disminució d'hèlix α , quedant uns valors entre el 15 i el 19 % i un augment de fulla β , quedant entre el 28 i el 34 % (Taula 16). Més concretament, l'augment es produí en la fulla β de baixa freqüència (Taula 6 de l'Annex).

Taula 16. Percentatges (%) d'estructura secundària en dissolució de la histona H1e fosforilada i les seves espècies fosforilades

components estructurals	posicions fosforilades								
	0	145P	153P	171P	186P	2P	3P	4P	5P
girs	38	26	30	31	24	25	31	29	40
hèlix α	20	16	15	17	18	16	16	16	19
estructura desordenada	20	26	23	23	18	28	23	21	13
fulla β	22	32	32	29	40	31	30	34	28

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e fosforilada en dissolució. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM NaCl, 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm⁻¹) dels espectres s'inclouen en la taula 6 de l'annex.

En el cas de l'espècie monofosforilada en la posició 186 (localitzada en l'extrem distal del domini C-terminal de la proteïna), es manté aquesta lleugera disminució d'hèlix α però a diferència de les altres espècies, l'augment de fulla β és molt més considerable. Aquest augment del 18 % resulta en un total de fulla β del 40 %, fins i tot més que les altres espècies amb grau més elevat de fosforilació. Sembla ser, doncs, que en dissolució hi ha un efecte de la posició fosforilada i que no hi ha una relació proporcional entre l'augment en el nombre de fosfats incorporats a la proteïna i una major inducció de fulla β .

4.3.4. Estructura secundària de la histona H1e no fosforilada unida a DNA

En l'estudi de l'estructura secundària de la histona H1e no fosforilada i unida a DNA a una relació proteïna/DNA (r,w/w) de r=0'7 es va obtenir un contingut del 28 % en hèlix α i del 20 % en fulla β (Taula 17, Fig. 58 A). Els complexos formats amb les proteïnes mutants no presentaven diferències significatives (Taula 17, Fig. 58 B-F).

Les proteïnes no fosforilades en presència de tampó presentaven un 20-23 % d'hèlix α . En presència de DNA aquesta augmenta fins a uns valors de 28-32 % (Taula 17). Contràriament, els percentatges de fulla β es mantenen igual que en la proteïna en tampó, 20-24 %. La unió a DNA provoca l'augment d'hèlix α que afecta per igual a tots els mutants. Així també es va comprovar novament com les mutacions *per se* no induïen canvis significatius en l'estructura secundària de les proteïnes.

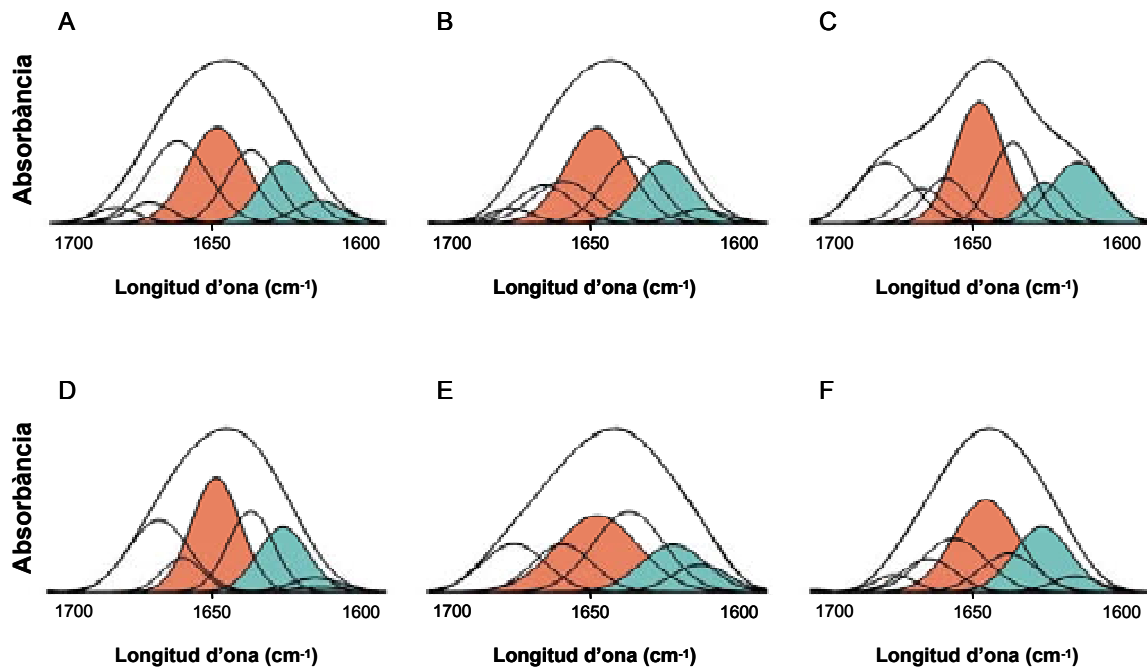


Figura 58. Descomposició de la regió de l'Amida I de la histona H1e en complexos proteïna/DNA (r,w/w) a r=(0'7). Espectre obtingut per FTIR, mesurat en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7, i descompost pel mètode de *curvefitting*. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. S'indica en color taronja, el component estructural d'hèlix α i en color blau, la fulla β . A, H1e. B, H1e(T→A17). C, H1e(T→A17/145). D, H1e(T→A17/145/153). E, H1e(T→A17/145/171/186). F, H1e(T→A17/145/153/171).

Els valors de l'estimació d'estructura de la histona H1e no fosforilada unida a DNA són d'un 39 % per l'hèlix α i d'un 15 % per a la fulla β (Taula 14), representant un augment respecte a l'H1e no fosforilada en dissolució del 17 % d'hèlix α i un manteniment de la fulla β . En els valors obtinguts experimentalment, respecte a les proteïnes en dissolució, en l'hèlix α l'augment que es dona és entre el 6 i l'11 %. La unió a DNA no incrementa els percentatges de fulla β ni experimentalment ni en les estimacions. En el cas de l'hèlix α , contràriament al cas de la proteïna no fosforilada en tampó, els valors no concorden amb l'estimació.

Taula 17. Percentatges (%) d'estructura secundària de la histona H1e i els seus mutants T→A units a DNA

components estructurals	posicions mutades			
	17/153/171/186	17/145/171/186	17/145/153/186	17/145/153/171
girs	26	26	31	32
hèlix α	29	28	28	32
estructura desordenada	22	25	18	12
fulla β	23	21	23	24

components estructurals	posicions mutades			
	17/145/153	17/145	17	H1e
girs	30	33	28	34
hèlix α	30	28	31	28
estructura desordenada	19	16	19	18
fulla β	21	23	22	20

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e en complexos proteïna/DNA (r,w/w) a r=(0'7). Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM NaCl, 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm⁻¹ dels espectres s'inclouen en la taula 7 de l'annex.

Així doncs, s'observà com la unió de l'H1e no fosforilada a DNA indueix un augment d'hèlix α però no afecta a la proporció de fulla β respecte a la proteïna en dissolució. Podria ser reflex de l'estructuració del domini C-terminal.

4.3.5. Estructura secundària de la histona H1e fosforilada unida a DNA

Un cop analitzada l'estructura secundària de l'H1e i els seus mutants units a DNA, es procedí a l'anàlisi de les proteïnes fosforilades també unides a DNA (Fig. 59).

La formació de complexos de les proteïnes fosforilades amb el DNA no altera els valors d'hèlix α . Aquests es continuen mantenint entre el 14 i el 18 % (Taula 18). En canvi, la unió a DNA provoca un major augment d'estructuració en fulla β . Els valors de fulla β en les proteïnes fosforilades dels complexos presentaren un augment respecte a les proteïnes fosforilades en dissolució (Taula 16), arribant al 38-46 % i de fins al 50 % en el cas de l'espècie monofosforilada en la posició 186. Aquesta espècie fosforilada en dissolució ja presentava un percentatge de fulla β del 40 %, superior a la resta d'espècies fosforilades. L'espècie amb més estructuració en fulla β de les espècies amb més d'un fosfat és la trifosforilada amb un 46 %. Tant l'espècie 4P com la 5P tenen percentatges inferiors (42 % i 41 %, respectivament).

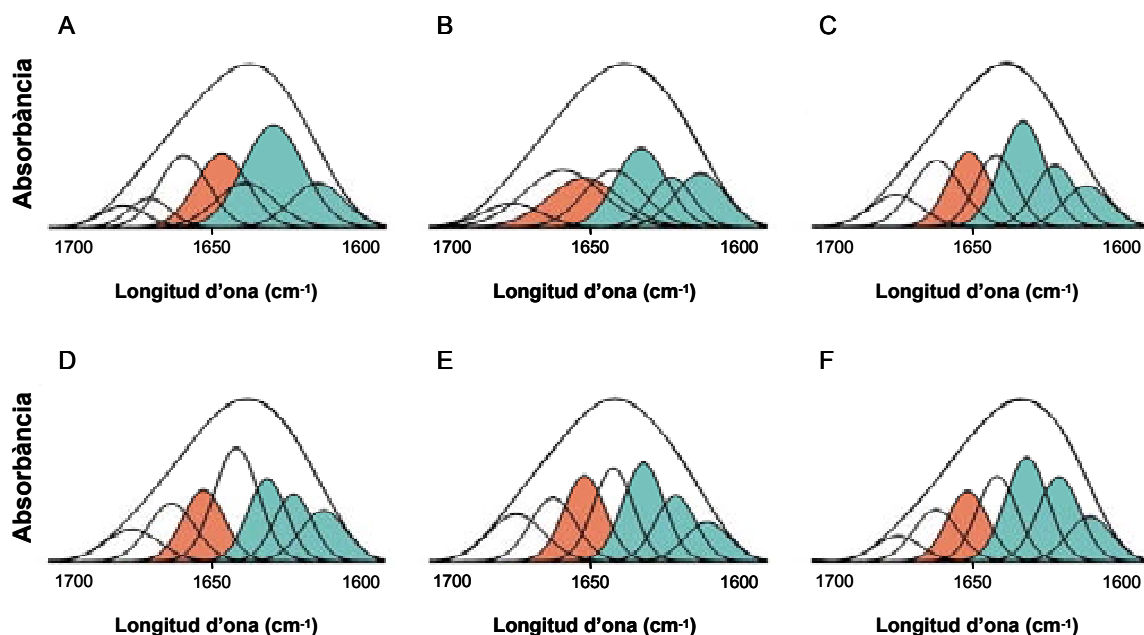


Figura 59. Descomposició de la regió de l'Amida I de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.7$. Espectre obtingut per FTIR, mesurat en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7, i descompost pel mètode de *curvefitting*. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. S'indica en color taronja, el component estructural d'hèlix α i en color blau, la fulla β . A, 5P. B, 4P. C, 3P. D, 2P. E, 153P. F, 186P.

En les proteïnes fosforilades dels complexos amb DNA, els valors d'hèlix α van disminuir un 10-14 % i els de fulla β van augmentar entre el 18 i el 30 % respecte a les proteïnes no fosforilades dels complexos. El màxim increment observat és en el mutant 186P (30 %) seguit del mutant trifosforilat (26 %) (Taula 20).

Taula 18. Percentatges (%) d'estructura secundària de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA

components estructurals	posicions fosforilades								
	0	145P	153P	171P	186P	2P	3P	4P	5P
girs	34	22	26	22	18	21	24	26	28
hèlix α	28	14	17	17	15	15	16	16	18
estructura desordenada	18	26	17	20	17	24	14	16	13
fulla β	20	38	40	41	50	40	46	42	41

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.7$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. Les bandes dels components individuals (cm^{-1}) dels espectres s'inclouen en la taula 8 de l'annex.

Per tant, en les proteïnes fosforilades unides a DNA es va observar un efecte dependent de la posició fosforilada i que un major nombre de fosforilacions no es correlaciona amb un augment d'estructuració, ja que com es pot observar en la taula 20, les espècies 4P i 5P contenen menys β que la 3P.

Capítol 4

Caracterització de la interacció amb el DNA de la histona H1e i les seves espècies fosforilades.

4.4.1. Capacitat d'agregació del DNA de les espècies fosforilades de la histona H1e i del seu domini C-terminal

Seguint amb l'estudi dels efectes de la fosforilació en la histona H1e i dels seus mutants per als motius (S/T)-P-X-Z, varem fer una anàlisi de la capacitat d'agregació de fragments de DNA que mostraven aquestes espècies fosforilades per mitjà de gels de retard en agarosa.

Els fragments de DNA (de 50 pb) formen uns complexos amb la proteïna que en funció de la capacitat d'agregació de la proteïna tindran una mida determinada que en alguns casos impedirà que el complex pugui entrar en el gel.

Primerament, calia saber la relació proteïna/DNA (pes/pes) en la qual s'observés tant DNA lliure com la formació de complexos. En el cas del domini C-terminal de l'H1e (CH1e) aquestes relacions ja les coneixiem per experiments anteriors del nostre grup ³³², utilitzarem dues relacions: $r=0'45$ i $r=0'5$.

Per l'assaig amb l'H1e sencera i les seves espècies fosforilades es va fer una titració amb l'H1e per tal de trobar la relació adequada. La relació escollida va ser $r=1'05$. Com es pot observar en el gel de la figura 60, corresponent a la titració de l'H1e sencera, la primera relació on es formen agregats és a $r=1$. A partir de $r=1'05$ els agregats formats ja no entren en el gel.

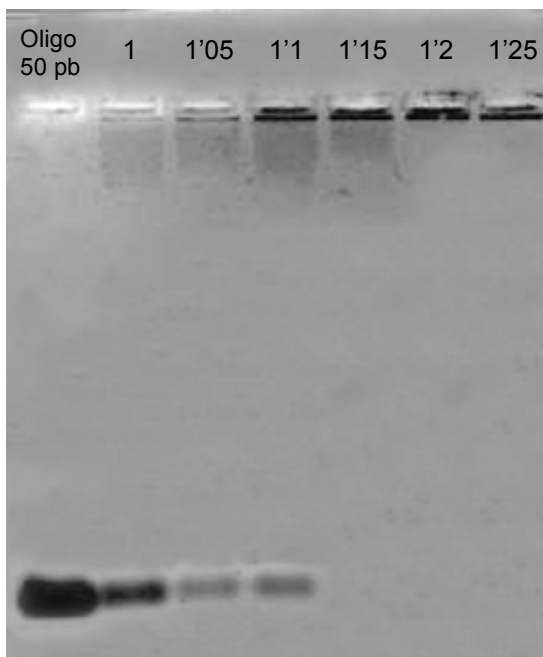


Figura 60. Titració de DNA amb l'H1e sencera.

Petites variacions en la relació proteïna/DNA (pes/pes) afecten molt a la formació dels agregats, per aquest motiu és important realitzar un correcte equilibrat de les proteïnes que s'utilitzen en l'assaig mitjançant electroforesi SDS-PAGE (Fig. 61 C per al domini C-terminal i Fig. 62 B per a la proteïna sencera). Les proteïnes que s'utilitzaren en l'assaig foren el CH1e i

Resultats

les seves espècies fosforilades: 153P, 171P, 186P, 2P, 3P i 4P (Taula 4); i l'H1e i les seves espècies fosforilades: 171P, 186P, 2P, 3P, 4P i 5P (Taula 5).

Amb el domini C-terminal a $r=0'45$ la màxima agregació es donà en les espècies amb major grau de fosforilació, en 3P i 4P. El domini sense fosforilar i les altres espècies parcialment fosforilades també presentaven capacitat d'agregar però en menor grau, ja que com es pot observar en la figura 61 A, hi ha formació d'agregats de menor mida i que poden entrar en el gel i a més, encara queda DNA lliure. Les espècies amb menor capacitat d'agregació són la 186P i la 2P. A $r=0'5$ augmentà la formació d'agregats amb totes les proteïnes excepte en el cas de 153P (Fig. 61, B). A aquesta relació el CH1e no fosforilat ja aconseguia agregar la totalitat del DNA com ho feien 3P i 4P.

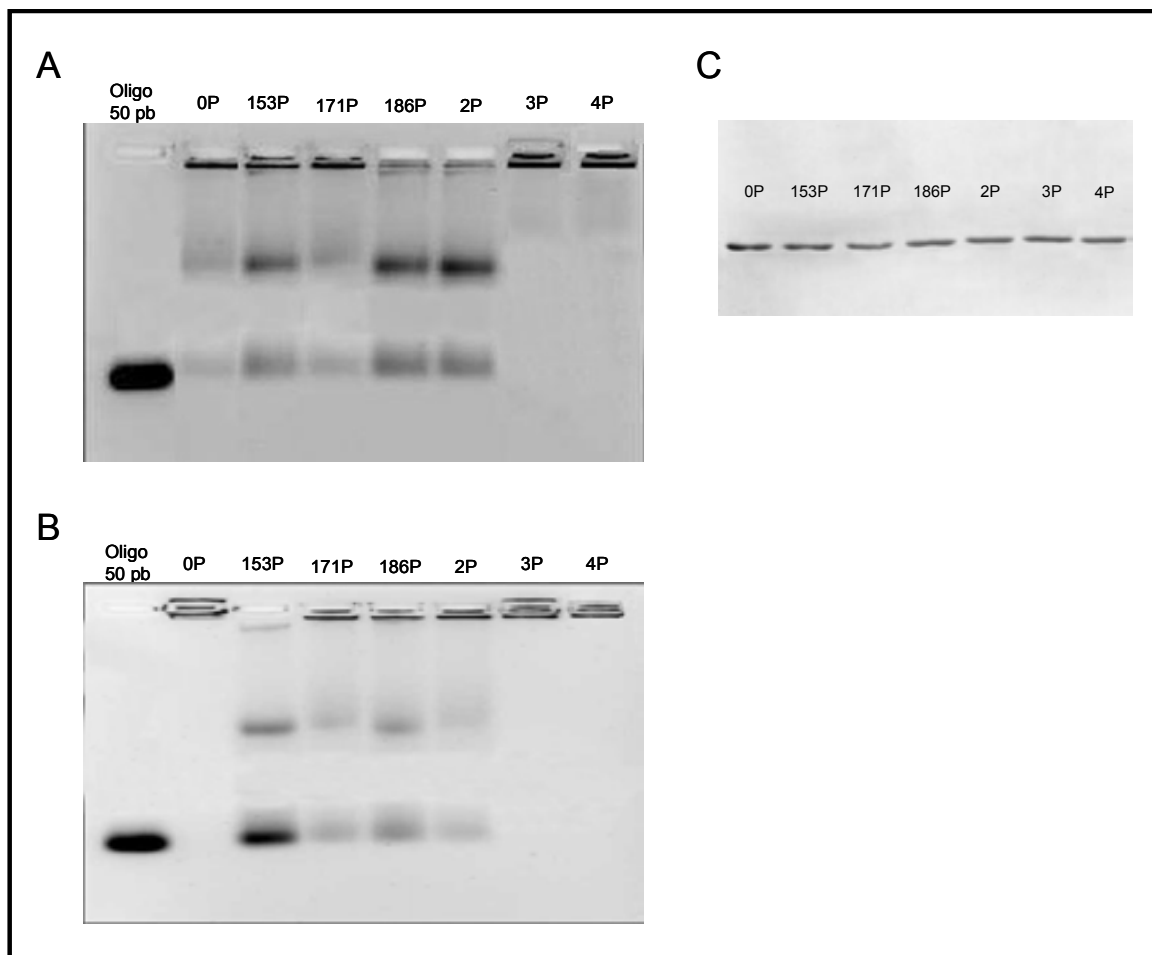


Figura 61. Gel de retard de fragments de DNA de 50 pb amb el domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades. A, $r=0'45$. B, $r=0'5$. C, gel SDS-PAGE del correcte equilibrat de les proteïnes.

En el cas de la proteïna sencera i les seves espècies fosforilades s'observà que la proteïna que menor capacitat d'agregació del DNA presentava era l'espècie monofosforilada 171P. La

proteïna no fosforilada i l'espècie difosforilada presentaven una capacitat d'agregació del DNA intermèdia i les 3P, 4P i 5P agregaven la totalitat dels fragments del DNA (Fig. 62 A).

Es tornà a evidenciar, com en el capítol anterior, les característiques diferencials de l'espècie monofosforilada en la posició 186. A diferència de l'altre espècie monofosforilada i de la difosforilada, la 186P presentà la capacitat d'agregar totalment els fragments DNA, com ho feien els mutants 3P, 4P i 5P (Fig. 62 A). Aquestes espècies fosforilades que tenen la capacitat d'agregar totalment el DNA, coincideixen en ser les que més fulla β adquireixen.

Es veu doncs, com la capacitat d'agregació total es dóna sempre a partir de l'incorporació de tres grups fosfat, a excepció de l'espècie monofosforilada 186P que també mostra aquesta capacitat.

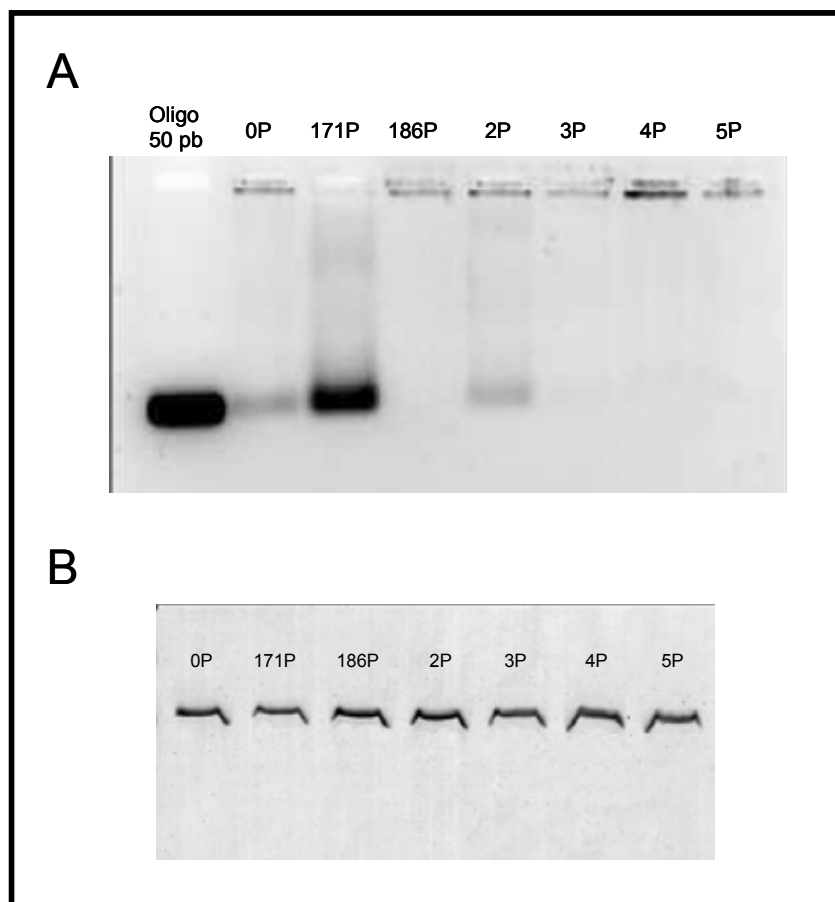


Figura 62. A, gel de retard de fragments de DNA de 50 pb amb la histona H1e i les seves espècies fosforilades a relació proteïna/DNA de $r=1'05$. B, gel SDS-PAGE del correcte equilibrat de les proteïnes.

4.4.2. Determinació de l'afinitat relativa pel DNA de la histona H1e i les seves espècies fosforilades

Per determinar les afinitats relatives de les diferents espècies fosforilades de la histona H1e es van realitzar assaigs de competició entre una de les espècies fosforilades de la histona H1e i un altre subtipus d'histona (H1⁰ i H1c) o la mateixa H1e no fosforilada, per una quantitat limitada de DNA. Els assaigs es van realitzar amb un excés de proteïna (3:1) i a concentració de NaCl fisiològica (140 mM) on la unió al DNA és cooperativa ¹²¹.

En total es van fer assaigs de competició amb 21 parelles diferents (Fig 63 i 64). Aquest nombre de parelles ens permeten estimar les afinitats relatives de cada espècie fosforilada de la histona H1e pel DNA i calcular l'error associat a l'estimació d'aquestes.

Tal com es descriu en l'apartat 3.2.4., els assaigs s'analitzaren per mitjà d'electroforesis SDS-PAGE en les competicions entre diferents subtipus d'histona i electroforesis AU-PAGE en les competicions entre diferents espècies fosforilades de l'H1e.

S'observà com en totes les competicions de totes les espècies fosforilades de l'H1e i l'H1c amb l'H1⁰, aquesta última sempre és més abundant en els complexos de DNA (precipitats) o la menys abundant en els sobrenedants (Fig. 63). Si ens fixem en les competicions de l'H1e amb les seves espècies fosforilades, sempre la més abundant en els precipitats era l'H1e no fosforilada (Fig. 64).

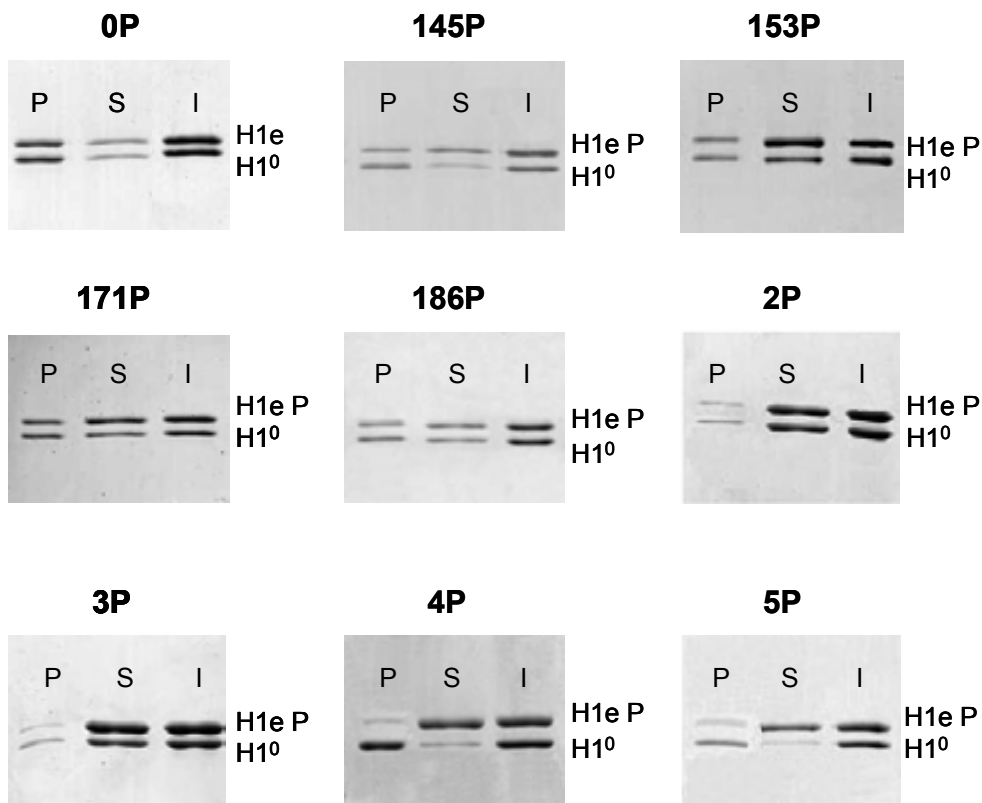


Figura 63. Assaigs de competició pel DNA SAR entre H1e i els seus mutants fosforilats i H1⁰ i entre H1c i H1⁰.

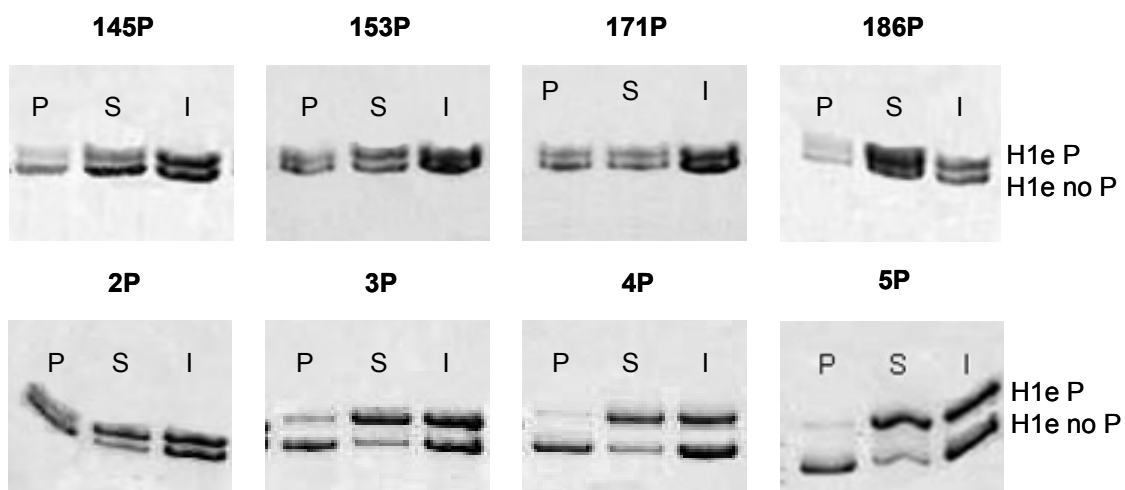


Figura 64. Assaigs de competició pel DNA SAR entre l'H1e no fosforilada (H1e no P) i les seves espècies fosforilades (H1e P).

La proporció de cada subtipus o espècie fosforilada en els complexos de DNA (precipitats) i lliure en els sobrenedants es va determinar a partir dels gels d'acrilamida tenyits amb coomassie brilliant blue.

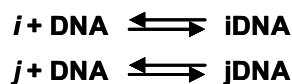
En la taula 19 es mostra la quantificació de cada precipitat i de cada sobrenedant de les parelles de proteïnes que competien en els assaigs.

Taula 19. Intensitats de les bandes dels experiments de competició pels fragments de DNA per parelles de subtipus i/o espècies fosforilades.

subtipus/espècie fosforilada	intensitat bandes		subtipus/espècie fosforilada	intensitat bandes	
	P	S		P	S
H1e 0P	0,85	0,04	H1e 145P	1,65	2,66
H1 ⁰	0,85	0,03	H1c	1,83	4,22
H1e 0P	1,20	0,58	H1e 145P	0,86	2,43
H1 ⁰	1,28	0,42	H1c	1,01	3,79
H1e 145P	0,42	2,19	H1e 153P	1,17	2,30
H1 ⁰	0,28	0,81	H1c	1,62	3,55
H1e 145P	0,34	1,35	H1e 153P	0,79	2,16
H1 ⁰	0,21	0,45	H1c	1,25	3,55
H1e 153P	0,28	1,52	H1e 171P	0,76	1,82
H1 ⁰	0,26	0,61	H1c	1,14	3,15
H1e 171P	0,37	0,79	H1e 145P	0,84	1,87
H1 ⁰	0,42	0,39	H1e 0P	1,94	2,58
H1e 186P	0,22	0,36	H1e 153P	0,17	0,52
H1 ⁰	0,32	0,25	H1e 0P	0,32	0,56
H1e 2P	0,11	3,41	H1e 171P	0,22	0,29
H1 ⁰	0,25	2,37	H1e 0P	0,37	0,33
H1e 2P	0,09	2,88	H1e 186P	0,44	10,02
H1 ⁰	0,24	2,03	H1e 0P	0,54	6,31
H1e 3P	0,06	5,24	H1e 2P	1,14	2,92
H1 ⁰	0,26	2,25	H1e 0P	2,18	1,56
H1e 4P	0,46	3,00	H1e 3P	0,48	1,51
H1 ⁰	2,30	0,40	H1e 0P	1,40	0,66
H1e 5P	0,67	4,05	H1e 4P	0,25	3,92
H1 ⁰	1,52	0,24	H1e 0P	3,02	1,23
H1e 0P	2,37	2,65	H1e 5P	0,25	4,75
H1c	1,15	4,17	H1e 0P	2,82	1,23
H1e 0P	1,24	2,50			
H1c	0,58	4,20			

A partir de les intensitats de les bandes dels precipitats (complexos proteïna/DNA) i dels sobrenedants (proteïna lliure) en les electroforesis SDS-PAGE i AU-PAGE (Taula 19) es van determinar les afinitats relatives pel DNA de la histona H1e i de cada una de les espècies fosforilades (Taula 20) pel mètode utilitzat per Orrego i col.²⁰⁴ descrit a continuació.

Els equilibris per a cada reacció d'afinitat entre dues proteïnes són:



on *i* i *j* són les espècies que competeixen per una quantitat limitada de DNA en cada reacció i *i*DNA i *j*DNA són els corresponents complexos formats.

Les constants d'equilibri són:

$$K_{\text{DNA}i} = \frac{[i\text{DNA}]}{[i] + [\text{DNA}]}$$

$$K_{\text{DNA}j} = \frac{[j\text{DNA}]}{[j] + [\text{DNA}]}$$

Així l'afinitat d'un mutant de l'H1e i pel DNA respecte al mutant j es defineix com:

$$\frac{K_{\text{DNA}i}}{K_{\text{DNA}j}} = \frac{\frac{[i\text{DNA}]}{[i] + [\text{DNA}]}}{\frac{[j\text{DNA}]}{[j] + [\text{DNA}]}}$$

En la reacció, les constants d'afinitat relativa no depenen de la concentració de DNA lliure perquè és la mateixa per ambdós equilibris, per tant, es pot dir que l'afinitat relativa d'un mutant i pel DNA respecte a l'altre mutant j és:

$$\frac{K_{\text{DNA}i}}{K_{\text{DNA}j}} = \frac{[i\text{DNA}] \times [j]}{[i] \times [j\text{DNA}]}$$

Amb l'equació anterior com expressió de la constant d'afinitat relativa es van obtenir les afinitats relatives de la histona H1e i dels diferents mutants fosforilats per el DNA SAR.

Per exemple es va calcular l'afinitat relativa de l'H1e no fosforilada (H1e 0P) pel DNA respecte a la H1⁰.

$$K_{\text{dna}}^{\text{H1e 0P/H1}^0} = \frac{[\text{H1e 0P-DNA}] [\text{H1}^0]}{[\text{H1e 0P}] [\text{H1}^0\text{-DNA}]}$$

$$K_{\text{dna}}^{\text{H1e 0P/H1}^0} = \frac{[0'2] [0'92]}{[0'71] [0'31]}$$

$$K_{\text{dna}}^{\text{H1e 0P/H1}^0} = 0'81$$

Es repetí aquest càlcul amb els valors de les intensitats de la taula 19 per tal obtenir totes la resta d'afinitats relatives de cada parella de mutants analitzada. En la taula 20 es mostren totes les afinitats relatives calculades.

Taula 20. Valors de les afinitats relatives entre l'H1e no fosforilada i les seves espècies fosforilades

$K_{DNA}^{i/j}$	afinitat pel DNA		$K_{DNA}^{i/j}$	afinitat pel DNA
H1e 0P/H1 ⁰	0,685	0,68	H1e 145P/H1e 0P	0,630
H1e 145P/H1 ⁰	0,566	0,538	H1e 153P/H1e 0P	0,585
H1e 153P/H1 ⁰	0,432		H1e 171P/H1e 0P	0,687
H1e 171P/H1 ⁰	0,442		H1e 186P/H1e 0P	0,025
H1e 186P/H1 ⁰	0,466		H1e 2P/H1e 0P	0,023
H1e 2P/H1 ⁰	0,299	0,248	H1e 3P/H1e 0P	0,518
H1e 3P/H1 ⁰	0,102		H1e 4P/H1e 0P	0,279
H1e 4P/H1 ⁰	0,027		H1e 5P/H1e 0P	0,150
H1e 5P/H1 ⁰	0,025			
H1e 0P/H1c	3,617	3,250		
H1e 145P/H1c	1,430	1,328		
H1e 153P/H1c	1,113	1,035		
H1e 171P/H1c	1,147			

* Els valors corresponen a experiments individuals.

4.4.2.1. Estimació de les afinitats relatives de la histona H1e i les seves espècies fosforilades a partir d'experiments per parelles.

La competició entre els diferents subtipus permet estimar amb precisió les afinitats relatives dels subtipus o mutants. S'utilitza un mètode estadístic per realitzar l'estimació de les afinitats relatives entre les espècies fosforilades de l'H1e. Per a l'estimació s'analitzaren l'H1e i les seves 8 espècies fosforilades, l'H1⁰ i l'H1c. Aquesta estimació es realitza a partir de les afinitats relatives obtingudes amb els experiments de competició (Taula 20). L'ús d'aquest mètode per a l'estimació de les afinitats relatives va ser descrit per Orrego i col.²⁰⁴.

Aquest mètode estadístic es basa en considerar l'estimació del valor de n paràmetres (en el nostre cas, les constants absolutes de cada proteïna pel DNA) com

$$k_i \text{ (i=1 ... n)}$$

A partir de diverses mesures experimentals dels seus quocients (les afinitats relatives obtingudes a partir dels experiments de competició)

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

Aquesta informació no permet estimar el valor absolut de les k_i ja que hi haurà sempre la indeterminació d'un factor multiplicatiu. Per eliminar aquesta indeterminació imposem la condició

$$k_1 = 1 \quad (1)$$

També suposem que una mesura experimental k_i/k_j és equivalent a una mesura k_j/k_i . En general, les mesures experimentals no inclouen necessàriament totes les parelles possibles i, j . També és possible que per a una mateixa parella i, j es disposi de diverses dades experimentals. w_{ij} representa el nombre de mesures experimentals existents per a k_i/k_j ($w_{ij} \geq 0$; $w_{ij} = w_{ji}$) i a_{ijq} ($q = 1 \dots w_{ij}$) els valors d'aquestes mesures ($a_{ijq} = 1/a_{jiq}$).

En el nostre cas, l'estimació dels paràmetres k_i està sobredeterminada, és a dir, hi ha més dades que paràmetres i les dades combinen tots els índexs i .

Si les mesures experimentals fossin exactes es compliria

$$k_i/k_j = a_{ijq} \quad (2)$$

Mitjançant els canvis de variable

$$x_i = \ln k_i$$

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

les relacions (1) i (2) es tradueixen en el sistema lineal

$$x_i - x_j = b_{ij} \quad (3a)$$

$$x_i = 0 \quad (3b)$$

A causa dels errors experimentals, en general el sistema (3) no serà compatible. Estadísticament es pot considerar que per a cada parella i, j els valors b_{ijq} són observacions d'una variable aleatòria X_{ij} de mitjana $x_i - x_j$. A falta de més informació, suposarem que aquestes variables tenen totes la mateixa desviació típica σ . El problema consisteix doncs, en estimar els paràmetres x_i a partir dels valors b_{ijq} considerats com observacions d'unes variables aleatòries de mitjana $x_i - x_j$ i de desviació típica σ .

Com és habitual en aquests casos, es pren com estimació dels x_i ($i > 1$) els valors x_i que minimitzin l'error quadràtic mig. Utilitzarem l'aplicació de regressió múltiple de l'opció anàlisi de dades del programa Excel, mètode que permet minimitzar l'error quadràtic mig.

En total, es poden formar 52 parelles de competició diferents, però amb 10 parelles és suficient per determinar les afinitats relatives de les nou proteïnes. En el nostre anàlisi varem utilitzar 21 parelles. En alguns casos les parelles estaven repetides, tenint un total de 28 valors.

Resultats

En la taula 21 es mostren els valors estimats de les afinitats relatives de la histona H1e i les seves espècies fosforilades i de l'H1c respecte a la histona H1⁰. Els errors es van calcular amb un nivell de confiança del 95 %. Els errors es calculen a partir de la transformació logarítmica dels valors de k_i i a_{ijq} , per aquest motiu els valors dels errors inferiors i superiors del valor promig són diferents un cop s'inverteix la transformació logarítmica. En aquesta mateixa taula es mostra també el valor promig i el percentatge d'error a més de les diferències dels valors superior i inferior. Així mateix, es varen calcular aquests valors respectes a l'H1e (Taula 22) i a totes les seves espècies fosforilades.

Taula 21. Estimació dels valors de les afinitats relatives de la histona H1e no fosforilada i les seves espècies fosforilades i de H1c pel DNA respecte a l'H1⁰

K_{DNA}^{ij}	estimació	dif. inferior	dif. superior	promig	% d'error
H1e 0P/H1 ⁰	0,860	0,097	0,110	0,104	12,05
H1e 145P/H1 ⁰	0,515	0,084	0,100	0,092	17,81
H1e 153P/H1 ⁰	0,413	0,076	0,093	0,085	20,51
H1e 171P/H1 ⁰	0,467	0,092	0,114	0,103	22,01
H1e 186P/H1 ⁰	0,459	0,085	0,104	0,095	20,65
H1e 2P/H1 ⁰	0,261	0,048	0,060	0,054	20,65
H1e 3P/H1 ⁰	0,115	0,019	0,023	0,021	18,53
H1e 4P/H1 ⁰	0,024	0,004	0,005	0,004	18,53
H1e 5P/H1 ⁰	0,022	0,004	0,004	0,004	18,53
H1c/H1 ⁰	0,340	0,055	0,066	0,061	17,79

Taula 22. Estimació dels valors de les afinitats relatives de la histona H1e i les seves espècies fosforilades i de l'H1c pel DNA respecte a l'H1e no fosforilada

K_{DNA}^{ij}	estimació	dif. inferior	dif. superior	promig	% d'error
H1e 145P/H1e 0P	0,599	0,099	0,118	0,108	18,09
H1e 153P/H1e 0P	0,480	0,086	0,105	0,096	19,90
H1e 171P/H1e 0P	0,543	0,105	0,130	0,118	21,63
H1e 186P/H1e 0P	0,534	0,104	0,129	0,116	21,82
H1e 2P/H1e 0P	0,304	0,059	0,073	0,066	21,82
H1e 3P/H1e 0P	0,133	0,022	0,027	0,025	18,53
H1e 4P/H1e 0P	0,028	0,005	0,006	0,005	18,53
H1e 5P/H1e 0P	0,026	0,004	0,005	0,005	18,53
H1 ⁰ /H1e 0P	1,163	0,132	0,149	0,140	12,05
H1c/H1e 0P	0,396	0,060	0,070	0,065	16,37

El resum del càlcul de totes les afinitats es mostra en la taula 23 i en la taula 24 es mostren els errors corresponents per a cada estimació.

Taula 23. Estimació dels valors de les afinitats relatives de H1e no fosforilada i les seves espècies fosforilades pel DNA

$K_{DNA}^{i/j}$	H1e 0P	145P	153P	171P	186P	2P	3P	4P	5P	(i)
H1e 0P	1	0,599	0,480	0,543	0,534	0,304	0,133	0,028	0,026	
145P	1,669	1	0,633	0,703	0,685	0,390	0,175	0,037	0,034	
153P	2,084	1,248	1	1,132	1,112	0,633	0,278	0,058	0,054	
171P	1,841	1,103	0,883	1	0,983	0,560	0,246	0,052	0,047	
186P	1,873	1,122	0,899	1,018	1	0,569	0,250	0,052	0,048	
2P	3,825	1,971	1,579	1,787	1,756	1	0,439	0,092	0,085	
3P	7,497	4,492	3,598	4,073	4,002	2,279	1	0,210	0,193	
4P	35,694	21,385	17,130	19,390	19,053	10,850	4,761	1	0,919	
5P	38,829	23,263	18,634	21,093	20,727	11,803	5,1791	1,0878	1	

(j)

En negreta s'indiquen les afinitats relatives pel DNA de cada espècie fosforilada de l'H1e respecte l'H1e no fosforilada.

Taula 24. Errors (\pm) corresponents a cada estimació dels valors de les afinitats relatives pel DNA de l'H1e no fosforilada i les seves espècies fosforilades

$K_{DNA}^{i/j}$	H1e 0P	145P	153P	171P	186P	2P	3P	4P	5P	(i)
H1e 0P		0,108	0,096	0,118	0,116	0,066	0,025	0,005	0,005	
145P	0,302		0,150	0,181	0,182	0,104	0,043	0,009	0,008	
153P	0,415	0,296		0,306	0,315	0,179	0,073	0,015	0,014	
171P	0,398	0,284	0,239		0,289	0,165	0,067	0,014	0,013	
186P	0,409	0,298	0,254	0,300		0,164	0,067	0,014	0,013	
2P	0,790	0,524	0,446	0,527	0,506		0,118	0,025	0,023	
3P	1,389	1,098	0,942	1,119	1,081	0,615		0,052	0,048	
4P	6,615	5,229	4,484	5,326	5,145	2,930	1,185		0,229	
5P	7,196	5,688	4,878	5,794	5,596	3,187	1,289	0,271		

(j)

La competició entre els subtipus i les diferents espècies fosforilades ens va permetre estimar amb precisió les afinitats relatives pel DNA. L'ordre d'afinitats pel DNA de major a menor és:

$$\mathbf{H1e\ 0P\ (1) > H1e\ 145P\ (0'6) \approx H1e\ 171P\ (0'54) \approx H1e\ 186P\ (0'53) \approx H1e\ 153P\ (0'48) > H1e\ 2P\ (0'3) > H1e\ 3P\ (0'13) > H1e\ 4P\ (0'028) \approx H1e\ 5P\ (0'026)}$$

Els valors entre parèntesi indiquen les afinitats de les diferents espècies fosforilades en relació amb el subtipus unit més fortament, que és l'H1e no fosforilada (0P). La diferència d'afinitat relativa entre l'espècie fosforilada amb menor afinitat, l'H1e 5P, i la de major, l'H1e 0P, és d'aproximadament 39.

Resultats

L'efecte més important s'observa en les espècies amb major grau de fosforilació, l'H1e 4P i l'H1e 5P. L'efecte va disminuint progressivament en disminuir el grau de fosforilació. Les espècies monofosforilades disminueixen l'afinitat aproximadament a la meitat (Fig. 65).

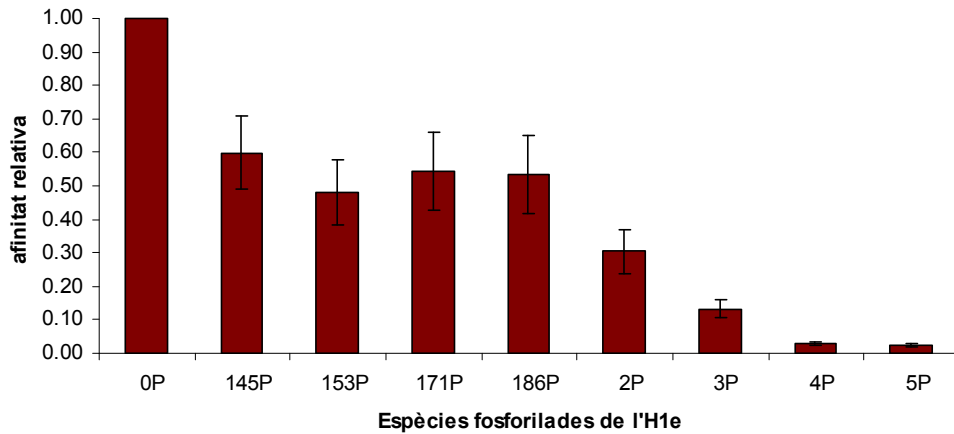


Figura 65. Representació gràfica dels valors d'afinitat relativa de l'H1e no fosforilada i de cada espècie fosforilada. Es mostren les barres d'error dels valors.

En la figura 65 es representen els valors de les afinitats relatives pel DNA de cada espècie fosforilada de l'H1e respecte a l'H1e no fosforilada, valors ressaltats en negreta en la taula 23.

Discussió general

Efectes de la fosforilació del domini C-terminal de la histona H1⁰ sobre la interacció amb el DNA

La histona H1 està formada per tres dominis, un domini globular flanquejat per uns dominis terminals que es troben poc estructurats en dissolució aquosa. El domini C-terminal representa gairebé el 50 % de la proteïna i la distribució de les seves càrregues és molt uniforme malgrat la variació de la seqüència en els diferents subtipus de l'H1 ¹⁶⁸.

En aquest treball s'ha caracteritzat la unió del domini C-terminal de la histona H1⁰ fosforilat ja que la fosforilació és la principal modificació post-traduccional en la histona H1. La majoria dels llocs de fosforilació els trobem situats en el domini C-terminal. El domini C-terminal de la histona H1⁰ conté tres motius S/T-P-X-Z fosforilables per la quinasa CDK2.

Les histones H1 s'han caracteritzat com a proteïnes d'unió a seqüències de tipus SAR ¹²¹. Les seqüències SAR són riques en adenina i timina (>70 %) disposades en trams homopolimèrics, poli(dA)-poli(dT), coneguts com *A-tracts*. La unió d'H1 és altament cooperativa i dependent de NaCl ²³¹ i està més determinada per la presència dels *A-tracts* que per la pròpia seqüència de SAR ^{231, 342, 343, 236, 344}. Els *A-tracts* tenen certes característiques estructurals com per exemple, un solc menor més estret ^{237, 238}. El domini C-terminal va ser identificat com el màxim responsable de la unió de la histona H1 a les seqüències SAR ³³⁰. En aquest mateix estudi es va concloure que el domini C-terminal, com la proteïna sencera, mantenia la cooperativitat d'interacció amb el DNA.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren que el domini C-terminal trifosforilat manté la preferència d'unió per les seqüències de DNA tipus SAR. També en la proteïna parcialment fosforilada (mono- i difosforilada) es manté la preferència per la SAR. En tots els casos, fins que no ha precipitat tota o gairebé tota la SAR no comença a precipitar el pUC19. Així, aquesta preferència per les seqüències SAR sembla més inherent a la seva pròpia estructura i no depèn ni de la fosforilació de la proteïna ni de la mida del fragment de DNA. Les seqüències SAR tenen un solc menor més estret que afavoreix que hi hagi una densitat de càrrega més alta. Per tant, en interaccionar els lligands amb elevada càrrega catiònica, com és el domini C-terminal de la histona H1, amb les seqüències SAR, que tenen un solc menor més estret, s'afavoriria uns contactes electrostàtics més intensos i una unió preferencial.

En cromatina a relacions proteïna/DNA subestequiomètriques, l'elevada afinitat de les H1 per SAR podria garantir la saturació de les seqüències SAR per l'H1 preferentment a d'altres seqüències ³³⁰.

En experiments de competició entre el domini C-terminal no fosforilat i el C-terminal trifosforilat, es posa de manifest la menor afinitat d'aquest últim pel DNA. L'afinitat relativa pel DNA disminueix aproximadament en un factor de 3. Els fosfats actuen neutralitzant la càrrega neta de la proteïna, en concret del domini C-terminal, i fan disminuir l'afinitat pel DNA.

Com comentàvem anteriorment, el domini C-terminal mostra una unió cooperativa a DNA ³³⁰. S'ha observat que en ser totalment fosforilat aquest, continua mantenint la cooperativitat d'unió al DNA, tot i que requereix relacions proteïna/DNA més elevades que el C-terminal no fosforilat

per precipitar. També s'ha pogut constatar la importància de la presència de força iònica en el medi per afavorir la unió cooperativa al DNA, més evident en el cas del C-terminal fosforilat, ja sigui pUC19 o SAR. En absència de força iònica, no s'aconsegueix la precipitació total del domini C-terminal trifosforilat a cap de les relacions proteïna/DNA utilitzades. La pèrdua de cooperativitat és menor en la SAR que en el pUC19 ja que a 1'75, la relació màxima estimada, queda aproximadament un 40 % de SAR per precipitar i encara un 56 % de pUC19.

Aquesta major disminució de la cooperativitat en el C-terminal trifosforilat també es mostra en fragments petits de DNA, com en l'oligòmer de 50 pb del nostre assaig. Es forma un complex molt petit i difícil de precipitar. Es repeteix aquí el mateix que succeeix en absència de força iònica. El domini C-terminal no fosforilat manté una cinètica cooperativa i s'aconsegueix la seva total precipitació, tot i que a relacions més elevades de proteïna/DNA. Per contra, el C-terminal trifosforilat perd la cooperativitat d'unió i només en precipita un 50 %. La fosforilació debilita la unió de l'H1 al DNA, fet que podria facilitar la obertura de la cromatina²³⁵.

Els espectres de dicroisme circular fan suposar que la fosforilació del domini C-terminal provoca una forma d'interacció amb el DNA diferent. Segons s'ha interpretat en la literatura, l'espectre ψ apareix per l'agregació ordenada de les molècules de DNA i la seva inducció depèn de les condicions del medi (força iònica, polaritat, etc.), de les característiques del DNA i de la presència de molècules inductores³³³⁻³³⁵. En analitzar el domini C-terminal de la histona H1⁰ i les seves espècies fosforilades amb diferents fragments de DNA, es va observar que tots són capaços d'induir l'espectre ψ , excepte en el cas del fragment de 50 pb. Les espècies fosforilades interaccionen de diferent manera amb els fragments petits de DNA, fet que s'observa tant en els espectres de dicroisme circular com en les corbes de precipitació. Pel que fa als DNAs de major mida, s'observa que a una mateixa relació proteïna/DNA, les espècies fosforilades són capaces d'induir un espectre ψ més intens que el domini no fosforilat, mostrant una major capacitat d'agregació ordenada del DNA.

Una possible explicació per a les diferències observades entre el domini C-terminal no fosforilat i el fosforilat podria romandre en el seu *binding site*. Com es pot observar en les corbes de precipitació, per precipitar el DNA es necessita més proteïna amb el domini fosforilat. El domini fosforilat tindria un *binding site* més petit que el domini no fosforilat, és a dir, en un mateix fragment de DNA, s'hi podrien unir més molècules del domini C-terminal fosforilat que del no fosforilat. El fet que el domini C-terminal fosforilat tingués un *binding site* més petit indicaria que la fosforilació indueix una major estructuració del domini i que en conseqüència, farà que interaccionés amb el DNA de diferent manera (com es veu en els espectres de dicroisme circular).

Efectes de la fosforilació sobre l'estructura secundària de la histona H1e i el seu domini C-terminal i sobre la seva interacció amb el DNA

El domini C-terminal de la histona H1e (CH1e) de rata és ric en lisina, prolina, alanina i serina. Aquests aminoàcids són considerats com a promotors de desordre³⁴⁶. En dissolució aquosa el CH1e es troba poc estructurat però en unir-se a DNA adquireix major estructuració secundària. Aquestes característiques fan que el domini C-terminal es pugui classificar dins del grup de proteïnes intrínsecament desordenades (Intrinsically disordered proteins, IDP)^{177,241}.

La unió del domini C-terminal de la histona H1e a DNA indueix a un important augment d'hèlix α i un lleuger augment de fulla β . El CH1e en dissolució conté un 10 % d'hèlix α i un 18 % de fulla β , és a dir, només s'estructura menys d'un terç del domini. En unir-lo a DNA, augmenta l'estructuració obtenint fins a un 30-32 % d'hèlix α i un 20-21 % de fulla β . Aquest comportament és similar al descrit pel domini C-terminal de l'H1⁰ en unir-se a DNA³³².

La fosforilació per quinases dependents de ciclines és la modificació post-traduccional més important de la histona H1. És un fenomen dependent del cicle cel·lular i el seu grau màxim s'assoleix en els cromosomes metafàsics^{246, 256}. El nombre de fosfats varia en cada subtipus i la majoria de les dianes es troben en el domini C-terminal.

El CH1e de rata conté 4 motius S/T-P-X-Z fosforilables per la quinasa CDK2. La fosforilació dels motius S/T-P-X-Z del domini C-terminal de la histona H1e unit a DNA provoca una disminució d'hèlix α i un augment de fulla β . Les espècies fosforilades que més fulla β adquireixen són la trifosforilada i la tetrafosforilada.

El domini C-terminal de la histona H1e (CH1e) i les seves espècies fosforilades es varen estudiar a dues relacions proteïna/DNA ($r, w/w$), a $r=0'5$ i a $r=0'7$. En comparar les dues relacions, s'observa que l'increment d'estructuració en forma de fulla β del CH1e trifosforilat i tetrafosforilat és dependent de la relació proteïna/DNA dels complexos. A major relació proteïna/DNA, més fulla β adquireix la proteïna. En el 3P la diferència de fulla β entre ambdues relacions és del 21 % i en el 4P és del 13 %. Les altres espècies fosforilades no mostren aquest comportament i tant l'hèlix α com la fulla β es mantenen en valors similars en les dues relacions. La relació 0'7 és la relació de saturació i en la qual es troben afavorides les interaccions proteïna-proteïna. Aquesta interacció entre proteïnes podria afavorir una major estructuració del domini que no es dona a relacions proteïna/DNA menors. Aquest efecte de la relació proteïna/DNA també va ser observat amb el domini C-terminal de la histona H1⁰³³².

Tot i aquest important augment d'estructuració en fulla β del 3P, arribant a un 55 %, aquest és inferior a l'adquirida pel domini CH1⁰ trifosforilat també en complexos proteïna/DNA, el qual amb un 76 % de fulla β arriba a adquirir una conformació del tipus tot- β . Aquestes dades reforcen la hipòtesi que existeixen diferències funcionals entre els diferents subtipus de la histona H1.

Després de l'anàlisi de l'efecte de la fosforilació en la inducció d'estructura secundària del domini C-terminal de l'H1e, es procedí a l'anàlisi de la proteïna sencera.

L'estructura secundària de la histona H1e sencera en dissolució aquosa obtinguda a partir dels espectres de FTIR conté 20-23% d'hèlix α i 20-24% de fulla β . Aquesta estructuració es deu fonamentalment a l'estructuració del domini globular. El domini globular és estable en condicions iòniques fisiològiques. Conté 3 motius hèlix α a més d'una fulla β antiparal·lela i és el domini més conservat evolutivament ¹²². Els valors experimentals i els valors estimats d'estructuració secundària coincideixen en el cas de l'hèlix α però difereixen en la fulla β . Els valors de fulla β experimentals són més elevats que els valors de l'estimació calculada considerant els tres dominis per separat (14% de fulla β en l'estimació). D'aquest fet, podem deduir que en el cas de la proteïna sencera hi ha una major estructuració probablement perquè el domini globular confereix una major estabilitat estructural a la proteïna i permet una major estructuració dels dominis terminals.

La proteïna en dissolució té més estructura de la que es pot atribuir al domini globular, per tant, aquesta major estructuració ha de ser resultat de l'estructuració dels dominis terminals. Els dominis terminals estan classificats com a proteïnes intrínsecament desordenades (IDP) però considerant que els nostres resultats de la proteïna descrits en el paràgraf anterior caldria assenyalar que els dominis terminals aïllats sí es comporten com IDP però quan els dominis formen part de la proteïna sencera, aquest comportament afecta una menor proporció del domini.

La unió a DNA té efectes desiguals depenent de si la proteïna està o no fosforilada. En l'H1e no fosforilada, la formació de complexos amb el DNA induïx l'augment de l'hèlix α , en canvi en la proteïna fosforilada induïx l'augment de la fulla β . Per contra, en la proteïna fosforilada en dissolució, la unió del DNA no té efecte sobre l'hèlix α però sí sobre la fulla β .

La fosforilació dels motius S/T-P-X-Z de la histona H1e provoca un canvi estructural en la proteïna: la disminució d'hèlix α i l'augment de fulla β . L'efecte més important és en els complexos on la fosforilació provoca que l'hèlix α disminueixi a la meitat i la fulla β augmenti el doble respecte a les proteïnes no fosforilades unides a DNA.

L'augment de fulla β en detriment de l'hèlix α com a conseqüència de la fosforilació s'ha descrit en diverses proteïnes amiloides. En encefalopaties priòniques s'ha vist que la interacció amb el DNA converteix la isoforma nativa d'hèlix α en una isoforma de fulla β similar a la trobada en estats fibrilars ³⁴⁷. A més, l'H1 s'ha trobat associada a fibres *amyloid-like* ²⁹². Tot i així, estudis per FTIR mostren que l'estructura de proteïnes amb fulla β nativa i la de les fibres amiloides són diferents i que és necessària una important reorganització estructural per que es formin fibres amiloides a partir d'una proteïna amb fulla β ³⁴⁸. A més, hi ha evidències que suggereixen que la formació de fibres amiloides involucra el trencament de bona part de les interaccions natives de la proteïna alhora que necessita com a mínim, un desplegament parcial de l'estructura nativa ³⁴⁹. En el nostre cas aquesta reorganització estructural necessària per a la formació de fibres amiloides vindria donada per la fosforilació de la proteïna.

S'estimaren els valors d'estructura secundària de la proteïna sencera a partir dels valors d'estructuració dels dominis aïllats fosforilats i s'observà que els resultats experimentals tenen

uns valors de fulla β més elevats que els valors calculats de l'estimació. La diferència entre els valors de l'estimació per a la proteïna sencera fosforilada i els valors experimentals dels complexos de proteïna/DNA de totes les espècies fosforilades, suggereixen que el domini C-terminal de l'H1e posseeix una conformació del tipus tot- β . Els percentatges de fulla β del domini C-terminal en la proteïna sencera es troben entre el 62 % i el 85 %.

La fosforilació produeix un augment de fulla β de baixa freqüència. Aquest fet pot tenir origen en un augment d'interaccions intermoleculares entre les cadenes de fulla β ³⁵⁰ donant una major capacitat d'interacció proteïna-proteïna. Aquest fet suggereix que les interaccions proteïna-proteïna poden jugar un paper important en els canvis estructurals de la proteïna. A més de les interaccions proteïna-proteïna, és possible que també hi hagi interaccions dins del propi domini C-terminal o fins i tot, entre el domini C-terminal i el N-terminal. En aquest sentit, un estudi de FRET indica que el domini C-terminal de l'H1⁰ en dissolució està en una conformació estesa però quan s'uneix al nucleosoma es plega aproximant els seus dos extrems. Els autors d'aquest estudi proposen un model de plegament per al domini C-terminal en el qual aquest contindria hèlix α i fulla β ^{184, 351}. Pel que fa a la possible interacció entre el domini C-terminal amb el domini N-terminal, cal dir que la longitud i els llocs de fosforilació del domini N-terminal varien segons els subtipus. Per exemple, el domini N-terminal de la histona H1⁰ és més curt i no és fosforilable.

Cal fixar-se molt especialment en el mutant monofosforilat en la posició 186, corresponent al motiu SPKK del domini C-terminal més allunyat del domini globular. La fosforilació única en aquesta posició indueix un important augment d'estructuració en forma de fulla β superior a la resta d'espècies fosforilades tan en dissolució (40%) com en unió a DNA (50%). La fosforilació d'aquesta posició en el domini C-terminal aïllat no produeix aquest augment de fulla β .

És destacable que aquest fet només succeeix quan la proteïna és fosforilada únicament en aquesta posició i no s'observa en les altres espècies fosforilades en les quals també hi ha fosforilada la posició 186. La fosforilació de la posició 186 *per se* és capaç d'induir una major estructuració en fulla β del domini C-terminal. Podria ser que en fosforilar-se la posició 186 estigués interaccionant amb una altra part de la proteïna que afavorís l'augment de fulla β . S'explicaria així perquè en el domini C-terminal aïllat la fosforilació d'aquesta posició no té el mateix efecte. Una possible funció a nivell fisiològic seria que la fosforilació de la posició 186 *in vivo* només es donés en determinades regions de la cromatina, és a dir, tindria un efecte local sobre l'estructura de la cromatina.

El fet que els altres mutants di-, tri-, tetrafosforilats o la proteïna totalment fosforilada, que també contenen la posició 186 fosforilada, presentin menor percentatge de fulla β podria ser degut a que d'alguna manera la fosforilació de les altres posicions atenua o regula l'efecte de la fosforilació de la posició 186.

La fosforilació per quinases dependents de ciclines (CDKs) és dependent del cicle cel·lular, sent menor en la fase G1, incrementant al llarg de la fase S i G2 i arribant al màxim nivell durant la mitosi²⁵⁶. La fosforilació parcial del domini C-terminal de l'H1 es dona en la interfase, on hi ha un relaxament de la cromatina. Aquest fet es correspon amb les nostres observacions

en que la fosforilació parcial del CH1⁰ redueix la capacitat d'agregació al DNA. En canvi, una total fosforilació com es dona en la mitosi (metafase), restaura considerablement la capacitat d'agregació del DNA ³³². Aquests resultats serien compatibles amb la idea de que l'espècie trifosforilada es troba en la cromatina condensada. La hiperfosforilació de la H1 és necessària per mantenir els cromosomes metafàsics en el seu estat de condensació ²⁵⁴.

La fosforilació es dona en residus de serina i de treonina, específics dels motius S/T-P-X-Z dels dominis N- i C-terminals ^{256, 259, 352}. Estudis en cromatina amb la histona H1b conclouen que aquesta es fosforila únicament en tres posicions durant la interfase, en les serines 17, 172 i 188. És en la fase G2 tardana i en la mitosi que es dona la hiperfosforilació exclusivament en les treonines, o la Thr137 o la Thr154, donant les formes tetrafosforilades. No es dona la fosforilació simultània d'aquestes dues treonines. La forma pentafosforilada resulta de la fosforilació de la Thr10 ³⁵², però aquesta no és fosforilada per la quinasa CDK2. En l'H1e, les posicions 171 i 186 (les més distals al domini globular) corresponen a serines i les posicions 17, 145 i 153 corresponen a treonines. Així, la posició 186, la qual s'ha vist que és la que més estructuració induïx, podria ser la primera posició en fosforilar-se, indicant així un possible paper funcional en la condensació de la cromatina.

En la inducció d'estructura secundària per efecte de la fosforilació sembla ser que hi ha un efecte específic de la posició que és fosforilada i a més, no necessàriament es correlaciona un major grau de fosforilació amb una major estructuració ni en dissolució ni en els complexos. De les espècies amb més d'un fosfat, la que més estructura β adquireix és la trifosforilada (46 %), com passa també amb el CH1e trifosforilat (55 %) i la histona H1⁰ trifosforilada (54 %). Així doncs, el grau d'estructuració secundària depèn de la posició i del nombre de fosfats, com s'ha observat també en la histona H1⁰.

La histona H1e i la H1⁰ en dissolució no fosforilades tenen una estructura secundària molt similar pel que fa al contingut en hèlix α i fulla β . En l'estructuració secundària de la histona H1e i de les seves espècies fosforilades no es dona una dependència de la relació proteïna/DNA en els complexos, al contrari que en el domini C-terminal de la H1e i de la H1⁰ aïllats i la H1⁰ sencera. La fosforilació de l'H1⁰ (amb tres posicions fosforilables en el domini C-terminal) induïx una disminució d'hèlix α i un augment de fulla β . Aquests efectes són similars als que succeeixen a l'H1e en ser fosforilada, tant en dissolució com en els complexos, però més notables en l'H1⁰ 3P. Com en l'H1e, la inducció d'estructura secundària en la histona H1⁰ és dependent de la posició fosforilada. En aquest cas, al contrari que en l'H1e, és la fosforilació de la posició més pròxima al domini globular la que induïx major estructuració en la proteïna en dissolució. L'efecte de la fosforilació en aquesta posició concreta es perd quan la proteïna s'uneix a DNA, sent llavors el mutant trifosforilat el que més fulla β conté ³³⁵.

Tot i que són bastant conservats, els diferents subtipus d'histona H1 presenten diferent nombre i posició de motius fosforilables. Aquest estudi de la H1e juntament amb les comparacions establertes amb el CH1e i l'H1⁰, indica que la inducció d'estructura secundària està modulada, segons els casos, per l'efecte de la posició i pel nombre de fosfats que adquireix la proteïna. També s'ha vist una dependència de la relació proteïna/DNA: en el CH1⁰ trifosforilat, en CH1e

trifosforilat i tetrafosforilat i en l'H1⁰ trifosforilada. Totes aquestes diferències podrien reforçar la idea de les diferents implicacions a nivell funcional dels diferents subtipus.

En la forma trifosforilada la fulla β augmenta fins assolir un 46%. La forma tetrafosforilada i la pentaforilada contenen un 42% i un 41%, respectivament. Aquestes formes és possible que no existeixin *in vivo* ja que en estudis amb l'H1b no s'ha vist que el domini C-terminal tingui fosforilats els quatre motius S/T-P-X-Z simultàniament. Podria ser que com l'H1b, en l'H1e només es fosforilés una de les treonines alternativament, mai totes a la vegada.

La fosforilació també té efecte sobre la capacitat d'agregació del DNA de la histona H1e. Aquesta capacitat d'agregació és diferent en les diferents espècies fosforilades, en les més fosforilades (3P, 4P i 5P) és major que en les mono- i difosforilades (excepte la 186P de l'H1e). Tant en els gels de retard amb el CH1e com amb l'H1e sencera es compleix que la proteïna no fosforilada agrega menys que la 3P. L'espècie monofosforilada en la posició 186 de l'H1e sencera mostra de nou que presenta uns trets diferencials respecte a les altres espècies monofosforilades, ja que presenta tanta capacitat d'agregació com les espècies amb més grau de fosforilació. El 186P del CH1e no mostra cap comportament diferent de les altres espècies monofosforilades, tal com s'observa en els resultats obtinguts per FTIR. Les espècies amb major capacitat d'agregació del DNA són les que contenen més fulla β que afavoriria la formació d'agregats DNA-proteïna i proteïna-proteïna.

Els experiments de competició entre els subtipus i les diferents espècies fosforilades ens va permetre estimar amb precisió les afinitats relatives pel DNA. S'observa una correlació directa entre el grau de fosforilació i l'afinitat pel DNA. A major grau de fosforilació, menor afinitat pel DNA: **H1e 0P** (1) > **H1e 145P** (0'6) \approx **H1e 171P** (0'54) \approx **H1e 186P** (0'53) \approx **H1e 153P** (0'48) > **H1e 2P** (0'3) > **H1e 3P** (0'13) > **H1e 4P** (0'028) \approx **H1e 5P** (0'026).

Els valors entre parèntesi indiquen les afinitats de les diferents espècies fosforilades en relació amb el subtipus unit més fortament, que és l'H1e no fosforilada (0P). La diferència d'afinitat relativa entre l'espècie fosforilada amb menor afinitat, l'H1e 5P, i la de major, l'H1e 0P, és d'aproximadament 39. La diferència d'afinitat relativa entre l'H1e 0P i l'H1e 3P, que com dèiem és la fosforilació que es dona fisiològicament, és de 7'5. La incorporació d'un sol fosfat més en l'espècie trifosforilada disminueix dràsticament l'afinitat. És possible que les espècies 4P i 5P només es trobin durant la mitosi i fins i tot, podria ser que es trobessin dissociades de la cromatina.

La diferència d'afinitat relativa entre el CH1⁰ i el CH1⁰ 3P és de 3, menys de la meitat de la diferència d'afinitat que hi ha entre l'H1e i l'H1e 3P. Podria ser que el fet de ser la proteïna sencera faci que s'accentuï la pèrdua d'afinitat. Tot i ser subtipus diferents, l'H1⁰ i l'H1e serien comparables ja que tenen una afinitat pel DNA similar.

Si considerem les diferències d'afinitat només entre els diferents subtipus no fosforilats utilitzats, és a dir, H1e, H1⁰ i H1c, trobem que l'ordre de major a menor afinitat seria: H1⁰ > H1e > H1c. Es confirmen els resultats obtinguts anteriorment en el nostre grup amb histones natives, els quals establiren l'ordre: H1d > H1⁰ > H1e > H1b > H1c > H1a. Es van distingir tres grups d'afinitats: H1d, H1⁰ i H1e d'afinitat elevada; H1b i H1c d'afinitat intermèdia; i H1a

d'afinitat baixa. La diferència d'afinitat relativa més gran entre els subtipus és de 19²⁰⁴. La diferència d'afinitat de l'H1e 4P i 5P respecte a l'H1e és superior, és a dir, que trobem major la diferència d'afinitat entre espècies fosforilades del mateix subtipus que entre diferents subtipus. Aquest fet, reforça la idea de que les espècies hiperfosforilades es puguin trobar en la mitosi.

En estudis previs amb el domini C-terminal de la histona H1⁰ es va observar com l'afinitat del domini trifosforilat (totalment fosforilat) i que major percentatge de fulla β conté, és tres vegades menor que el no fosforilat. En canvi, una fosforilació parcial, només en disminueix lleugerament l'afinitat³³². Amb el domini C-terminal de la histona H1⁰ també es compleix que a major fosforilació, menor afinitat pel DNA. Pel que fa a la capacitat d'agregació, com en els nostres resultats, són les espècies més fosforilades les que mostren una major capacitat d'agregació del DNA³³².

Les espècies amb més grau de fosforilació mostren una menor afinitat pel DNA però també una major capacitat d'agregació d'aquest. Els fosfats incorporats actuen neutralitzant la càrrega neta de la proteïna disminuint-ne l'afinitat pel DNA. A la vegada, aquestes mateixes espècies són les que contenen més estructuració en forma de fulla β , fet que afavoriria la formació d'agregats DNA-proteïna, en els quals les interaccions proteïna-proteïna hi tindrien un paper important. L'elevada capacitat d'agregació del DNA podria romandre en la seqüència del domini C-terminal. En general els dominis C-terminal de les histones H1 presenten una seqüència rica en aminoàcids bàsics formant doblats. En estructurar-se en forma de fulla β , les cadenes laterals consecutives dels aminoàcids són projectades alternant-se per dalt i per baix de l'estructura. Es formaria així, un motiu d'unió amb dues superfícies catióniques³³².

Conclusions

1. El domini C-terminal de la histona H1⁰ trifosforilat interacciona cooperativament amb fragments de DNA en presència de força iònica (70 mM i 140 mM).
2. La fosforilació del domini C-terminal disminueix dràsticament la capacitat de precipitació del DNA a baixa força iònica i en fragments petits de DNA (50 pb).
3. En experiments de competició entre el domini C-terminal no fosforilat i el C-terminal trifosforilat de la histona H1⁰, es posa de manifest la menor afinitat d'aquest últim pel DNA. L'afinitat relativa pel DNA disminueix aproximadament en un factor de 3.
4. En fragments de DNA de 50 pb les espècies fosforilades del domini C-terminal no són capaces d'induir l'espectre ψ .
5. A una mateixa relació proteïna/DNA, les espècies fosforilades són capaces d'induir un espectre ψ més intens que el domini no fosforilat amb fragments de DNA de més de 50 pb.
6. El domini C-terminal trifosforilat manté la preferència per les seqüències SAR.
7. La unió del domini C-terminal de la histona H1e a DNA indueix un important augment d'hèlix α i un lleuger augment de fulla β .
8. La fosforilació dels motius S/T-P-X-Z del domini C-terminal de la histona H1e provoca un augment de fulla β quan s'uneix a DNA. Les espècies fosforilades que més fulla β adquireixen són la 3P i la 4P.
9. L'increment d'estructuració en forma de fulla β del CH1e trifosforilat i tetrafosforilat és dependent de la relació proteïna/DNA dels complexos. En les relacions estudiades, a major relació proteïna/DNA, més fulla β adquireix la proteïna.
10. L'estructura del domini C-terminal de l'H1e i del C-terminal de l'H1⁰ i les seves espècies fosforilades units a DNA difereixen en la proporció dels motius d'estructura secundària.
11. Els valors d'estructuració secundària obtinguts experimentalment amb l'H1e sencera són més elevats que els valors de l'estimació calculada considerant els tres dominis per separat, indicant que els dominis terminals tenen una major estructuració secundària quan formen part de la proteïna sencera que quan es troben aïllats.
12. La unió de la histona H1e no fosforilada a DNA indueix un lleuger augment d'hèlix α , però no afecta a la proporció de fulla β respecte a la proteïna en dissolució.

Conclusions

13. Tant en dissolució com en els complexos, la fosforilació dels motius S/T-P-X-Z de la histona H1e provoca un canvi estructural en la proteïna: la disminució d'hèlix α i l'augment de fulla β . L'efecte més important és en els complexos on l'hèlix α disminueix a la meitat i la fulla β augmenta el doble respecte als complexos amb la proteïna no fosforilada.

14. El grau d'estructuració secundària depèn de la posició i del nombre de fosfats, com s'ha observat també en la histona H1⁰.

15. L'espècie monofosforilada en la posició 186 és la que adquireix major estructuració en fulla β , tant en dissolució com en els complexos. La fosforilació d'aquesta posició no produeix aquest augment de fulla β en el domini C-terminal aïllat.

16. En l'estructuració secundària de la histona H1e i de les seves espècies fosforilades no es dona una dependència de la relació proteïna/DNA, al contrari que en els dominis C-terminals de la H1e i la H1⁰ aïllats i la H1⁰ sencera.

17. La diferència entre els valors de l'estimació per a la proteïna sencera fosforilada i els valors experimentals dels complexos de proteïna/DNA de totes les espècies fosforilades, suggereixen que el domini C-terminal de l'H1e fosforilat posseeix una conformació del tipus tot- β en la proteïna sencera però no en el domini C-terminal aïllat.

18. La fosforilació té efectes diferencials sobre la capacitat d'agregació del DNA de la histona H1e i les seves espècies fosforilades. En les més fosforilades (3P, 4P i 5P) i en la monofosforilada 186P és major que en la resta d'espècies monofosforilades i la difosforilada.

19. Tant el domini C-terminal de l'H1e com l'H1e sencera no fosforilada agreguen menys el DNA que les espècies amb tres o més fosfats.

20. L'ordre d'afinitats pel DNA de les diferents espècies fosforilades de la histona H1e que s'ha pogut establir de major a menor és: H1e 0P (1) > H1e 145P (0'6) \approx H1e 171P (0'54) \approx H1e 186P (0'53) \approx H1e 153P (0'48) > H1e 2P (0'3) > H1e 3P (0'13) > H1e 4P (0'028) \approx H1e 5P (0'026). Els valors entre parèntesi indiquen les afinitats de les diferents espècies fosforilades en relació amb el subtipus unit més fortament, que és la H1e no fosforilada (0P). La diferència d'afinitat relativa entre l'espècie fosforilada amb menor afinitat, l'H1e 5P, i la de major, l'H1e no fosforilada, és aproximadament de 39.

21. Les espècies amb més grau de fosforilació mostren una menor afinitat pel DNA però també una major capacitat d'agregació d'aquest, i coincideixen en ser les espècies que contenen més estructuració en forma de fulla β .

Bibliografia

1. Wolffe, A. P. (1992) New Insights into Chromatin Function in Transcriptional Control. *FASEB J.* 6, 3354-3361.
2. Laemmli, U. K., Kas, E., Poljak, L., and Adachi, Y. (1992) Scaffold-Associated Regions: Cis-Acting Determinants of Chromatin Structural Loops and Functional Domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2, 275-285.
3. van Holde, K., and Zlatanova, J. (2006) Scanning Chromatin: A New Paradigm? *J. Biol. Chem.* 281, 12197-12200.
4. Anderson, J. D., and Widom, J. (2000) Sequence and Position-Dependence of the Equilibrium Accessibility of Nucleosomal DNA Target Sites. *J. Mol. Biol.* 296, 979-987.
5. Thoma, F., Koller, T., and Klug, A. (1979) Involvement of Histone H1 in the Organization of the Nucleosome and of the Salt-Dependent Superstructures of Chromatin. *J. Cell Biol.* 83, 403-427.
6. 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.
7. Dorigo, B., Schalch, T., Kulangara, A., Duda, S., Schroeder, R. R., and Richmond, T. J. (2004) Nucleosome Arrays Reveal the Two-Start Organization of the Chromatin Fiber. *Science.* 306, 1571-1573.
8. Daban, J. R., and Bermudez, A. (1998) Interdigitated Solenoid Model for Compact Chromatin Fibers. *Biochemistry.* 37, 4299-4304.
9. Felsenfeld, G., and McGhee, J. D. (1986) Structure of the 30 Nm Chromatin Fiber. *Cell.* 44, 375-377.
10. Langowski, J. (2006) Polymer Chain Models of DNA and Chromatin. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter.* 19, 241-249.
11. Renz, M., Nehls, P., and Hozier, J. (1977) Involvement of Histone H1 in the Organization of the Chromosome Fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 1879-1883.
12. Clark, D. J., and Thomas, J. O. (1986) Salt-Dependent Co-Operative Interaction of Histone H1 with Linear DNA. *J. Mol. Biol.* 187, 569-580.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Dimitrov, S. I., Russanova, V. R., and Pashev, I. G. (1987) The Globular Domain of Histone H5 is Internally Located in the 30 Nm Chromatin Fiber: An Immunochemical Study. *EMBO J.* 6, 2387-2392.
17. Woodcock, C. L., Grigoryev, S. A., Horowitz, R. A., and Whitaker, N. (1993) A Chromatin Folding Model that Incorporates Linker Variability Generates Fibers Resembling the Native Structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9021-9025.

18. 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. U. S. A.* *91*, 11621-11625.
19. Yang, G., Leuba, S. H., Bustamante, C., Zlatanova, J., and van Holde, K. (1994) Role of Linker Histones in Extended Chromatin Fibre Structure. *Nat. Struct. Biol.* *1*, 761-763.
20. 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.
21. 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.
22. Wolffe, A. P. (1998) *Chromatin, Structure & Function*. Academic Press, .
23. van Holde, K. (1988) *Chromatin*. Springer-Verlag, New York.
24. Routh, A., Sandin, S., and Rhodes, D. (2008) Nucleosome Repeat Length and Linker Histone Stoichiometry Determine Chromatin Fiber Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 8872-8877.
25. Woodcock, C. L., Skultchi, A. I., and Fan, Y. (2006) Role of Linker Histone in Chromatin Structure and Function: H1 Stoichiometry and Nucleosome Repeat Length. *Chromosome Res.* *14*, 17-25.
26. van Holde, K., and Zlatanova, J. (2007) Chromatin Fiber Structure: Where is the Problem Now? *Semin. Cell Dev. Biol.* *18*, 651-658.
27. Schalch, T., Duda, S., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (2005) X-Ray Structure of a Tetranucleosome and its Implications for the Chromatin Fibre. *Nature.* *436*, 138-141.
28. Robinson, P. J., Fairall, L., Huynh, V. A., and Rhodes, D. (2006) EM Measurements Define the Dimensions of the "30-Nm" Chromatin Fiber: Evidence for a Compact, Interdigitated Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6506-6511.
29. Hancock, R. (2004) A Role for Macromolecular Crowding Effects in the Assembly and Function of Compartments in the Nucleus. *J. Struct. Biol.* *146*, 281-290.
30. Mozziconacci, J., and Victor, J. M. (2003) Nucleosome Gaping Supports a Functional Structure for the 30nm Chromatin Fiber. *J. Struct. Biol.* *143*, 72-76.
31. Mozziconacci, J., Lavelle, C., Barbi, M., Lesne, A., and Victor, J. M. (2006) A Physical Model for the Condensation and Decondensation of Eukaryotic Chromosomes. *FEBS Lett.* *580*, 368-372.
32. Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000) The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature.* *403*, 41-45.
33. Quina, A. S., Buschbeck, M., and Di Croce, L. (2006) Chromatin Structure and Epigenetics. *Biochem. Pharmacol.* *72*, 1563-1569.
34. Featherstone, M. (2002) Coactivators in Transcription Initiation: Here are Your Orders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *12*, 149-155.

35. Rice, J. C., and Allis, C. D. (2001) Histone Methylation Versus Histone Acetylation: New Insights into Epigenetic Regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 263-273.
36. Grewal, S. I., and Elgin, S. C. (2002) Heterochromatin: New Possibilities for the Inheritance of Structure. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 178-187.
37. Jackson, V. (1990) In Vivo Studies on the Dynamics of Histone-DNA Interaction: Evidence for Nucleosome Dissolution during Replication and Transcription and a Low Level of Dissolution Independent of both. *Biochemistry.* 29, 719-731.
38. 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.
39. Jackson, V. (1987) Deposition of Newly Synthesized Histones: New Histones H2A and H2B do Not Deposit in the Same Nucleosome with New Histones H3 and H4. *Biochemistry.* 26, 2315-2325.
40. Jackson, V. (1988) Deposition of Newly Synthesized Histones: Hybrid Nucleosomes are Not Tandemly Arranged on Daughter DNA Strands. *Biochemistry.* 27, 2109-2120.
41. Ng, H. H., Xu, R. M., Zhang, Y., and Struhl, K. (2002) Ubiquitination of Histone H2B by Rad6 is Required for Efficient Dot1-Mediated Methylation of Histone H3 Lysine 79. *J. Biol. Chem.* 277, 34655-34657.
42. Briggs, S. D., Xiao, T., Sun, Z. W., Caldwell, J. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Allis, C. D., and Strahl, B. D. (2002) Gene Silencing: Trans-Histone Regulatory Pathway in Chromatin. *Nature.* 418, 498.
43. McNairn, A. J., and Gilbert, D. M. (2003) Epigenomic Replication: Linking Epigenetics to DNA Replication. *Bioessays.* 25, 647-656.
44. DeLange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L., and Bonner, J. (1969) Calf and Pea Histone IV. 3. Complete Amino Acid Sequence of Pea Seedling Histone IV; Comparison with the Homologous Calf Thymus Histone. *J. Biol. Chem.* 244, 5669-5679.
45. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B. C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991) The Nucleosomal Core Histone Octamer at 3.1 Å Resolution: A Tripartite Protein Assembly and a Left-Handed Superhelix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 10148-10152.
46. Kuo, M. H., Brownell, J. E., Sobel, 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.
47. Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S. M., and 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, 583-592.
48. 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.
49. Prevelige, P. E., Jr, and Fasman, G. D. (1987) Structural Studies of Acetylated and Control Inner Core Histones. *Biochemistry.* 26, 2944-2955.
50. Wang, X., Moore, S. C., Laszczak, M., and Ausio, J. (2000) Acetylation Increases the Alpha-Helical Content of the Histone Tails of the Nucleosome. *J. Biol. Chem.* 275, 35013-35020.

51. Finch, J. T., and Klug, A. (1976) Solenoidal Model for Superstructure in Chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1897-1901.
52. Wolffe, A. P., Khochbin, S., and Dimitrov, S. (1997) What do Linker Histones do in Chromatin? *Bioessays*. **19**, 249-255.
53. Eickbush, T. H., and Moudrianakis, E. N. (1978) The Histone Core Complex: An Octamer Assembled by Two Sets of Protein-Protein Interactions. *Biochemistry*. **17**, 4955-4964.
54. Karantza, V., Freire, E., and Moudrianakis, E. N. (2001) Thermodynamic Studies of the Core Histones: Stability of the Octamer Subunits is Not Altered by Removal of their Terminal Domains. *Biochemistry*. **40**, 13114-13123.
55. 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. U. S. A.* **90**, 10489-10493.
56. 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.
57. Hayes, J. J., Clark, D. J., and Wolffe, A. P. (1991) Histone Contributions to the Structure of DNA in the Nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6829-6833.
58. 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.
59. McGhee, J. D., and Felsenfeld, G. (1979) Reaction of Nucleosome DNA with Dimethyl Sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 2133-2137.
60. McGhee, J. D., and Felsenfeld, G. (1982) Reconstitution of Nucleosome Core Particles Containing Glucosylated DNA. *J. Mol. Biol.* **158**, 685-698.
61. Thomas, J. O. (1989) Chemical Radiolabeling of Lysines that Interact Strongly with DNA in Chromatin. *Methods Enzymol.* **170**, 369-385.
62. 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. U. S. A.* **94**, 8959-8964.
63. Grunstein, M., Hecht, A., Fisher-Adams, G., Wan, J., Mann, R. K., Strahl-Bolsinger, S., Laroche, T., and Gasser, S. (1995) The Regulation of Euchromatin and Heterochromatin by Histones in Yeast. *J. Cell Sci. Suppl.* **19**, 29-36.
64. Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001) Translating the Histone Code. *Science*. **293**, 1074-1080.
65. Turner, B. M. (2002) Cellular Memory and the Histone Code. *Cell*. **111**, 285-291.
66. Sawan, C., and Herceg, Z. (2010) *Advances in Genetics*, in Elsevier Inc., .
67. Fisher-Adams, G., and Grunstein, M. (1995) Yeast Histone H4 and H3 N-Termini have Different Effects on the Chromatin Structure of the GAL1 Promoter. *EMBO J.* **14**, 1468-1477.
68. Kouzarides, T. (2007) Chromatin Modifications and their Function. *Cell*. **128**, 693-705.

69. Zhang, L., Eugeni, E. E., Parthun, M. R., and Freitas, M. A. (2003) Identification of Novel Histone Post-Translational Modifications by Peptide Mass Fingerprinting. *Chromosoma*. 112, 77-86.
70. Zhang, K., Tang, H., Huang, L., Blankenship, J. W., Jones, P. R., Xiang, F., Yau, P. M., and Burlingame, A. L. (2002) Identification of Acetylation and Methylation Sites of Histone H3 from Chicken Erythrocytes by High-Accuracy Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Postsource Decay, and Nano electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* 306, 259-269.
71. Zhang, K., Williams, K. E., Huang, L., Yau, P., Siino, J. S., Bradbury, E. M., Jones, P. R., Minch, M. J., and Burlingame, A. L. (2002) Histone Acetylation and Deacetylation: Identification of Acetylation and Methylation Sites of HeLa Histone H4 by Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*. 1, 500-508.
72. Mahadevan, L. C., Willis, A. C., and Barratt, M. J. (1991) Rapid Histone H3 Phosphorylation in Response to Growth Factors, Phorbol Esters, Okadaic Acid, and Protein Synthesis Inhibitors. *Cell*. 65, 775-783.
73. Wei, Y., Mizzen, C. A., Cook, R. G., Gorovsky, M. A., and Allis, C. D. (1998) Phosphorylation of Histone H3 at Serine 10 is Correlated with Chromosome Condensation during Mitosis and Meiosis in Tetrahymena. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7480-7484.
74. Murnion, M. E., Adams, R. R., Callister, D. M., Allis, C. D., Earnshaw, W. C., and Swedlow, J. R. (2001) Chromatin-Associated Protein Phosphatase 1 Regulates Aurora-B and Histone H3 Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 26656-26665.
75. Chadee, D. N., Peltier, C. P., and Davie, J. R. (2002) Histone H1(S)-3 Phosphorylation in Ha-Ras Oncogene-Transformed Mouse Fibroblasts. *Oncogene*. 21, 8397-8403.
76. Ota, T., Suto, S., Katayama, H., Han, Z. B., Suzuki, F., Maeda, M., Tanino, M., Terada, Y., and Tatsuka, M. (2002) Increased Mitotic Phosphorylation of Histone H3 Attributable to AIM-1/Aurora-B Overexpression Contributes to Chromosome Number Instability. *Cancer Res.* 62, 5168-5177.
77. Katayama, H., Brinkley, W. R., and Sen, S. (2003) The Aurora Kinases: Role in Cell Transformation and Tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 22, 451-464.
78. Nowak, S. J., and Corces, V. G. (2000) Phosphorylation of Histone H3 Correlates with Transcriptionally Active Loci. *Genes Dev.* 14, 3003-3013.
79. Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S., and Higgins, J. M. (2005) The Kinase Haspin is Required for Mitotic Histone H3 Thr 3 Phosphorylation and Normal Metaphase Chromosome Alignment. *Genes Dev.* 19, 472-488.
80. Sung, M. T., and 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, 1616-1623.
81. Jackson, V., Shires, A., Tanphaichitr, N., and Chalkley, R. (1976) Modifications to Histones Immediately After Synthesis. *J. Mol. Biol.* 104, 471-483.
82. 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.

83. 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.
84. Wade, P. A., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1997) Histone Acetylation: Chromatin in Action. *Trends Biochem. Sci.* 22, 128-132.
85. Krishnamoorthy, T., Chen, X., Govin, J., Cheung, W. L., Dorsey, J., Schindler, K., Winter, E., Allis, C. D., Guacci, V., Khochbin, S., Fuller, M. T., and Berger, S. L. (2006) Phosphorylation of Histone H4 Ser1 Regulates Sporulation in Yeast and is Conserved in Fly and Mouse Spermatogenesis. *Genes Dev.* 20, 2580-2592.
86. Goebel, W., Obermeyer, N., Bleicher, N., Kratzmeier, M., Eibl, H. J., Doenecke, D., and Albig, W. (2007) Apoptotic DNA Fragmentation is Not Related to the Phosphorylation State of Histone H1. *Biol. Chem.* 388, 197-206.
87. Csordas, A. (1990) On the Biological Role of Histone Acetylation. *Biochem. J.* 265, 23-38.
88. Brownell, J. E., and Allis, C. D. (1996) Special HATs for Special Occasions: Linking Histone Acetylation to Chromatin Assembly and Gene Activation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 176-184.
89. Taunton, J., Hassig, C. A., and Schreiber, S. L. (1996) A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p. *Science.* 272, 408-411.
90. Turner, B. M. (1991) Histone Acetylation and Control of Gene Expression. *J. Cell. Sci.* 99 (Pt 1), 13-20.
91. Wolffe, A. P., and Hayes, J. J. (1999) Chromatin Disruption and Modification. *Nucleic Acids Res.* 27, 711-720.
92. Mathis, D. J., Oudet, P., Wasylyk, B., and Chambon, P. (1978) Effect of Histone Acetylation on Structure and in Vitro Transcription of Chromatin. *Nucleic Acids Res.* 5, 3523-3547.
93. Lee, D. Y., Hayes, J. J., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1993) A Positive Role for Histone Acetylation in Transcription Factor Access to Nucleosomal DNA. *Cell.* 72, 73-84.
94. Vettese-Dadey, M., Grant, P. A., Hebbes, T. R., 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.
95. Ura, K., Kurumizaka, H., Dimitrov, S., Almouzni, G., and Wolffe, A. P. (1997) Histone Acetylation: Influence on Transcription, Nucleosome Mobility and Positioning, and Linker Histone-Dependent Transcriptional Repression. *EMBO J.* 16, 2096-2107.
96. 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.
97. Maas, N. L., Miller, K. M., DeFazio, L. G., and Toczyski, D. P. (2006) Cell Cycle and Checkpoint Regulation of Histone H3 K56 Acetylation by Hst3 and Hst4. *Mol. Cell.* 23, 109-119.
98. Qin, S., and Parthun, M. R. (2006) Recruitment of the Type B Histone Acetyltransferase Hat1p to Chromatin is Linked to DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3649-3658.
99. Esteller, M. (2007) Cancer Epigenomics: DNA Methylomes and Histone-Modification Maps. *Nat. Rev. Genet.* 8, 286-298.

100. Varier, R. A., and Timmers, H. T. (2011) Histone Lysine Methylation and Demethylation Pathways in Cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1815, 75-89.
101. 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, 2916-2924.
102. Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003) Binary Switches and Modification Cassettes in Histone Biology and Beyond. *Nature.* 425, 475-479.
103. Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bernstein, B. E., Karabetsou, N., Morillon, A., Weise, C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2003) Methylation of Histone H3 K4 Mediates Association of the Isw1p ATPase with Chromatin. *Mol. Cell.* 12, 1325-1332.
104. Bannister, A. J., Schneider, R., Myers, F. A., Thorne, A. W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2005) Spatial Distribution of Di- and Tri-Methyl Lysine 36 of Histone H3 at Active Genes. *J. Biol. Chem.* 280, 17732-17736.
105. Sanders, S. L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2004) Methylation of Histone H4 Lysine 20 Controls Recruitment of Crb2 to Sites of DNA Damage. *Cell.* 119, 603-614.
106. Metivier, R., Penot, G., Hubner, M. R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003) Estrogen Receptor-Alpha Directs Ordered, Cyclical, and Combinatorial Recruitment of Cofactors on a Natural Target Promoter. *Cell.* 115, 751-763.
107. Cuthbert, G. L., Daujat, S., Snowden, A. W., Erdjument-Bromage, H., Hagiwara, T., Yamada, M., Schneider, R., Gregory, P. D., Tempst, P., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2004) Histone Deimination Antagonizes Arginine Methylation. *Cell.* 118, 545-553.
108. Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2005) Reversing Histone Methylation. *Nature.* 436, 1103-1106.
109. 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.
110. West, M. H., and Bonner, W. M. (1980) Histone 2B can be Modified by the Attachment of Ubiquitin. *Nucleic Acids Res.* 8, 4671-4680.
111. Kleinschmidt, A. M., and Martinson, H. G. (1981) Structure of Nucleosome Core Particles Containing uH2A (A24). *Nucleic Acids Res.* 9, 2423-2431.
112. Gushchin, D. I., Ebralidze, 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. (Mosk).* 25, 1400-1411.
113. Usachenko, S. I., Bavykin, S. G., Gavin, I. M., and Bradbury, E. M. (1994) Rearrangement of the Histone H2A C-Terminal Domain in the Nucleosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6845-6849.
114. Sun, Z. W., and Allis, C. D. (2002) Ubiquitination of Histone H2B Regulates H3 Methylation and Gene Silencing in Yeast. *Nature.* 418, 104-108.
115. Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, D. E., Bylebyl, G. R., Dokmanovic, M., Dorsey, J. A., Whelan, K. A., Krsmanovic, M., Lane, W. S., Meluh, P. B., Johnson, E. S., and Berger, S. L.

(2006) Histone Sumoylation is a Negative Regulator in *Saccharomyces Cerevisiae* and shows Dynamic Interplay with Positive-Acting Histone Modifications. *Genes Dev.* 20, 966-976.

116. Khochbin, S., and Wolffe, A. P. (1994) Developmentally Regulated Expression of Linker-Histone Variants in Vertebrates. *Eur. J. Biochem.* 225, 501-510.

117. Dou, Y., Mizzen, C. A., Abrams, M., Allis, C. D., and Gorovsky, M. A. (1999) Phosphorylation of Linker Histone H1 Regulates Gene Expression in Vivo by Mimicking H1 Removal. *Mol. Cell.* 4, 641-647.

118. Zlatanova, J., Caiafa, P., and Van Holde, K. (2000) Linker Histone Binding and Displacement: Versatile Mechanism for Transcriptional Regulation. *FASEB J.* 14, 1697-1704.

119. Koop, R., Di Croce, L., and Beato, M. (2003) Histone H1 Enhances Synergistic Activation of the MMTV Promoter in Chromatin. *EMBO J.* 22, 588-599.

120. Pennings, S., Meersseman, G., and Bradbury, E. M. (1994) Linker Histones H1 and H5 Prevent the Mobility of Positioned Nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10275-10279.

121. 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.

122. 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.

123. Parseghian, M. H., Henschen, A. H., Krieglstein, K. G., and Hamkalo, B. A. (1994) A Proposal for a Coherent Mammalian Histone H1 Nomenclature Correlated with Amino Acid Sequences. *Protein Sci.* 3, 575-587.

124. Eick, S., Nicolai, M., Mumberg, D., and Doenecke, D. (1989) Human H1 Histones: Conserved and Varied Sequence Elements in Two H1 Subtype Genes. *Eur. J. Cell Biol.* 49, 110-115.

125. Lennox, R. W. (1984) Differences in Evolutionary Stability among Mammalian H1 Subtypes. Implications for the Roles of H1 Subtypes in Chromatin. *J. Biol. Chem.* 259, 669-672.

126. Th'ng, J. P., Sung, R., Ye, M., and Hendzel, M. J. (2005) H1 Family Histones in the Nucleus. Control of Binding and Localization by the C-Terminal Domain. *J. Biol. Chem.* 280, 27809-27814.

127. Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., and Brown, D. T. (2000) Dynamic Binding of Histone H1 to Chromatin in Living Cells. *Nature.* 408, 877-881.

128. Bianchi, M. E. (2004) Significant (Re)Location: How to use Chromatin and/or Abundant Proteins as Messages of Life and Death. *Trends Cell Biol.* 14, 287-293.

129. Phair, R. D., Scaffidi, P., Elbi, C., Vecerova, J., Dey, A., Ozato, K., Brown, D. T., Hager, G., Bustin, M., and Misteli, T. (2004) Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions in Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins. *Mol. Cell. Biol.* 24, 6393-6402.

130. Welch, S. L., and Cole, R. D. (1979) Differences between Subfractions of H1 Histone in their Interactions with DNA. Circular Dichroism and Viscosity. *J. Biol. Chem.* 254, 662-665.

131. Welch, 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.
132. Liao, L. W., and Cole, R. D. (1981) Differences among H1 Histone Subfractions in Binding to Linear and Superhelical DNA. Sedimentation Velocity Studies. *J. Biol. Chem.* 256, 11145-11150.
133. Fan, Y., Sirotkin, A., Russell, R. G., Ayala, J., and Skoultchi, A. I. (2001) Individual Somatic H1 Subtypes are Dispensable for Mouse Development Even in Mice Lacking the H1(0) Replacement Subtype. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7933-7943.
134. Sirotkin, A. M., Edelman, W., Cheng, G., Klein-Szanto, A., Kucherlapati, R., and Skoultchi, A. I. (1995) Mice Develop Normally without the H1(0) Linker Histone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6434-6438.
135. Fan, Y., Nikitina, T., Morin-Kensicki, E. M., Zhao, J., Magnuson, T. R., Woodcock, C. L., and Skoultchi, A. I. (2003) H1 Linker Histones are Essential for Mouse Development and Affect Nucleosome Spacing in Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4559-4572.
136. Sancho, M., Diani, E., Beato, M., and Jordan, A. (2008) Depletion of Human Histone H1 Variants Uncovers Specific Roles in Gene Expression and Cell Growth. *PLoS Genet.* 4, e1000227.
137. 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.
138. Ponte, I., Martinez, P., Ramirez, A., Jorcano, J. L., Monzo, M., and Suau, P. (1994) Transcriptional Activation of Histone H1 Zero during Neuronal Terminal Differentiation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 80, 35-44.
139. Cole, R. D. (1984) A Minireview of Microheterogeneity in H1 Histone and its Possible Significance. *Anal. Biochem.* 136, 24-30.
140. Lennox, R. W., and Cohen, L. H. (1983) The Histone H1 Complements of Dividing and Nondividing Cells of the Mouse. *J. Biol. Chem.* 258, 262-268.
141. Pina, B., Martinez, P., and Suau, P. (1987) Changes in H1 Complement in Differentiating Rat-Brain Cortical Neurons. *Eur. J. Biochem.* 164, 71-76.
142. Affolter, M., Cote, J., Renaud, J., and Ruiz-Carrillo, A. (1987) Regulation of Histone and Beta A-Globin Gene Expression during Differentiation of Chicken Erythroid Cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3663-3672.
143. 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.
144. Wisniewski, J. R., Zougman, A., Kruger, S., and Mann, M. (2007) Mass Spectrometric Mapping of Linker Histone H1 Variants Reveals Multiple Acetylations, Methylations, and Phosphorylation as Well as Differences between Cell Culture and Tissue. *Mol. Cell. Proteomics.* 6, 72-87.
145. Happel, N., Schulze, E., and Doenecke, D. (2005) Characterisation of Human Histone H1x. *Biol. Chem.* 386, 541-551.
146. Wolffe, A. P. (1997) Histone H1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1463-1466.

147. Khochbin, S. (2001) Histone H1 Diversity: Bridging Regulatory Signals to Linker Histone Function. *Gene*. 271, 1-12.
148. Tanaka, M., Hennebold, J. D., Macfarlane, J., and 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, 655-664.
149. Tanaka, Y., Kato, S., Tanaka, M., Kuji, N., and Yoshimura, Y. (2003) Structure and Expression of the Human Oocyte-Specific Histone H1 Gene Elucidated by Direct RT-Nested PCR of a Single Oocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 351-357.
150. Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2005) Polar Nuclear Localization of H1T2, a Histone H1 Variant, Required for Spermatid Elongation and DNA Condensation during Spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2808-2813.
151. Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., Okabe, M., and Nishimune, Y. (2005) HANP1/H1T2, a Novel Histone H1-Like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7107-7119.
152. Yan, W., Ma, L., Burns, K. H., and Matzuk, M. M. (2003) HILS1 is a Spermatid-Specific Linker Histone H1-Like Protein Implicated in Chromatin Remodeling during Mammalian Spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10546-10551.
153. Albig, W., Drabent, B., Kunz, J., Kalf-Suske, M., Grzeschik, K. H., and Doenecke, D. (1993) All Known Human H1 Histone Genes Except the H1(0) Gene are Clustered on Chromosome 6. *Genomics*. 16, 649-654.
154. Wang, Z. F., Krasikov, T., Frey, M. R., Wang, J., Matera, A. G., and Marzluff, W. F. (1996) Characterization of the Mouse Histone Gene Cluster on Chromosome 13: 45 Histone Genes in Three Patches Spread Over 1Mb. *Genome Res.* 6, 688-701.
155. Wang, Z. F., Sirotkin, A. M., Buchold, G. M., Skoultchi, A. I., and Marzluff, W. F. (1997) The Mouse Histone H1 Genes: Gene Organization and Differential Regulation. *J. Mol. Biol.* 271, 124-138.
156. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raaf, M., Roberts, K., and Walter, P. (1998) *Essential Cell Biology. an Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York.
157. Zhao, K., Kas, E., Gonzalez, E., and 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.
158. Brannan, C. I., Gilbert, D. J., Ceci, J. D., Matsuda, Y., Chapman, V. M., Mercer, J. A., Eisen, H., Johnston, L. A., Copeland, N. G., and Jenkins, N. A. (1992) An Interspecific Linkage Map of Mouse Chromosome 15 Positioned with Respect to the Centromere. *Genomics*. 13, 1075-1081.
159. Allan, J., Hartman, P. G., Crane-Robinson, C., and Aviles, F. X. (1980) The Structure of Histone H1 and its Location in Chromatin. *Nature*. 288, 675-679.
160. 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.

161. 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.
162. 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.
163. Ramesh, S., Bharath, M. M., Chandra, N. R., and Rao, M. R. (2006) A K52Q Substitution in the Globular Domain of Histone H1t Modulates its Nucleosome Binding Properties. *FEBS Lett*. 580, 5999-6006.
164. Brown, D. T., Izard, T., and Misteli, T. (2006) Mapping the Interaction Surface of Linker Histone H1(0) with the Nucleosome of Native Chromatin in Vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 250-255.
165. Bohm, L., and Mitchell, T. C. (1985) Sequence Conservation in the N-Terminal Domain of Histone H1. *FEBS Lett*. 193, 1-4.
166. Vila, R., Ponte, I., Collado, M., Arrondo, J. L., Jimenez, M. A., Rico, M., and Suau, P. (2001) DNA-Induced Alpha-Helical Structure in the NH2-Terminal Domain of Histone H1. *J. Biol. Chem*. 276, 46429-46435.
167. Vila, R., Ponte, I., Jimenez, M. A., Rico, M., and Suau, P. (2002) An Inducible Helix-Gly-Gly-Helix Motif in the N-Terminal Domain of Histone H1e: A CD and NMR Study. *Protein Sci*. 11, 214-220.
168. Subirana, J. A. (1990) Analysis of the Charge Distribution in the C-Terminal Region of Histone H1 as Related to its Interaction with DNA. *Biopolymers*. 29, 1351-1357.
169. Butler, P. J. (1984) A Defined Structure of the 30 Nm Chromatin Fibre which Accommodates Different Nucleosomal Repeat Lengths. *EMBO J*. 3, 2599-2604.
170. Clark, D. J., Hill, C. S., Martin, S. R., and Thomas, J. O. (1988) Alpha-Helix in the Carboxy-Terminal Domains of Histones H1 and H5. *EMBO J*. 7, 69-75.
171. Moran, F., Montero, F., Azorin, F., and Suau, P. (1985) Condensation of DNA by the C-Terminal Domain of Histone H1. A Circular Dichroism Study. *Biophys. Chem*. 22, 125-129.
172. Moran, F., Rodriguez, A. T., Suau, P., and Montero, F. (1989) Kinetic Analysis of Psi-DNA Structure Formation Induced by Histone H1 and its C-Terminal Domain. *Biophys. Chem*. 33, 133-141.
173. Lu, X., and Hansen, J. C. (2004) Identification of Specific Functional Subdomains within the Linker Histone H10 C-Terminal Domain. *J. Biol. Chem*. 279, 8701-8707.
174. Lu, X., Hamkalo, B., Parseghian, M. H., and Hansen, J. C. (2009) Chromatin Condensing Functions of the Linker Histone C-Terminal Domain are Mediated by Specific Amino Acid Composition and Intrinsic Protein Disorder. *Biochemistry*. 48, 164-172.
175. Bharath, M. M., Ramesh, S., Chandra, N. R., and Rao, M. R. (2002) Identification of a 34 Amino Acid Stretch within the C-Terminus of Histone H1 as the DNA-Condensing Domain by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*. 41, 7617-7627.
176. Khadake, J. R., and 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, 1041-1051.

177. Roque, A., Iloro, I., Ponte, I., Arrondo, J. L., and Suau, P. (2005) DNA-Induced Secondary Structure of the Carboxyl-Terminal Domain of Histone H1. *J. Biol. Chem.* **280**, 32141-32147.
178. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005) Intrinsically Unstructured Proteins and their Functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197-208.
179. Uversky, V. N. (2002) Natively Unfolded Proteins: A Point Where Biology Waits for Physics. *Protein Sci.* **11**, 739-756.
180. Uversky, V. N. (2003) Protein Folding Revisited. A Polypeptide Chain at the Folding-Misfolding-Nonfolding Cross-Roads: Which Way to Go? *Cell Mol. Life Sci.* **60**, 1852-1871.
181. 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.
182. 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.
183. Vila, R., Ponte, I., Collado, M., Arrondo, J. L., and Suau, P. (2001) 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**, 30898-30903.
184. Caterino, T. L., Fang, H., and Hayes, J. J. (2011) Nucleosome Linker DNA Contacts and Induces Specific Folding of the Intrinsically Disordered H1 Carboxyl Terminal Domain. *Mol. Cell Biol.*
185. Simpson, R. T. (1978) Structure of the Chromatosome, a Chromatin Particle Containing 160 Base Pairs of DNA and all the Histones. *Biochemistry.* **17**, 5524-5531.
186. Travers, A. A. (1994) Chromatin Structure and Dynamics. *Bioessays.* **16**, 657-662.
187. Pruss, D., Hayes, J. J., and Wolffe, A. P. (1995) Nucleosomal Anatomy--Where are the Histones? *Bioessays.* **17**, 161-170.
188. Mirzabekov, A. D., Pruss, D. V., and Ebralidse, K. K. (1990) Chromatin Superstructure-Dependent Crosslinking with DNA of the Histone H5 Residues Thr1, His25 and His62. *J. Mol. Biol.* **211**, 479-491.
189. 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.
190. Boulikas, T., Wiseman, J. M., and Garrard, W. T. (1980) Points of Contact between Histone H1 and the Histone Octamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 127-131.
191. 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. U. S. A.* **90**, 6415-6419.
192. Travers, A. (1999) The location of the linker histone on the nucleosome. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 4-7.
193. Hayes, J. J., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1994) Contacts of the Globular Domain of Histone H5 and Core Histones with DNA in a "Chromatosome". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7817-7821.

194. 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.
195. 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.
196. 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.
197. Lever, M. A., Th'ng, J. P., Sun, X., and Hendzel, M. J. (2000) Rapid Exchange of Histone H1.1 on Chromatin in Living Human Cells. *Nature*. 408, 873-876.
198. Catez, F., Ueda, T., and Bustin, M. (2006) Determinants of Histone H1 Mobility and Chromatin Binding in Living Cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 305-310.
199. Zlatanova, J., Seebart, C., and Tomschik, M. (2008) The Linker-Protein Network: Control of Nucleosomal DNA Accessibility. *Trends Biochem. Sci.* 33, 247-253.
200. Marky, N. L., and Manning, G. S. (1995) A Theory of DNA Dissociation from the Nucleosome. *J. Mol. Biol.* 254, 50-61.
201. Polach, K. J., and Widom, J. (1995) Mechanism of Protein Access to Specific DNA Sequences in Chromatin: A Dynamic Equilibrium Model for Gene Regulation. *J. Mol. Biol.* 254, 130-149.
202. Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., and Wolberger, C. (2004) Regulated Nucleosome Mobility and the Histone Code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1037-1043.
203. Tomschik, M., Zheng, H., van Holde, K., Zlatanova, J., and Leuba, S. H. (2005) Fast, Long-Range, Reversible Conformational Fluctuations in Nucleosomes Revealed by Single-Pair Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3278-3283.
204. Orrego, M., Ponte, I., Roque, A., Buschati, N., Mora, X., and Suau, P. (2007) Differential Affinity of Mammalian Histone H1 Somatic Subtypes for DNA and Chromatin. *BMC Biol.* 5, 22.
205. Warrant, R. W., and Kim, S. H. (1978) Alpha-Helix-Double Helix Interaction shown in the Structure of a Protamine-Transfer RNA Complex and a Nucleoprotamine Model. *Nature*. 271, 130-135.
206. Turnell, W. G., Satchwell, S. C., and Travers, A. A. (1988) A Decapeptide Motif for Binding to the Minor Groove of DNA. A Proposal. *FEBS Lett.* 232, 263-268.
207. Suzuki, M. (1989) SPKK, a New Nucleic Acid-Binding Unit of Protein found in Histone. *EMBO J.* 8, 797-804.
208. Churchill, M. E., and Suzuki, M. (1989) 'SPKK' Motifs Prefer to Bind to DNA at A/T-Rich Sites. *EMBO J.* 8, 4189-4195.
209. 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 Nonspecific DNA Sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9499-9503.
210. Akhmanova, A., Verkerk, T., Langeveld, A., Grosveld, F., and Galjart, N. (2000) Characterisation of Transcriptionally Active and Inactive Chromatin Domains in Neurons. *J. Cell. Sci.* 113 Pt 24, 4463-4474.

211. McArthur, M., and Thomas, J. O. (1996) A Preference of Histone H1 for Methylated DNA. *EMBO J.* 15, 1705-1714.
212. Hill, D. A., and Reeves, R. (1997) Competition between HMG-I(Y), HMG-1 and Histone H1 on Four-Way Junction DNA. *Nucleic Acids Res.* 25, 3523-3531.
213. Nightingale, K., and Wolffe, A. P. (1995) Methylation at CpG Sequences does Not Influence Histone H1 Binding to a Nucleosome Including a *Xenopus Borealis* 5 S rRNA Gene. *J. Biol. Chem.* 270, 4197-4200.
214. Hansen, J. C., Ausio, J., Stanik, V. H., and van Holde, K. E. (1989) Homogeneous Reconstituted Oligonucleosomes, Evidence for Salt-Dependent Folding in the Absence of Histone H1. *Biochemistry.* 28, 9129-9136.
215. Clark, D. J., and Kimura, T. (1990) Electrostatic Mechanism of Chromatin Folding. *J. Mol. Biol.* 211, 883-896.
216. Hansen, J. C., and Wolffe, A. P. (1992) Influence of Chromatin Folding on Transcription Initiation and Elongation by RNA Polymerase III. *Biochemistry.* 31, 7977-7988.
217. Garcia-Ramirez, 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.
218. Schwarz, P. M., and Hansen, J. C. (1994) Formation and Stability of Higher Order Chromatin Structures. Contributions of the Histone Octamer. *J. Biol. Chem.* 269, 16284-16289.
219. Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. (1995) Modulation of Chromatin Folding by Histone Acetylation. *J. Biol. Chem.* 270, 17923-17928.
220. Fletcher, T. M., and Hansen, J. C. (1995) Core Histone Tail Domains Mediate Oligonucleosome Folding and Nucleosomal DNA Organization through Distinct Molecular Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 25359-25362.
221. 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.
222. De Bernardin, W., Losa, R., and Koller, T. (1986) Formation and Characterization of Soluble Complexes of Histone H1 with Supercoiled DNA. *J. Mol. Biol.* 189, 503-517.
223. Adrian, M., ten Heggeler-Bordier, B., Wahli, W., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., and Dubochet, J. (1990) Direct Visualization of Supercoiled DNA Molecules in Solution. *EMBO J.* 9, 4551-4554.
224. Hizume, K., Yoshimura, S. H., and Takeyasu, K. (2005) Linker Histone H1 Per Se can Induce Three-Dimensional Folding of Chromatin Fiber. *Biochemistry.* 44, 12978-12989.
225. Bednar, J., Furrer, P., Stasiak, A., Dubochet, J., Egelman, E. H., and Bates, A. D. (1994) The Twist, Writhe and overall Shape of Supercoiled DNA Change during Counterion-Induced Transition from a Loosely to a Tightly Interwound Superhelix. Possible Implications for DNA Structure in Vivo. *J. Mol. Biol.* 235, 825-847.
226. Vologodskii, A. V., and Cozzarelli, N. R. (1994) Conformational and Thermodynamic Properties of Supercoiled DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23, 609-643.
227. Al-Natour, Z., and Hassan, A. H. (2007) Effect of Salt on the Binding of the Linker Histone H1 to DNA and Nucleosomes. *DNA Cell Biol.* 26, 445-452.

228. Clark, D. J., and Thomas, J. O. (1988) Differences in the Binding of H1 Variants to DNA. Cooperativity and Linker-Length Related Distribution. *Eur. J. Biochem.* 178, 225-233.
229. Renz, M., and Day, L. A. (1976) Transition from Noncooperative to Cooperative and Selective Binding of Histone H1 to DNA. *Biochemistry.* 15, 3220-3228.
230. Mamoon, N. M., Song, Y., and Wellman, S. E. (2005) Binding of Histone H1 to DNA is Described by an Allosteric Model. *Biopolymers.* 77, 9-17.
231. 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.
232. 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, 223-232.
233. Saitoh, Y., and Laemmli, U. K. (1994) Metaphase Chromosome Structure: Bands Arise from a Differential Folding Path of the Highly AT-Rich Scaffold. *Cell.* 76, 609-622.
234. 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.
235. Kas, E., Poljak, L., Adachi, Y., and Laemmli, U. K. (1993) A Model for Chromatin Opening: Stimulation of Topoisomerase II and Restriction Enzyme Cleavage of Chromatin by Distamycin. *EMBO J.* 12, 115-126.
236. Craig, J. M., Boyle, S., Perry, P., and Bickmore, W. A. (1997) Scaffold Attachments within the Human Genome. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 21), 2673-2682.
237. Coll, M., Frederick, C. A., Wang, A. H., and Rich, A. (1987) A Bifurcated Hydrogen-Bonded Conformation in the d(A.T) Base Pairs of the DNA Dodecamer d(CGCAAATTTGCG) and its Complex with Distamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8385-8389.
238. Nelson, H. C., Finch, J. T., Luisi, B. F., and Klug, A. (1987) The Structure of an Oligo(dA).Oligo(dT) Tract and its Biological Implications. *Nature.* 330, 221-226.
239. von Holt, C., de Groot, P., Schwager, S., and Brandt, W. (1984) *Histone Genes.* Wiley-Interscience, New York.
240. 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 Eng.* 6, 565-574.
241. Vila, R., Ponte, I., Jimenez, M. A., Rico, M., and Suau, P. (2000) A Helix-Turn Motif in the C-Terminal Domain of Histone H1. *Protein Sci.* 9, 627-636.
242. Burkhoff, A. M., and Tullius, T. D. (1987) The Unusual Conformation Adopted by the Adenine Tracts in Kinetoplast DNA. *Cell.* 48, 935-943.
243. Balhorn, R. (1982) A Model for the Structure of Chromatin in Mammalian Sperm. *J. Cell Biol.* 93, 298-305.
244. Zor, T., Mayr, B. M., Dyson, H. J., Montminy, M. R., and Wright, P. E. (2002) Roles of Phosphorylation and Helix Propensity in the Binding of the KIX Domain of CREB-Binding Protein by Constitutive (c-Myb) and Inducible (CREB) Activators. *J. Biol. Chem.* 277, 42241-42248.

245. Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Brown, C. J., O'Connor, T. R., Sikes, J. G., Obradovic, Z., and Dunker, A. K. (2004) The Importance of Intrinsic Disorder for Protein Phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 32, 1037-1049.
246. Baatout, S., and Derradji, H. (2006) About Histone H1 Phosphorylation during Mitosis. *Cell Biochem. Funct.* 24, 93-94.
247. Morgan, D. O. (1997) Cyclin-Dependent Kinases: Engines, Clocks, and Microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 261-291.
248. Garcia, B. A., Busby, S. A., Barber, C. M., Shabanowitz, J., Allis, C. D., and Hunt, D. F. (2004) Characterization of Phosphorylation Sites on Histone H1 Isoforms by Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* 3, 1219-1227.
249. Dasso, M., Dimitrov, S., and Wolffe, A. P. (1994) Nuclear Assembly is Independent of Linker Histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12477-12481.
250. Ohsumi, K., Katagiri, C., and Kishimoto, T. (1993) Chromosome Condensation in *Xenopus* Mitotic Extracts without Histone H1. *Science.* 262, 2033-2035.
251. Horn, P. J., Carruthers, L. M., Logie, C., Hill, D. A., Solomon, M. J., Wade, P. A., Imbalzano, A. N., Hansen, J. C., and Peterson, C. L. (2002) Phosphorylation of Linker Histones Regulates ATP-Dependent Chromatin Remodeling Enzymes. *Nat. Struct. Biol.* 9, 263-267.
252. Hendzel, M. J., Lever, M. A., Crawford, E., and Th'ng, J. P. (2004) The C-Terminal Domain is the Primary Determinant of Histone H1 Binding to Chromatin in Vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 20028-20034.
253. Halmer, L., and Gruss, C. (1996) Effects of Cell Cycle Dependent Histone H1 Phosphorylation on Chromatin Structure and Chromatin Replication. *Nucleic Acids Res.* 24, 1420-1427.
254. Th'ng, J. P., Guo, X. W., Swank, R. A., Crissman, H. A., and Bradbury, E. M. (1994) Inhibition of Histone Phosphorylation by Staurosporine Leads to Chromosome Decondensation. *J. Biol. Chem.* 269, 9568-9573.
255. Paulson, J. R., Patzlaff, J. S., and Vallis, A. J. (1996) Evidence that the Endogenous Histone H1 Phosphatase in HeLa Mitotic Chromosomes is Protein Phosphatase 1, Not Protein Phosphatase 2A. *J. Cell. Sci.* 109 (Pt 6), 1437-1447.
256. 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.
257. Swank, R. A., Th'ng, J. P., Guo, X. W., Valdez, J., Bradbury, E. M., and Gurley, L. R. (1997) Four Distinct Cyclin-Dependent Kinases Phosphorylate Histone H1 at all of its Growth-Related Phosphorylation Sites. *Biochemistry.* 36, 13761-13768.
258. Hergeth, S. P., Dundr, M., Tropberger, P., Zee, B. M., Garcia, B. A., Daujat, S., and Schneider, R. (2011) Isoform-Specific Phosphorylation of Human Linker Histone H1.4 in Mitosis by the Kinase Aurora B. *J. Cell. Sci.* 124, 1623-1628.
259. Sarg, B., Helliger, W., Talasz, H., Forg, B., and Lindner, H. H. (2006) Histone H1 Phosphorylation Occurs Site-Specifically during Interphase and Mitosis: Identification of a Novel Phosphorylation Site on Histone H1. *J. Biol. Chem.* 281, 6573-6580.
260. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2002) Coupling of Folding and Binding for Unstructured Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 54-60.

261. Dunker, A. K., Brown, C. J., Lawson, J. D., Iakoucheva, L. M., and Obradovic, Z. (2002) Intrinsic Disorder and Protein Function. *Biochemistry*. 41, 6573-6582.
262. McDonald, I. K., and Thornton, J. M. (1994) Satisfying Hydrogen Bonding Potential in Proteins. *J. Mol. Biol.* 238, 777-793.
268. Lindner, H., Sarg, B., Hoertnagl, B., and Helliger, W. (1998) The Microheterogeneity of the Mammalian H1(0) Histone. Evidence for an Age-Dependent Deamidation. *J. Biol. Chem.* 273, 13324-13330.
263. Daujat, S., Zeissler, U., Waldmann, T., Happel, N., and Schneider, R. (2005) HP1 Binds Specifically to Lys26-Methylated Histone H1.4, Whereas Simultaneous Ser27 Phosphorylation Blocks HP1 Binding. *J. Biol. Chem.* 280, 38090-38095.
264. 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.
265. Lake, R. S., and Salzman, N. P. (1972) Occurrence and Properties of a Chromatin-Associated F1-Histone Phosphokinase in Mitotic Chinese Hamster Cells. *Biochemistry*. 11, 4817-4826.
266. Wright, H. T. (1991) Sequence and Structure Determinants of the Nonenzymatic Deamidation of Asparagine and Glutamine Residues in Proteins. *Protein Eng.* 4, 283-294.
267. Pham, A. D., and Sauer, F. (2000) Ubiquitin-activating/conjugating Activity of TAFII250, a Mediator of Activation of Gene Expression in Drosophila. *Science*. 289, 2357-2360.
268. Moore, S. C., Jason, L., and Ausio, J. (2002) The Elusive Structural Role of Ubiquitinated Histones. *Biochem. Cell Biol.* 80, 311-319.
269. Panzeter, P. L., Realini, C. A., and Althaus, F. R. (1992) Noncovalent Interactions of Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) with Histones. *Biochemistry*. 31, 1379-1385.
270. Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. (1982) Poly(ADP-Ribosyl)ation of Polynucleosomes Causes Relaxation of Chromatin Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3423-3427.
271. D'erme, M., Zardo, G., Reale, A., and Caiafa, P. (1996) Co-Operative Interactions of Oligonucleosomal DNA with the H1e Histone Variant and its Poly(ADP-Ribosyl)ated Isoform. *Biochem. J.* 316 (Pt 2), 475-480.
272. 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.
273. Zardo, G., Marenzi, S., and Caiafa, P. (1998) H1 Histone as a Trans-Acting Factor Involved in Protecting Genomic DNA from Full Methylation. *Biol. Chem.* 379, 647-654.
274. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., and Shi, Y. (2004) Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. *Cell*. 119, 941-953.
275. Staynov, D. Z., and Crane-Robinson, C. (1988) Footprinting of Linker Histones H5 and H1 on the Nucleosome. *EMBO J.* 7, 3685-3691.

276. Allan, J., Mitchell, T., Harborne, N., Bohm, L., and Crane-Robinson, C. (1986) Roles of H1 Domains in Determining Higher Order Chromatin Structure and H1 Location. *J. Mol. Biol.* **187**, 591-601.
277. Widom, J. (1989) Toward a Unified Model of Chromatin Folding. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 365-395.
278. Brown, D. T., Gunjan, A., Alexander, B. T., and 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.
279. Adams, C. C., and Workman, J. L. (1993) Nucleosome Displacement in Transcription. *Cell.* **72**, 305-308.
280. Lu, Z. H., Sittman, D. B., Romanowski, P., and Leno, G. H. (1998) Histone H1 Reduces the Frequency of Initiation in Xenopus Egg Extract by Limiting the Assembly of Prereplication Complexes on Sperm Chromatin. *Mol. Biol. Cell.* **9**, 1163-1176.
281. De, S., Brown, D. T., Lu, Z. H., Leno, G. H., Wellman, S. E., and Sittman, D. B. (2002) Histone H1 Variants Differentially Inhibit DNA Replication through an Affinity for Chromatin Mediated by their Carboxyl-Terminal Domains. *Gene.* **292**, 173-181.
282. Karymov, M. A., Tomschik, M., Leuba, S. H., Caiafa, P., and Zlatanova, J. (2001) DNA Methylation-Dependent Chromatin Fiber Compaction in Vivo and in Vitro: Requirement for Linker Histone. *FASEB J.* **15**, 2631-2641.
283. Fan, Y., Nikitina, T., Zhao, J., Fleury, T. J., Bhattacharyya, R., Bouhassira, E. E., Stein, A., Woodcock, C. L. and Skoultchi, A. I. (2005) Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell* **123**, 1199-1212.
284. Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., and Kouzarides, T. (2001) Selective Recognition of Methylated Lysine 9 on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain. *Nature.* **410**, 120-124.
285. Alexandrow, M. G., and Hamlin, J. L. (2005) Chromatin Decondensation in S-Phase Involves Recruitment of Cdk2 by Cdc45 and Histone H1 Phosphorylation. *J. Cell Biol.* **168**, 875-886.
286. Hale, T. K., Contreras, A., Morrison, A. J., and Herrera, R. E. (2006) Phosphorylation of the Linker Histone H1 by CDK Regulates its Binding to HP1alpha. *Mol. Cell.* **22**, 693-699.
287. Kysela, B., Chovanec, M., and Jeggo, P. A. (2005) Phosphorylation of Linker Histones by DNA-Dependent Protein Kinase is Required for DNA Ligase IV-Dependent Ligation in the Presence of Histone H1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1877-1882.
288. Yellajoshiyula, D., and Brown, D. T. (2006) Global Modulation of Chromatin Dynamics Mediated by Dephosphorylation of Linker Histone H1 is Necessary for Erythroid Differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 18568-18573.
289. Mishra, S., Saleh, A., Espino, P. S., Davie, J. R., and Murphy, L. J. (2006) Phosphorylation of Histones by Tissue Transglutaminase. *J. Biol. Chem.* **281**, 5532-5538.
290. Bleher, R., and Martin, R. (1999) Nucleo-Cytoplasmic Translocation of Histone H1 during the HeLa Cell Cycle. *Chromosoma.* **108**, 308-316.
291. Tsai, L. H., Delalle, I., Caviness, V. S., Jr, Chae, T., and Harlow, E. (1994) P35 is a Neural-Specific Regulatory Subunit of Cyclin-Dependent Kinase 5. *Nature.* **371**, 419-423.

292. Duce, J. A., Smith, D. P., Blake, R. E., Crouch, P. J., Li, Q. X., Masters, C. L., and Trounce, I. A. (2006) Linker Histone H1 Binds to Disease Associated Amyloid-Like Fibrils. *J. Mol. Biol.* 361, 493-505.
293. Zlatanova, J. S., Srebrevna, L. N., Banchev, T. B., Tasheva, B. T., Tsanev, R. G. (1990) Cytoplasmic pool of histone H1 in mammalian cells. *J. Cell. Sci.* 96, 461-468.
294. Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A. I., and Tsujimoto, Y. (2003) Involvement of Histone H1.2 in Apoptosis Induced by DNA Double-Strand Breaks. *Cell.* 114, 673-688.
295. Parseghian, M. H., and 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, 289-304.
296. Wu, D., Ingram, A., Lahti, J. H., Mazza, B., Grenet, J., Kapoor, A., Liu, L., Kidd, V. J., and Tang, D. (2002) Apoptotic Release of Histones from Nucleosomes. *J. Biol. Chem.* 277, 12001-12008.
297. Gabler, C., Blank, N., Hieronymus, T., Schiller, M., Berden, J. H., Kalden, J. R., and Lorenz, H. M. (2004) Extranuclear Detection of Histones and Nucleosomes in Activated Human Lymphoblasts as an Early Event in Apoptosis. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1135-1144.
298. Kratzmeier, M., Albig, W., Hanecke, K., and Doenecke, D. (2000) Rapid Dephosphorylation of H1 Histones After Apoptosis Induction. *J. Biol. Chem.* 275, 30478-30486.
299. Napirei, M., Wulf, S., and Mannherz, H. G. (2004) Chromatin Breakdown during Necrosis by Serum Dnase1 and the Plasminogen System. *Arthritis Rheum.* 50, 1873-1883.
300. Parseghian, M. H., and Luhrs, K. A. (2006) Beyond the Walls of the Nucleus: The Role of Histones in Cellular Signaling and Innate Immunity. *Biochem. Cell Biol.* 84, 589-604.
301. Brix, K., Summa, W., Lottspeich, F., and Herzog, V. (1998) Extracellularly Occurring Histone H1 Mediates the Binding of Thyroglobulin to the Cell Surface of Mouse Macrophages. *J. Clin. Invest.* 102, 283-293.
302. Hiemstra, P. S., Eisenhauer, P. B., Harwig, S. S., van den Barselaar, M. T., van Furth, R., and Lehrer, R. I. (1993) Antimicrobial Proteins of Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 61, 3038-3046.
303. Evans, D. L., Kaur, H., Leary, J., 3rd, Praveen, K., and Jaso-Friedmann, L. (2005) Molecular Characterization of a Novel Pattern Recognition Protein from Nonspecific Cytotoxic Cells: Sequence Analysis, Phylogenetic Comparisons and Anti-Microbial Activity of a Recombinant Homologue. *Dev. Comp. Immunol.* 29, 1049-1064.
304. Rose, F. R., Bailey, K., Keyte, J. W., Chan, W. C., Greenwood, D., and Mahida, Y. R. (1998) Potential Role of Epithelial Cell-Derived Histone H1 Proteins in Innate Antimicrobial Defense in the Human Gastrointestinal Tract. *Infect. Immun.* 66, 3255-3263.
305. Zhu, G., Chen, H., Choi, B. K., Del Piero, F., and Schifferli, D. M. (2005) Histone H1 Proteins Act as Receptors for the 987P Fimbriae of Enterotoxigenic Escherichia Coli. *J. Biol. Chem.* 280, 23057-23065.
306. Tamura, M., Natori, K., Kobayashi, M., Miyamura, T., and Takeda, N. (2003) Inhibition of Attachment of Virions of Norwalk Virus to Mammalian Cells by Soluble Histone Molecules. *Arch. Virol.* 148, 1659-1670.

307. Fernandes, J. M., Molle, G., Kemp, G. D., and Smith, V. J. (2004) Isolation and Characterisation of Oncorhyncin II, a Histone H1-Derived Antimicrobial Peptide from Skin Secretions of Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.* *28*, 127-138.
308. Luders, T., Birkemo, G. A., Nissen-Meyer, J., Andersen, O., and Nes, I. F. (2005) Proline Conformation-Dependent Antimicrobial Activity of a Proline-Rich Histone h1 N-Terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2399-2406.
309. Burri, M., Schlimme, W., Betschart, B., Lindner, H., Kampfer, U., Schaller, J., and Hecker, H. (1995) Partial Amino Acid Sequence and Functional Aspects of Histone H1 Proteins in *Trypanosoma Brucei Brucei*. *Biol. Cell.* *83*, 23-31.
310. Solioz, N., Blum-Tirouvanziam, U., Jacquet, R., Rafati, S., Corradin, G., Mauel, J., and Fasel, N. (1999) The Protective Capacities of Histone H1 Against Experimental Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Vaccine.* *18*, 850-859.
311. Masina, S., M Gicheru, M., Demotz, S. O., and Fasel, N. J. (2003) Protection Against Cutaneous Leishmaniasis in Outbred Vervet Monkeys using a Recombinant Histone H1 Antigen. *J. Infect. Dis.* *188*, 1250-1257.
312. Patat, S. A., Carnegie, R. B., Kingsbury, C., Gross, P. S., Chapman, R., and Schey, K. L. (2004) Antimicrobial Activity of Histones from Hemocytes of the Pacific White Shrimp. *Eur. J. Biochem.* *271*, 4825-4833.
313. Patel, S. J., Shapiro, W. R., Laske, D. W., Jensen, R. L., Asher, A. L., Wessels, B. W., Carpenter, S. P., and Shan, J. S. (2005) Safety and Feasibility of Convection-Enhanced Delivery of Cotara for the Treatment of Malignant Glioma: Initial Experience in 51 Patients. *Neurosurgery.* *56*, 1243-52; discussion 1252-3.
314. Chen, S., Yu, L., Jiang, C., Zhao, Y., Sun, D., Li, S., Liao, G., Chen, Y., Fu, Q., Tao, Q., Ye, D., Hu, P., Khawli, L. A., Taylor, C. R., Epstein, A. L., and Ju, D. W. (2005) Pivotal Study of Iodine-131-Labeled Chimeric Tumor Necrosis Treatment Radioimmunotherapy in Patients with Advanced Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* *23*, 1538-1547.
315. Nakano, T., Kawamoto, S., Lai, C. Y., Sasaki, T., Aki, T., Shigeta, S., Goto, T., Sato, S., Goto, S., Chen, C. L., and Ono, K. (2004) Liver Transplantation-Induced Antihistone H1 Autoantibodies Suppress Mixed Lymphocyte Reaction. *Transplantation.* *77*, 1595-1603.
316. Rickwood, D., and Hames, B. D. (1990) Gel Electrophoresis of Nucleic Acids a Practical Approach.
317. Whitmore, L., and Wallace, B. A. (2008) Protein Secondary Structure Analyses from Circular Dichroism Spectroscopy: Methods and Reference Databases. *Biopolymers.* *89*, 392-400.
318. Greenfield, N. J. (2006) Using Circular Dichroism Spectra to Estimate Protein Secondary Structure. *Nat. Protoc.* *1*, 2876-2890.
319. Klewpatinond, M., and Viles, J. H. (2007) Empirical Rules for Rationalising Visible Circular Dichroism of Cu²⁺ and Ni²⁺ Histidine Complexes: Applications to the Prion Protein. *FEBS Lett.* *581*, 1430-1434.
320. van Holde, K., Johnson, W. C., and Ho, P. S. (1998) *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice-Hall, Inc, New Jersey.

321. Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J. M., and Raussens, V. (2006) Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. *Biophys. J.* 90, 2946-2957.
322. Arrondo, J. L., and Goni, F. M. (1999) Structure and Dynamics of Membrane Proteins as Studied by Infrared Spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 367-405.
323. Krimm, S., and Abe, Y. (1972) Intermolecular Interaction Effects in the Amide I Vibrations of Polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 2788-2792.
324. Barth, A. (2000) Fine-Structure Enhancement--Assessment of a Simple Method to Resolve Overlapping Bands in Spectra. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 56, 1223-1232.
325. Kumosinski, T. F., and Unruh, J. J. (1996) Quantitation of the Global Secondary Structure of Globular Proteins by FTIR Spectroscopy: Comparison with X-Ray Crystallographic Structure. *Talanta.* 43, 199-219.
326. Mayer, E. (1994) FTIR Spectroscopic Study of the Dynamics of Conformational Substates in Hydrated Carbonyl-Myoglobin Films Via Temperature Dependence of the CO Stretching Band Parameters. *Biophys. J.* 67, 862-873.
327. Byler, D. M., and Susi, H. (1986) Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers.* 25, 469-487.
328. Arrondo, J. L., Muga, A., Castresana, J., and Goni, F. M. (1993) Quantitative Studies of the Structure of Proteins in Solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
329. 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 Eukaryote Chromatin. the Three Structural Regions of the Histone H1 Molecule. *Eur. J. Biochem.* 77, 45-51.
330. Roque, A., Orrego, M., Ponte, I., and Suau, P. (2004) The Preferential Binding of Histone H1 to DNA Scaffold-Associated Regions is Determined by its C-Terminal Domain. *Nucleic Acids Res.* 32, 6111-6119.
331. Rodriguez, A. T., Perez, L., Moran, F., Montero, F., and Suau, P. (1991) Cooperative Interaction of the C-Terminal Domain of Histone H1 with DNA. *Biophys. Chem.* 39, 145-152.
332. Roque, A., Ponte, I., Arrondo, J. L., and Suau, P. (2008) Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Domain of Histone H1: Effects on Secondary Structure and DNA Condensation. *Nucleic Acids Res.* 36, 4719-4726.
333. Jordan, C. F., Lerman, L. S., and Venable, J. H. (1972) Structure and Circular Dichroism of DNA in Concentrated Polymer Solutions. *Nat. New Biol.* 236, 67-70.
334. Fasman, G. D., Schaffhausen, B., Goldsmith, L., and Adler, A. (1970) Conformational Changes Associated with f-1 Histone-Deoxyribonucleic Acid Complexes. Circular Dichroism Studies. *Biochemistry.* 9, 2814-2822.
335. Lopez, R., Roque, A., and Suau, P. (2009) *Estructura De La Histona H1⁰. Efectos De La Fosforilacion.* .
336. Pepe, I., Catasti, P., Rauch, G., Nizzari, M., and Nicolini, C. (1990) The Histone H1 Globular Region. A Possible Supersecondary Structure from Spectroscopic and Statistical Studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1041, 14-21.

337. Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991) Relationship between Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shift and Protein Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* 222, 311-333.
338. Sullivan, S. A., Aravind, L., Makalowska, I., Baxevanis, A. D., and Landsman, D. (2000) The Histone Database: A Comprehensive WWW Resource for Histones and Histone Fold-Containing Proteins. *Nucleic Acids Res.* 28, 320-322.
339. 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. U. S. A.* 83, 7628-7632.
340. 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.
341. van Helden, P. D. (1982) A Theoretical Consideration of the Lysine-Rich Histones: H1 from a Mammal and an Echinoderm, H5 from Erythrocytes. *J. Theor. Biol.* 96, 327-336.
342. Dickinson, L. A., and Kohwi-Shigematsu, T. (1995) Nucleolin is a Matrix Attachment Region DNA-Binding Protein that Specifically Recognizes a Region with High Base-Unpairing Potential. *Mol. Cell. Biol.* 15, 456-465.
343. Luderus, M. E., den Blaauwen, J. L., de Smit, O. J., Compton, D. A., and van Driel, R. (1994) Binding of Matrix Attachment Regions to Lamin Polymers Involves Single-Stranded Regions and the Minor Groove. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6297-6305.
344. Kipp, M., Gohring, F., Ostendorp, T., van Druenen, C. M., van Driel, R., Przybylski, M., and Fackelmayer, F. O. (2000) SAF-Box, a Conserved Protein Domain that Specifically Recognizes Scaffold Attachment Region DNA. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7480-7489.
345. Sipski, M. L., and Wagner, T. E. (1977) Probing DNA Quaternary Ordering with Circular Dichroism Spectroscopy: Studies of Equine Sperm Chromosomal Fibers. *Biopolymers.* 16, 573-582.
346. Radivojac, P., Obradovic, Z., Smith, D. K., Zhu, G., Vucetic, S., Brown, C. J., Lawson, J. D., and Dunker, A. K. (2004) Protein Flexibility and Intrinsic Disorder. *Protein Sci.* 13, 71-80.
347. Cordeiro, Y., Machado, F., Juliano, L., Juliano, M. A., Brentani, R. R., Foguel, D., and Silva, J. L. (2001) DNA Converts Cellular Prion Protein into the Beta-Sheet Conformation and Inhibits Prion Peptide Aggregation. *J. Biol. Chem.* 276, 49400-49409.
348. Zandomenighi, G., Krebs, M. R., McCammon, M. G., and Fandrich, M. (2004) FTIR Reveals Structural Differences between Native Beta-Sheet Proteins and Amyloid Fibrils. *Protein Sci.* 13, 3314-3321.
349. Fandrich, M., Forge, V., Buder, K., Kittler, M., Dobson, C. M., and Diekmann, S. (2003) Myoglobin Forms Amyloid Fibrils by Association of Unfolded Polypeptide Segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15463-15468.
350. Chehin, R., Iloro, I., Marcos, M. J., Villar, E., Shnyrov, V. L., and Arrondo, J. L. (1999) Thermal and pH-Induced Conformational Changes of a Beta-Sheet Protein Monitored by Infrared Spectroscopy. *Biochemistry.* 38, 1525-1530.
351. Caterino, T. L., and Hayes, J. J. (2011) Structure of the H1 C-Terminal Domain and Function in Chromatin Condensation. *Biochem. Cell Biol.* 89, 35-44.

352. Talasz, H., Sarg, B., and Lindner, H. H. (2009) Site-Specifically Phosphorylated Forms of H1.5 and H1.2 Localized at Distinct Regions of the Nucleus are Related to Different Processes during the Cell Cycle. *Chromosoma*. 118, 693-709.

Annex

Taula 1. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA ($r=0.5$)

Components estructurals	posicions mutades												CH1e	
	145/153/171		145/153/186		145/171/186		145/186		145		CH1e			
	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%		
Girs	1681	4	1685	2	1685	1	1683	6			1681	7		
Girs	1670	9	1675	4	1675	5	1672	12	1669	16	1671	2		
Girs	1660	8	1664	15	1664	14	1661	15	1662	5	1663	15		
Hèlix α	1650	34	1650	28	1650	27	1650	27	1653	34	1650	30		
Estructura desordenada	1639	24	1640	31	1640	32	1639	17	1641	28	1640	26		
Fulla β	1631	7	1629	14	1630	16	1629	12	1632	14	1629	8		
Fulla β de baixa freqüència	1620	14	1616	6	1616	5	1618	11	1621	3	1619	12		

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.5$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D_2O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim.

Taula 2. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA ($r=0.7$)

Components estructurals	posicions mutades											
	145/153/171		145/153/186		145/171/186		145/186		145		CH1e	
	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%
Girs	1685	4	1681	2	1683	2	1683	4				
Girs	1675	15			1674	2	1672	8	1670	15	1671	6
Girs	1661	12	1663	18	1663	18	1661	13	1663	6	1660	14
Hèlix α	1653	33	1650	30	1650	28	1650	33	1653	33	1649	32
Estructura desordenada	1642	14	1641	30	1640	30	1641	24	1641	28	1640	27
Fulla β	1631	12	1630	9	1629	11	1628	11	1633	14	1629	12
Fulla β de baixa freqüència	1619	10	1619	11	1618	9	1618	7	1622	4	1619	9

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e en complexos proteïna/DNA (r,w/w) a r=0.7. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim.

Taula 3. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA ($r=0'5$)

Components estructurals	Posicions mutades											
	186P		171P		153P		2P		3P		4P	
	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%	Band	%
Girs	1681	3	1682	3	1682	4	1685	6	1681	4	1685	2
Girs	1669	7	1672	5	1672	6	1673	16	1671	7	1672	28
Girs	1659	14	1662	14	1662	15	1661	13	1661	9	1659	5
Hèlix α	1651	29	1652	21	1652	19	1651	15	1651	25	1651	19
Estructura desordenada	1640	24	1641	27	1641	29	1640	22	1640	21	1641	17
Fulla β	1631	9	1631	14	1631	11	1629	17	1630	18	1631	10
Fulla β de baixa freqüència	1620	14	1620	16	1620	16	1619	11	1620	16	1621	19
Fulla β de baixa freqüència												

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0'5$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. 2P, 153-171P; 3P, 153-171-186P; 4P, 145-153-171-186P.

Taula 4. Percentatges (%) d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e i les seves espècies fosforilades unides a DNA ($r=0.7$)

Components estructurals	Posicions mutades											
	186P		171P		153P		2P		3P		4P	
	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%
Girs			1685	3			1685	4	1682	3	1685	3
Girs	1671	5	1672	8	1671	1	1672	16	1671	8	1674	22
Girs	1661	10	1660	14	1660	11	1662	6	1661	9	1664	9
Hèlix α	1652	27	1651	23	1652	22	1651	18	1652	17	1654	17
Estructura desordenada	1640	32	1642	20	1640	40	1641	31	1645	8	1645	7
Fulla β	1629	12	1631	17	1630	10	1627	19	1636	31	1636	24
Fulla β de baixa freqüència	1618	14	1619	15	1619	16	1619	6	1625	17	1622	18
Fulla β de baixa freqüència									1616	7		

Percentatges d'estructura secundària del domini C-terminal de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA ($r,w/w$) a $r=0.7$. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. 2P, 153-171P; 3P, 153-171-186P; 4P, 145-153-171-186P.

Taula 5. Percentatges (%) d'estructura secundària en dissolució de la histona H1e i els seus mutants T→A

Components estructurals	posicions mutades																
	H1e		17/153/171/186		17/145/171/186		17/145/153/186		17/145/153/171		17/145/153		17/145		17		
	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	
Girs	1676	11					1677	3	1680	7	1675	8	1677	3	1676	9	
Girs	1667	10	1671	15	1675	9	1668	16	1668	18	1667	5	1668	10	1667	4	
Girs	1658	17	1660	12	1661	26	1659	16	1658	15	1660	17	1660	16	1660	20	
Hèlix α	1649	20	1650	23	1650	20	1650	20	1649	21	1650	23	1651	23	1650	20	
Estructura desordenada	1640	20	1641	30	1640	21	1640	21	1640	15	1641	27	1641	25	1641	23	
Fulla β	1630	15	1631	10	1631	13	1631	14	1631	15	1631	15	1631	18	1630	15	
Fulla β de baixa freqüència	1618	7	1621	10	1621	11	1621	10	1621	9	1620	5	1622	5	1620	9	
Fulla β de baixa freqüència																	

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e en dissolució. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM NaCl, 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim.

Taula 6. Percentatges (%) d'estructura secundària en dissolució de la histona H1e fosforilada i els seus mutants T→A

Components estructurals	posicions fosforilades																	
	0		145P		153P		171P		186P		2P		3P		4P		5P	
	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%
Girs	1676	11	1676	7	1677	7	1679	4	1676	4	1676	7	1679	5	1679	4	1680	7
Girs	1667	10	1668	6	1667	8	1668	13	1667	7	1668	2	1670	3	1668	13	1669	6
Girs	1658	17	1659	13	1658	15	1658	14	1658	13	1660	16	1660	23	1658	12	1659	27
Hèlix α	1649	20	1650	16	1649	15	1649	17	1649	18	1649	16	1649	16	1649	16	1649	19
Estructura desordenada	1640	20	1640	26	1640	23	1640	23	1640	18	1640	28	1640	23	1640	21	1640	13
Fulla β	1630	15	1630	12	1631	15	1631	14	1631	21	1631	12	1631	14	1631	15	1631	14
Fulla β de baixa freqüència	1618	7	1621	20	1621	17	1621	15	1621	19	1621	19	1621	16	1621	19	1621	14
Fulla β de baixa freqüència																		

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e fosforilada en dissolució. Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. 2P, 171-186P; 3P, 153-171-186P; 4P, 145-153-171-186P; 5P, 17-145-153-171-186P.

Taula 7. Percentatges (%) d'estructura secundària de la histona H1e i els seus mutants T→A units a DNA (r=0'7)

Components estructurals	posicions mutades																
	H1e		17/153/171/186		17/145/171/186		17/145/153/186		17/145/153/171		17/145/153		17/145		17		
	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	
Girs	1680	4					1677	6	1675	4			1678	17	1676	3	
Girs	1670	5	1676	6	1675	13	1667	12	1665	9	1667	23	1667	7	1666	11	
Girs	1662	25	1663	20	1660	13	1660	13	1658	19	1660	7	1660	9	1660	14	
Hèlix α	1650	28	1651	29	1650	28	1650	28	1648	32	1650	30	1650	28	1650	31	
Estructura desordenada	1640	18	1640	22	1640	25	1640	18	1641	12	1640	19	1640	16	1640	19	
Fulla β	1630	15	1629	18	1627	14	1631	15	1631	20	1630	17	1631	8	1630	18	
Fulla β de baixa freqüència	1620	5	1618	5	1619	7	1621	8	1621	4	1620	4	1621	15	1619	4	
Fulla β de baixa freqüència																	

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e en complexos proteïna/DNA (r,w/w) a r=(0'7). Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM NaCl, 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim.

Taula 8. Percentatges (%) d'estructura secundària de la histona H1e fosforilada i els seus mutants T→A units a DNA (r=0'7)

Components estructurals	posicions fosforilades																	
	0		145P		153P		171P		186P		2P		3P		4P		5P	
	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%	Banda (cm ⁻¹)	%
Girs	1680	4	1678	3													1678	5
Girs	1670	5	1668	6	1674	12	1675	6	1675	6	1675	8	1675	8	1676	6	1670	6
Girs	1662	25	1661	13	1663	14	1664	16	1663	12	1663	13	1663	16	1661	20	1660	17
Hèlix α	1650	28	1651	14	1654	17	1654	17	1654	17	1654	15	1653	16	1654	16	1649	18
Estructura desordenada	1640	18	1640	26	1646	17	1645	20	1645	17	1644	24	1645	14	1645	16	1642	13
Fulla β	1630	15	1630	16	1637	19	1637	20	1636	22	1635	16	1637	24	1637	19	1633	30
Fulla β de baixa freqüència	1620	5	1620	22	1627	13	1628	15	1627	18	1627	13	1628	13	1628	10	1620	11
Fulla β de baixa freqüència					1618	8	1618	6	1617	10	1618	11	1618	9	1620	13		

Percentatges d'estructura secundària de la histona H1e fosforilada en complexos proteïna/DNA (r,w/w) a r=(0'7). Dades experimentals obtingudes per espectroscòpia FTIR en D₂O en tampó HEPES 10 mM, NaCl 140 mM pH7. La concentració de la proteïna era 5 mg/ml. Valors arrodonits al nombre enter més pròxim. 2P, 171-186P; 3P, 153-171-186P; 4P, 145-153-171-186P; 5P, 17-145-153-171-186P.