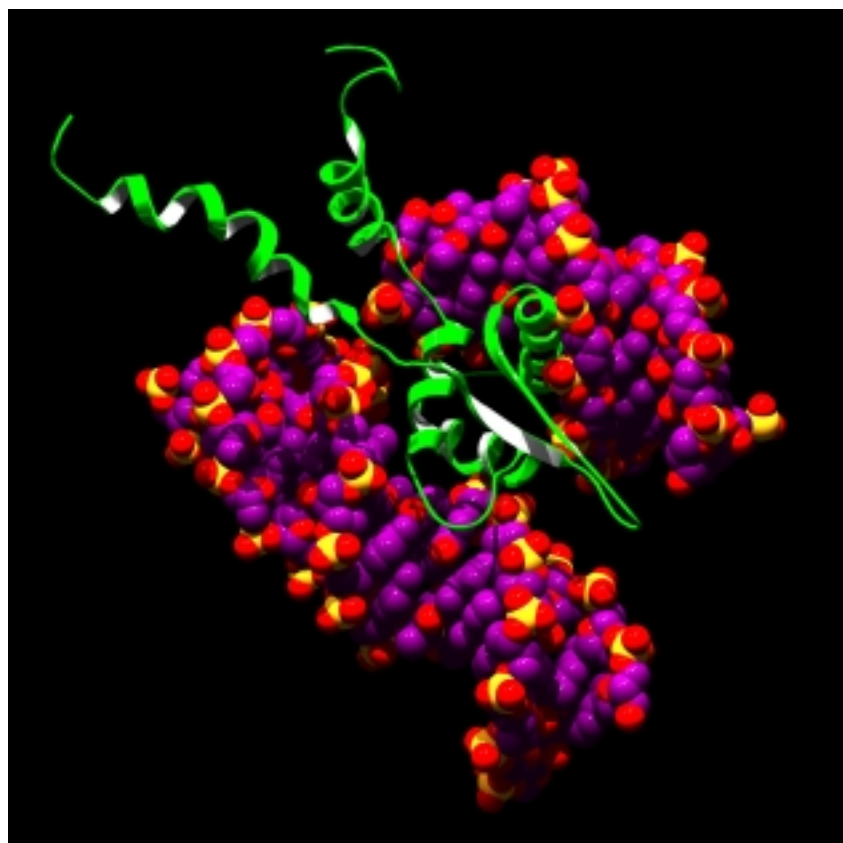


Universitat Autònoma de Barcelona

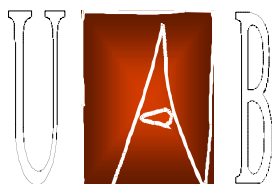
TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE PÈPTIDS
DELS DOMINIS TERMINALS DE LA HISTONA H1**



ROGER VILA UJALDÓN

UAB 2001



Universitat Autònoma de Barcelona

CARACTERITZACIÓ ESTRUCTURAL DE PÈPTIDS DELS DOMINIS TERMINALS DE LA HISTONA H1

Memòria presentada per

Roger Vila Ujaldón

Per a optar al grau de

Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular

Treball realitzat sota la direcció del
Dr. Pere Suau León i la Dra. Imma Ponte Marull

Unitat de Ciències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona.

Dr. Pere Suau León

Dra. Imma Ponte Marull

Roger Vila Ujaldón

Bellaterra, maig de 2001

Als meus pares i germana

Els de major saber i millors maneres,
la reunió de savis amb la seva llum il·luminaren;
no van trobar un camí cap al dia en la nit,
només contaren contes i després s'adormiren.

Robayyat, Omar Jayyam

AGRAÏMENTS:

Moltes gràcies als meus directors de tesi per haver fet la seva tasca de forma exemplar, però sobretot molt agradable. Al Dr. Pere Suau un agraïment especial per compartir amb mi molt més del necessari i perquè d'ell he après ciència i vida. A la Dra. Imma Ponte un agraïment especial per estar sempre disponible i atenta en tots els detalls; per la seva infatigable paciència en respondre els milers de preguntes que li dec haver fet en aquests anys.

El meu agraïment també als companys de laboratori:

A la Mary, que no perdi mai la seva rialla.

Al Marcus, que no perdi mai el seu estil.

A l'Alicia, benvinguda.

A tots els companys del departament, que m'han tractat, sense excepció, de meravella i han fet molt agradable un entorn a priori tan poc humà com són uns laboratoris. Se'm fa impossible prioritzar. “El vaixell avança companys mariners! No sé cap on, però disfrutem del mar!”

Als grups amb qui he col·laborat, per acceptar-me, ensenyar-me i pel seu bon tracte:

Al Dr. Manuel Rico i al seu grup, especialment a la Dra. M. Angeles Jiménez, per guiar-me pel bosc (per a mi impenetrable) de la RMN.

Al Dr. José Luís Arrondo i al seu grup, especialment a la Dra. Maribel Collado, per ajudar-me en els estudis de FTIR.

El meu agraïment més profund a la meva família:

Al meu pare, mare i germana, sempre junts.

Als meus avis, Josep i Maria, i tiets i cosins, sempre interessats per mi.

Un emotiu record per la meva iaia Lola, amb molt d'amor.

Als meus Amics de l'ànima: Imed, Sandra.

A molts amics, una barreja de noms viva, fantàstica i infinita: Sebi, Montse, Roger, Ferran, Santi, Judit, Tatiana, Àlex, Lourdes...

En general, i així no em deixo a ningú, a molta gent que porto al cor i amb qui he compartit instants eterns.

Sense tots vosaltres, no només aquesta tesi no existiria, sinó que tot seria diferent. Inimaginable.

ÍNDEX TEMÀTIC	i
ABREVIATURES	iii
INTRODUCCIÓ	1
1. ORGANITZACIÓ I FUNCIÓ DE LA CROMATINA.....	1
1.1. El nucleosoma.....	1
1.1.1. L'estructura del DNA en el nucleosoma.....	2
1.1.2. Posicionament dels nucleosomes.....	4
1.2. La fibra de 30 nm.....	5
1.3. L'arquitectura dels cromosomes.....	10
1.4. La infraestructura del cromosoma i del nucli.....	11
1.5. La regulació de la transcripció a través de la modificació de la cromatina.....	14
1.6. Les proteïnes HMG.....	18
2. LES HISTONES INTERNES.....	19
2.1. La posició de les histones internes en el nucleosoma.....	20
2.2. Variants de les histones internes.....	23
2.3. Modificacions post-traduccionals de les histones internes.....	26
2.3.1. Acetilació.....	27
2.3.2. Fosforilació.....	30
2.3.3. Metilació.....	30
2.3.4. ADP-ribosilació.....	31
2.3.5. Ubiquitinització.....	31
3. LA HISTONA H1.....	32
3.1. Els subtipus de la H1.....	32
3.2. La posició de la histona H1 en el nucleosoma.....	33
3.3. La histona H1 en la condensació de la cromatina.....	36
3.4. Proteïnes que desplacen la H1 del nucleosoma.....	38
3.5. Modificacions post-traduccionals de la histona H1.....	39
3.5.1. Fosforilació.....	39
3.5.2. ADP-ribosilació.....	42
3.6. Preferències de seqüència de la H1.....	43
3.7. L'estructura de la histona H1.....	44
3.7.1. El domini globular.....	44
3.7.2. Els dominis amino- i carboxiterminals.....	47
OBJECTIUS	53
CAPÍTOL I: CD AND NMR ANALYSIS OF A C-TERMINAL DOMAIN PEPTIDE OF HISTONE H1°	57

CAPÍTOL II: FTIR ANALYSIS OF A C-TERMINAL DOMAIN PEPTIDE OF HISTONE H1°	81
CAPÍTOL III: CD AND NMR ANALYSIS OF A N-TERMINAL DOMAIN PEPTIDE OF HISTONE H1e	99
CAPÍTOL IV: CD, NMR AND FTIR ANALYSIS OF THE N-TERMINAL DOMAIN OF HISTONE H1°	119
DISCUSSIÓ	147
Zones estudiades.....	147
Zones que no s'estructuren.....	148
Amfipaticitat de les hèlixs.....	150
El gir TPKK.....	151
Mecanisme d'acció del TFE.....	152
Els límits dels dominis estructurals.....	152
Estudis de FTIR.....	153
Naturalesa dels complexos pèptid-DNA.....	155
CONCLUSIONS	161
BIBLIOGRAFIA	165

ABREVIATURES

ADP-ribosilació	adenosindifosfat-ribosilació
ATP	adenosintrifosfat
CAP	proteïna activadora del gen catabolít
CBF	factor d'unió a caixa CCAAT
CD	dicroïsme circular
CENP	proteïna del centròmer
C-terminal	carboxiterminal
DMSO	dimetilsulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
DNasa	desoxiribonucleasa
EDTA	àcid etilendiaminotetraacètic
<i>Et al.</i>	<i>Et alter</i> , i col·laboradors
FTIR	espectroscòpia d'infraroig de transformada de Fourier
GH1	domini globular de la H1
GH5	domini globular de la H5
HNF	factor nuclear de l'hepatòcit
INCENP	proteïnes internes del centròmer
LIS	diiodesalicilat de liti
MAR	regió d'unió a la matriu
MMTV	virus del tumor mamari de ratolí
MPF	quinasa mitòtica principal
mRNA	àcid ribonucleic missatger
NaCl	clorur sòdic
NaClO ₄	perclorat sòdic
NOE	efecte nuclear d'Overhauser
N-terminal	aminoterminal
pb	parells de bases
proteïna HMG	proteïna del grup d'alta mobilitat
proteïna Sc	proteïna de la bastida
proteïna SMC	proteïna per a l'estabilitat i manteniment dels cromosomes
RMN	ressonància magnètica nuclear
RMN-2D	ressonància magnètica nuclear de doble dimensió
RNA	àcid ribonucleic
rRNA	àcid ribonucleic ribosomal
SAR	regió d'unió a la bastida
TAF	factor associat a proteïna d'unió a TATA
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TR	receptor tiroideu
TRE	element de resposta tiroidea
UBF	factor d'unió a 5'
XCAP	proteïnes associades al cromosoma de <i>Xenopus</i>

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. ORGANITZACIÓ I FUNCIO DE LA CROMATINA

La propietat més destacada dels cromosomes és la llargada de cada molècula de DNA incorporada i plegada en ells. El genoma humà, de 3×10^9 pb, amidaria un metre si es desenrotllés; tanmateix, és compactat dins un nucli que amida només 10^{-5} m de diàmetre. El més sorprenent és que el DNA es troba no només compactat, sinó ordenat en estructures que poden plegar-se i desplegar-se reversiblement i sovint de forma local i dirigida.

En els eucariotes, l'empaquetament del DNA per proteïnes histones i no histones forma la cromatina. Així s'aconsegueix la condensació i l'organització necessària per a permetre processos com la replicació, la transcripció i la regulació de l'expressió gènica (Van Holde, 1989; Wolffe, 1992). El nostre coneixement de l'organització dels cromosomes i la cromatina és molt més complet pel que fa a les seves unitats estructurals més petites i fonamentals: els nucleosomes. Aquest fet respon a les limitacions de les tècniques actuals per a estudiar grans complexos macromoleculars amb un grau de detall suficient.

1.1. El nucleosoma

L'estudi de la cromatina ha desenvolupat una nomenclatura particular, però sovint variable segons l'autor. En aquest treball la nomenclatura és la següent: un *nucleosoma* està constituït per un segment d'una molècula de DNA, unit a l'octàmer d'histones internes i una molècula d'histona H1. Una *partícula nucli* consisteix de l'octàmer d'histones internes i del segment de DNA que resisteix una digestió extensiva per nucleasa micrococcal, és a dir, els 145-147 pb de DNA que es troben en contacte directe amb les histones internes. El DNA que uneix dues partícules nucli, i que és sensible a la digestió per nucleasa micrococcal, s'anomena *DNA internucleosomal*.

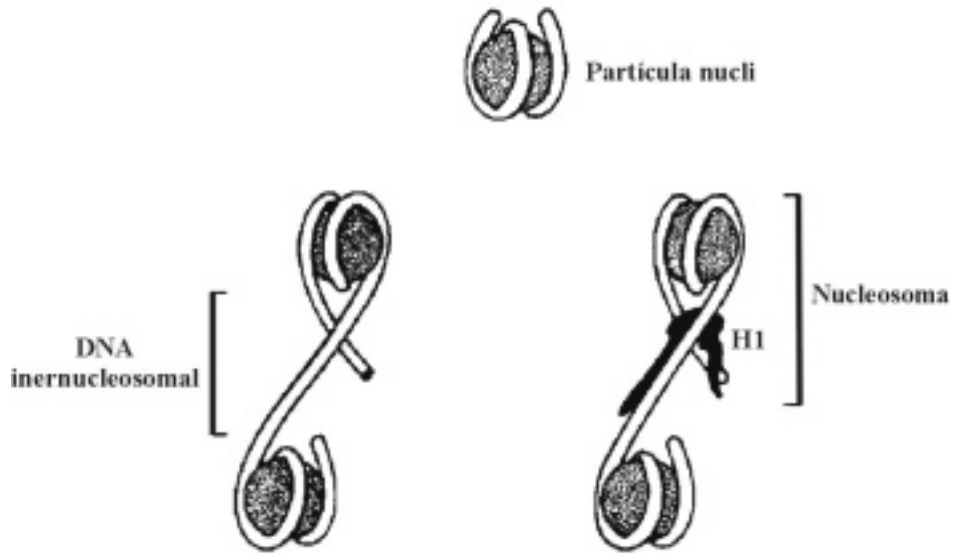


Figura 1: Definició de partícula nucli, DNA internucleosomal i nucleosoma. La posició de la histona H1 és un dels possibles models. (Extret de Wolffe, 1998).

1.1.1. L'estructura del DNA en el nucleosoma

L'anàlisi de cristalls de partícules nucli a 7 Å de resolució, va demostrar que el DNA es troba en la superfície del nucleosoma i que la partícula nucli té forma de disc, confirmant les prediccions de microscopia electrònica, anàlisi de sedimentació i dispersió de neutrons. El disc amida 11 nm de diàmetre i 5,6 nm de gruix, i el DNA està enrotllat 1,75 voltes en forma de superhèlix levògira al voltant del nucli d'histones (Finch *et al.*, 1977; Richmond *et al.*, 1984).

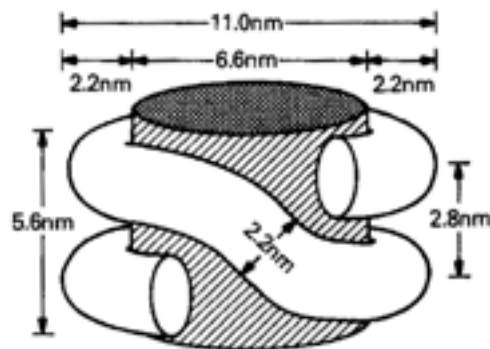


Figura 2: Dibuix de la posició que adopta el DNA en la partícula nucli.

(Extret de Wolffe, 1998).

Actualment, el nostre coneixement de la morfologia de la partícula nucli és profund i detallat arrel de la cristal·lització i resolució de la seva estructura a menys de 3Å (Luger *et al.*, 1997).



Figura 3: Estructura de la partícula nucli resolta a nivell atòmic. (Extret de Luger *et al.*, 1997).

La corbatura del DNA al voltant de l'octàmer d'histones no és uniforme. S'observen corbatures bastant pronunciades localitzades aproximadament a una i a quatre voltes de la doble hèlix contant des del centre del DNA nucleosomal. L'existència d'aquestes distorsions del DNA nucleosomal s'ha confirmat per estudis de digestió amb agents químics i enzims sensibles a l'estructura del DNA (Hogan *et al.*, 1987; Pruss *et al.*, 1994). La partícula nucli sembla gairebé simètrica, i per això el centre del DNA nucleosomal s'anomena l'eix binari de la partícula nucli. S'ha d'advertir, però, que, degut a la variació en la seqüència del DNA, la partícula nucli probablement no serà exactament simètrica. La corbatura total del DNA i les potencials pertorbacions locals de la pauta de la doble hèlix, tenen importants implicacions pel posicionament dels nucleosomes. Les

tres voltes centrals de la doble hèlix de DNA en el nucleosoma tenen un nombre de bases per volta (10,7) diferent de la resta del DNA nucleosomal (10,0) i del DNA en solució (10,5). La zona d'unió entre aquestes dues regions del DNA amb diferent estructura, són els llocs on s'aprecia una distorsió més severa del DNA en el nucleosoma (Hayes *et al.*, 1990, 1991; Puhl i Behe, 1993). La raó d'aquesta periodicitat de les voltes del DNA en la regió central és que les histones H3 i H4 creen una superfície en el centre del nucleosoma amb arginines exposades i espaiades, de forma que interaccionen preferentment amb DNA de 10,7 pb/volta. En canvi, l'espaiat dels residus bàsics de la superfície de contacte de l'octàmer amb la resta del DNA, afavoreix una periodicitat helicoidal del DNA de 10,0 pb/volta. Aquestes periodicitats del DNA nucleosomal tenen importants conseqüències per l'associació de proteïnes que s'uneixen al DNA amb especificitat de seqüència.

1.1.2. Posicionament dels nucleosomes

Les propietats locals de rigidesa i corbatura del DNA afecten la posició translacional i rotacional precisa que la doble hèlix adopta respecte l'octàmer d'histones (Sivolob i Khrapunov, 1995). Aquest fenomen és conegut com *posicionament dels nucleosomes* i té importants conseqüències biològiques. Els nucleosomes posicionats que s'han definit són prop de les zones reguladores de l'expressió gènica. La posició concreta dels nucleosomes al llarg de la molècula de DNA és, almenys en part, determinada per una preferència per certes seqüències de DNA. És energèticament favorable incorporar una seqüència de DNA ja intrínsecament corbada al nucleosoma, perquè el DNA s'ha de corbar finalment al voltant de l'octàmer d'histones (Drew i Travers, 1985; Shrader i Crothers, 1989). Els solcs estrets més estrets del normal s'encararan a l'interior del nucleosoma, mentre que els solcs estrets eixamplats, s'encararan a l'exterior. A més, s'ha observat que les seqüències de trinucleòtids repetits (CTG)_n i (CCG)_n, responsables d'algunes malalties genètiques humanes, tenen la capacitat de posicionar els nucleosomes a través de mecanismes desconeguts (Wang *et al.*, 1994; Godde i Wolffe, 1996).

Un fet molt interessant és que les histones H1 també poden influir en la posició translacional exacta del nucleosoma (Meersseman *et al.*, 1991; Chipev i Wolffe, 1992; Ura *et al.*, 1995). Per exemple, sembla que el posicionament dels nucleosomes per part de la histona H1 és responsable, almenys en part, de la repressió dels gens del 5S rRNA de *Xenopus* durant el desenvolupament (Bouvet *et al.*, 1994; Kandolf, 1994). En aquest cas concret, l'octàmer d'histones internes és relativament mòbil respecte la seqüència de

DNA, de manera que pot ocupar una sèrie de posicions al llarg del gen del 5S rRNA (Meersseman *et al.*, 1991). L'addició d'histones H1 restringeix la mobilitat nucleosomal (Pennings *et al.*, 1994) i determina la posició translacional exacta (Ura *et al.*, 1995). Aquesta posició afavorida per la histona H1 restringeix en gran mesura l'accessibilitat de la maquinària transcripcional de la RNA polimerasa III al gen 5S rRNA (Ura *et al.*, 1995). La capacitat del domini globular de la histona H1 d'unir-se al DNA nucleosomal amb certa especificitat de seqüència explica el posicionament dels nucleosomes en el gen del 5S rRNA de *Xenopus in vivo* (Chipev i Wolffe, 1992; Sera i Wolffe, 1998). Les histones H1 també semblen contribuir al posicionament dels nucleosomes en el gen de la β globina de pollastre (Liu *et al.*, 1993; Davey *et al.*, 1995).

1.2. La fibra de 30 nm

Malgrat que és relativament senzill visualitzar la cadena de nucleosomes al llarg de la molècula de DNA, aquest representa només el primer nivell de compactació del DNA en el nucli. El nostre coneixement de l'empaquetament del DNA en estructures més complexes que la cadena de nucleòtids és molt menor que el nostre coneixement sobre el nucleosoma aïllat. Aquest fet reflecteix les limitacions de les tècniques actuals per a aïllar i estudiar complexos moleculars grans i també, probablement, l'heterogeneïtat de les estructures que pot adoptar la fibra de cromatina.

Molta informació sobre el plegament de la cadena de nucleosomes en estructures superiors prové d'imatges de microscopia electrònica de fragments de cromatina preparats en molt diverses condicions (Thoma *et al.*, 1979; Woodcock *et al.*, 1993; Leuba *et al.*, 1994; Bednar *et al.*, 1995). Aquestes imatges mostren que a baixa força iònica (0,2 mM EDTA, 1 mM clorur de trietanolamina) la cromatina sembla una fibra de nucleosomes en zig-zag. A una força iònica lleugerament major (0,2 mM EDTA, 5 mM clorur de trietanolamina) es forma una cinta plana d'uns 25 nm d'amplada. Finalment, a una força iònica moderada (100mM NaCl), a prop de la força iònica fisiològica, la cromatina es condensa per formar estructures d'un diàmetre de 30 nm. A part d'aquestes estructures, altres imatges de microscopia electrònica de cromatina nativa a força iònica fisiològica revelen altres conformacions possibles de la cromatina. En són un exemple les anomenades "superboles" (*superbeads*), que consisteixen en grups de nucleosomes amb aparença globular que en certes condicions poden ser considerablement uniformes i que contenen entre 8 i 48 nucleosomes (Zentgraf i Franke, 1984). No s'ha trobat mai, però,

una estructuració de la cromatina en “superboles” de forma generalitzada, fet que indica que no tota la cromatina adopta aquesta estructura *in vivo*.

La fibra de 30 nm és similar a les estructures observades en nuclis preparats amb una gran varietat de tècniques; per això la fibra de cromatina s’anomena també fibra de 30 nm. Efectivament, es creu que la majoria de la cromatina en els nuclis dels eucariotes superiors es troba en aquesta configuració. Tanmateix, l’estructura d’aquesta fibra de 30 nm roman encara dins el marc de les hipòtesis i models. S’han proposat molts models al respecte (van Holde i Zlatanova, 1995, 1996; Zlatanova i van Holde, 1996). Aquesta varietat de models i de dades experimentals podria revelar una heterogeneïtat subjacent en l’estructura de la cromatina i en el grau d’empaquetament (Suau *et al.*, 1979). A continuació descriuré només alguns dels models que compten amb un major recolzament experimental.

Klug, Koller i col·legues van examinar el plegament dependent de força iònica de llargs fragments de cromatina, que contenien vàries quilobases de DNA, mitjançant el microscopi electrònic (Thoma *et al.*, 1979). Fruit de les seves observacions, van proposar un model per l’estructura de la fibra de 30 nm en què la cadena de nucleosomes es compactaria enrotllant-se en una estructura solenoidal simple. El resultat seria una hèlix de nucleosomes amb sis nucleosomes per volta i un pas de rosca d’uns 11 nm.

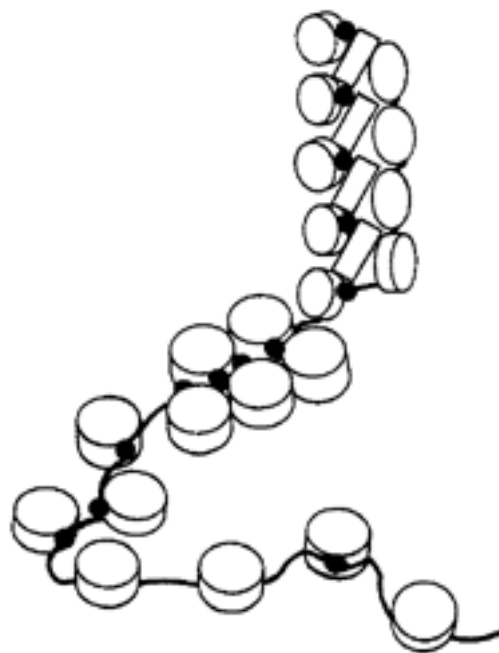


Figura 4: Model del solenoide de la fibra de cromatina. (Extret de Thoma *et al.*, 1979).

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 cromatina (Renz *et al.*, 1977; Clark i Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1992). També podria ser, però, que el plegament de la cadena de nucleosomes fos mediada 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 cromatina (Graziano *et al.*, 1994). 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 (Losa *et al.*, 1984; Dimitrov *et al.*, 1987). Tanmateix, la disminució d'accessibilitat de les histones H1 pot resultar de mecanismes diferents que el seu segrest en l'eix central.

Un model alternatiu, que ha rebut considerable atenció, es basa en l'observació de l'existència de cadenes de nucleosomes en zig-zag en dissolucions a baixa força iònica i en el fet que l'aparença d'aquestes cadenes és dependent de la presència d'histones H1. En el model de Worcel, Woodcock i col·legues, la cadena en zig-zag formaria una cinta condensada que contindria dues files paral·leles de nucleosomes; plegament dirigit per la histona H1, naturalment. L'enrotllament d'aquesta cinta generaria la fibra de 30 nm (Woodcock *et al.*, 1984).

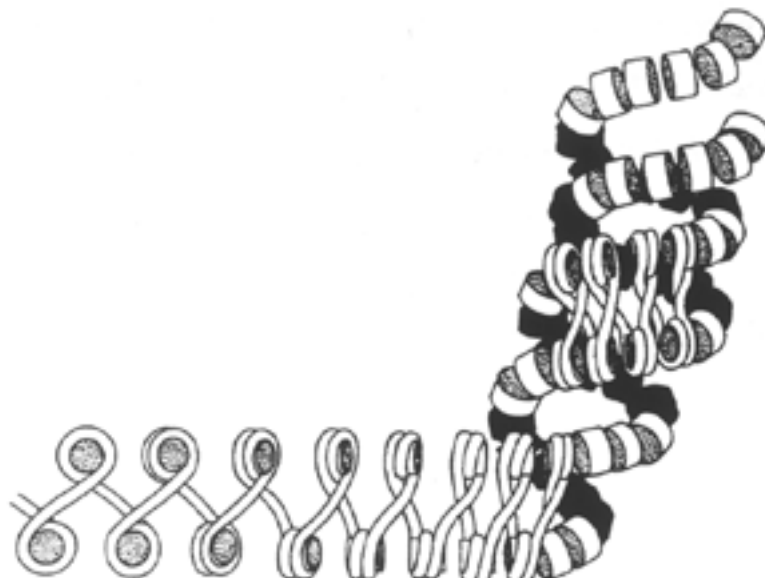


Figura 5: Model helicoidal de la cadena de nucleosomes en zig-zag.
(Adaptat de Woodcock *et al.*, 1984)

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 cromatina (Woodcock *et al.*, 1993; Leuba *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1994; Bednar *et al.*, 1995). Per exemple, mitjançant la tècnica de la criomicroscopia electrònica en seccions de nuclis, s'observen fibres de cromatina formades pel que semblen estructures en zig-zag (Horowitz *et al.*, 1994). Els DNA internucleosomals estirats són una característica d'aquest model que s'adiu amb resultats d'empremta fotoquímica (*photofootprinting*) *in vivo* (Pehrson, 1989; Pehrson i Cohen, 1992).

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. Aquest model s'anomena model del DNA internucleosomal enrotllat (*coiled linker model*) (Felsenfeld i Mc Ghee, 1986).

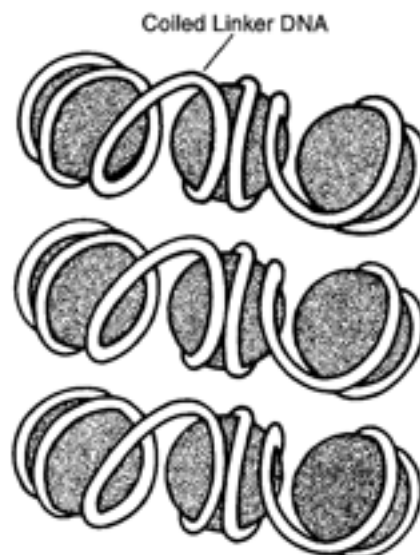


Figura 6: Model del DNA internucleosomal enrotllat de la fibra de cromatina. Només es mostren tres voltes d'un sol costat de la fibra. (Extret de Wolffe, 1998).

Un model molt més recent és l'anomenat model del solenoide interdigitat (Daban i Bermúdez, 1998). 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.

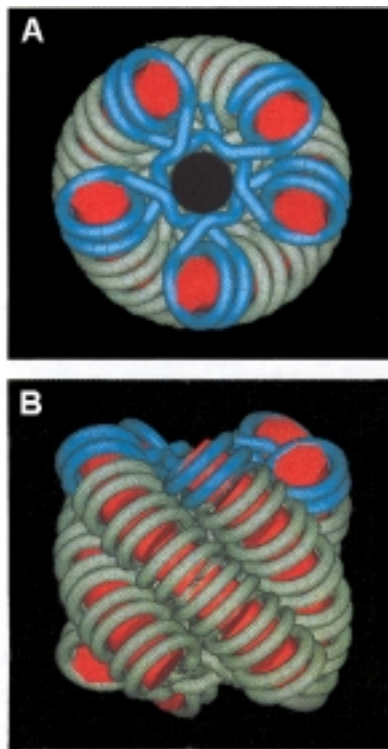


Figura 7: Model del solenoide interdigitat per a la fibra de cromatina. (A) vista axial. (B) vista lateral. (Extret de Daban i Bermúdez, 1998).

Per a alguns d'aquests models la llargada de la repetició nucleosomal, 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 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 mar (van Holde, 1988). Mitjançant cromatina amb una repetició nucleosomal molt llarga, s'ha demostrat que el diàmetre de la fibra de cromatina augmenta amb la llargada del DNA internucleosomal (Athey *et al.*, 1990; Williams i Langmore, 1991). Tanmateix, aquest fenomen no ha pogut ser detectat *in vivo*, observant-se sempre el mateix diàmetre independentment de la llargada del DNA internucleosomal (Woodcock, 1994). En l'altre extrem, s'ha demostrat que el compactament de la cromatina de *Saccharomyces* és possible tot i la curta longitud de la seva repetició nucleosomal. Cadenes de nucleosomes que contenen DNA internucleosomal de menys de 20 pb són capaços de plegar-se en la fibra de 30 nm (Lowary i Widom, 1989). Si s'apliquen càlculs teòrics a la torsió a la que estaria sotmès el DNA en aquestes circumstàncies, resulta evident que la histona H1 augmenta clarament la flexibilitat de DNA internucleosomal, probablement a través de la neutralització de càrregues negatives de la cadena fosfodièster. Aquesta flexibilitat augmentada del DNA internucleosomal permetria, per exemple, l'aplicació del model del DNA internucleosomal enrotllat també en el cas de longituds de repetició nucleosomal curtes.

Podem concloure aquest resum dels models principals de l'estructura de la fibra de la cromatina afirmant que sembla que l'heterogeneïtat és una de les característiques de la cromatina *in vivo*, així com tampoc podem oblidar que es tracta d'una estructura dinàmica, que es modifica a nivell local i general al llarg del temps per a acomplir la seva funció. Sembla que s'ha de distingir molt bé entre quines estructures pot adoptar la cromatina *in vitro*, sovint d'una gran uniformitat, i quines adopta realment *in vivo*.

1.3. L'arquitectura dels cromosomes

El nostre coneixement de l'organització estructural dels cromosomes es centra bàsicament en els cromosomes en metafase, ja que són els més condensats i per tant més visibles (Rattner i Lin, 1985). El plegament del DNA en la cadena de nucleosomes dóna lloc a una compactació en la llargada de 7 vegades, el mateix factor que aporta el pas de la cadena de nucleosomes a la fibra de 30 nm. El cromosoma metafàsic es troba 250 vegades compactat en llargada respecte la fibra de cromatina de la que està format (Earnshaw, 1988, 1991). S'han proposat dos models principals per a la compactació de la cromatina en cromosomes metafàsics. El primer suggereix una organització de la fibra de

cromatina en llaços que es disposarien radialment al llarg de l'eix del cromosoma (Paulson i Laemmli, 1977; Gasser i Laemmli, 1986b; Boy de la Tour i Laemmli, 1988).

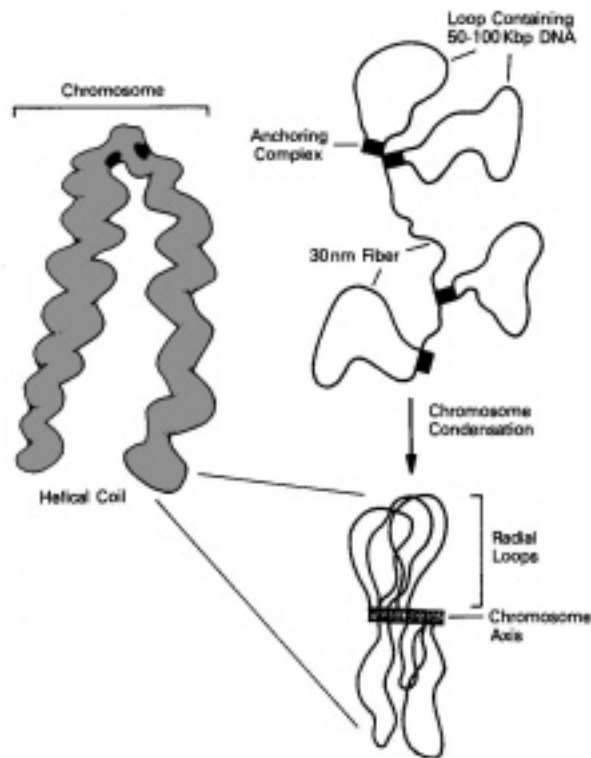


Figura 8: Model d'estructura del cromosoma en llaços. (Extret de Wolffe, 1998).

El segon model suggereix un plegament helicoidal de la fibra de cromatina, del que resultaria una fibra de 250 nm que al seu temps es tornaria a plegar de forma helicoidal (Sedat i Manuelidis, 1978). Varis resultats experimentals recolzen el primer model, indicant la presència de llaços situats al llarg de l'eix del cromosoma. Concretament, digestions controlades amb DNasa I (Benyajati i Worcel, 1976) i observació directe per microscopia electrònica de nuclis a alta concentració salina, de forma que no hi hagi histones unides, (Cook i Brazell, 1975; Paulson i Laemmli, 1977; Jackson *et al.*, 1990) indiquen la presència de llaços independents de la fibra de cromatina de 50 a 100 kb que representarien una unitat de la estructura del cromosoma. Tanmateix, aquests llaços no sembla que s'originin en un eix central continu. En canvi, resultats de microscopia òptica d'alta resolució suggereixen que l'eix podria estar formant-se i desestructurant-se contínuament. A més, sembla que els llaços de la fibra de 30 nm es podrien organitzar en

estructures més complexes que conformarien el cromosoma. L'estructura exacta dels llaços de la fibra cromatina es coneix menys que la de la pròpia fibra de 30 nm, però és clar que proteïnes no histones són importants per a la seva organització. En el proper apartat en parlem.

1.4. La infraestructura del cromosoma i del nucli

Molts estudis s'han centrat en les proteïnes no histones presents en el nucli que generen la infraestructura dels cromosomes i del mateix nucli cel·lular, així com en les seqüències de DNA associades. La bastida (*scaffold*) del cromosoma metafàsic es defineix a nivell morfològic com l'estructura complexa en l'eix del cromosoma mitòtic que s'observa després de l'extracció de les histones (Paulson i Laemmli, 1977). L'extracció bioquímica mitjançant sal (2 M NaCl) o mitjançant diodesalicilat de liti (LIS), s'usa per a definir el complex residual nucleoproteic d'un nucli interfàsic (Paulson i Laemmli, 1977; Mirkovitch *et al.*, 1984). Si l'extracció ha estat salina, es parla de matriu nuclear, si s'ha utilitzat LIS es parla de bastida nuclear. En aquests dos casos s'observa un grup de proteïnes quelcom més complex que en el cas de la bastida del cromosoma metafàsic (Gasser *et al.*, 1989). Alguns d'aquests mètodes poc fisiològics han estat criticats perquè podrien donar lloc a reorganitzacions en les interaccions proteïna-DNA i agregacions no específiques (Cook, 1988). Per aquesta raó s'han desenvolupat mètodes alternatius per a aïllar i estudiar la infraestructura nuclear que generen un *esquelet* nuclear que manté la capacitat de transcriure i replicar el DNA (Jackson *et al.*, 1988). S'ha demostrat, però, que la composició i funció de l'esquelet nuclear així obtingut són molt diferents dels de la matriu i bastida nuclears. Sembla que la matriu i bastida nuclears interaccionarien amb zones del genoma pobres en gens, mentre que l'esquelet nuclear interaccionaria amb zones especialment riques en gens (Craig *et al.*, 1997).

En les preparacions de bastida de cromosoma s'han identificat diverses proteïnes diferents, incloent les lamines A, B i C, que són proteïnes en forma de filament que constitueixen la làmina nuclear (McKeon *et al.*, 1986; Franke, 1987). El fet que les lamines formin part de la fracció de la bastida fa pensar en que la làmina probablement fixa la cromatina de la interfase a la membrana nuclear, d'acord amb moltes observacions de microscopia electrònica. A més s'ha observat que les lamines A i C s'uneixen específicament a la superfície de cromosomes mitòtics (Glass i Gerace, 1990). Donat que la presència d'histones H1 en la cromatina no és imprescindible per a aquesta unió (Dasso *et al.*, 1994a), el lloc d'interacció de la làmina amb la cromatina és molt probablement les cues de les histones internes, que sobresurten dels nucleosomes.

Efectivament, s'ha demostrat que els dominis terminals de les proteïnes lamines interaccionen amb les histones internes (Taniura *et al.*, 1995). A més, sembla que proteïnes integrals de membrana presents en la membrana nuclear poden interaccionar tant amb les lamines com amb cromosomes (Foisner i Gerace, 1993; Collas *et al.*, 1996), unió que podria estabilitzar la localització de dominis de la cromatina prop de l'envoltura nuclear.

Un segon grup de proteïnes que es troben en la fracció de la bastida inclou les proteïnes Sc (*scaffold proteins*) I, II i III (Lewis i Laemmli, 1982). Mentre que la funció de Sc III és desconeguda, Sc I (170 kDa) s'ha identificat com la topoisomerasa II, i Sc II és una proteïna heterodimèrica amb hèlixs espiralades (*coiled-coil*) coneguda com SMC o XCAP. Resultats d'immunolocalització mostren que la topoisomerasa II es troba en un gran nombre de punts repartits al llarg de la regió axial dels cromosomes. Aquests punts presenten un tamany molt uniforme, suggerint que poden representar complexos estructurals independents. Es creu que cadascun d'aquests punts poden ser els complexos d'unió als que es troben fixats els llaços de cromatina. El paper de la topoisomerasa II en aquests complexos podria ser desfer els nusos que inevitablement es deuen generar en el procés de replicació. En efecte, si la topoisomerasa II és inactivada *in vivo*, les cèl·lules mutants moren perquè no poden separar els seus cromosomes al final de la mitosi (DiNardo *et al.*, 1984). La topoisomerasa II és essencial per a la formació dels cromosomes, però la seva presència no és imprescindible per a mantenir la seva estructura una vegada formats (Hirano i Mitchison, 1993). Per tant, sembla que té un paper essencial en desentortolligar les molècules de DNA en el cromosoma (Warburton i Earnshaw, 1997), però no sembla que tingui un paper estructural pròpiament dit.

La proteïna Sc II té un paper molt més actiu en dirigir la condensació del cromosoma mitòtic que la de la topoisomerasa II (Saitoh *et al.*, 1995). Sc II és un membre de la família de proteïnes SMC (*stability and maintenance of chromosomes*). La funció d'aquesta família de proteïnes va ser caracteritzada inicialment en el llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Strunnikov *et al.*, 1993, 1995; Koshland i Strunnikov, 1996). Les proteïnes SMC es troben conservades en estructura des dels fongs als vertebrats. En els vertebrats les proteïnes són conegudes com a XCAP, de *Xenopus chromosome associated proteins*, organisme en la que van ser descrites inicialment (Hirano i Mitchison, 1994). El paper concret d'aquesta proteïna no es coneix amb detall, però està clar que és fonamental per a la formació dels cromosomes.

Encara s'han identificat altres proteïnes pròpies de la bastida del cromosoma; són les proteïnes INCENP (*inner centromere proteins*) i les CENP A, B i C. Totes aquestes proteïnes s'associen amb el centròmer dels cromosomes. Les proteïnes INCENP (135-150 kDa) són alliberades del cromosoma al començament de la separació dels cromosomes durant la mitosi (anafase), fet que suggereix que podrien tenir un paper en regular l'aparellament de les cromàtides (Pluta *et al.*, 1990). A part dels centròmers, també els telòmers es co-purifiquen en l'obtenció de la bastida nuclear (De Lange, 1992) i, per tant, aquesta fracció es veu enriquida en proteïnes pròpies dels telòmers.

Resumint, veiem que entre les proteïnes involucrades en la infraestructura dels cromosomes i nucli cel·lular s'hi inclouen les lamines, la topoisomerasa II i les proteïnes SMC, així com components del centròmer i telòmers.

La matriu o bastida nuclear contenen seqüències específiques de DNA conegudes com a regions d'unió a la matriu o bastida (MARs o SARs). La topoisomerasa II i la histona H1 s'uneixen preferentment a aquestes regions de DNA ric en A+T (Adachi *et al.*, 1989; Izaurralde *et al.*, 1989). També s'ha suggerit que proteïnes com les HMG I/Y (*high mobility group protein*) podrien desplaçar la histona H1 selectivament de les regions SAR, contribuint al control local de l'activitat transcripcional (Zhao *et al.*, 1993). Tanmateix, aquest tipus d'unió preferent de proteïnes amb les regions SAR no ha estat encara demostrat *in vivo*. Aquest és un punt vital per a valorar la importància d'aquests mecanismes, ja que els resultats dels experiments realitzats *in vitro* poden ser un efecte de la coneguda preferència de la histona H1 per seqüències riques en A+T (Leng i Felsenfeld, 1966).

1.5. La regulació transcripcional a través de la modificació de la cromatina

La regulació de la transcripció en resposta a canvis hormonals o a la concentració de nutrients, per exemple, requereix un ràpid canvi reversible en l'activitat gènica que en la majoria dels casos estudiats en profunditat implica la modificació de la cromatina. S'ha observat que diversos factors de transcripció específics de seqüència, com els receptors nuclears d'esteroides o d'hormones, Mad/Max, c-Jun/v-Jun, C-Myb/v-Myb, c-Fos, MyoD i CREB utilitzen un nombre limitat de coactivadors i/o corepressors transcripcionals per a realitzar les seves funcions reguladores. Aquests coactivadors i corepressors integren diverses senyals reguladores per a determinar l'activitat gènica i presenten múltiples activitats que conjuntament contribueixen en la seva funció. Tenen la capacitat d'interaccionar tant amb els dominis reguladors de factors de transcripció com amb la

maquinària de la transcripció basal. A més, modifiquen directament l'entorn cromatínic en el qual la maquinària transcripcional funciona. En efecte, sembla que la maquinària transcripcional requereix un estat de la cromatina especial per funcionar més eficientment. Podríem dir que s'utilitza la cromatina per a amplificar la regulació de la transcripció, en comparació amb l'efecte en DNA nu (Wolffe *et al.*, 1997a). Per exemple, s'ha observat que la corbatura i superenrotllament del DNA en el nucleosoma pot promoure la unió de factors de transcripció i augmentar les interaccions entre diferents factors (Schild *et al.*, 1993; Truss *et al.*, 1995).

Cada vegada és més clar que no es pot separar indiscriminadament la regulació de la transcripció de l'estructura de la cromatina. Els experiments inicials van establir l'existència de grans màquines moleculars que desestructuren la cromatina i faciliten la transcripció (Peterson i Tamkun, 1995). Més recentment, s'ha establert la importància de la modificació covalent de les histones internes com a mecanisme per a regular la transcripció. S'ha demostrat que múltiples coactivadors posseeixen activitat acetiltransferasa (Brownell *et al.*, 1996; Mizzen *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996) i s'han identificat corepressors que s'uneixen a histona desacetilases (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997; Kadosh i Struhl, 1997; Laherty *et al.*, 1997) i que s'uneixen selectivament a histones desacetilades (Edmondson *et al.*, 1996).

A continuació comentarem amb cert detall un exemple de regulació de la transcripció a través de la modificació de la cromatina, per a il·lustrar quins mecanismes es troben implicats en aquests processos; tanmateix, els casos coneguts i estudiats en profunditat són bastants i augmenten ràpidament.

El promotor TR β A de *Xenopus* es troba sota el control de la hormona tiroidea i del seu receptor, el qual és un heterodímer format per TR i RXR (Ranjan *et al.*, 1994). L'heterodímer receptor de l'hormona tiroidea s'uneix de forma constitutiva a un element de resposta tiroidea (TRE) del promotor TR β A que es troba formant part d'un nucleosoma posicionat. En absència d'hormona tiroidea, la unió del receptor a TRE provoca el reclutament d'un complex corepressor, compost per NCoR, Sin3 i HD1, que provoca la desacetilació de les histones internes i impedeix la transcripció. Concretament, el receptor sense lligand s'uneix al corepressor NCoR (Horlein *et al.*, 1995), i aquest interacciona amb Sin3, el qual al seu torn recluta la histona desacetilasa HD1 (Alland *et al.*, 1997; Heinzl *et al.*, 1997). Tota la repressió transcripcional produïda pel receptor d'hormona tiroidea sense lligand en oocits de *Xenopus* desapareix en presència de Tricostatina A, un inhibidor de la histona desacetilasa. En canvi, en presència d'hormona

tiroidea, la unió del receptor heterodímer a TRE dóna lloc al reclutament d'un complex coactivador, format per les proteïnes p300/CBP, p/CAF i TAF_{II}250 (Yang *et al.*, 1996; Ogryzko *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Aquest complex coactivador produeix l'acetilació de les histones internes, desestructura localment la cromatina i facilita la transcripció (Wong *et al.*, 1995, 1997). No només això, sinó que impedeix l'activitat de la histona desacetilasa HD1 i recluta alguns components de la maquinària transcripcional, facilitant el seu ensamblatge i activitat.

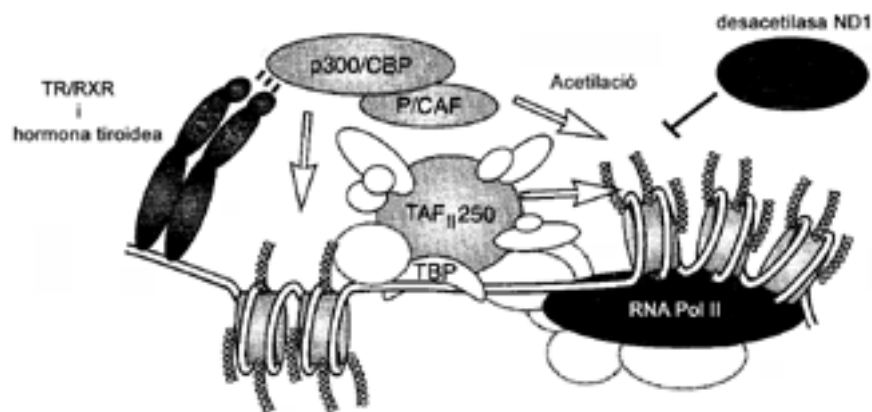


Figura 9: Cadena d'esdeveniments i factors implicats en l'activació transcripcional per part del receptor de l'hormona tiroidea. (Extret de Wolffe, 1998).

Les evidències que s'estan acumulant en múltiples experiments porten a considerar les proteïnes estructurals de la cromatina com a components integrals de la maquinària de transcripció. És important reconèixer que l'estructura de la cromatina no és necessàriament estàtica i un impediment per a la transcripció, sinó que és un factor que modula la funció d'una seqüència de DNA. Variacions en la qualitat de les interaccions histona-DNA i en la conformació tridimensional de la doble hèlix de DNA poden influir directament en la transcripció (Schild *et al.*, 1993; Ura *et al.*, 1997). La conformació és un conegut determinant de l'activitat enzimàtica, de manera anàloga s'està establint que alteracions en la conformació de la cromatina poden determinar l'activitat transcripcional.

A més dels mecanismes descrits, existeixen altres factors a tenir en compte per a una completa descripció de la relació entre estructura i funció de la cromatina, com per exemple la metilació del DNA. La repressió transcripcional està fortament relacionada amb la densitat de metilació del DNA (Boyes i Bird, 1992; Hsieh, 1994). La metilació del

DNA té una funció reguladora essencial en el desenvolupament dels mamífers, ja que serveix per a reprimir de forma estable gens no transcrits en cèl·lules adultes diferenciades (Bird, 1995). Dades recents impliquen repressors transcripcionals específics per DNA metilat en el control general de l'activitat gènica. En són un exemple els repressors MeCP1 i MeCP2, els quals s'uneixen a metil-CpG sense una especificitat de seqüència aparent (Meehan *et al.*, 1989, 1992; Lewis *et al.*, 1992). MeCP2 és una proteïna cromosomal amb la capacitat de desplaçar la histona H1 del nucleosoma (Nan *et al.*, 1996) i que, a més, presenta un domini d'unió a metil-CpG DNA i un domini repressor (Nan *et al.*, 1993, 1997). L'ensamblatge d'estructures nucleosomals especialitzades en DNA metilat explicaria la capacitat dels segments de DNA metilat de silenciar la transcripció de manera encara més efectiva que la cromatina convencional.

En aquest sentit, s'ha observat que l'activador Gal4-VP16 pot penetrar i actuar normalment en cromatina plegada, activant la transcripció fins i tot en presència d'histona H1 formant part dels nucleosomes (Laybourn i Kadonaga, 1992). Tanmateix, aquest activador no pot accedir als seus llocs d'unió i activar la transcripció si la cromatina està formada per DNA metilat (Siegfried i Cedar, 1997). La metilació del DNA no només actua com un repressor permanent de la transcripció, sinó que s'ha demostrat que dominis locals d'alta densitat de metil-CpG poden produir la repressió transcripcional de promotors en *cis* no metilats (Kass *et al.*, 1993). L'existència de nucleosomes especialitzats podria ser un mecanisme molecular potencial, probablement actuant de forma conjunta amb l'acetilació de les histones internes, per a produir la propagació estable del silenciament transcripcional dependent de DNA metilat a través de la divisió cel·lular.

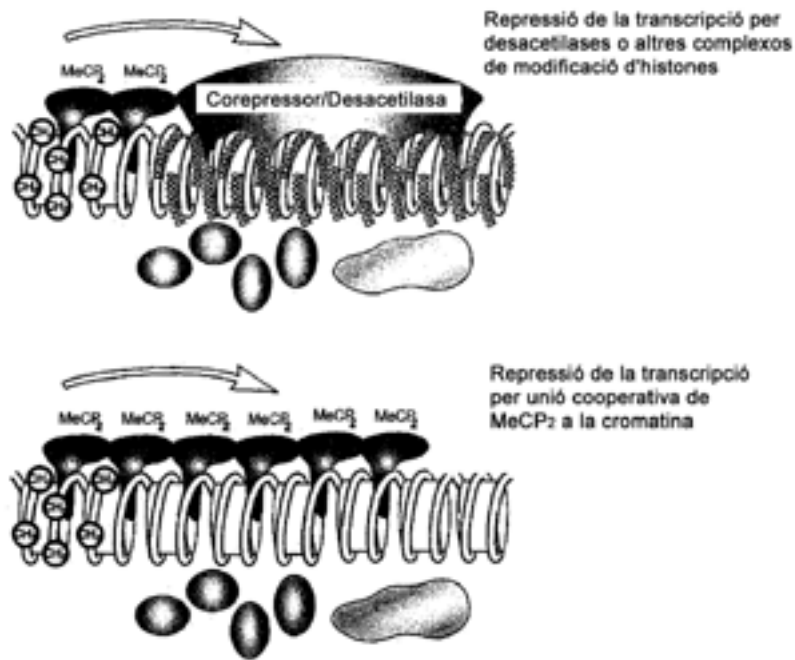


Figura 10: Esquema de dos mecanismes teòrics de repressió transcripcional en els que estaria implicat el repressor MeCP₂. (Adaptat de Wolffe, 1998).

1.6. Les proteïnes HMG

Les proteïnes HMG (*high mobility group*) són proteïnes no histones que interaccionen amb el DNA i que clàssicament s'han associat a la modificació de l'estructura de la cromatina (Johns, 1982). Dins de les HMG de vertebrat es distingeixen quatre proteïnes majoritàries agrupades en dues classes: HMG1 i 2 són dues proteïnes homòlogues d'uns 29 kDa de pes molecular, mentre que HMG14 i 17 tenen un pes molecular d'entre 10 i 12 kDa. El contingut en HMG14 i 17 de la cromatina pot arribar a un 10% del pes del DNA, similar al de la histona H1. A més, existeixen algunes proteïnes HMG minoritàries, per exemple la HMG-I/Y que s'uneix a les seqüències de satèl·lits α en el centròmer (Bustin i Reeves, 1996).

Les proteïnes HMG1 i HMG2 són representants d'una gran família de proteïnes d'unió al DNA, algunes de les quals interaccionen amb el DNA de forma específica. Totes elles presenten un domini d'unió al DNA altament conservat i un domini ric en residus acídics. Sembla que HMG1 i 2 tenen una funció estructural en la cromatina i poden, en certes circumstàncies, substituir les histones H1 en el nucleosoma. En aquest sentit, sembla que

HMG1 pot ser capaç de substituir de forma funcional la histona H1 en la cromatina (Jackson *et al.*, 1979; Nightingale *et al.*, 1996).

Les proteïnes HMG14 i 17 presenten una major afinitat pel DNA nucleosomal que pel DNA nu i curiosament s'uneixen als nucleosomes com a homodimers (Mardian *et al.*, 1980; Sandeen *et al.*, 1980; Crippa *et al.*, 1992). Aparentment influeixen en el plegament de la cromatina i indirectament incrementarien l'accessibilitat dels complexos regulatoris a la RNA polimerasa (Crippa *et al.*, 1993; Tremethick i Drew, 1993). A més, sembla que la incorporació d'HMG14 i 17 en la cromatina facilita la progressió de la RNA polimerasa a través de la cadena de nucleosomes (Ding *et al.*, 1994). També s'ha suggerit que HMG14 i 17 poden ser responsables de la potenciació de la transcripció de gens *in vivo* (Einck i Bustin, 1985).

2. LES HISTONES INTERNES

Les principals proteïnes que provoquen i controlen el plegament del DNA en cromatina són les histones. Apart de la compactació del DNA, les histones realitzen interaccions proteïna-proteïna entre elles mateixes i amb altres proteïnes. No totes les cèl·lules eucariotes tenen histones; per exemple, els dinoflagelats empaqueten la majoria del seu DNA mitjançant petites proteïnes bàsiques completament diferents de les histones (Vernet *et al.*, 1990) i en les espècies de mamífers la majoria del DNA en els espermatozoides és compactat mitjançant la interacció de proteïnes bàsiques conegudes com protamines.

Cada nucleosoma conté un nucli central proteic al voltant del qual el DNA s'enrotlla. Aquest nucli conté dues molècules de cada una de les histones H2a, H2b, H3 i H4, les anomenades histones internes. El nucleosoma no és complet sense una cinquena histona, la histona H1 (o la histona H5, una variant específica d'eritròcits nucleats d'au), que s'uneix externament.

Donat que les histones poden ser separades del DNA per concentracions salines elevades, les principals interaccions entre les histones internes i el DNA semblen ser de naturalesa electrostàtica. Les histones H2A i H2B es dissocien primer a mesura que la concentració de sal augmenta, seguides de les histones H3 i H4. Estudis d'aquest tipus, juntament amb estudis d'entrecreuament químic, demostraren que les histones H2A i H2B formen un dímer estable, mentre que les histones H3 i H4 formen un tetràmer estable en absència de DNA (Kornberg, 1974; Kornberg i Thomas, 1974).

Totes les histones internes són conservades en llargada i en seqüència aminoacídica de forma remarcable al llarg de l'evolució. Les histones H3 i H4 són les més altament conservades; per exemple, la histona H4 de vedella i de pèsol difereixen en només dos dels seus 102 residus (De Lange *et al.*, 1969a,b). Les histones H3 i H4 tenen un paper central en el nucleosoma i en molts processos de la cromatina; aquests requeriments funcionals i estructurals contribueixen presumiblement a la conservació de la seva seqüència. Les histones H2A i H2B són lleugerament menys conservades.

Totes les histones internes són proteïnes petites, de 11 a 16 kDa de pes molecular, que contenen un elevat percentatge de lisina i arginina (més del 20% dels aminoàcids). Les histones H2A i H2B contenen més lisina (14 de 129, i 20 de 125 aminoàcids, respectivament, en vedella), i les histones H3 i H4 contenen més arginina (18 de 135, i 14 de 102 aminoàcids, respectivament, en vedella) (van Holde, 1988). Totes quatre histones presenten un domini globular del tipus anomenat precisament "plegament d'histona"

(*histone-fold*) en l'extrem carboxi (C-) terminal de la proteïna, a través del qual es produeixen les principals interaccions histona-histona i histona-DNA. A més, presenten una cua amino (N-) terminal que conté la majoria de les lisines (Arents *et al.*, 1991).

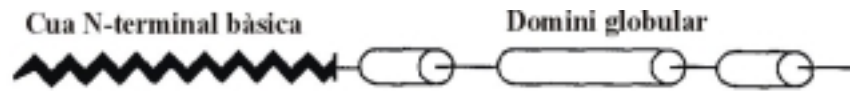


Figura 11: Estructura en dominis de les histones internes. (Extret de Wolffe, 1998).

El domini tipus “plegament d’histona” C-terminal, conté tres hèlixs α . Aquest domini és conservat evolutivament, degut a les restriccions que li confereix la seva importància estructural en el nucleosoma; tanmateix, la seqüència de la cua N-terminal carregada també es troba conservada. Aquestes cues N-terminals sofreixen varies modificacions post-traduccionals, sovint per part de proteïnes reguladores de la transcripció, en aminoàcids específics (Kuo *et al.*, 1996). Aquesta és una de les explicacions de la conservació evolutiva de la seqüència d’aquestes cues, juntament amb la seva importància en la interacció amb altres components estructurals de la cromatina i altres proteïnes que n’organitzen la superestructura (Hecht *et al.*, 1995; Edmondson *et al.*, 1996). Per tant, les cues N-terminals constitueixen la diana per les vies de transducció de senyals que modifiquen l’estructura de la cromatina. S’ha observat que aquests dominis terminals són capaços d’estructurar-se lleugerament en hèlix en presència d’inductors de l’estructura secundària com el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE). Sembla, a més, que l’acetilació d’aquests dominis de les histones internes incrementa el percentatge d’hèlix que poden adquirir (Prevelige i Fasman, 1987; Wang *et al.*, 2000).

2.1. La posició de les histones internes en el nucleosoma

Movent-nos enllà dels extrems del DNA nucleosomal, les histones H2A i H2B s’uneixen a la perifèria i les histones H3 i H4 s’uneixen cap al centre. Interaccions proteïna-DNA especialment fortes tenen lloc on les histones H3 i H4 organitzen les voltes centrals del DNA en el nucleosoma. Són justament aquests contactes els que provoquen el canvi en la periodicitat de l’hèlix del DNA en aquesta regió (Arents i Moudrianakis, 1993). La histona H3 presenta interaccions dèbils amb el DNA on aquest entra i surt de la

partícula nucli; tanmateix, els aminoàcids implicats en aquests contactes dèbils poden ser modificats amb importants conseqüències.

El domini globular C-terminal de cadascuna de les histones internes és molt similar. És predominant l'hèlix α , amb una llarga hèlix central flanquejada a cada costat per un llaç i una hèlix més curta. Cada un dels llaços conté una certa estructuració en cadena β . La llarga hèlix central actua com a zona de dimerització. La zona d'interacció entre les histones és descrita sovint com a motiu *handshake* (Arents *et al.*, 1991). Les quatre histones internes tenen interaccions molt selectives entre elles. Com ja s'ha comentat, les histones H2A i H2B formen un heterodímer, però les histones H3 i H4 també són capaces de formar un heterodímer. La zona d'unió entre els dos dímers (H3, H4) és més petita, però per contra més estable, que la zona d'unió entre els dímers (H3, H4) i (H2A, H2B) (Eickbush i Moudrianakis, 1978; Karantza *et al.*, 1996). Experiments de mutagènesi indiquen que tirosines de l'hèlix α C-terminal de la histona H4 tenen un paper important en la estabilització de la unió entre l'heterodímer (H3, H4) i l'heterodímer (H2A, H2B) (Zweidler, 1992; Santisteban *et al.*, 1997).

La disposició final de les histones internes en l'octàmer és un tetràmer (H3, H4)₂ central, flanquejat per dos dímers (H2A, H2B).

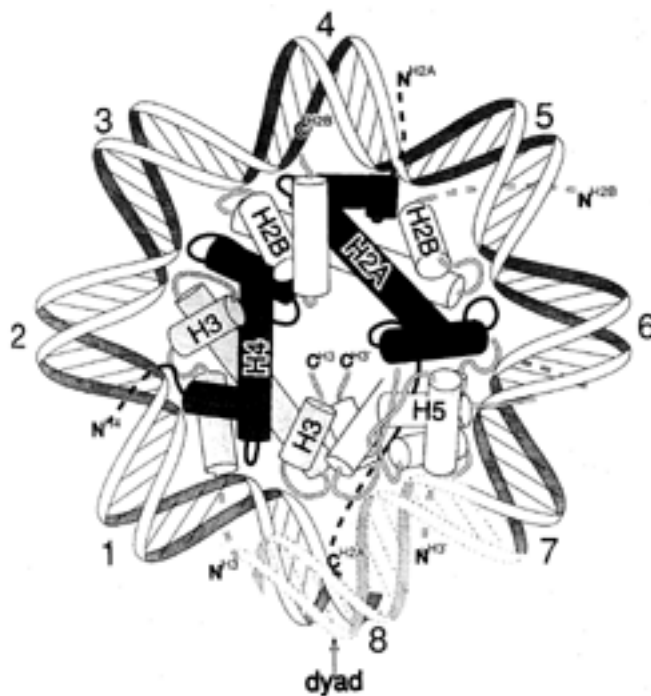


Figura 12: Dibuix del nucleosoma en el que s'aprecia la disposició de les histones internes, del DNA i un possible lloc d'unió de la histona H5. (Extret de Wolffe, 1998).

Aquesta estructura presenta una sèrie de solcs en la seva superfície que creen una rampa helicoidal levògira en la que s'enrotllarà el DNA. Dins d'aquesta rampa hi ha exposats els 16 llaços de les histones internes, que queden aparellats formant 8 ponts β (β -bridges) paral·lels en el moment de la dimerització. Cadascun d'aquests ponts β presenta almenys dos residus carregats positivament que són capaços d'interaccionar amb els fosfats del DNA en la superfície de l'octàmer d'histones (Arents i Moudrianakis, 1993). També l'extrem N-terminal de la primera hèlix de les histones queda aparellat en la dimerització i sembla que s'uneix al DNA.

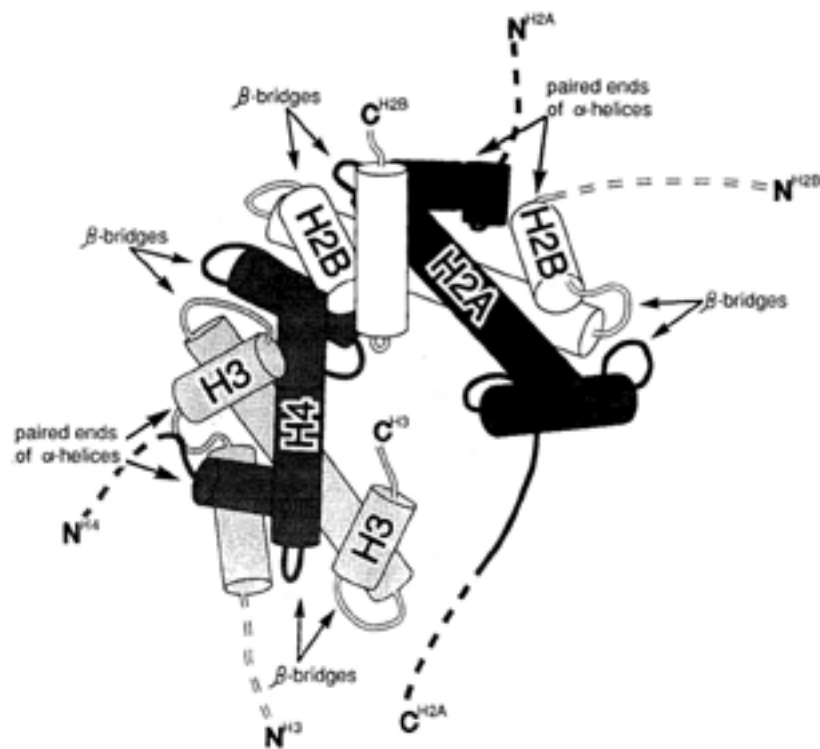


Figura 13: Heterodímers d'H2A/H2B i d'H3/H4. Els llocs d'interacció amb el DNA estan indicats. (Extret de Wolffe, 1998).

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 (Ichimura *et al.*, 1982). Tot i que 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 (Hayes *et al.*, 1991) i que no tenen un paper essencial en mantenir la integritat del nucleosoma (Ausió *et al.*, 1989), modificacions post-traduccionals d'aquestes cues poden alterar aspectes més subtils de la conformació del nucleosoma i de la qualitat de les interaccions histona-DNA. A més, tot i que alguns experiments suggereixen que les cues N-terminal de les histones internes no presenten interaccions estables amb el solc ample del DNA en el nucleosoma (McGhee i Felsenfeld, 1979, 1982; Thomas, 1989), altres resultats indiquen un entrecreuament químic molt específic entre el la cua N-terminal d'H2A i el DNA a 40 pb de l'eix de simetria binari (Lee i Hayes, 1997). És molt sorprenent i interessant aquesta distribució tant localitzada dels entrecreuaments, que suggereix que el domini N-terminal només pot adoptar un nombre molt limitat de conformacions. A més de qualsevol paper específic en l'estructura del nucleosoma, les cues N-terminal de les histones internes intervenen en interaccions proteïna-proteïna fora del nucleosoma.

2.2. Variants de les histones internes

Els gens de les histones internes es troben invariablement presents en múltiples còpies idèntiques, presentant un nivell de reiteració des de dues còpies de cada gen en el llevat fins a varis cents en l'eriçó de mar. A més, en alguns organismes existeixen diferents subtipus de les histones internes, que són transcrits en períodes precisos durant el desenvolupament (Poccia, 1986). En els eucariotes superiors també es coneixen alguns casos de variants de les histones internes. H2A.vD és un subtipus de la histona H2A conservat evolutivament que s'ha demostrat essencial per al desenvolupament de *Drosophila* (van Daal i Elgin, 1992). Aquest subtipus és conegut com H2A.Z en mamífers, H2A.F/Z en pollastres i hv1 en *Tetrahymena* (Harvey *et al.*, 1983; Ernst *et al.*, 1987; van Daal *et al.*, 1988; Hatch i Bonner, 1988). Aquesta variant particular d'H2A s'associa amb preferència amb cromatina activament transcrita en *Tetrahymena* (Stargell *et al.*, 1993). H2A.Z presenta una cua N-terminal que és similar a la de la histona H4, i que és modificada post-traduccionament per acetilació en una major intensitat que la H2A normal. Una altra variant conservada d'H2A és H2A.X, expressada fora de la fase S del cicle cel·lular (Mannironi *et al.*, 1989) i que sembla que pot tenir un paper en

l'espaiat dels nucleosomes durant la formació de cromatina en DNA nu (Kleinschmidt i Steinbeisser, 1991). Aquesta histona presenta una cua C-terminal desestructurada en solució aquosa. La presència de cues C-terminals no és un fet estrany en variants de la histona H2A d'altres organismes, com en la variant H2A1 del blat (Lindsey *et al.*, 1991).

Aquests subtipus, però, són considerats avui com a una petita part d'una família de proteïnes que tenen en comú la presència del motiu estructural "plegament d'histona". Les altres proteïnes de la família poden ser incorporades també en l'arquitectura del nucleosoma, però les seves seqüències s'allunyen molt de les de les histones. Sembla que les histones internes han evolucionat a partir d'una proteïna d'unió a DNA que contenia només les tres hèlixs α del domini tipus "plegament d'histona" i no presentava cap més domini ni cua (Baxevanis *et al.*, 1995). En aquest sentit, la proteïna arqueobacteriana Hmf consisteix només en el domini tipus "plegament d'histona" i enrotlla el DNA sobre sí mateix en estructures semblants a nucleosomes (Sandman *et al.*, 1990). Les histones internes dels eucariotes han retingut aquesta propietat, però a més atorguen a la nucleoproteïna resultant la capacitat d'interaccionar amb altres proteïnes externes al nucleosoma a través de l'addició de dominis en forma de cua. Altres proteïnes reguladores fan ús del domini tipus "plegament d'histona" per a donar propietats específiques a nucleosomes individuals, reemplaçant les histones normals de la cromatina (Sullivan *et al.*, 1994; Stoler *et al.*, 1995; Shelby *et al.*, 1997). Formen part d'aquestes proteïnes CENP-A, que es toba en el centròmer, i macro H2A de rata. CENP-A presenta un nivell d'identitat significant amb el domini globular de la histona H3 i fins i tot és capaç de reemplaçar-la en el nucleosoma, però té una cua N-terminal molt diferent. CENP-A pot haver evolucionat en resposta a la necessitat en el centròmer d'una estructura nucleosomal especialitzada, en la que la cua N-terminal contacti de forma molt selectiva amb altres components centromèrics, com les grans proteïnes hidrofíliques d'unió al DNA CENP-B i CENP-C. Macro H2A presenta una cua C-terminal afegida al domini tipus "plegament d'histona" que conté una cremallera de leucines, un motiu de dimerització que es troba sovint en factors de transcripció (Pehrson i Fried, 1992). Tanmateix, no es coneix la funció concreta de macro H2A.

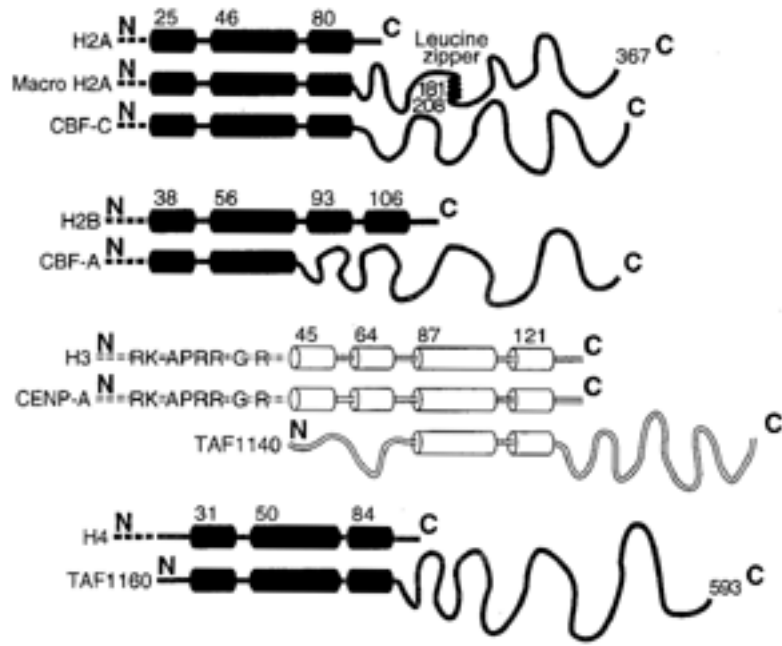


Figura 14: Histones i proteïnes reguladores que contenen el domini tipus “plegament d’histona”. (Extret de Wolffe i Pruss, 1996).



Figura 15: Aliniaments de seqüència pels subtipus de les histones internes i proteïnes relacionades. Les identitats es mostren com una ratlleta i els *gaps* com una línia puntejada. (Extret de Wolffe i Pruss, 1996).

Entre les proteïnes de regulació transcripcional existeixen variacions més extremes de la seqüència normal de les histones. Aquestes proteïnes mantenen el domini característic de les histones i en fan ús per a dirigir interaccions específiques proteïna-proteïna i per a unir DNA (Kokubo *et al.*, 1993; Sinha *et al.*, 1995). En són un exemple (TAF)_{II}60 i (TAF)_{II}40 (*TATA-binding-protein associated factors*) i les proteïnes relacionades CBF (*CCAAT-box-binding factors*), concretament NF-Y, HAP2, HAP3 i HAP5. La proteïna (TAF)_{II}60 s'assembla a la histona H3 i (TAF)_{II}40 a la histona H4, mentre que HAP3 i HAP4 presenten una regió que s'assembla al domini globular d'H2B i H2A, respectivament.

2.3. Modificacions post-traduccionals de les histones internes

Les histones internes presenten dos tipus principals de modificació post-traduccional: acetilació i fosforilació, però també poden ser metilades, ADP-ribosilades i ubiquitinades. La variació d'aquestes modificacions al llarg del cicle cel·lular es mostra en la següent figura:

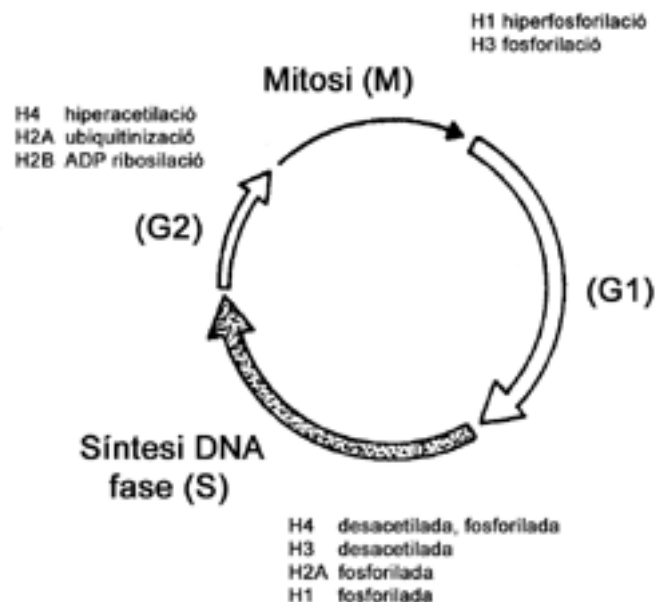


Figura 16: Principals modificacions post-traduccionals de la H1 i les histones internes que tenen lloc al llarg del cicle cel·lular. (Adaptat de Wolffe, 1998).

2.3.1. Acetilació

L'acetilació de les histones internes té un paper molt important en el procés de la regulació de la transcripció perquè alguns activadors transcripcionals presenten activitat histona acetiltransferasa (Brownell *et al.*, 1996) i alguns repressors transcripcionals són histones desacetilases (Taunton *et al.*, 1996). S'ha observat acetilació de les quatre histones internes en totes les espècies d'animals i plantes examinades (Csordas, 1990). Concretament, s'aceten els residus lisina de les cues aminoterminals carregades, de manera que cada grup acetat afegit a la histona redueix la seva càrrega neta positiva en 1. El nombre de residus lisina acetilats en una molècula d'histona depèn d'un equilibri entre les histona acetilases i desacetilases. Curiosament, sembla que en el nucli d'una cèl·lula en particular existeixen dues poblacions d'histones acetilades. Per exemple, en l'eritrocit embrionari de pollastre, un 30% de les histones internes es troben acetilades de forma estable, mentre que l'estat d'acetilació d'un 2% canvia ràpidament. 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 (Turner, 1991).

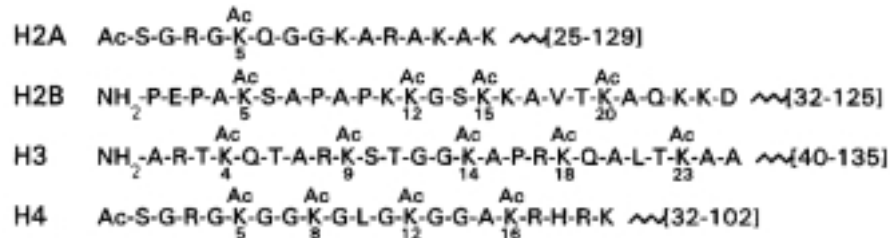


Figura 17: Seqüència dels dominis N-terminals de les histones internes de ratolí amb els punts d'acetilació indicats. (Extret de Wolffe, 1998).

La hiperacetilació de les cues de les histones internes dóna lloc a petits canvis en la conformació del nucleosoma (Bode *et al.*, 1983; Oliva *et al.*, 1990), però sembla que les conseqüències més importants d'aquesta modificació rau en les interaccions proteïna-proteïna, bé entre nucleosomes, bé amb la histona H1 o amb proteïnes no histones. Les cues N-terminals són accessibles a la tripsina i, per tant, sembla que es troben exposades cap a l'exterior de la partícula nucli. 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 (Lee *et al.*,

1993; Vettese-Dadey *et al.*, 1996); resultat que indica un paper regulador important del procés de transcripció per a l'acetilació de les histones. Cada cop està més clar que canvis subtils en l'estabilitat de la fibra de cromatina poden tenir grans efectes en la transcripció.

En un sistema purificat l'acetilació de les histones internes no influeix directament en l'associació de la histona H1 amb els nucleosomes (Ura *et al.*, 1994, 1997). D'acord amb aquestes observacions *in vitro*, s'ha observat que la hiperacetilació constitutiva de les histones internes no redueix l'associació de la histona H1 amb la cromatina (Dimitrov *et al.*, 1993; Almouzni *et al.*, 1994), però inhibeix la completa condensació de la cromatina en la interfase (Annunziato *et al.*, 1988).

L'obtenció d'anticossos específics contra histones acetilades, ha permès una sèrie d'experiments que han donat lloc a un coneixement més precís de la funció de l'acetilació de les histones. Per exemple, en *Tetrahymena*, *Xenopus* i humans s'ha demostrat la presència d'histones acetilades immediatament després de que tingui lloc la replicació (Lin *et al.*, 1989). També s'ha observat una forta correlació entre l'acetilació de les histones i l'activitat transcripcional de la cromatina (Allfrey *et al.*, 1964; Gorovsky *et al.*, 1973; Mathis *et al.*, 1978). Les histones H3 i H4 acabades de sintetitzar són acetilades (Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Chang *et al.*, 1997) i desacetilades poc després de la seva incorporació en la cromatina que s'està formant immediatament després de la replicació (Jackson *et al.*, 1976). Les histona acetilases i desacetilases implicades en aquestes modificacions han estat caracteritzades (Taunton *et al.*, 1996; Parthun *et al.*, 1996). L'acetilació i la desacetilació de la histona H4, probablement la histona més ben estudiada en aquest aspecte, sembla necessària per a la progressió del cicle cel·lular (Megee *et al.*, 1995). En *S. cerevisiae* la majoria del genoma és transcripcionalment actiu i conté histones internes hiperacetilades (Clark, D.J. *et al.*, 1993). Tanmateix, també existeixen dominis de la cromatina de llevat transcripcionalment inactius. Aquestes regions inactives contenen histona H4 hipoacetilada, excepte en una posició precisa, concretament la lisina 12 (Braunstein *et al.*, 1993, 1996). En eritrocits de pollastre, s'ha observat hiperacetilació de la histona H4 restringida al domini de la cromatina que conté el gen de la β -globina, potencialment actiu (Hebbes *et al.*, 1992, 1994). Aquest resultat és indicatiu d'una especificitat molt alta de la histona acetiltransferasa. Sembla que les cues hiperacetilades mantenen un cert contacte amb el DNA *in vivo* en el gen de la β -globina (Ebraldise *et al.*, 1993). Experiments de marcatge per anticossos en cromosomes politènics de *Chironomus* i *Drosophila* també revelen una distribució no a l'atzar de l'acetilació de la histona H4, correlacionada amb l'activitat transcripcional (Turner *et al.*,

1992; Bone *et al.*, 1994). En les femelles de mamífer, el cromosoma X transcripcionalment inactiu es distingeix per una manca d'acetilació de la histona H4 (Jeppesen i Turner, 1993).

Tota aquesta sèrie d'experiments mostren que els dominis de la cromatina que es transcriuen activament o que són potencialment actius es troben enriquits en histones hiperacetilades, mentre que la cromatina transcripcionalment inactiva conté histones hipoacetilades. En resum, sembla que els estudis sobre el paper de l'acetilació de les histones tant en la transcripció com en el manteniment de la integritat cromosomal indiquen 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 senyals.

A més, també es coneix l'existència d'una connexió entre l'acetilació de les histones internes i la diferenciació cel·lular. Inhibidors de la desacetilació de les histones, com el butirat sòdic i la tricostatina A, provoquen la diferenciació cel·lular (Yoshida *et al.*, 1987) i restringeixen la transformació de les cèl·lules (Sugita *et al.*, 1992). Aquests inhibidors també indueixen defectes durant l'embriogènesi primerenca en vertebrats (Almounzi *et al.*, 1994). Una part d'aquests efectes podria donar-se a través de fenòmens epigenètics, com l'*imprinting* dels cromosomes, ja que es coneix que aquests efectes epigenètics contribueixen en el control del creixement i de la tumorigènesi (Reik i Surani, 1989). El manteniment de l'acetilació de les histones podria ser un mecanisme per a la propagació d'*imprints* cromosomals estables que determinin l'activitat gènica. En aquests sentit, la segregació distributiva dels nucleosomes durant la replicació asseguraria que l'estat d'acetilació de les histones parental sigui present en les dues cromàtides resultants (Perry *et al.*, 1993), tenint en compte que els estats d'acetilació cromosòmica es mantenen a través de la mitosi (Lavender *et al.*, 1994).

Ja s'ha comentat que l'acetilació sembla augmentar el percentatge d'hèlix que són capaços d'adquirir els dominis N-terminal de les histones internes (Prevelige i Fasman, 1987; Wang *et al.*, 2000). 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 (Sung i Dixon, 1970; Strahl i Allis, 2000).

2.3.2. Fosforilació

El segon tipus de modificació post-traducciona de les histones internes que ha estat objecte d'un intens estudi experimental ha estat la fosforilació. Sembla molt probable que existeixi una relació encara poc coneguda entre les vies de transducció de senyals cel·lulars i dianes en la cromatina. La histona H3 és ràpidament fosforilada en residus serina del seu domini bàsic aminoterminal, quan senyals extracel·lulars com factors de creixement o èsters de forbol estimulen cèl·lules quiescents a proliferar (Mahadevan *et al.*, 1991). La fosforilació *in vivo* de les histones H4 i H2A ocorre en el citoplasma poc després de la seva síntesi (Sung i Dixon, 1970; Ruiz-Carrillo *et al.*, 1975; Jackson *et al.*, 1976; Dimitrov *et al.*, 1994). 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 (Kaufman i Botchan, 1994; Wade *et al.*, 1997). L'eliminació de la fosforilació de les histones internes mitjançant fosfatases no influeix en l'espaiat dels nucleosomes (Dimitrov *et al.*, 1994) i la funció de la fosforilació en la constitució de la cromatina continua subjecte d'especulació.

2.3.3. Metilació

Les histones internes també són metilades en els seus residus lisina, sense conseqüències funcionals definides encara. Podria ser que, com que impedeix l'acetilació de les lisines, la metilació contribuís a la repressió transcripcional. La majoria de les metilacions en els vertebrats tenen lloc en la histona H3 en les lisines 9 i 27 i en la histona H4 en la lisina 20 (Annunziato *et al.*, 1995). La histona H3 presenta fins a tres grups metil en cada lisina, mentre que la lisina 20 de la histona H4 presenta dos grups metil com a màxim. La metilació de les lisines comença després de la formació dels nucleosomes i és màxima durant la mitosi. Durant l'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.

2.3.4. ADP-ribosilació

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 DNA (Mathis i Althaus, 1990). 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.

2.3.5. Ubiquitinització

La histona H2B i especialment la H2A poden ser també modificades per l'addició de la petita proteïna de 76 residus ubiquitina (West i Bonner, 1980). 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 proteolisi. Concretament és unida a l'extrem C-terminal de les histones H2A i H2B. S'ha observat que la histona H2A ubiquitinada s'incorpora en els nucleosomes sense canvis importants aparents en l'organització de la partícula nucli (Levinger i Varshavsky, 1980; Kleinschmidt i Martison, 1981). Com que l'extrem C-terminal de la histona H2A contacta amb el DNA nucleosomal en l'eix de simetria binari (Guschin *et al.*, 1991; Usachenko *et al.*, 1994), la seva ubiquitinització 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.

3. LA HISTONA H1

3.1. Els subtipus de la H1

Les histones de la classe H1 són codificades per una família multigènica. En mamífers, han estat identificats cinc subtipus (H1a, -b, -c, -d i -e) que són constitutius, tot i que les seves proporcions varien àmpliament durant el cicle cel·lular i l'ontogènesi (Lennox i Cohen, 1983; Cole, 1984). En l'individu adult el subtipus majoritari és la H1e, subtipus que va augmentant la seva proporció al llarg de l'ontogènesi. En les cèl·lules de la línia germinal masculina s'hi troba el subtipus H1t. A més a més, alguns tipus cel·lulars contenen H1°, subtipus que fou descrit com una proteïna de la classe H1 que es troba en teixits amb poca o gens de proliferació cel·lular (Panyim i Chalkley, 1969). Els subtipus de la H1 difereixen en el grau de fosforilació i en el grau de conservació evolutiva (Lennox, 1984). També difereixen en les seves taxes relatives de síntesi i degradació en cèl·lules en proliferació o quiescents (Pherson i Cole, 1982; Lennox i Cohen, 1983). Finalment també s'ha vist que alguns subtipus presenten diferent habilitat per a condensar el DNA *in vitro* (Welsh i Cole, 1979, 1980; Liao i Cole, 1981). Aquestes propietats suggereixen que alguns subtipus deuen ser funcionalment diferents d'altres.

El subtipus H1° de mamífer, també trobat en *Xenopus laevis*, i les histones H5 d'eritròcits nucleats de les aus, es troben evolutivament relacionats i formen un grup lleugerament diferenciat de la resta de subtipus de la H1. Durant la maduració dels eritròcits de les aus, la histona H5 substitueix la H1 (Affolter *et al.*, 1987). 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 (Sun *et al.*, 1990).

El gen de la H1° no es troba localitzat en el bloc de gens de les histones. Mentre que les histones internes i la resta de les H1 es troben codificades en múltiples còpies en el cromosoma 6 d'humà, la H1° és codificada per un gen de còpia única en el cromosoma 22 (Albig *et al.*, 1993). Una altra característica especial de la H1° és que el seu mRNA es troba adenilat i presenta unes regions 3' i 5' no traduïdes molt llargues, en contrast amb la resta d'histones (Kress *et al.*, 1986).

És ben demostrada l'especificitat de la H1° pel què fa a la seva expressió. Treballs previs en neurones corticals i les seves cèl·lules germinals han demostrat que la regulació de l'expressió de la H1° és diferent de la dels altres subtipus. Mentre que els nivells dels subtipus H1a-e varien durant tot el procés de la diferenciació neuronal, la histona H1° s'acumula durant la diferenciació terminal de les neurones i cèl·lules glials (Stambolova

et al., 1984; Piña *et al.*, 1984, 1987; Domínguez *et al.*, 1992). S'ha demostrat que la H1^o és activada transcripcionalment en tipus neuronals específics (Ponte *et al.*, 1994). En certs teixits com el còrtex adrenal, la tiroides, els testicles, la pròstata i el *vas deferens*, la pèrdua de funció deguda a deprivació de la hormona corresponent està correlacionada amb nivells baixos d'H1^o i no dels altres subtipus d'H1 (Gjerset *et al.*, 1982). La quantitat d'H1^o també decreix en pàncreas i fetge en regeneració (Marsh i Fitzgerald, 1973; Fedoseeva, 1983). S'ha observat que els nivells d'H1^o en neurones del nucli arcuat en condicions fisiològiques són regulats per hormones (García-Segura *et al.*, 1993). En aquestes neurones, la quantitat d'H1^o és sexualment dimòrfica i fluctua durant el cicle estral. També en neurones del nucli supraòptic de rata s'ha observat que l'expressió de la H1^o disminueix en induir-se la transcripció general (Lafarga *et al.*, 1995). Aquests resultats mostren la capacitat de la H1^o, que sembla que no presenta cap dels altres subtipus, de respondre a senyals externs.

3.2. La posició 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 (Simpson, 1978; Allan *et al.*, 1980), presenta problemes d'interpretació de les noves dades experimentals de què es disposa, fins al punt que l'opinió clàssica sobre la posició de la histona H1 en el nucleosoma ha estat seriosament qüestionada (Travers, 1994; Pruss *et al.*, 1995). 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 (Mirzabekov *et al.*, 1990; Ramakrishnan *et al.*, 1993), 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.

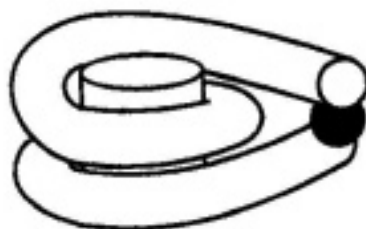


Figura 18: Hipòtesi de la histona H1 situada simètricament però separada de l'octàmer. (Extret de Wolffe, 1998).

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 (Lambert *et al.*, 1991) i l'observació d'entrecreuament químic proteïna-proteïna entre parts del domini globular de la histona H2A i del domini globular de la histona H1 (Boulikas *et al.*, 1980).

Actualment existeixen tres models principals per a la unió de la H1 al nucleosoma.

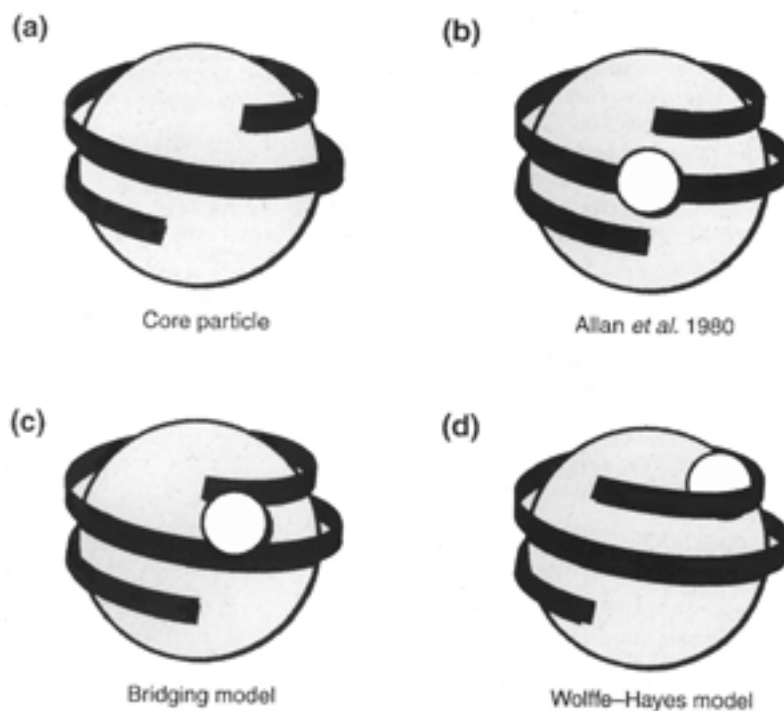


Figura 19: Les tres hipòtesis principals sobre la posició de la histona H1 en el nucleosoma. (Extret de Travers, 1999).

El model clàssic, totalment simètric, situa el domini globular centrat en l'eix de simetria binari del nucleosoma. El model anomenat "*bridging model*" (Zhou *et al.*, 1998) postula que el domini globular de la H1 s'uneix entre dues voltes superhelicoidals del DNA, concretament entre un extrem del DNA nucleosomal i el centre de simetria. 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 (Hayes i Wolffe, 1993).

La crítica principal a aquest tercer model de Hayes i Wolffe és que està basat en resultats obtinguts amb nucleosomes que incorporen DNA de seqüències específiques i, tot i que els resultats en aquests casos són molt clars, no es poden generalitzar a qualsevol seqüència, especialment si es té en compte la unió parcialment selectiva de seqüència de la histona H1 al DNA. Resultats d'entrecruament químic entre la histona H5 i el DNA en el nucleosoma del gen 5S de *Xenopus*, revelen un contacte principal entre el domini globular d'H5 i el DNA a aproximadament 65 pb enllà de l'eix de simetria binari, simultàniament amb una protecció asimètrica del DNA a la degradació per nucleasa micrococal (Hayes *et al.*, 1994; Pruss *et al.*, 1996; Hayes, 1996). A més, les evidències de què es disposa suggereixen una posició de la histona H1 poc exposada, és a dir unida al solc ample del DNA quan aquest no es troba dirigit directament cap al solvent. Aquests resultats descrits pel gen del 5S rRNA de *Xenopus*, s'han obtingut també en cinc casos més, tots ells amb seqüències de DNA definides (An *et al.*, 1998; Guschin *et al.*, 1998; Sera i Wolffe, 1998).

El model asimètric de Hayes i Wolffe seria consistent amb les interaccions proteïna-proteïna de la histona H1 amb la histona H2A, les dades de protecció a nucleasa i amb les dimensions i probable interacció del domini globular d'H5 amb el DNA (Pruss *et al.*, 1995). Presumiblement, la unió asimètrica vindria donada per preferències locals de seqüència del DNA que presenta el domini globular de les histones H1 (Satchwell i Travers, 1989). Aquest tipus d'associació asimètrica també explicaria perquè dues molècules d'histona H1 es poden unir simultàniament a una sola partícula nucli (Nelson *et al.*, 1979; Bates i Thomas, 1981). Tanmateix, el model asimètric no explicaria fàcilment el fet que la histona H1 protegeix 20 pb de DNA internucleosomal, incloent regions dels dos extrems del nucleosoma, o la protecció del DNA a l'eix de simetria binari de la digestió amb DNasa I en dinucleosomes (Staynov i Crane-Robinson, 1988).

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 (Hayes *et al.*, 1994; Lee i Hayes, 1998; Guschin *et al.*, 1998). Aquest fet suggereix que l'associació de la histona H1 pot causar canvis alostèrics en el plegament de l'octàmer que podrien resultar en l'estabilització de les interaccions histona-DNA (Simpson, 1978; Usachenko *et al.*, 1996). Aquests canvis podrien venir donats a través de la interacció directa, ja esmentada, entre histona H1 i la histona H2A.

Tots els models de la situació de la 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 la H1.

3.3. La histona H1 en la condensació de la cromatina

La histona H1 és una molècula clau en la formació de superestructures a partir de la cadena de nucleosomes. Varis estudis amb cromatina “natural” a la que se li ha extret la histona H1 i 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 solució (Hansen *et al.*, 1989; Clark i Kimura, 1990; Hansen i Wolffe, 1992; García-Ramírez *et al.*, 1992). En les condicions apropiades és possible condensar la cromatina fins un nivell aproximat al que s'observa *in vivo* (Schwartz i Hansen, 1994). 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, amb tota probabilitat, més aspectes que una simple neutralització de càrregues. Com és d'esperar, la condensació de la cromatina induïda per concentració salina és facilitada per la presència d'histones H1 (García-Ramírez *et al.*, 1992, 1995; Fletcher i Hansen, 1995; Schwartz *et al.*, 1996). Sembla que existeixen mecanismes que permetrien interaccions entre cadenes de nucleosomes de dues molècules de DNA diferents (Fletcher i Hansen, 1996). A més, és probable que els diferents subtipus d'histona H1 existents en un mateix organisme presentin especificitats i particularitats encara no ben conegudes.

El domini globular de la histona H1 mostra una clara preferència pel DNA nucleosomal en relació al DNA lliure. Algunes pistes sobre què determina aquesta selectivitat les podem trobar estudiant les preferències que també presenta aquest domini per altres tipus de DNA especials, com per exemple pel DNA superenrotllat en comparació amb el DNA relaxat (Singer i Singer, 1976). En el DNA superenrotllat la doble hèlix creua sobre si mateixa amb una freqüència major que en el DNA relaxat i sembla que la histona H1 s'uneix preferencialment en aquests punts de creuament. L'associació selectiva de les histones H1 amb el DNA cruciforme (*four-way junction DNA*), en el que dues dobles hèlixs es troben juxtaposades formant un angle relativament agut, estaria d'acord amb la preferència de la H1 pels creuaments de DNA (Varga-Weisz *et al.*, 1994). Aquesta preferència es pot relacionar amb la hipòtesi que el domini globular de la histona H1 presenta almenys dues superfícies d'unió al DNA i que s'uniria als dos

extrems del DNA enrotllat al voltant del nucli del nucleosoma (Goytisolo *et al.*, 1996). Una explicació alternativa a aquest fenomen seria que la histona H1 preferiria unir-se al DNA corbat. Efectivament, el DNA superenrotllat i el DNA cruciforme es troben clarament més distorsionats que el DNA lineal en forma B. Seria consistent amb aquesta possibilitat el fet que es manté la preferència d'unió de la histona H1 pel DNA nucleosomal encara que només un lloc d'unió estigui present en el domini globular (Hayes *et al.*, 1996).

No són aquestes les úniques propietats de les histones H1. El domini globular central s'uneix al DNA nu de forma cooperativa, aproximant dues dobles hèlixs entre elles i apilant histones H1 entre elles (Draves *et al.*, 1992; Thomas *et al.*, 1992). Aquest resultat és consistent amb el fet que el domini globular de la histona H1 presenti dos llocs d'unió al DNA, però no està clar si és una sola molècula d'histona H1 o un dímer d'elles el que mantindria properes les dues molècules de DNA. En cristalls, el domini globular de la histona H5 dimeritza i exposa els seus llocs d'unió a DNA cap enfora de l'estructura dimèrica. L'espaiat entre aquests dominis és compatible amb el que s'observa entre les dues molècules de DNA en el complex amb dominis globals d'histona H1 (Ramakrishnan *et al.*, 1993). La possibilitat que les histones H1 interaccionin amb altres histones H1 de nucleosomes adjacents, o amb el seu DNA, va donar lloc ben aviat a la hipòtesi que les cadenes de nucleosomes es podien plegar en fibres de cromatina altament ordenades amb les histones H1 situades en el centre de la fibra (Thoma *et al.*, 1979). Efectivament, estudis de dispersió de neutrons demostren que la histona H1 es troba localitzada en l'interior de la fibra de cromatina (Graziano *et al.*, 1994). S'ha suggerit que la histona H1 també pot presentar cooperativitat en presència de cromatina (Renz *et al.*, 1977; Clark i Thomas, 1986; Thomas *et al.*, 1992). La cooperativitat observada *in vitro* amb el DNA nu pot no tenir res a veure amb la possible cooperativitat en la cromatina.

Estudis d'entrecruament químic han demostrat que ocorren canvis significatius en la interacció de les histones H1 amb el DNA durant la compactació de les cadenes de nucleosomes en fibres de cromatina. Aquesta interacció modificada de les histones H1 amb el DNA en la cromatina difereix de la interacció observada amb DNA nu (Mirzabekov *et al.*, 1990). Aquest fet fa pensar que en el procés de compactació es poden produir canvis en la posició i interacció de la histona H1 impossibles d'estudiar de forma directa amb DNA nu o nucleosomes aïllats en les condicions habituals.

3.4. Proteïnes que desplacen la H1 del nucleosoma

El reemplaçament de la histona H1 per la proteïna HNF3 és un cas similar al reemplaçament ja comentat de la histona H3 per la proteïna CENP-A en el centròmer. HNF3 és un factor d'unió específic a la seqüència potenciadora (*enhancer*) del gen de l'albumina de ratolí que presenta una estructura molt similar al domini globular de la H1 i que fins i tot podria ser considerada com una variant extrema de la H1.

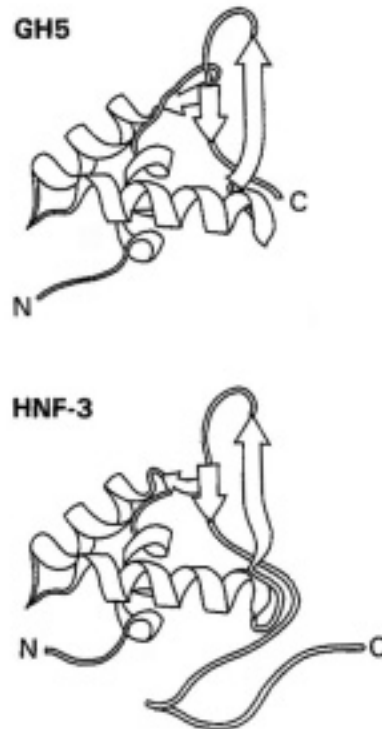


Figura 20: Comparació de l'estructura del domini globular de la histona H5 amb l'estructura d'HNF3. (Extret de Wolffe, 1998).

Quan la seqüència potenciadora del gen de l'albumina es troba en forma activa, s'hi ha detectat una cadena de partícules semblants a nucleosomes molt precisament posicionades (Meersseman *et al.*, 1991). HNF3 forma part d'aquestes partícules semblants a nucleosomes i és capaç de dirigir activament el seu posicionament respecte la seqüència de DNA. Aquestes observacions indiquen que HNF3 reemplaça la histona H1 en la cromatina que conté la seqüència potenciadora del gen de l'albumina. A l'igual que en el cas de CENP-A en el centròmer, una proteïna reguladora semblant a una histona i selectiva de seqüència, dirigeix la formació d'un domini de cromatina diferenciat. Sembla

que HNF3 substituiria les histones H1 en la seqüència potenciadora de l'albumina per a prevenir la seva influència represiva en la transcripció (Cirillo *et al.*, 1998; Shim *et al.*, 1998).

A part d'HNF3, s'han descrit altres factors proteics capaços de desplaçar la histona H1 del nucleosoma i en alguns casos s'han descrit conseqüències en la regulació de la transcripció, tant en forma d'activació transcripcional com d'inactivació. Per exemple, la proteïna d'unió a metil-CpG MeCP2, pot desplaçar la H1 del DNA metilat i reprimir la transcripció en el promotor tardà (*late promoter*) d'adenovirus (Nan *et al.*, 1997). El mateix poden fer el receptor de glucocorticoides en el promotor del virus del tumor mamari de ratolí (MMTV) (Lee i Archer, 1998) i el factor d'unió UBF (*upstream binding factor*) en la seqüència potenciadora de r-DNA (Kermekchiev *et al.*, 1999), en ambdós casos donant lloc a una activació transcripcional. És molt destacable que el receptor de glucocorticoides només és capaç de desplaçar H1 fosforilada.

3.5. Modificacions post-traduccionals de la H1

3.5.1. Fosforilació

La histona H1 és modificada a nivell post-traduccional principalment per fosforilació reversible. Aquesta modificació varia al llarg del cicle cel·lular (Bradbury, 1992). S'han realitzat estudis per a examinar aquest fet amb varis organismes i tipus cel·lulars, com amb *Physarum polycephalum* (Mueller *et al.*, 1985), cèl·lules d'ovari d'hàmsster xinès (Gurley *et al.*, 1975, 1978) i també amb cultius cel·lulars de mamífer, que mostren que la fosforilació de la H1 és màxima en cèl·lules que es divideixen ràpidament i decreix en cèl·lules que no proliferen. Els nivells de fosforilació de la H1 són baixos en la fase G1 del cicle cel·lular i augmenten durant la fase S i la mitosi. Durant la mitosi la fosforilació de la histona H1 arriba al seu màxim en la metafase, quan els cromosomes es troben condensats al màxim, amb 22-24 fosfats per molècula d'histona H1 en el cas extrem de *Physarum polycephalum* (Mueller *et al.*, 1985), i després decreix de forma molt acusada (Ajiro *et al.*, 1981) (Veure la figura 16, pàgina 27).

Experiments amb línies cel·lulars mutants que presenten una fosforilació de la histona H1 disminuïda, mostren una condensació dels cromosomes menor (Matsumoto *et al.*, 1980; Yasuda *et al.*, 1981). En canvi, la hiperfosforilació de la H1 en una altra línia cel·lular dóna lloc a una condensació de la cromatina prematura (Ajiro *et al.*, 1983). Aquests resultats van donar lloc a la suposició que existeix una relació causal directa entre la fosforilació de la histona H1 i la condensació cromosòmica.

Amb la finalitat de determinar la importància de la fosforilació de la histona H1 per a la funció cromosòmica, s'han estudiat sistemes en els que la mitosi i la compactació cromosòmica es troben desacoblats (Roth i Allis, 1992). En aquest sentit, experiments amb *Tetrahymena*, protozou que presenta simultàniament dos nuclis diferents, ha permès concloure que la fosforilació de la histona H1 es relaciona inversament amb la condensació de la cromatina (Lin *et al.*, 1991). Un altre sistema en el que la fosforilació de les histones H1, en aquest cas la histona H5, es pot desacoblar de la mitosi és el desenvolupament de l'eritròcit nucleat de pollastre. Durant els últims estadis del desenvolupament de l'eritròcit de pollastre, el nucli es condensa en heterocromatina inactiva, fenomen degut en part a l'aparició de la histona H5. La histona H5 recentment sintetitzada es troba altament fosforilada, però quan la cromatina de l'eritrocit es condensa la histona H5 és quantitativament defosforilada. En aquest cas novament la defosforilació de la histona H1 es correlaciona amb la compactació de la cromatina (Aubert *et al.*, 1991). Aquesta relació entre aquests dos processos es ratifica encara en un altre experiment en el que el gen de la histona H5 va ser expressat en fibroblasts. Aquest subtipus d'histona H1 especialitzat no es troba normalment en aquestes cèl·lules. L'acumulació de la histona H5 en els fibroblasts va provocar la condensació de la cromatina i va inhibir el creixement cel·lular (Sun *et al.*, 1989). En aquestes circumstàncies la histona H5 no estava fosforilada. La introducció de la proteïna en cèl·lules transformades, en canvi, donava lloc a la fosforilació de la histona H5. En aquest cas la condensació nuclear no va tenir lloc i les cèl·lules van continuar creixent i dividint-se. Per tant, es podria concloure que la fosforilació de les histones H1 impedeix el plegament de la cromatina. L'espermatogènesi d'eriçó de mar és un altre exemple que està d'acord amb aquests resultats. En aquest cas, la defosforilació de la histona H1 específica d'esperma també es correlaciona amb la condensació de la cromatina (Green i Poccia, 1985). Després de la fertilització, la histona H1 d'esperma es fosforila al mateix temps que l'esperma del pronucli es decondensa.

En el cas excepcional de la mitosi la fosforilació de la histona H1 coincideix amb la condensació de la cromatina, però aquesta condensació podria ser deguda realment a la fosforilació paral·lela d'altres proteïnes no histones que regulin el procés. S'ha demostrat que la fosforilació de la histona H1 debilita la interacció dels seus dominis terminals amb el DNA, però de forma sorprenent aquests canvis influeixen més en la unió de la histona a la cromatina que en el DNA nu (Hill *et al.*, 1991). Potser la fosforilació de la histona H1 en la mitosi és requerida per a debilitar la interacció amb la cromatina i permetre que

factors en *trans* puguin accedir al DNA o a la fibra de cromatina i produir canvis en l'arquitectura cromosòmica. Per exemple, algunes d'aquestes proteïnes podrien ser les proteïnes SMC (*stability and maintenance of chromosomes*), com XCAP-C i XCAP-E, de les que ja hem parlat en un apartat anterior. De forma més general, s'ha proposat que la fosforilació de la H1 actuaria com un primer pas que provocaria una descondensació temporal de la cromatina, que permetria l'accés de factors específics d'unió al DNA durant els processos d'activació gènica, replicació del DNA o condensació dels cromosomes. Efectivament, s'ha relacionat també el procés de la replicació del DNA amb la fosforilació de la histona H1. Experiments *in vivo* amb mutants incapaçs de fosforilar la H1, mostren una replicació del DNA incompleta (Yasuda *et al.*, 1981). També s'han reconstruït minicromosomes amb histones H1 amb diferents graus de fosforilació i s'ha demostrat un efecte en l'estructura de la cromatina i en la replicació (Halmer i Gruss, 1996). S'ha demostrat que la histona H1 es troba altament fosforilada en línies cel·lulars transformades amb combinacions dels oncogens *ras*, *myc* i p53 mutant. La fosforilació de la H1 es correlaciona en aquest estudi amb la transformació cel·lular, però sembla independent del potencial metastàtic (Taylor *et al.*, 1995).

La proteïna quinasa principalment responsable de la fosforilació de la histona H1 durant el cicle cel·lular en eucariotes és la quinasa mitòtica principal (*major mitotic kinase*), també anomenada *cdc2*, *CDC28* o *MPF*, en dependència de l'organisme en el que s'ha descrit (Dunphy i Newport, 1988; Langan *et al.*, 1989). Durant la mitosi en eucariotes superiors, la quinasa mitòtica principal indueix els canvis estructurals requerits per a la divisió cel·lular, incloent la desestructuració de l'envoltori nuclear (membrana nuclear i làmina), la condensació de la cromatina i la construcció del fus mitòtic. Encara que la histona H1 esdevé hiperfosforilada en la mitosi, és clar que no és l'únic substrat de la quinasa mitòtica principal durant el cicle cel·lular. S'ha demostrat que la vesicularització de la membrana nuclear, la desestructuració de la làmina i la condensació cromosòmica són tots ells processos independents (Ohaviano i Gerace, 1985; Newport i Spann, 1987; Newport *et al.*, 1990). És molt possible que la fosforilació de les altres proteïnes de la fracció de la bastida nuclear, incloent Sc I (topoisomerasa II); Sc II (XCAP-C/E) i Sc III, pugui influir en el plegament de la cromatina i els cromosomes.

Els residus serina i treonina són els acceptors dels grups fosfat en les histones H1. La fosforilació es dona en les cues N- i C-terminals bàsiques de les histones H1 i, més concretament, en seqüències conservades del tipus K-(S/T)-P-X-K i K-(S/T)-P-K. Aquests motius són les seqüències consens de fosforilació per les quinases de la família

cdc (Langan *et al.*, 1989). En aquest sentit, s'ha parlat molt dels motius (S/T)-P-X-(K/R), presents amb certa freqüència en les cues carregades (Churchill i Travers, 1991). En canvi, el domini estructurat central de la histona H1 no és fosforilat (Langan, 1982). És de suposar que l'addició d'una càrrega negativa i la consegüent neutralització de la càrrega neta positiva de les cues dóna lloc a un debilitament de la interacció de la histona H1 amb el DNA internucleosomal.

Alguns resultats indiquen que els subtipus d'histona H1 de mamífer H1^o, H1a i H1c difereixen d'H1b, H1d i H1e en el seu nivell de fosforilació al llarg del cycle cel·lular. També s'han trobat diferències en els nivells de fosforilació màxima entre els mateixos subtipus de ratolí i de rata (Talaszi *et al.*, 1996). És molt interessant el fet que els nivells màxims de fosforilació per a cada subtipus sol coincidir amb el nombre de motius (S/T)-P-K-K que presenta.

3.5.2. ADP-ribosilació

A part de fosforilada, la histona H1 també pot ser ADP-ribosilada. La H1 és un dels millors substrats per la poli(ADP-ribosa) polimerasa (Poirier i Savard, 1980), la qual transfereix polímers d'ADP-ribosa a certes proteïnes de forma covalent i/o no covalent. La unió covalent dóna lloc a la presència de cadenes d'ADP-ribosa curtes, cadenes de 8 a 10 unitats en el cas de la H1 (D'Erme *et al.*, 1996). En canvi, la unió no covalent resulta en la transferència de polímers llargs i ramificats (de 100 a 200 unitats) a dominis específics de la proteïna (Panzeter *et al.*, 1992). Les unions no covalents són molt més fortes que el que s'esperaria d'una simple interacció electrostàtica, ja que són resistents a una gran varietat de condicions.

La presència de polímers d'ADP-ribosa en la histona H1 produeix un canvi de la càrrega total de la proteïna i és molt probable que afecti a les unions H1-DNA i H1-H1. S'ha observat per microscòpia electrònica que l'ADP-ribosilació de polinucleosomes *in vitro* produeix una relaxació de l'estructura de la cromatina (Poirier *et al.*, 1982). Tanmateix, aquesta modificació post-traduccional no produeix la desunió de la histona H1 de les regions internucleosomals (D'Erme *et al.*, 1996).

Evidències recents suggereixen que l'ADP-ribosilació *in vivo* pot estar implicada en el manteniment dels patrons de metilació en el DNA genòmic (Zardo *et al.*, 1998; De Capoa *et al.*, 1999), especialment mantenint l'estat no metilat de les illes CpG dels promotors de gens expressats constitutivament (Zardo i Caiafa, 1998). El mecanisme molecular que relaciona l'ADP ribosilació amb la metilació és desconegut.

3.6. Preferències de seqüència de la H1

És sabut que la unió de la histona H1 al DNA no és una unió específica i per tant limitada a certes seqüències. Malgrat això s'ha indicat una preferència *in vitro* per les seqüències riques en A+T (Laemmli *et al.*, 1992). Es coneix que les SAR (*scaffold associated regions*) actuen com a lloc d'unió preferencial per a la H1 *in vitro*. A més, donada l'elevada cooperativitat que presenta aquesta histona en unir-se al DNA (Rodríguez *et al.*, 1991), la unió preferencial a les SAR provoca la unió de molècules d'H1 addicionals al DNA no-SAR proper (Izaurralde *et al.*, 1989). Com ja hem comentat abans, les SAR són elements del DNA implicats en la delimitació estructural dels llaços de cromatina. Aquests llaços contenen de 50 a 100 Kb de DNA i poden ser vists com a subunitats estructurals i dinàmiques dels cromosomes. El mode i densitat d'empaquetament dels llaços pot ser alterat durant el cicle cel·lular i en relació a la funció genòmica. Pràcticament, les SARs són definides com a fragments de restricció que s'uneixen específicament al conjunt de proteïnes que formen la bastida nuclear o cromosòmica. Les SARs són seqüències de varis cents de parells de bases molt riques en A+T (>70%). S'han descrit alguns motius característics de les SAR: la seqüència consens de tall de la topoisomerasa II *in vitro* (Gasser i Laemmli, 1986a; Cockerill i Garrad, 1986), les caixes de A- i T- (Gasser i Laemmli, 1986b) i el motiu ATATTT (Cockerill i Garrad, 1986; Mielke *et al.*, 1990). Estudis de disseny de motius, identifiquen els compostos poli[dA]₁₁-poli[dT]₁₁ com les millors SARs artificials (Käs *et al.*, 1989; Adachi *et al.*, 1989). Efectivament, la histona H1 s'uneix preferencialment a aquests A-tracks, segons es desprèn d'experiments amb seqüències SAR sintètiques i distamicina A. Aquesta droga inhibeix la unió preferencial de la histona H1 al DNA que conté seqüències SAR, donant lloc a una redistribució de la H1 no selectiva entre DNA SAR i no SAR.

En el model que s'està perfilant (Laemmli *et al.*, 1992), la histona H1 i les topoisomerases són els dos candidats principals que poden servir com a proteïnes implicades en la topologia cromosòmica i en l'estructura en dominis de la cromatina, tot i que s'estan trobant altres proteïnes que s'uneixen a les SAR selectivament. Aquestes dues proteïnes semblen competir per unir-se al DNA SAR. La hipòtesi és que una unió regional i regulada de la H1 podria generar dominis potencialment actius, "oberts", o dominis no actius, "tancats" (Izaurralde *et al.*, 1989). S'ha proposat també l'existència d'anàlegs a la distamicina en la cèl·lula, batejats proteïnes D, que intervindrien en la regulació de la unió H1-DNA SAR. Segons aquest model, les SAR que flanquegen un

gen inhibirien o estimularien la seva transcripció depenent de la relació proteïna-D/H1. Estudis amb *Xenopus laevis* han demostrat que, en aquesta espècie, la transcripció dels gens ribosomals 5S de tipus oocític es troba directament regulada per la unió d'histones H1 a zones riques en A+T que flanquegen les múltiples còpies d'aquests gens (Tomaszewski i Jerzmanowski, 1997).

Per altra banda, s'ha descrit una baixa afinitat de la H1 per seqüències CpG (Käs *et al.*, 1989). En canvi, s'ha observat una especial afinitat de la H1 per illes CpG metilades (Jost i Hofsteenge, 1992). Com ja hem comentat, aquestes illes també són coneguts motius que influeixen en la regulació de l'expressió gènica, i veiem que també en aquest cas pot estar-hi implicada la histona H1, encara que no està gens clar de quina manera.

Tant per la H1^o com per altres subtipus de la H1, s'ha observat una distribució no homogènia en el nucli i en cromosomes metafàsics (Gorka *et al.*, 1993; Breneman *et al.*, 1993; Ponte *et al.*, 1994). En aquest fenomen també hi pot estar involucrada l'afinitat diferencial de la H1 per diferents seqüències de DNA.

3.7. L'estructura de la histona H1

La histona H1 està constituïda per tres dominis estructurals: una regió globular central d'uns 80 residus flanquejada per cues N- i C-terminalis hidrofíliques i bàsiques, d'uns 20 i 100 residus, respectivament (Bradbury *et al.*, 1975; Isenberg, 1979). S'estan acumulant múltiples evidències, tant per la H1 com per les histones internes, de que els dominis estructurals assumeixen diferents funcions estructurals en la cromatina.



Figura 21: Estructura en dominis de la histona H1.

3.7.1. El domini globular

El domini globular central 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 (Allan *et*

al., 1980; Buckle *et al.*, 1992). Aquest domini és el més conservat evolutivament, fins el punt de ser bàsicament idèntic entre alguns subtipus i entre espècies diferents (Ponte *et al.*, 1998). La seva estructura es coneix amb detall gràcies a estudis de ressonància magnètica nuclear de doble dimensió realitzats amb el domini globular de la H5 (GH5) d'eritròcit nucleat de pollastre (Cloure *et al.*, 1987) i amb la H1 (GH1), també de pollastre (Cerf *et al.*, 1993, 1994), i a estudis de difracció de raigs X del mateix domini de la H5 amb una resolució de 2,5 Å (Ramakrishnan *et al.*, 1993). El domini globular consta en tots els casos de tres hèlixs α i una fulla β antiparalela en l'extrem terminal carboxílic.

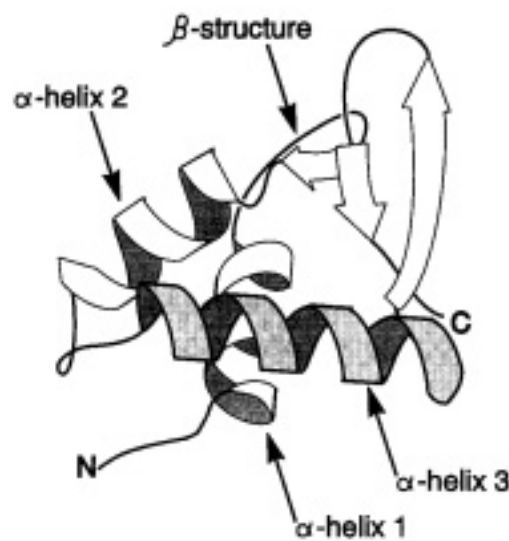


Figura 22: Estructura del domini globular de la histona H5. (Adaptat de Wolffe, 1998).

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. A partir d'aquesta similitud, s'ha proposat per analogia que el lloc principal d'unió al DNA és l'hèlix III, o hèlix de reconeixement, que s'uniria al solc major del DNA. El final de la fulla β de la H1 és flexible i s'ha proposat com a lloc secundari d'unió al DNA.

GH1 i GH5 presenten una identitat de seqüència d'aproximadament un 40% i molt poques diferències estructurals entre ells. Existeixen, però, diferències subtils d'estructura

i de potencial electrostàtic que principalment es troben localitzades en el llaç entre la segona i la tercera hèlix α (Cerf *et al.*, 1994), una regió que pot ser responsable de la diferent afinitat pel DNA d'aquests dos subtipus. Efectivament, el domini globular de la H5 aïllat, s'uneix més fortament al nucleosoma que el de la H1 (Thoma *et al.*, 1983).

El probable lloc principal d'unió al DNA inclou tres residus bàsics conservats (tres lisines per GH1 i dues lisines i una arginina per GH5), que es troben situats i amb les cadenes laterals orientades de la mateixa manera en els dos subtipus estudiats. Els dos primers residus bàsics formen part de l'hèlix III, que, en les proteïnes amb motiu hèlix-gir-hèlix, és l'hèlix que reconeix el DNA, fet que es pot observar en l'estructura resolta del co-cristall d'HNF-3 γ unit a DNA (Clark, K.L. *et al.*, 1993).

La fulla β sembla bastant flexible en els resultats de RMN per GH1 (per GH5 no es va determinar aquesta estructura secundària, probablement degut precisament a la seva flexibilitat). Els resultats de difracció de raigs-X per GH5, mostren dos monòmers asimètrics, idèntics en la seva conformació excepte en la posició d'aquesta fulla β . No és aquest el cas en l'estructura del cristall d'HNF-3 γ unit a DNA, en el que la fulla β presenta una posició molt definida. És probable, que aquesta regió del domini globular de la histona H1 només adopti una estructura ben definida en la presència de DNA.

La regió del llaç entre les hèlixs II i III és molt diferent entre GH1 i GH5. Precisament en aquesta regió també existeixen discrepàncies importants a nivell de la seqüència aminoacídica. GH5 conté dos residus bàsics en aquesta regió, mentre que GH1 només en presenta un. La lisina extra de GH5 no ha estat fins ara mai relacionada amb la unió al DNA, però s'ha observat que es troba lleugerament protegida enfront de modificació química en la presència del nucleosoma (Thomas i Wilson, 1986). Per tant, el llaç en qüestió en GH5 presenta una càrrega neta positiva major i es troba en una conformació diferent que en GH1. Si es realitza un modelat de la interacció amb el DNA per ambdós dominis a partir de l'estructura del complex HNF-3 γ /DNA, s'observa que el llaç de GH5 seguiria una de les cadenes de DNA, mentre que el llaç de GH1 quedaria una mica apartat del DNA. De ser cert aquest modelatge, aquesta podria ser la causa de la diferència en afinitat pel DNA entre GH1 i GH5.

Un detall curiós que s'aprecia en comparar els estudis realitzats amb GH1 i GH5, és la diferent estabilitat que presenten aquests dominis. Sembla que GH1 presenta una estabilitat molt limitada, característica que no comparteix amb GH5. Aquest fet es fa patent en que GH1 només adopta una estructura suficientment estable en unes condicions

de tampó molt específiques, que inclouen la presència d'ions sulfat (Cerf *et al.*, 1994), mentre que GH5 es pot estudiar amb detall utilitzant un tampó fosfat estàndard (Zarbock *et al.*, 1986, Clore *et al.*, 1987). També apunten en la mateixa direcció els resultats de NMR dels experiments d'intercanvi protó-deuteri: tots els protons amida de GH1 intercanvien en menys de mitja hora i la majoria dels protons amida de GH5 tarden més de 24 hores. Les implicacions biològiques d'aquesta diferència d'estabilitat són desconegudes, si és que realment en té alguna.

La comparació del potencial electrostàtic del domini globular de GH1 i GH5 és molt interessant, ja que la unió de la H1 al DNA involucra principalment interaccions electrostàtiques entre residus carregats positivament i els grups fosfat negatius del DNA, com ho demostra la ràpida dissociació de la H1 del DNA al augmentar la força iònica del medi (Kumar i Walker, 1980). En tots dos dominis s'observen tres punts de màxima concentració de càrrega positiva, que corresponen a agrupacions de residus bàsics. Només un d'aquests punts és totalment equivalent entre els dos subtipus, concretament l'agrupació de tres residus bàsics conservats del lloc principal d'unió a DNA. Els altres dos difereixen en la seva composició aminoacídica i lleugerament en la seva posició. Tanmateix, la diferència principal dels dos potencials electrostàtics resideix en una regió clarament negativa en el llaç entre les hèlix II i III de GH1, que no s'observa en GH5. En aquest llaç, GH1 presenta dos residus àcids, un aspàrtic i un glutàmic, conservats a més entre la majoria de les H1 (Crane-Robinson i Ptitsyn, 1989), que no existeixen en GH5. Aquest potencial negatiu podria crear una repulsió contra el DNA que debilitaria la força d'interacció de GH1.

3.7.2. Els dominis amino- i carboxiterminals

Els dominis terminals són formats per un alt percentatge de residus bàsics, especialment lisina. El domini C-terminal presenta al voltant d'un 40% de residus lisina i també bastants residus alanina (en alguns subtipus gairebé un 30%) i prolina. Per exemple, de 97 residus de què consta la H1^o de ratolí, 40 són lisina, 16 alanina, 12 prolina, 9 valina, 7 serina i 5 treonina. 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, efectivament, a estar isolats o formant doblats 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.

El domini N-terminal presenta dues regions diferents conservades en la majoria de subtipus coneguts (Böhm i Mitchell, 1985). La regió N-terminal no conté residus bàsics i té un marcat caràcter apolar, ja que està formada principalment de residus alanina i prolina. L'altra regió del domini N-terminal, adjacent al domini globular, és similar al domini C-terminal pel que respecte a la composició aminoacídica. Conté, en efecte, molts residus bàsics, especialment lisina.

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 (Felsenfeld, 1992). Efectivament, aquest domini possiblement contribueix a la torsió del DNA internucleosomal en el filament de 30 nm (Butler, 1984; Clark *et al.*, 1988). A més, resultats d'estudis de diroïsm circular demostren que la condensació del DNA per H1 en condicions de força iònica fisiològiques és deguda principalment al domini C-terminal (Morán *et al.*, 1985, 1989).

Els dominis terminals de les H1 són altament repetitius i, probablement, en la seva evolució han tingut lloc un bon nombre de duplicacions. S'han trobat varis motius que es repeteixen en els dominis terminals de les diferents H1 i s'ha postulat que alguns d'ells podrien constituir llocs d'unió al DNA. Un motiu que es repeteix amb freqüència en els dominis terminals de les H1, especialment en algunes d'invertebrats, és el (S/T)-P-(K/R)-(K/R), conegut com motiu SPKK (Suzuki, 1989). Aquest motiu ha estat extensament estudiat, demostrant-se que es tracta d'un motiu d'unió al DNA, concretament al solc estret, amb preferència per regions riques en A+T (Churchill i Suzuki, 1989) i DNA tipus SAR (Khadake, 1997b). També s'han realitzat estudis de RMN-2D que han establert que presenta una estructura tipus gir β o gir σ (Suzuki, 1993). L'estructura d'aquest motiu recorda la de la netropsina, fet que ha permès realitzar estudis comparatius per a deduir la seva forma d'unió al DNA.

Es considera que els dominis terminals en solució aquosa es troben totalment desestructurats, amb l'excepció d'una regió del C-terminal de la H1 d'esperma d'eriçó de mar (*Echinus esculentus*) que s'estructura parcialment en hèlix α (Hill *et al.*, 1989). Tanmateix, estudis de predicció d'estructura secundària i, sobretot, estudis de diroïsm circular, detecten un tant per cent apreciable d'estructura en hèlix en el domini C-terminal, en presència d'inductors d'estructura secundària com el 2,2,2-trifluoroetanol (TFE) i el NaClO₄ (Clark *et al.*, 1988; Hill *et al.*, 1989). Concretament, s'estima que un 29% del domini C-terminal de la H1 (barreja de varis subtipus) i un 39% del C-terminal

de la H5 es troben formant hèlix α en presència d'un 65% de TFE.

Donada la riquesa del domini C-terminal en residus prolina, residus disruptors de l'hèlix α que es troben de forma ben repartida per tot el domini, s'ha proposat un model de trams curts en estructura d'hèlix α limitats per prolines. D'aquesta manera, s'especula, 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.

A part dels estudis de dicroïsmes circulars esmentats amb el domini C-terminal sencer, s'han realitzat aproximacions mitjançant pèptids, sempre mitjançant dicroïsmes circulars i en algun cas FTIR (Wellman, 1996; Böhm i Creemers, 1993; Erard *et al.*, 1990; Creemers *et al.*, 1992; Khadake *et al.*, 1997a; Verdaguer *et al.*, 1993). En varis d'aquests pèptids s'ha observat inducció d'hèlix α per TFE i NaClO_4 , però en altres, aquesta inducció no s'ha pogut demostrar de forma clara, per exemple en pèptids corresponents a parts del domini N-terminal.

S'ha apuntat la possibilitat que el domini C-terminal adquireixi estructura en hèlix α , al menys parcialment, a l'unir-se al DNA. 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 dels estudis amb pèptids ja esmentats, s'ha intentat determinar, mitjançant dicroïsmes circulars 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 la H1 sencera i amb el domini C-terminal sencer (Morán *et al.*, 1985), es manté per tant en alguns d'aquests pèptids. En els casos en què no apareix l'espectre Ψ , només s'observa una molt lleugera variació dels espectres, molt probablement deguda a canvis en l'estructura del DNA.

Si existeixen molts dubtes sobre l'estructura i la funció del domini C-terminal, el nostre coneixement del domini N-terminal és encara molt menor. No es coneix si té capacitat d'estructurar-se, ni de quina manera. Es desconeix la funció de la seva regió apolar i no se sap a quina regió del DNA nucleosomal o internucleosomal s'uneix la regió bàsica, ni amb quina finalitat.