

50376
1981
240

50376
1981
240

Numéro d'ordre : 517

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

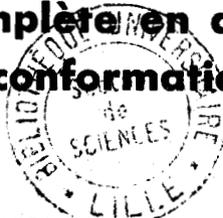
OPTION BIOCHIMIE

par

Gilbert BRIAND

HISTONE H 5 D'ERYTHROCYTE DE POULET

**Séquence complète en acides aminés
Etudes conformationnelles**



présentée le 11 Mai 1981 devant la Commission d'Examen

Président et rapporteur : Professeur J. MONTREUIL
Rapporteurs : Professeur G. BISERTE
Docteur M. CHAMPAGNE
Examineurs : Professeur J. DEMAILLE
Professeur G. SPIK
Docteur P. SAUTIERE

DOYENS HONORAIRES De l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M. MIGEON.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire

PROFESSEURS - 1ère Classe

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Génie Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie Organique Biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOBE Bernard	Sciences Economiques
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BOIVIN Jean-Claude	Chimie Minérale
M. BONNELLE Jean-Pierre	Catalyse
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. CHAPOTON Alain	Electronique

M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et Environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie Animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du Solide et Cristallographie
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la Réactivité Chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie Animale
M. DORMARD Serge	Sciences Economiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie Hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie Hertzienne
M. DUEE Gérard	Géologie
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des Cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie Structurale
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREVET Patrick	Sciences Economiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie Mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. HOUDART René	Physique Atomique et Moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et Statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie Hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie Hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Méthodologie
M. LEROY Yves	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences Economiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKÉ Bruno	Physique Moléculaire et Rayonnements Atmosphériques

M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M ^{le} MARQUET Simone	Probabilités
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et Biochimie Appliquées
M ^{me} N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
M ^{le} PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie Organique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PETIT Francis	Chimie Organique, Minérale et Analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. PORCHET Maurice	Biologie Animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie Structurale
M. RICHARD Alain	Biologie Animale
M. RIETSCH François	Physique des Polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SALAMA Pierre	Sciences Economiques
M ^{me} SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie Moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{le} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie Alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, Electrotechnique, Automatique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VERBERT André	Biochimie
M. VILETTE Michel	Résistance des Matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. WERNER Georges	Informatique Fondamentale Appliquée
M ^{me} ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

A ma femme,

A mes enfants,

A mes parents,

A mes beaux-parents,

A toute ma famille,

A mes amis.

Je tiens à exprimer, ici, toute ma gratitude à mes Juges :

Monsieur le Professeur G. BISERTE, vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir dans votre Institut et vous n'avez cessé de me témoigner la plus grande bienveillance. Je vous prie d'accepter le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux attachement.

Monsieur le Docteur P. SAUTIERE, dès mon entrée dans votre Laboratoire, j'ai trouvé auprès de vous compréhension, gentillesse et disponibilité constante. C'est vous qui avez guidé mes premiers pas dans la Recherche avec compétence et bienveillance. Vos conseils avisés et vos encouragements m'ont permis de mener à bien ce travail. Je vous en remercie vivement.

Mademoiselle le Docteur M. CHAMPAGNE, je suis très heureux de vous compter aujourd'hui parmi mes Juges. Votre grande compétence dans le domaine des histones me fait solliciter votre indulgence pour juger cette thèse. Je vous prie de trouver, ici, l'expression de mes sentiments de très vive gratitude.

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL, je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail et de présider le Jury de cette thèse. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Professeur J. DEMAILLE, vous m'avez fait l'honneur de vous intéresser à ce travail et de juger ce mémoire. Je vous en remercie et vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle le Professeur G. SPIK, je vous remercie très vivement d'avoir accepté de faire partie de mes Juges et vous prie de trouver, ici, l'expression de ma respectueuse gratitude.

Cette thèse est pour moi l'occasion de témoigner ma reconnaissance à Messieurs les Professeurs P. DEGAND et P. ROUSSEL pour la confiance qu'ils m'ont manifestée en m'accueillant parmi leurs assistants.

Je remercie Madame le Docteur M.H. LOUCHEUX pour son aide dans la détermination de la structure secondaire de l'histone H5 par la méthode de prédiction de structure de CHOU et FASMAN.

Les déterminations des sites antigéniques et des structures secondaire et tertiaire de l'histone H5 sont les fruits de collaborations. Aussi, mes remerciements s'adressent au Docteur A. MAZEN de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg, aux Docteurs C.V. MURA et J.M. NEELIN de l'Institut de Biochimie de l'Université CARLETON à Ottawa, au Docteur C. CRANE-ROBINSON du Laboratoire de Biophysique de Portsmouth.

Je remercie également Monsieur Daniel KMIECIK, Madame Danièle WOUTERS, Mademoiselle Arlette MARTINAGE et Madame Odile BORIE pour leur collaboration et leur aide dans la réalisation de ce travail.

Mes sentiments les plus amicaux s'adressent à toute l'équipe des Histones et particulièrement à Mesdames Denise BELAICHE, Marie-Joëlle DUPIRE, Anick LEMAIRE, Mesdemoiselles Thérèse ERNOUT et Annie HEMEZ, à Madame Odile HANNEDOUCHE, avec mes remerciements pour l'aide efficace qu'elles m'ont apportée, ainsi qu'à Madame Marie-Thérèse GARET pour les reproductions photographiques qui illustrent cette thèse.

Ce travail a été réalisé dans les laboratoires de l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur la Cellule Normale et Cancéreuse (U. 124 INSERM) et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur Gérard BISERTE) sous la direction de Monsieur Pierre SAUTIERE, Maître de Recherches au C.N.R.S.

Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :

- "Chicken erythrocyte histone H5 ; II Amino-acid sequence adjacent to the phenylalanine residue"

SAUTIERE, P., KMIĘCIK, D., LOY, O., BRIAND, G., BISERTE, G.,
GAREL, A. and CHAMPAGNE, M. (1975)

FEBS Lett. 50, 200-203.

- "Chicken erythrocyte histone H5 ; III Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues)

SAUTIERE, P., BRIAND, G., KMIĘCIK, D., LOY, O., BISERTE, G.,
GAREL, A. and CHAMPAGNE, M. (1976)

FEBS Lett. 63, 164-166.

- "Location of the globular region in Chicken erythrocyte histone H5"

CRANE-ROBINSON, C., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and CHAMPAGNE, M. (1977)

Biochim. Biophys. Acta 493, 283-292.

- "Chicken erythrocyte histone H5 ; IV Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence"

BRIAND, G., KMIĘCIK, D., SAUTIERE, P., WOUTERS, D., BORIE-LOY, O.,
BISERTE, G., MAZEN, A. and CHAMPAGNE, M. (1980)

FEBS Lett. 112, 147-151.

- "Distribution of antigenicity in Chicken erythrocyte histone H5"

MURA, C.V., MAZEN, A., NEELIN, J.M., BRIAND, G., SAUTIERE, P.
and CHAMPAGNE, M. (1980)

Eur. J. Biochem. 108, 613-620.

Ce travail a également été présenté sous forme de communications orales ou de posters.

- "Studies of the primary structure of histone H5"

International Symposium on the Chromatin.

Strasbourg, 6-7 avril 1974.

- "La séquence amino-terminale de l'histone H5"

Société de Chimie Biologique - Forum des Jeunes.

Montpellier, 5-6 et 7 septembre 1974.

- "Méthodes de détermination de la structure primaire des histones" (posters)

Colloque sur les méthodes physico-chimiques appliquées à la biologie.

Paris, 13-14 novembre 1975.

- "Sequence of the amino-terminal half of the Chicken erythrocyte histone H5"

Tenth International Congress of Biochemistry.

Hambourg, 25-31 juillet 1976.

- "Structure primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet"

Forum des Jeunes de la Société de Chimie Biologique.

Villeneuve d'Ascq, 27-29 juin 1978.

Nos recherches ont bénéficié des contrats suivants :

D.G.R.S.T. 72.7.0505 et 75.7.0187

I.N.S.E.R.M. 74.5.059.03 et 77.5.048.2

A.T.P. C.N.R.S. Chromatine 2875.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

AcOH	:	acide acétique
ADP-ribose	:	adénosine diphospho-ribose
ATZ	:	2 anilino-5-thiazolinone
CM-Cellulose	:	carboxyméthyl-cellulose
CNBr	:	bromure de cyanogène
DABITC	:	4-NN-diméthylaminoazobenzène 4'-isothiocyanate
DABTH	:	4-NN-diméthylaminoazobenzène 4'-thiohydantoïne
DABTZ	:	4-NN-diméthylaminoazobenzène 4'-thiazolinone
DC	:	dichroïsme circulaire
DEAE-cellulose	:	diéthylaminoéthyl-cellulose
DMAA	:	diméthylallylamine
DNA	:	acide désoxyribonucléique
DNS	:	dansylamino-acide (5-diméthylamino-naphtalene-1-sulfonylamino-acide)
HClO ₄	:	acide perchlorique
HFBA	:	acide heptafluorobutyrique
Protéines HMG	:	protéines non histones de mobilité électrophorétique élevée (high mobility group)

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

Protéines LMG : protéines non histones de faible mobilité électrophorétique (low mobility group)

NBS : N-bromosuccinimide

PITC : phénylisothiocyanate

PTC-peptide : phénylthiocarbamyl-peptide

PTH : phénylthiohydantoïne

RMN : résonance magnétique nucléaire

RNA : acide ribonucléique

SDS : sodium dodécyl sulfate

3-sulfo-PITC : 3-sulfo-phénylisothiocyanate

TCA : acide trichloracétique

TPCK : L-(1-tosylamido-2-phényl)éthyl chlorométhyl cétone

TABLE DES MATIERES

=====

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION : STRUCTURE DE LA CHROMATINE</u>	2
1 - PROTEINES NON HISTONES	2
2 - HISTONES	5
3 - CHROMATINE	13
4 - SUPERSTRUCTURE DE LA CHROMATINE	
ROLE DES HISTONES H1 et H5	21
<u>CHAPITRE I : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE L'HISTONE H5 DE POULET</u>	<u>31</u>
1 - PREPARATION DE L'HISTONE H5 D'ERYTHROCYTE DE POULET ..	34
1-1 Préparation de la chromatine	34
1-2 Extraction de l'histone H5 à partir de la chromatine	34
1-3 Purification de l'histone H5	34
2 - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HISTONE H5	36

<u>CHAPITRE II</u> : <u>ETUDE STRUCTURALE DE L'HISTONE H5</u>	40
1 - HISTORIQUE	45
2 - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU FRAGMENT PEPSIQUE COOH-TERMINAL (FRAGMENT Px) DE L'HISTONE H5	47
2-1 Hydrolyse de l'histone H5 par la pepsine et fractionnement de l'hydrolysate	47
2-2 Composition en acides aminés	49
3 - DETERMINATION DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU FRAGMENT Px	49
3-1 Stratégie adoptée	49
3-2 Méthodes utilisées	51
3-2-1 Hydrolyses enzymatiques du fragment Px...	51
a) Hydrolyses du fragment Px par la thermolysine	51
b) Hydrolyse du fragment Px par la tryp- sine après citraconylation	52
c) Hydrolyses du fragment Px par l'élas- tase	53
3-2-2 Fractionnement des hydrolysats	54
a) Chromatographie de gel-filtration	54
b) Chromatographie d'échange d'ions	54
3-2-3 Contrôle de pureté des fractions pepti- diques	55
3-2-4 Etude structurale des peptides	56
3-3 Résultats	56
3-3-1 Dégradation automatique de EDMAN du fragment Px	57
3-3-2 Etude des peptides obtenus par hydrolyse du fragment Px avec la thermolysine ...	57
3-3-3 Etude des peptides obtenus par hydrolyse du fragment Px de l'histone H5 par l'élastase	67

3-3-4 Hydrolyse du peptide Px par la trypsine après citraconylation	84
3-4 Séquence complète du fragment Px	88
4 - SEQUENCE COMPLETE DE L'HISTONE H5 ET DISCUSSION	89
CHAPITRE III : <u>STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE DE L'HISTONE H5</u>	
<u>SITES ANTIGENIQUES DE L'HISTONE H5</u>	97
1 - STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE DE L'HISTONE H5 ..	102
1-1 Résultats obtenus en résonance magnétique nucléaire (RMN) et dichroïsme circulaire (DC) sur les peptides acétiques	102
1-2 Prédiction de la structure secondaire d'après la méthode de CHOU et FASMAN	103
1-3 Discussion	104
2 - ETUDE DES SITES ANTIGENIQUES DE L'HISTONE H5	109
<u>CONCLUSIONS</u>	112
<u>APPENDICE TECHNIQUE</u>	116
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	133

I N T R O D U C T I O N

=====

STRUCTURE DE LA CHROMATINE

Dans les cellules des organismes supérieurs le maintien de la structure du matériel génétique et la régulation de l'activité des gènes à l'intérieur des chromosomes sont assurés par les protéines chromosomales - histones et protéines non histones - associées au DNA au sein d'un complexe appelé chromatine.

I - PROTEINES NON HISTONES

Ces protéines forment un groupe très hétérogène et sont en quantité plus ou moins importante en fonction de l'espèce animale ou végétale et de la nature du tissu.

A cause de leur tendance à s'agréger ou à former des complexes avec les histones et les acides nucléiques, il est difficile de les isoler.

BEKHOR et coll. (11) dissocient la chromatine en présence de NaCl 2 M et d'urée 5 M. A pH 8,0, la dissociation de la chromatine est presque complète et les protéines non histones, après extraction des histones en milieu acide, peuvent être séparées du DNA par des extractions salines (12) ou par fractionnement sur colonne de Biorex 70 (82), (14) ou DEAE Cellulose (82).

Les nombres entre parenthèses correspondent au classement alphabétique des publications de la bibliographie (page 133).

L'utilisation des gels de polyacrylamide en milieu SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (12), (47) a permis de montrer que leur nombre était supérieur à 100 et que leur masse variait de 5 000 à 150 000 daltons.

Ce groupe très hétérogène renferme des protéines de structure telles que les protéines de mobilité électrophorétique élevée ou protéines HMG (high mobility group), de l'actine, des phosphoprotéines et des enzymes tels que les DNA et RNA-polymérase, les histone-acétyl-transférases, les histone-méthylases, les histone-kinases.

Les protéines non histones extraites de la chromatine par NaCl 0,35 M peuvent être séparées suivant leur solubilité dans l'acide trichloracétique et leur migration en gel de polyacrylamide en deux groupes (59) :

- les protéines LMG (ou low mobility group), de masse moléculaire supérieure à 30 000 daltons ;
- les protéines HMG (ou high mobility group), de masse moléculaire inférieure à 30 000 daltons.

Sept protéines appartenant à ce groupe, HMG 1, HMG 2, HMG 14, HMG 17, HMG 18, HMG 19 et HMG 20, ont été isolées de la chromatine de thymus de Veau et caractérisées par JOHNS et ses collaborateurs (60), (163)*, (164)*.

On connaît actuellement les séquences complètes des protéines HMG 14 (145), HMG 17 (143) et les séquences partielles des protéines HMG 1 (144) et HMG 2 (146), (167)*.

La plupart des résidus basiques sont localisés dans la région NH₂-terminale de ces protéines où ils sont souvent associés en doublets (exemples : Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Lys, Arg-Arg).

La répartition asymétrique des résidus basiques est donc une caractéristique commune aux histones et aux protéines HMG. Il y a cependant une différence structurale fondamentale entre les deux classes de protéines qui est l'accumulation d'acides aminés dicarboxyliques dans la moitié COOH-terminale des protéines HMG.

* Voir additif bibliographique page 152.

Selon WALKER et coll. (147), les protéines HMG interviendraient plutôt dans le contrôle de la structure du DNA que dans celui de l'activité des gènes.

L'étude par dichroïsme circulaire et dénaturation thermique des interactions entre les protéines HMG 1 et HMG 2 avec le DNA (159) montre que chacune de ces protéines stabilise la structure du DNA. Elles couvrent par leur région basique respectivement 20 paires de bases de DNA et 25 paires de bases de DNA alors que leur région acide reste libre.

Par ailleurs, la protéine HMG 17 est peu structurée (structures secondaire et tertiaire) et se lie au DNA par sa région NH₂-terminale basique (résidus 5 à 40), comme l'ont montré les travaux de ABERCROMBIE et coll. (1).

Selon JAVAHERIAN et coll. (71), ces protéines pourraient éventuellement affecter certains processus tels que la transcription du DNA.

YU et SPRING (160) ont mis en évidence des interactions au niveau des protéines HMG 1 et HMG 2 avec des sous-fractions de l'histone H1 couplées de manière covalente à l'agarose.

Ces interactions s'accompagnent d'un changement de structure conformationnelle de la région hydrophobe de l'histone H1. Les mêmes auteurs ont également observé des interactions "fortes" entre les protéines HMG 1 ou HMG 2 et les histones H2B ou H3 couplées de manière covalente à l'agarose. Ces deux histones sont beaucoup plus hydrophobes que l'histone H1 : il semble donc que les régions hydrophobes de la structure primaire jouent un rôle primordial dans les interactions histone-protéine HMG.

2 - LES HISTONES

Les histones sont des protéines basiques au nombre de cinq dont la masse moléculaire est comprise entre 11 000 et 22 000 daltons, (tableau I, page 6).

Dans les histones le rapport acides aminés basiques/ acides aminés dicarboxyliques est compris entre 2,8 et 6,5. En fonction de leurs caractères de solubilité et de leur rapport lysine/arginine, les histones sont réparties en trois groupes :

- l'histone H1 très riche en résidus de lysine. Il s'agit en fait d'une famille de molécules protéiques étroitement apparentées (quatre à cinq sous-fractions suivant les espèces et les tissus). Toutefois, le testicule de Truite (89) et le sperme d'Oursin (128) ne renferment qu'un seul type moléculaire d'histone H1. A l'histone H1 est apparentée l'histone H5 spécifique des érythrocytes nucléés et que l'on trouve donc chez les Oiseaux, les Poissons, les Batraciens et les Reptiles ;

- l'histone H2B est légèrement riche en lysine ;

- les histones H2A, H3 et H4 sont riches en arginine.

Les histones ne contiennent pas de tryptophane et sont pauvres en acides aminés aromatiques et en acides aminés soufrés (cystéine et méthionine). En effet, seule l'histone H3 renferme de la cystéine (1 ou 2 résidus suivant les espèces). Toutefois, l'histone H4 des Echinodermes renferme un résidu de cystéine (154).

On connaît actuellement la séquence complète en acides aminés des histones H2A, H2B, H3, H4 dans plusieurs espèces (142).

Les séquences de l'histone H1 de testicule de Truite (89), de sperme d'Oursin (128) et de thymus de Lapin (sous-fraction 3) (73) ont été également déterminées.

CARACTERISATION DES HISTONES

Nomenclature	H1 (fraction 3 thymus de Lapin)	H5 (érythrocyte de Poulet)	H2B (thymus de Veau)	H2A (thymus de Veau)	H3 (thymus de Veau)	H4 (thymus de Veau)
Rapport Lys/Arg	15,2	2,23	2,5	1,16	0,72	0,78
Masse moléculaire	22 000	20 580	13 774	14 005	15 324	11 282
Nombre de résidus	212	189	125	129	135	102
NH ₂ -terminal	Ac-Ser	Thr Ac-Thr (15 %)	Pro	Ac-Ser	Ala	Ac-Ser
COOH-terminal	Lys	Lys	Lys	Lys	Ala	Gly
Caractéristiques structurales	<u>3 domaines</u>		<u>3 domaines</u>		<u>2 domaines</u>	
	1 domaine NH ₂ -terminal basique 1-39 1-21 1 domaine central hydrophobe 40-115 22-99 1 domaine COOH-terminal très basique 116-212 100-189	1 domaine NH ₂ -terminal très basique et variable 1-31 1-17 1 domaine central hydrophobe très conservé 32-107 18-118 1 courte séquence COOH-terminale basique et variable 108-125 119-129	1 domaine NH ₂ -terminal basique 1-27 1-20 1 domaine COOH-terminal hydrophobe 28-135 21-102			

TABEAU I



On connaît aussi les séquences des histones H5 d'Oie (YAGUCHI et coll.) (157) et de Poulet (BRIAND et coll.) (23).

La détermination de la structure primaire des histones H1 et H5 s'est révélée plus difficile que celle des autres histones à cause de leur taille moléculaire plus élevée (environ 200 résidus) et de l'accumulation de résidus basiques dans la partie COOH-terminale des molécules.

Les autres histones se caractérisent par contre, par une partie COOH-terminale hydrophobe alors que les résidus basiques souvent associés en "doublets ou triplets" prédominent dans la région NH₂-terminale.

Une caractéristique essentielle des histones H3 et H4 est que leurs séquences sont hautement conservées à travers l'évolution des espèces. C'est ainsi que le taux de mutation de l'histone H4 est de 0,06/100 résidus/100 millions d'années. Ce caractère hautement conservatif laisse supposer pour les histones H3 et H4 un rôle essentiel dans la structuration de la chromatine de toutes les cellules.

Par contre, les séquences des histones H2A et H2B sont plus variables. Leur taux de mutation est de 1,5/100 résidus/100 millions d'années. Les mutations sont généralement localisées dans les régions basiques de ces protéines.

Enfin, ce sont les histones H1 et H5 qui montrent le plus de variabilité.

L'histone H1 est la plus variable, à la fois en ce qui concerne le nombre de sous-fractions présentes dans un tissu et une espèce donnée et l'évolution de cette protéine. Son taux de mutation est de 4/100 résidus/100 millions d'années.

Entre l'histone H5 de Poulet (23) et celle de l'Oie (157) une variation de 15 % des résidus a été observée. Néanmoins, par rapport à d'autres classes de protéines, comme les cytochromes ou les globines, les

histones peuvent être considérées comme des protéines qui présentent une stabilité structurale remarquable.

Ce sont également des protéines qui subissent beaucoup de modifications post-synthétiques.

Quatre types de modifications ont été décrites : l'acétylation, la phosphorylation, la méthylation et la poly (ADP-ribosylation). On peut rattacher à ces modifications, la liaison covalente d'une molécule d'ubiquitine à l'histone H2A. L'histone H2A ainsi modifiée a d'ailleurs été dénommée protéine A24 (56).

- Acétylation

L'acétylation intervient soit au niveau du groupe α -aminé terminal des histones H1, H2A et H4 (et dans ce cas, elle est irréversible), soit au niveau du groupe ϵ -aminé des résidus de lysine localisés dans la région NH₂-terminale des histones H3, H4, H2A et H2B.

Bien que de nombreuses corrélations aient été faites entre l'acétylation et l'activité du gène, le rôle exact de l'acétylation au sein de la chromatine n'est pas encore bien connu. Il semblerait cependant, selon CHAHAL et coll. (27), que le rôle de l'acétylation "multiple" de H4 soit de déstabiliser la structure inactive de la chromatine en vue de la transcription. En ce qui concerne l'histone H3, son acétylation pourrait en quelque sorte "préparer le terrain" pour la phosphorylation de cette protéine (151).

D'autres auteurs ont noté que l'acétylation des histones conduit à accroître la sensibilité du DNA à l'action de la désoxyribonucléase I (141).

- Phosphorylation

Toutes les histones peuvent être phosphorylées. BRADBURY et coll. (17) ont étudié la phosphorylation de H1 chez *Physarum polycephalum*, durant le cycle mitotique. La phosphorylation se produit avant la mitose

lorsque la chromatine se condense. Ceci suggère que la phosphorylation pourrait intervenir dans le déclenchement de la mitose. Au terme d'études sur la phosphorylation des histones et l'organisation de la chromatine, GURLEY et coll. (64), (65) ont proposé que les différents niveaux d'organisation de la chromatine, dans des cellules CHO* synchronisées, pourraient être éventuellement corrélés avec différents types de phosphorylation des histones.

- Durant l'interphase, on observe une histone H1_I renfermant de 1 à 3 groupes phosphate. Les sites de phosphorylation sont uniquement des résidus de sérine situés dans la partie COOH-terminale de la molécule (résidus 73 à l'extrémité COOH-terminale). L'apparition de H1_I coïncide avec une réorganisation de la chromatine qui intervient avant que la cellule puisse se diviser.

- Durant la métaphase, toutes les molécules d'histones H1 sont "superphosphorylées" : on observe une histone H1_M renfermant 4 à 6 groupes phosphate. Les sites de phosphorylation sont aussi bien des résidus de sérine que des résidus de thréonine et sont situés dans les parties NH₂- et COOH-terminales de l'histone. Simultanément l'histone H3 est phosphorylée (H3_M). Dans les cellules CHO, les histones H1_M et H3_M sont strictement associées avec la structure condensée du chromosome.

- La phosphorylation de l'histone H2A intervient à toutes les phases du cycle cellulaire, et serait impliquée dans l'organisation de l'hétérochromatine. On désigne sous ce vocable des zones condensées de la chromatine dans lesquelles le DNA n'est pas transcrit.

- Méthylation

La méthylation des résidus de lysine a été seulement observée dans les histones H3 et H4, mais il est possible que des résidus d'histidine soient méthylés dans les histones H1 et H5 d'érythrocyte de

* Cellules CHO : cellules d'ovaires d'Hamster chinois.

Les 10 % d'histone H2A ainsi modifiée forment la protéine A24 qui a été identifiée parmi les composants protéiques des nucléosomes (24).

La détermination de la séquence en acides aminés des histones permet d'identifier les sites des modifications post-synthétiques. Elle rend également possible une approche de la conformation spatiale de ces protéines par des méthodes de prédiction de structure dont notamment la méthode de CHOU et FASMAN (34). On peut ainsi prévoir la localisation des acides aminés participant à chacun des types de structures : hélice α , feuillet β , coude β , structure désordonnée.

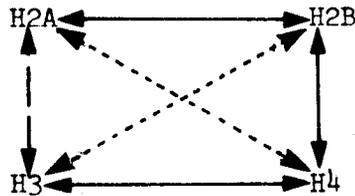
Les données, ainsi acquises par ces méthodes prédictives, viennent compléter celles que fournissent des méthodes physiques telles que la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire, le dichroïsme circulaire et la spectroscopie infra-rouge. Ces méthodes sont généralement appliquées à l'histone entière et aussi à ses fragments obtenus par coupure chimique ou enzymatique.

Il apparaît que les régions structurées sont localisées dans les segments apolaires des histones alors que les régions désordonnées sont dans les segments basiques.

Cette asymétrie de structure et d'organisation dans les histones conduit à penser que les interactions histone-histone et histone-protéine HMG se situent au niveau de ces régions structurées. Par contre, les segments basiques sont des sites privilégiés d'interaction avec le DNA.

Les interactions histone-histone se manifestent d'abord par la forte tendance qu'ont ces protéines à l'auto-agrégation lorsqu'on élève la force ionique du milieu : toutes les histones (sauf H1 et H5) s'agrègent. Cette tendance est plus forte pour l'histone H4 (LEWIS et coll.) (83) : $H4 > H3 > H2A > H2B$.

Les interactions histone-histone se manifestent surtout par la formation de complexes, H2A - H2B, H3 - H4, H2B - H4. D'ANNA et ISENBERG (39) ont étudié ces complexes par anisotropie de fluorescence, dichroïsme circulaire et diffusion de la lumière et déterminé les forces d'interaction. Ces résultats sont présentés dans le schéma suivant :



- complexe fort
- - - complexe de force intermédiaire
- complexe faible

Les travaux de THOMAS et KORNBERG (134) réalisés sur des complexes d'histones stabilisés par pontage avec le diméthylsubérimidate ont montré que les histones H3 et H4 sont capables de former un tétramère $(H3 - H4)_2$ alors que les histones H2A et H2B forment un dimère H2A - H2B. Il faut cependant considérer que ce type de pontage peut avoir un certain caractère artéfactuel.

BRADURY et ses collaborateurs (95), (13), (18) ont délimité par spectroscopie de RMN, les régions nécessaires aux interactions entre les différentes histones.

Ces travaux montrent que les interactions entre les histones H2A et H2B font respectivement intervenir au moins les régions 31 à 95 pour H2A et 32 à 114 pour H2B et que pour les histones H3 et H4 les régions 42 à 120 pour l'une et 38 à 102 pour l'autre sont importantes.

Récemment ces résultats ont été affinés par les travaux réalisés par M. COUPPEZ (résultats non publiés) dans notre laboratoire et qui montrent que les histones H2A et H2B interagissent respectivement par les régions 21 à 118 et 32 à 125.

SPIKER et ISENBERG (126) ont montré qu'un seul résidu peut intervenir dans la formation d'un tel complexe. La modification par oxydation (méthionine sulfoxyde ou méthionine sulfone) peut abolir l'interaction de H3 avec H2A alors que l'interaction de H3 avec H4 est seulement diminuée.

Enfin, l'obtention de groupes thiols, par réduction de l'histone H3, est nécessaire pour avoir une interaction avec l'histone H4.

3 - LA CHROMATINE

L'étude du chromosome par la méthode de la diffraction des rayons X, réalisée par WILKINS (153), en 1959, a montré que la chromatine possédait une structure répétitive.

Cette structure répétitive a été confirmée ensuite, par l'étude en microscopie électronique et l'analyse électrophorétique d'hydrolysats enzymatiques de la chromatine.

La première mise en évidence d'une unité de répétition a été fournie par l'hydrolyse enzymatique de la chromatine par une endonucléase capable de couper le DNA double brin (67), les fragments de DNA séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide sont constitués de 200 paires

de bases de DNA (ou d'un multiple de 200). Cette observation implique donc que la chromatine est accessible par l'endonucléase toutes les 200 paires de bases de DNA et qu'entre les sites de coupure, le DNA est éventuellement protégé par les histones.

Cette unité de répétition a par ailleurs été visualisée en microscopie électronique sous forme de structures globulaires appelées v-bodies (OLINS et coll.) (104), (106), nucléosomes (OUDET, GROSS-BELARD et CHAMBON) (107) ou P.S. particles (VAN HOLDE et coll.) (139), observées dans une chromatine soumise à l'action d'une nucléase isolée de la souche *Foggi* de *Staphylocoque doré*.

La longueur moyenne pour le DNA du nucléosome est d'environ 200 paires de bases de DNA. Cette longueur de DNA concerne la chromatine des mammifères. Mais on trouve par exemple, 140 paires de bases de DNA dans la chromatine d'un champignon *Aspergillus nidulans* et 241 paires de bases de DNA dans la chromatine de sperme d'Oursin (77).

Par une hydrolyse plus poussée avec une nucléase micrococcalle, il apparaît une particule plus stable facilement préparée et parfaitement définie : la "core particle". La "core particle" contient deux molécules de chacune des histones H3, H4, H2A, H2B pour 140* paires de bases de DNA (KORNBERG) (76).

Le nucléosome est donc constitué de la "core particle", d'une molécule d'histone H1 (ou H5), en association avec un DNA "linker" (ou DNA "spacer") de longueur assez variable.

Forme et taille du nucléosome

A l'aide de la microscopie électronique, LANGMORE et WOOLEY (79) ont décrit le nucléosome comme un disque de 135 Å de diamètre et 55 Å d'épaisseur. L'étude de la diffusion des neutrons par la chromatine (10), l'étude de la diffraction des rayons X par la "core particle" cristallisée (50) ont abouti à la définir comme un disque de 100 Å de diamètre et de 55 Å d'épaisseur.

* Dans les publications récentes, le nombre de paires de bases de DNA de la "core particle" maintenant admis est de 146.

FINCH et KLUG (50) ont donc proposé un modèle en super-hélice de 1 tour $3/4$ pour 140 paires de bases de DNA, (80 paires de bases de DNA par tour), de diamètre de 90 Å et d'un pas de 28 Å (figure 1, page 16).

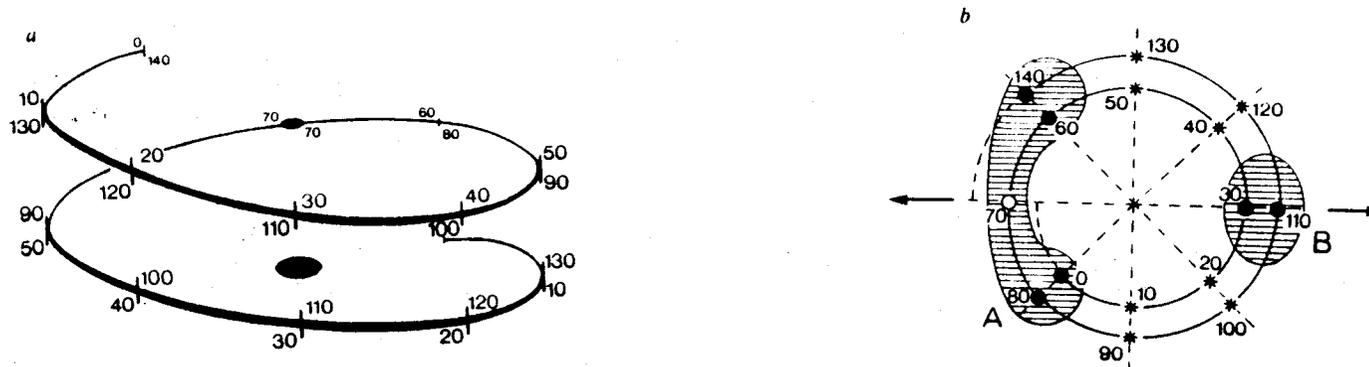
Le DNA est situé à l'extérieur de la "core particle"

Diverses endonucléases ont été utilisées pour déterminer la structure du DNA dans la "core particle" : nucléase micrococcale (7), (8), (119), (123), désoxyribonucléase I et II (3), (88), (99), (108), (124), (125), (150), endonucléase d'*Aspergillus oryzae* (150), streptodornase (100) et endonucléase de *Serratia marcescens* (111).

Ces enzymes, ayant des sites de coupure différents, donnent des fragments de DNA de 10 à 200 paires de bases de DNA démontrant l'accessibilité du DNA et donc sa position externe à la "core particle" (99).

Ceci a été confirmé par la méthode de diffusion des neutrons qui montrent que le DNA est enroulé autour d'un noyau constitué d'histones. En faisant varier le rapport D_2O/H_2O dans le milieu, BALDWIN et coll. (10) mesurent la diffusion des neutrons par les différents constituants de la chromatine (DNA ou protéines). Ils obtiennent alors des informations sur les dimensions respectives de ces molécules et leur position l'une par rapport à l'autre. Le rayon de giration du DNA mesuré de cette manière est beaucoup plus grand que celui des protéines : il apparaît donc que le DNA du nucléosome est enroulé autour d'un noyau constitué d'histones.

Un fait important des résultats de l'étude des hydrolyses enzymatiques est que les bandes observées en électrophorèse en gel de polyacrylamide sont d'intensité variable : cela suggère qu'il existe des régions du DNA qui sont plus ou moins facilement hydrolysées. Pour déterminer d'une façon plus précise l'accessibilité des différents sites de la désoxyribonucléase I, LUTTER (88) et SIMPSON et coll. (121) ont marqué par le ^{32}P l'extrémité 5' du DNA. De cette façon, il a été possible d'établir que les sites placés à 30, 60, 80 et 110 nucléotides de l'extrémité 5' sont relativement protégés du clivage par la désoxyribonucléase I.



- a. Représentation schématique de 1,75 tour de DNA en superhélice pour les 140 paires de bases de la "core particle". Les chiffres du dessus indiquent les distances en bases de DNA des sites de coupure à partir de l'extrémité 5' d'un des brins ; les chiffres du dessous se réfèrent à l'autre brin avec mise en évidence de l'axe de symétrie.
- b. Le 1,75 tour de DNA en superhélice est représenté en spirale pour montrer comment ce modèle rapproche les sites distants de 80 paires de bases de DNA et regroupe les sites de faible (ou moyenne) accessibilité à la désoxyribonucléase I dans les régions A et B diamétralement opposées.

Selon FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUSHTON, B., LEVITT, M. and KLUG, A. (1977).

Nature 269, 29-36.

figure 1



Le moyen le plus simple d'expliquer ces résultats est de supposer que les histones "verrouillent" les sites de clivage. Ce phénomène est parfaitement représenté dans le modèle de FINCH et KLUG (50). En effet, dans une super hélice comprenant 80 paires de bases de DNA par tour, 2 sites de clivage séparés par 80 paires de bases de DNA (exemple 30 et 110) se trouvent finalement très proches l'un de l'autre.

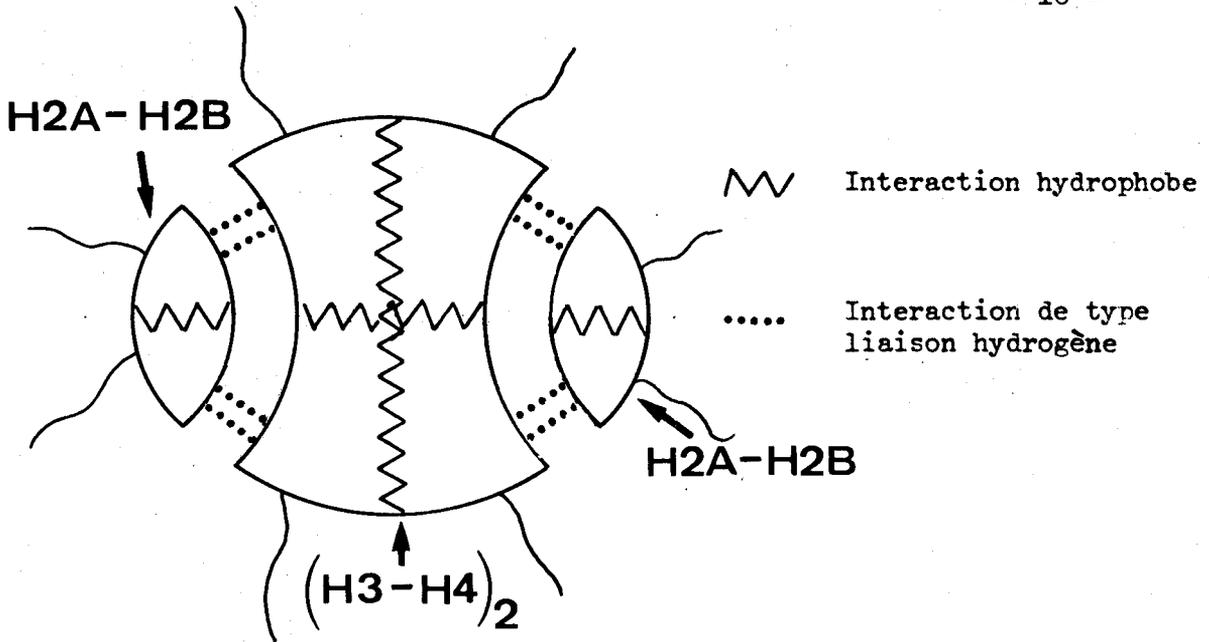
Organisation des histones dans le nucléosome

Le modèle le plus généralement admis est celui de l'octamère proposé par THOMAS et KORNBERG (134) qui ont utilisé le diméthylsubérimidate comme moyen de pontage entre les histones. EICKBUSH et MOUDRIANAKIS (46) ont proposé comme "coeur du nucléosome" le tétramère $(H3 - H4)_2$ lié par des liaisons de type hydrogène à 2 dimères H2A - H2B (figure 2, page 18).

Les histones H3 et H4 doivent jouer un rôle très important dans la structure de la "core particle". Il a été, en effet, prouvé que les histones H3 et H4 sont nécessaires (et suffisantes) pour former une structure "nucléosome-like". L'hydrolyse enzymatique du complexe par les endonucléases donne les mêmes résultats qu'avec les nucléosomes complets. Le rôle de H2A et H2B serait alors de stabiliser la structure du nucléosome.

Une approche pour déterminer la disposition des histones dans le nucléosome est l'hydrolyse enzymatique de la chromatine (ou des nucléosomes isolés) par une protéase, en particulier la trypsine. L'histone H3 apparaît alors comme la plus accessible à la protéase.

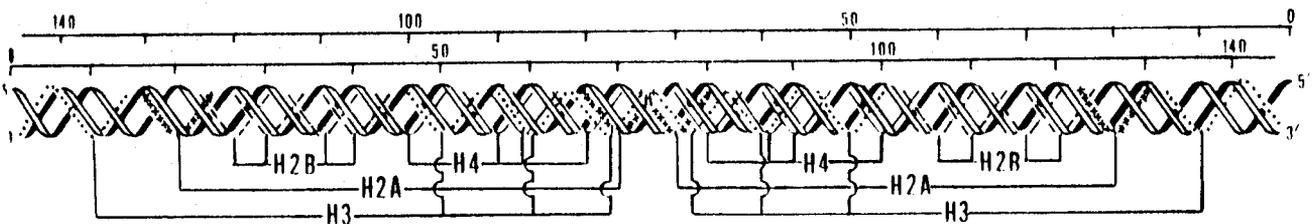
WEINTRAUB et VAN LENTE (148) ont montré que les zones NH_2 -terminales basiques, restées libres à la surface de l'octamère, peuvent être éliminées par hydrolyse tryptique de la chromatine qui conserve cependant la plupart de ses caractéristiques initiales. La "core particle" peut donc exister en l'absence de ces zones basiques des histones. Dans la chromatine, ces zones se lient-elles à leur propre "core particle" et/ou au DNA "linker" en association avec l'histone H1 ou encore à un autre nucléosome ?



Représentation schématique des interactions histone-histone dans la "core particle".

selon EICKBUSH, T.E. et MOUDRIANAKIS, E.M. (1978)
Biochemistry 23, 4955-4964.

figure 2



Modèle linéaire de la "core particle"
d'après MIRZABEKOV et Coll. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4184-4188.



Dans ce modèle, l'ordre linéaire des histones le long de la chaîne de DNA est le suivant : H2A - H2B - H4 - H3 - H3 - H4 - H2B - H2A.

figure 3

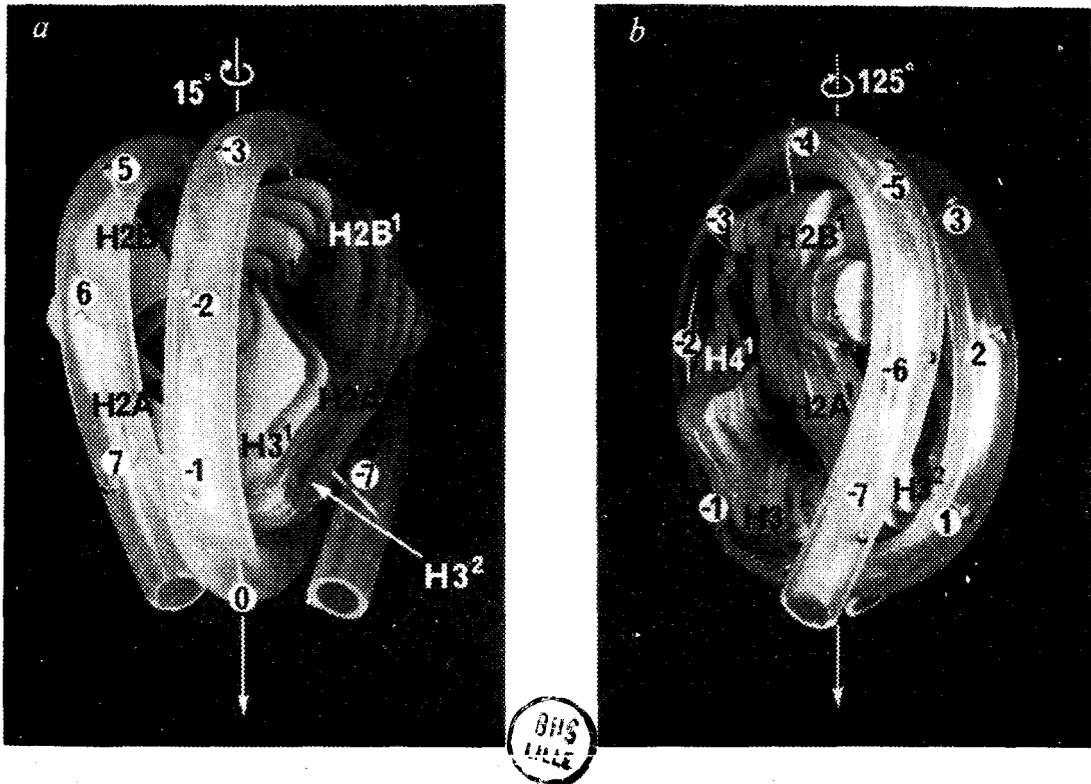
Des méthodes de "pontage" entre histones et DNA ont été étudiées dans le but d'établir la séquence des histones le long du DNA du nucléosome. MIRZABEKOV et coll. (93) ont décrit une méthode de pontage entre la lysine et le DNA et proposé une carte complète de la séquence des histones le long du DNA (figure 3, page 18). Cette technique consiste à lier les histones par le groupe ϵ -aminé des résidus de lysine au DNA partiellement dépuriné, puis à couper le DNA au niveau de la liaison créée afin de déterminer la distance de liaison obtenue par rapport à l'extrémité 5' de l'acide nucléique.

Les résultats obtenus montrent que les histones sont placées sur plusieurs séquences de DNA d'environ 10 nucléotides, adjacents ou séparés par des intervalles de $(10)_n$ nucléotides dépourvus d'histones correspondant vraisemblablement à des sites très accessibles par les nucléases.

A partir d'observations réalisées en microscopie électronique à 22 Å de résolution sur des structures tubulaires* d'histones $(H3)_2 (H4)_2 (H2A)_2 (H2B)_2$, KLUG et coll. (75) ont montré que cet octamère avait un double axe de symétrie et que sa forme globale était celle d'une "bobine hélicoïdale gauche", autour de laquelle peuvent s'enrouler environ deux tours d'une superhélice de DNA dans le nucléosome (figure 4, page 20).

En associant les données fournies par la microscopie électronique aux résultats obtenus par THOMAS et KORNBERG (134), MARTINSON et coll. (91), (92) et MIRZABEKOV et coll. (93) au terme d'expériences de pontage avec différents agents, KLUG et coll. (75) proposent une disposition des histones dans l'octamère où l'ordre linéaire des histones serait le suivant : H2A - H2B - H4 - H3 - H3 - H4 - H2B - H2A (figure 3, page 18).

*Ces structures tubulaires sont obtenues en traitant une solution d'octamère dans 2 M NaCl, 100 mM Tris - HCl pH 7,0 par du sulfate d'ammonium à une saturation supérieure à 40 % et à +4°C.



Octamère d'histones autour duquel sont enroulés deux tours de superhélice de DNA. Les intervalles de dix paires de bases de DNA sont indiqués par des chiffres de -7 à +7 en prenant l'axe de dyade comme origine. Les 14 intervalles ainsi définis correspondent aux 146 paires de bases de DNA de la "core particle". La position des chiffres correspond approximativement aux sites de coupure par la désoxyribonucléase I.

- a. Vue du modèle avec une rotation de 15° de l'axe de dyade
- b. Vue du modèle avec une rotation de 125° de l'axe de dyade.

Selon KLUG, A., RHODES, D., SMITH, J., FINCH, J.T. et THOMAS, J.O., (1980)

Nature 287, 509-516.

figure 4

Dans le modèle proposé par KLUG et coll., le tétramère $(H3)_2 (H4)_2$ qui a la forme d'un disque de 27 Å d'épaisseur jouerait un rôle fondamental en contraignant 80 paires de bases de DNA à former un tour de superhélice autour de lui.

On présume que ce tétramère peut se lier également mais de façon plus lâche aux 80 autres paires de bases de DNA. Au cours de l'assemblage du chromosome (166 paires de bases de DNA et un octamère d'histones) les dimères de H2A - H2B viennent s'associer à cette particule primaire en la stabilisant par des liaisons fortes avec les 80 paires de bases de DNA liées primitivement de façon lâche au tétramère.

Enfin, d'après LASKEY et EARNSHAW (80), deux protéines, la DNA topoisomérase I et la nucléoplasmine, pourraient faciliter l'assemblage du nucléosome.

4 - SUPERSTRUCTURE DE LA CHROMATINE. ROLE DES HISTONES H1 et H5

L'aspect en "collier de perles" observé en microscopie électronique par OLINS et OLINS (104), (106) et par OUDET, GROSS-BELLARD et CHAMBON (107) était obtenu à partir de la chromatine après extraction de l'histone H1.

La chromatine sans l'histone H1 peut se condenser en augmentant la force ionique, mais elle est moins dense et de structure moins bien définie que la chromatine intacte (132), (133).

Des polynucléosomes, contenant donc l'histone H1, obtenus par une brève hydrolyse de la chromatine par les endonucléases montrent une chaîne formée d'unités jointives de 100 Å de diamètre et appelée "nucléofilament" par FINCH et KLUG (49).

Ces différents résultats laissent donc prévoir un rôle particulier de l'histone H1 dans la chromatine. Puisque l'histone H5 remplace partiellement l'histone H1 durant l'érythropoïèse, il est vraisemblable que cette histone peut interagir avec la chromatine d'une façon similaire.

Dans le nucléosome, les histones H1 et H5 sont situées en position externe

Les études par la méthode de diffusion des neutrons qui montrent une réduction du rayon de giration de la chromatine après extraction de H1, suggèrent que l'histone H1 est à l'extérieur des unités globulaires (10). Cette situation externe permet d'expliquer que, les histones H1 et H5 se dissocient plus facilement de la chromatine.

Les histones H1 et H5 sont extraites de la chromatine à force ionique 0,6 alors que les autres histones sont extraites à force ionique supérieure à 0,7 (152), (103). Par ailleurs, l'hydrolyse plus rapide des histones H1 et H5 par la trypsine suppose une accessibilité plus grande de ces histones par rapport aux histones de la "core particle" (107), (148), (33).

Les histones H1 et H5 sont situées sur le DNA "linker" à proximité de l'octamère (H2A - H2B) (H3 - H4)₂ (H2A - H2B)

Par hydrolyse ménagée de la chromatine d'érythrocyte de Poulet, SIMPSON (122) obtient une particule qu'il appelle "chromatosome" contenant l'octamère d'histones, l'histone H1 ou H5 et environ 160 paires de bases de DNA. Une hydrolyse plus poussée réduit le chromatosome en "core particle" (octamère d'histones plus 140 paires de bases de DNA) par élimination de l'histone H1 ou H5 et de 20 paires de bases de DNA.

SIMPSON montre que les histones H1 et H5 interagissent par leurs séquences basiques NH₂-terminale (20 résidus) et COOH-terminale (100 résidus) avec les 20 paires de bases de DNA supplémentaires.

Dans le chromatosome, les 160 paires de bases de DNA permettent la formation de deux tours complets de superhélice de DNA autour de l'octamère d'histones (SIMPSON) (122), alors que dans la "core particle", les 140 paires de bases de DNA forment un tour trois quarts de superhélice de DNA autour de l'octamère d'histones (FINCH et KLUG) (50).

Des travaux récents de ALLAN et coll. (2) montrent que le domaine globulaire (résidus 22 à 100) de l'histone H5 ou de l'histone H1 (résidus 36 à 121) a la forme d'une sphère d'un diamètre de 29 Å. Le diamètre de ce domaine globulaire est par conséquent très proche du pas de l'hélice du DNA qui entoure le chromatosome. ALLAN et coll. (2) ont donc proposé un modèle (figure 5, page 24) de chromatosome dans lequel l'histone H1 ou l'histone H5 "verrouille" la superhélice de DNA autour de l'octamère d'histones.

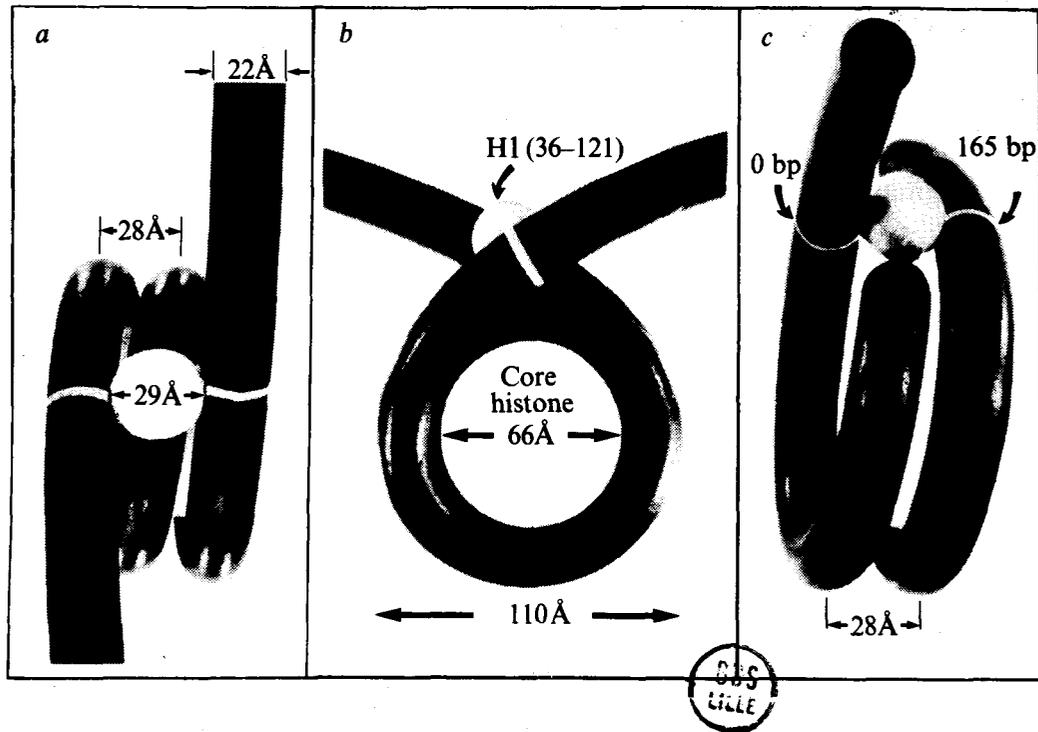
Selon THOMA et coll. (133), les 200 paires de bases de DNA qui représentent la longueur moyenne du DNA dans le nucléosome pourraient se répartir de la manière suivante :

- une longueur invariable de 166 paires de bases de DNA pour le DNA d'un nucléosome "minimum", qui est l'équivalent du chromatosome de SIMPSON (122) décrit plus haut.

- une longueur variable de DNA "linker" d'environ 34 paires de bases de DNA.

La "core particle" contient alors 146 paires de bases de DNA pour deux molécules de chacune des histones H2A, H2B, H3, H4.

Selon plusieurs auteurs, l'élimination de l'histone H1 (ou H5) expose 30 à 50 paires de bases de DNA à l'hydrolyse par la nucléase micrococcalle (140), (149). En effet, la vitesse d'hydrolyse du DNA



Modèle proposé pour la localisation du domaine globulaire de l'histone H1 (ou de l'histone H5) dans le chromatosome.

D'après J. ALLAN, P.G. HARTMAN, C. CRANE-ROBINSON
et F.X. AVILES (1980).

Nature 288, 675-679

* b.p. : paire de bases de DNA

figure 5

"linker" par cette nucléase est augmentée d'environ 8 fois lorsque le nucléosome ne contient plus d'histone H1 (ou H5).

Les histones H1 et H5 stabilisent le DNA "linker" et le DNA de la "core particle"

COWMAN et FASMAN (36) ont étudié, par dichroïsme circulaire et dénaturation thermique, l'effet stabilisant des histones H1 et H5 sur le DNA. Les températures de fusion correspondant au DNA "linker" et au DNA de la "core particle" sont plus élevées en présence des histones H1 et H5.

L'extraction de l'histone H1 ou de l'histone H5 par traitement des mononucléosomes avec NaCl 0,6 M conduit à une destabilisation et à une altération structurale d'une partie du DNA de la "core particle".

La conclusion importante de ces travaux est que les histones H1 et H5 stabilisent le DNA "linker" et 30 paires de bases de DNA de la "core particle".

Les résultats obtenus par THOMA et KOLLER (133) confirment cette action stabilisante des histones H1 et H5 sur le DNA "linker".

Les histones H1 et H5 interagissent-elles avec les histones de la "core particle" ?

Des études très récentes montrent que le nucléosome renferme une molécule d'histone H1 ou H5 (133), (49), (36).

Selon BONNER et STEDMAN (15) et BOULIKAS et coll. (16) la partie globulaire de l'histone H1 pourrait interagir avec les histones

de la "core particle". En faisant agir par exemple des carbodiimides hydro-solubles sur des noyaux isolés d'érythrocyte de Poulet et des cellules leucémiques de Souris, BONNER et STEDMAN (15) ont pu établir un pontage entre l'histone H1 et l'histone H2A, de même qu'entre l'histone H1 et la protéine A24.

Des expériences de pontage similaire ont été réalisées par BOULIKAS et coll. (16) qui utilisent des noyaux intacts, de la chromatine ou des mononucléosomes. Ces auteurs ont notamment obtenu un dimère H1 - H2A dans lequel la région (74 - 106) de l'histone H1 est liée à la région COOH-terminale de l'histone H2A (résidus 58 à 129).

Cependant, la position de H1 ou H5 à proximité de H2A implique-t-elle nécessairement des interactions ? Pour BONNER et STEDMAN l'interaction observée par pontage entre les histones H1 et H2A n'est pas forcément due à des interactions entre ces deux histones mais peut-être à leur proximité dans le nucléosome (15).

Les histones H1 et H5 sont nécessaires à la formation de super-structures de la chromatine

L'empaquetage du DNA dans les chromosomes est obtenu par la formation de nucléosomes puis par un arrangement de ces nucléosomes dans des structures d'ordre supérieur.

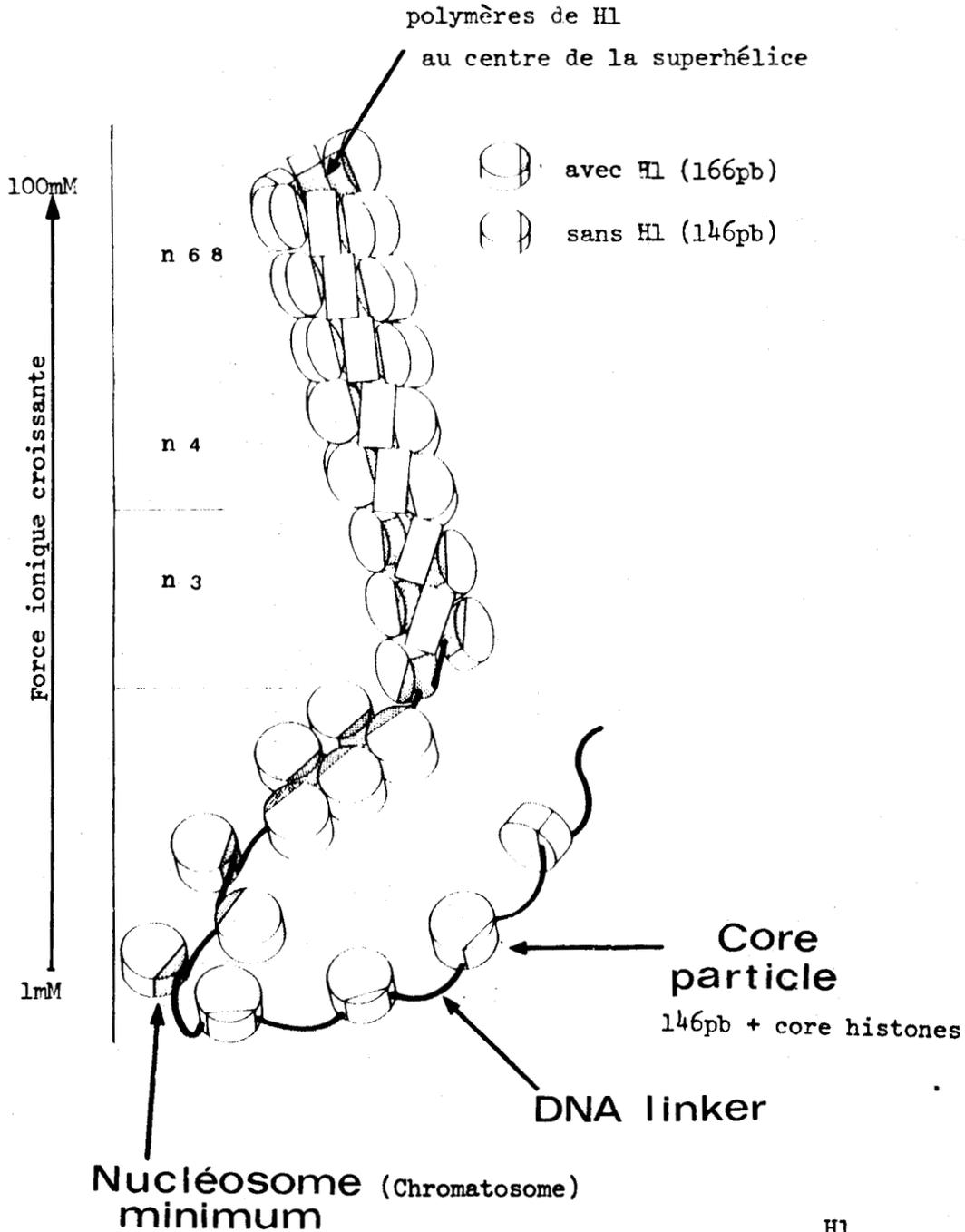
A partir d'observations en microscopie électronique, un certain nombre de modèles ont été proposés depuis 1975. Nous ne parlerons ici que du modèle de THOMA et coll. (133) proposé en 1979 qui concorde étroitement avec les résultats obtenus par des méthodes physico-chimiques.

La chromatine avec H1 puis sans H1 est observée en microscopie électronique après pontage des nucléosomes entre eux par le glycéraldéhyde (figure 6, page 27).

A très faible force ionique la chromatine montre un filament nucléosomique dans lequel les nucléosomes sont bien séparés.

SUPERSTRUCTURES HELICOIDALES DE LA CHROMATINE

Selon THOMA et coll. (1979) J. Cell. Biology 83, 403-407



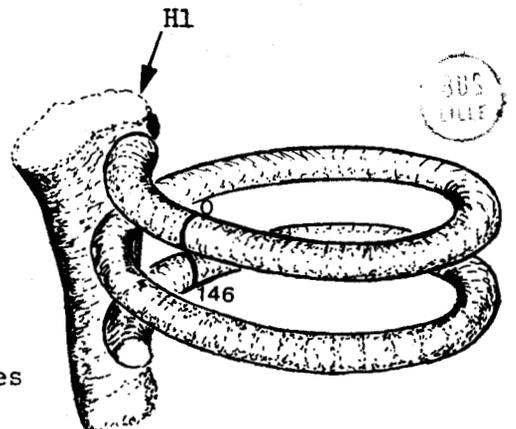
166 pb + core histones + H1

pb : paire de bases de DNA

n : nombre de nucléosomes par tour de spire

Le nombre 146 correspond au nombre de paires de bases de la "core particle"

figure 6



En augmentant la force ionique, le filament se structure légèrement sous forme de fibres avec des nucléosomes rangés en "zig-zag" : le DNA "internucléosomique" n'est plus visible. Les nucléosomes se touchent et sont pontés certainement par l'intermédiaire de l'histone H1, près de l'endroit où entre et sort le DNA du nucléosome.

Cette structure plane de nucléosomes disposés en "zig-zag" se modifie progressivement lorsqu'on augmente la force ionique jusqu'à 100 mM. La chromatine s'organise en une fibre de structure hélicoïdale, avec un pas constant de 100 Å et un diamètre variant de 200 à 300 Å. Les changements morphologiques observés lorsque la force ionique augmente, sont expliqués par une augmentation du nombre de nucléosomes par tour.

Selon CHAHAL et coll. (27), il est vraisemblable que des interactions internucléosomales des régions NH₂-terminales basiques des histones de l'octamère soient impliquées dans la formation de la fibre de 300 Å (figure 7, page 29). Dans ce cas l'acétylation, et plus particulièrement l'hyperacétylation de ces régions NH₂-terminales, destabiliserait la fibre de 300 Å et conduirait à une formation plus étendue. Inversement la phosphorylation de H1 est probablement impliquée dans l'empaquetage des fibres de 300 Å dans un ordre plus élevé de structure.

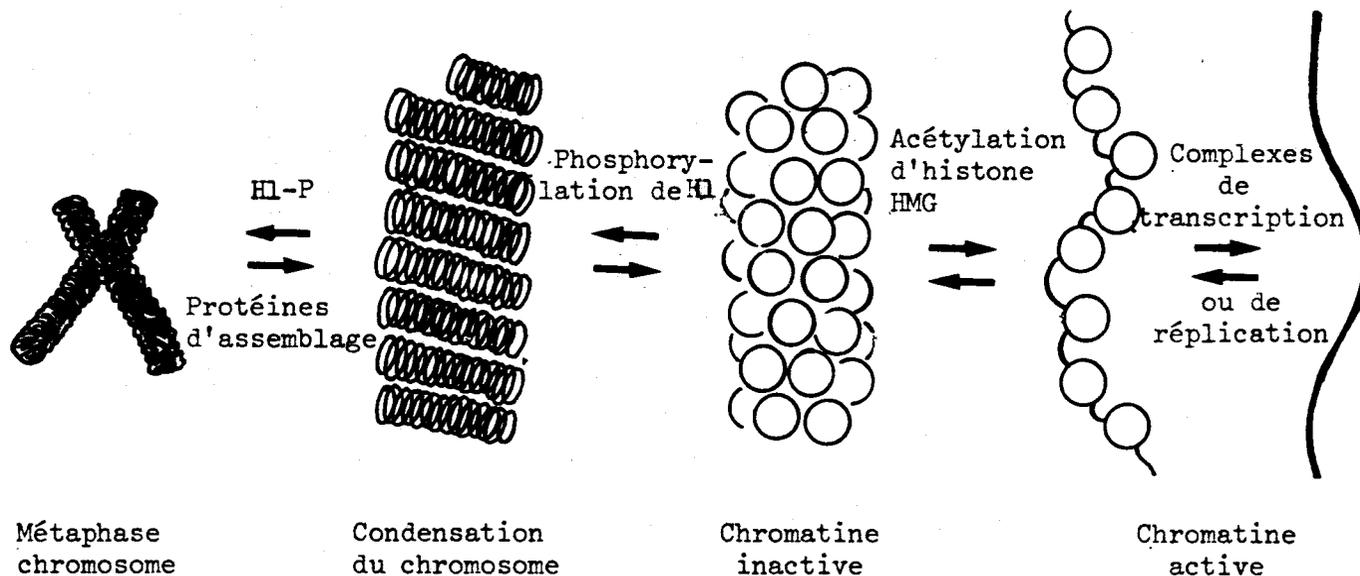
L'hypothèse de CHAHAL s'accorde parfaitement avec le modèle proposé par THOMA et coll. (133) et fait ressortir l'importance des modifications post-synthétiques des histones.

Dans cette structure d'ordre supérieur, l'histone H1 (ou l'histone H5) se trouverait placée dans la lumière du solénoïde. Cette hypothèse est confirmée par des études immunologiques (130).

L'anticorps anti-histone H1 se lie moins à la chromatine à force ionique élevée qu'à force ionique faible, cela suppose donc que l'histone H1 est située à l'intérieur du solénoïde.

Des homopolymères de l'histone H1 (ou de l'histone H5) pourraient se former au centre de cette structure. Ceci a déjà été observé,

MODELE REPRESENTANT LES TRANSITIONS STRUCTURALES MAJEURES DE LA CHROMATINE



Ce modèle montre, de la droite vers la gauche, l'organisation progressive de la fibre chromatinienne en des structures d'ordre supérieur qui aboutissent à la condensation du chromosome métaphasique. On notera l'influence de la phosphorylation de H1 dans la condensation du chromosome et l'acétylation de H4 dans le passage de la chromatine inactive en la chromatine active.

Selon CHAHAL, S.S., MATTHEWS, H.R. et BRADBURY, E.M. (1980).

Nature 287, 76-79.

figure 7



en milieu de force ionique élevée après traitement des noyaux d'érythrocyte de Poulet (105) ou de la chromatine de thymus de Veau (28) par un agent de pontage comme le glutaraldéhyde.

La présence des protéines HMG dans le nucléosome étant maintenant démontrée (9), (40), (61), le centre du solénoïde pourrait être le siège d'interactions entre ces protéines et les histones H1 ou H5 d'une part et les histones de la "core particle" d'autre part.

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET CARACTERISATION
DE L'HISTONE H5
D'ERYTHROCYTE DE POULET

L'histone H5 existe seulement dans les érythrocytes nucléés des Oiseaux, des Batraciens, des Reptiles et des Poissons. La présence de H5 est limitée aux réticulocytes et aux érythrocytes matures et n'existe dans aucun autre tissu.

Durant l'érythropoïese aviaire, la synthèse du DNA se produit dans les érythroblastes en division tandis que les réticulocytes et les érythrocytes matures ne se divisent pas et ne synthétisent pas de DNA. D'une façon parallèle, l'histone H5 est synthétisée et remplace progressivement et partiellement l'histone H1.

L'inactivité relative de l'érythrocyte n'est pas due à un manque d'enzymes, car il y a un fort pourcentage de RNA polymérase DNA dépendante dans les érythrocytes matures (115), (116), (137). L'addition de RNA polymérase exogène n'augmente pas l'activité transcriptionnelle de l'érythrocyte, par contre si l'histone H5 est éliminée *in vitro*, cette activité augmente (117), (118). Ces observations suggèrent un rôle de l'histone H5 dans l'inactivation du gène et la condensation de la chromatine.

APPELS et coll. (4) et MOSS et coll. (94) ont montré que l'histone H5 est présente, bien qu'en faible quantité, dans l'érythroblaste. Cette observation semble donc en contradiction avec une simple relation entre la biosynthèse de l'histone H5 et l'inactivation du gène.

L'histone H5, nouvellement synthétisée, subit une phosphorylation progressive. En effet, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide d'histone H5 isolée d'érythroblastes montre une hétérogénéité de cette protéine due à la phosphorylation (129). Cette réaction de phosphorylation pourrait donc moduler les interactions de l'histone H5 avec le DNA, de telle sorte que dans l'état hautement phosphorylé, les "fortes" interactions diminuent, permettant ainsi l'établissement d'interactions plus faibles mais cependant spécifiques (129).

Ensuite, durant la deuxième étape du processus de maturation, l'histone H5, qui est séquentiellement déphosphorylée, retrouve ses possibilités d'interagir fortement avec le DNA et donc de bien contrôler la condensation de la chromatine de l'érythrocyte mature.

Si les histones H1 et H5 ont sensiblement le même effet stabilisant sur le DNA, des études thermodynamiques ont montré que l'histone H5 a une plus forte affinité pour le DNA que l'histone H1 (70), (135). L'histone H5 joue donc certainement un rôle important dans la condensation de la chromatine de l'érythrocyte nucléé qui, par son caractère particulier, apparaît comme un bon modèle d'étude des problèmes de différenciation cellulaire et de régulation du gène.

L'étroite spécificité tissulaire et le rôle particulier de l'histone H5 ont particulièrement motivé la détermination de sa structure primaire que nous avons réalisée et qui a été initiée par Mademoiselle CHAMPAGNE (52) à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg et par K. MURRAY à Edimbourg (63).

Nous connaissons donc maintenant, dans ce modèle unique qu'est la chromatine d'érythrocyte de Poulet, la séquence complète en acides aminés des histones H5 (BRIAND et coll.) (23), H2A (LAINE et coll.) (78), H3 (BRANDT et coll.) (19), (20) et H4 (WOUTERS-TYROU et coll.) (156) et la séquence partielle de l'histone H2B (VAN HELDEN et coll.) (138).

Il reste encore à établir la structure primaire de l'histone H1 dont l'étude est en cours dans notre laboratoire.

Enfin, il est utile de rappeler ici que la séquence complète de la protéine HMG17 (165)* et la séquence partielle de la protéine HMG14 (166)* de l'érythrocyte de Poulet sont connues.

* Voir additif bibliographique page 152.

1 - PREPARATION DE L'HISTONE H5 D'ERYTHROCYTE DE POULET

La préparation de l'histone H5 a été réalisée dans le laboratoire de Mademoiselle M. CHAMPAGNE (Maître de Recherches au C.N.R.S.) à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg (29) (tableau II, page 35).

1-1 Préparation de la chromatine

La préparation est effectuée à 2°C. Les érythrocytes obtenus par centrifugation du sang de Poulets adultes sont hémolysés dans une solution de Saponine - NaCl 0,15 M. Les noyaux, débarrassés des cellules non hémolysées, sont homogénéisés dans une solution de NaCl 0,15 M et centrifugés. Cette opération est répétée 4 fois. Au terme de cette étape, on obtient une préparation de chromatine purifiée dont on extrait sélectivement les histones très riches en lysine (H1 et H5).

1-2 Extraction de l'histone H5 à partir de la chromatine

Les histones H1 et H5 sont extraites ensemble, à partir de la chromatine, par l'acide perchlorique à 5 % ou par l'acide trichloracétique à 5 %. L'extraction est totale avec l'acide perchlorique, elle est incomplète avec l'acide trichloracétique (rendement 80 %) (29).

1-3 Purification de l'histone H5

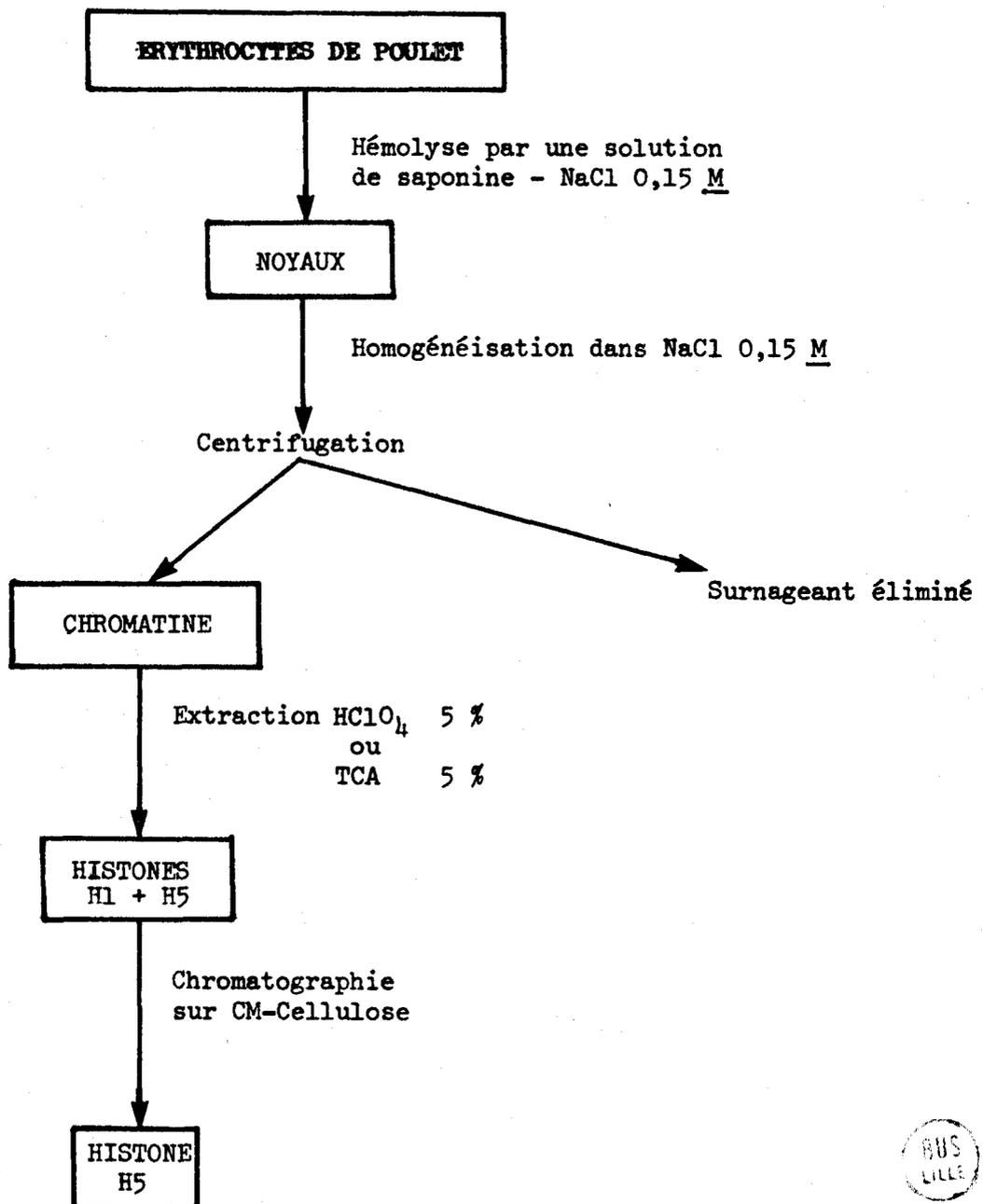
L'histone H5 est obtenue pure à partir du mélange des histones H1 et H5 par chromatographie d'échanges d'ions sur carboxyméthylcellulose (CM-cellulose Serva) (72).

TABLEAU II

PREPARATION DE L'HISTONE H5

(CHAMPAGNE, M. et MAZEN, A. (1967)

C.R. Acad. Sci. Paris, 265, 2100 - 2103 (162)*



* Voir additif bibliographique page 152.

L'élution est réalisée selon la méthode préconisée par JOHNS et coll. (72) avec les tampons acétate I et II puis l'acide chlorhydrique 0,02 N.

La fraction éluée par le tampon acétate II correspond à l'histone H1 très riche en lysine.

La fraction éluée par l'acide chlorhydrique 0,02 N est la fraction spécifique des érythrocytes de Poulet, analogue à la fraction F2C de HNILICA (68) ou la fraction F5 de NEELIN et coll. (97).

La pureté des préparations d'histone H5 est contrôlée en électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de LEBOY (81) ou celle de PANYIM et CHALKLEY (109) (figure 8, page 37).

2 - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'HISTONE H5

L'histone H5 s'apparente à l'histone H1 riche en lysine par ses caractères de solubilité dans l'acide trichloracétique à 5 %.

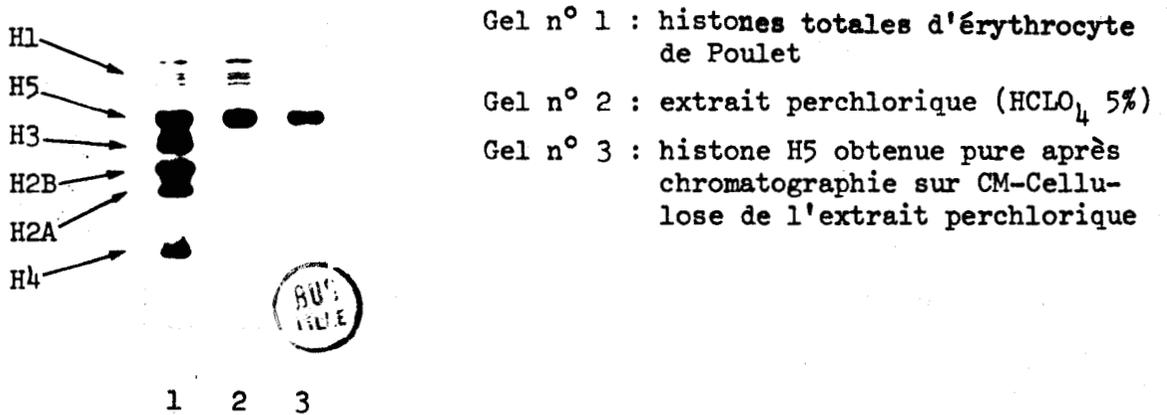
Une électrophorèse en gel de polyacrylamide selon PANYIM et CHALKLEY (109) montre pour l'histone H5 une seule bande et un comportement différent de l'histone H1, en ce sens qu'elle est relativement plus rapide en électrophorèse à pH 2,7 et en milieu urée 2,5 M (figure 8, page 37).

La composition en acides aminés de l'histone H5, établie sur des hydrolysats de 24 heures et 72 heures, est présentée dans le tableau III (page 38). L'analyse des acides aminés est effectuée sur un analyseur Beckman, type Multichrom, en utilisant un système monocolonne.

Comme l'histone H1, l'histone H5 se caractérise par sa richesse en résidus de lysine et d'alanine et par la présence d'un seul ré-

CONTROLE DES ETAPES DE LA PREPARATION DE L'HISTONE H5

D'ERYTHROCYTE DE POULET



Electrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 2,7 en milieu urée 2,5 M selon PANYIM et CHALKLEY (109).

figure 8



COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE L'HISTONE H5
D'ERYTHROCYTE DE POULET (a)

Acides aminés	HISTONE H5 (b)	HISTONE H1 (b)
	D'ERYTHROCYTE DE POULET	
Acide aspartique	3,23 (3) (c)	4
Thréonine	6,23 (6)	11
Sérine	25,3 (26) (d)	15
Acide glutamique	7,42 (7-8) (e)	7-8
Proline	12,97 (13)	20
Glycine	9,0 (9)	14
Alanine	28,65 (29)	58
Cystéine	0	0
Valine	7,82 (8)	9-10
Méthionine	1,32 (1)	0
Isoleucine	6,08 (6)	2
Leucine	8,10 (8)	10
Tyrosine	2,93 (3)	1
Phénylalanine	1,35 (1)	1
Histidine	2,88 (3)	0
Lysine	42,35 (44) (d)	62
Arginine	20,93 (21-22) (e)	5
Nombre de résidus	189	220
Rapport Lys/Arg	2,0	12,4
NH ₂ -terminal	Thréonine partiellement acétylée 15 %	Acétyl-sérine
COOH-terminal	Lysine	Lysine
Masse moléculaire calculée d'après les valeurs arrondies	20 580	23 000

- (a) La composition en acides aminés de l'histone H5 est exprimée en nombre de résidus par mole de protéine.
- (b) Les compositions en acides aminés des histones H1 et H5 ont été effectuées, dans notre laboratoire, sur un analyseur Beckman type Multichrom en utilisant un système monocolonne.
- (c) Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'entier le plus proche.
- (d) Valeurs déterminées d'après la séquence.
- (e) Ces valeurs témoignent du polymorphisme de l'histone H5 (Gln→Arg) en position 15 dans la séquence en acides aminés, mis en évidence par GREENAWAY et MURRAY (63) et GAREL et coll. (52).

sidu de phénylalanine. Mais elle s'en distingue par sa richesse en résidus d'arginine et de sérine et par la présence d'un résidu de méthionine, de trois résidus d'histidine et de trois résidus de tyrosine.

Toutefois, le point fondamental qui distingue l'histone H5 de l'histone H1 est la différence entre leurs rapports Lys/Arg ; ce rapport est de 2,0 dans l'histone H5 et de 12,4 dans l'histone H1.

La masse moléculaire de l'histone H5 de Poulet que nous avons calculé sur la base de 189 résidus, est de 20 580.

Un résidu de thréonine partiellement N-acétylé (15 %) (EDWARDS et HNILICA) (45) a été identifié à l'extrémité amino-terminale tandis que l'extrémité carboxy-terminale de la protéine est constituée par un résidu de lysine (BRIAND et coll.) (23), (GAREL et coll.) (52), (GREENAWAY et MURRAY) (63).

CHAPITRE II

ETUDE STRUCTURALE DE L'HISTONE H5

Publication 1

"Chicken erythrocyte histone H5 : II Amino-acid sequence adjacent to the phenylalanine residue".

SAUTIERE, P., KMIECIK, D., LOY, O., BRIAND, G., BISERTE, G.,
GAREL, A. and CHAMPAGNE, M. (1975)

FEBS Lett. 50, 200-202.

Publication 2

"Chicken erythrocyte histone H5 ; III Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues)"

SAUTIERE, P., BRIAND, G., KMIECIK, D., LOY, O., BISERTE, G.,
GAREL, A. and CHAMPAGNE, M. (1976)

FEBS Lett. 63, 164-166.

Publication 3

"Chicken erythrocyte histone H5 ; IV Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence"

BRIAND, G., KMIECIK, D., SAUTIERE, P., WOUTERS, D., BORIE-LOY, O.,
BISERTE, G., MAZEN, A. and CHAMPAGNE, M. (1980)

FEBS Lett. 112, 147-151.

P U B L I C A T I O N 1

CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H₅; II AMINO ACID SEQUENCE ADJACENT TO THE PHENYLALANINE RESIDUE

P. SAUTIERE, D. KMIECIK, O. LOY, G. BRIAND and G. BISERTE

Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Boîte postale 3567, 59020-Lille CEDEX, France

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15, rue Descartes, 67000-Strasbourg, France

Received 4 December 1974

1. Introduction

In the first paper of this series we have presented the N-terminal sequence (70 residues) of the chicken erythrocyte histone H₅* [1]. We report here the sequence of 25 residues around the only phenylalanyl residue present in the histone H₅. This region rich in hydrophobic residues, shows a strong analogy with the sequence adjacent to the phenylalanyl residue 106 in the Rabbit thymus lysine-rich histone (RTL-3) [2]. The sequence data were obtained from a tryptic peptide of the maleylated protein, and from peptides obtained by hydrolysis of the unmodified protein with chymotrypsin and a staphylococcal protease.

2. Materials and methods

All materials and methods were essentially as reported in the earlier paper with the following addi-

* The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H₁ (F₁, I, KAP); H₂A (F_{2a2}, II_{b1}, ALK); H₂B (F_{2b}, II_{b2}, KSA); H₃ (F₃, III, ARK), H₄ (F_{2a1}, IV, GRK) and H₅ (F_{2c}, V, KAS).

** The staphylococcal protease isolated from *Staphylococcus aureus* strain V8 was a generous gift from Dr G. R. Drapeau.

tion. The histone H₅ was hydrolyzed at 37°C for 18 hr in 0.05 M ammonium bicarbonate, pH 8.0, with a staphylococcal protease** at an enzyme/substrate ratio of 1:30.

The hydrolysate was fractionated on Sephadex G-50 F, equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. Further purification of the peptides was achieved either by paper chromatography or paper electrophoresis or both methods as described previously [3].

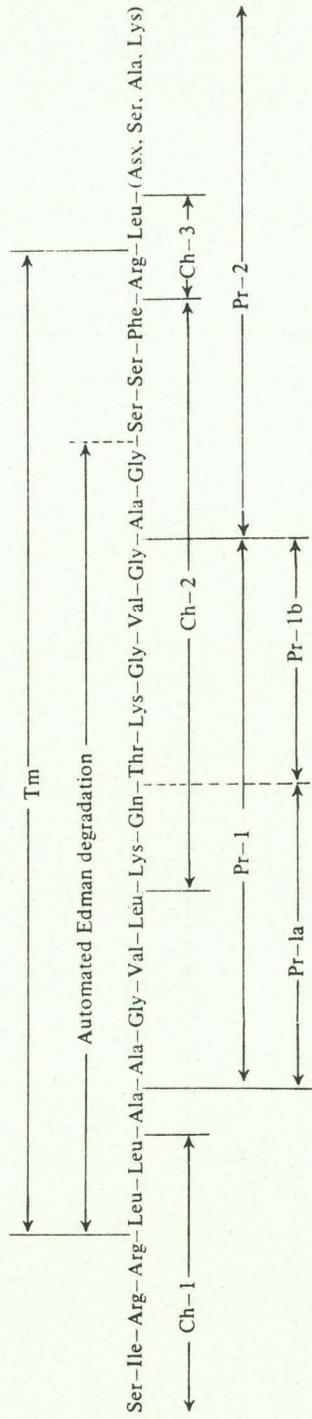
3. Results and discussion

In the tryptic hydrolysate of the maleylated histone a peptide containing the only phenylalanyl residue present in the protein was identified. This peptide (20 residues) has the following amino acid composition: Thr, Ser₂, Glu, Ala₃, Val₂, Leu₃, Phe, Lys₂, Arg. The sequence of the first sixteen residues was established by the automated Edman degradation (table 1).

The remainder of the sequence was deduced from the data provided by the peptide Pr-2 isolated from the staphylococcal hydrolysate of the protein. This peptide has the following composition: Asp, Ser₃, Gly, Ala₂, Leu, Phe, Lys, Arg. The sequence of the first seven residues was as follows:

Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-(Asx, Ser, Ala, Lys)

Table 1
Amino acid sequence adjacent to the phenylalanyl residue in the chicken erythrocyte histone H₅



Due to a low recovery of this peptide no further sequence work could be carried out. However, this peptide allows us to localise the last of the three residues of aspartic acid present in the histone H₅ close to the phenylalanyl residue.

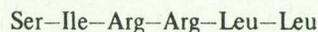
From the same hydrolysate we have isolated the peptide Pr-1 and its two derived peptides Pr-1a and Pr-1b. The peptide Pr-1 overlaps the median part of the tryptic peptide (table 1). The presence of the peptides Pr-1, Pr-1a, Pr-1b and Pr-2 in the staphylococcal protease hydrolysate led us to question the purity of the enzyme preparation.

Among the three proteases produced by the strain V8 of *Staphylococcus aureus* [4,5], one has been shown to have a specificity limited to glutamyl bonds in ammonium bicarbonate or ammonium acetate buffers [6,7].

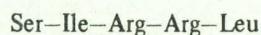
The results that we have obtained clearly indicate that the 'Glu-specific protease' was contaminated by a protease which exhibits a thermolysin like activity, since bonds such as Ala-Ala, Gln-Thr, and Gly-Ala present in the peptide Tm were split.

Only three of the chymotryptic peptides called Ch-1, Ch-2, and Ch-3 are critical to the purposes of this report and will be described here.

The sequence of the peptide Ch-1 was found to be:



A derived peptide with only one leucine was also identified in the chymotryptic hydrolysate and its structure is:



Since we know from the amino acid analysis that the fragment NB-4 obtained by *N*-bromosuccinimide

cleavage of the histone H₅, contains six leucine residues already positioned [1], it is obvious that the peptide Ch-1 overlaps the N-terminal part of the tryptic peptide Tm (table 1).

The peptides Ch-2, -Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe, and Ch-3, -Arg-Leu-, overlap the C-terminal part of this peptide Tm (table 1).

Thus we have determined in the chicken erythrocyte histone H₅ a sequence of 25 residues, which includes the only phenylalanyl residue present in the histone molecule.

This sequence is in excellent agreement with the partial results obtained by Greenaway [8] on tryptic and thermolysin peptides of the histone H₅.

A striking analogy can be observed (table 2) by comparison of this sequence with the sequence adjacent to the phenylalanine residue 106 in the rabbit thymus/lysine-rich histone (RTL-3) determined by Jones et al. [2].

Acknowledgements

We are grateful to Dr Policard, Socosi, 94000, Saint Maur, France, for the automated Edman degradation and to Mrs D. Belaïche-Mayeur and M. J. Dupire-Ceulenaere for their skillful technical assistance.

The work was supported by a grant 72 7 05 05 from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

References

- [1] Preceding paper.
- [2] Jones, C. M. T., Rall, S. C. and Cole, R. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2548-2553.

Table 2
Sequence analogies in the vicinity of the phenylalanyl residue in histones H₁ and H₅

H ₅ (Chicken erythrocyte)	Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg		
H ₁ (Rabbit thymus) [2] RTL-3	Val- 96	-Glx-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Lys 100	107

- [3] Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 222-226.
- [4] Arvidson, S., Holme, T. and Lindholm, B. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 302, 135-148.
- [5] Arvidson, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 302, 149-157.
- [6] Drapeau, G. R., Boily, Y. and Houmard, J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6720-6726.
- [7] Houmard, J. and Drapeau, G. R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3506-3509.
- [8] Greenaway, P. J. (1971) *Biochem. J.* 124, 319-325.

P U B L I C A T I O N 2

CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H₅ III. SEQUENCE OF THE AMINO-TERMINAL HALF OF THE MOLECULE (III RESIDUES)

P. SAUTIÈRE, G. BRIAND, D. KMIÉCIK, O. LOY, G. BISERTE

*Unité n° 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 124 INSERM),
B.P. n° 3567, 59020 Lille Cédex, France*

and

A. GAREL, M. CHAMPAGNE

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue Descartes, 67000 Strasbourg, France

Received 21 January 1976

1. Introduction

In our previous papers [1,2] we have presented the N-terminal sequence (70 residues) of the chicken erythrocyte histone H₅^{*}, and a sequence of 25 residues around the only phenylalanyl residue present in that protein. The amino acid sequence of the histone H₅ has now been extended up to the 111th residue. The sequence was determined from data provided by the peptides obtained by hydrolysis of the protein or of its carboxy-terminal fragment NB-4, with trypsin, thermolysin and dilute acetic acid.

2. Materials and methods

All materials and methods were essentially as described previously [1,2] with the following additions. The histone H₅ was hydrolyzed at 105°C for 6 h with 0.25 M acetic acid (10 mg protein/ml

acetic acid). The hydrolysate was fractionated on Sephadex G-50 F equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. On the other hand the histone H₅ was hydrolyzed at 37°C for 4 h in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0 with trypsin at an enzyme/substrate ratio of 1:100. The hydrolysate was fractionated on Chromobeads P column (Technicon) with pyridine formate and pyridine acetate buffers [3]. Furthermore, the C-terminal fragment NB-4 (142 residues) obtained by NBS** cleavage of the protein [1] was hydrolyzed at 40°C for 2 h in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0, with thermolysin at an enzyme/substrate ratio of 1:100. The hydrolysate was fractionated on Sephadex G-25 F equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. The fractions containing the small peptides ranging from di- to penta-peptides were further fractionated by ion-exchange chromatography, as described above.

3. Results and discussion

Among the peptides obtained by acetic acid cleavage of two aspartyl bonds in the histone H₅, one is of peculiar interest for the purpose of the present paper.

This peptide designated by Ac-2 contains 34

*The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H₁ (F₁, I, KAP); H_{2A} (F_{2a2}, II_{b1}, ALK); H_{2B} (F_{2b}, II_{b2}, KSA); H₃ (F₃, III, ARK); H₄ (F_{2a1}, IV, GRK) and H₅ (F_{2C}, V, KAS).

**Abbreviation: NBS, *N*-bromosuccinimide.

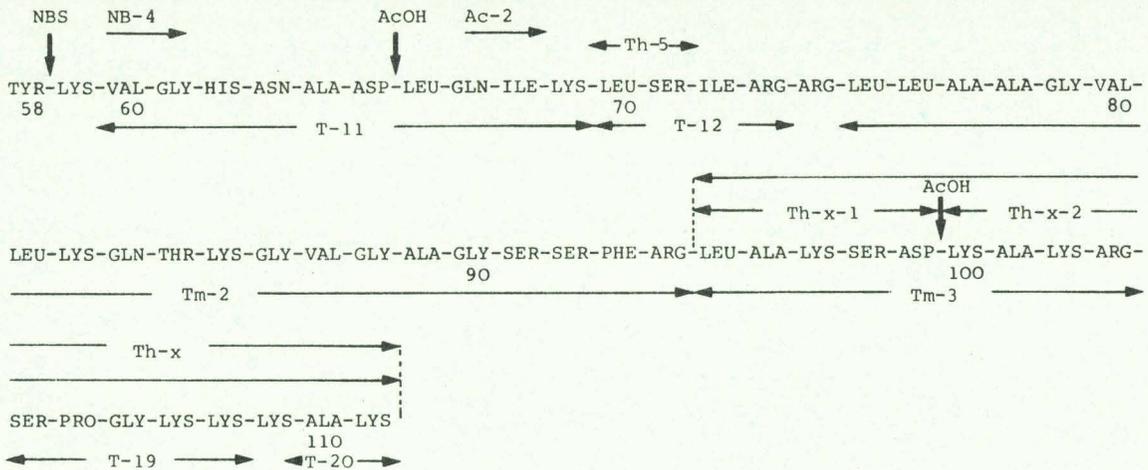


Fig.1. Ordering of the peptides from residue 58 to residue 111 in the amino acid sequence of chicken erythrocyte histone H₅. Tryptic peptides are designated by T- and Tm- (from maleylated peptide NB-4), and thermolytic peptides by Th-. Sites of cleavage of the protein by *N*-bromosuccinimide and acetic acid are indicated by NBS and AcOH respectively.

residues determined as follows: Asp, Thr, Ser₄, Glu₂, Gly₄, Ala₄, Val₂, Ile₂, Leu₆, Phe, Lys₄, Arg₃. The presence of aspartic acid in this peptide is related to an incomplete enucleation of the aspartyl residue due to a short time hydrolysis with dilute acetic acid. The amino-terminal sequence of peptide Ac-2 was found to be: Leu-Gln-Ile-Lys-Leu. This sequence

corresponds to the carboxy-terminal sequence of the 70 first residues of the protein [1].

Its carboxy-terminal sequence Leu-Ala-Lys-Ser-Asp was deduced from the kinetic study of the hydrolysis of the peptide with carboxypeptidase C.

These structural studies as well as the amino acid composition of the peptide which contains the only

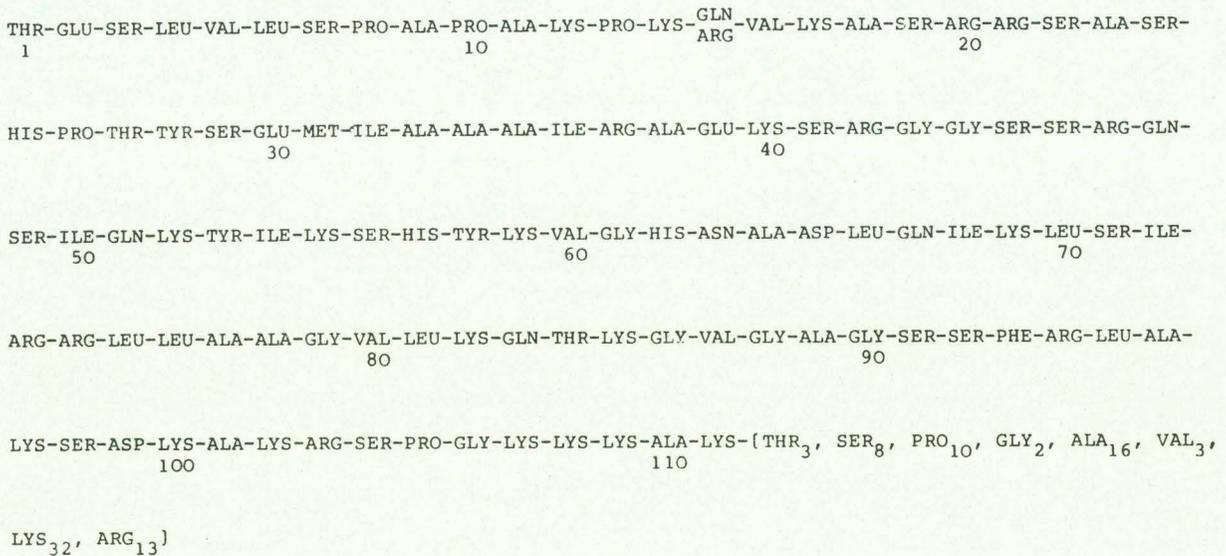


Fig.2. Sequence of the amino-terminal half of the chicken erythrocyte histone H₅.

phenylalanyl residue present in the histone H₅ indicate obviously that the sequence adjacent to the phenylalanyl residue established previously [2] comes next to the leucyl residue in position 70 (fig.1).

The identification of peptide T-12 Leu-Ser-Ile-Arg in the tryptic hydrolysate of the protein and of peptide Th-5 Leu-Ser in the thermolysin hydrolysate of the peptide NB-4 confirm the above assignment.

From the same thermolysin hydrolysate a highly basic peptide was isolated. This peptide Th-x (17 residues) has the following composition: Asp, Ser₂, Pro, Gly, Ala₃, Leu, Lys₇, Arg.

The peptide Th-x has a leucyl residue in the amino-terminal position. Its carboxy-terminal sequence Lys-Lys-Lys-Ala-Lys was established from the kinetic study of the hydrolysis of the peptide with carboxypeptidases B and A.

Its complete sequence was deduced from the structural data provided by the derived peptides Th-x-Ac-1 and Th-x-Ac-2 obtained by cleavage of the peptide Th-x with 0.25 M acetic acid and by the tryptic peptides Tm-3 and T-19 (fig.1). The peptide Tm-3 was identified in the tryptic hydrolysate of the maleylated peptide NB-4 whereas the peptide T-19 was isolated from the tryptic hydrolysate of the protein.

The amino-terminal sequence of the peptide Th-x overlaps the carboxy-terminal sequence of the peptide Ac-2 (fig.1).

These results led us to present the sequence of the first 111 amino acids of the chicken erythrocyte

histone H₅ (fig.2). This sequence which corresponds to about half of the protein molecule, contains all the aromatic residues and most of the hydrophobic residues but alanine present in the histone H₅.

On the other hand, the highly basic character of the carboxy-terminal part of the protein appears in the composition (in brackets, fig.2) where half of the amino acids which remain to be sequenced, are basic.

This strongly suggests that all the globular structure of the whole molecule is located in the sequence 1-99.

Acknowledgements

We wish to acknowledge with pleasure the skillful technical assistance of Mrs M. J. Dupire and D. Belaiche.

The work was supported by grant 75.7.0187 from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

References

- [1] Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautiere, P., Kmiecik, D., Loy, O. and Biserte, G. (1975) FEBS Lett. 50, 195-199.
- [2] Sautiere, P., Kmiecik, D., Loy, O., Briand, G., Biserte, G., Garel, A. and Champagne, M. (1975) FEBS Lett. 50, 200-203.
- [3] Sautiere, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 222-226.

P U B L I C A T I O N 3

CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H5

IV. Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence

G. BRIAND, D. KMIĘCIK, P. SAUTIERE, D. WOUTERS, O. BORIE-LOY, G. BISERTE, A. MAZEN[†]
and M. CHAMPAGNE[†]

Unité 124 INSERM et Institut de Recherches sur le Cancer, Place de Verdun, BP 3567, 59020 Lille Cédex and

[†]Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15, rue Descartes, 67000 Strasbourg, France

Received 17 January 1980

1. Introduction

The sequence of the first 111 residues and some partial sequences of the carboxy-terminal region of chicken erythrocyte histone H5 (189 residues, mol. wt 20 580) have been determined [1,2]. Most of the 66 basic residues present in the histone appeared to be accumulated in the carboxy-terminal half of the protein molecule; the elucidation of such a highly basic sequence was problematic. Specific cleavage with pepsin at the single phenylalanine residue of the protein, located at position 93 of the sequence, released the carboxy-terminal fragment of H5. The sequence of this fragment (96 residues) was determined mainly from data provided by peptides obtained by cleavage with trypsin and thermolysin. Additional information was obtained from peptides generated by cleavage with elastase. The complete sequence of the 189 amino acid residues of the chicken erythrocyte histone H5 is elucidated here.

2. Materials and methods

All materials and methods were as in [1,3], with the following additions: Histone H5 dissolved in 5% formic acid, was hydrolyzed with pepsin (Worthington) at 37°C for 2 h, using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50. The hydrolysate was fractionated on a Sephadex G-50 (fine) column (200 × 2.5 cm) equilibrated and

eluted with 0.01 M HCl. Digestion of the carboxy-terminal peptic fragment Px with thermolysin (Merck) was performed at 40°C in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8.0) for 30 min or 2 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:100. The fragment Px was also hydrolyzed with porcine elastase (Calbiochem) at 37°C in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8.0) for 30 min using an enzyme-to-substrate ratio of 1:500 or for 2 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:100.

Maleylation, citraconylation or succinylation of peptide Px prior to tryptic digestion were performed at 0°C in 0.1 M K₂HPO₄ (pH 9.0) with a 10 M excess of maleic, citraconic or succinic anhydride relatively to the content of α- and ε-amino groups. Hydrolysis of the modified peptide Px with Tos-PheCH₂Cl-treated trypsin (Worthington) was performed at 37°C in 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8.0) for 4 h, using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50.

The enzymatic digests were fractionated on a Sephadex G-25 (fine) column (200 × 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl.

The fractions containing large peptides, were further fractionated on a CM-cellulose (Whatman CM-52) column (25 × 1.2 cm) equilibrated in 0.02 M ammonium acetate–0.2 M NaCl adjusted to pH 6.0 with HCl. Peptides were eluted with a linear gradient of NaCl (from 0.2–0.6 M) in 0.02 M ammonium acetate buffer (pH 6.0). The small peptides ranging from di- to hexapeptides were separated by ion-exchange chromatography on Chromobeads P (Technicon) with pyridine–formate and pyridine–acetate buffers [4].

Automated Edman degradation of large peptides was performed in a Beckman 890 C Sequencer using a DMAA program (102974) in the presence of poly-

Abbreviations: Tos-PheCH₂Cl, *N*-tosylphenylalanine chloromethyl ketone; DMAA, dimethylallylamine; PTH, phenylthiohydantoin

brene [5,6]. In some cases peptides were treated with 3-sulfo-phenylisothiocyanate prior to Edman degradation [7]. PTH amino acids identified by high-pressure liquid chromatography on a column of C₁₈ micro Bondapak (Waters Associates) [8] and by gas-chromatography as in [9]. The sequence of the small peptides was determined by the manual dansyl-Edman method [10] or by a modified Edman degradation developed in [11] using 4-*N,N*-dimethylaminoazobenzene-4'-isothiocyanate (DABITC, Fluka AG) in combination with phenylisothiocyanate as coupling reagent.

3. Results and discussion

When histone H5 is hydrolyzed with pepsin, the specific cleavage of the Phe-Arg bond yields a peptide of 96 residues, designated by Px, with the following amino acid composition:

Asp₁, Thr₃, Ser₁₂, Pro₉, Gly₂, Ala₁₇, Val₃, Leu₁, Lys₃₄, Arg₁₄.

From kinetic studies with carboxypeptidases B and C performed simultaneously on peptide Px and on histone H5, peptide Px was found to be the carboxy-terminal half of the protein. The amino acid sequence of peptide Px is presented in fig.1. Detailed results which led to the above sequence will be published elsewhere. Thus the carboxy-terminal sequence of chicken histone H5 which remained to be determined [1,2], is now elucidated and with it, the complete amino acid sequence of the protein (fig.2).

Chicken erythrocyte histone H5 contains 189 residues. By amino acid analysis and structural studies of peptide Px a precise evaluation of the number of serine, lysine and arginine present in the protein could be obtained. Thus histone H5 contains 26 serine, 44 lysine and 22 arginine, instead of 25, 42 and 21, respectively, as described in [2]. Moreover the sequences Gly-Ser and Ala-Lys in [1], were found

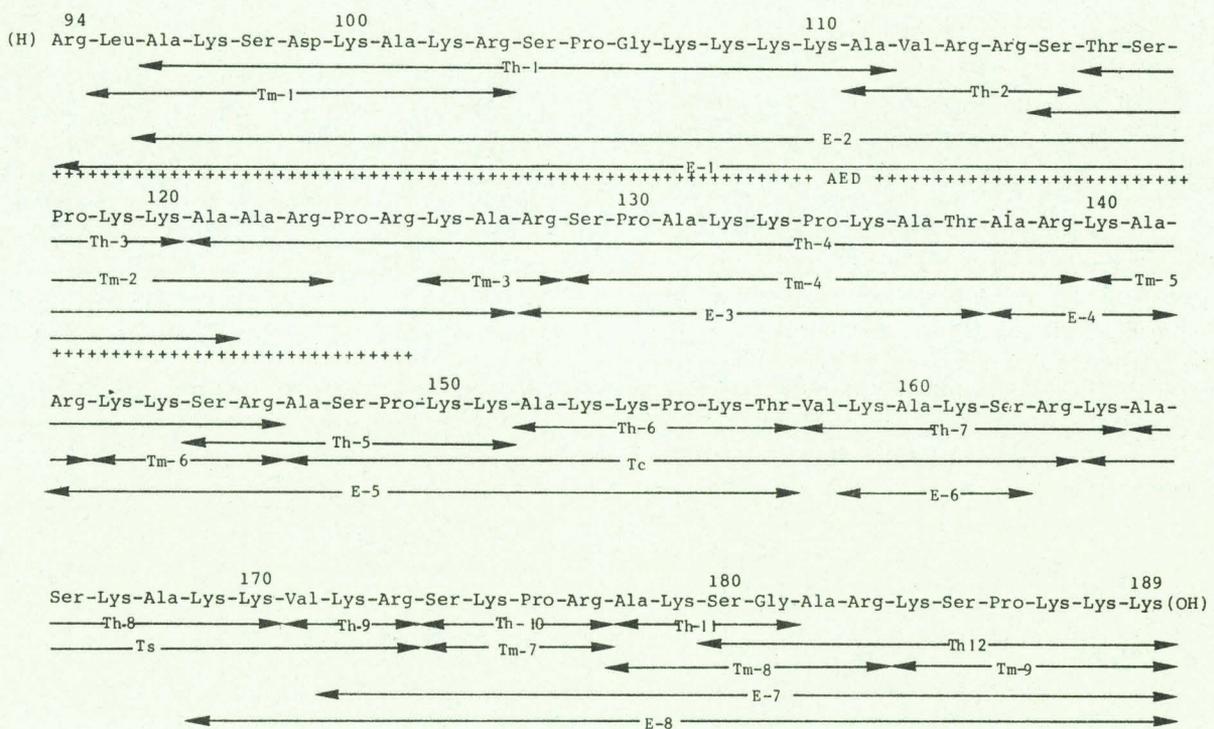


Fig.1. Carboxy-terminal sequence of chicken erythrocyte histone H5. Th, peptide from digestion with thermolysin; Tm, peptide from digestion with trypsin after maleylation; Tc, peptide from digestion with trypsin after citraconylation; Ts, peptide from digestion with trypsin after succinylation; E, peptide from digestion with elastase; AED, automated Edman degradation.

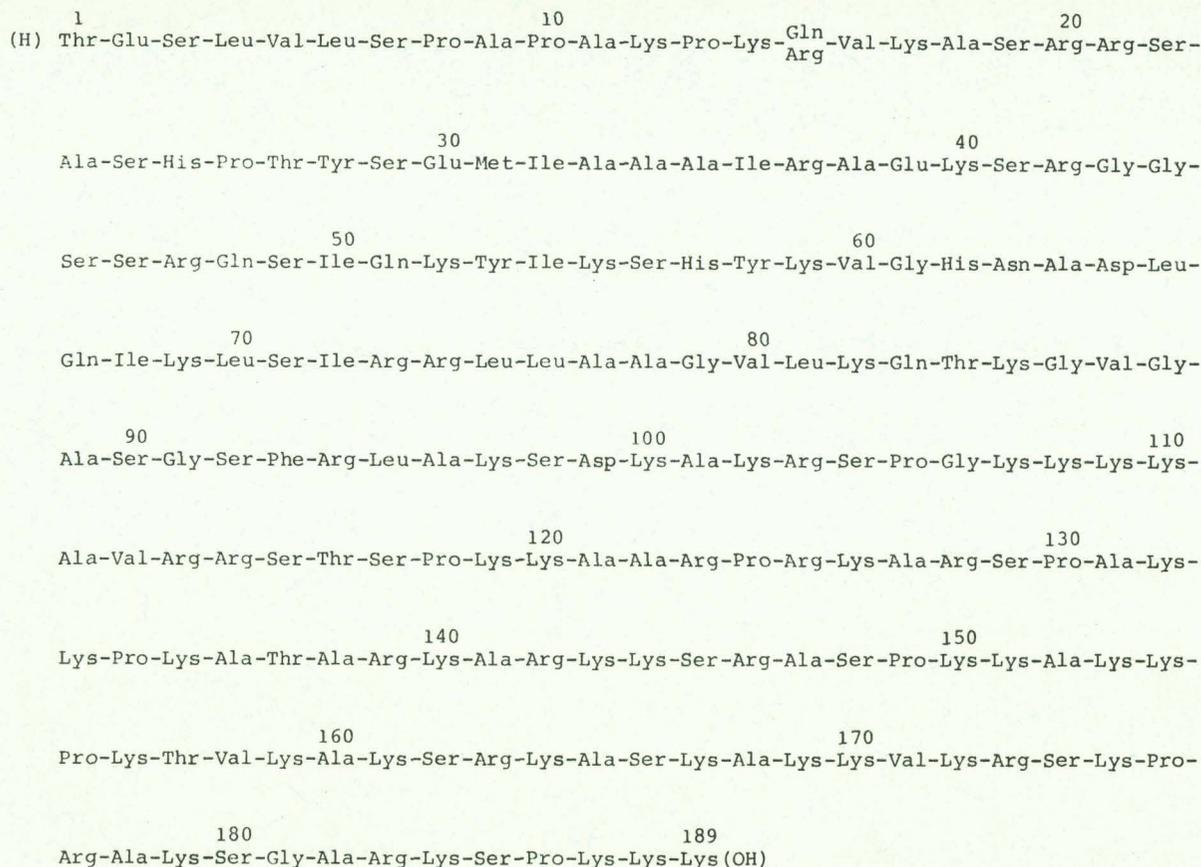


Fig.2. Amino acid sequence of chicken erythrocyte histone H5.

to be Ser-Gly from the sequence determination of the tryptic peptide (residues 86-94) and Lys-Ala from the data provided by automated Edman degradation of peptide Px.

Histone H5 is characterized by an asymmetrical distribution of the hydrophobic and basic residues similar to that found in trout histone H1 [12]. The amino terminal half of histone H5 contains most of the hydrophobic residues and all the aromatic residues of the protein and has been shown to take up a globular conformation at ionic strength >0.1 [2,13]. The globular region is, in fact, from residues 22-100 [14]. The carboxy-terminal half, which corresponds exactly to the fragment Px (residues 94-189) is strongly basic. Lysine and arginine account together for 50% of the total residues in the fragment Px. The remainder of the residues is almost exclusively composed of alanine, serine and proline. Such a composi-

tion is not expected to support an organized structure. As a matter of fact no secondary or tertiary structure was shown by circular dichroism and nuclear magnetic resonance studies, between residues 100-189 [2]. However the distribution of the proline residues within the carboxy-terminal region of histone H5 delimits two long basic sequences (fig.2) (the first between proline-134 and proline-149, the second between proline-155 and proline-176) which could take up a helical conformation when the positive charges are neutralized by the phosphate groups of DNA. The fact that serine-145 and serine-166 have been found phosphorylated in vitro by a rat pancreatic kinase (A. Martinage, P. S., unpublished) supports the idea that these two sequences are likely privileged sites for the binding of histone H5 to DNA, through electrostatic interactions.

On the other hand, when the sequence of chicken histone H5 is aligned for maximum homology with

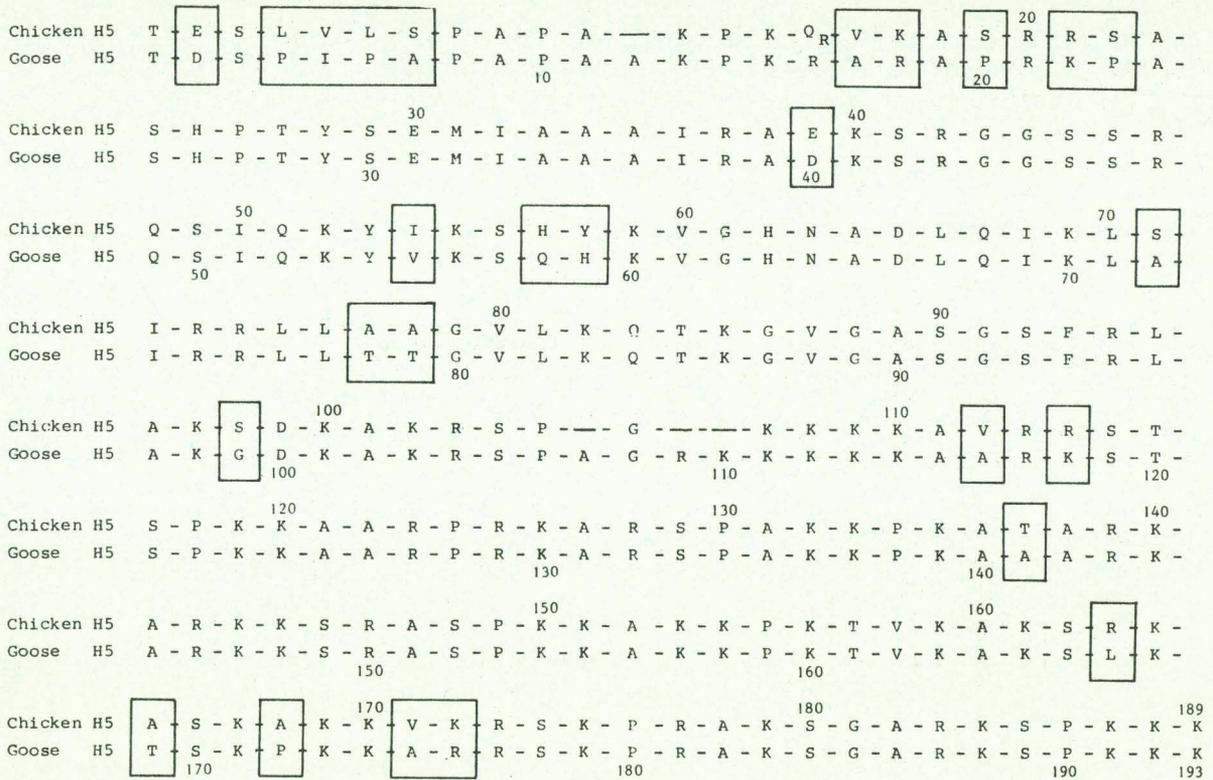


Fig.3. Comparison of amino acid sequences of chicken erythrocyte histone H5 and goose erythrocyte histone H5 [15]. The two sequences shown with the one-letter code (see J. Biol. Chem. (1979) 254, 7), are aligned for maximum homology. Amino acid changes are indicated by boxes and deletions by (—).

that of goose histone H5 [15], 30 differences can be observed (fig.3). Of these differences, 14 correspond to non-conservative amino acid replacements and 4 are deletions. The changes occur mainly in the amino-terminal and carboxy-terminal sequences of the histones. In the amino-terminal sequence (residues 1–22) 1 deletion and 10 substitutions of which 5 are not conservative are found. In the carboxy-terminal sequence (residues 100–189) 9 substitutions and 3 deletions take place. The globular regions (residues 23–99) show an extensive homology; besides the few conservative changes observed, the replacement of the sequence His–Asn of chicken H5 by the sequence Gln–His in goose H5, must be quoted.

The conservation of the sequence of the globular region in avian histone H5 might be related to a fundamental function, e.g., protein–protein interaction, in the chromatin.

Acknowledgements

The skilful technical assistance of Mrs D. Bühr and Miss J. Dunand (preparation of histone 115) and of Mrs D. Belaïche, M. J. Dupire and of Miss A. Hemez (structural studies of histone H5) is gratefully acknowledged. We thank Professor M. Daune (IBMC, Strasbourg) for his continuous interest and helpful advice. The work was supported by grants ATP Chromatine no. 2875 and LA 268 of the Centre National de la Recherche Scientifique and by grant no. 77.5.048.2 of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

References

[1] Sautière, P., Briand, G., Kmiecik, D., Loy, O., Biserte, G., Garel, A. and Champagne, M. (1976) FEBS Lett. 63, 164–166.

- [2] Crane-Robinson, C., Briand, G., Sautière, P. and Champagne, M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 493, 283-292.
- [3] Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautière, P., Kmiecik, D., Loy, O. and Biserte, G. (1975) *FEBS Lett.* 50, 195-199.
- [4] Wouters, D., Sautière, P. and Biserte, G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 231-239.
- [5] Tarr, G. E., Beecher, J. F., Bell, M. and McKeaw, D. (1978) *Anal. Biochem.* 84, 622-627.
- [6] Hunkapiller, M. W. and Hood, L. E. (1978) *Biochemistry* 17, 2124-2133.
- [7] Dwulet, F. E. and Gurd, F. R. N. (1976) *Anal. Biochem.* 76, 530-538.
- [8] Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Neurath, H. and Walsh, K. A. (1978) *Biochemistry* 17, 5672-5679.
- [9] Pisano, J. J. and Bronzert, T. J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5597-5607.
- [10] Gray, W. R. and Hartley, B. S. (1963) *Biochem. J.* 89, 379-380.
- [11] Chang, J. Y., Brauer, D. and Wittmann-Liebold, B. (1978) *FEBS Lett.* 93, 205-214.
- [12] McLeod, A. R., Wong, N. C. W. and Dixon, G. H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 78, 281-291.
- [13] Crane-Robinson, C., Danby, S. E., Bradbury, E. M., Garel, A., Kovacs, A. M., Champagne, M. and Daune, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 379-388.
- [14] Chapman, G. E., Aviles, F. J., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E. M. (1978) *Eur. J. Biochem.* 90, 287-296.
- [15] Yaguchi, M., Roy, C. and Seligy, V. L. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 1400-1406.

1 - HISTORIQUE

L'histone H5 ne contenant qu'un résidu de méthionine, la première étape de la détermination de la structure primaire a consisté à couper la protéine par le bromure de cyanogène qui libère deux fragments appelés CN-1 (résidus 1 à 31) et CN-2 (résidus 32 à 189).

La séquence du fragment CN-1 a été réalisée par GREENAWAY et MURRAY (63). Ces auteurs ainsi que GAREL et coll. (52) ont mis en évidence une hétérogénéité en position 15.

Nous avons entrepris à la demande de Mademoiselle CHAMPAGNE et du Professeur DAUNE la détermination de la séquence complète de l'histone H5.

La dégradation automatique de EDMAN du fragment CN-2 et les études structurales réalisées sur les peptides obtenus par hydrolyse de la protéine par la trypsine, la chymotrypsine et la N-bromosuccinimide ont permis d'établir la séquence des 70 premiers résidus (tableau IV, page 46) (53).

La N-bromosuccinimide libère par coupure à la tyrosine 59 le peptide COOH-terminal NB-4 (résidus 59 à 189) qui a été hydrolysé par la trypsine après maléylation ou par la thermolysine.

L'étude des peptides des différents hydrolysats nous a permis d'établir la séquence des 111 premiers résidus de l'histone H5 (publication 1 et 2), (113), (114).

Pour la détermination de la séquence de la partie COOH-terminale de la protéine, l'hydrolyse pepsique s'est révélée d'un grand intérêt puisqu'elle libère avec un rendement de 80 %, un fragment de 96 résidus en position COOH-terminale dans la protéine, par coupure de l'unique liaison phénylalanyle présente dans l'histone H5.

SEQUENCE NH₂-TERMINALE DE L'HISTONE H5

(SAUTIERE et coll. (53))

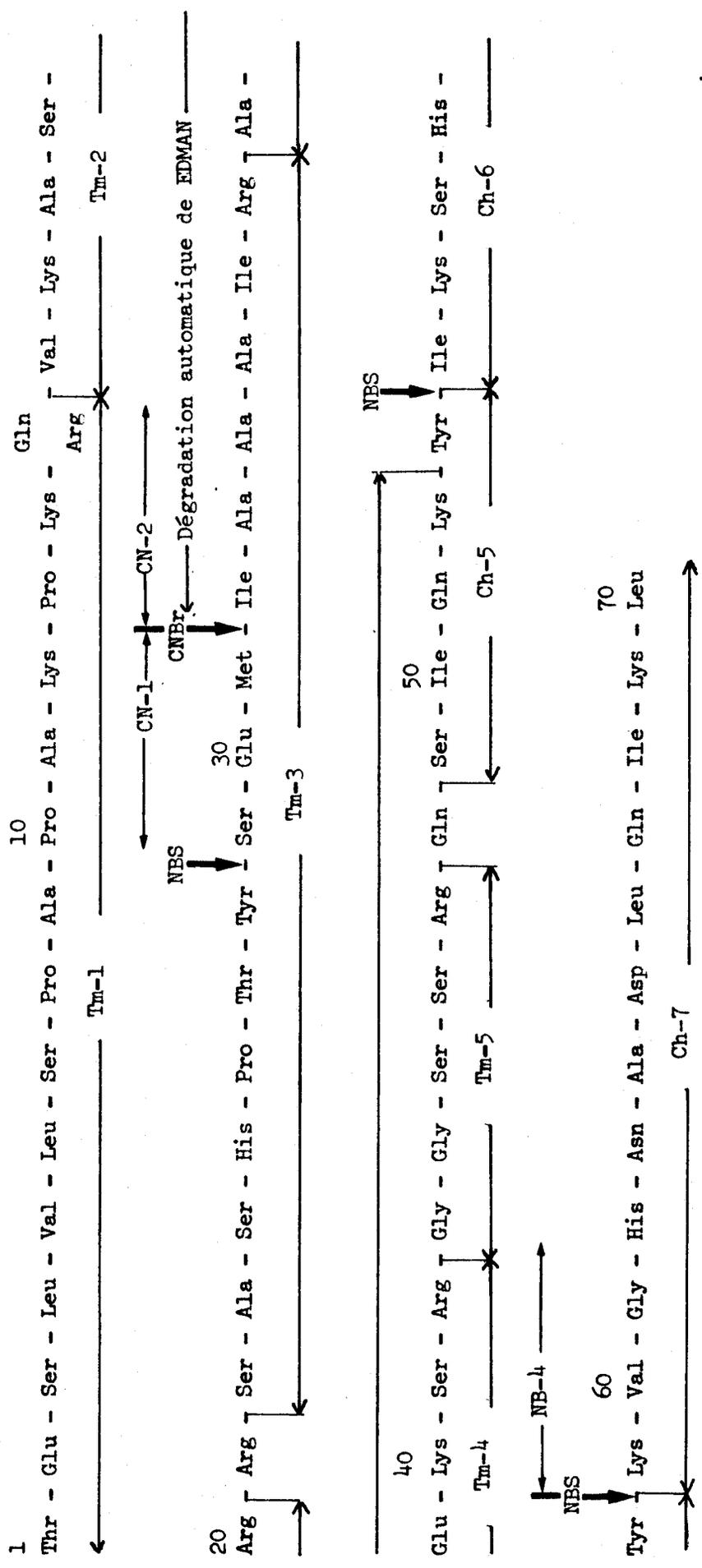


TABLEAU IV

Cette méthode de coupure par la pepsine a été préférée à l'hydrolyse de l'histone H5 par l'acide acétique 0,25 N qui coupe la protéine au niveau des résidus d'acide aspartique en position 65 et 99 et libère plusieurs fragments dont le fragment COOH-terminal (résidus 100 à 189) mais avec un rendement de 65 %.

La coupure par l'acide acétique 0,25 N présente cependant un intérêt majeur, d'une part pour les études conformationnelles, d'autre part pour l'étude des sites antigéniques de l'histone H5.

2 - ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU FRAGMENT PEPSIQUE COOH-TERMINAL

(FRAGMENT Px) DE L'HISTONE H5

2-1 Hydrolyse de l'histone H5 par la pepsine et fractionnement de l'hydrolysate

100 mg de protéine dissous dans 6 ml d'acide formique à 5 % sont hydrolysés pendant 2 heures à 37°C par la pepsine avec un rapport enzyme/substrat de 1/50.

L'hydrolysate est ensuite déposé sur une colonne de Sephadex G.50 F (195 x 2,5 cm) équilibrée et éluée avec l'acide chlorhydrique 0,01N. La détection des peptides est réalisée par lecture de la densité optique de l'éluat à 220 nm (figure 10, page 48).

L'électrophorèse de la fraction 1S en gel de polyacrylamide à 17 % d'acrylamide dans le système acide acétique 0,9 N - urée 2,5 M décrit par PANYIM et CHAKLEY (109) montre qu'elle renferme un seul composant qui correspond au fragment Px.

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DE L'HYDROLYSAT PEPSIQUE DE L'HISTONE H5

SUR COLONNE DE SEPHADEX G.50 F

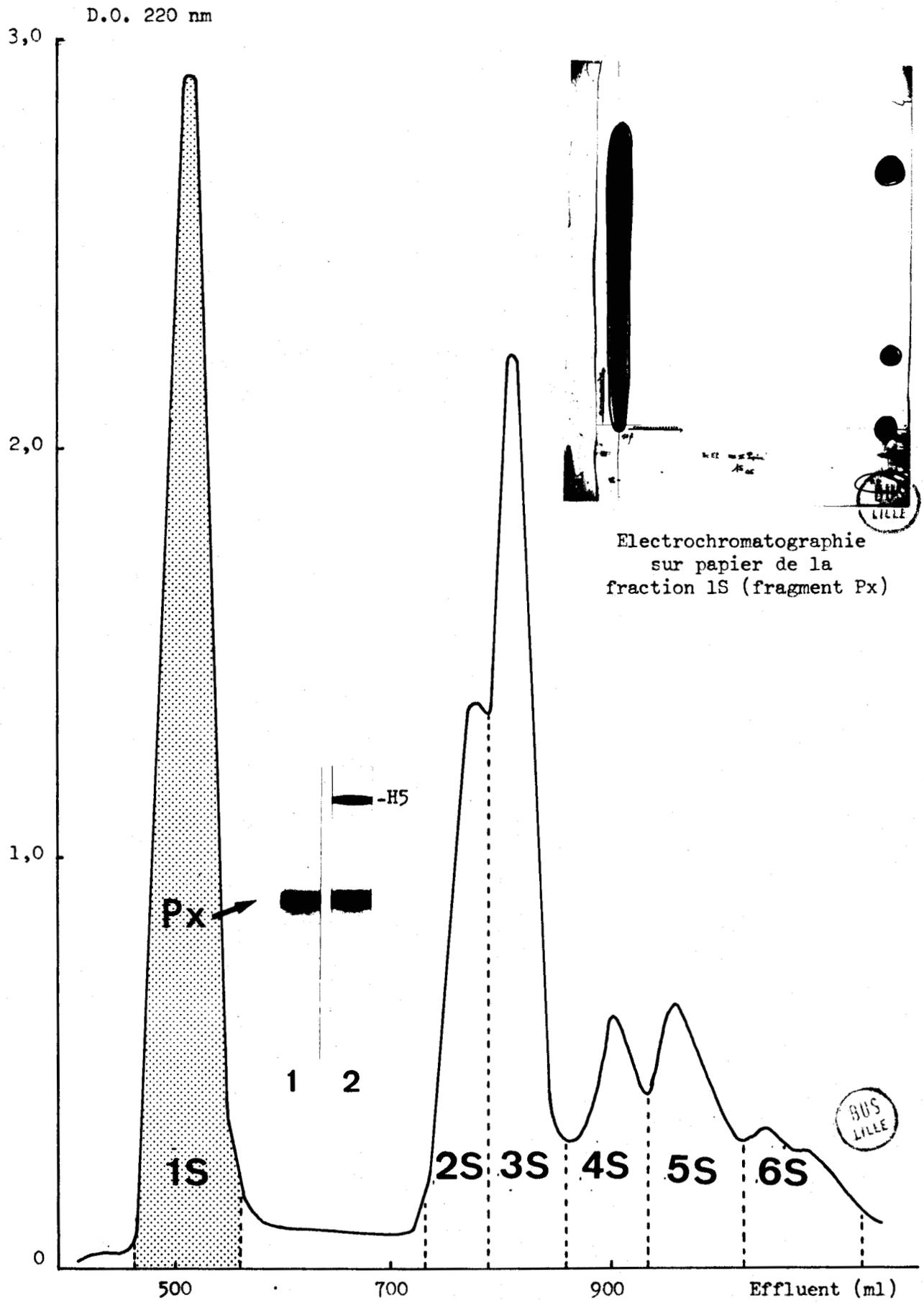


figure 10

Le fragment Px ne migre pas en chromatographie sur papier dans le système solvant n-butanol-pyridine - acide acétique - eau (15:10:3:12) (v/v) et migre sous forme d'une large trainée en électrophorèse à pH 3.6 dans le tampon pyridine - acide acétique - eau (1:10:289) (v/v), (figure 10, page 48).

2-2 Composition en acides aminés

La composition du fragment Px apparaît dans le tableau V (page 50) en comparaison avec celle de l'histone H5.

Le peptide se caractérise par sa richesse en acides aminés basiques (48 sur 96 résidus).

Il est dépourvu d'acides aminés aromatiques, d'acide glutamique, de méthionine et d'isoleucine. Il renferme un résidu d'acide aspartique et de leucine, deux résidus de glycine et trois résidus de thréonine et de valine. Ces acides aminés, en faible quantité, constituent autant de marqueurs qui représentent un grand intérêt pour le recouvrement et l'alignement des peptides dans la séquence.

3 - DETERMINATION DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU FRAGMENT Px

3-1 Stratégie adoptée

A cause de la composition particulière du fragment Px, les seules méthodes applicables pour la détermination de sa structure sont des méthodes enzymatiques. En outre, les seuls enzymes utilisables sont la trypsine, la thermolysine et, en dernier lieu, l'élastase.

TABLEAU VCOMPOSITION EN ACIDES AMINES DU FRAGMENT Px *

Acides aminés	Fragment Px	Histone H5
Acide aspartique	1	3
Thréonine	3	6
Sérine	12	26
Acide glutamique	-	7-8
Proline	9	13
Glycine	2	9
Alanine	17	29
1/2 Cystine	-	-
Valine	3	8
Méthionine	-	1
Isoleucine	-	6
Leucine	1	8
Tyrosine	-	3
Phénylalanine	-	1
Histidine	-	3
Lysine	<u>34</u>	44
Arginine	<u>14</u>	21-22
Nombre de résidus	96	189

* La composition en acides aminés du fragment Px est exprimée en nombre de résidus par mole de peptide.



alanine, thréonine. Des liaisons de type X-sérine peuvent être également coupées par la thermolysine.

Le fragment Px contient 17 résidus d'alanine, 1 résidu de leucine, 3 résidus de valine, 3 résidus de thréonine et 12 résidus de sérine qui constituent autant de sites potentiels de clivage par la thermolysine.

Les deux hydrolyses du fragment Px de l'histone H5 par la thermolysine sont réalisées, à 20°C, en milieu N-méthylmorpholine 0,1M pH 8,0, pendant 30 minutes et 2 heures, en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/250. Les hydrolyses sont arrêtées en abaissant le pH à 3,5 par de l'acide formique à 70 %. Les hydrolysats sont ensuite lyophilisés.

b) Hydrolyse du fragment Px par la trypsine après
.....
citraconylation
.....

Le peptide Px contient 34 résidus de lysine et 14 résidus d'arginine sur un total de 96 résidus. En limitant la coupure par la trypsine aux seules liaisons arginyles, cela permet d'obtenir un nombre restreint de peptides et de taille relativement importante.

Le blocage du groupement ε-aminé des résidus de lysine peut être fait par citraconylation (41).

L'anhydride citraconique réagit spécifiquement avec les groupes ε-aminés libres de la protéine. La citraconylation est réversible et le déblocage des fonctions ε-aminées est obtenu rapidement à pH 3,5 et à 40°C.

- Obtention du fragment Px citraconylé

Le fragment Px est dissous dans un tampon K_2HPO_4 0,1M pH 9,0 à 0°C. La citraconylation est réalisée en ajoutant progressivement

10 μ moles d'anhydride citraconique par μ mole de lysine. Le pH est maintenu constant à 9,0 par addition de soude 2N.

Un dessalage est effectué sur une colonne de Sephadex G.50 F (140 x 2,5 cm) éluée et équilibrée par NH_4OH 5 mM.

- Hydrolyse trypsique du fragment Px citraconylé

Le fragment Px est hydrolysé à 37°C pendant 2 heures en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1M pH 8,0 avec de la trypsine traitée par le TPCK* (inhibiteur de la chymotrypsine).

Le rapport enzyme/substrat est de 1/50 en poids. L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu en abaissant le pH à 3,5 par addition d'acide formique à 70 %.

La décitraconylation complète des peptides est obtenue en maintenant l'hydrolysât à pH 3,5 et à 40°C pendant 3 heures. L'hydrolysât est alors lyophilisé.

c) Hydrolyses du fragment Px par l'élastase
.....

L'élastase hydrolyse les liaisons peptidiques du côté NH_2 -terminal ou COOH -terminal des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe non aromatique : alanine, valine, isoleucine et leucine.

L'hydrolyse est effectuée à 37°C en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1M pH 8,0 pendant 30 minutes en utilisant un rapport enzyme/substrat de 1/500 ou pendant 2 heures avec un rapport enzyme/substrat de 1/100.



* TPCK : L-(1-tosylamido-2-phényl) éthyl chlorométhyl cétone.

3-2-2 Fractionnement des hydrolysats

a) Chromatographie de Gel-filtration

Les différents hydrolysats sont fractionnés sur une colonne de Sephadex G.25, G.50 F ou G.100 (200 x 2,5 cm) ou (140 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par HCl 0,01 N.

Les fractions correspondant à un pic du diagramme d'éluion obtenu par lecture de la densité optique à 220 nm sont rassemblées et lyophilisées. Les fractions peptidiques sont dissoutes dans 2 ml de HCl 0,01 N et conservées à -20°C.

b) Chromatographie d'échange d'ions

- Chromatographie sur colonne de carboxyméthyl-cellulose.

Les peptides les plus basiques sont fractionnés sur une colonne (20 x 2,5 cm) de carboxyméthyl-cellulose (CM. Cellulose 52 Whatman).

La colonne est équilibrée en tampon acétate d'ammonium 20 mM ajusté à pH 6,0 par HCl et les peptides sont élués avec un gradient linéaire de NaCl de 0,2 à 0,6 M.

- Chromatographie sur colonne de Chromobeads P.

Les fractions éluées tardivement au cours de la chromatographie de gel filtration sont souvent complexes et correspondent généralement à des peptides de petite taille moléculaire. Ces peptides sont fractionnés sur une colonne de résine Chromobeads P (Technicon Corporation) équilibrée dans un tampon pyridine 0,1 M (ajusté à pH 2,9 par de l'acide formique pur) et thermostatée à 60°C.

L'élution des peptides est réalisée avec un gradient de pH croissant de 2,9 à 5,0 et de molarité croissante en pyridine de 0,1 à 2 M (155).

Les peptides basiques, encore fixés sur la résine après le passage du gradient, sont élués avec du tampon pyridine 2 M - acide acétique pH 7,0.

La détection des peptides s'effectue par la réaction à la ninhydrine et la réaction de SAKAGUCHI (pour les peptides contenant de l'arginine) sur des aliquotes prélevées automatiquement dans chaque fraction de l'éluat.

3-2-3 Contrôle de pureté des fractions peptidiques

Chaque fraction est soumise à un contrôle de pureté par chromatographie et électrophorèse sur papier Whatman 3 MM préalablement lavé à l'acide acétique à 10 %.

La chromatographie est réalisée pendant 18 heures dans le solvant n-butanol/pyridine/acide acétique/eau (15:10:3:12) (v/v) en présence de rouge de phénol utilisé comme marqueur externe.

L'électrophorèse se fait perpendiculairement à la chromatographie pendant 75 minutes sous un voltage de 2 200 volts dans un tampon de pH 3,6 (pyridine/acide acétique/eau) (1:10:289) (v/v) et en présence d'acides aminés (acide aspartique, tyrosine, arginine) comme marqueurs de migration.

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme avec le réactif ninhydrine-cadmium (84). Pour les peptides renfermant de l'arginine, la révélation à la phénanthrène-quinone a été utilisée (43), (158).

Les gros fragments peptidiques sont soumis à l'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à 17 % d'acrylamide en milieu urée 2,5 M et à pH 2,7 selon la technique de PANYIM et CHACKLEY (109).

3-2-4 Etude structurale des peptides

L'étude de chaque peptide est faite selon le schéma suivant :

- composition en acides aminés sur Autoanalyseur Beckman, type Multichrom A.

- détermination de l'extrémité NH₂-terminale par dansylation suivant le protocole décrit par GRAY et HARTLEY (62).

- détermination de l'extrémité COOH-terminale par hydrolyse par les carboxypeptidases A, B ou C*.

- détermination de la séquence par dégradation récurrente de EDMAN (44) utilisée en méthode manuelle ou en méthode automatique* sur Séquenceur Beckman 890 C ou par la méthode de CHANG*(30) utilisant le 4-NN-diméthylaminoazobenzène 4'-isothiocyanate.

- identification des PTH amino-acides par microchromatographie sur couche mince (35), chromatographie liquide à haute performance* (66), et par chromatographie en phase gazeuse*(110).

3-3 Résultats

La séquence complète des 111 premiers résidus est connue (publication 1 et 2), (113), (114).

*Ces techniques sont détaillées dans l'appendice technique (page 116).

Les hydrolyses de l'histone H5, du fragment NB-4 (résidus 59 à 189) obtenu par coupure de l'histone H5 avec la N-bromosuccinimide, par la trypsine et la thermolysine nous ont donné des séquences peptidiques importantes appartenant à la partie COOH-terminale de la molécule (résidus 112 à 189). Ces résultats apparaissent dans le tableau VI, page 58 . Il était donc nécessaire d'obtenir de gros fragments peptidiques pour le recouvrement et l'alignement de ces petits peptides dans la séquence de l'histone H5.

3-3-1 Dégradation automatique de EDMAN du fragment Px

Ce peptide a été soumis à une dégradation automatique de EDMAN sur un séquenceur Beckman 890 B au laboratoire du Docteur COHEN-SOLAL à Créteil (Unité INSERM 91).

La détermination de séquence a été effectuée sur 470 nanomoles en tampon diméthylbenzylamine 0,8 M.

L'identification des PTH amino-acides a été faite par microchromatographie sur couche mince (35) et par chromatographie en phase gazeuse (110).

Nous avons pu établir la séquence des 32 premiers résidus du peptide Px et prolonger ainsi la séquence jusqu'au résidu 125.

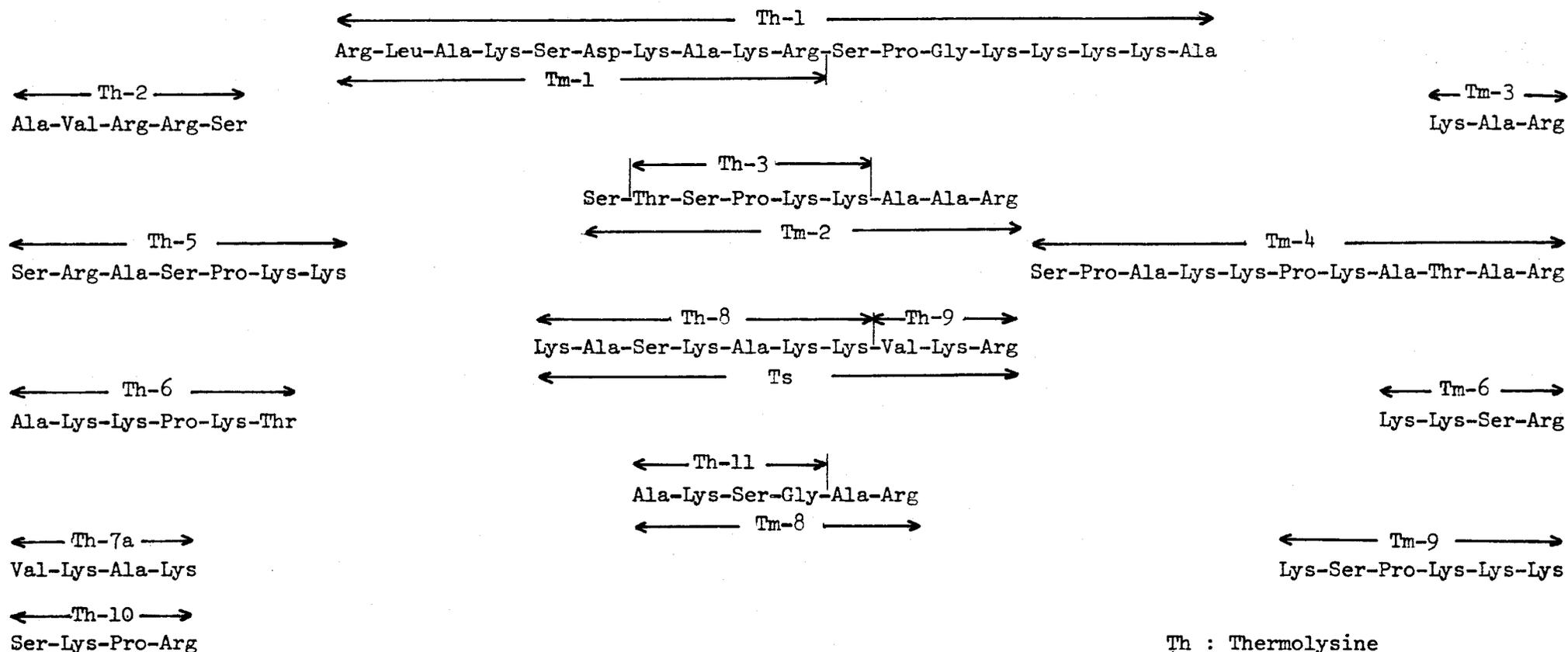
Cette séquence NH₂-terminale du fragment Px comporte deux résidus de proline, de nombreux résidus basiques et tout particulièrement un enchainement (Lys)₄ qui diminuent le rendement de la dégradation automatique de EDMAN.

3-3-2 Etude des peptides obtenus par hydrolyse du fragment Px avec la thermolysine

Nomenclature Les peptides obtenus par hydrolyse du peptide Px par la thermolysine sont désignés par Th et numérotés suivant leur position

PEPTIDES THERMOLYSIQUES ET TRYPSIQUES DE LA PARTIE COOH-TERMINALE DE L'HISTONE H5

Ces peptides nous ont fourni les recouvrements nécessaires pour l'alignement des peptides obtenus par l'élastase, ainsi que les données structurales pour déterminer la structure d'un long peptide (peptide Th-4, résidus 121 à 146) obtenu par hydrolyse brève du fragment Px avec la thermolysine.



Les peptides sont numérotés selon leur position dans la séquence.

Th : Thermolysine
 Tm : Trypsine (maléylation)
 Ts : Trypsine (succinylation)



TABLEAU VI

dans la séquence (Publication 3), (23).

La composition en acides aminés du Px indique 23 sites potentiels de coupure par la thermolysine (Thr, Ala, Val, Leu), avec des possibilités de coupure au niveau des 12 résidus de sérine bien que cet acide aminé n'ait pas un caractère hydrophobe.

L'intérêt de réaliser l'hydrolyse pendant 30 minutes ou 2 heures et à température ambiante est donc de limiter les coupures aux seuls résidus d'alanine et de valine qui permet l'obtention de fragments peptidiques particulièrement intéressants : Th-4 (26 résidus), Th-7 (7 résidus) et Th-12 (10 résidus).

Le peptide Th-7 de séquence Val-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg-Lys, habituellement coupé par la thermolysine et la trypsine au niveau de la liaison Lys-Ser assure un recouvrement essentiel.

Les conditions d'hydrolyse, par la thermolysine du fragment Px pour l'obtention de ces trois peptides, sont présentées dans le tableau VII (page 60).

Peptide Th-4 (Résidus 121 à 146)

Ala - Ala - Arg - Pro - Arg - Lys - Ala - Arg - Ser - Pro - Ala - Lys - Lys -
Pro - Lys - Ala - Thr - Ala - Arg - Lys - Ala - Arg - Lys - Lys - Ser - Arg

Le diagramme d'élution des peptides thermolysiques fractionnés sur colonne de Sephadex G. 100 (200 x 2,5 cm), est présenté dans la figure 11 (page 61).

Nous nous intéresserons uniquement à la fraction 1S qui renferme un composant majeur légèrement contaminé par des constituants de migration électrophorétique plus rapide.

CONDITIONS DES HYDROLYSES PAR LA THERMOLYSINE DU FRAGMENT Px

DE L'HISTONE H5 DE POULET

	pH	Température	Rapport enzyme/substrat	Durée de l'hydrolyse
Peptide Th-4 Résidus 121 à 146	8,0	20°C	1/250	30 mn
Peptide Th-7 Résidus 158 à 164	8,0	20°C	1/250	2 h.
Peptide Th-12 Résidus 180 à 189				

TABLEAU VII



CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G.100 DES PEPTIDES

OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 30 MINUTES DU FRAGMENT Px AVEC LA THERMOLYSINE

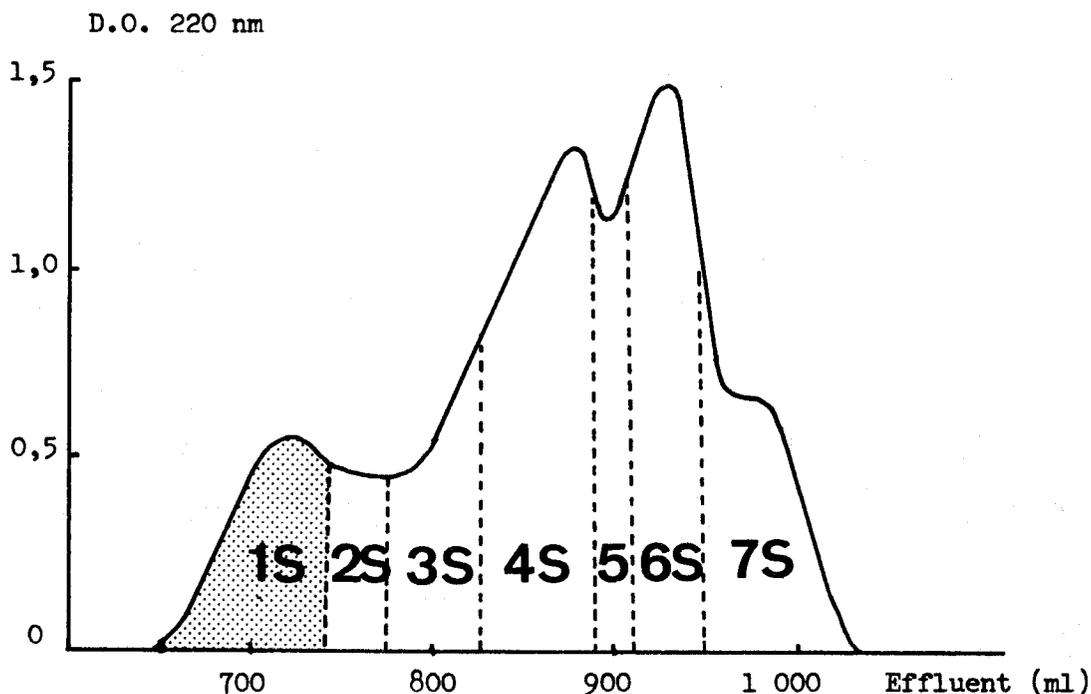


figure 11

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 1S SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

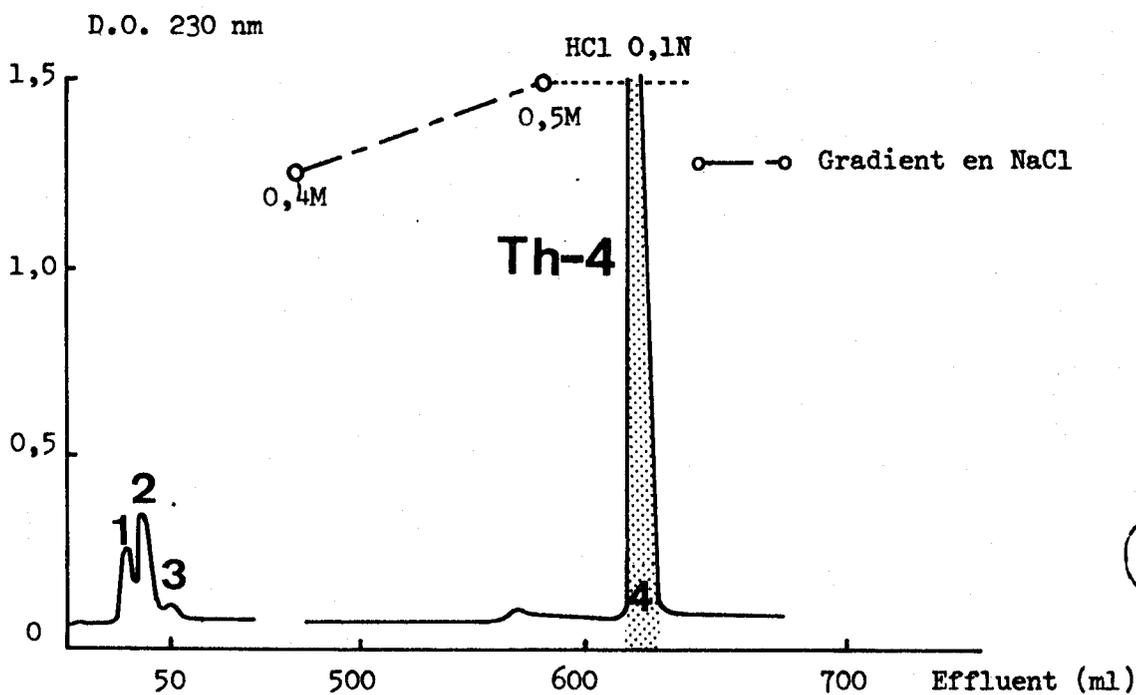


figure 12

Cette fraction 1S hétérogène est chromatographiée sur une colonne de carboxyméthyl-cellulose dans les conditions décrites précédemment. Le diagramme d'élution apparaît dans la figure 12 (page 61).

La fraction 4 de ce diagramme renferme le peptide majeur de la fraction 1S. La composition en acides aminés de ce peptide Th-4 est la suivante :

Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	Arg
1,3 (1)	2,4 (2)	3,2 (3)	7,0 (7)	0,5 (0)	7,4 (7)	5,6 (6)

a) Dansylamino-acide NH₂-terminal
.....

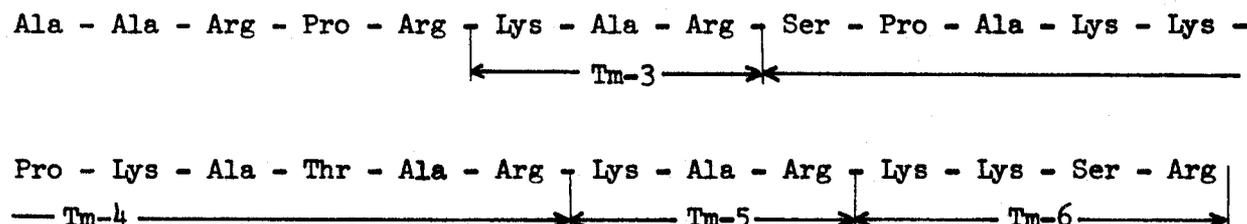
Deux dansylamino-acides sont obtenus : la DNS-Ala qui constitue le dérivé majeur et la DNS-Ser qui constitue le dérivé mineur. L'obtention de ces deux dérivés dansylés montre que la purification du peptide Th-4 par chromatographie sur CM-Cellulose est incomplète. Toutefois, malgré la présence d'un contaminant mineur dans le peptide Th-4, nous avons pu déterminer la séquence NH₂-terminale.

b) Dégradation automatique de EDMAN
.....

Ce peptide a été soumis à la dégradation automatique de EDMAN sur séquenceur Beckman 890 C avec un programme diméthylallylamine (DMAA) et en présence de polybrène (69), (131).

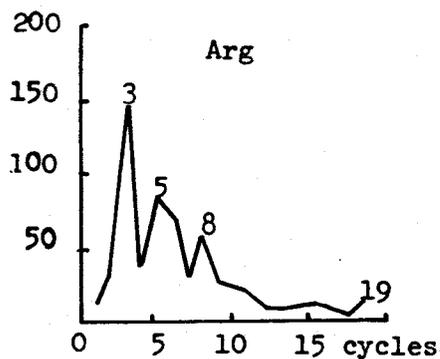
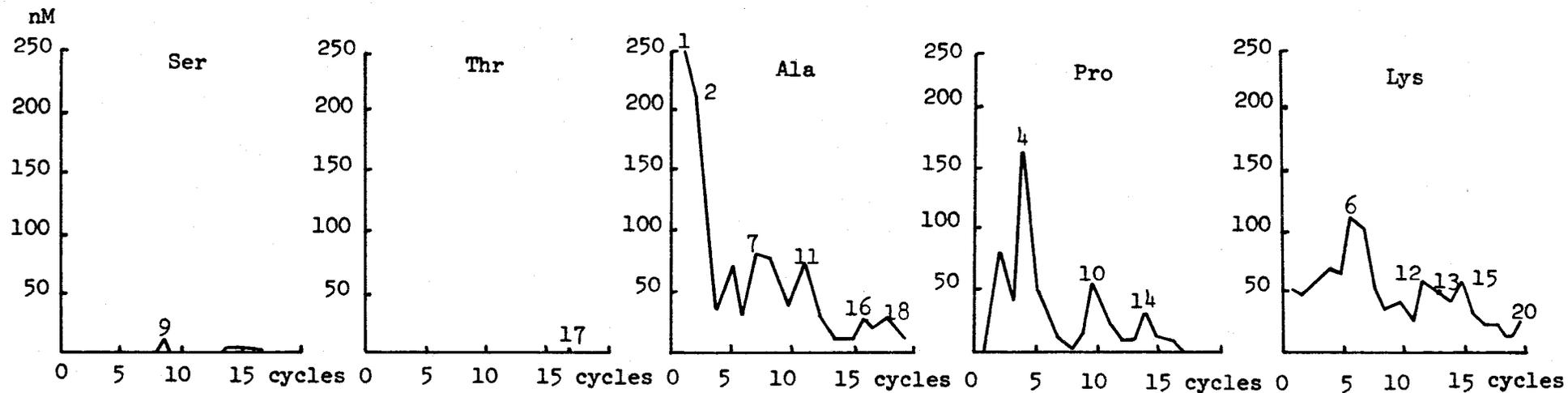
Nous avons pu ainsi déterminer la séquence des 20 premiers résidus avec toutefois une incertitude pour les résidus 17 (Thr) et 19 (Arg), (tableau VIII, page 63).

La séquence complète du peptide Th-4 a été élucidée grâce aux peptides tryptiques Tm-3, Tm-4, Tm-5, Tm-6 obtenus précédemment (tableau VI, page 58) par hydrolyse tryptique de l'histone H5 maléylée.



RESULTATS DE LA DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN DU PEPTIDE Th-4 (résidus 121 à 146)

OBTENU PAR HYDROLYSE DU FRAGMENT P_x PAR LA THERMOLYSINE



Chaque nombre placé en haut d'un pic correspond au cycle où la phénylthiohydantoïne considérée a été identifiée.

nM : nanomoles

TABLEAU VIII



Peptide Th-7 (Résidus 158 à 164)

Val - Lys - Ala - Lys - Ser - Arg - Lys

Ce peptide est obtenu par action de la thermolysine sur le fragment Px dans des conditions d'hydrolyse limitée (2 heures, température ambiante, rapport enzyme/substrat 1/250).

Le diagramme d'éluion des peptides sur colonne de Sephadex G. 25 (200 x 2,5 cm) est présenté dans la figure 13 (page 65)

La fraction 4S contenant le peptide Th-7 a été chromatographiée sur une colonne de CM-Cellulose suivant les conditions décrites précédemment. Le diagramme d'éluion est présenté dans la figure 14 (page 65) La fraction 6 correspond au peptide Th-7.

a) Composition en acides aminés
.....

Ser	Ala	Val	Lys	Arg
1,28 (1)	0,96 (1)	1,00 (1)	2,93 (3)	1,28 (1)

b) Dansylamino-acide NH₂-terminal
.....2.....

DNS - Val

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase B
.....

L'hydrolyse du peptide Th-7 par la carboxypeptidase B pendant 4 heures donne la séquence COOH-terminale : Arg - Lys .

Le fragment Px contient 3 résidus de valine placés dans les peptides suivants obtenus par hydrolyse du fragment NB-4 par la thermolysine (tableau VI, page 58).

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G.25 DES PEPTIDES

OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 2 HEURES DU FRAGMENT P_x AVEC LA THERMOLYSINE

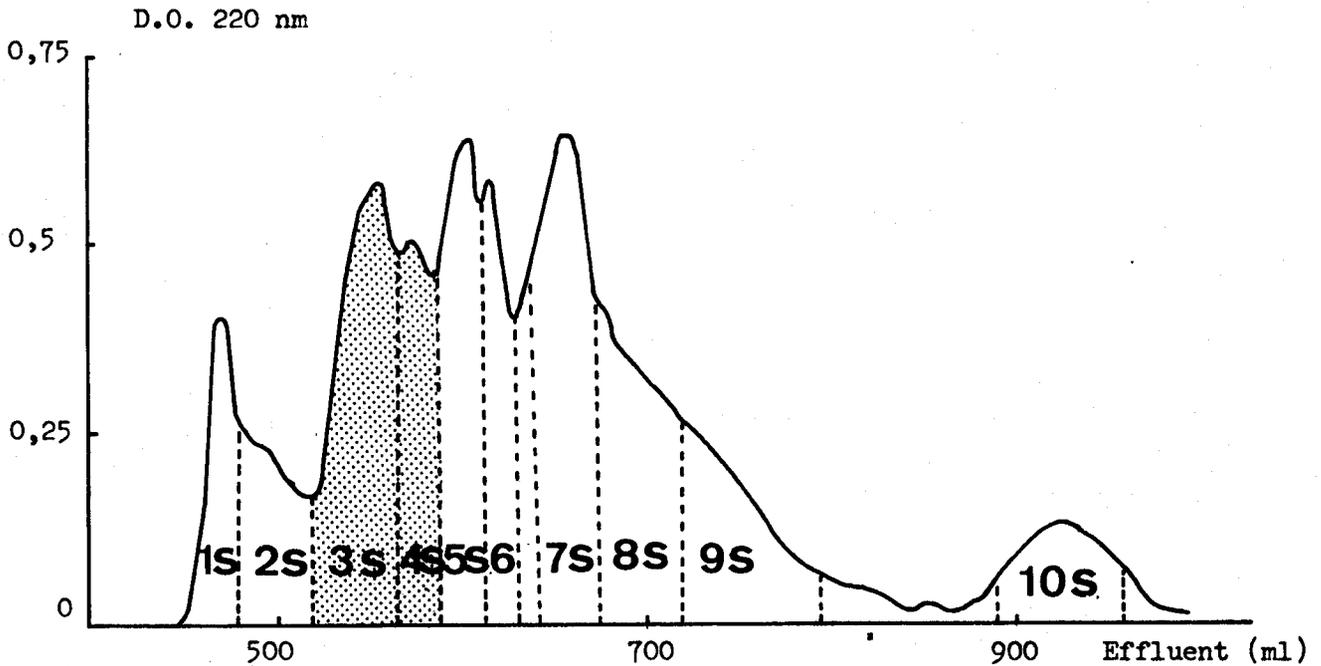


figure 13

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 3S
SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

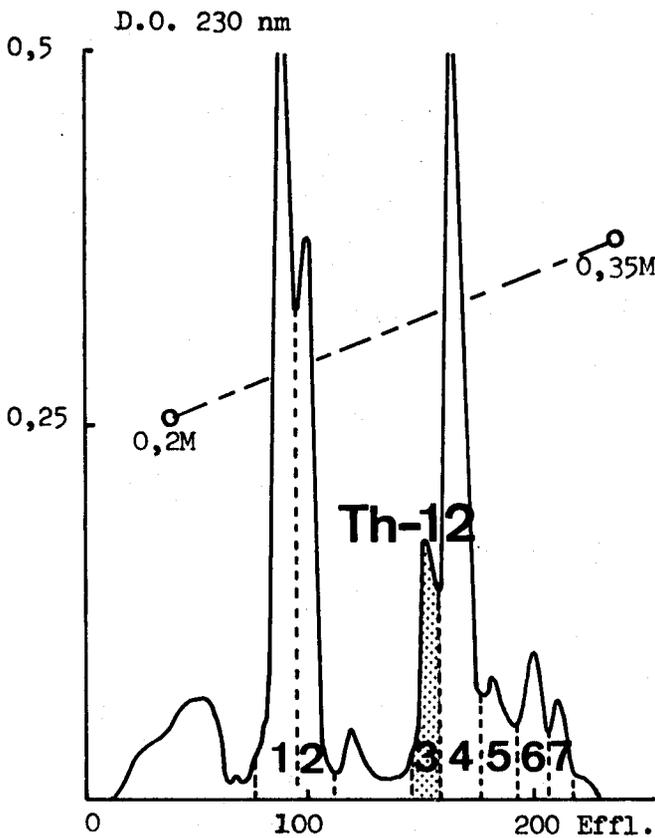


figure 15

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 4S
SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

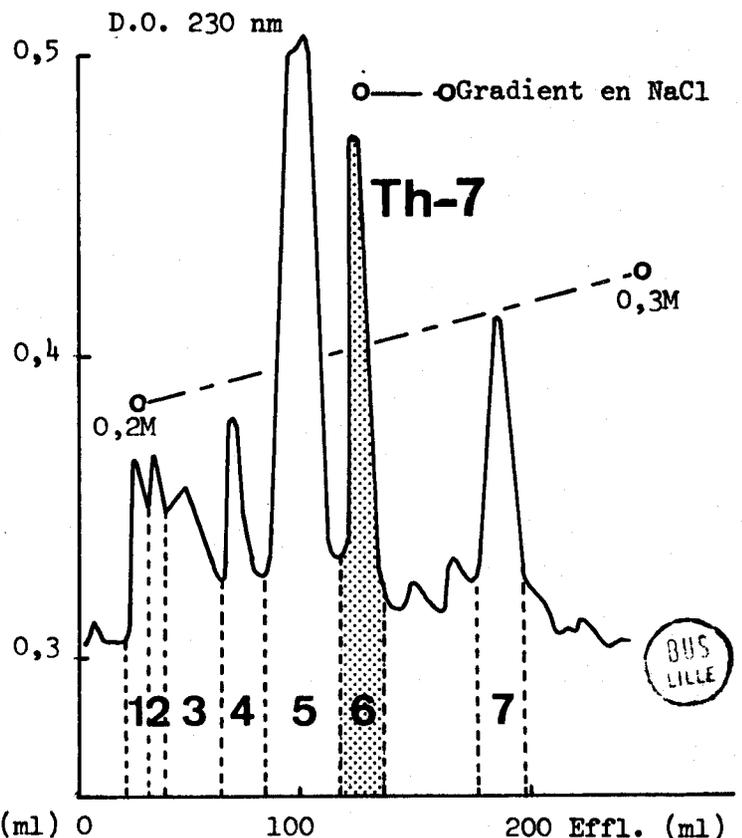


figure 14

Th-2 Ala - Val - Arg - Arg - Ser

Th-9 Val - Lys - Arg

Th-7a Val - Lys - Ala - Lys

La séquence du peptide Th-7a, la composition en acides aminés et les résultats de séquence obtenus sur le peptide Th-7 permettent de déduire sa séquence complète sans ambiguïté.

Val - Lys - Ala - Lys - Ser - Arg - Lys
← Th-7a →

Peptide Th-12 (Résidus 180 à 189)

Ser - Gly - Ala - Arg - Lys - Ser - Pro - Lys - Lys - Lys

Ce peptide présent dans la fraction 3S de l'hydrolysat thermolysique (2 heures, température ambiante, rapport enzyme/substrat 1/250) fractionné sur colonne de Séphadex (figure 13, page 65) a été purifié sur colonne de CM-Cellulose (figure 15, page 65).

a) Composition en acides aminés
.....

Ser	Pro	Gly	Ala	Lys	Arg
1,57 (2)	0,95 (1)	0,96 (1)	1,09 (1)	3,98 (4)	0,99 (1)

b) Dansylamino-acide NH₂-terminal
.....2.....

DNS - Ser

c) Dégradation automatique de EDMAN
.....

Le peptide Th-12 contient 10 résidus d'acides aminés dont

4 résidus de lysine. Nous avons donc jugé nécessaire de bloquer le groupe ϵ -aminé de ces résidus de lysine par le 3-sulfo-PITC pour éviter que le peptide ne soit entraîné hors de la coupelle du séquenceur automatique pendant les opérations de lavage qui interviennent au cours de la dégradation automatique de EDMAN.

La séquence complète de ce peptide a été établie à partir de 160 nanomoles de peptide traité au 3-sulfo-PITC. La dégradation a été réalisée en tampon diméthylallylamine et en présence de polybrène.

3-3-3 Etude des peptides obtenus par hydrolyse du

fragment Px de l'histone H5 par l'élastase

Nomenclature Les peptides obtenus par hydrolyse du peptide Px par l'élastase sont désignés par E et numérotés suivant leur position dans la séquence (publication 3).

Le peptide Px est hydrolysé pendant 30 minutes en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1M pH 8,0 à 37°C avec un rapport enzyme/substrat de 1:500.

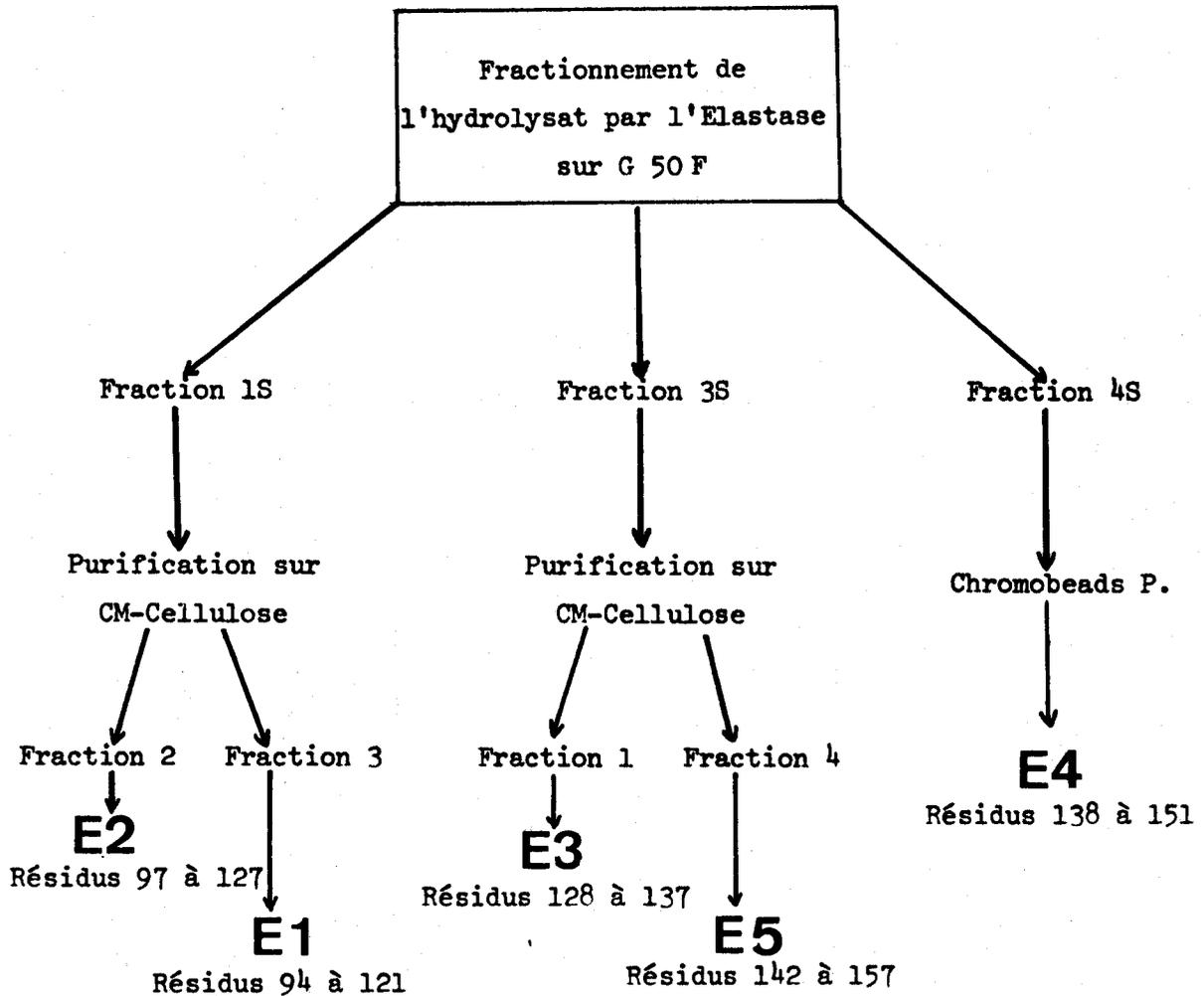
Les peptides résultant de cette hydrolyse sont fractionnés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 50 F.

La courbe d'élution de ces peptides est présentée dans la figure 17 (page 69). Cinq fractions, 1S, 2S, 3S, 4S et 5S sont obtenues. En raison de leur hétérogénéité, ces fractions ont été chromatographiées sur une colonne de carboxyméthyl-cellulose dans les conditions décrites précédemment. L'obtention des peptides est schématisée dans le tableau IX (page 68)

Peptide E1 (Résidus 94 à 121)

Arg - Leu - Ala - Lys - Ser - Asp - Lys - Ala - Lys - Arg - Ser - Pro - Gly -
Lys - Lys - Lys - Lys - Ala - Val - Arg - Arg - Ser - Thr - Ser - Pro - Lys -
Lys - Ala

SCHEMA D'OBTENTION DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT PAR L'ELASTASE



Les chromatographies sur colonnes de Sephadex G.50 F, de CM-Cellulose et de Chromobeads P. sont présentées dans les figures 17 (page 69), 17a, 17b (page 70) et 17c (page 71).

TABLEAU IX

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G.50 F DES PEPTIDES

OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 30 MINUTES DU FRAGMENT P_x AVEC L'ELASTASE

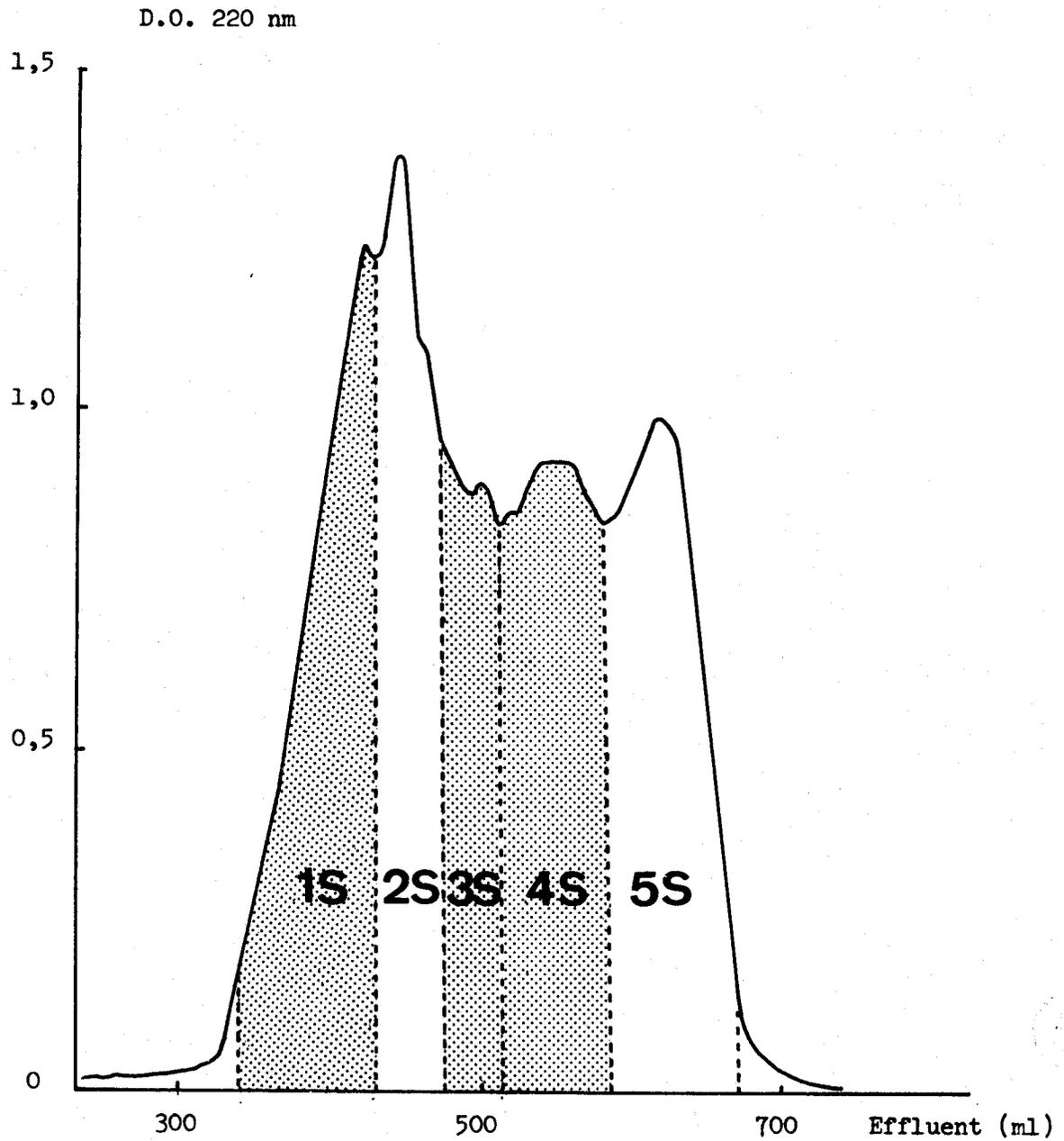


figure 17

0. 230 nm
0,6

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 1S SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

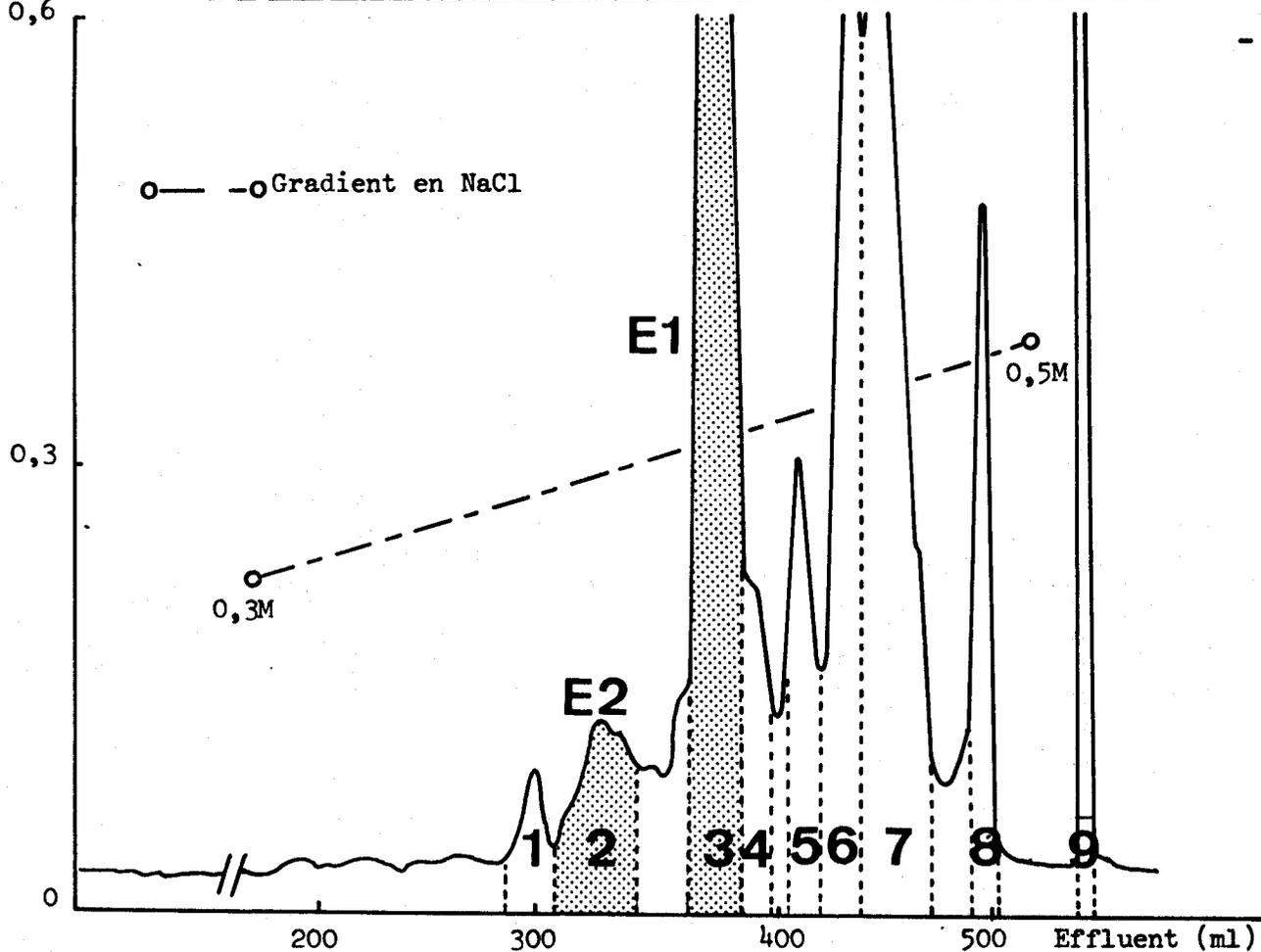


figure 17a

0. 230 nm

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 3S SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

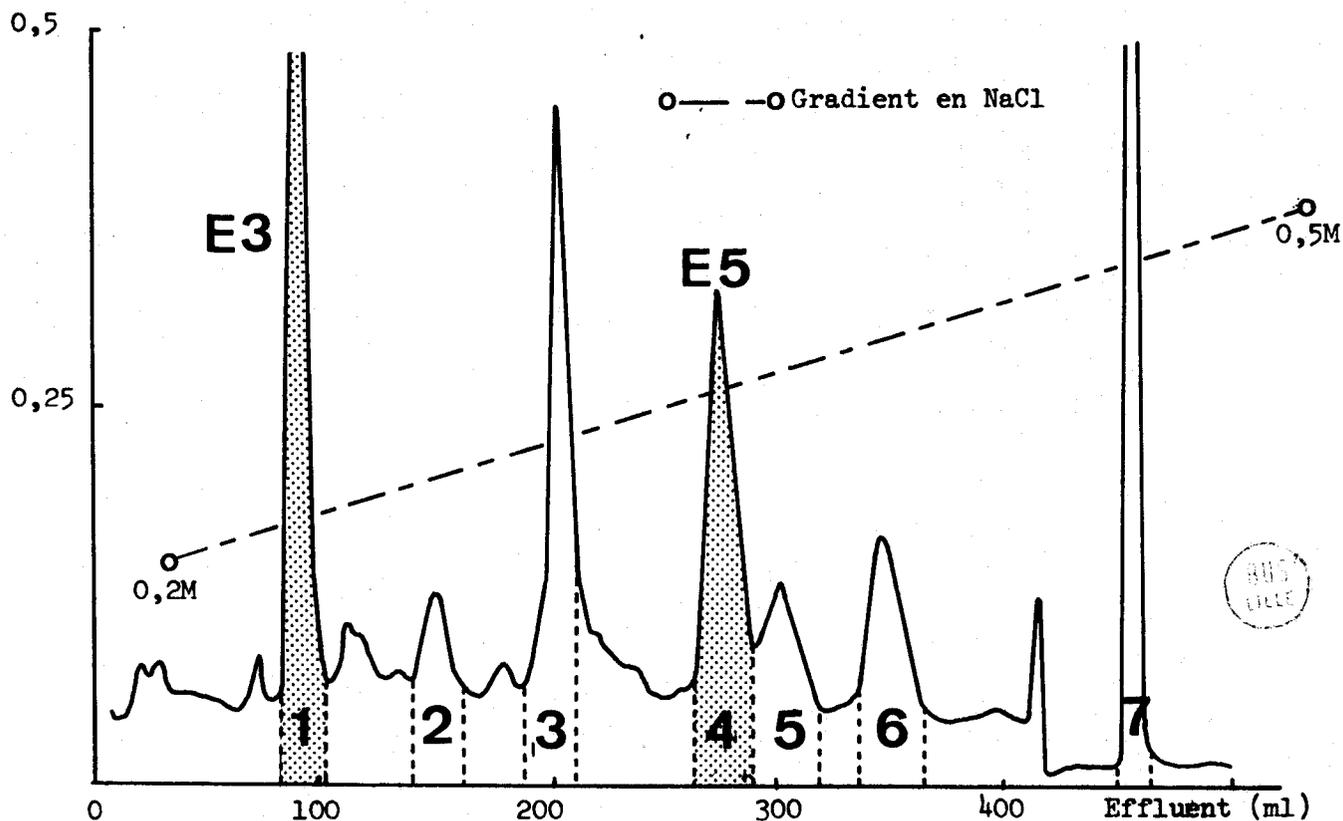


figure 17b

SEPARATION DES PEPTIDES OBTENUS PAR L'ELASTASE, DE LA FRACTION 4S

SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

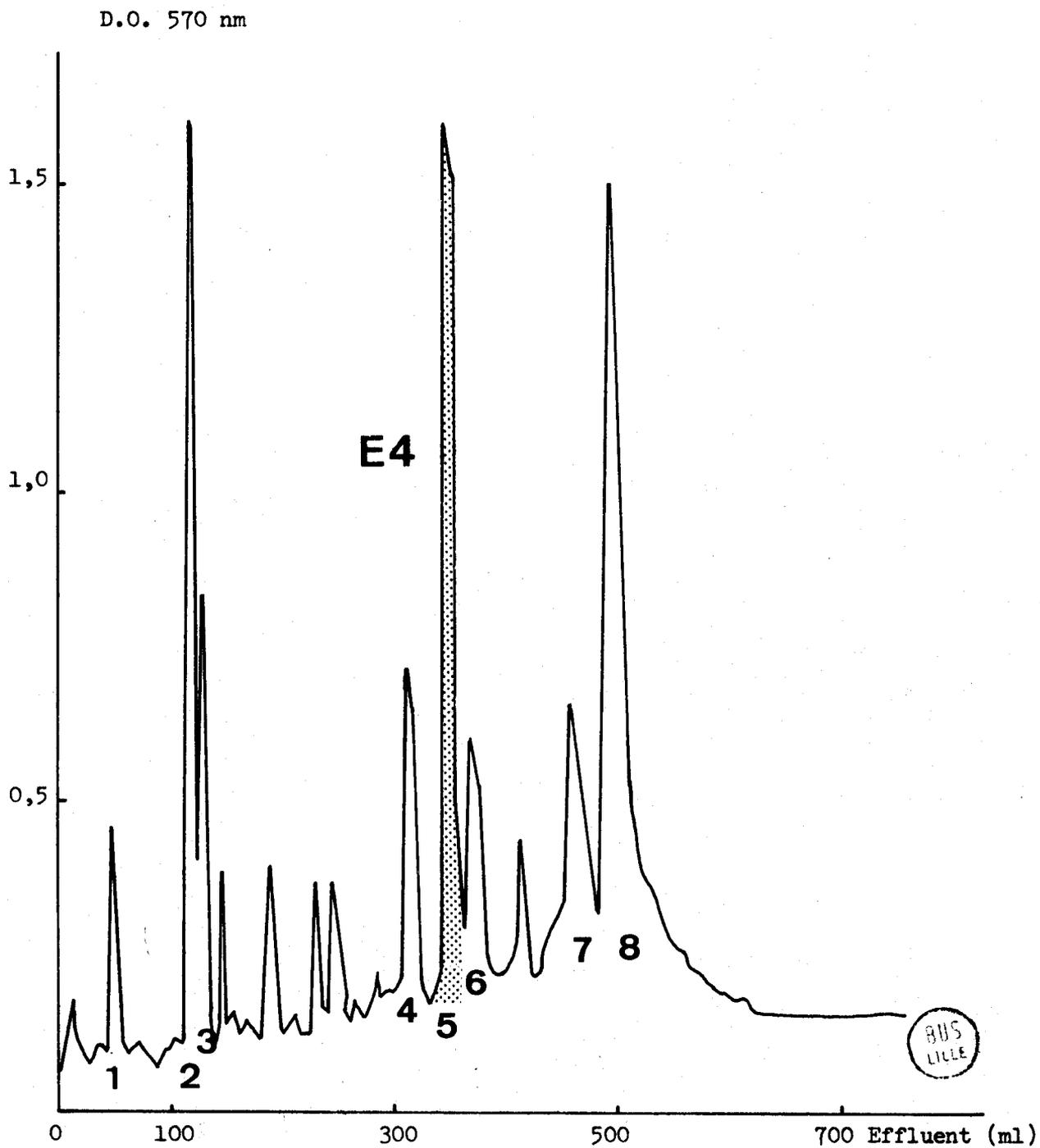


figure 17c

Peptide E2 (Résidus 97 à 127)

Lys - Ser - Asp - Lys - Ala - Lys - Arg - Ser - Pro - Gly - Lys - Lys - Lys -
 Lys - Ala - Val - Arg - Arg - Ser - Thr - Ser - Pro - Lys - Lys - Ala - Ala -
 Arg - Pro - Arg - Lys - Ala

a) Composition en acides aminés

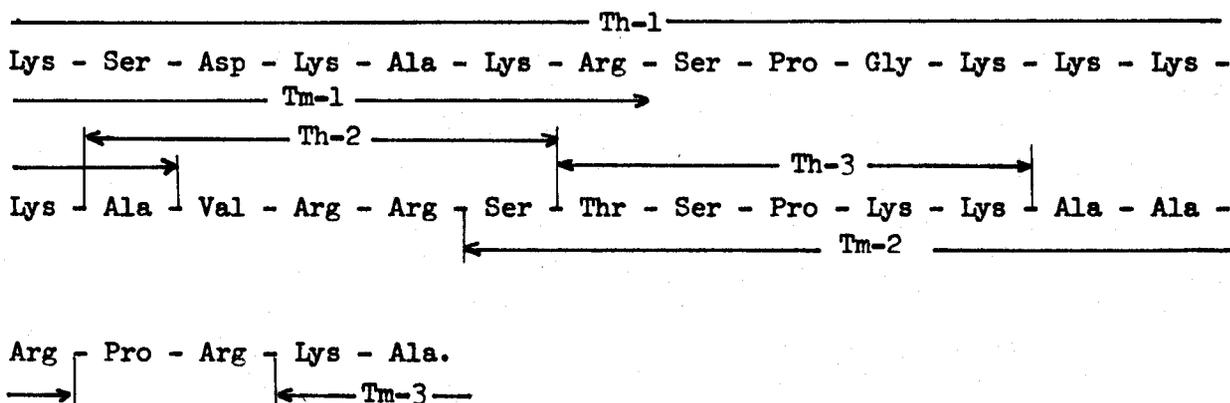
Asp	Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Val
0,92 (1)	0,98 (1)	4,03 (4)	3,17 (3)	1,42 (1)	4,42 (5)	0,89 (1)
Lys	Arg					
10,44 (10)	3,97 (4)					

Ce peptide se caractérise par la présence de l'unique résidu d'acide aspartique et de l'un des deux résidus de glycine du fragment Px.

b) Dégradation de EDMAN

Trois cycles de dégradation ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale suivante : Lys - Ser - Asp.

Ces résultats caractérisent le peptide NH₂-terminal du fragment Px (résidus 97 à 117). Le peptide E2 recouvre le peptide E1 et sa séquence complète a été déduite des peptides tryptiques Tm-1, Tm-2, Tm-3, des peptides "thermolysine" Th-1, Th-2, Th-3 (publication 3 et tableau VI, page 58).



Peptide E3 (Résidus 128 à 137)

Arg - Ser - Pro - Ala - Lys - Lys - Pro - Lys - Ala - Thr
135

a) Composition en acides aminés
.....

Thr	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
0,93 (1)	1,33 (1)	2,01 (2)	2,19 (2)	3,39 (3)	0,97 (1)

b) Dansylamino-acide NH₂-terminal
.....

DNS - Arg

c) Dégradation de EDMAN modifiée utilisant le 4-NN-
.....
diméthylaminoazobenzène 4'-isothiocyanate
.....

Sept dégradations ont permis de déterminer la séquence
NH₂-terminale suivante : Arg - Ser - Pro - Ala - Lys - Lys - Pro.

d) Hydrolyse par la carboxypeptidase A
.....

L'hydrolyse du peptide E3 par la carboxypeptidase A pen-
dant 2 heures a permis d'identifier la séquence COOH-terminale :
Ala - Thr.

La présence d'un résidu de lysine en position 135 a été
déduite de la composition en acides aminés et des études structurales du pep-
tide E3. L'ensemble de ces résultats permet de déterminer la séquence complè-
te du peptide E3, qui est par ailleurs confirmée par la séquence du pepti-
de Tm-4 (tableau VI, page 58).

Peptide E4 (Résidus 138 à 141)

Ala - Arg - Lys - Ala

a) Composition en acides aminés
.....

Ala	Lys	Arg
1,94 (2)	0,97 (1)	1,08 (1)

b) Dégradation de EDMAN modifiée utilisant le DABITC
.....

Quatre cycles de dégradation ont permis de déterminer la séquence complète de ce peptide.

Peptide E5 (Résidus 142 à 157)

Arg - Lys - Lys - Ser - Arg - Ala - Ser - Pro - Lys - Lys - Ala - Lys - Lys -
Pro - Lys - Thr - Val

a) Composition en acides aminés
.....

Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	Arg
0,61 (1)	1,71 (2)	1,58 (2)	1,95 (2)	0,81 (1)	5,85 (6)	2,05 (2)

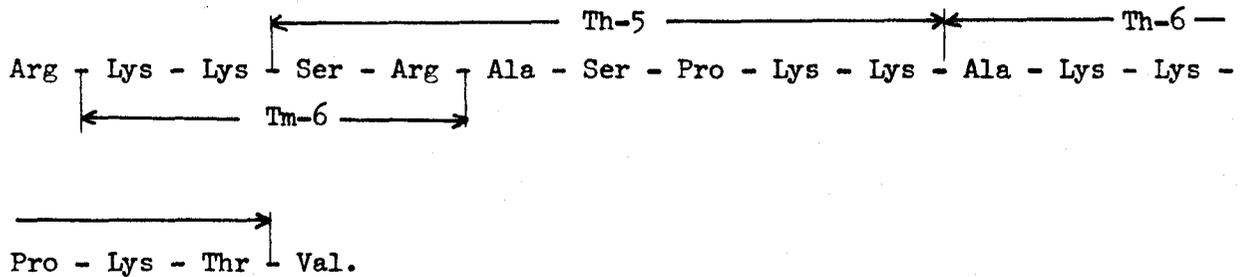
b) Dégradation de EDMAN
.....

Cinq cycles de dégradation de EDMAN ont permis de déterminer la séquence NH₂-terminale suivante : Arg - Lys - Lys - Ser - Arg.

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase A
.....

L'hydrolyse par la carboxypeptidase A pendant 2 heures libère de la valine et de la thréonine.

La séquence complète de ce peptide a été déduite de l'étude structurale des peptides thermolysiques Th-5 et Th-6 et tryptique Tm-6 qui recouvrent le peptide E5.



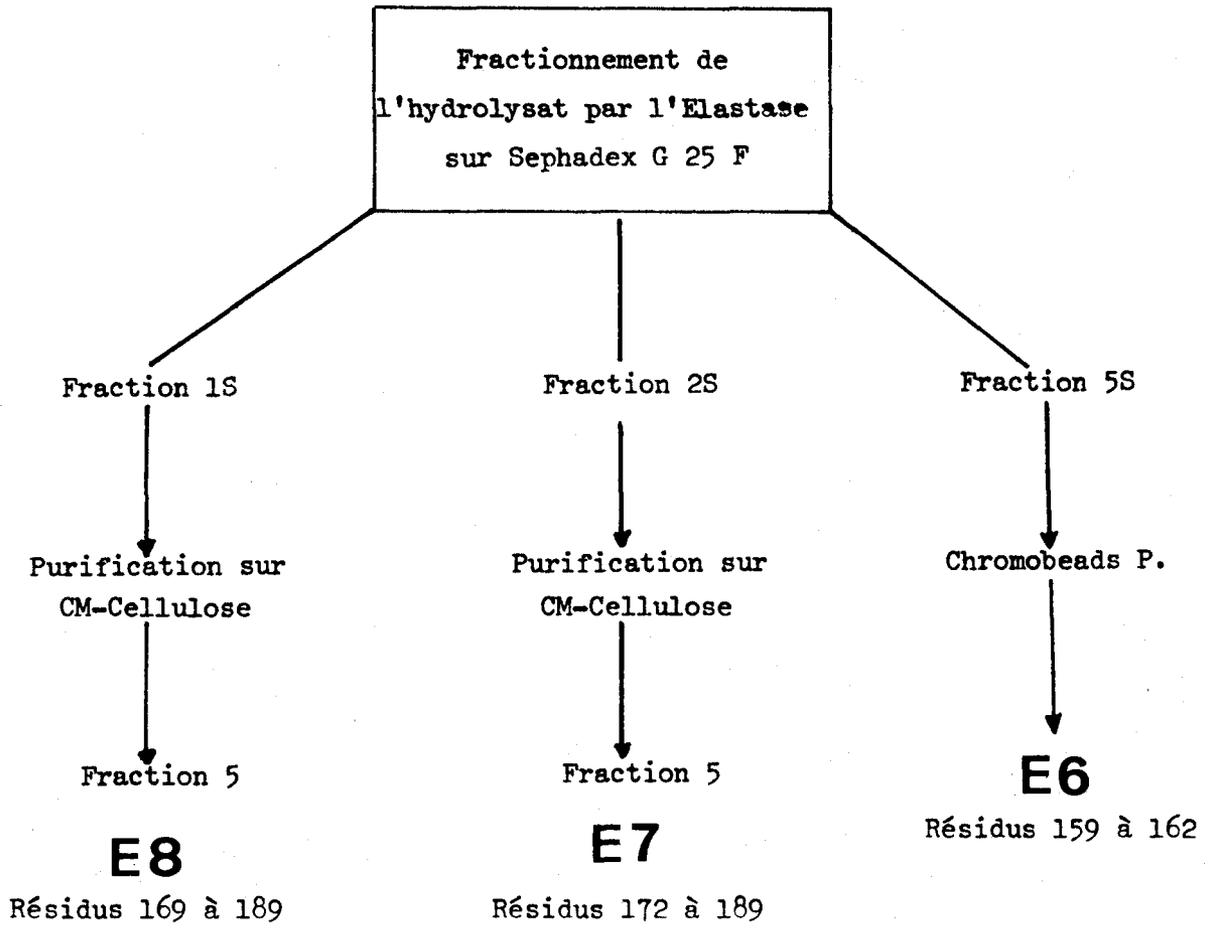
L'hydrolyse du fragment Px par l'élastase dans des conditions limitées (durée : 30 minutes, rapport enzyme/substrat 1/250) nous donne un petit nombre de peptides intéressants. Le faible rendement des peptides obtenus s'explique par la complexité de l'hydrolysats liée aux coupures partielles.

Une deuxième hydrolyse réalisée dans des conditions différentes (durée : 2 heures, rapport enzyme/substrat 1/100) a donc été nécessaire pour obtenir des fragments peptidiques de taille moyenne importants pour le recouvrement de certains peptides tryptiques ou thermolysiques de la région COOH-terminale du fragment Px.

Le fragment Px a été hydrolysé pendant 2 heures par l'élastase en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0 avec un rapport enzyme/substrat de 1/100.

L'hydrolysats a été chromatographié sur une colonne Sephadex G. 25 F (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par HCl 0,01N. Le diagramme d'éluion est présenté dans la figure 18 (page 78).

SCHEMA D'OBTENTION DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT PAR L'ELASTASE



Les chromatographies sur colonnes de Sephadex G. 25 F, de CM-Cellulose et de Chromobeads P. sont présentées dans les figures 18, 18a, 18b (page 78) et 18c (page 79).

TABLEAU X



CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G.25 F DES PEPTIDES

OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 2 HEURES DU FRAGMENT P_x AVEC L'ELASTASE

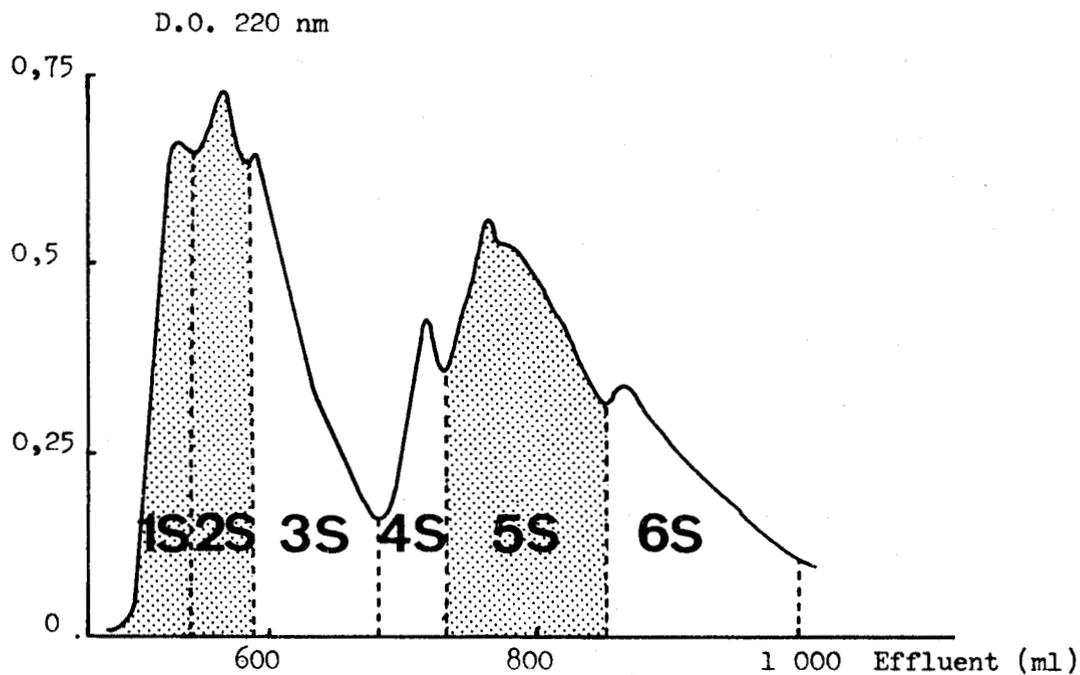


figure 18

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 1S

SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

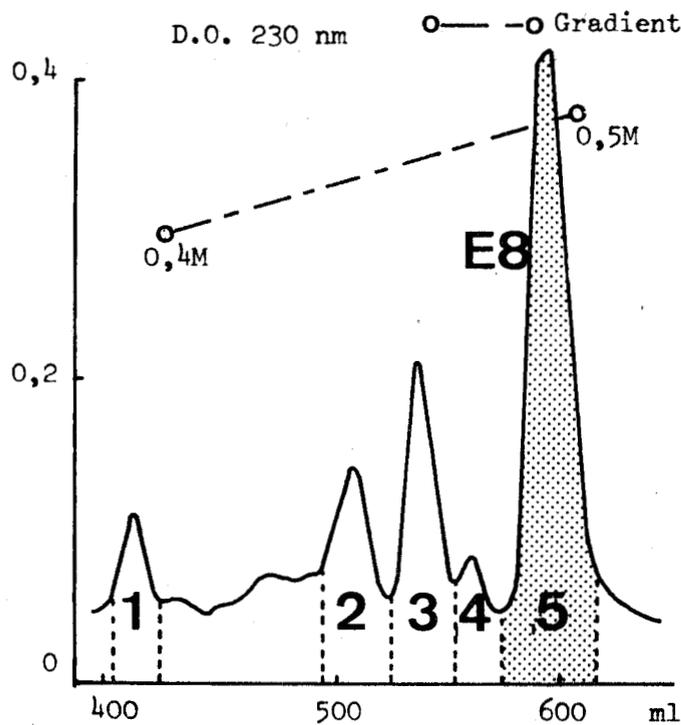


figure 18a

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 2S

SUR COLONNE DE CM-CELLULOSE

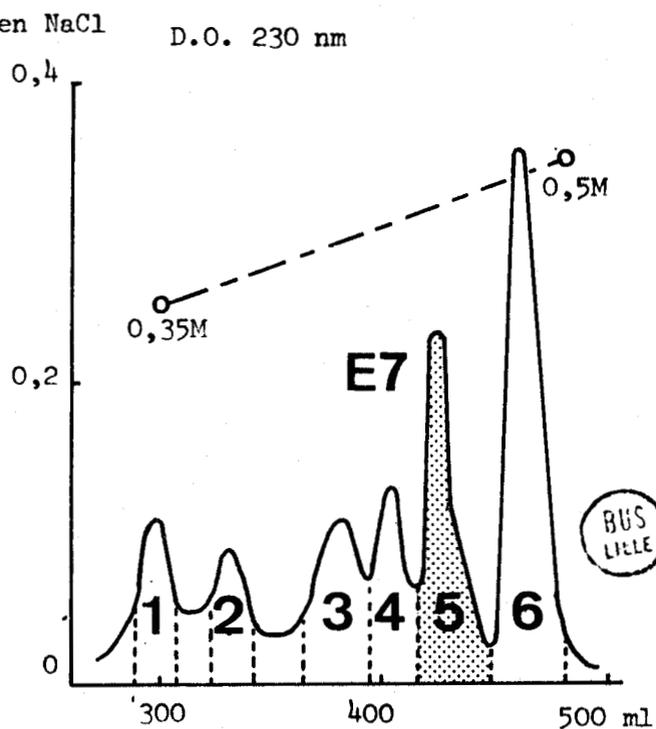


figure 18b

SEPARATION DES PEPTIDES OBTENUS PAR L'ELASTASE, DE LA FRACTION 5S

SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

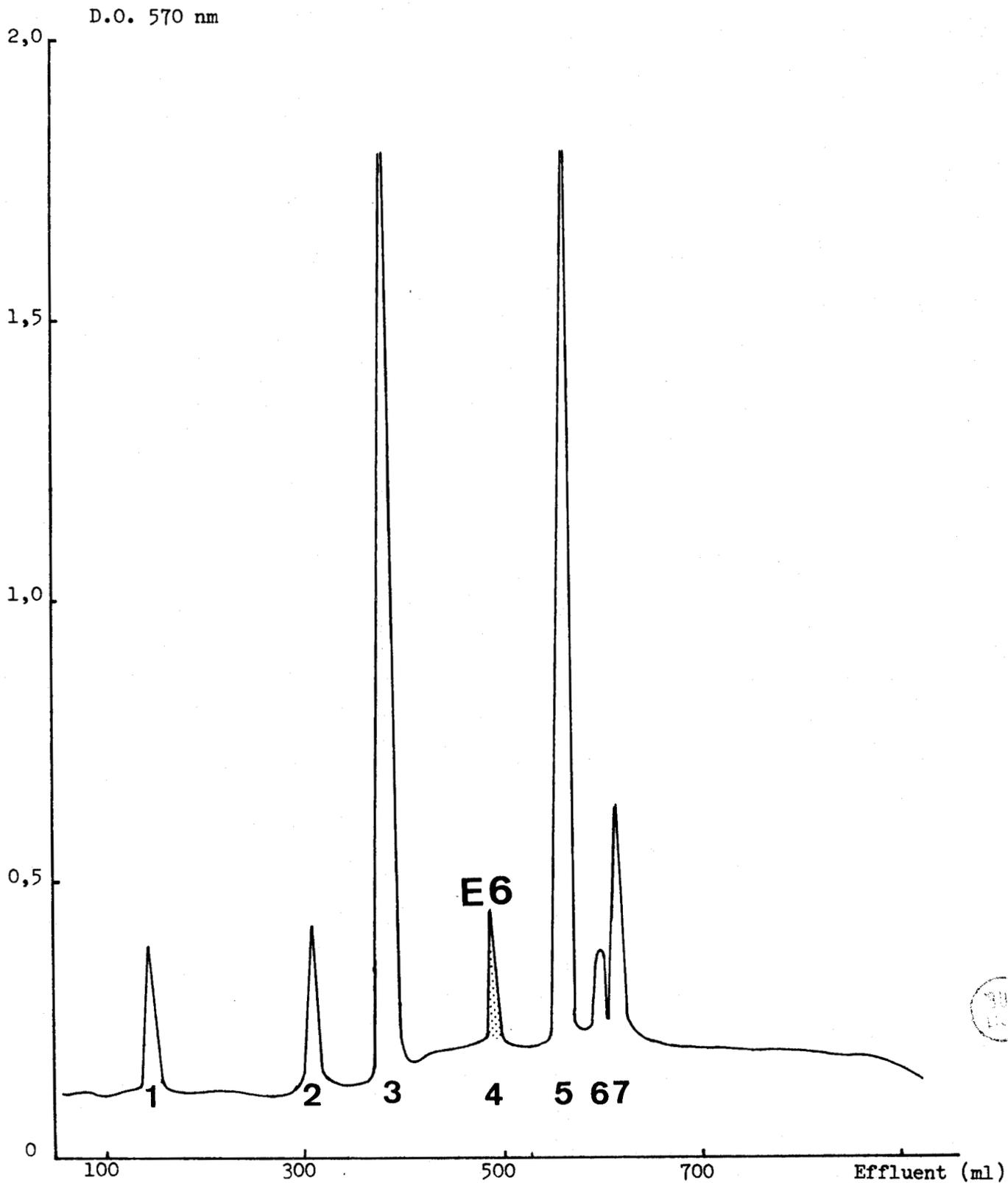


figure 18c

Les fractions 1S, 2S et 5S contenant des peptides intéressants ont été étudiées. L'obtention des peptides élastases de ces fractions est schématisée dans le tableau X (page 77).

Peptide E6 (Résidus 159 à 162)

Lys - Ala - Lys - Ser

a) Composition en acides aminés
.....

Ser	Ala	Lys
0,93 (1)	1,06 (1)	2,01 (2)

b) Dégradation utilisant le D.A.B.I.,T.C.
.....

Trois cycles de dégradation ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale Lys - Ala - Lys. Le résidu de sérine a été placé par différence.

Peptide E7 (Résidus 172 à 189)

Peptide E8 (Résidus 169 à 189)

E7 : Lys - Arg - Ser - Lys - Pro - Arg - Ala - Lys - Ser - Gly - Ala - Arg -
Lys - Ser - Pro - Lys - Lys - Lys.

E8 : Lys - Lys - Val - Lys - Arg - Ser - Lys - Pro - Arg - Ala - Lys - Ser -
Gly - Ala - Arg - Lys - Ser - Pro - Lys - Lys - Lys.

a) Composition en acides aminés
.....

<u>E7</u> :	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Lys	Arg
	2,62 (3)	2,02 (2)	1,04 (1)	1,97 (2)		6,8 (7)	2,96 (3)
<u>E8</u> :	2,61 (3)	1,95 (2)	1,06 (1)	1,90 (2)	0,94 (1)	9,7 (9)	3,13 (3)

Les compositions de ces peptides se caractérisent par la présence de l'unique résidu de glycine de la partie COOH-terminale du fragment Px (résidus 112 à 189). Elles sont très semblables. Toutefois le peptide E8 renferme un résidu de valine et deux résidus de lysine de plus que le peptide E7.

b) Dansylamino-acides NH₂-terminaux
.....

E7 : DNS - Lys
E8 : DNS - Lys

c) Dégradation automatique de EDMAN du peptide E7
.....

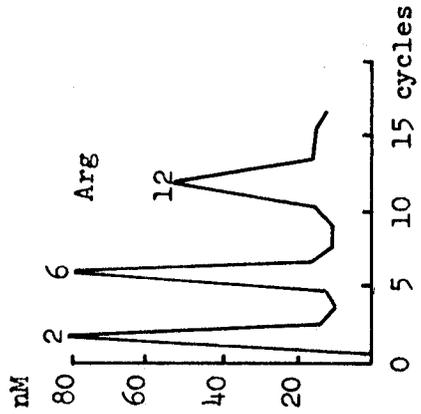
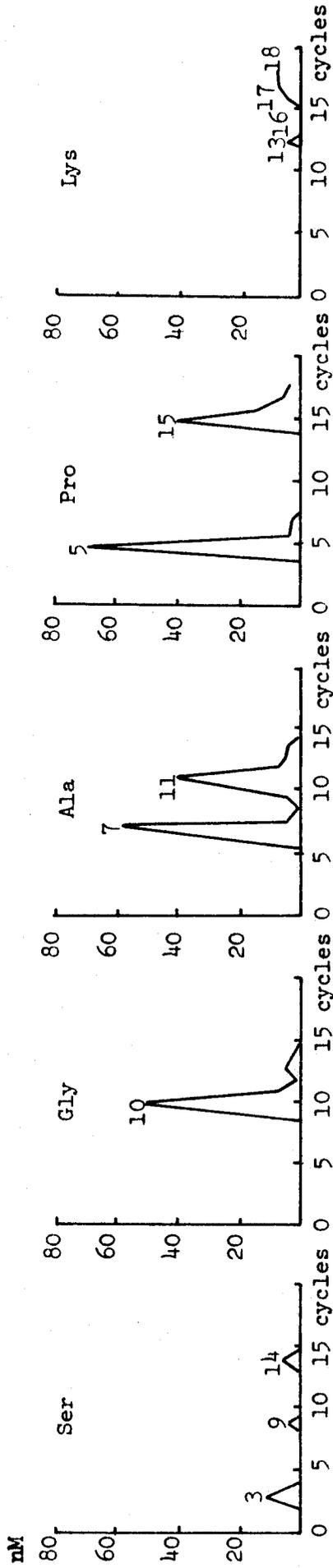
Ce peptide de 18 résidus contenant 7 résidus de lysine a été traité au 3-sulfo-PITC dans le but d'éviter son extraction de la coupelle du séquenceur lors des lavages par le benzène (42).

La dégradation automatique en tampon diméthylallylamine et en présence de polybrène de 270 nmoles de peptide ainsi traité a permis d'en déterminer la séquence complète.

Les résultats de cette dégradation apparaissent dans le tableau XI (page 82). Les résidus de lysine de la partie COOH-terminale du peptide sont partiellement modifiés par le 3-sulfo-PITC en raison d'un encombrement stérique : ils ont donc pu être normalement identifiés en H.P.L.C. Les résidus de lysine en position 1, 4 et 8 ont été déduits de la composition en acides aminés.

RESULTATS DE LA DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN DU PEPTIDE E7 (résidus 172 à 189)

OBTENU PAR HYDROLYSE PAR L'ELASTASE DU FRAGMENT Px



Chaque nombre placé en haut d'un pic correspond au cycle où la phénylthiohydantoïne considérée a été identifiée.

nM : nanomoles

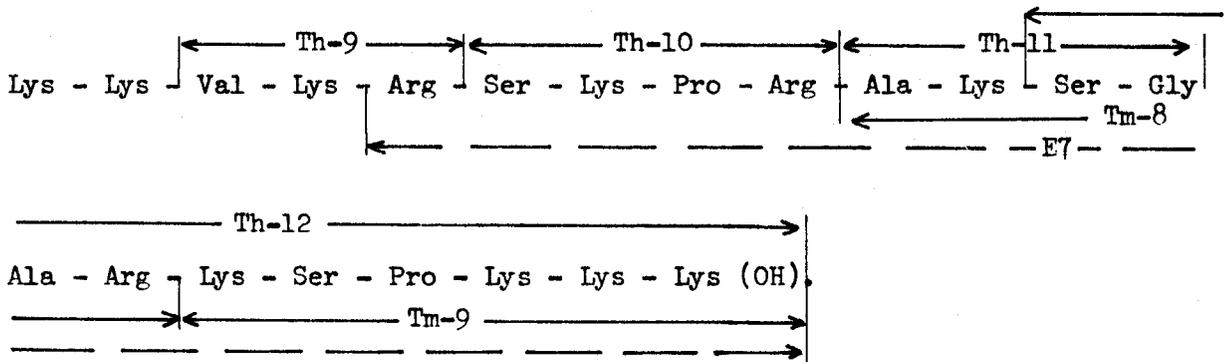
TABLEAU XI

BUS
LILLE

d) Dégradation au D.A.B.I.T.C. du peptide E8

Cinq cycles de dégradation ont permis de déterminer la séquence NH₂-terminale suivante : Lys - Lys - Val - Lys - Arg.

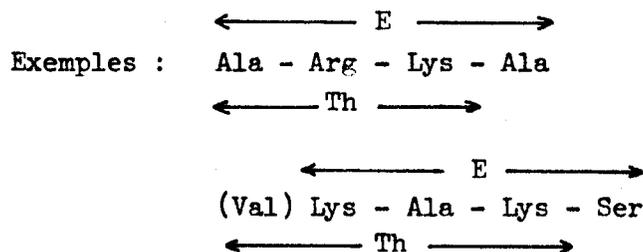
Nous pouvons déduire la séquence complète du peptide E8 de sa séquence NH₂-terminale et de la séquence complète du peptide E7.



En outre, la séquence du peptide E8 est confirmée par les peptides tryptiques Tm-8 (résidus 178 à 183) et Tm-9 (résidus 184 à 189) et par les peptides Th-9 (résidus 171 à 173), Th-10 (résidus 174 à 177), Th-11 (résidus 178 à 181) et Th-12 (résidus 180 à 189) obtenus par la thermolysine.

La spécificité de l'élastase est dans tous les cas limitée, du côté COOH-terminal, aux acides aminés non aromatiques : Leu, Ala, Ser, Thr. Cette spécificité est différente de celle de la thermolysine qui agit au niveau des liaisons où se trouve engagé le groupe α-aminé de ces mêmes acides aminés.

Par rapport à la thermolysine, l'élastase permet l'obtention de peptides contenant un résidu supplémentaire en position COOH-terminale.



Le peptide E4, en particulier, permet un recouvrement des peptides Tm-4 et Tm-5 obtenus par hydrolyse par la trypsine de l'histone H5 maléylée.

En outre, l'utilisation de l'élastase a permis d'obtenir de longs fragments peptidiques nécessaires au recouvrement des séquences partielles déjà connues.

Les peptides E7 (résidus 172 à 189) et E8 (résidus 169 à 189) ont été particulièrement importants pour la détermination de la séquence de la partie COOH-terminale. Ils permettent un parfait recouvrement des peptides tryptiques Tm-7, Tm-8 et thermolysiques Th-9, Th-10, Th-11 (publication 3).

Toutefois, il manque encore des informations sur la séquence 145-165 d'où la nécessité d'une hydrolyse tryptique après citraconylation.

3-3-4 Hydrolyse du peptide Px par la trypsine après

citraconylation

Nomenclature : Les peptides obtenus par hydrolyse par la trypsine du Px citraconylé sont désignés par Tc.

L'hydrolyse tryptique est faite pendant 2 heures à 37°C avec un rapport enzyme/substrat de 1/50.

La décitraconylation se fait rapidement et totalement, en 3 heures, à pH 3,5 et à 40°C.

L'hydrolysate est chromatographié sur une colonne de Sephadex G. 50 (140 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par HCl 0,01N. Le diagramme d'éluion est présenté dans la figure 19 (page 85).

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHADEX G.50 F DES PEPTIDES
TRYPSIQUES DU FRAGMENT Px CITRACONYLE (résidus 94 à 189) DE L'HISTONE H5

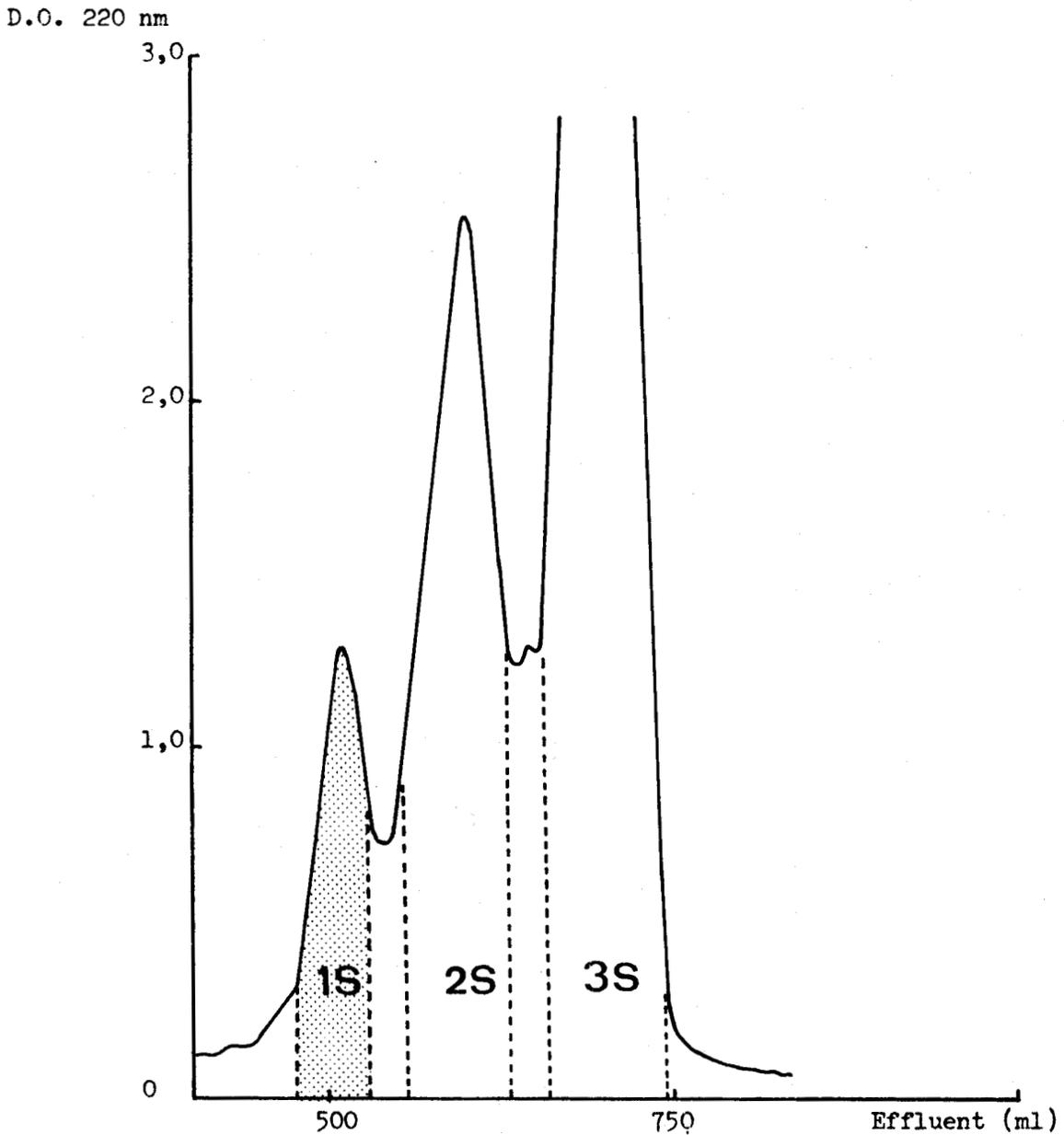


figure 19

Seule la fraction 1S contenant un gros peptide a été étudiée.

Peptide Tc (Résidus 147 à 163)

Ala - Ser - Pro - Lys - Lys - Ala - Lys - Lys - Pro - Lys - Thr - Val -
Lys - Ala - Lys - Ser - Arg.

a) Composition en acides aminés
.....

Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	Arg
0,72 (1)	1,70 (2)	1,71 (2)	3,04 (3)	0,96 (1)	6,06 (7)	1,12 (1)

Le peptide se caractérise par la présence d'un résidu de valine et d'un résidu de thréonine, acides aminés marqueurs du fragment Px.

b) Acide aminé NH₂-terminal par la méthode au DABITC
.....₂.....

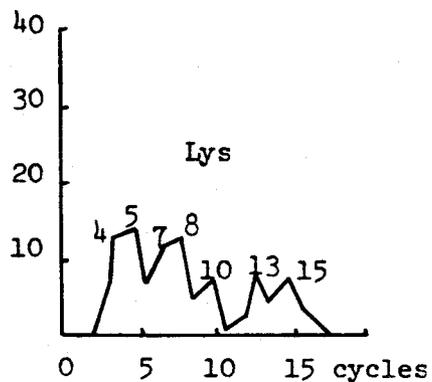
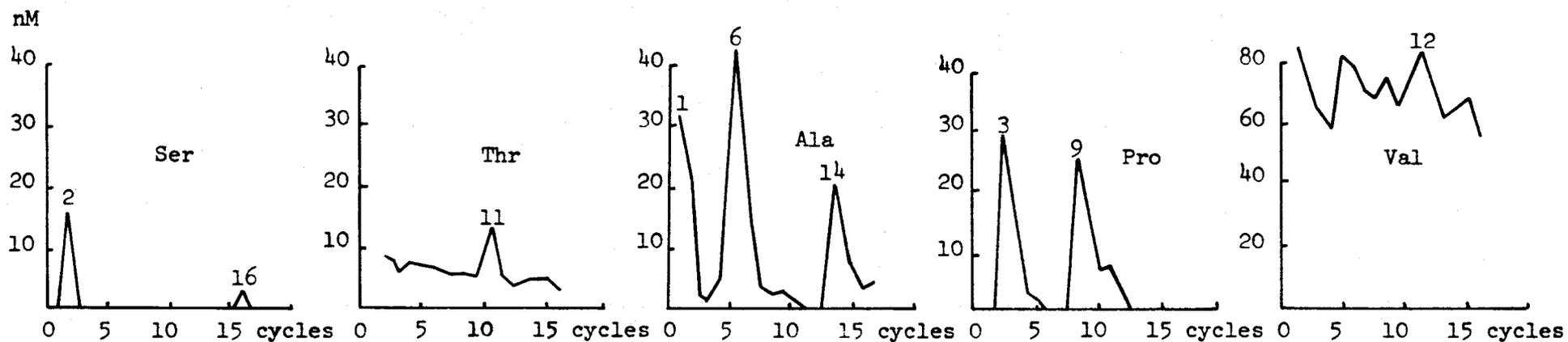
DABTH - Ala

c) Dégradation automatique de EDMAN
.....

72 nanomoles de peptide traité au 3-sulfo-PITC sont séquencées en tampon diméthylallylamine (DMAA) en présence de polybrène. Les résultats obtenus apparaissent dans le tableau XII (page 87). Les résidus de lysine partiellement modifiés ont pu être identifiés en H.P.L.C. Le résidu d'arginine a été placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine pour les seules liaisons arginyles dans un substrat citraconylé.

RESULTATS DE LA DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN DU PEPTIDE Tc (résidus 147 à 163)

OBTENU PAR HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE DU FRAGMENT Px CITRACONYLE



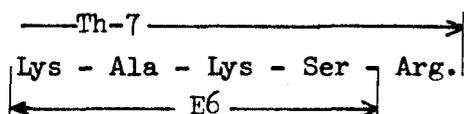
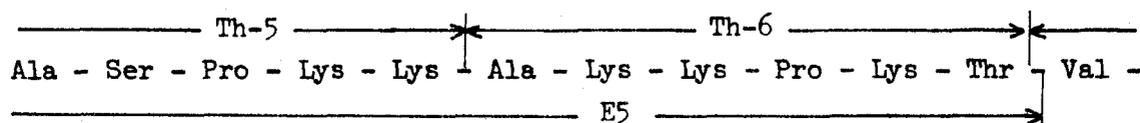
Chaque nombre placé en haut d'un pic correspond au cycle où la phénylthiohydantoïne considérée a été identifiée.

nM : nanomoles

TABLEAU XII



Ce peptide important assure le recouvrement des peptides obtenus par la thermolysine : Th-5, Th-6, Th-7 et par l'élastase : E5 et E6. Ce peptide n'avait pu être isolé de l'hydrolysate tryptique de l'histone H5 ou du fragment NB-4 après maléylation.



3-4 Séquence complète du fragment Px

L'ensemble des résultats fournis par l'étude des peptides obtenus par hydrolyse du fragment Px avec la thermolysine et l'élastase nous a permis de déterminer la séquence complète des 96 résidus de ce fragment (publication 3) (23).

La dégradation automatique de EDMAN du fragment Px a permis d'établir la séquence des 32 premiers résidus de ce fragment. Le peptide Th-4 (résidus 121 à 146) prolonge la séquence jusqu'au résidu 146. Cette séquence est confirmée par les peptides E2 (résidus 96 à 127), E3 (résidus 128 à 137), E4 (résidus 138 à 141) obtenus par l'élastase.

La jonction entre les peptides Th-4 (résidus 121 à 146) et Tc (résidus 147 à 163) est parfaitement réalisée par le peptide E5 obtenu par l'élastase (résidus 142 à 157).

La structure du peptide T5 (résidus 164 à 173) contenant le dernier résidu de valine est confirmée par celle des peptides Th-8 (résidus 165 à 170) et Th-9 (résidus 171 à 173).

Le peptide Th-7 recouvre la séquence COOH-terminale du peptide Tc et l'extrémité NH₂-terminale du peptide T5.

Enfin, les peptides E7 (résidus 172 à 189) et E8 (résidus 169 à 189) ont permis d'établir la séquence complète du fragment Px.

La connaissance de la structure primaire des 111 premiers résidus (publications 1 et 2) et du fragment Px (résidus 94 à 189) nous donne la séquence complète de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet (publication 3).

4 - SEQUENCE COMPLETE DE L'HISTONE H5 ET DISCUSSION

(publication 3) (23)

L'histone H5 dont la séquence complète apparaît dans le tableau XIII (page 90) se caractérise par une région NH₂-terminale (résidus 1 à 99) hydrophobe alors que la partie COOH-terminale a un caractère basique très marqué lié à la présence de 44 résidus basiques sur un total de 90 résidus.

Cette séquence contient de nombreux doublets Lys - Lys, Arg - Arg, Arg - Lys et Lys - Arg et des triplets Lys - Lys - Lys et Arg - Lys - Lys, sites potentiels d'interaction avec le DNA.

Les résidus de proline délimitent de longues séquences basiques (tableau XIV, page 91) en particulier, les séquences comprises entre les résidus Pro-134 et Pro-149 d'une part et, les Pro-155 et Pro-176 d'autre part.

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H5 D'ERYTHROCYTE DE POULET

1	10	20
(H) Thr-Glu-Ser-Leu-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Pro-Ala-Lys-Pro-Lys-	Gln-Val-Lys-Ala-Ser-Arg-Arg-Ser-Ala-Ser-His-Pro-Thr-	
	Arg	
30	40	50
Tyr-Ser-Glu-Met-Ile-Ala-Ala-Ile-Arg-Ala-Glu-Lys-Ser-Arg-Gly-Gly-Ser-Arg-Gln-Ser-Ile-Gln-Lys-Tyr-Ile-		
60	70	80
Lys-Ser-His-Tyr-Lys-Val-Gly-His-Asn-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Lys-Leu-Ser-Ile-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala-Ala-Gly-Val-Leu-		
90	100	
Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp-Lys-Ala-Lys-Arg-Ser-Pro-Gly-Lys-Lys-		
110	120	130
Lys-Lys-Ala-Val-Arg-Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Arg-Pro-Arg-Lys-Ala-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-		
140	150	160
Ala-Thr-Ala-Arg-Lys-Ala-Arg-Lys-Lys-Ser-Arg-Ala-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Thr-Val-Lys-Ala-Lys-Ser-		
170	180	189
Arg-Lys-Ala-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Val-Lys-Arg-Ser-Lys-Pro-Arg-Ala-Lys-Ser-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Lys (OH)		



SEQUENCES BASIQUES DE LA REGION COOH-TERMINALE DE L'HISTONE H5 DELIMITEES PAR LES RESIDUS DE PROLINE

105				118	
	Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Ala-Val-Arg-Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-				
119		124			
	Lys-Lys-Ala-Ala-Arg-Pro-				
125		130			
	Arg-Lys-Ala-Arg-Ser-Pro-				
131		134			
	Ala-Lys-Lys-Pro-				
135		145	149		
	Lys-Ala-Thr-Ala-Arg-Lys-Ala-Arg-Lys-Lys-Ser-Arg-Ala-Ser-Pro-				
					P
150		155			
	Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Pro-				
156		166	176		
	Lys-Thr-Val-Lys-Ala-Lys-Ser-Arg-Lys-Ala-Ser-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Val-Lys-Arg-Ser-Lys-Pro-				
					P
177		186			
	Arg-Ala-Lys-Ser-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Pro-				
187		189			
	Lys-Lys-Lys (OH).				

P : Site de phosphorylation
(MARTINAGE et coll.) (90)

TABLEAU XIV



Ces zones pourraient être des sites d'interaction spécifiques avec le DNA. Ce problème est d'autant plus intéressant que les études de phosphorylation *in vitro* de l'histone H5 par une protéine kinase isolée du pancréas de Rat (90) donnent deux sites majeurs de phosphorylation situés dans chacune des zones définies plus haut : il s'agit des résidus de sérine 145 et 166.

La moitié COOH-terminale de l'histone H5 présente également des séquences répétitives de type Ser - Pro - Lys - Lys (séquences 117-120, 148-151, 185-189) et Ala - Lys - Lys - Pro - Lys (séquences 131-135, 153-156) que l'on retrouve dans les histones H5 d'Oie (157) et H1 de Truite (89).

La comparaison de la structure primaire de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet avec celle de l'histone H5 d'érythrocyte d'Oie montre 30 différences dont 14 non conservatives et 4 délétions. Ces modifications ont lieu principalement dans les régions NH₂-terminale et COOH-terminale (publication 3).

On remarque dans la région NH₂-terminale (résidus 1 à 22) 10 substitutions dont 5 ne sont pas conservatives et une délétion puis dans la région COOH-terminale (résidus 98 à 189) 9 substitutions et 3 délétions. La région centrale de caractère hydrophobe (résidus 23 à 97) montre 7 changements pour la plupart conservatifs.

La comparaison des histones H1 et H5 montre des analogies sur le plan de leur solubilité dans l'acide perchlorique ou trichloracétique à 5 %, de leur composition en acides aminés mais également de leur séquence en acides aminés.

Dans le tableau XV (page 93), pour faire apparaître les homologies de séquence, nous avons comparé les séquences des régions centrales hydrophobes des histones H5 de Poulet (23) et H1 de Truite (89) et de Poulet (COLE, communication personnelle).

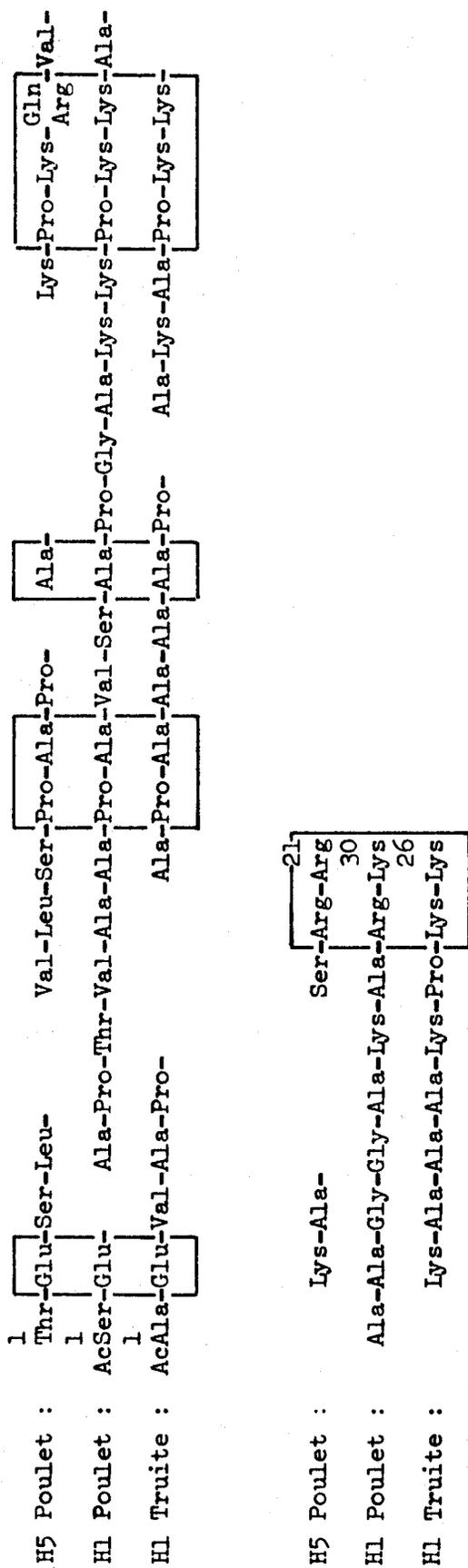
Nous pouvons remarquer des homologies de séquences principalement au voisinage du résidu de phénylalanine (en position 93 dans l'histone H5, en position 100 dans l'histone H1 de Poulet et en position 96 dans l'histone H1 de Truite). Les homologies sont d'autant plus évidentes si l'on tient compte de certaines substitutions conservatives Leu/Val/Ile/Met et Lys/Arg.

Une plus grande variabilité de séquence dans les régions basiques NH_2 -terminale et COOH -terminale s'oppose à la conservation des régions plus hydrophobes (tableaux XVI et XVII, pages 95 et 96). On peut cependant noter de nombreuses séquences répétitives communes très basiques dans la région COOH -terminale.

Mais cette homologie qui est remarquable ne peut être étendue aux rôles de ces histones au sein de la chromatine. En effet, l'histone H5 synthétisée durant la maturation des globules rouges remplace progressivement et partiellement l'histone H1.

L'histone H5, bien que plus courte que les histones H1 comporte un plus grand nombre de résidus basiques Lys + Arg [65-66] que l'histone H1 de testicule de Truite [60] ou de Poulet [62]. Cette basicité lui confère une plus forte affinité pour le DNA que l'histone H1. Ceci suggère un rôle particulier de l'histone H5 dans la condensation de la chromatine et de son maintien dans cet état condensé.

COMPARAISON DES SEQUENCES NH₂-TERMINALES DES HISTONES H5 DE POULET ET H1* DE POULET ET DE TRUITE



* Séquence de l'histone H1 de Poulet selon COLE (communication personnelle)

Séquence de l'histone H1 de Truite selon MACLEOD, WONG et DIXON (89)

Les régions homologues sont encadrées.

TABLEAU XVI



COMPARAISON DES SEQUENCES COOH-TERMINALES DE L'HISTONE H5 DE POULET ET DE L'HISTONE H1 DE TRUITE

H5	105	Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-Lys-Ala-Val-Arg-Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Arg-	Ala-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-Ala-Ala	Pro-Arg-Lys-Lys-Ala-Arg-Ser-
H1	108	Pro-Ala-Lys-Lys-Lys-Ala-Ala-Ala-	Pro-Lys-	
H5		Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-Ala-	Arg-Lys-Ala-Arg-Lys-Lys-Ser-Arg-Ala-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Thr-Val-	
H1		Lys-Lys-Pro-Lys-Lys-Val-Ala-Ala-Lys-Lys-Ala-Val-	Ala-Ala-Lys-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys-Lys-Pro-Ala-Thr-Pro-	
H5		Lys-Lys-Ser-	Arg-Lys-Ala-Ser-Lys-Ala-Lys-Lys-Val-Lys-Arg-Ser-Lys-Pro-Arg-Ala-Lys-Ser-Cly-Ala-Arg-Lys-Ser-	
H1		Lys-Lys-Ala-Ala-Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Thr-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-	Lys-Pro-Lys-Ala-Ala-Lys-Pro-Lys-	Ala-Ala-Lys-Ser-
H5	189	Pro-Lys-Lys-Lys (OH)		
H1	194	Pro-Lys-Lys-Val-Lys-Lys-Pro-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys (OH)		

* Séquence de l'histone H1 de Truite selon MACLEOD, WONG et DIXON (89)

Les régions homologues sont encadrées.

CHAPITRE III

=====

STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE
DE L'HISTONE H5

SITES ANTIGENIQUES DE L'HISTONE H5

Publication 4

"Location of the globular region in chicken erythrocyte histone H5"

CRANE-ROBINSON, C., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and CHAMPAGNE, M. (1977)

Biochim. Biophys. Acta 493, 283-292.

Publication 5

"Distribution of antigenicity in chicken erythrocyte histone H5"

MURA, C.V., MAZEN, A., NEELIN, J.M., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and
CHAMPAGNE, M. (1980)

Eur. J. Biochem. 108, 613-620 (1980).

PUBLICATION 4



Reprinted from

Biochimica et Biophysica Acta, 493 (1977) 283-292
© Elsevier/North-Holland Biomedical Press

BBA 37731

LOCATION OF THE GLOBULAR REGION IN CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H5

COLYN CRANE-ROBINSON, GILBERT BRIAND*, PIERRE SAUTIÈRE* and MADELEINE CHAMPAGNE**

Biophysics Laboratories, Portsmouth Polytechnic, St Michael's Building, White Swan Road, Portsmouth, Hants. (U.K.)

(Received February 3rd, 1977)

SUMMARY

Chicken erythrocyte histone H5 has been cleaved by acetic acid hydrolysis at the two aspartic acid residues 65 and 99 and the 4 peptides (1-65), (66-185) (1-99) (100-185) recovered in a pure form. 270 MHz magnetic resonance and circular dichroic studies show that the two C-terminal peptides are unable to form secondary or tertiary structure. The N-terminal peptides however, form both secondary and tertiary structure. In particular, the peptide (1-99) at high ionic strength possesses a similar number of helical residues to intact histone H5 and also has a closely related nuclear magnetic resonance spectrum. It is concluded that the peptide (1-99) contains most, but not quite all of the residues that are included in the globular segment of histone H5.

INTRODUCTION

In a recent structural study of chicken erythrocyte histone H5 [1] it was concluded that not all of the 185 amino acid residues are included in the tertiary fold of this non-associating histone molecule. A study of the cyanogen bromide peptides (1-31) and (32-185) and the *N*-bromosuccinimide peptide (59-185) led to the proposal that the globular region of histone H5 extends right up to the N-terminus of the chain. The recently published sequence of histone H5 up to residue 111 [2], suggests that the globular region probably does not extend far beyond the centre of the polypeptide chain, since the sequence of the C-terminal half of the molecule is extremely basic (50% lysine + arginine). The present study seeks to define the location of the globular region of histone H5 by a nuclear magnetic resonance (NMR) and circular dichroism (CD) study of 4 peptides obtained by acetic acid cleavage of histone H5 at aspartic

* Present address: Unité No. 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U 124 INSERM) et Institut de Recherches sur le Cancer, Cité Hospitalière, B.P. 3567, 56020 Lille Cédex (France).

** Present address: Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 Rue René-Descartes, F 67000 Strasbourg (France).

acid residues 65 and 99. Chicken erythrocyte histone H5 contains only these two aspartic acid residues and the 4 peptides prepared were the two pairs spanning the complete molecule i.e. (1-65) and (66-185) together with (1-99) and (100-185). NMR is used to detect the presence of specific tertiary folding in the peptides and CD is used to measure their α -helical content.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and purification of peptides

The methodology was as follows: [8, 9] 200 mg (approximately 10 μ mol) of chicken erythrocyte histone H5 were hydrolyzed with 0.25 N acetic acid (1 ml/10 mg of protein) at 105 °C in an evacuated sealed tube for 6 hours. The hydrolysate was freeze-dried and dissolved in 9 ml of 0.01 N HCl. 3 ml aliquots of the hydrolysate were then subjected to gel filtration on a column (200 \times 2.5 cm) of Biogel P-60 equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. The separated fragments were recovered by freeze-drying and subsequently analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis in 2.5 M urea at pH 2.7 as described by Panyim and Chalkley [3], using a 17% acrylamide concentration. Further purification of the fragments was achieved by rechromatography on the Biogel P-60 column or by preparative paper chromatography for 24 h using the mixture 1-butanol/pyridine/acetic acid/water (15:10:3:12, v/v) as solvent. The amino acid compositions of the peptides were determined using 24 and 72 h hydrolysates. Peptides (0.1 μ mol) were hydrolyzed in evacuated sealed tubes at 110 °C in 6 N HCl (1 ml) with one drop of 1% phenol to prevent excessive degradation of tyrosine. Dansylation of the peptides was performed according to the method of Gray and Hartley [4]. The dansyl amino acids were identified in bidimensional thin layer chromatography with the solvents I and II described by Gros and Labouesse [5]. Peptides were hydrolyzed with carboxypeptidases A and B at pH 8.0 and 37 °C in 0.1 M ammonium bicarbonate or with carboxypeptidase C at pH 5.3 and 30 °C in 0.05 M tri-sodium citrate.

Structural studies

NMR spectra were obtained at 270 MHz using a Bruker WH270 spectrometer in the Fourier Transform mode. 5-mm tubes and 99.8% $^2\text{H}_2\text{O}$ were used throughout. CD spectra were obtained on a Cary 61 spectropolarimeter using a path length of 0.1 mm and protein concentrations of between 3 and 9 mg/ml, the same as used for the NMR spectra. Protein concentrations were obtained from the absorbance at 275 nm, assuming an extinction coefficient of 1350 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol tyrosine}^{-1}$. In the case of peptide 100-185, which contains no tyrosine, the concentration was obtained from the peptide absorbance at 215 and 225 nm as per reference [6]. CD and NMR spectra of the peptides were obtained in 1 mM ^2HCl (non-structuring conditions) and 0.25 M K_2SO_4 pH 3 or 7 (structuring conditions). Potassium sulphate was chosen since parallel studies on histone H1 and its fragments [7] showed that the divalent sulphate anion is highly effective in inducing secondary and tertiary structure. Acrylamide gel electrophoresis of the peptide samples was also carried out after NMR and CD spectra had been obtained to check for degradation whilst in solution. In no case was any degradation observed.

RESULTS

Characterisation of peptides from histone H5

The primary structure of the chicken erythrocyte histone H5 is shown in Fig. 1. The two sites of cleavage by dilute acetic acid (the aspartic residues at positions 65 and 99) are circled. Fig. 1 also shows a schematic diagram of the 4 fragments obtained from histone H5.

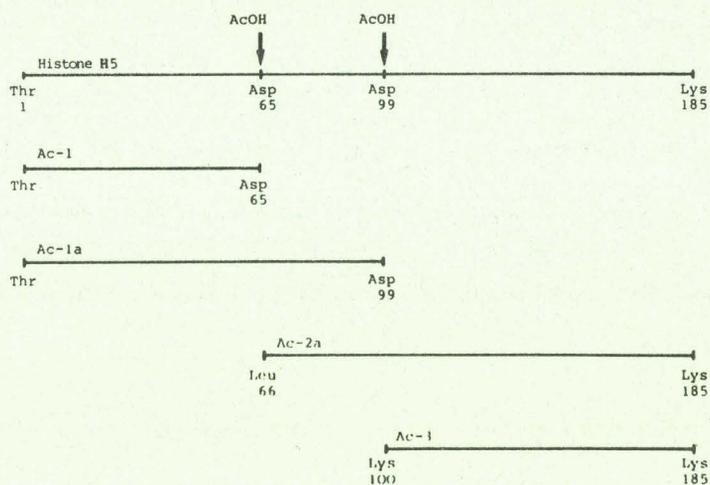
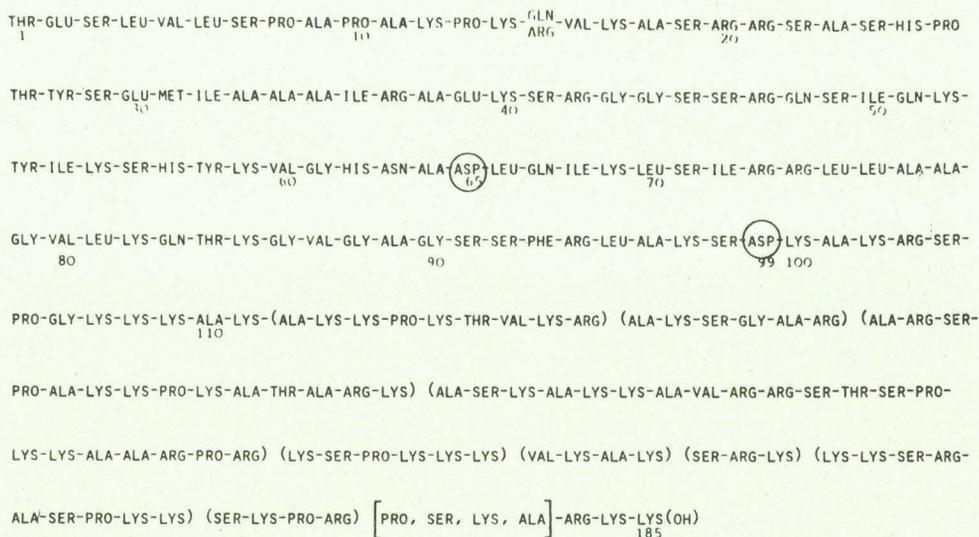


Fig. 1. Primary structure of chicken erythrocyte histone H5 and schematic diagram showing the sites of cleavage by 0.25 N acetic acid and the different fragments so obtained.

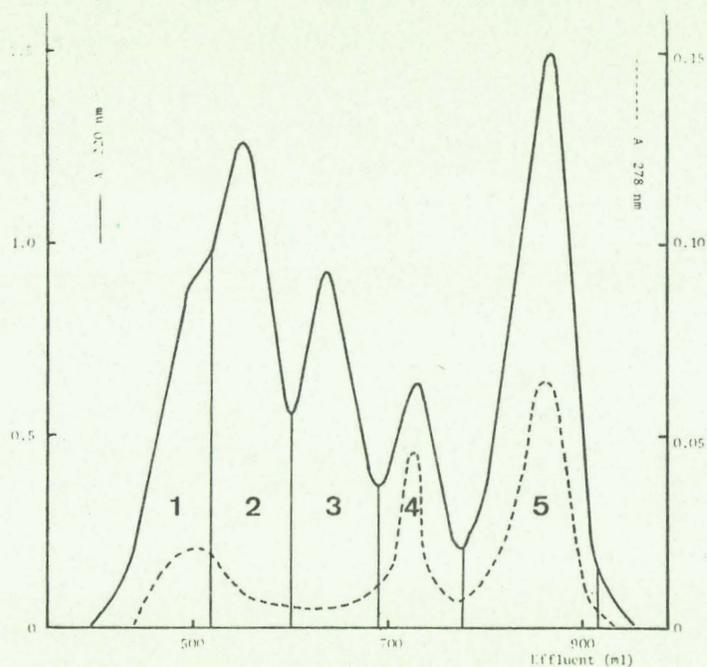


Fig. 2. Gel filtration chromatography on Biogel P-60 equilibrated and eluted with 0.01 N HCl, of the acetic hydrolysate of the chicken erythrocyte histone H5. The flow-rate was 25 ml/h and 5 ml-fractions were collected.



Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea [3] of the acetic fragments of the chicken erythrocyte histone H5. Loading sample: 5 to 20 μ g. Migration 3 h from top to bottom. Staining with 1% Amidoschwarz in the solvent acetic acid/ethanol/water (7:10:83, v/v). Destaining by 48 h diffusion in the same solvent. Gel 0: unfractionated hydrolysate. Gels 1-5 correspond to fractions 1-5 of the gel filtration chromatography on Biogel P-60 (Fig. 2). Gels numbered with asterisks contain 5 μ g of histone H5 used as marker.

The separation on Biogel P-60 of the fragments obtained by a 6 h hydrolysis of the histone H5 with 0.25 N acetic acid is shown in Fig. 2.

Electrophoretic analysis of the hydrolysate and of each of the Biogel P-60 fractions 1-5 is presented in Fig. 3. The electropherogram of the hydrolysate (gel 0) shows five main bands which have been labelled a-e. Fraction 1 contains two components: one corresponding to some uncleaved protein (band a); the other corresponds to band c. Fraction 2 contains a major component (band c) contaminated with trace amounts of uncleaved protein and of component e. The component c was purified by gel filtration chromatography of fraction 2 on Biogel P-60. Structural data obtained by amino acid analysis (Table I), dansylation and carboxypeptidase hydrolysis indicate unequivocally that the component c is the fragment Ac-2a (residues 66 through 185).

TABLE I

AMINO ACID COMPOSITION OF THE CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H5 AND OF ITS FRAGMENTS OBTAINED BY ACETIC ACID CLEAVAGE (EXPRESSED AS NUMBER OF RESIDUES)

Amino acid	Histone H5	Fragment Ac-1 1-65	Fragment Ac-1a 1-99	Fragment Ac-2a 66-185	Fragment Ac-3 100-185
Aspartic acid	3.23 (3) ^a	1.76 (2)	2.82 (3)	1.39 (1)	—
Threonine	6.23 (6)	1.93 (2)	2.96 (3)	4.12 (4)	2.99 (3)
Serine	25.30 (25)	10.14 (11)	12.59 (15) ^b	14.48 (14)	10.18 (10)
Glutamic acid	7.42 (7-8)	5.40 (5)	6.13 (7) ^b	3.07 (3)	—
Proline	12.97 (13)	4.26 (4)	4.70 (4) ^b	9.0 (9)	9.03 (9)
Glycine	9.00 (9)	3.36 (3)	6.32 (7) ^b	6.91 (6) ^b	2.59 (2)
Alanine	28.65 (29)	9.16 (9)	13.12 (13)	20.0 (20)	15.95 (16)
Valine	7.82 (8)	3.04 (3)	4.52 (5)	4.98 (5)	3.00 (3)
Methionine	1.32 (1)	1.05 (1)	1.02 (1)	—	—
Isoleucine	6.08 (6)	3.76 (4)	4.84 (6) ^b	2.24 (2)	—
Leucine	8.10 (8)	2.16 (2)	6.63 (8) ^b	5.87 (6)	—
Tyrosine	2.93 (3)	2.59 (3)	2.91 (3)	—	—
Phenylalanine	1.35 (1)	—	1.30 (1)	0.82 (1)	—
Histidine	2.88 (3)	2.91 (3)	2.96 (3)	—	—
Lysine	39.56 (42) ^b	7.43 (7)	11.30 (11)	34.36 (34)	30.54 (31)
Arginine	22.99 (21-20) ^b	6.05 (6)	10.14 (9) ^b	15 (15)	12.15 (12)
Total number of residues	185	65	99	120	86

^a Values in parentheses are the nearest integer.

^b Values obtained from sequence data.

Fraction 3 consists of one major component corresponding to band e slightly contaminated with component c and with an unidentified material. The component e was purified by gel filtration chromatography of fraction 3 on Biogel P-60. Structural data provided by amino acid analysis (Table I), dansylation and carboxypeptidase hydrolysis of the component e are characteristic of the fragment Ac-3 (residues 100 through 185).

Fraction 4 corresponds to component b contaminated with minute amounts

of component e. The component b was purified by gel filtration chromatography of fraction 4 on Biogel P-60. The amino acid composition (Table I), the amino terminal residue identified as dansyl-Thr and the carboxy-terminal sequence Leu-Ala-Lys-Ser-Asp of the component b are consistent with the sequence 1 through 99 (fragment Ac-1a) of the histone H5.

Fraction 5 appears heterogeneous on polyacrylamide gel (bands d) and on paper electrochromatography. However, the amino composition (Table I), the amino terminal residue identified as dansyl-Thr and the carboxy-terminal sequence Ala-Asp clearly characterize the fragment Ac-1 (residues 1 through 65). This heterogeneity is likely to be due to the partial enucleation of the aspartic acid residue at position 65, as evidenced by the data of the carboxypeptidase hydrolysis which show a larger amount of alanine than of aspartic acid release by the enzyme. The partial deamidation of the residues asparagine (position 63) and glutamine (positions 15, 48 and 51) as well as the microheterogeneity at position 15 (a glutamine or an arginine residue is found) also account for the apparent heterogeneity of the fragment Ac-1 in analytical electrophoresis.

Spectroscopic results

C-terminal peptides: (a) peptide 66-185. Cleavage at residue 65 cuts the molecule 1/3 the way along the sequence. It has previously been shown [1] that the *N*-bromosuccinimide peptide (59-185) is incapable of forming much secondary or tertiary structure and the present data indicate a similar behaviour for the peptide (66-185). Fig. 4 shows the CD spectra of (66-185) under structuring conditions and an ellipticity of -2500° at 222 nm indicates that only a very small amount of helix is present (approx. 5% or 7 residues). The same ellipticity at 222 nm was observed previously [1] for (59-185) at high ionic strength. The NMR spectrum of (66-185) was observed to be essentially the same in water and in 0.25 M K_2SO_4 , pH 3: in particular, no resonances were observed in positions different from their characteristic random coil shifts. On salt addition a small degree of line broadening was observed for certain resonances, in particular that of phenyl alanine 93, the only aromatic residue. This indicates that some non-specific aggregation occurs with this peptide and a similar phenomenon was noted [1] with the peptide (59-185). The lack of any perturbed resonances in the spectrum in 0.25 M K_2SO_4 indicates the complete absence of tertiary structure in (66-185).

(b) Peptide 100-185. Cleavage at residue 99 cuts the histone H5 molecule almost exactly in half. The C-terminal half is exceptionally basic and contains 12% serine, one acidic residue, no aromatic residues and only 3 apolar residues (all valine). This composition would not be expected to support either secondary or tertiary structure and this was fully borne out by experiment. Fig. 4 shows the CD spectrum of the peptide under structuring conditions of high ionic strength. The ellipticity of -1500° at 222 nm indicates that no secondary structure is induced. The same CD curve, within experimental error was obtained for peptide (100-185) in water at pH 3. In a similar way to the CD results, it was likewise observed that the NMR spectrum of (100-185) was identical in water and in 0.25 M K_2SO_4 and showed no evidence of any perturbed resonances. It is concluded that this peptide is also unable to form any secondary or tertiary structure.

N-terminal peptides: (a) peptide 1-65. Although only one half the length of

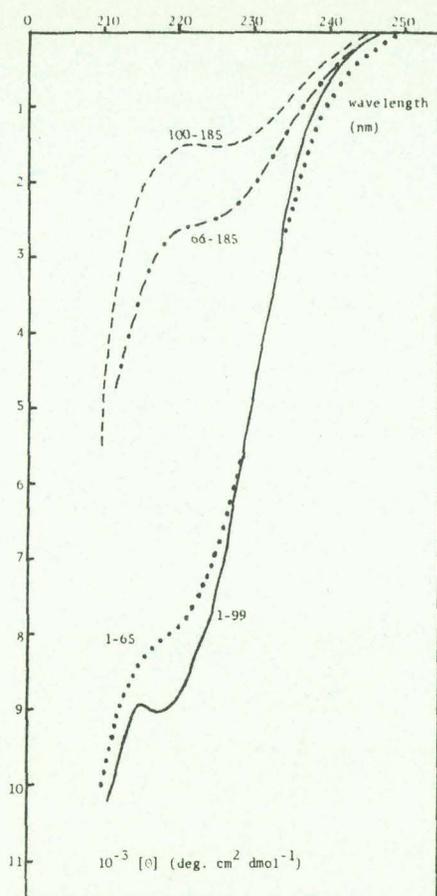


Fig. 4. CD spectra of the 4 peptides under structuring solution conditions: 0.25 M K_2SO_4 , pH 3. Protein concentrations 3–9 mg/ml, path length 0.13 mm.

its companion C-terminal peptide (66–185), Fig. 1 shows that under structuring conditions, considerable amounts of helix are formed in (1–65) in 0.25 M K_2SO_4 . The measured ellipticity at 222 nm of -7600° indicates a helicity of 23% (15 residues) using the calibrating ellipticity values: random coil = -1000° and fully helical = $-30\,000^\circ$ [10]. The NMR spectrum of peptide (1–65) showed considerable change on addition of 0.25 M K_2SO_4 . Fig. 5 includes the resonance of the aromatic residues of (1–65) in 2H_2O and in 0.25 M H_2SO_4 . The spectrum comes from 3 histidines (at 25, 57 and 62) and 3 tyrosines (at 28, 53 and 58) i.e. all the aromatics in histone H5 except phenylalanine 93. In 2H_2O at pH 3, the 3 tyrosine residues are essentially equivalent but some non-equivalence is seen among the 3 histidines, particularly in the C4H resonance. This non-equivalence is probably a primary structure effect since it is observed in intact histone H5 and in other cleaved peptides in 2H_2O , pH 3 [1]. Histidine 62 might also have an unusual shift due to its proximity to the C-terminus. The high purity of the peptide is demonstrated by the complete absence of phenylalanine resonance at approx. 7.3 ppm. Addition of 0.25 M K_2SO_4 causes a number



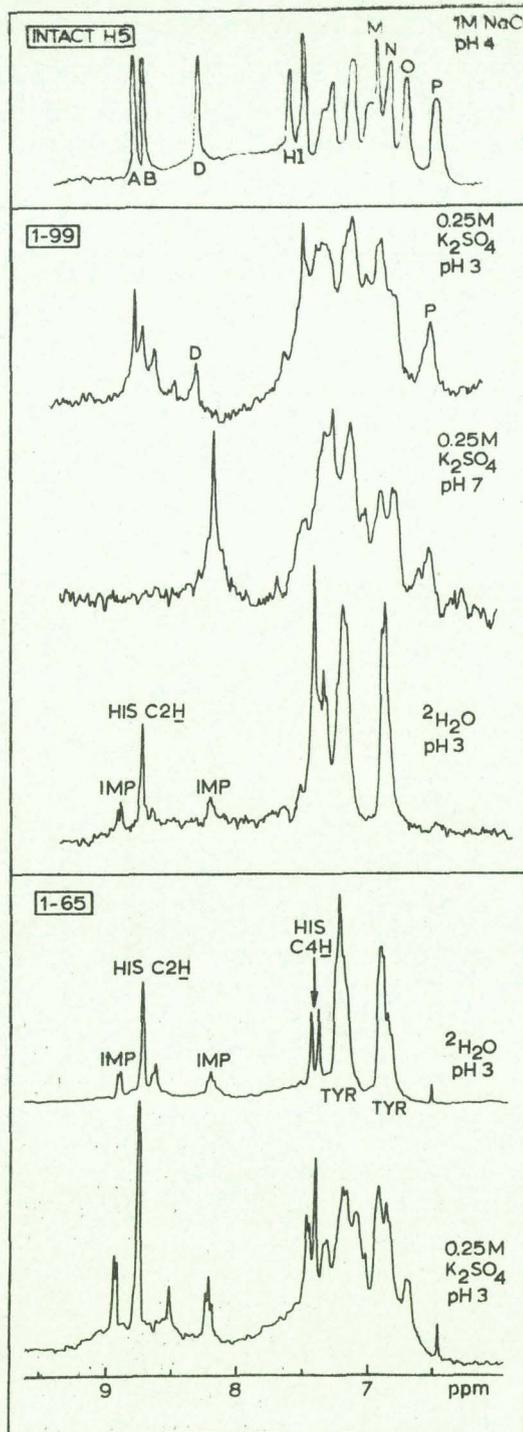


Fig. 5. 270 MHz NMR spectra of the aromatic residues in intact H5 and in the two N-terminal peptides 1-65 and 1-99. The peak labelling letters are taken from Reference 1, viz. A, B and D are the 3 histidine C₂H, H, I and M are the corresponding histidine C₄H and N, O and P are the upfield components of the 3 tyrosine residues. IMP = impurity peak.

of perturbations and increased complexity in the aromatic spectrum. Although a precise peak assignment cannot easily be given, it is apparent that considerable non-equivalence appears among the 3 tyrosine residues. The histidine resonances seem to be much less affected by salt addition. Reference to Fig. 5 shows that the aromatic spectrum of (1-65) in 0.25 M K_2SO_4 although markedly changed from the random coil spectrum, is however very different from that of folded intact histone H5.

(b) *Peptide (1-99)*. This peptide represents the N-terminal half of the molecule and includes all the aromatic residues. All the predicted secondary structure is also within this sequence [1]. The CD spectrum in Fig. 4 shows that in 0.25 M K_2SO_4 this peptide has considerable helicity. The ellipticity at 222 nm of -8600° indicates 26% helix (26 residues) using the 100% coil and helix ellipticities given above. Fig. 5 includes the aromatic NMR spectrum of (1-99), both in 2H_2O at pH 3 and in 0.25 M K_2SO_4 . At pH 3 in 2H_2O the peptide is clearly completely unstructured since the 3 histidines appear closely equivalent and the 3 tyrosine residues exactly equivalent. On addition of 0.25 M K_2SO_4 at pH 3 the spectrum becomes complex and the 3 tyrosine and histidine residues are no longer equivalent. The appearance of more than 3 histidine C2H resonances even suggests some structural heterogeneity. Increase of the pH to 6.8 by addition of 25 mM phosphate buffer leads to further changes in the spectrum, but all of these can be assigned to upfield displacement of histidine resonance due to removal of a proton from these 3 residues. The tertiary structure is not significantly changed therefore by the pH increase. The upfield spectrum of (1-99) also shows some slight changes on salt addition and two weak ring-current shifted peaks are observed at approx. 0.4 ppm. The NMR spectra therefore show that tertiary structure is induced in this peptide, and this structure appears more extensive than in 1-65 as judged from the peak perturbations.

DISCUSSION

Since only the peptides (1-65) and (1-99) show any evidence of secondary and tertiary structure formation, the above data clearly confirm our earlier conclusion [1] that it is the N-terminal part of histone H5 that is folded.

The structural perturbations on salt addition to (1-65) are markedly less than for (1-99). The 15 or so helical residues induced in (1-65) represent about half the number (approx. 29) in intact histone H5 and this number is in reasonable accord with the predictions for this segment of the molecule (see ref. 1).

In the case of (1-99) the induced helicity (26 residues) is very close to that of intact H5 and furthermore the NMR spectrum of folded (1-99) shows many perturbations and bears a strong resemblance to that of folded intact histone H5. This similarity can be illustrated from the two most perturbed aromatic resonances. At pH 3 the histidine C2H peak (D) that is displaced upfield is at 8.24 ppm in intact H5 and at 8.29 ppm in (1-99). Similarly, the most perturbed tyrosine resonance (P) lies at 6.45 ppm in intact histone H5 and at 6.51 ppm in (1-99). Thus in both cases the perturbations in the peptide are about 85% of those in the intact molecule. This is what would be observed if, at high ionic strength, the peptide were in rapid conformational equilibrium between a fully folded state (85% of the time) and a denatured state. Such rapid exchange is not unexpected since it has already been demonstrated [1] that on thermal denaturation, intact histone H5 does not behave in the

more typical highly cooperative manner but is also in rapid equilibrium between the native and denatured states.

Whatever the precise details of the conformation of (1-99), it is experimentally observed that the number of helical residues in the peptide and its NMR spectrum are close to, but not identical with those of intact histone H5. We therefore conclude that the sequence 1-99 represents most, but not quite all of the residues within the globular folded portion of histone H5. The folded histone H5 molecule in solution thus has a "tadpole" shape with an N-terminal globular head of approximately 100 residues and a structureless C-terminal tail.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the skilful technical assistance of Miss A. Hemez, Mrs. M. Dupiere and D. Belaiche and the encouragement received from Drs. E. M. Bradbury and G. Biserte. The work was supported by grant 75.7.0187 from the Délégation Générale de la Recherche Scientifique et Technique, and by the Science Research Council of Great Britain.

REFERENCES

- 1 Crane-Robinson, C., Danby, S. E., Bradbury, E. M., Garel, A., Kovacs, A. M., Champagne, M. and Daune, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 379-388
- 2 Sautiere, P., Briand, G., Kmiecik, D., Loy, O., Biserte, G., Garel, A. and Champagne, M. (1976) *FEBS Lett.* 63, 164-166
- 3 Panyim, S. and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346
- 4 Gray, W. R. and Hartley, B. S. (1973) *Biochem. J.* 89, 59P-60P
- 5 Gros, C. and Labouesse, B. (1969) *Eur. J. Biochem.* 7, 463-470
- 6 Waddell, W. J. (1956) *J. Lab. Clin. Med.* 48, 311-314
- 7 Chapman, G., Hartman, P. G. and Bradbury, E. M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 69-75
- 8 Partridge, S. M. and Davis, H. F. (1950) *Nature* 165, 62-64
- 9 Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormick, J. and Jones, R. T. (1963) *Biochemistry* 2, 992-998
- 10 Moss, T., Cary, P. D., Abercrombie, B. D., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E. M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 71, 337-350

P U B L I C A T I O N 5

Distribution of Antigenicity in Chicken Erythrocyte Histone H5

Casilda V. MURA, Alice MAZEN, James M. NEELIN, Gilbert BRIAND, Pierre SAUTIERE, and Madeleine CHAMPAGNE

Institute of Biochemistry, Carleton University, Ottawa, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, and
Unité 124, Institut de Recherches sur le Cancer, Lille

(Received February 18, 1980)

We have compared the inhibitory strengths of eight peptides from chicken histone H5 to that of the parent protein (189 residues) in complement fixation by guinea pig anti-H5 serum complexed with the homologous histone. Two precisely delineated regions (residues 59 to 65 and 94 to 99) and two less-defined regions (between 66 and 93; 100 and 189) are depicted. The sequences of particular consequences are quite conserved in avian histone H5 while the most variable N-terminal portion of 31 residues has no inhibitory effect.

It is now well established that specific antibodies can be raised in rabbits against histones complexed with nucleic acid [1–6], and against free histones in either rabbits [6–11] or guinea pigs [6, 12, 13]. Lysine-rich histones are especially effective as immunogens [2, 6–9], presumably because of their wider quantitative and qualitative variations [14, 15]. Such variation reaches an extreme in the erythrocyte-specific histone 5 [16], which partially replaces histone H1 in erythrocytes of birds [17–20], some fish [13, 21], reptiles [22], amphibians [23] and marine invertebrates [24].

Antisera against the lysine-rich histones have been used to survey immunological homologies among histone H1 sub-types [2, 5–7, 25–27], to probe conformational changes in isolated H1 [9] or its accessibility in chromatin [28, 29], as well as to locate histones H1 and H5 in various cells and metabolic conditions [23, 30–33]. When specific antisera are used as probes of molecular or subcellular structure, it is valuable to appreciate what regions, or even what precise antigenic determinants, are interacting with the antibodies [6].

Using inhibition of complement fixation by a series of peptides from chicken histone H5, we establish that guinea-pig anti-H5 immunoglobulins react primarily but not exclusively with the globular domain near the middle of the H5 peptide chain. At least two precise antigenic determinants, one of them perhaps exerting a conformational rather than a direct influence, are located in this region.

MATERIALS AND METHODS

The lysine-rich histones H1 and H5 were selectively extracted from isotonic-saline-washed nuclei after sa-

ponin lysis of saline-washed erythrocytes from normal, adult White Leghorn chickens [12]. Nuclei were stirred at 4°C for 1–2 h in trichloroacetic acid [34] at a final concentration of 5% (w/v) and sedimented at 10000 × g for 10 min. After reextraction the combined supernatants were exhaustively dialyzed against distilled water, lyophilized, and histone H5 was purified by cation-exchange chromatography on a column of Amberlite CG-50 (Rohm and Haas), eluted with a linear gradient of 8 to 20% (w/v) guanidinium chloride buffered in 0.1 M sodium phosphate pH 6.8 [12, 35]. Proteins in the extracts and in each purified fraction were identified by electrophoresis in polyacrylamide gel according to Panyim and Chalkley [36].

Chicken H5 peptidic fragments, the compositions or sequences of which have been published [37, 38], were obtained by cation-exchange or exclusion chromatography after treatment of the parent protein as follows: fragments 1–31 and 32–189¹, after CNBr cleavage at the methionine [37], fragment 59–189 after *N*-bromosuccinimide cleavage at tyrosine [37], fragments 1–99, 1–65, 66–99 and 100–189 after acetic acid hydrolysis at aspartyl groups [38, 39] and fragment 94–189 after pepsin treatment [40]. The molecular weight of the intact protein is taken as 20600, while those of the respective fragments were calculated as 3400, 17200, 14200, 10650, 7100, 3550, 9950 and 10650.

¹ Since complete sequence of the 189 residues of the chicken erythrocyte histone H5 is now determined [40], the nomenclature of the C-terminal fragments has been changed throughout the text, captions of the figures and in Fig. 11. Moreover, calculated molecular weights have been subsequently corrected.

Antibodies to histone H5 were obtained as previously described [12] by immunizing guinea pigs (250–300 g; Hartley strain) in groups of six, initially via the footpads with 20 μ g of histone per animal, followed by intradermal boosters of 10 μ g each. Sera from subsequent bleedings up to 41 days after initial injection were pooled and stored at -20°C with azide preservative.

Titers and cross-reactivities of antisera and immunoglobulin fractions were measured by micro-complement fixation according to the method of Wassermann and Levine [41], after heating to 56°C for 60 min to destroy endogenous complement. Optimal titers of antibody and guinea pig complement (as reconstituted serum from Colorado Serum Co.) in fresh barbital/saline (0.14 M NaCl, 0.01 M sodium barbital, pH 7.35) containing 0.1% (w/v) gelatin, 1 mM MgCl_2 , 0.15 mM CaCl_2 , were incubated with various concentrations of antigen for 16–18 h at 4°C along with controls [41,42]. The residual complement was detected by spectrophotometric measurement at 550 nm of hemoglobin released from sheep erythrocytes, which had been washed with barbital/saline and pre-sensitized for 10 min at 37°C with one volume of rabbit hemolysin (Baltimore Biological) diluted to give optimal lysis with unfixed complement. In most of the assays described herein, 50% maximal complement fixation was obtained with anti-H5 serum dilution titers of 1:3000, even by the first bleedings [43].

Inhibition of complement fixation was assessed by incubating H5 fragments at various concentrations for 15 min at 37°C with anti-H5 serum diluted 1:2000 or 1:3000 (which gives 80–90% maximal complement fixation in the inhibitor-free control). This conditioned serum was then used with a series of antigen concentrations to measure the percentage complement fixation at 4°C in the usual way. All series were replicated to ensure consistency of results. For comparing inhibitors, inhibition was plotted as a fraction of the maximal complement fixation for various concentrations of inhibitor, expressed in molar ratios relative to the H5 antigen at optimal concentration (1.25–1.5 μ g/ml with antiserum diluted 1:2000 or 1:3000).

RESULTS

Polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 1 B) shows that chicken histones H1 and H5, obtained by repeated extraction of washed erythrocyte nuclei with 5% trichloroacetic acid, were not contaminated by nucleosomal histones (Fig. 1 A). The fractions of histones H1 and H5, recovered from this extract by elution from Amberlite CG-50, were free from mutual contamination (Fig. 1 C and D).

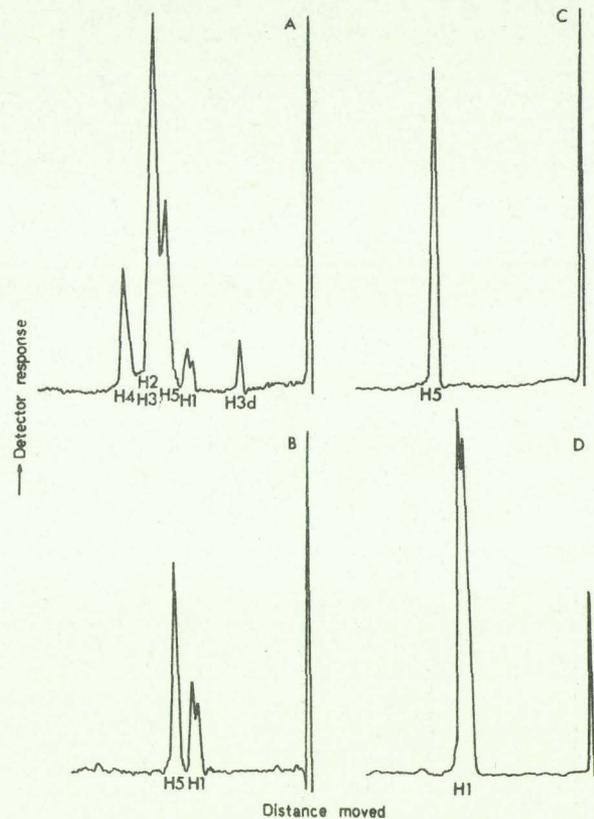


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of chicken erythrocyte histones in acid-urea gels [36]. (A) Total histones extracted with HCl from isolated chicken erythrocyte nuclei. (B) Lysine-rich histones extracted with 5% trichloroacetic acid from erythrocyte nuclei. (C) Histone H5 isolated from the extract in B by chromatography on Amberlite CG-50 [12] with a gradient of guanidine chloride. (D) Histone H1 isolated from the extract in B by chromatography as in C. Cationic migration is depicted from right to left; gels were stained in Amido Black and scanned at 550 nm; positions of histones H4, H2A-2B-3 (unresolved), H5, H1 and H3 dimer are shown

When purified histone H5 was injected repeatedly into two groups of guinea pigs, complement fixation titers rose by 41 days to 1:3160 in one lot of anti-H5 serum and to 1:2800 in the other [43]. No complement was fixed even with undiluted anti-H5 serum by chicken erythrocyte histone fractions H2A–H2B or H3–H4, prepared by exclusion chromatography of 0.20 M HCl extracts (not shown). A light cross-reaction was observed with purified histone H1 but only at dilution 1:10 or 1:20. None of the eight H5 peptides at concentrations from 0.3 to 5 μ g/ml fixed complement with anti-H5 serum diluted (1:2000 or 1:3000).

In control for the inhibition assays with H5 peptides, a peculiar feature of guinea pig anti-H5 serum was revealed. When small amounts of intact histone H5 were briefly pre-incubated at 37°C with anti-H5 serum (diluted 1:3000) before complexing at 4°C with more antigen and complement in the fixation

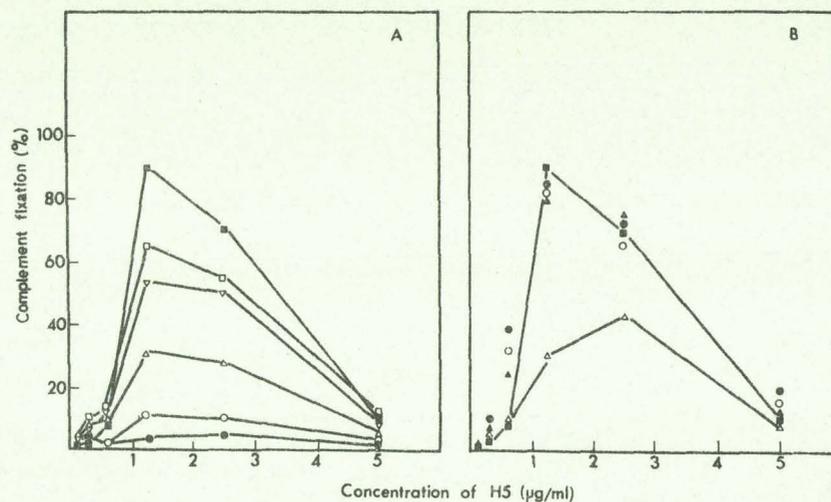


Fig. 2. Inhibition by whole histones of complement fixation by guinea pig anti-H5 diluted 1:3000 and complexed with chicken histone H5 at 4°C. (A) Concentrations of H5 as inhibitor pre-incubated at 37°C with anti-H5: (■—■) control without inhibitor; (□—□) 0.3; (▽—▽) 0.6; (△—△) 1.25; (○—○) 2.5; (●—●) 5 or 25 µg/ml. (B) Concentrations of H1 or H4 as inhibitor: (■—■) control; (▲—▲) 1.4 µg H1/ml; (△—△) 2.8 µg H1/ml; (●—●) 0.75 µg H4/ml; (○—○) 1.5 µg H4/ml. Abscissae are concentrations (in µg/ml) of H5 incubated with anti-H5 (with or without inhibitor) in presence of complement

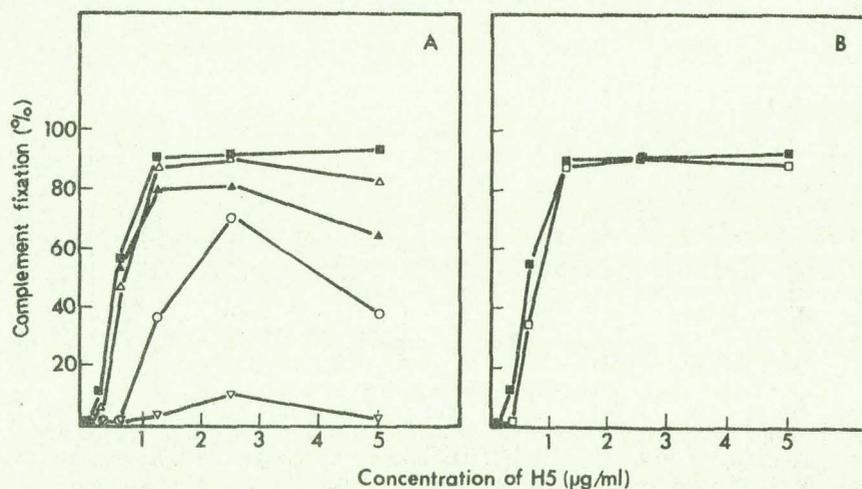


Fig. 3. Inhibition by H5 peptides of complement fixation by guinea pig anti-H5 (1:2000) with chicken histone H5. (A) Concentrations of peptide 32-189: (■—■) control; (△—△) 0.8 or 1.0; (▲—▲) 1.5; (○—○) 2.5; (▽—▽) 3.0 µg/ml. (B) Concentrations of peptide 1-31: (■—■) control; (□—□) from 0 to 50 µg/ml. Abscissae as in Fig. 2

assay, it inhibited in proportion to the amount of pre-incubated histone H5 at concentrations of antigen at, or above the optimum (Fig. 2A). There were no shifts in the optimal antigen concentration which might have indicated inactivation of antigen, or the typical effect of antigen excess. To a lesser extent similar behaviour was observed with histone H1 as inhibitor of complement fixation by the anti-H5/H5 antigen, but comparable molar proportions of histone H4 had no effect (Fig. 2B).

This behaviour of antiserum pre-incubated with histone H5 serves as a reference for assessing the effects of its peptide fragments. The large fragment 32-189 was virtually as potent an inhibitor as the whole

protein, effectively blocking complement fixation by H5/anti-H5 at concentrations between 2.5 and 5.0 µg peptide/ml (Fig. 3A). In contrast the corresponding N-terminal fragment 1-31 had no direct inhibitory effect even up to 50 µg/ml with anti-H5 serum diluted either 1:2000 (Fig. 3B) or 1:3000 (not shown).

The shorter C-terminal fragment 59-189 was also strongly inhibitory at serum dilutions of 1:2000 (Fig. 4A) and 1:3000 (Fig. 4B); the latter was used for subsequent assays, because of its sensitivity to weak inhibition. Even so, fragment 94-189 only inhibited complement fixation appreciably at considerable molar excess over the antigen (Fig. 5A). The slightly shorter

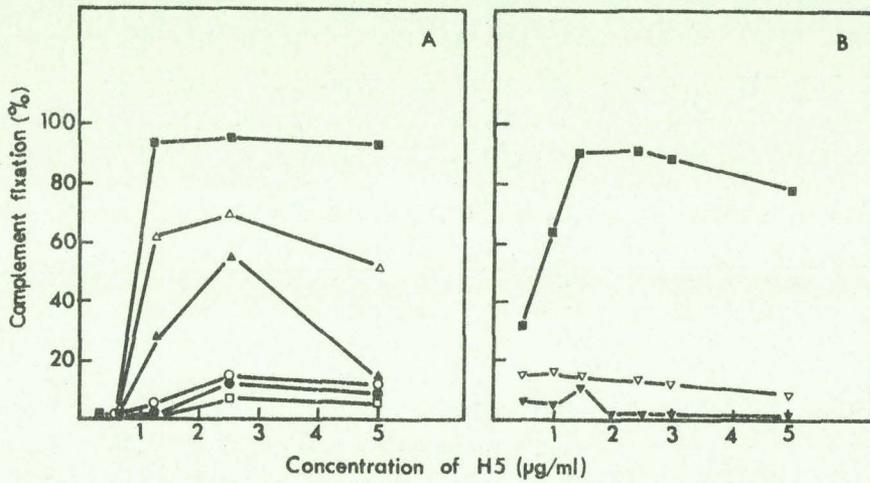


Fig. 4. Inhibition by H5 peptides 59-189 of complement fixation by guinea pig anti-H5 with chicken histone H5. (A) Serum diluted 1:2000; (B) serum diluted 1:3000. Concentrations of peptide: (■—■) control; (▽—▽) 1.7; (△—△) 2.5; (▲—▲) 5; (○—○) 10; (●—●) 20; (□—□) 40; (▼—▼) from 17 to 130 µg/ml. Abscissae as in Fig. 2

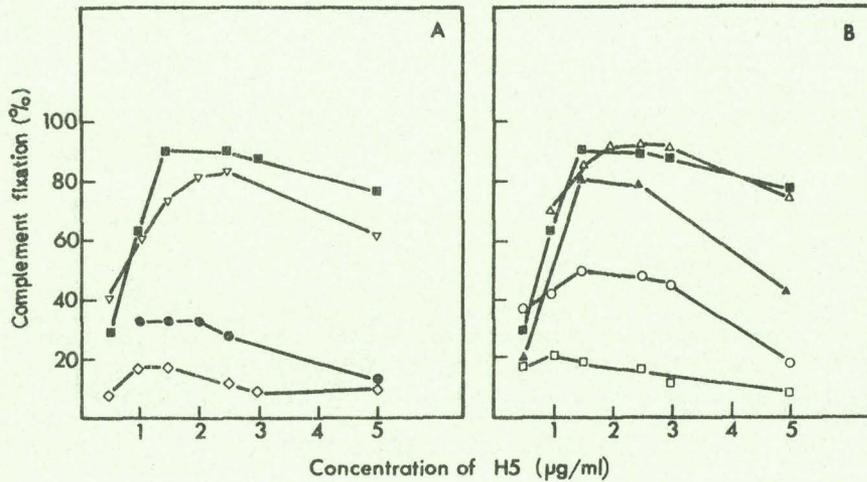


Fig. 5. Inhibition by H5 peptides of complement fixation by guinea pig anti-H5 (1:3000) with chicken histone H5. (A) Concentrations of peptide 94-189: (■—■) control; (▽—▽) 1.2; (●—●) 12; (◇—◇) 36 or 120 µg/ml. (B) Concentrations of peptide 100-189: (■—■) control; (△—△) 1.2; (▲—▲) 12; (○—○) 36; (□—□) 120 µg/ml. Abscissae as in Fig. 2

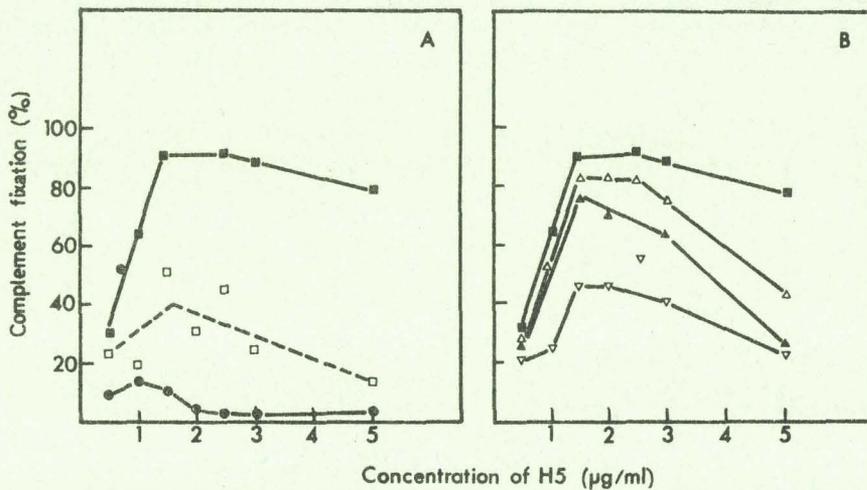


Fig. 6. Inhibition by H5 peptides of complement fixation by guinea pig anti-H5 (1:3000) with chicken histone H5. (A) Concentrations of peptide 1-99: (■—■) control; (□—□) 1.3; (●—●) from 13 to 130 µg/ml. (B) Concentrations of peptide 1-65: (■—■) control; (△—△) 0.9 or 9.0; (▲—▲) 26; (▽—▽) 87 µg/ml. Abscissae as in Fig. 2



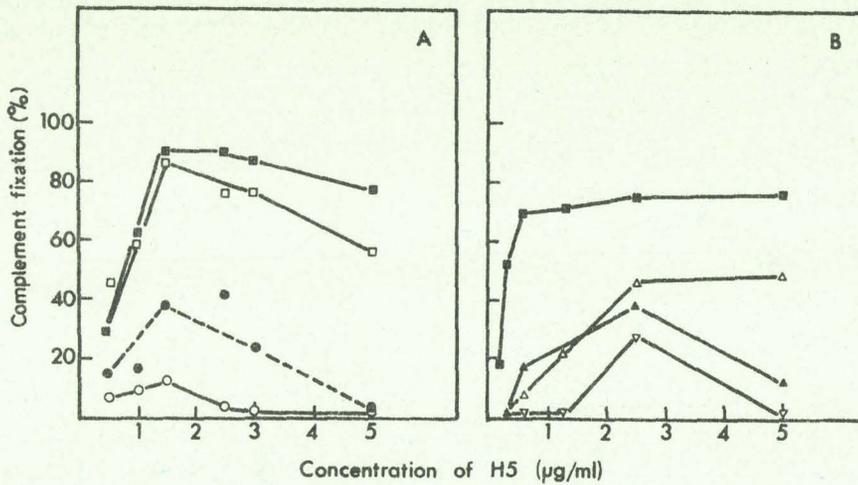


Fig. 7. Variation in inhibition by H5 peptide 66-99 of complement fixation by guinea pig anti-H5 (1:3000) with chicken histone H5. (A) Series 1; (B) series 2. Concentrations of peptide: (■—■) control; (Δ—Δ) 0.3; (▲—▲) 0.6; (□—□) 0.4 or 4; (▽—▽) 2.5 or 5.0; (●—●) 13; (○—○) 44 µg/ml. Abscissae as in Fig. 2

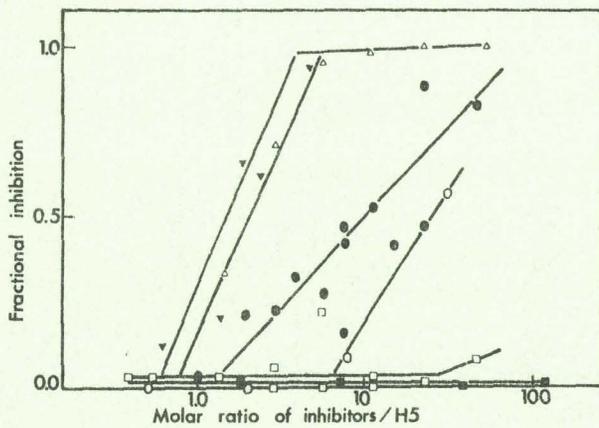


Fig. 8. Relative inhibitions by H5 peptides of complement fixation by guinea pig anti-H5 serum 1 (diluted 1:2000) with histone H5. Ordinate: inhibition plotted as a fraction of optimal complement fixation in the absence of inhibitor. Abscissa: molar ratio of inhibitor peptide/H5. Inhibitors: (▼—▼) peptide 32-189; (Δ—Δ) peptide 59-189; (●—●) peptide 1-99; (○—○) peptide 94-189; (□—□) peptide 1-65; (■—■) peptide 1-31. Relative inhibitory effectiveness is indicated approximately by sloping lines

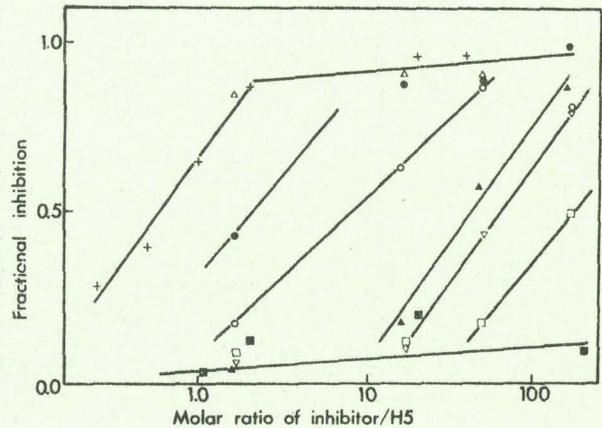


Fig. 9. Relative inhibitors by H5 peptides of complement fixation by guinea pig anti-H5 serum 1 (diluted 1:3000) with histone H5. Inhibitors: (+—+) histone H5; (▲—▲) peptide 66-69; (▽—▽) peptide 100-189. Other symbols, ordinate and abscissa as in Fig. 8

C-terminal fragment 100-189 was just moderately inhibitory even in great excess (Fig. 5B), while the corresponding N-terminal fragment 1-99 strongly inhibited at low concentrations (Fig. 6A). In contrast fragment 1-65, shorter by 34 residues, was only weakly inhibitory (Fig. 6B), while fragment 66-69, containing these residues, showed considerable variation in the strength of its effect (e.g. Fig. 7A,B). In eight separate assays fragment 66-99/H5 molar ratios needed for 50% inhibition ranged from 1.3 to 90 with a mode around 50.

To compare the abilities of fragments to inhibit complement fixation by H5/anti-H5, the fractional

inhibition of maximal complement fixation was plotted against molar ratios of peptide to antigen (on a logarithmic scale for convenience; Fig. 8 and 9).

Reproducibility of the antibody population raised in guinea pigs was established by a similar series with fewer peptides and antiserum from another group of six guinea pigs (Fig. 10) which gave 50% complement fixation by serum 1:2800. Of the eight peptides tested, all but the N-terminal 31 residues could inhibit complement fixation by at least 50%, if molar excess was sufficient. The inhibitors tend to fall into three groups: intact histone H5 and the large C-terminal fragment 59-189 inhibited similarly and

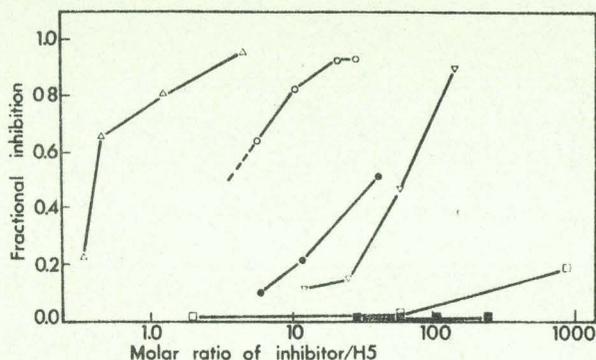


Fig. 10. Relative inhibitions by H5 peptides of complement fixation by guinea pig anti-H5 serum II (diluted 1:2000) with histone H5. Ordinate and abscissa as in Fig. 8. Inhibitors: symbols as in Fig. 8 and 9

strongly with serum diluted 1:3000 (Fig. 9), as did this fragment and 32–189 with serum 1:2000 (Fig. 8 and 10). Although fragment 1–58 was not available, it appears that little or no inhibitory capacity has been lost with the N-terminal 32 or 58 residues. Overlapping fragments 1–99 and 94–189 inhibited moderately at both serum dilutions (Fig. 8 and 9), but their order of potency was reversed in pooled antisera from another lot of guinea pigs (Fig. 10). Fragment 1–93 was not available for assay, its loss evidently affected important determinants, while the influence of the next six residues was even more striking (Fig. 9 and 10).

DISCUSSION

It is generally conceded that a multiplicity of determinants on a molecule or aggregate favours immunogenicity and that complement is most efficiently fixed by antigen complexed with a number of antibodies from a population of reasonably balanced concentrations [44,45]. Although these conditions may be scarcely achieved with small or partially disorganized histones, multivalency should not be needed for inhibition of aggregate formation in complement fixation assays. With soluble antigens and immunoglobulin G [45], such as histones and antihistones [43], complement fixation is more efficient at 4°C than at the 37°C used for pre-incubation with prospective inhibitor. Since change in temperature also alters conformation of the antigenic or inhibitory H5 [46] with probable consequences on its immunochemical behaviour [9,47], the antibody complex formed with histone H5 or its peptides at 37°C may be incapable of accommodating more complement-fixing H5 after the temperature is lowered.

In order for antigenicity to survive fragmentation of the parent protein, internal modifications of amino acid side-chains in determinants should be avoided. Although *N*-bromosuccinimide is reputed to oxidize

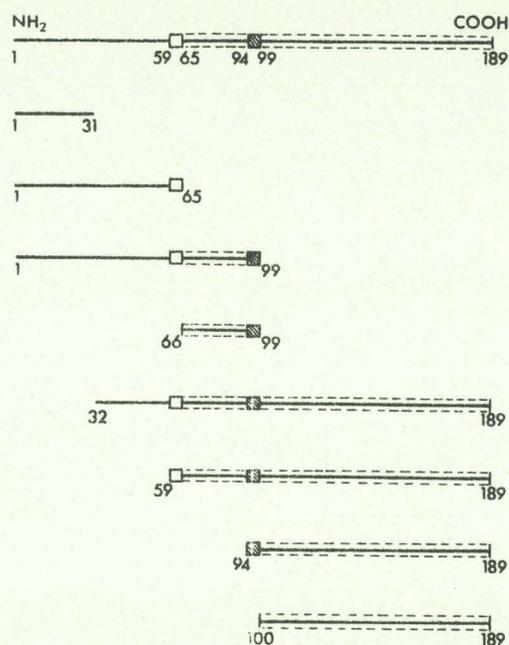


Fig. 11. Diagrammatic distribution of histone H5 sites antigenic to guinea pig anti-H5 immunoglobulin. Lengths of horizontal bars are proportional to numbers of residues, some of which are numbered from the N-terminus of the parent H5 molecule (top). Antigenicity indicate as follows: — no evident inhibitory effect; --- weak to moderate effect not precisely located; □ weak to moderate effect in precise region; ■ strong effect in precise region

histidine and methionine [48], fragment 59–189 retains essentially full inhibitory capacity, as does fragment 32–189 produced by CNBr. While the conditions of mild acid hydrolysis at aspartyl residues may well denature tertiary structure, the very active fragment 1–99 was subject to the same conditions as its components, the weak and variable inhibitors 1–65 and 66–99, as well as the very basic fragment 100–189. While acid treatment may alter the antigenicity of a salt-extracted histone [9], our histone H5 used as immunogen, antigen or inhibitor was always acid-extracted.

No previous report has localized antigenicity of a lysine-rich histone more precisely than in the C-terminal two-thirds of histone H1 [2,7]. Our attribution of antigenic sites in chicken histone H5 is summarized in Fig. 11, in which each peptide fragment is aligned in relation to the intact chain. Two precisely delineated regions of different antigenic significance and two less defined regions are depicted. Although the N-terminal 58 residues had little effect on inhibition, the N-terminal 65-residues fragment was weakly inhibitory by itself and its loss disrupted the antigenicity and stability of fragment 1–99. Similarly excision of the N-terminal 93 residues, particularly the stretch from 59 to 93, removed important determinants or stabilizing groups, but the overlapping fragments 1–99 and 94–189 remained highly inhibitory.

The two short sequences of particular consequence are quite conserved among avian species. Residues 59–65 and 94–99, respectively Lys-Val-Gly-His-Asn-Ala-Asp and Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp in chicken [38], are nearly identical in goose [49], as is the intervening sequence. This is consistent with a cross-reaction of goos histone H5 fixing complement with anti-H5 (chicken) at about half the serum dilution for complement fixation with chicken H5 (M. Rodriguez, C. Mura and J. Neelin, unpublished observations). Although chicken or amphibian erythrocyte histones H1 and H5 do not cross-react in complement fixation [23,43], the inhibition by histone H1 in the H5 system suggests a limited antigenic homology not obvious from the known H1 sequences [49].

The antigenic determinants in chicken histone H5 appear to be more localized than in histone H3 [50]. Guinea-pig anti-H5 sera are mostly directed against the 'globular' or 'central' domain of the histone [49,51]. Because this region is less firmly bound to DNA than the basic ends [52], it should be accessible to antibody probes for cytochemical studies [30–32,43].

The centralization of antigenicity in one-third of the primary sequence may be a limitation on homology surveys of lysine-rich histones [2,5–7,25–27], if it applies as well to rabbit anti-H1 or anti-H5 sera. It is already evident that the highly variable N-terminal third of histone H1 [53] contributes little to antigenicity [2,7,54] but if structured and conserved regions of histones are more critical to their biological functions, an immunochemical comparison of their partial homologies could be illuminating.

The authors are indebted to Ms Josette Dunand and Ms Margarita Rodriguez for assistance with some assays, and to the latter for guinea pig antiserum H. This work was supported by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Centre National de la Recherche Scientifique of France, and partially fulfilled the requirements for C. Mura's Ph.D. degree from Carleton University. Two of us (G.B. and P.S.) acknowledge the *Centre National de la Recherche Scientifique* for the grant ATP Chromatine 2875. Abstracts of preliminary reports appeared in *Proc. Can. Fed. Biol. Soc.* 21, 35 (1978) and *Abstr. Int. Congr. Biochem.* 11, 538 (1979).

REFERENCES

- Stollar, B. D. & Ward, M. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1261–1266.
- Sluyser, M. & Bustin, M. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2507–2511.
- Tsutsui, Y., Suzuki, I. & Hayashi, H. (1975) *Exp. Cell Res.* 94, 63–69.
- Sapeika, G., Absolom, D. & Van Regenmortel, M. H. V. (1976) *Immunochemistry*, 13, 499–501.
- Roland, B. & Pallotta, D. (1978) *Can. J. Biochem.* 56, 1021–1027.
- Bustin, M. (1978) in *Chromatin, Part A*; vol. 4 of *The Cell Nucleus* (Busch, H., ed.) pp. 195–238, Academic Press, New York and London.
- Hekman, A. & Sluyser, M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 295, 613–620.
- Sotirov, N. & Johns, E. W. (1972) *J. Immunol.* 109, 686–691.
- Mihalakis, N., Miller, O. J. & Erlanger, B. F. (1976) *Science (Wash. D.C.)* 192, 469–471.
- Scott, A. C. & Wells, J. R. E. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 448–455.
- Desai, L. S., Pothier, L., Fole, G. E. & Adams, R. A. (1972) *Exp. Cell Res.* 70, 468–471.
- Mura, C., Huang, P. C. & Levy, D. A. (1974) *J. Immunol.* 113, 750–755.
- Goetz, G., Esmailradel, A. & Huang, P. S. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 517, 236–245.
- Bustin, M. & Cole, R. D. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5291–5294.
- Bustin, M. & Cole, R. D. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5286–5290.
- Yaguchi, M., Roy, C., Dove, M. & Seligy, V. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 76, 100–106.
- Greenaway, P. J. & Murray, K. (1971) *Nat. New Biol.* 229, 233–238.
- Purkayastha, R. & Neelin, J. M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 117, 468–477.
- Mazen, A. & Champagne, M. (1969) *FEBS Lett.* 2, 248–250.
- Sotirov, N. & Johns, E. W. (1972) *Exp. Cell Res.* 73, 13–16.
- Miki, B. L. A. M. & Neelin, J. M. (1977) *Can. J. Biochem.* 55, 1220–1222.
- Tsai, Y. H. & Hnilica, L. S. (1975) *Exp. Cell Res.* 91, 107–112.
- Destrée, O. H. J., Hoenders, H. J., Moorman, A. F. M. & Charles, R. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 577, 61–70.
- Mazen, A. & Champagne, M. (1976) *Exp. Cell Res.* 103, 119–125.
- Bustin, M. & Stollar, B. D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 3506–3510.
- Bustin, M. & Stollar, B. D. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 5716–5721.
- Bustin, M., Reeder, R. H. & McKnight, S. L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3099–3101.
- Takahashi, K. & Tashiro, Y. (1979) *Eur. J. Biochem.* 97, 353–360.
- Zick, Y., Goldblatt, D. & Bustin, M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 637–643.
- Mura, C., Craig, S. W. & Huang, P. C. (1978) *Exp. Cell Res.* 114, 301–305.
- Mura, C., Huang, P. C. & Craig, S. W. (1978) *Mech. Ageing Dev.* 7, 109–122.
- Enea, L., Gottesman, S. S. & Vidali, G. (1979) *Mech. Ageing Dev.* 7, 97–108.
- Sopina, V. A., Ivanova, S. B., Lipskaya, A. A., Bers, E. P., Vodop'yanova, I. G., Afon'kin, S. Y. & Kozlov, A. V. (1979) *Exp. Cell Res.* 121, 299–306.
- Champagne, M. & Mazen, A. (1967) *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 265D, 2100–2103.
- Murray, K., Vidali, G. & Neelin, J. M. (1968) *Biochem. J.* 107, 207–215.
- Panyim, S. & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337–346.
- Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautière, P., Kmiecik, D., Loy, O. & Biserte, G. (1975) *FEBS Lett.* 50, 200–203.
- Sautière, P., Briand, G., Kmiecik, D., Loy, O., Biserte, G., Garel, A. & Champagne, M. (1976) *FEBS Lett.* 63, 164–166.
- Crane-Robinson, C., Briand, G., Sautière, P. & Champagne, M. (1977) *Biochem. Biophys. Acta*, 493, 283–292.
- Briand, G., Kmiecik, D., Sautière, P., Wouters, D., Borie-Loy, O., Biserte, G., Mazen, A. & Champagne, M. (1980) *FEBS Lett.* 112, 147–151.
- Wasserman, E. & Levine, L. (1960) *J. Immunol.* 87, 290–295.
- Stollar, B. D. (1978) *Methods Cell Biol.* 18, 105–122.
- Mura, C. V. (1979) Ph.D. Thesis, Carleton University, Ottawa, Canada.
- Reichlin, M. & Noble, R. W. (1977) in *Immunochemistry of Proteins* (Atassi, M. Z., ed.) vol. 2, pp. 311–351, Plenum Press, New York and London.

45. Calvanico, N. J. & Tomasi, T. B. (1979) in *Immunochemistry of Proteins* (Atassi, M. Z., ed.) vol. 3, pp. 1–85, Plenum Press, New York and London.
46. Crane-Robinson, C., Danby, S. E., Bradbury, E. M., Garel, A., Kovacs, A. M., Champagne, M. & Daune, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* **67**, 379–388.
47. Feldman, L. & Stollar, B. D. (1977) *Biochemistry*, **16**, 2767–2771.
48. Atassi, M. Z. (1977) in *Immunochemistry of Proteins* (Atassi, M. Z., ed.) vol. 1, pp. 1–161, Plenum Press, New York and London.
49. Yaguchi, M., Roy, C. & Seligy, V. L. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1400–1406.
50. Absalom, D. & Van Regenmortel, M. H. V. (1977) *FEBS Lett.* **81**, 419–422.
51. Aviles, F. J., Chapman, G. E., Kneale, G. G., Crane-Robinson, C. & Bradbury, E. M. (1978) *Eur. J. Biochem.* **88**, 363–371.
52. Aviles, F. J., Danby, S. E., Chapman, G. E., Crane-Robinson, C. & Bradbury, E. M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **578**, 290–296.
53. Von Holt, C., Strickland, W. N., Brandt, W. F. & Strickland, M. S. (1979) *FEBS Lett.* **100**, 201–218.
54. Bustin, M. & Stollar, B. D. (1973) *Biochemistry*, **12**, 1124–1129.

C. Mura, Department of Biochemistry and Pharmacology, Tufts University School of Medicine, Boston, Massachusetts, U.S.A. 02111

J. Neelin, Biology Department, Carleton University, Ottawa, Canada, K1S 5B6

A. Mazen and M. Champagne, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Centre National de la Recherche Scientifique, 15 Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg-Cedex, France

P. Sautière and G. Briand, Unité 124, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Recherches sur le Cancer, B.P. no. 3567, F-59020 Lille-Cedex, France

L'histone H5 se caractérise essentiellement :

1°) par le caractère hydrophobe de la région NH_2 -terminale où sont localisés tous les résidus d'isoleucine, de leucine, cinq des huit résidus de valine et tous les résidus aromatiques (Tyr, Phe, His).

2°) par l'accumulation des résidus basiques dans la région COOH -terminale (50 % de résidus basiques).

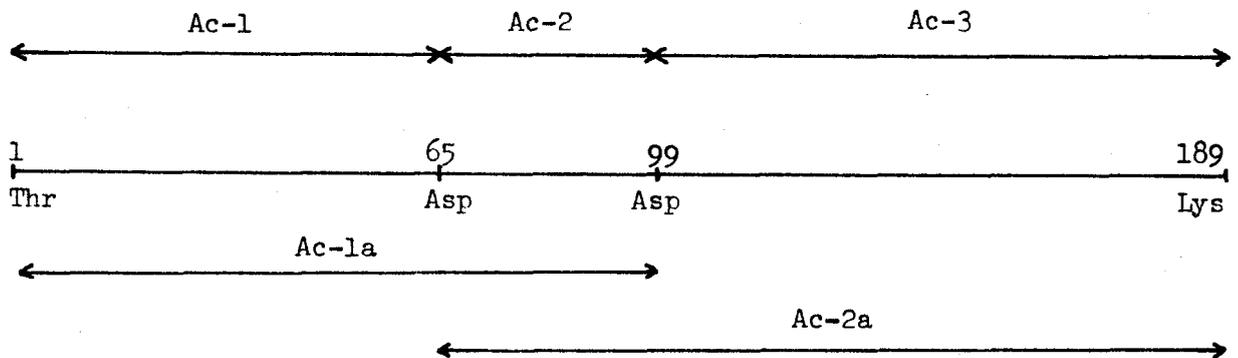
De nombreuses tentatives qui ont été faites pour étudier la corrélation séquence-conformation ont montré que les segments apolaires favorisaient la formation en hélice α .

Les caractéristiques de l'histone H5 suggèrent très fortement que la structure globulaire est localisée dans la partie NH_2 -terminale alors que la partie basique serait sous forme de pelote statistique.

Du fait de la position des résidus d'acide aspartique en position 65 et 99, les fragments obtenus à partir de l'histone H5 après coupure par l'acide acétique 0,25 N sont particulièrement intéressants pour déterminer les régions structurées ou non structurées de la molécule. En effet, le fragment NH_2 -terminal (résidus 1 à 99) englobe toute la région hydrophobe de l'histone tandis que le fragment COOH -terminal (résidus 100 à 189) correspond exactement à sa région basique.

L'hydrolyse de l'histone H5 par l'acide acétique 0,25 N permet d'obtenir cinq fragments (figure ci-dessous) qui présentent un très grand intérêt :

- à la fois pour les études conformationnelles,
- ainsi que pour l'étude des sites antigéniques de l'histone H5.



1 - STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE DE L'HISTONE H5

1-1 Résultats obtenus en résonance magnétique nucléaire

(RMN) et dichroïsme circulaire (DC) sur les peptides acétiques

L'obtention des peptides acétiques et les études faites en spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de dichroïsme circulaire (DC) à Portsmouth en collaboration avec M. BRADBURY et C. CRANE-ROBINSON sont présentés dans la publication 4 (38).

Les résultats obtenus montrent que la partie NH_2 -terminale de la molécule a une structure globulaire alors que la partie COOH -terminale n'a aucune structure. En RMN comme en DC nous observons un changement important de conformation des fragments Ac-1 (résidus 1 à 65) et Ac-la (résidus 1 à 99) lors de l'élévation de la force ionique avec du sulfate de potassium 0,25 M.

Dans ces conditions de structuration, on peut observer une conformation en hélice α dans le peptide Ac-1 (résidus 1 à 65). Le taux d'hélicité mesuré en DC à 222 nm, est de 23 % (15 résidus).

Dans les mêmes conditions, le peptide Ac-la (résidus 1 à 99) a une hélicité α de 26 % (26 résidus). Sa structure tertiaire, mise en évidence par la perturbation en RMN du spectre des résidus d'histidine et de tyrosine, est plus importante que celle du peptide Ac-1 (résidus 1 à 65).

Le fragment Ac-2a (résidus 66 à 189) a une hélicité α de 5 % (7 résidus).

Enfin, le fragment Ac-3 (résidus 100 à 189) peut être considéré comme un excellent modèle de structure totalement inorganisée.

1-2 Prédiction de la structure secondaire d'après la méthode

de CHOU et FASMAN

La méthode de calcul de CHOU et FASMAN (34) qui permet la prédiction de la structure secondaire d'une protéine, attribue à chaque résidu d'acide aminé une probabilité de se classer dans l'une des conformations suivantes :

hélice α , feuillet β , coude β (ou β -turn), structure inorganisée en pelote statistique.

La structure secondaire prédite pour l'histone H5 est présentée dans la figure 20 (page 105).

Les régions organisées, observées en RMN et DC dans la région NH₂-terminale, apparaissent d'après le calcul, localisées entre les résidus 1 et 6, 30 et 40, puis entre les résidus 64 et 82.

Les régions comprises entre les résidus 10 et 19, 93 et 103 puis 135 et 148 ont une forte probabilité de se mettre en structure hélicoïdale. Cependant, à cause des répulsions des charges entre résidus voisins, défavorables à la formation d'hélice α , ces régions n'ont en fait, aucune structure.

Le nombre de résidus en hélice α définis par cette méthode (32 résidus) est en bon accord avec les données obtenues par le dichroïsme circulaire (27 résidus) (37).

Il est intéressant de noter l'absence de structure β dans l'histone H5. Ce résultat obtenu par le calcul était déjà connu par spectroscopie infrarouge (CRANE-ROBINSON et coll.) (37).

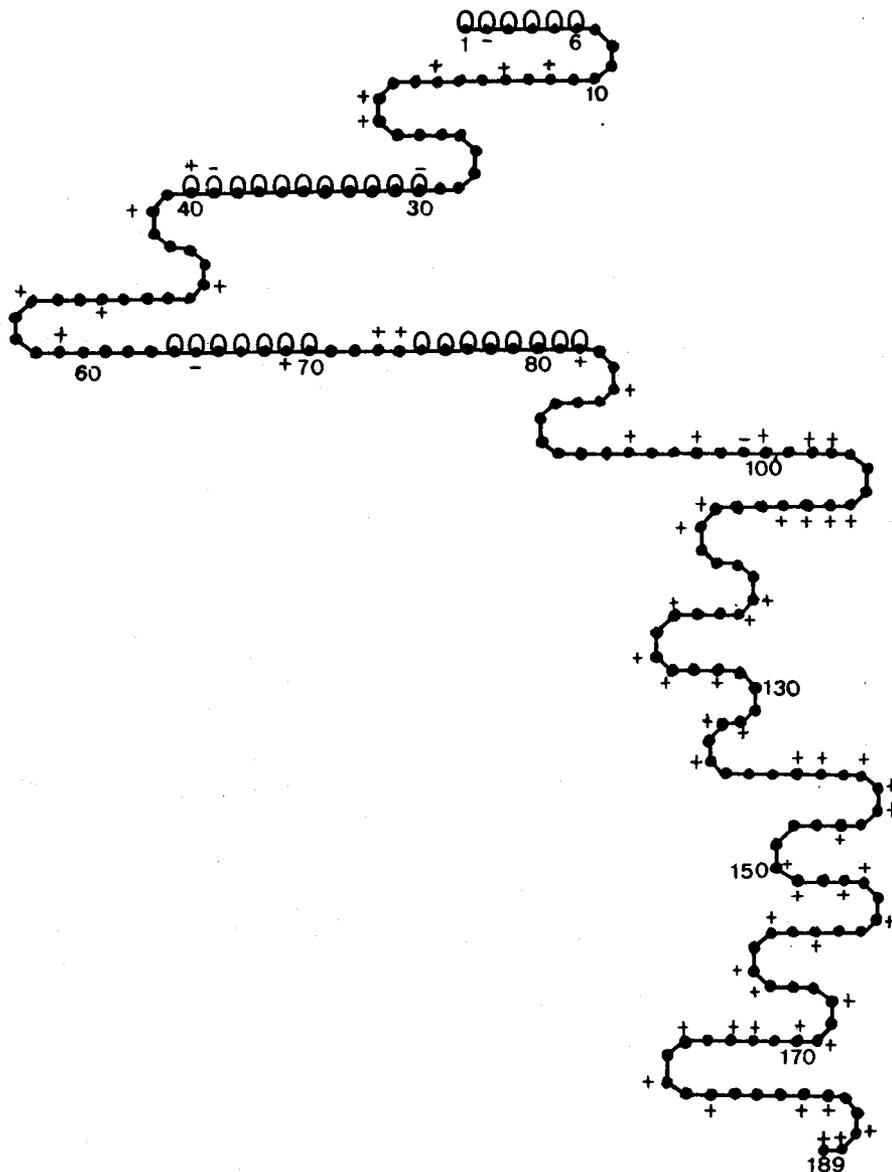
1-3 Discussion

L'étude des peptides acétiques a permis de montrer que la partie NH₂-terminale de l'histone H5 (résidus 1 à 99) est globulaire alors que la partie COOH-terminale (résidus 100 à 189) ne possède aucune structure organisée.

Ces résultats ont confirmé ceux obtenus par CRANE-ROBINSON et coll. (37) en dichroïsme circulaire, spectroscopie de RMN et spectroscopie IR sur l'histone H5 et ses fragments obtenus par coupure

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE L'HISTONE H5

D'ERYTHROCYTE DE POULET



La structure secondaire est déterminée par le calcul de FASMAN et Coll. (48). Les régions en hélice α sont représentées par \bigcirc . Les "retournements" de chaîne indiquent les tétrapeptides en coude β . Les régions en structure inorganisée sont représentées par \bullet . Les résidus de lysine et d'arginine sont indiqués par un signe + et les résidus d'acide aspartique et d'acide glutamique par un signe -.



figure 20

avec le bromure de cyanogène (résidus 1 à 31, résidus 32 à 189) et la N-Bromosuccinimide (résidus 59 à 189). Dans l'histone H5 la formation de la structure secondaire s'accompagne d'un repliement tertiaire mis en évidence en dichroïsme circulaire au niveau de la bande d'absorption des résidus aromatiques dans la région 280-290 nm.

Récemment, AVILES et coll. (5) ont pu affiner les résultats précédents en déterminant les limites précises de la zone globulaire de l'histone H5. L'histone H5 est placée dans un milieu de force ionique élevée (tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 - K_2SO_4 0,2M) où elle acquiert un maximum de conformation secondaire et tertiaire. La protéine est alors soumise à une hydrolyse trypsique limitée : rapport enzyme/substrat 1/1000, température à 20°C, durée de l'hydrolyse 4 heures. Dans ces conditions, la trypsine libère un fragment de 79 résidus (résidus 22 à 100) qui correspond à la zone globulaire de l'histone H5.

A partir des spectres de dichroïsme circulaire les auteurs ont pu estimer à 25 le nombre de résidus en configuration d'hélice α . Cette valeur est voisine de celle trouvée pour l'histone H5 (27 résidus en configuration d'hélice α) et de celle trouvée pour le fragment Ac-la (26 résidus en configuration d'hélice α). Rappelons que le fragment Ac-la est obtenu par coupure de l'histone H5 avec l'acide acétique 0,25 N et correspond à la séquence 1-99.

Il apparaît donc que la zone centrale 22-100 renferme toute l'hélicité α de l'histone H5.

Par mesure de la vitesse de sédimentation et par diffusion des neutrons, cette région globulaire a une forme approximativement sphérique. La diffusion des neutrons permet de déduire un rayon de giration de $1,14 \pm 0,07$ nm (5).

L'histone H5 en solution contient donc trois domaines bien distincts (figure 21, page 108) :

- Une région NH_2 -terminale désordonnée d'environ 21 résidus,

- une région globulaire sphérique de 79 résidus. Cette région renferme toute la structure secondaire et tertiaire de la protéine. En outre, CHAPMAN et coll. (32) ont mis en évidence par RMN la proximité des résidus de tyrosine 28 et 53.

- une région COOH -terminale désordonnée de 89 résidus.

L'histone H1 comporte également ces trois domaines structuraux. La différence importante est que le domaine NH_2 -terminal de l'histone H5 est plus court d'environ 12 résidus d'acides aminés et comporte une charge positive nette moins importante.

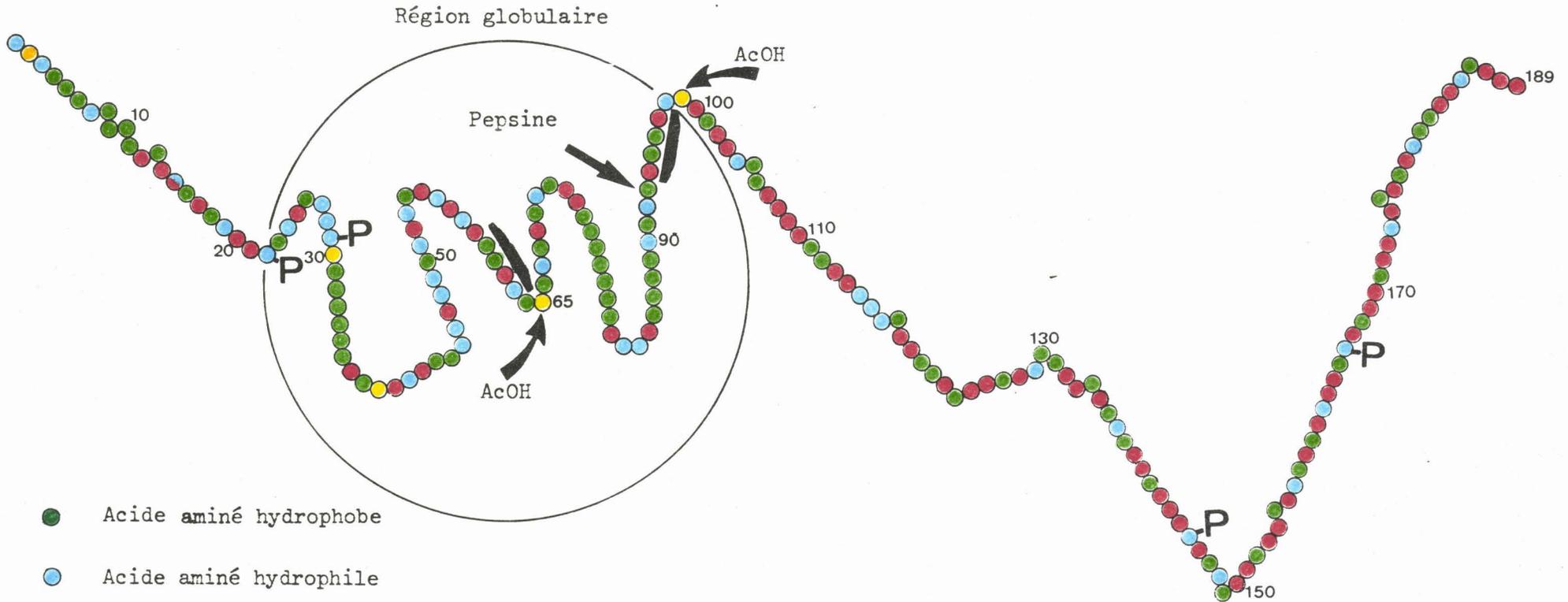
Ces différences pourraient se répercuter sur les forces d'interaction entre DNA et les régions NH_2 -terminales de ces deux histones.

GAREL et coll. (54) ont étudié, par dichroïsme circulaire et absorption ultraviolette la stabilité et la conformation du complexe de l'histone H5 avec le DNA au cours de sa dénaturation thermique.

Par ailleurs, les liaisons de l'histone H5 et de la région centrale (résidus 22 à 100) au DNA ont été étudiées en RMN à faible force ionique (AVILES et coll.) (6).

D'après ces deux résultats, la structure organisée de l'histone H5 observée sur la protéine seule, à force ionique élevée, est maintenue lorsque la protéine se lie au DNA à force ionique de 10^{-3} M. Dans ces conditions de faible force ionique, l'histone H5 seule n'est pas structurée. Ceci met en évidence l'importance du "microenvironnement" ionique résultant de la concentration des ions portés par les histones et le DNA dans un volume restreint.

STRUCTURE SCHEMATIQUE DE L'HISTONE H5 D'ERYTHROCYTE DE POULET



- Acide aminé hydrophobe
- Acide aminé hydrophile
- Acide aminé basique
- Acide aminé acide
- P Site de phosphorylation
- / Déterminant antigénique

Le schéma, que nous proposons, montre que l'histone H5 contient trois domaines bien distincts :

- les régions NH₂-terminale et COOH-terminale de structure désordonnée,
- une région globulaire centrale renfermant toute la structure secondaire et tertiaire de la protéine.

D'après CRANE-ROBINSON et coll. (37), (38) et AVILES et coll. (5).



figure 21

Les trois régions structurales de l'histone H5 se lient fortement au DNA à faible force ionique. Le domaine central (résidus 22 à 100) se dissocie du DNA entre 0,3 - 0,4 M NaCl, mais une concentration de 0,7 M NaCl est nécessaire pour la dissociation des régions NH₂- et COOH-terminales.

Contrairement à l'histone H5, l'histone H1 se lie faiblement au DNA par ses régions NH₂-terminale et globulaire, seule la partie COOH-terminale interagit fortement avec le DNA.

Cette différence pour la région globulaire peut être attribuée au taux plus élevé de résidus d'arginine de l'histone H5 par rapport à l'histone H1. En effet, en RMN, la résonance du groupe NH₂ du groupement guanidique des résidus d'arginine est intense seulement à force ionique élevée impliquant que ces résidus interagissent fortement avec le DNA.

Enfin, les deux sites majeurs de la phosphorylation (résidus de sérine 145 et 166) ainsi que les deux sites mineurs (résidus de sérine en position 22 et 29) sont localisés dans ou près des coudes β conformation qui pourrait être nécessaire à la reconnaissance du site par la phosphokinase (MACLEOD et coll.) (89).

2 - ETUDE DES SITES ANTIGENIQUES DE L'HISTONE H5

L'obtention des différents fragments acétiques de l'histone H5 débouche également sur la détermination des sites antigéniques de la protéine.

L'étude immunologique a été réalisée au laboratoire de Biochimie de l'Université CARLETON à Ottawa et à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg (publication 5) (96).

Huit fragments peptidiques ont été utilisés pour la localisation des sites antigéniques de l'histone H5 :

- fragments CN-1 (résidus 1 à 31) et
CN-2 (résidus 32 à 189) obtenus par
coupure de la protéine avec le bromure de cyanogène,
- fragment NB-4 (résidus 59 à 189) obtenu par
coupure de la protéine avec la N-Bromosuccinimide,
- fragments acétiques : Ac-1 (résidus 1 à 65)
Ac-1a (résidus 1 à 99)
Ac-2 (résidus 66 à 99) et
Ac-3 (résidus 100 à 189),
- fragment Px (résidus 94 à 189) obtenus par hydro-
lyse de l'histone H5 avec la pepsine.

Notre participation à ce travail se situe au niveau de la préparation des fragments acétiques et du fragment Px de l'histone H5.

La capacité des peptides d'inhiber la fixation du complément par le complexe H5/anti H5 est appréciée par la disparition du pouvoir hémolytique du mélange vis à vis des hématies de Mouton. Une mesure de la quantité d'hémoglobine libérée est faite par lecture spectrophotométrique à 550 nm.

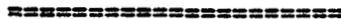
Deux déterminants antigéniques sont localisés dans la zone globulaire de la protéine : séquences 59 - 65 et 94 - 99 (figure 21, page 108).

La conservation de ces deux régions dans l'histone H5 d'Oie (157) expliquerait la fixation du complément observée par le complexe H5 d'Oie/anti H5 de Poulet (observations non publiées de M. RODRIGUEZ, C. MURA et J. NEELIN).

Deux autres déterminants antigéniques, moins bien définis, sont localisés l'un dans la zone globulaire entre les résidus 66 et 93, l'autre dans la moitié COOH-terminale de la protéine entre les résidus 100 et 189.

L'inhibition par l'histone H1 de la fixation du complément par le complexe H5 - anti H5 suggère une homologie antigénique limitée entre ces deux histones.

C O N C L U S I O N S



Nous avons déterminé la structure primaire complète (189 résidus) de l'histone H5 d'érythrocyte de Poulet. La séquence de l'histone H5 est caractérisée par :

- une distribution asymétrique des résidus basiques et hydrophobes ;
- la présence de 3 domaines :
 - un domaine basique peu structuré (résidus 1 à 21) ;
 - un domaine hydrophobe de structure globulaire (résidus 22 à 99) ;
 - un domaine très basique dépourvu de toute structure (résidus 100 à 189).

Les domaines basiques sont des sites privilégiés d'interactions électrostatiques avec les groupes phosphate du DNA. Il n'est pas exclu toutefois qu'ils soient également le siège d'interactions électrostatiques avec les fonctions carboxyliques des chaînes latérales des protéines HMG 1 et HMG 2 dont les régions COOH-terminales sont très riches en résidus d'acide aspartique et d'acide glutamique.

Cette détermination de séquence a permis :

- la détermination des sites antigéniques ;
 - l'identification des sites de phosphorylation.
- Les sites majeurs de phosphorylation (Ser 145 et Ser 166) sont situés dans des séquences comprises entre les résidus de Pro-134 et Pro-149 d'une part et les résidus de Pro-155 et Pro-176 d'autre part qui pourraient se structurer en hélice α par l'introduction d'un groupement phosphate au niveau d'un

résidu de sérine et lorsque les charges positives sont neutralisées par les groupes phosphate du DNA.

La connaissance de la structure primaire de l'histone H5 est une étape essentielle et indispensable à la compréhension de sa fonction au sein de la chromatine. Nous savons que l'histone H5 remplace progressivement, mais partiellement l'histone H1, au cours de la maturation de l'érythrocyte et qu'elle manifeste une plus forte affinité pour le DNA que l'histone H1, à cause de son taux élevé d'arginine, environ cinq fois supérieur à celui de l'histone H1.

Le rôle de l'histone H5 serait de maintenir la chromatine de l'érythrocyte dans un état condensé, état dans lequel la chromatine est transcriptionnellement inactive. Les interactions histone H5-DNA sont modulées par la phosphorylation. Ainsi dans l'érythroblaste où la globine est encore synthétisée, l'histone H5 est très phosphorylée alors que dans l'érythrocyte mature l'histone H5 est complètement déphosphorylée (APPELS et WELLS) (4).

On est tenté d'établir un parallèle entre le rôle de l'histone H5 et celui des protamines dans la condensation de la chromatine. Au cours de la spermatogénèse, les histones sont remplacées par des protamines dont les interactions avec le DNA sont modulées par la phosphorylation (26), (85), (86), (87).

En raison de la parenté structurale entre les histones H1 et H5, il serait intéressant de rechercher si l'histone H5 comme l'histone H1 est susceptible d'être ADP-ribosylée. On connaît dans l'histone H1 les sites d'ADP-ribosylation sur le γ -COOH du résidu d'acide glutamique en position 2 et sur l' α -COOH du résidu de lysine en position 189. Selon l'hypothèse d'OGATA et coll. (101) l'ADP-ribosylation interviendrait dans la formation de l'homopolymère de H1 qui apparaît dans les structures d'ordre supérieur de la chromatine (THOMA et coll.) (133).

Enfin, les études structurales de YAGUCHI et coll. (157) réalisées sur l'histone H5 de cinq espèces du groupe aviaire ont mis en évidence une variabilité de séquence tout à fait significative surtout quand on compare les histones H5 de Poulet et de Pigeon. L'étude de la structure primaire d'une histone H5 isolée d'une autre espèce animale comme les Poissons ou les Amphibiens présenterait donc un intérêt phylogénétique certain.

APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE

- 1 - Dégradation automatique de EDMAN
 - 1-1 Solubilisation du peptide
 - 1-2 Couplage avec le phénylthiocyanate
 - 1-3 Elimination de l'excès de réactifs
 - 1-4 Clivage par l'acide heptafluorobutyrique
 - 1-5 Extraction des thiazolinones

- 2 - Identification des PTH-Amino-acides

- 3 - Méthode modifiée de EDMAN utilisant le 4-NN-diméthylaminoazobenzène
4'-isothiocyanate

- 4 - Hydrolyse par la carboxypeptidase C

1 - DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN

La perte importante de rendement au cours de la dégradation manuelle de EDMAN est essentiellement due à une désulfuration oxydative du groupement phénylthiocarbamyl.

La dégradation automatique de EDMAN est par contre réalisée en atmosphère inerte d'azote.

Le séquenceur utilisé est du type Beckman 890 C. Le "coeur" de l'appareil est une coupelle cylindrique en verre. La coupelle en rotation permet d'étaler la protéine en un film très fin et régulier qui avantage les échanges avec les réactifs comme avec les solvants. L'élimination des réactifs est accélérée et le séchage du film s'en trouve amélioré.

La coupelle comporte un "étranglement" discret (undercut) situé à mi-hauteur de sa partie cylindrique, dont le but est d'empêcher l'élimination de la protéine ou du peptide lors des lavages par le benzène (figure 22, page 119).

Les différentes étapes de la dégradation automatique, effectuées à 57°C, sont les suivantes (figure 23, page 120) :

- Solubilisation du peptide
- Couplage avec le phénylthiocyanate
- Elimination de l'excès de réactifs
- Clivage par l'acide heptafluorobutyrique
- Extraction des 2 anilino-5 thiazolinones.

SCHEMA SIMPLIFIE DU SEQUENCEUR BECKMAN 890 C

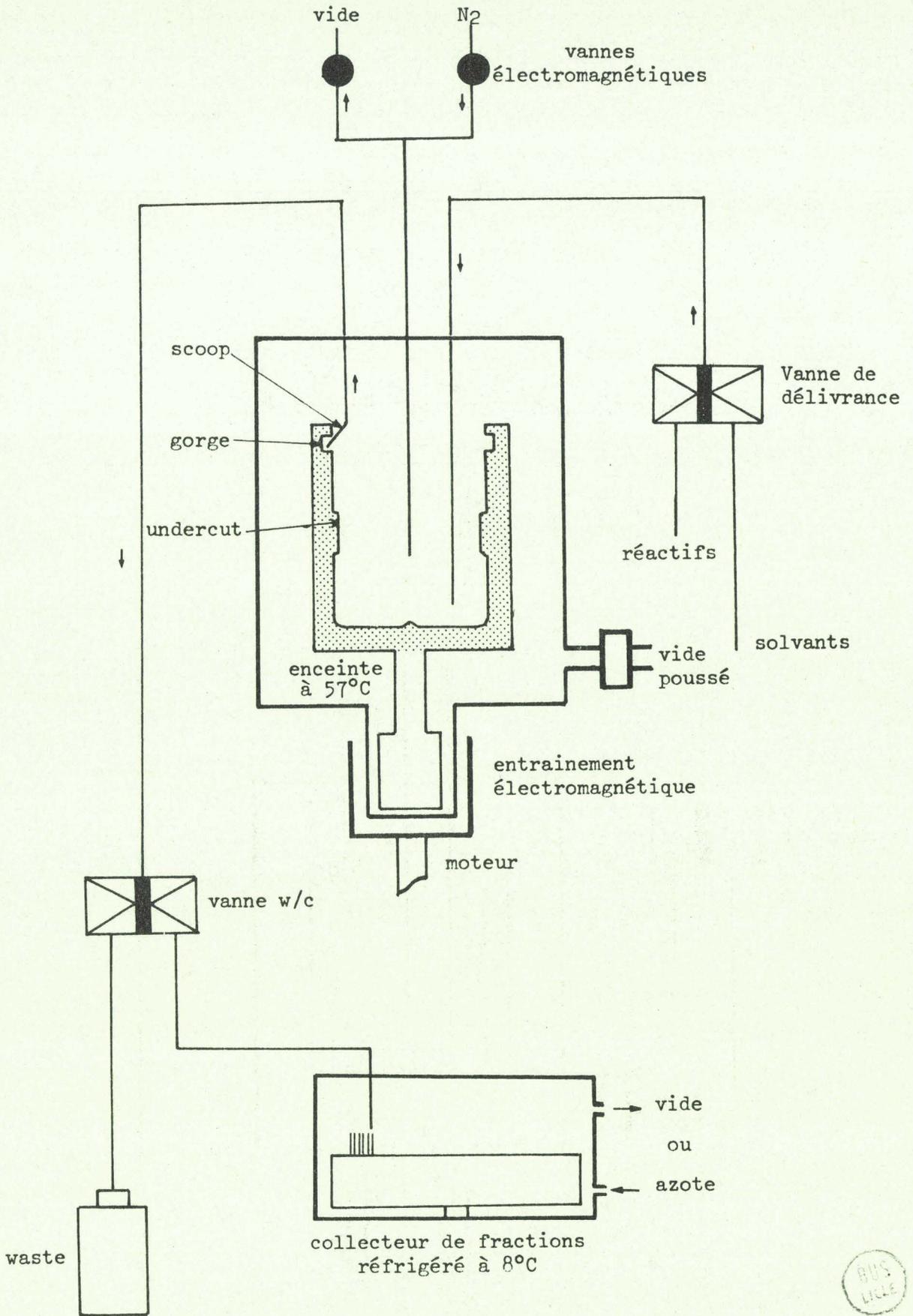


figure 22

ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN (44)

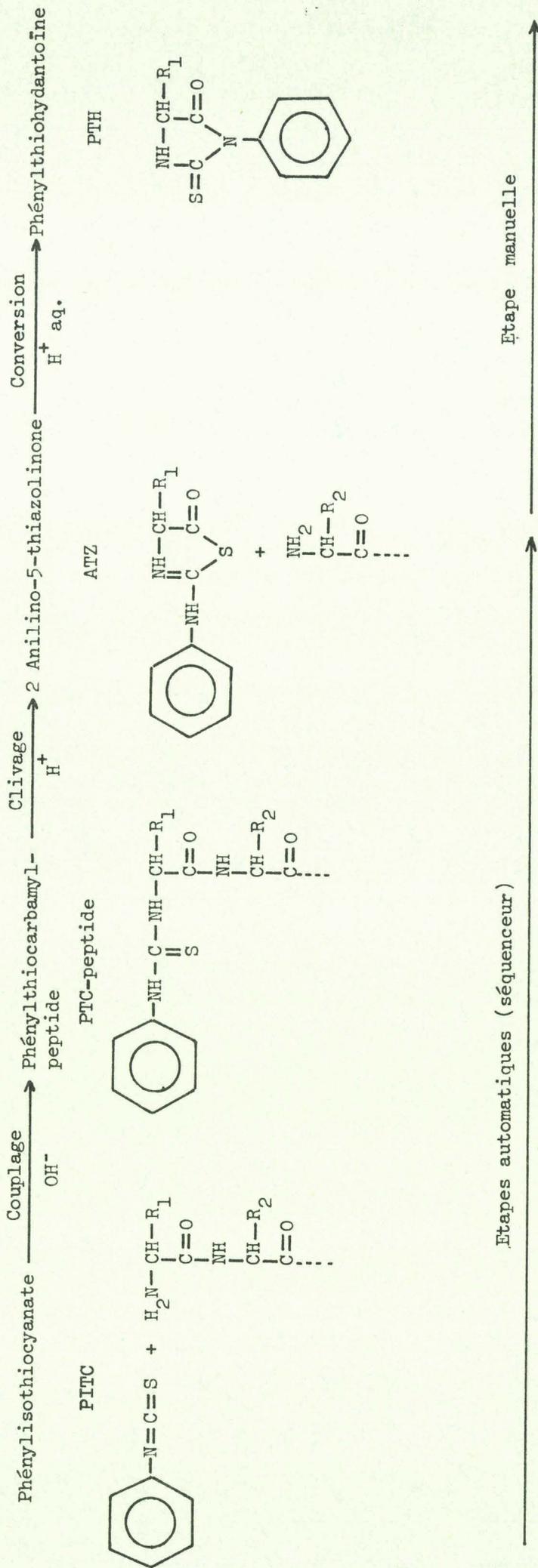


figure 23



1-1 Solubilisation du peptide

Le peptide est solubilisé dans 400 µl d'eau ou d'acide formique à 10 % ou même dans le tampon de couplage, puis déposé délicatement près du fond de la coupelle tandis que celle-ci tourne à 1 000 t/mn. Le peptide est plaqué contre la paroi de la coupelle sous l'effet de la force centrifuge. Le séchage est ensuite effectué par une série de balayages à l'azote et de vide progressif.

1-2 Couplage avec le phénylisothiocyanate

Le couplage est réalisé en faisant réagir le peptide avec du phénylisothiocyanate (PITC) en tampon de couplage diméthylallylamine 0,8 M pH 9,4 (DMAA).

1-3 Elimination de l'excès de réactifs

Le DMAA est utilisé pour les peptides relativement courts. Il est très volatil et de ce fait, la plus grande partie peut être éliminée par évaporation sous vide. La quantité de benzène nécessaire pour son élimination totale est très réduite, limitant ainsi les pertes de peptide.

L'élimination des constituants du tampon de couplage, du PITC en excès et de ses dérivés secondaires est réalisée par un vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel puis par un lavage au benzène. Le benzène est ensuite éliminé lorsqu'il atteint la gorge située

à la partie supérieure de la coupelle d'où il est aspiré à l'aide d'un tube appelé scoop.

1-4 Clivage par l'acide heptafluorobutyrique

Après séchage du film, le clivage est réalisé par addition d'acide heptafluorobutyrique (HFBA). Un vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide permet d'éliminer l'acide à la fin de la réaction.

1-5 Extraction des thiazolinones

Enfin la dernière étape, réalisée par le séquenceur, est l'extraction par le chloro-butane des 2 anilino-5 thiazolinones (ATZ) et leur collection dans des tubes réfrigérés contenant le milieu de conversion 200 µl d'HCl IN et quelques gouttes d'éthyl mercaptan comme antioxydant.

La dégradation automatique, d'une durée de 80 minutes, se termine par un séchage du peptide résiduel grâce à un vide progressif suivi d'un balayage d'azote sous vide partiel. Le cycle suivant peut ensuite commencer.

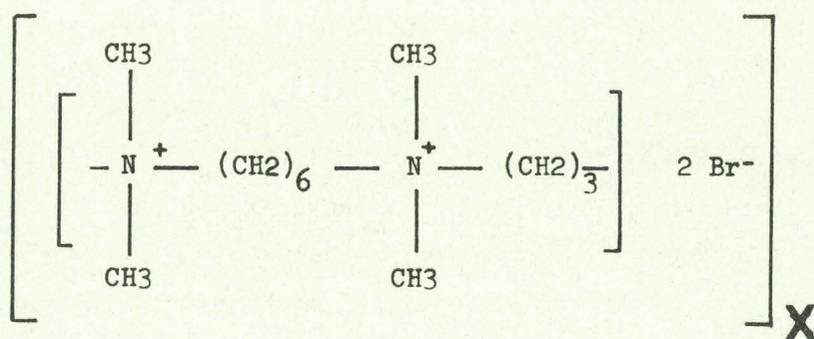
Au cours de la conversion, la thiazolinone est transformée en une phénylthiohydantoïne d'acide aminé (PTH) plus stable.

Le chloro-butane est ensuite évaporé sous azote. Au cours de cette évaporation, la thiazolinone se concentre progressivement dans la phase HCl qui est incubée de 7 à 15 minutes à 80°C.

La durée de la conversion est de 10 minutes pour la plupart des PTH-amino-acides. Cependant, ce temps est limité à 7 minutes pour les PTH-hydroxylés (Sérine, Thréonine) afin d'éviter leur destruction et porté à 15 minutes pour permettre une conversion totale des PTH-Val, PTH-Leu, PTH-Ile, PTH-Phe, PTH-Lys.

A cette technique classique de EDMAN nous y avons ajouté l'utilisation de "mainteneurs" (51), (112), (120), (131) qui ont pour but de minimiser au maximum les pertes lors des lavages par une stabilisation mécanique du peptide dans la coupelle.

Bien qu'il soit possible d'utiliser des protéines bloquées naturellement ou artificiellement (51), (112), le mainteneur le "plus utilisé" est le polybrène. Le polybrène est un ammonium quaternaire de formule :



Si son mécanisme d'action n'est pas encore bien connu, on sait que la quantité minimum à utiliser est de 2 à 3 mg (74). Les artefacts dus au polybrène sont sensiblement diminués en soumettant 50 nanomoles de dipeptide Gly - Gly à 3 cycles de dégradation en présence de mainteneur ce qui a pour but de faire réagir les impuretés du polybrène avec le groupe α-aminé terminal du dipeptide (69).

Le peptide est ensuite déposé dans la coupelle puis soumis à la dégradation automatique.

La deuxième modification est l'utilisation du phényliso-thiocyanate sulfoné pour les peptides contenant plusieurs résidus de lysine.

Le blocage des groupes ϵ -aminés des résidus de lysine par le 3-sulfo-PITC augmente la polarité du peptide et évite son entrainement hors de la coupelle pendant les opérations de lavage qui interviennent au cours de la dégradation automatique de EDMAN (21), (22).

Le groupe α -aminé du résidu d'acide aminé en position NH_2 -terminale est également modifié.

La thiazolinone des acides aminés modifiés n'est plus extraite par le chloro-butane et il est donc nécessaire d'identifier préalablement le résidu en position NH_2 -terminale par une autre méthode. Par contre, l'identification des résidus de lysine est directement impossible.

Cependant, en utilisant le 3-sulfo-PITC en faible excès, la modification des résidus de lysine n'est pas totale. Il est donc possible, après extraction de la thiazolinone, d'identifier le PTH-Lys.

Environ 300 nM de peptide sont traitées par le 3-sulfo-PITC (1 nM de sulfo-PITC/nM de résidu de lysine) pendant 1 heure à 40°C en milieu diméthylamino-propyne - eau (30:15) (v/v).

Après avoir ajouté 5 μl de tributylamine la réaction se continue 1 heure à la température ambiante. Evaporé à sec le peptide est repris par le tampon de couplage DMAA 0,8 M pH 9,4 et déposé dans la coupelle.

2 - IDENTIFICATION DES PTH-AMINO-ACIDES

Nous avons d'abord utilisé comme technique principale d'identification des PTH-amino-acides la microchromatographie sur couche mince de gel de silice (Kieselgel 60 F 254) puis la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (66).

La technique de microchromatographie sur couche mince (35) que nous n'avons utilisée qu'une seule fois, ne sera pas décrite dans cet appendice technique.

La détermination des PTH-amino-acides par chromatographie sur couche mince est rapide et peu couteuse mais l'impossibilité d'un dosage limite son utilisation à une recherche rapide des constituants de l'échantillon à analyser.

Les avantages de la chromatographie liquide à haute performance par rapport à la chromatographie sur couche mince ou en phase gazeuse sont :

- quantification précise de tous les PTH-amino-acides. Possibilité d'identifier un plus grand nombre de résidus, la quantification minimisant les risques d'erreur en présence d'un bruit de fond inévitable en fin de dégradation,

- faible quantité de l'échantillon utilisé,

- absence de transformation préalable à l'injection de l'échantillon.

L'appareil utilisé pour la chromatographie liquide à haute performance est un Hewlett-Packard modèle 1084B équipé d'un détecteur à UV fixe (254 nm) et d'un détecteur à UV variable (200-540 nm).

La phase utilisée pour la séparation des PTH-amino-acides est constituée d'un support solide (silice) sur lequel sont greffés

des groupements - (CH₂)₁₇ - CH₃ de caractère peu polaire (μ Bondapak C18 Waters Associates).

La phase mobile utilisée est polaire et on parle alors de chromatographie liquide à phases inversées.

La séparation des PTH-amino-acides sur colonne C18 (3,9 x 300 mm) est présentée dans la figure 24 (page 127). Le PTH-NVal est utilisé comme témoin interne.

Les PTH-Méthionine et PTH-Valine d'une part, et les PTH-Isoleucine et PTH-Phénylalanine non séparés sur colonne μ Bondapak C18, peuvent être identifiés sur une colonne μ Bondapak CN (Waters Associates). Cette colonne de polarité intermédiaire est constituée par la liaison chimique d'un groupe cyano sur un support de silice. La séparation obtenue est présentée dans la figure 25 (page 128).

L'identification des PTH-Met, PTH-Val, PTH-Ile et PTH-Phe est également possible en chromatographie phase gaz utilisant une colonne WHP 100/120 mesh imprégnée de chlorophénylsilicone SP400 à 10 %.

Le diagramme obtenu des PTH-amino-acides sans silylation est présenté dans la figure 26 (page 129). Ce système a pour unique but d'identifier avec certitude les PTH-Val, PTH-Met, PTH-Ile et PTH-Phe.

Les PTH-hydroxylés (Sérine, Thréonine) sont particulièrement instables et forment des dehydrodérivés. 80 % du PTH-Sérine et 65 % du PTH-Thréonine sont détruits pendant la conversion malgré l'emploi d'éthylmercaptan et la durée de conversion limitée à 7 minutes.

En outre, leur identification en phase gazeuse est difficile à cause de leur décomposition thermique.

Leur détection en HPLC à 254 nm est difficile, mais il est cependant possible de détecter les dérivés de la thréonine à 313 nm.

SEPARATION DES PTH-AMINO-ACIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE SUR COLONNE μ BONDAPAK C18

D.O. 254 nm
0,1

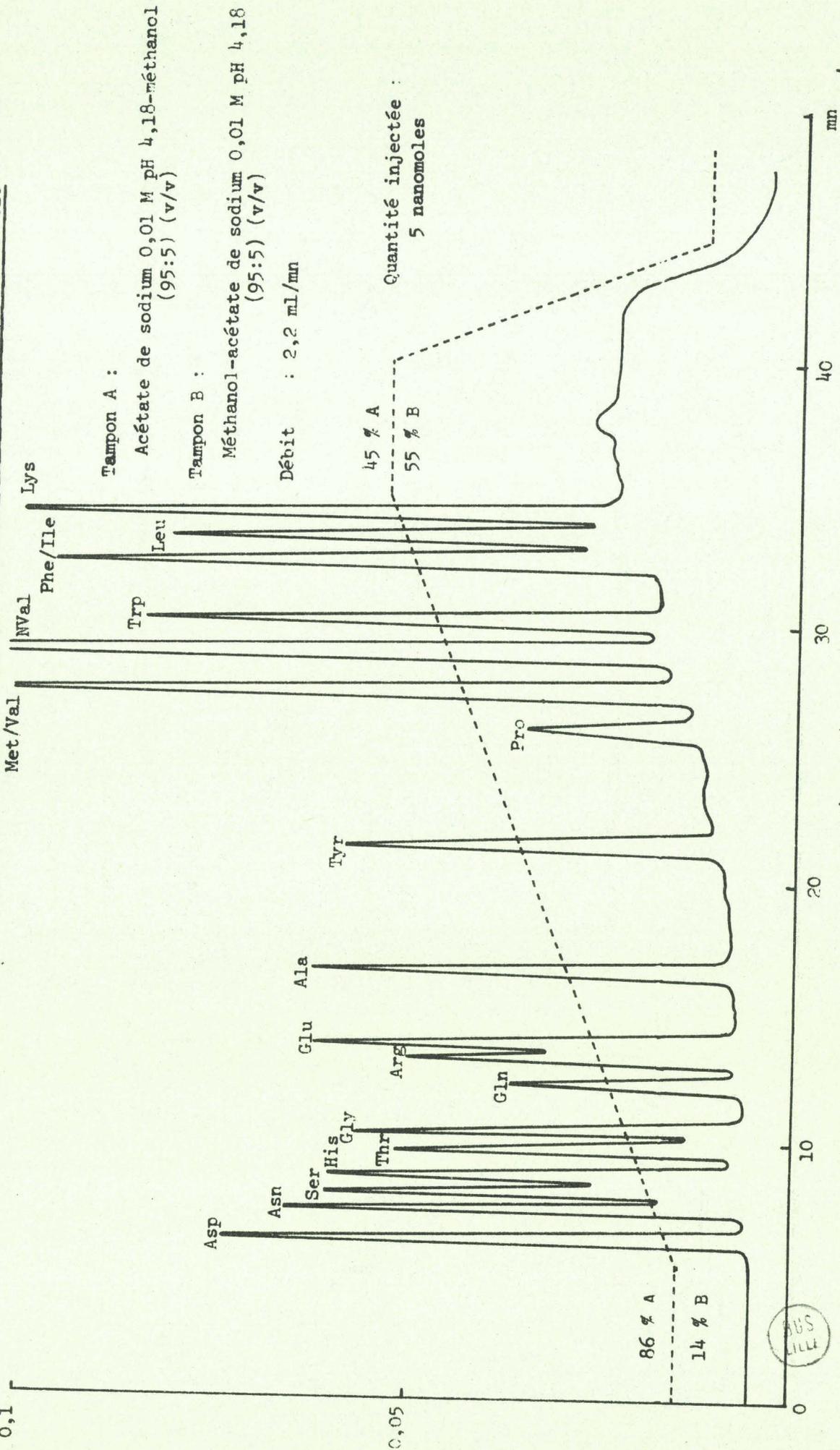


Figure 24

SEPARATION DES PTH-AMINO-ACIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE SUR COLONNE μ BONDAPAK CN

D.O. 254 nm
0,1

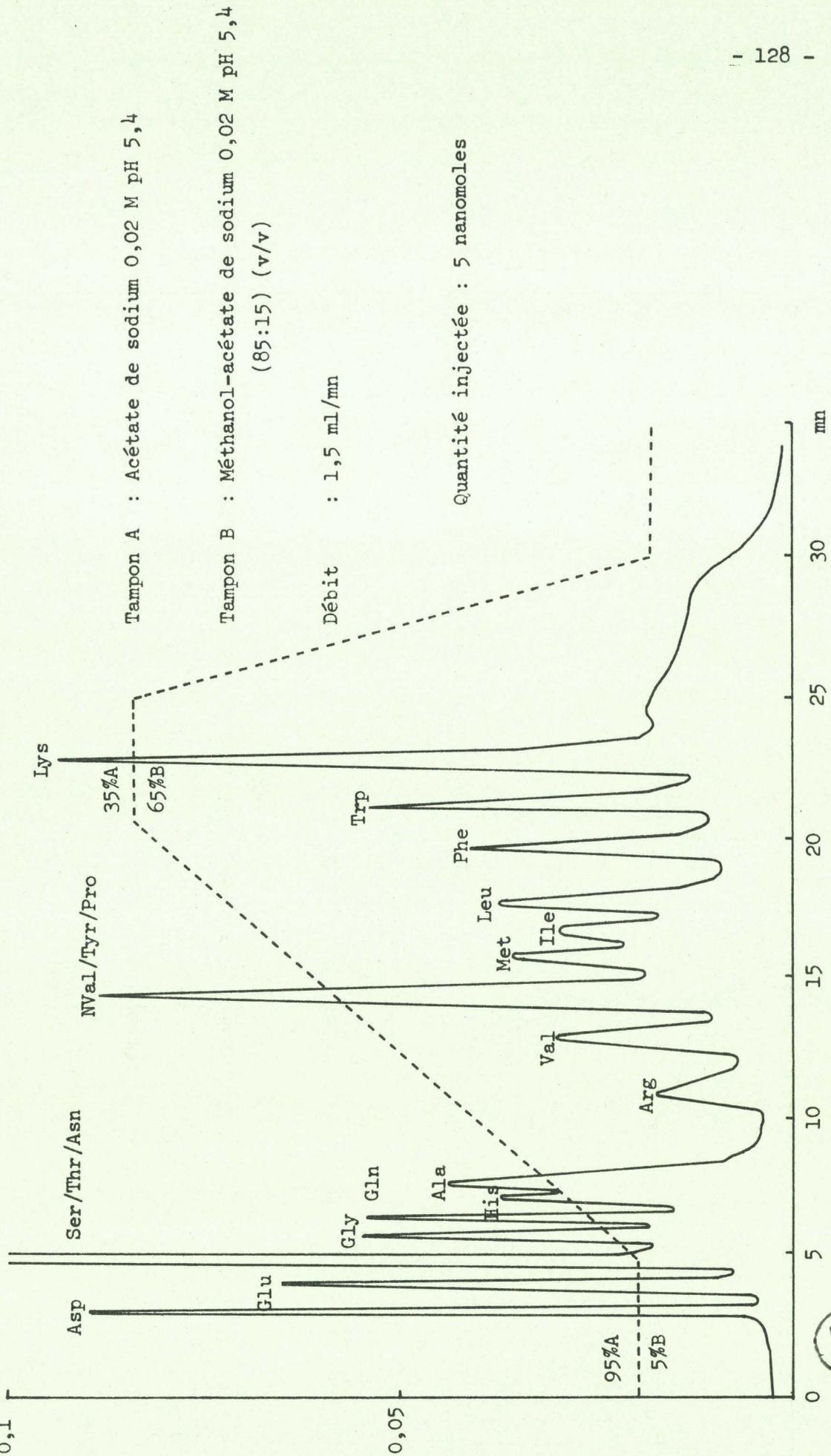


figure 25



SEPARATION DES PTH-AMINO-ACIDES NON SILYLES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

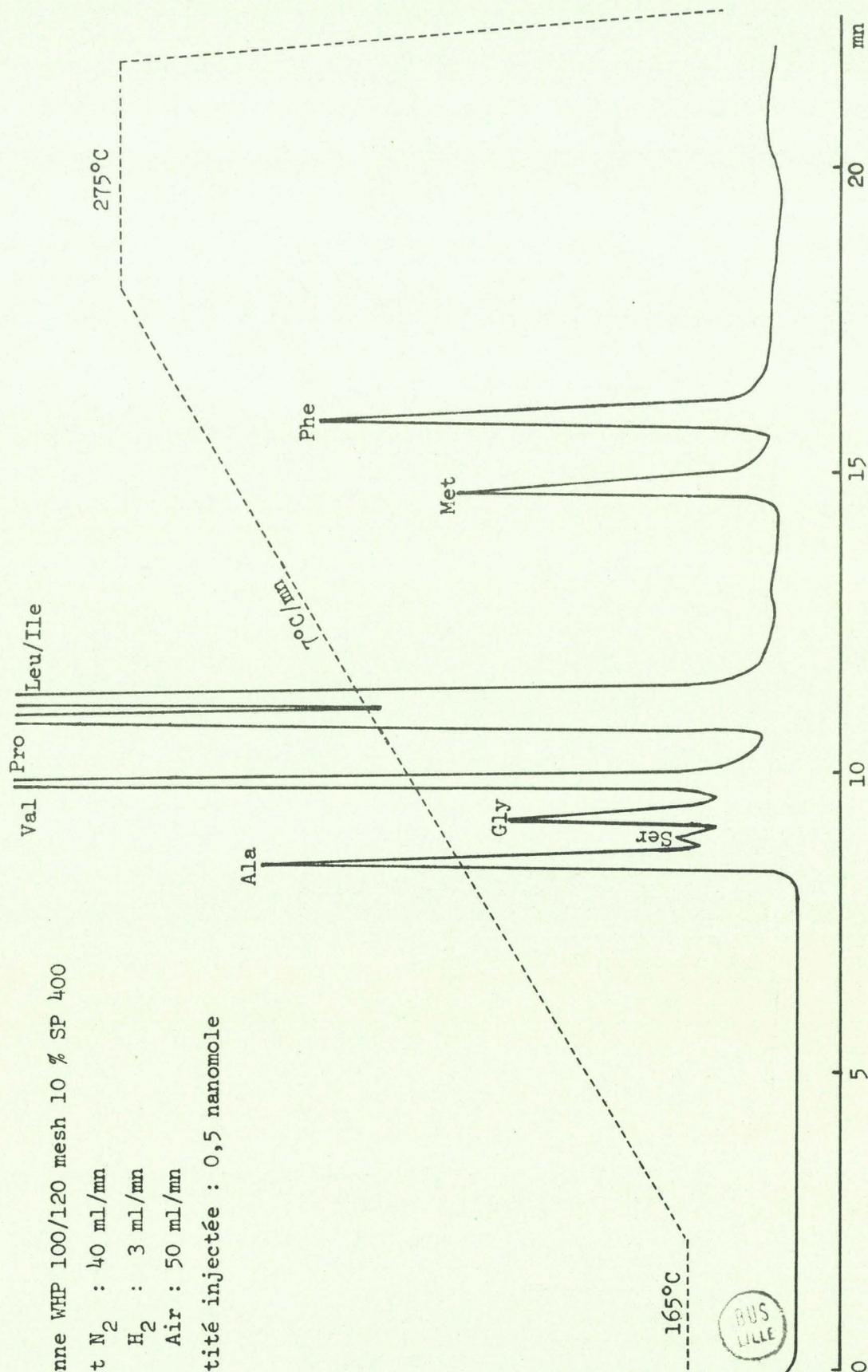
Colonne WHP 100/120 mesh 10 % SP 400

Débit N₂ : 40 ml/mn

" H₂ : 3 ml/mn

" Air : 50 ml/mn

Quantité injectée : 0,5 nanomole



3 - METHODE MODIFIEE de EDMAN UTILISANT LE 4-NN-DIMETHYLAMINOAZO-

BENZENE 4'-ISOTHIOCYANATE (DABITC)

Cette méthode augmente de 10 à 20 fois la sensibilité des techniques manuelles en utilisant le DABITC (Fluka) (30).

Afin d'éviter l'emploi d'une forte température (75°C) nécessaire à un couplage de 100 % du NH₂-terminal du peptide mais néfaste sur la stabilité du DABITC, cette méthode comprend 2 couplages à 50°C, l'un avec le DABITC, l'autre avec le PITC.

Les étapes de la dégradation utilisant le DABITC sont schématisées dans le tableau XVIII (page 131).

Identification des DABTH-amino-acides

L'identification des DABTH-amino-acides peut être faite en chromatographie liquide à haute performance (31) ou en chromatographie sur couche mince. Pour l'instant, nous utilisons dans notre laboratoire, la chromatographie sur couche mince de polyamide 5 x 5 cm (30).

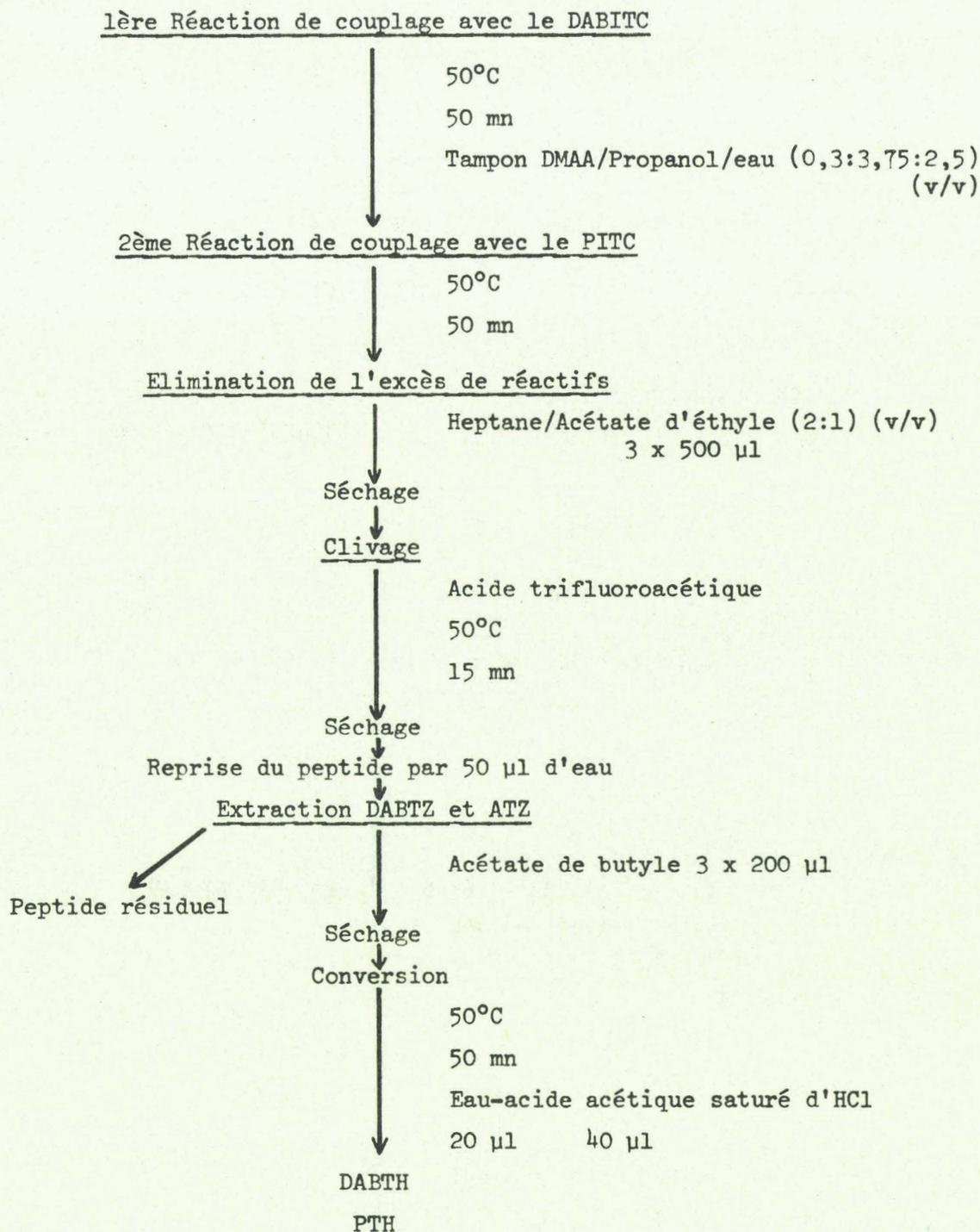
La migration se fait en double dimension :

1ère dimension : Acide acétique/H₂O (1:2) (v/v)

2ème dimension : Toluène/nHexane/acide acétique (2:1:1) (v/v).

Après migration, les plaques sont séchées puis exposées aux vapeurs d'HCl. Les DABTH apparaissent colorés en rouge. En outre, des dérivés des résidus de thréonine et de lysine apparaissent en bleu.

SCHEMATISATION DES DIFFERENTES ETAPES DE LA METHODE MODIFIEE DE EDMAN
UTILISANT LE 4-NN-DIMETHYLAMINOAZOBENZENE 4'-ISOTHIOCYANATE (DABITC) (30)



4 - HYDROLYSE PAR LA CARBOXYPEPTIDASE C

La carboxypeptidase C est isolée du citron (161) ou des feuilles d'oranger (127). Quelque soit son origine, l'enzyme a une spécificité maximale à pH 5,3. Cependant la carboxypeptidase C extraite des feuilles d'oranger est plus stable et n'est pas inhibée par le diisopropyl fluorophosphate.

La carboxypeptidase C libère de façon récurrente à partir de l'extrémité COOH-terminale d'un peptide tous les acides aminés acides, basiques, neutres y compris la proline qui limite l'action des carboxypeptidases A et B. Cependant l'hydrolyse du résidu de glycine est lente et le résidu d'hydroxyproline n'est pas libéré.

L'hydrolyse par la carboxypeptidase C est réalisée à 30°C en milieu citrate de sodium 0,05 M pH 5,3 avec une concentration en enzyme de 1/500.

L'arrêt de la réaction est obtenu en chauffant les tubes de prélèvement pendant 1 minute à 100°C.

Les acides aminés libérés sont séparés et dosés avec un analyseur d'acides aminés.

BIBLIOGRAPHIE

- Pages
- 1 - ABERCROMBIE, B.D., KNEALE, G.G., CRANE-ROBINSON, C., 4
BRADBURY, E.M., GOODWIN, G.H., WALKER, J.M. and
JOHNS, E.W. (1978)
Studies on the conformational properties
of the high-mobility-group chromosomal
protein HMG 17 and its interaction with
DNA.
Eur.J.Biochem. 84, 173-177.
- 2 - ALLAN, J., HARTMAN, P.G., CRANE-ROBINSON, C. and 23, 24
AVILES, F.X. (1980)
The structure of histone H1 and its lo-
cation in chromatin.
Nature 288, 675-679.
- 3 - ALTENBURGER, W., HORZ, W., ZACHAU, H.G. (1976) 15
Nuclease cleavage of chromatin at 100-
nucleotide pair intervals.
Nature 264, 517-522.
- 4 - APPELS, R. and WELLS, J.R.E. (1972) 32, 114
Synthesis and turnover of DNA-bound
histone during maturation of avian
red blood cells.
J.Mol.Biol. 70, 425-434.
- 5 - AVILES, F.J., CHAPMAN, G.E., KNEALE, G.G., CRANE- 106, 108
ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1978)
The conformation of histone H5. Isola-
tion and characterization of the globu-
lar segment.
Eur.J.Biochem. 88, 363-371.
- 6 - AVILES, F.J., DANBY, S.E., CHAPMAN, G.E., CRANE- 107
ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1979)
The conformation of histone H5 bound
to DNA maintenance of the globular
structure after binding.
Biochim.Biophys.Acta 578, 290-296.
- 7 - AXEL, R. (1975) 15
Cleavage of DNA in nuclei and chromatin
with staphylococcal nuclease.
Biochemistry 14, 2921-2925.

- 8 - AXEL, R., MELCHIOR, W.B. Jr, SOLLNER-WEBB, B. and FELSENFELD, G. (1974) 15
Specific sites of interaction between histones and DNA chromatin.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 71, 4101-4105.
- 9 - BAKAYEV, V.V., BAKAYEVA, T.G., SCHATCHENKO, V.V. and GEORGIEV, G.P. (1978) 30
Non-histone proteins in mononucleosomes and subnucleosomes.
Eur.J.Biochem. 91, 291-301.
- 10 - BALDWIN, J.P., BOSSELEY, P.G. and BRADBURY, E.M. 14, 15, 22
IBEL, K. (1975)
The subunit structure of the encaryotic chromosome.
Nature 253, 245-249.
- 11 - BEKHOR, I., KUNG, G.M. and BONNER, J. (1969) 2
Sequence-specific interaction of DNA and chromosomal protein.
J.Mol.Biol. 39, 351
- 12 - BENJAMIN, W. and GELLHORN, A. (1968) 2, 3
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 59, 262
- 13 - BOHM, L., HAYASHI, H., CARY, P.D., MOSS, T. CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1977) 12
Sites of histone/histone interaction in the H3-H4 complex.
Eur.J.Biochem. 77, 487-493.
- 14 - BONNER, J., CHALKLEY, G.R., DAHMUS, M., FAMBROUGH, D., FUJIMURA, F., HUANG, R.C.C., HUBERMANN, J., JENSEN, R., MARUSHIGE, K., OHLENBUSCH, H., OLIVERA, B.M. and WIDHOLM, J. (1968) 2
Isolation and characterization of chromosomal nucleoproteins.
Methods Enzymol. 12B, 3
- 15 - BONNER, W.N. and STEDMAN, J.D. (1979) 25, 26
Histone 1 is proximal to histone 2A and to A-24.
(chromatin/nucleosomes/crosslinking/water-soluble carbodiimide)
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 76, 2190-2194.
- 16 - BOULIKAS, T., WISEMAN, J.M. and GARRARD, W.T. (1980) 25, 26
Points of contact between histone H1 and the histone octamer.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 77, 127-131.

- 17 - BRADBURY, E.M., INGLIS, R.J., MATTHEWS, H.R. 8
 (1974)
 Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation.
Nature 247, 257-261.
- 18 - BRADBURY, E.M., MOSS, T., HAYASHI, H., HJELM, R.P., 12
 SUAU, P., STEPHENS, R.M., BALDWIN, J.P., CRANE-ROBINSON, C. (1977)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 277-286.
- 19 - BRANDT, W.F. and VON HOLT, C. (1974a) 33
 The determination of the primary structure of histone F3 from chicken erythrocytes by automatic Edman degradation. I Cleavage and Alignment of fragments.
Eur. J. Biochem. 46, 407-417.
- 20 - BRANDT, W.F. and VON HOLT, C. (1974b) 33
 The determination of the primary structure of histone F3 from chicken erythrocytes by automatic Edman degradation. 2 Sequence analysis of histone F3.
Eur. J. Biochem. 46, 419-429.
- 21 - BRAUNITZER, G. (1971) 124
 Zur vollständigen automatischen sequenzanalyse von peptiden mit quadrol.
Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. 352, 1730-1732.
- 22 - BRAUNITZER, G., SCHRANK, B., PETERSEN, S. and 124
 PETERSEN, U. (1973)
 Über ϵ -markierung von peptiden. Automatische sequenzanalyse des insulins.
Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. 354, 1563-1566.
- 23 - BRIAND, G., KMIĘCIK, D., SAUTIERE, P., WOUTERS, D., 7, 33, 39
 BORIE-LOY, O., BISERTE, G., MAZEN, A. and 41, 59, 88
 CHAMPAGNE, M. (1980) 89, 92
 Chicken erythrocyte histone H5. IV Sequence of the carboxy-terminal half of the molecule (96 residues) and complete sequence.
FEBS Lett. 112, 147-151.
- 24 - BUSCH, H., BALLAL, N.R., BUSCH, R.K., CHOI, Y.C., 11
 DAVIS, F., GOLDKNOPF, I.L., MATSUI, S.I., RAO, M.S. and ROTHBLUM, L.I. (1978)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42, 665-683.

- 25 - BYVOET, P. and BAXTER, C.S. (1975) 10
In chromosomal proteins and their
role in the regulation of gene ex-
pression.
Ed. STEIN, G.S. and KLEINSMITH, L.J.,
pp 127-151, New-York, Academic Press.
- 26 - CANDIDO, E.P.M. and DIXON, G.H. (1972) 114
Trout testis cells. III Acetylation
of histones in different cell types
from developing trout testis.
J. Biol. Chem. 247, 5506-5510.
- 27 - CHAHAL, S.S., MATTHEWS, H.R. and BRADBURY, E.M. 8, 28, 29
(1980)
Acetylation of histone H4 and its role
in chromatin structure and function.
Nature 287, 76-79.
- 28 - CHALKLEY, R. and HUNTER, C. (1975) 30
Histone-histone propinquity by alde-
hyde fixation of chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1304-
1308.
- 29 - CHAMPAGNE, M., MAZEN, A. et WILHEM, X. (1968) 34
Histones d'erythrocytes de Poulets.
I Fractionnement des histones totales
et isolement d'une histone spécifique.
Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1261-1272.
- 30 - CHANG, J.Y., BRAUER, D. and WITTMANN-LIEBOLD, B. 56, 130
(1978)
Microsequence analysis of peptides and
proteins using 4-NN-dimethylaminoazo-
benzene 4'-isothiocyanate/phenyliso-
thiocyanate double coupling method.
FEBS Lett. 93, 205-214.
- 31 - CHANG, J.Y., LEHMANN, A. and WITTMANN-LIEBOLD, B. 130
(1980)
Analysis of dimethylaminoazobenzene-
thiohydantoins of amino acid by high
pressure liquid chromatography.
Anal. Biochem. 102, 380-383.
- 32 - CHAPMAN, G.E., AVILES, F.J., CRANE-ROBINSON, C. 107
and BRADBURY, E.M. (1978)
A nuclear-magnetic-resonance study of
the globular structure of the H5 his-
tone.
Eur. J. Biochem. 90, 287-296.

- 33 - CHATTERJEE, S. and WALKER, J.O. (1973) 22
The modification of deoxyribonucleo-
histone by trypsin and chymotrypsin.
Eur.J.Biochem. 34, 519-534.
- 34 - CHOU, P.Y. and FASMAN, G.D. (1974) 103, 11
Conformational parameters for amino
acids in helical, β sheet and random
coil regions calculated from proteins.
Biochemistry 13, 211-221.
- 35 - COHEN-SOLAL, M. and BERNARD, J.L. (1973) 56, 57, 125
Miniature thin-layer chromatography of
phenylthiohydantoin amino-acids. Appli-
cation to automatic Edman degradation.
J.Chromatogr. 80, 140-143.
- 36 - COWMAN, M.K. and FASMAN, G.D. (1980) 25
Dependance of mononucleosome deoxyribo-
nucleic acid conformation on the deoxy-
ribonucleic acid length and H1/H5 con-
tent circular dichroism and thermal de-
naturation studies.
Biochemistry 19, 532-541.
- 37 - CRANE-ROBINSON, C., DANBY, S.E., BRADBURY, E.M., 104, 108
GAREL, A., KOVACS, A-M., CHAMPAGNE, M. and
DAUNE, M. (1976)
Structural studies of chicken erythro-
cyte histone H5.
Eur.J.Biochem. 67, 379-388.
- 38 - CRANE-ROBINSON, C., BRIAND, G., SAUTIERE, P. and 98, 108
CHAMPAGNE, M. (1977) 102
Location of the globular region in chicken
erythrocyte histone H5.
Biochim.Biophys.Acta 493, 283-292.
- 39 - D'ANNA, J.A. and ISENBERG, I. (1974) 12
A histone cross-complexing pattern.
Biochemistry 13, 4992-4997.
- 40 - DEFER, N., KITZIS, A., LEVY, F., TICHONICKY, L., 30
SABATIER, M.M. and KRUEH, J. (1978)
Presence of non-histone proteins in
nucleosomes.
Eur.J.Biochem. 88, 583-591.
- 41 - DIXON, H.B.F. and PERHAM, R.N. (1968) 52
Reversible blocking of amino groups
with citraconic anhydride.
Biochem.J. 109, 312

- 42 - DWULET, F.E. and GURD, F.R.N. (1976) 81
 A comparison of sulfonated phenylisothiocyanates for reducing losses of lysine-containing peptides during automated-sequencing.
Anal. Biochem. 76, 530-538.
- 43 - EASLEY, C.W., ZEGERS, B.J.M. and DE VITLDER, M. (1969) 55
 Application of specialized techniques for specific staining of peptide maps on various media.
Biochim. Biophys. Acta 175, 211
- 44 - EDMAN, P. (1956) 56, 120
 On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides.
Acta Chem. Scand. 10, 761-768.
- 45 - EDWARDS, L.J. and HNILICA, L.S. (1968) 39
 The specificity of histones in nucleated erythrocytes.
Experientia 24, 228-229.
- 46 - EICKBUSH, T.E. and MOUDRIANAKIS, E.M. (1978) 17, 18
 The histone core complex : An octamer assembled by two sets of protein-protein interactions.
Biochemistry 23, 4955-4964.
- 47 - ELGIN, S.C.R. and BONNER, J. (1970) 3
 Limited heterogeneity of the major non histone chromosomal proteins.
Biochemistry 9, 4440
- 48 - FASMAN, G.D., CHOU, P.Y. and ADLER, A.J. (1976) 105
 Prediction of the conformation of the histones.
Biophys. J. 16, 1201-1238.
- 49 - FINCH, J.T. and KLUG, A. (1976) 21, 25
 Solenoidal model for superstructure in chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1897-1901.
- 50 - FINCH, J.T., LUTTER, L.C., RHODES, D., BROWN, R.S., RUSHTON, B., LEVITT, M. and KLUG, A. (1977) 14, 15, 16, 17, 23
 Structure of nucleosome core particle of chromatin.
Nature 269, 29-36.
- 51 - FRANK, G. and ZUBER, H. (1976) 123
 The amino acid sequence of Monellin.
Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem. 357, 587-592.

- 52 - GAREL, A., BURCKARD, J., MAZEN, A. et CHAMPAGNE, M. 33, 38
(1972) 39, 45
Histones d'erythrocytes de Poulets.
II Mise en evidence de l'hétérogénéité
du fragment N-terminal de l'histone
spécifique.
Biochimie 54, 451-455.
- 53 - GAREL, A., MAZEN, A., CHAMPAGNE, M., SAUTIERE, P., 45, 46
KMIECIK, D., LOY, O. and BISERTE, G. (1975)
Chicken erythrocyte histone H5.
I Amino terminal sequence (70 residues)
FEBS Lett. 50, 195-199.
- 54 - GAREL, A., KOVACS, A-M., CHAMPAGNE, M. and 107
DAUNE, M. (1975)
Comparison between histones FV and
F2a2 of chicken erythrocyte.
II Interaction with homologous DNA.
Biochim. Biophys. Acta 395, 16-27.
- 55 - GERSHEY, E.L., HASLETT, G.W., VIDALI, G. and 10
ALLFREY, V.G. (1969)
Chemical studies of histone methyla-
tion. Evidence for the occurrence of
3-methylhistidine in avian erythrocy-
te histone fractions.
J. Biol. Chem. 244, 4871-4877.
- 56 - GOLDKNOPF, I.L., TAYLOR, C.W., BAUM, R.M., 8, 10
YEOMAN, L.C., OLSON, O.J., PRESTAYKO, A.W. and
BUSCH, H. (1975)
Isolation and characterization of pro-
tein A24, a "Histone like" non-histone
chromosomal protein.
J. Biol. Chem. 250, 7182-7187.
- 57 - GOLDKNOPF, I.L. and BUSCH, H. (1977) 10
Isopeptide linkage between non-histone
and histone 2A polypeptides of chromo-
somal conjugate-protein A24.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 864-868.
- 58 - GOLDKNOPF, I.L., WILSON, G., BALLAL, N.R. and 10
BUSCH, H. (1980)
Chromatin conjugate protein A24 is clea-
ved and ubiquitin is lost during chicken
erythropoiesis.
J. Biol. Chem. 255, 10555-10558.

- 59 - GOODWIN, G.M. and JOHNS, E.W. (1973) 3
Isolation and characterization of two calf thymus chromatin non-histone proteins with high contents of acidic and basic amino acids.
Eur.J.Biochem. 40, 215-219.
- 60 - GOODWIN, G.M., NICOLAS, R.H. and JOHNS, E.W. (1975) 3
An improved large scale fractionation of high mobility group non-histone chromatin proteins.
Biochim.Biophys.Acta 405, 280-291.
- 61 - GOODWIN, G.M., WOODHEAD, L. and JOHNS, E.W. (1977) 30
The presence of high mobility group non-histone chromatin proteins in isolated nucleosomes.
FEBS Lett. 73, 85-88.
- 62 - GRAY, W.R. and HARTLEY, B.S. (1963) 56
A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides.
Biochem.J. 89, 59-60.
- 63 - GREENAWAY, P.J. and MURRAY, K. (1971) 33, 38, 39
Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte histone fraction V.
Nature (New Biol.) 229, 233-238.
45
- 64 - GURLEY, L.R., WALTERS, R.A., BARHAM, S.S., DEAVEN, L.L. (1978) 9
Heterochromatin and histone phosphorylation.
Exp.Cell Res. 111, 373-383.
- 65 - GURLEY, L.R., D'ANNA, J.A., BARHAM, S.S., DEAVEN, L.L. and TOBEY, R.A. (1978) 9
Histone phosphorylation and chromatin structure during mitoses in chinese Hamster cells.
Eur.J.Biochem. 84, 1-15.
- 66 - HERMANN, J., TITANI, K., ERICSSON, L.H., WADE, R.D. 56, 125
NEURATH, H. and WALSH, K.A. (1978)
Amino acid sequence of two cyanogen bromide fragments of glycogene phosphorylase.
Biochemistry 17, 5672-5679.
- 67 - HEWISH, D.R. and BURGOYNE, L.A. (1973) 13
Chromatin sub-structure.
The digestion of chromatin DNA at regulary spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease
Biochem.Biophys.Res.Commun. 52, 504

- 68 - HNILICA, L.S. (1964) 36
The specificity of histones in chicken erythrocytes.
Experientia 20, 13-14.
- 69 - HUNKAPILLER, M.W. and HOOD, L.E. (1978) 62, 123
Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequanator, a non-protein carrier (Polybrene), and high pressure liquid chromatography.
Biochemistry 17, 2124-2133.
- 70 - HWAN, J.C., LEFFACK, I.M., LI, H.J., HUANG, P.C. and MURA, C. (1975) 33
Studies on interaction between histone V (F2c) and deoxyribonucleic acids.
Biochemistry 14, 1390.
- 71 - JAVAHERIAN, K., LIU, L.F. and WANG, J.C. (1978) 4
Non-histone proteins HMG 1 and HMG 2 change the DNA helical structure.
Science 199, 1345-1346.
- 72 - JOHNS, E.W., PHILLIPS, D.M.P., SIMSON, P. and BUTLER, J.A.V. (1960) 34, 36
Improved fractionation of arginine-rich histones from calf thymus.
Biochem. J. 77, 631-636.
- 73 - JONES, G.M.T., RALL, S.C. and COLE, R.D. (1974) 5
Extension of the amino acid sequence of a lysine-rich histone.
J. Biol. Chem. 249, 2548-2553.
- 74 - KLAPPER, D.G., WILDE, C.E. and CAPRA, J.D. (1978) 123
Automated amino acid sequence of small peptides utilizing polybrene.
Anal. Biochem. 85, 126-131.
- 75 - KLUG, A., RHODES, D., SMITH, J., FINCH, J.T. and THOMAS, J.O. (1980) 19, 20
A low resolution structure for the histone core of the nucleosome.
Nature 287, 509-516.
- 76 - KORNBERG, R.D. (1974) 14
Chromatin structure : arepeating unit of histone and DNA chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecule and about 200 DNA base pairs.
Science 184, 868-871.

- 77 - KORNBERG, R.D. (1977) 14
Structure of chromatin.
Ann.Rev.Biochem. 46, 931-954.
- 78 - LAINE, B., KMIECIK, D., SAUTIERE, P. and 33
BISERTE, G. (1978)
Primary structure of chicken erythro-
cyte histone H2A.
Biochimie 60, 147-150.
- 79 - LANGMORE, J.P. and WOOLEY, J.C. (1975) 14
Chromatin architecture : Investigation
of a subunit of chromatin by dark field
electron microscopy.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 72, 2691-2695.
- 80 - LASKEY, R.A. and EARNSHAW, W.C. (1980) 21
Nucleosome assembly.
Nature 286, 763-767.
- 81 - LEBOY, P.S., COX, E.C. and FLAKS, J.G. (1964) 36
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 52, 1367-1374.
- 82 - LEVY, S., SIMPSON, R.T. and SOBER, H.A. (1972) 2
Fractionation of chromatin components.
Biochemistry 11, 1547
- 83 - LEWIS, P.N., BRADBURY, E.M. and CRANE-ROBINSON, C. 11
(1975)
Ionic strength induced structure in his-
tone H4 and its fragments.
Biochemistry 14, 3391-3400.
- 84 - LIU, T.Y., STEIN, W.H., MOORE, S. and ELLIOTT, S.D. 55
(1965)
The sequence of amino acid residues a-
round the sulfhydryl group at the active
site of streptococcal proteinase.
J.Biol.Chem. 240, 1143
- 85 - LOUIE, A.J. and DIXON, G.H. (1972) 114
Trout testis cells. I Characterization
by deoxyribonucleic acid and protein
analysis of cells separated by veloci-
ty sedimentation.
J.Biol.Chem. 247, 5490-5497.
- 86 - LOUIE, A.J. and DIXON, G.H. (1972) 114
Trout testis cells. II Synthesis and
phosphorylation of histones and pro-
tamines in different cell types.
J.Biol.Chem. 247, 5498-5505.

- 87 - LOUIE, A.J. and DIXON, G.H. (1972) 114
Kinetics of enzymatic modification
of the protamines and a proposal
for their binding to chromatin.
J. Biol. Chem. 247, 7962-7968.
- 88 - LUTTER, L.C. (1978) 15
Kinetic analysis of deoxyribonuclease I
cleavages in the nucleosome core: evi-
dence for a DNA superhelix.
J. Mol. Biol. 124, 391-420.
- 89 - MACLEOD, A.R., WONG, N.C. and DIXON, G.H. (1977) 5, 92, 93
The amino acid sequence of trout testis 95, 96
histone H1. 109
Eur. J. Biochem. 78, 281
- 90 - MARTINAGE, A., MANGEAT, P., LAINE, B., COUPPEZ, M., 92
SAUTIERE, P., MARCHIS-MOUREN, G. and BISERTE, G.
(1980)
In vitro phosphorylation of histones H5,
H2A, H2B and of the dimer H2A-H2B by a
cyclic AMP-dependent protein kinase
from rat pancreas.
FEBS Lett. 118, 323-329.
- 91 - MARTINSON, H.G., TRUE, R., LAU, C.K. and 19
MEHRABIAN, M. (1979)
Histone-histone interactions within
chromatin. Preliminary location of
multiple contact sites between histones
2A, 2B and 4.
Biochemistry 18, 1075-1082.
- 92 - MARTINSON, H.G. and TRUE, R.J. (1979) 19
Amino acid contacts between histones
are the same for plants and mammals.
Binding-site studies using ultraviolet
light and tetranitromethane.
Biochemistry 18, 1947-1951.
- 93 - MIRZABEKOV, A.D., SCHICK, V.V., BELYAVSKY, A.V. 18, 19
and BAVYKIW, S.G. (1978)
Primary organization of nucleosome core
particle of chromatin sequence of his-
tone arrangement along DNA.
(crosslinking of proteins to DNA/sequen-
cing)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4184-4188.
- 94 - MOSS, B.A., JOYCE, W.G. and INGRAM, V.M. (1973) 32
Histones in chick embryonic erythro-
poiesis.
J. Biol. Chem. 248, 1025

- 95 - MOSS, T., CARY, P.D., ABERCROMBIE, B.D., CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E.M. (1976) 12
A pH-dependant interaction between histones H2A and H2B involving secondary and tertiary folding.
Eur.J.Biochem. 71, 337-350.
- 96 - MURA, C.V., MAZEN, A., NEELIN, J.M., BRIAND, G. SAUTIERE, P. and CHAMPAGNE, M. (1980) 98, 110
Distribution of antigenicity in Chicken erythrocyte histone H5.
Eur.J.Biochem. 108, 613-620.
- 97 - NEELIN, J.M., CALLAHAN, P.X., LAMB, D.C. and MURRAY, K. (1964) 36
Histones of chicken erythrocyte nuclei.
Can.J.Biochem. 42, 1743-1752.
- 98 - NISHIZUKA, Y., UEDA, K., HONJO, T., HAYAISHI, O. (1968) 10
Enzymatic adenosine diphosphate ribosylation of histone and polyadenosine diphosphate ribose synthesis in rat liver nuclei.
J.Biol.Chem. 243, 3765-3767.
- 99 - NOLL, M. (1974) 15
Nucleic Acids Res. 1, 1573-1578.
- 100 - NOLL, M. (1977) 15
DNA folding in the nucleosome.
J.Mol.Biol. 116, 49-71.
- 101 - OGATA, N., UEDA, K., KAGAMIYAMA, H. and HAYAISHI, O. (1980) 10, 114
ADP-ribosylation of histone H1.
J.Biol.Chem. 255, 7616-7617.
- 102 - OGATA, N., UEDA, K. and HAYAISHI, O. (1980) 10
ADP-ribosylation of histone H2B.
J.Biol.Chem. 255, 7610
- 103 - OHLENBUSCH, H.M., OLIVERA, B.M., TUAN, D. and DAVIDSON, N. (1967) 22
Selective dissociation of histones from calf thymus nucleoprotein.
J.Mol.Biol. 25, 299-315.
- 104 - OLINS, A.L. and OLINS, D.E. (1973) 14, 21
Spheroid chromatin units (v bodies)
J.Cell Biol. 59, 252

- 105 - OLINS, D.E. and WRIGHT, E.B. (1973) 30
Glutaraldehyde fixation of isolated
eucaryotic nuclei.
J.Cell Biol. 59, 304-311.
- 106 - OLINS, A.L. and OLINS, D.E. (1974) 14, 21
Spheroid chromatin units (v bodies)
Science 183, 330-332.
- 107 - OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1974) 14, 22
Electron microscopic and biochemical
evidence that chromatin structure is a
repeating unit.
Cell 4, 281-300.
- 108 - OOSTERHOF, D.K., HOZIER, J.C. and RILL, R.L. (1975) 15
Nuclease action on chromatin : Evidence
for discrete, repeated nucleoprotein units
along chromatin fibrils.
(non-random digestion/IIS subunits/electron
microscopy/DNase II/calf thymus)
Proc.Natl.Acad.sci.U.S.A. 72, 633-637.
- 109 - PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969) 36, 37
High resolution acrylamide gel electro- 47, 48
phoresis of histones.
Arch.Biochem.Biophys. 130, 337-346.
- 110 - PISANO, J.J. and BRONZERT, T.J. (1969) 56, 57
Analysis of amino-acid phenylthiohy-
dantoins by gaz chromatography.
J.Biol.Chem. 244, 5597-5607.
- 111 - POSPELOV, V.A., SVETLIKOVA, S.B., VOROBEV, V.I. 15
(1979)
Mol.Biol. 12, 796-806.
- 112 - ROCHAT, H.G., BECHIS, G., KOPEYAN, C., GREGOIRE, J. 123
and VAN RIETSCHOTEN, J. (1976)
Use of parvalbumin as a protecting pro-
tein in the sequanator ; an easy and
efficient way for sequencing small
amounts of peptides.
FEBS Lett. 64, 404-408.
- 113 - SAUTIERE, P., KMIECIK, D., LOY, O., BRIAND, G., 41, 45, 56
BISERTE, G., GAREL, A. and CHAMPAGNE, M. (1975)
Chicken erythrocyte histone H5 ; II Ami-
no-acid sequence adjacent to the phenyl-
alanine residue.
FEBS Lett. 50, 200-203.

- 114 - SAUTIERE, P., BRIAND, G., KMIECIK, D., LOY, O., 41, 45, 56
 BISERTE, G., GAREL, A. and CHAMPAGNE, M. (1976)
 Chicken erythrocyte histone H5 ; III Se-
 quence of the amino-terminal half of the
 molecule (111 residues)
FEBS Lett. 63, 164-166.
- 115 - SCHECHTER, N.M. (1973) 32
 Studies of RNA polymerase in mature
 avian erythrocytes.
Biochim.Biophys.Acta 308, 129
- 116 - SCHEINTAUB, H.M. and FIEL, R.J. (1973) 32
 RNA polymerase in normal avian erythro-
 cyte.
Exp.Cell Res. 80, 442
- 117 - SELIGY, V.L. and NEELIN, J.M. (1970) 32
 Transcription properties of stepwise
 acid-extracted chicken erythrocyte
 chromatin.
Biochim.Biophys.Acta 213, 380
- 118 - SELIGY, V.L. and MIYAGI, M. (1974) 32
 Comparison of template-property chan-
 ges after salt extraction of avian
 erythrocyte and liver chromatin.
Eur.J.Biochem. 46, 259
- 119 - SHAW, B.R., HERMAN, T.M., KOVACIC, R.T., 15
 BEAUDREAU, G.S., VAN HOLDE, K.E. (1976)
 Analysis of subunit organization in
 chicken erythrocyte chromatin.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 73, 505-509.
- 120 - SILVER, J. and HOOD, L.E. (1974) 123
 Automated microsequence analysis in the
 presence of a synthetic "carrier".
Anal.Biochem. 60, 285-292.
- 121 - SIMPSON, R.T., WHITLOCK, J.P.Jr (1976) 15
 Mapping DNase I-susceptible sites in nu-
 cleosomes labeled at the 5'ends.
Cell 9, 347-353.
- 122 - SIMPSON, R.T. (1978) 22, 23
 Structure of the chromatosome, a chroma-
 tin particle containing 160 base pairs
 of DNA and all the histones.
Biochemistry 17, 5524-5531.
- 123 - SOLLNER-WEBB, B. and FELSENFELD, G. (1975) 15
 A comparison of the digestion of nuclei
 and chromatin by staphylococcal nuclease
Biochemistry 14, 2915-2920.

- 124 - SOLLNER-WEBB, B., CAMERINI-OTERO, R.D. and FELSENFELD, G. (1976) 15
Chromatin structure as probed by nucleases and proteases : evidence for the central role of histone H3 and H4.
Cell 9, 179-193.
- 125 - SOLLNER-WEBB, B., MELCHIOR, W.B. Jr and FELSENFELD, G. (1978) 15
DNase I, DNase II and staphylococcal nuclease cut a different, yet symmetrically located, sites in nucleosome core.
Cell 14, 611-627.
- 126 - SPIKER, S. and ISENBERG, I. (1977) 13
Cross-complexing pattern of plant histones.
Biochemistry 16, 1819-1826.
- 127 - SPRÖSSLER, B., HEILMANN, H-D., GRAMPP, E. and UHLING, H. (1971) 132
Eigenschaften der carboxypeptidase C aus orangenblättern.
Hoppe Seyler's Z.Phys.Chem. 352, 1524
- 128 - STRICKLAND, W.N., STRICKLAND, M., BRANDT, W.F., VON HOLT, C., LEHMANN, A. and WITTMANN-LIEBOLD, B. (1980) 5
The primary structure of histone H1 from sperm of the sea urchin *Parechinus angulosus*. 2 Sequence of the C-terminal CNBr peptide and the entire primary structure.
Eur.J.Biochem. 104, 567-578.
- 129 - SUNG, M.T. (1977) 32
Phosphorylation and dephosphorylation of histone V (H5) : controlled condensation of avian erythrocyte chromatin.
Biochemistry 16, 286-290.
- 130 - TAKAHASHI, K. and TASHIRO, Y. (1979) 28
Binding of antibodies against histone H1 to unfolded and folded nucleofilaments.
Eur.J.Biochem. 97, 353-360.
- 131 - TARR, G.E., BEECHER, J.F., BELL, M. and Mc KEAW, D. (1978) 62, 123, 131
Polyquaternary amines prevent peptide.
Anal.Biochem. 84, 622-627.
- 132 - THOMA, F. and KOLLER, Th. (1977) 21
Influence of histone H1 on chromatin structure.
Cell 12, 101-107.

- 133 - THOMA, F., KOLLER, Th. and KLUG, A. (1979) 21, 23, 25
Involvement of histone H1 in the organi- 26, 27, 28
zation of the nucleosome and of the salt- 114
dependent superstructures of chromatin.
J. Cell Biology 83, 403-427.
- 134 - THOMAS, J.O. and KORNBERG, R.D. (1975) 12, 17, 19
An octamer of histones in chromatin and
free in solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2626-2630.
- 135 - TSAI, Y.H., ANSEVIN, A.T. and HNILICA, L.C. (1975) 33
Association of tissue-specific histones
with deoxyribonucleic acid. Thermal de-
naturation of native, partially dehis-
tonized and reconstituted chromatins.
Biochemistry 14, 1257
- 136 - UEDA, K., HAYAISHI, O., KAWAICHI, M., OGATA, N., 10
IKAI, K., OKA, J. and OKAYAMA, H. (1979)
Poly (ADP-ribose) and ADP-ribosylation
of proteins.
in Modulation of protein function,
pp.47-64 (D.E. ATKINSON and C.F. FOX, eds)
Academic Press
- 137 - VAN DER WESTHUYZEN, D.R., BOYD, M.C.D., 32
FITSCHEN, W. and VON HOLT, C. (1973)
DNA-dependent RNA polymerase in matu-
ring avian erythrocytes.
FEBS Lett. 30, 195
- 138 - VAN HELDEN, P., STRICKLAND, W.N., BRANDT, W.F. 33
and VON HOLT, C. (1978)
Histone H2B variants from the erythro-
cytes of an amphibian, a reptile and
a bird.
Biochim. Biophys. Acta 533, 278-281.
- 139 - VAN HOLDE, K.E., SAHASRABUDDHE, C.G. and SHAW, B.B. 14
(1974)
A model for particulate structure in
chromatin.
Nucleic Acids Res. 1, 1579-1586.
- 140 - VARSHAVSKY, A.J., BAKAYEV, U.V. and GEORGIEV, G.P. 23
(1976)
Heterogeneity of chromatin subunits in
vitro and location of histone H1.
Nucleic Acids Res. 3, 477-492.

- 141 - VIDALI,G., BOFFA,C., BRADBURY,E.M. and ALLFREY,V.G. (1978) 8
Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75, 2239-2243.
- 142 - VON HOLT,C., STRICKLAND,W.N., BRANDT,W.F. and STRICKLAND,M. (1979) 5
More histone structure. FEBS Lett. 100, 201-218.
- 143 - WALKER,J.M., HASTINGS,J.R.B. and JOHNS,E.W. (1977) 3
The primary structure of a non-histone chromosomal protein. Eur.J.Biochem. 76, 461-468.
- 144 - WALKER,J.M., PARKER,B.M. and JOHNS,E.W. (1978) 3
Isolation and partial sequence of the cyanogen bromide peptides from calf-thymus non-histone chromosomal protein HMG 1. Int.J.Peptide Protein Res. 12, 269-276.
- 145 - WALKER,J.M., GOODWIN,G.H. and JOHNS,E.W. (1979) 3
The primary structure of the nucleosome associated chromosomal protein HMG 14. FEBS Lett. 100, 394-398.
- 146 - WALKER,J.M., GOODERHAM,K. and JOHNS,E.W. (1979) 3
The isolation, characterization and partial sequence of a peptide rich in glutamic acid and aspartic acid (HGA-2 Peptide) from calf thymus non-histone chromosomal protein HMG 2. Biochem.J. 179, 253-254.
- 147 - WALKER,J.M., GOODERHAM,K. and JOHNS,E.W. (1979) 4
The isolation and partial sequence of peptides produced by cyanogen bromide cleavage of calf-thymus non-histone chromosomal high-mobility group protein 2. Biochem.J. 181, 659-665.
- 148 - WEINTRAUB,H. and VAN LENTE,F. (1974) 17, 22
Dissection of chromosome structure with trypsin and nucleases. (histones/fingerprint/cleavage products/DNA electrophoresis/iodination) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 71, 4249-4253.

- 149 - WHITLOCK, J.P. and SIMPSON, R.T. (1976) 23
Removal of histone H1 exposes a fifty
base pair DNA segment between nucleo-
somes.
Biochemistry 15, 3307-3314.
- 150 - WHITLOCK, J.P. Jr, RUSHIZKY, G.W., SIMPSON, R.T. 15
(1977)
DNase-sensitive sites of nucleosomes.
Their relative susceptibilities depend
on nuclease used.
J. Biol. Chem. 252, 3003-3006.
- 151 - WHITLOCK, J.P., AUGUSTINE, R. and SCHULMAN, H. 8
(1980)
Calcium-dependant phosphorylation of
histone H3 in butyrate-treated Hela
cells.
Nature 287, 74-76.
- 152 - WILHEM, F.X. and CHAMPAGNE, M.H. (1969) 22
Dissociation de la nucleoprotéine d'éry-
throcytes de poulet par les sels.
Eur. J. Biochem. 10, 102-109.
- 153 - WILKINS, M.H.F. (1956) 13
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21, 75
- 154 - WOUTERS-TYROU, D., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. 5
(1976)
Covalent structure of the sea urchin
histone H4.
FEBS Lett. 65, 225-228.
- 155 - WOUTERS, D., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1978) 55
Primary structure of histone H2A from
gonad of the sea urchin *Psammechinus*
miliaris.
Eur. J. Biochem. 90, 231-239.
- 156 - WOUTERS-TYROU, D., MARTIN-PONTHIEU, A., 33
SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1981)
Acetylation of histone H4 in chicken
erythrocyte and cuttle-fish testis
chromatin.
(Manuscript in preparation)
- 157 - YAGUCHI, M., ROY, C. and SELIGY, V.L. (1979) 7, 92, 110
Complete amino acid sequence of goose ery- 115
throcyte H5 histone and the homology bet-
ween H1 and H5 histones.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 1400-1406.

- 158 - YAMADA, S. and ITANO, H.A. (1966) 55
Phenanthrenequinone as an analytical
reagent for arginine and other mono-
substituted guanidines.
Biochim.Biophys.Acta 130, 538-540.
- 159 - YU, S.S., LEI, H.J., GOODWIN, G.H. and JOHNS, E.W. 4
(1977)
Interaction of non-histone chromosomal
proteins HMG 1 and HMG 2 with DNA.
Eur.J.Biochem. 78, 497-502.
- 160 - YU, S.S. and SPRING, T.G. (1977) 4
The interaction of non-histone chromoso-
mal proteins HMG 1 and HMG 2 with sub-
fractions of H1 histone immobilized on
agarose.
Biochim.Biophys.Acta 492, 20-28.
- 161 - ZUBER, H. (1964) 132
Purification properties of a new carbo-
xy-peptidase from citrus fruit.
Nature (London) 201, 613

ADDITIF BIBLIOGRAPHIQUE

- | | Pages |
|--|-------|
| 162 - CHAMPAGNE, M. et MAZEN, A. (1967)
Isolement et caractérisation d'une fraction
d'histone spécifique des érythrocytes de Poulets.
<u>C.R. Acad. Sci. Paris 265, 2100-2103.</u> | 35 |
| 163 - GOODWIN, G.H., BROWN, E., WALKER, J.M.
and JOHNS, E.W. (1980)
The isolation of three new high mobility group
nuclear proteins.
<u>Biochim. Biophys. Acta 623, 329-338.</u> | 3 |
| 164 - WALKER, J.M., GOODWIN, G.H. and JOHNS, E.W. (1978)
The isolation and identification of ubiquitin from
the high mobility group (HMG) non-histone protein
fraction.
<u>FEBS Lett. 90, 327-330.</u> | 3 |
| 165 - WALKER, J.M., STEARN, C. and JOHNS, E.W. (1980)
The primary structure of non-histone chromosomal
protein HMG 17 from Chicken erythrocyte nuclei.
<u>FEBS Lett. 112, 207-210.</u> | 33 |
| 166 - WALKER, J.M., BROWN, E., GOODWIN, G.H., STEARN, C.
and JOHNS, E.W. (1980)
Studies on the structures of some HMG-like non-
histone chromosomal proteins from Trout and
Chicken tissues. Comparison with Calf thymus
proteins HMG 14 and 17.
<u>FEBS Lett. 113, 253-257.</u> | 33 |
| 167 - WALKER, J.M., GOODERHAM, K., HASTINGS, J.R.B., MAYES, E.
and JOHNS, E.W. (1980)
The primary structures of non-histone chromosomal
proteins HMG 1 and 2.
<u>FEBS Lett. 122, 264-270.</u> | 3 |

