

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE LILLE I

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

option BIOCHIMIE

par

Maurice COUPPEZ



LES HISTONES H2A, H2B, H3 ET H4 :
PRÉPARATION, FRAGMENTS, STRUCTURE SECONDAIRE,
IMMUNOLOGIE, INTERACTION AVEC L'ADN, ACÉTYLATION

présentée le 11 Janvier 1996 devant la commission d'examen

Président	Professeur	André VERBERT
Rapporteurs	Professeur	Jean KREMBEL
	Professeur	Jean LIQUIER
	Docteur	Pierre SAUTIÈRE
Examineur	Professeur	Pierre FORMSTECHER

A la mémoire de mes parents

A ma famille

A mes amis

A mes maîtres

A mes juges

Ce travail s'inscrit dans une longue tradition lilloise d'étude de la chromatine commencée sous l'impulsion de Gérard Biserte. Il a été effectué sous la direction de Pierre Sautière Directeur de recherches au C.N.R.S., au sein de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille dans l'Unité 124 I.N.S.E.R.M. (Directeur Professeur G. Biserte) et dans l'Unité 409 C.N.R.S. (Directeur Docteur P. Sautière) et pour ce qui concerne la dernière phase de la rédaction, dans le Département de Biochimie de la Faculté de Médecine.

Que Pierre Sautière trouve ici ma reconnaissance pour l'intérêt constant qu'il a porté à ce travail.

Le thème de départ était la préparation d'histones et de peptides d'histones pour la détermination de leur structure et de leurs interactions par la résonance magnétique nucléaire (R.M.N.).

La préparation de grandes quantités d'histones très pures nous a posé de gros problèmes. Nous étions encore à une époque où on confondait sur les gels de polyacrylamide histone H2A phosphorylée ou acétylée et histone H2B et où l'utilisation de chlorure de guanidinium pur entraînait inmanquablement la non fixation des histones sur les colonnes de Biorex (la force ionique de départ devenait nettement plus grande qu'avec les chlorure de guanidinium impurs utilisés auparavant).

Etant donné la fâcheuse tendance des histones et encore plus de leurs peptides à s'agréger aux concentrations nécessaire pour la R.M.N. les résultats furent limités. Nous pûmes toutefois établir avec T. Moss et C. Crane-Robinson (Porthmouth) que les 31 premiers résidus de l'histone H2B n'étaient pas nécessaire à son interaction avec l'histone H2A.

L'approche de ces mêmes questions par dichroïsme circulaire (D.C.) a été plus fructueuse. Je tiens ici à remercier M. H. Loucheux et son équipe pour les conseils et l'aide efficace que j'ai toujours trouvés lors de la réalisation des spectres de D.C. J'ai conscience de ne pas mettre assez en évidence, dans ce mémoire, l'importance de cette technique dans mon travail. Je dirai seulement que, par exemple, les figures VI. 1 et VI. 2 ont demandé chacune une cinquantaine de (bons) spectres.

La spectrométrie RAMAN du peptide 1 - 53 de l'histone H4 et de l'histone H4 entière est due à S. K. Brahmachari et J. Brahm (Université de Paris VI). L'approche des interactions histone-ADN par spectroscopie infrarouge a été conduite par E. Taillandier et son équipe (Université de Paris XIII) dans laquelle je citerai : J. Liquier, L. Fort et J. Taboury.

La mise au point de deux méthodes de séparation des histones selon leurs modifications postsynthétiques compléta l'éventail des histones et des peptides disponibles pour toutes sortes d'études.

La reconstitution de "core particle" a été réussie par Monique Erard dans le laboratoire de M. Champagne et de M. Daune (I.B.M.C. Strasbourg). Les études immunologiques ont été réalisées principalement par Sylviane Muller dans le laboratoire de M. H. V. Van Regenmortel (I.B.M.C. Strasbourg).

Je tiens à remercier toutes les personnes nommées. Qu'elles sachent que sans leur travail, sans leur compréhension et sans une étroite collaboration ce genre d'étude n'aurait pas été possible.

Ma reconnaissance va aussi à tous les membres de l'unité 409 et des autres équipes qui m'ont aidé d'une façon directe ou non. Ainsi je n'oublierai pas : Annie Hemez pour les nombreux contrôles électrophorétiques qu'elle a effectués, Marie-Paule Hildebrand et Claude Denis pour la réalisation des spectres de D.C. et le Professeur Jerry Johnson (U.S.A) qui m'a enseigné le côté pratique de la chromatographie d'échange d'ions.

Table des matières

Introduction	3
Table des matières	5
Publications	10
Liste des illustrations	12
Abréviations utilisées	15
Acides aminés : code à une lettre et code à trois lettres	16
Première partie. Revue bibliographique : la chromatine chez les eucaryotes	17
Avant-propos	18
Chapitre I : Constituants	19
I - 1. Composition	19
I - 2. L'ADN	19
I - 3. Les histones	22
I - 3 - 1. Caractéristiques générales	22
I - 3 - 2. Variation de la structure primaire	26
I - 3 - 3. La macro H2A	28
I - 3 - 4. Modifications post-synthétiques	28
I - 3 - 5. Les interactions histone-histone	31
I - 3 - 6. Les interactions histone-ADN	32
I - 4. Les protéines non-histones	32
I - 4 - 1. Caractéristiques générales	32
I - 4 - 2. Les protéines HMG	33

Chapitre II : Organisation de la chromatine	35
II - 1. Mise en évidence de sous-unités répétitives dans la chromatine	35
II - 2. Organisation des sous-unités	36
II - 2 - 1. Structure de la "core particle"	36
II - 2 - 2. Position et rôle de l'histone H1	43
II - 3. Superstructure de la chromatine	47
II - 3 - 1. La fibre de 30 nm	47
II - 3 - 2. Les boucles d'ADN et la matrice nucléaire	53
II - 4. Localisation ordonnée de l'ADN dans le noyau interphasique	57
II - 5. Niveaux d'organisation supérieurs du chromosome métaphasique	57
II - 6. Conclusion	57
Chapitre III : Quelques phénomènes dynamiques dans la chromatine	61
III - 1. La transcription	61
III - 1 - 1. Aspect des zones transcrites	61
III - 1 - 2. L'ADN des zones transcrites	63
III - 1 - 3. Les protéines	65
III - 1 - 4. Modifications des histones	67
III - 1 - 5. Conclusion	72
III - 2. La réplication	74
III - 2 - 1. Localisation de la réplication	74
III - 2 - 2. Nucléosome et réplication	75
III - 2 - 3. Les modifications réversibles des histones lors de la réplication et lors de la mitose	77
III - 3. Autres phénomènes impliquant des modifications d'histones	81
III - 3 - 1. Surveillance de l'ADN	81
III - 3 - 2. Spermiogenèse	84
Conclusion de la revue bibliographique	87

Deuxième partie : Travaux	89
Chapitre IV : Préparation des histones	90
IV - 1. Introduction	90
IV - 2. Extraction des histones et fractionnement par les "méthodes chimiques"	92
IV - 2 - 1. Isolement de la désoxyribonucléoprotéine	92
IV - 2 - 2. Extraction des histones totales	94
IV - 2 - 3. Extractions sélectives des histones par la "méthode 2 de JOHNS" (1964)	94
IV - 2 - 4. Les modifications apportées à la "méthode 2 de JOHNS"	95
IV - 3. Critères de pureté	95
IV - 4. Obtention des histones H2A et H2B à l'état pur	96
IV - 4 - 1. Chromatographie des histones totales sur colonne de SP Sephadex à pH 2,0	97
IV - 4 - 2. Chromatographie sur SP Sephadex à pH 2,0 de fractions obtenues par extractions et précipitations sélectives	100
IV - 5. Obtention de l'histone H3	100
IV - 6. Obtention de l'histone H4	103
IV - 7. Conclusion	103
Chapitre V : Préparation des peptides	105
V - 1. Méthodes utilisées	105
V - 1 - 1. Les méthodes d'hydrolyse	105
V - 1 - 2. Séparation des peptides	106
V - 1 - 3. Critères de pureté et caractérisation	106
V - 2. Diagramme de fractionnement des hydrolysats et discussion	107
V - 2 - 1. Hydrolyse de l'histone H2B par le BrCN	107

V - 2 - 2. Hydrolyse des histones H2A et H2B par l'acide acétique 0,25 M	107
V - 2 - 3. Hydrolyse des histones H2A et H2B par la protéase de staphylocoque souche V8	115
V - 2 - 4. Hydrolyse de l'histone H2A par la pepsine	115
V - 2 - 5. Hydrolyse de l'histone H2B par la chymotrypsine à pH 5,0	119
V - 2 - 6. Hydrolyse enzymatique en milieu Na Cl 0,5 M	119
Chapitre VI : Structure secondaire et immunologie des histones H2A et H2B, et de leurs peptides	125
VI - 1. Etude de la structure secondaire	125
VI - 1 - 1. Généralités	125
VI - 1 - 2. Matériels et méthodes	127
VI - 1 - 3. Localisation des hélices dans l'histone H2A	128
VI - 1 - 3. Localisation des hélices dans l'histone H2B	130
VI - 1 - 5. Discussion	132
VI - 2. Immunologie des histones H2A et H2B, et de leurs peptides	133
VI - 2 - 1. Introduction : la réponse immunitaire humorale	133
VI - 2 - 2. Immunologie des histones H2A et H2B, et de leurs peptides : publications 1, 2 et 3	135
VI - 2 - 3. Discussion : relation épitope-structure spatiale	166
Chapitre VII : : Contribution à la détermination du rôle de la structure secondaire dans les interactions histone-ADN	172
VII - 1. Introduction	172
VII - 2. Etude par spectroscopie infrarouge et/ou par spectroscopie RAMAN des interactions entre les histones (et leurs peptides) et l'ADN : publications 4, 5 et 6	174
VII - 3. Discussion : importance des zones en hélice	192

Chapitre VIII : Contribution à l'étude de l'acétylation des histones H3 et H4	200
VIII - 1. Introduction	200
VIII - 2. Séparation des histones selon leur degré d'acétylation. Influence de l'acétylation sur la structure de la "core particle". Utilisation non quelconque des sites d'acétylation. Immunogénicité de l'histone H4 acétylée : Publications 7 à 10	202
VIII - 3. Discussion	237
Conclusion générale et perspectives	241
Références bibliographiques	245

Nos travaux ont fait l'objet des publications 1 à 10 ci-dessous qui figurent dans les chapitres VI, VII et VIII.

- 1 - MULLER, S., PLAUE, S., COUPPEZ, M. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1986)
Comparison of different methods for localizing antigenic regions in histone H2A.
Molec. Immun. 23, 593-601

- 2 - MULLER, S., COUPPEZ, M., BRIAND, J. P., GORDON, J., SAUTIÈRE, P. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1985)
Antigenic structure of histone H2B.
Biochim. Biophys. Acta 827, 235-246

- 3 - GOHILL, J., CARY, P. D., COUPPEZ, M. and FRITZLER, M. J. (1985)
Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxyl termini of histone .
J. Immunol. 135, 3116-3121

- 4 - COUPPEZ, M., SAUTIÈRE, P., BRAHMACHARI, S. K., BRAHMS, J., LIQUIER, J. and TAILLANDIER, E. (1980)
Site and role of the N-terminal fragment of the nucleosomal core histones in their binding to deoxyribnucleic acid as determined by vibrational spectroscopy.
Biochemistry 19, 3358-3363

- 5 - TAILLANDIER, E., TABOURY, J., LIQUIER, J., SAUTIÈRE, P. and COUPPEZ, M. (1981)
Structural transitions in DNAs and nucleohistones studied by I.R. spectroscopy.
Biochimie 63, 895-898

- 6 - TAILLANDIER, E., FORT, L., LIQUIER, J., COUPPEZ, M. and SAUTIÈRE, P. (1984)
Role of the protein α helixes in histone-DNA interactions studied by vibrational spectroscopy.
Biochemistry 23, 2644-2650

- 7 - COUPPEZ, M. and BELAÏCHE, D. (1996)
Successive elution by ion-exchange chromatography of H3-H4 histone complexes differing in their degree of acetylation.
Arch. Biochem. Biophys. 325, 29-38

- 8 - MULLER, S., ERARD, M., BURGGRAF, E., COUPPEZ, M., SAUTIÈRE, P., CHAMPAGNE, M. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1982)
Immunochemical detection of changes in chromatin subunits induced by histone H4 acetylation .
EMBO J. 1, 939-944

- 9 - COUPPEZ, M., MARTIN-PONTHIEU, A. and SAUTIÈRE, P. (1987)
Histone H4 from cuttlefish testis is sequentially acetylated. Comparison with acetylation of calf thymus histone H4.
J. Biol. Chem. 262, 2854-2860

10 - MULLER, S., ISABEY, A., COUPPEZ, M., PLAUE, S., SOMMERMEYER, G. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1987)

Specificity of antibodies raised against triacetylated histone H4.

Molec. Immun. 24, 779-789

Nos méthodes ont aussi été utilisées pour d'autres recherches et notamment dans les publications ci-dessous, non incluses dans ce mémoire.

OKAZAKI, H., NIEDERGANG, C., COUPPEZ, M., MARTINAGE, A., SAUTIERE, P. and MANDEL, P. (1980)

In vitro ADP-ribosylation of histones by purified calf thymus polyadenosine diphosphate ribose polymerase

FEBS Lett. 110, 227-229

MARTINAGE, A., MANGEAT, P., LAINE, B., COUPPEZ, M., 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

MARTINAGE, A., MANGEAT, P., SAUTIERE, P., COUPPEZ, M., MARCHIS-MOUREN, G. and BISERTE, G. (1981)

Study of *in vitro* phosphorylation of histones H3, H4 and of the non-acetylated and acetylated tetramer (H3-H4)₂.

FEBS Lett. 134, 107-110

CHAUVIERE, M., SAUTIERE, P., COUPPEZ, M. and CHEVAILLIER, P. (1982)

Histones from the testis of the crab *Cancer pagurus*.

Comp. Biochem. Physiol. 72B, 393-399

MICHALSKI-SCRIVE, C., AUBERT, J. P., COUPPEZ, M., BISERTE, G. and LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.-H. (1982)

U.V. differential study of the histones H2A-H2B-H3-H4 octamer.

Biochimie 64, 347-355

CHAMPAGNE, M., DEMOUVEAU, M.-F., COUPPEZ, M. and SAUTIERE, P. (1982)

The core histones from the slime mold *Physarum polycephalum*. Isolation and characterization.

Eur. J. Biochem. 126, 89-94

KMIECIK, D., COUPPEZ, M., BELAICHE, D. and SAUTIERE, P. (1983)

Primary structure of histone H2A from nucleated erythrocyte of the marine worm *Sipunculus nudus*. Presence of two forms of H2A in the sipunculid chromatin.

Eur. J. Biochem. 135, 113-121

KOUACH, M., BELAICHE, D., JAQUINOD, M., COUPPEZ, M., KMIECIK, D., RICART, G., VAN DORSSELAER, A., SAUTIERE, P. and BRIAND, G. (1994)

Application of electrospray and fast atom bombardment mass spectrometry to the identification of post-translational and other chemical modifications of proteins and peptides.

Biol. Mass Spectrom. 23, 283-294

Liste des illustrations

Figure I. 1 : Les formes de l'ADN	20
Table I. 1 : Caractéristiques des formes B, A et Z de l'ADN	21
Figure I. 2 : Structure primaire et principaux sites de modification des histones de l'octamère	23
Figure II. 1 : Arrangement des histones le long de l'ADN de la "core particle"	38
Figure II. 2 : Organisation de la "core particle"	40
Figure II. 3 : " " " "	41
Figure II. 4 : " " " "	42
Figure II. 5 : Structure de l'octamère d'histones à 3,1 Å de résolution	44
Figure II. 6 : Position de l'histone H1	45
Figure II. 7 : " " " "	45
Figure II. 8 : Modèle de chromosome	46
Figure II. 9 : Vue, au microscope électronique à balayage, à haute résolution, de fibres étirées de chromatine	48
Figure II. 10 : Modèles de fibre de 30 nm en solénoïdes	50
Figure II. 11 : Modèles de fibre de 30 nm en rubans vrillés	50
Figure II. 12 : Modèle de fibre de 30 nm à ADN "linker" entrecroisés et à rampe hélicoïdale double	51
Figure II. 13 : Schéma hypothétique général de l'attachement de l'ADN d'un chromosome à la matrice nucléaire	55
Figure II. 14 : Organisation d'un noyau interphasique de mammifère	58
Figure II. 15 : Modèle pour le repliement de la chromatine en chromosomes	59
Figure III. 1 : Un modèle de transcription à travers le nucléosome	66
Figure III. 2 : Dépliement possible du nucléosome lors de l'activation de la chromatine	68
Figure III. 3 : Dissociation de l'ADN de l'octamère	69

Figure III. 4 : Modèle eucaryote de complexe de réplication au niveau d'une fourche d'ADN	76
Figure III. 5 : Phosphorylation des histones au cours du cycle cellulaire dans les cellules CHO	80
Figure III. 6 : Modifications des histones lors des processus de réplication, de division cellulaire et de transcription	82
Figure IV. 1 : Extraction et purification des histones de thymus de veau	93
Figure IV. 2 : Chromatographie des histones totales de thymus de veau sur colonne de SP-Sephadex C50	98
Figure IV. 3 : Purification de l'histone H2A sur SP-Sephadex C50	101
Figure IV. 4 : Purification de l'histone H2B sur SP-Sephadex C50	102
Figure IV. 5 : Purification de l'histone H3 sur Biogel P10	104
Table V. 1 : Obtention des peptides à partir des histones H2A et H2B	108
Figure V. 1 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par coupure au bromure de cyanogène	110
Figure V. 2 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par coupure à l'acide acétique	112
Figure V. 3 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par coupure à l'acide acétique	114
Figure V. 4 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par action de la protéase de staphylocoque V8	116
Figure V. 5 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par action de la protéase de staphylocoque V8	117
Figure V. 6 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par action de la pepsine	118
Figure V. 7 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par action de la chymotrypsine à pH 5	120

Figure V. 8 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par action de la chymotrypsine à pH 9	121
Figure V. 9 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par action de la chymotrypsine à pH 8,5	123
Figure V. 10 : Chromatographie des fragments obtenus par action de la trypsine sur le complexe H2A-H2B	124
Figure VI. 1 : Nombre de résidus en hélice dans l'histone H2A et dans ses peptides, en fonction de la concentration en Na Cl	129
Figure VI. 2 : Nombre de résidus en hélice dans l'histone H2B et dans ses peptides, en fonction de la concentration en Na Cl	131
Figure VI. 3 : Principaux sites antigéniques mis en évidence dans les publications 1, 2 et 3	163
Figure VII. 1 : Prédiction de la structure secondaire des histones H2A, H2B, H3 et H4 obtenues avec la méthode de LEVIN et GARNIER	195
Figure VII. 2 : Structure secondaire des histones H2A, H2B, H3 et H4 dans l'octamère	196
Figure VII. 3 : Coïncidence entre charges positives des histones et ADN	199

Abréviations utilisées

A 220	Absorbance mesurée à 220 nm dans une cuve de un cm de trajet optique (sauf indication contraire)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARS	"Autonomously replicating sequences"
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
D. C	Dichroïsme circulaire
DNase	Désoxyribonucléase
DNP	Désoxyribonucléoprotéine
ELISA	"Enzyme-linked immunosorbent assay"
Gdm Cl	Chlorure de guanidinium
HMG	"High mobility group"
HPLC	"High performance liquid chromatography"
I. R.	Infrarouge
MAR	"Matrix attachment regions"
R. M. N.	Résonance magnétique nucléaire
SAR	"Scaffold attachment regions"
TFA	Acide trifluoroacétique
Tris	Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane
U. V.	Ultraviolet

Acides aminés : code à une lettre et code à trois lettres

A	Ala	Alanine
B	Asx	Acide aspartique ou Asparagine
C	Cys	Cystéine
D	Asp	Acide aspartique
E	Glu	Acide glutamique
F	Phe	Phénylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Méthionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine
Z	Glx	Acide glutamique ou glutamine

Première partie

Revue bibliographique :

La chromatine chez les eucaryotes

Avant-propos

Depuis les expériences de GRIFFITH et les travaux d'EVERY (EVERY *et al.*, 1944) l'ADN est connu pour être le support de l'hérédité dans les cellules, tant procaryotes qu'eucaryotes.

Cet ADN qui se présente sous la forme d'un filament de 20 Å de diamètre a une longueur qui varie selon les organismes entre quelques microns et plusieurs mètres. Il doit être organisé en une structure compacte de façon à tenir dans le noyau. Par exemple, les cellules somatiques humaines qui possèdent 46 chromosomes, contenant chacun une molécule d'ADN d'environ 4 cm de long, ont une longueur totale d'ADN de l'ordre de 2 mètres, à emballer à l'intérieur d'une sphère d'environ 5 µm de diamètre, correspondant au noyau.

Cet ADN doit néanmoins rester accessible à différentes macromolécules parmi lesquelles nous citerons : les enzymes de réparation, les enzymes de transcription qui formeront l'ARN, les enzymes de réplication qui permettront à la cellule qui va se diviser, d'avoir son ADN en double exemplaire. Ces deux exemplaires devront lors de la mitose pouvoir être soigneusement séparés l'un de l'autre.

Pour permettre le déroulement de ces différents phénomènes la cellule a organisé son ADN avec des protéines (il n'est d'ailleurs pas exclu qu'une quantité importante d'ADN n'ait d'autre rôle que de participer aussi à cette organisation). Cet ensemble complexe présent dans le noyau des cellules a été appelé chromatine.

Chapitre I : Constituants.

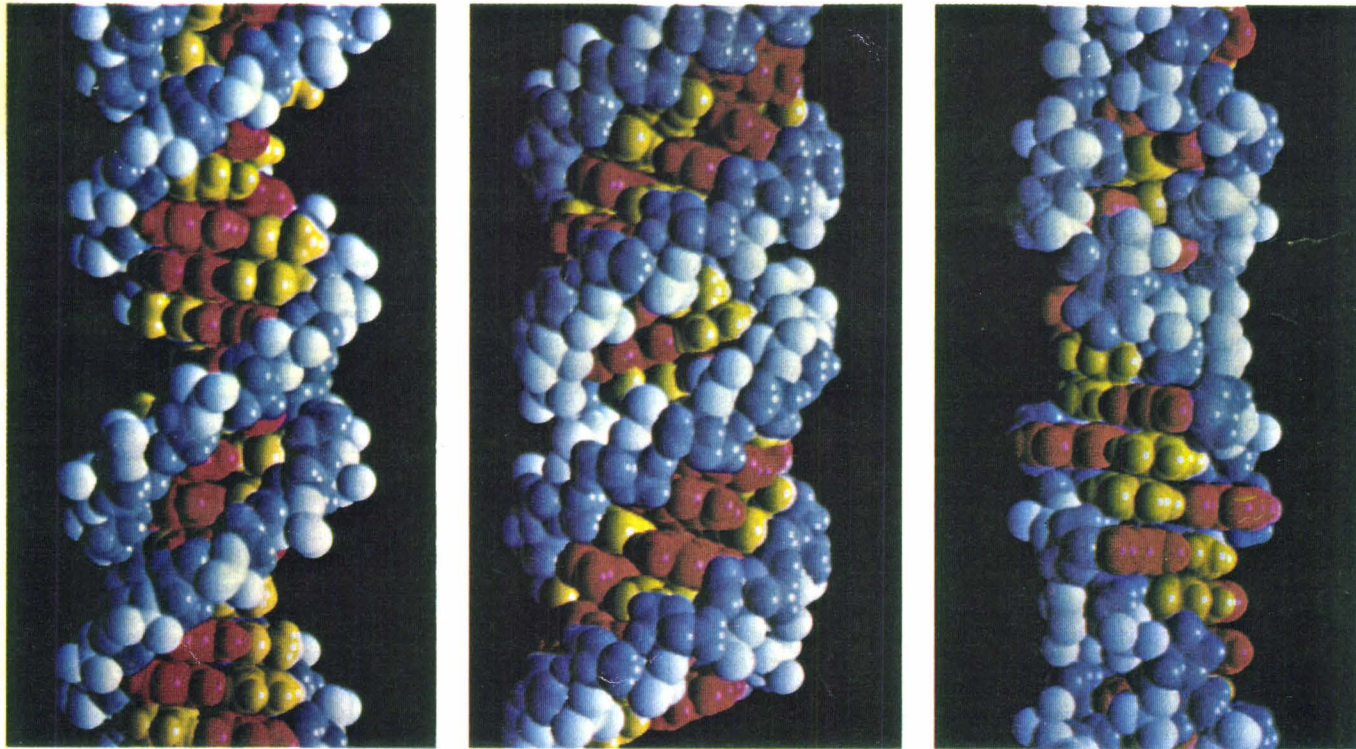
I - 1. COMPOSITION.

Dans les cellules somatiques des eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines basiques bien définies : les histones et, à des protéines beaucoup plus diversifiées, définies par ce qu'elles ne sont pas : les protéines non histones, expression qui cache mal la limite de nos connaissances.

Le terme chromatine désigne le gel de désoxyribonucléoprotéine isolé par lyse du noyau. Le complexe obtenu présente une composition variant avec les organismes, les organes et aussi avec le mode de préparation. Toutefois le rapport histones/ADN compris entre 1 et 1,3 est assez constant. Le rapport protéines non histones/ADN varie entre 0,7 pour le thymus et 1,5 à 2,5 pour le foie. Le rapport ARN/ADN varie quant à lui entre 0,05 et 0,3 pour les mêmes organes (POMERAI *et al.*, 1974 ; HJELM et HUANG, 1975 a, b).

I - 2. L' ADN.

Selon sa séquence et les conditions expérimentales - % d'humidité relative, force ionique et nature des ions, polarité du solvant, température - l'ADN peut adopter de nombreuses formes (revue : PALECEK, 1991). Ainsi l'ADN ayant une séquence au hasard, peut seulement adopter une structure en double hélice droite : formes A et B (WATSON et CRICK, 1953). Par contre de l'ADN ayant une structure répétitive précise tel que le poly(dG m⁵dC) peut adopter en outre une structure en double hélice gauche à laquelle a été attribué le nom de forme Z. Les caractéristiques principales de ces structures sont présentées figure I. 1 et table I. 1. A ces trois types de structure, il convient d'ajouter la structure qui peut se former lorsqu'une séquence de bases est suivie sur le même brin par sa séquence complémentaire dans l'ordre inverse (séquence palindromique sur l'autre brin) ; si les deux brins de la double hélice se séparent, il peut y avoir appariement entre les bases du



B

A

Z

Figure I. 1 : Les formes de l'ADN (FELSENFELD, 1985).
Les phosphates sont en bleu clair, les désoxyriboses en bleu foncé, les thymines et les cytosines en jaune et les adénines et les guanines en rouge.

Table I. 1 : Caractéristiques des formes B, A et Z de l'ADN.

	B	A	Z
Sens de l'hélice	Droite	Droite	Gauche
Diamètre (Å)	19,3	23	18
Nombre de paires de bases / tour	10 ; 10,4*	11	12
Angle de torsion (en degrés)	36 ; 34,6*	32,7	- 60 par dinucléotide
Pas de l'hélice (Å)	34	28,2	45
Inclinaison du plan des bases par rapport à un plan normal à la double hélice (tilt) (en degrés)	- 6	19	- 7
Orientation de la base par rapport au sucre	anti	anti	anti (cytidine) syn (guanosine)
Forme du cycle du sucre	C2' endo (variable)	C3' endo	C2' endo (cytidine) C3' endo (guanosine)
Petit sillon : largeur	5,7	11,0	
" " : profondeur	7,5	2,8	
Grand sillon : largeur	11,7	2,7	
" " : profondeur	8,5	13,5	
Références	ARNOTT, 1976 WING <i>et al.</i> , 1980 * WANG, 1979	CONNER <i>et al.</i> , 1982	WANG <i>et al.</i> , 1979

même brin, le phénomène se produisant aussi sur l'autre brin, on obtient une structure cruciforme (revue dans WELLS, R. D. 1988).

Parmi ces différentes structures d'ADN la forme B est de loin la plus représentée dans la chromatine, mais l'existence de courts segments d'ADN sous forme A ou Z ne peut être exclue. Ces formes pourraient être reconnues spécifiquement par certaines molécules aux rôles biologiques importants.

I - 3. LES HISTONES.

Les histones sont des protéines basiques. Après lavage des noyaux par une solution isotonique de pH neutre, les histones constituent les principaux composés acido-solubles restants. Cette propriété permet de les extraire en bloc relativement facilement.

Les histones peuvent être aussi dissociées de l'ADN à pH neutre par une force ionique élevée, leur séparation du reste du matériel nucléaire demande alors la mise en oeuvre de procédés tels que l'ultracentrifugation, la chromatographie sur colonne de tamisage moléculaire, la chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite.

I - 3 - 1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES.

La plupart des tissus renferment cinq types d'histones : H1, H2A, H2B, H3, H4. Dans les érythrocytes nucléés, l'histone H1 est partiellement remplacée par l'histone H5.

En 1960, JOHNS *et al.* classent les fractions d'histones obtenues par des extractions sélectives en trois groupes : histones très riches en lysine, histones légèrement riches en lysine, et histones riches en arginine. Dans la nomenclature adoptée depuis 1974 (BRADBURY, 1975) le premier groupe correspond à l'histone H1, le second aux histones H2A et H2B et le troisième aux histones H3 et H4. Nous verrons plus loin que ces distinctions, basées simplement sur la valeur du rapport lysine/arginine, correspondent à des rôles quelque peu différents pour chaque groupe.

Les structures primaires des histones H2A, H2B, H3 et H4 de thymus de veau sont présentées figure I. 2.

La région N-terminale des histones contient une forte proportion de résidus basiques, principalement des résidus de lysine, et peu de résidus hydrophobes. Elle correspond aux 20

Figure I. 2 : Structure primaire et principaux sites de modification des histones de l'octamère.

Structure primaire :

H2A : YEOMAN *et al.*, 1972 ; SAUTIÈRE *et al.*, 1974

H2B : IWAI *et al.*, 1970

H3 : DeLANGE *et al.*, 1973

H4 : DeLANGE *et al.*, 1969 ; OGAWA *et al.*, 1969

Acétylation (Ac) : DOENECKE et GALLWITZ (1982)

Méthylation (Me) : DeLANGE *et al.*, 1969, 1973

Phosphorylation (P) : MARZLUFF et McCARTY, 1972 ; RUIZ-CARRILLO *et al.*, 1975 ; MARTINAGE *et al.*, 1980, 1981

ADP-ribosylation (ADP-R) : BURZIO *et al.*, 1979 ; OGATA *et al.*, 1980a

Ubiquitination (Ub) : GOLDKNOPF et BUSCH, 1977 ; THORNE *et al.*, 1987

P* : site déterminé *in vitro*.

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES HISTONES H2A ET H2B DE THYMUS DE VEAU ET PRINCIPAUX SITES DE MODIFICATION

H2A: Ac-Ser^P-Gly-Arg-Gly-Lys^{Ac}-Gln-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser^{P*}-Arg-Ala-Gly-Leu-Gln-Phe-Pro-Val-Gly-Arg-Val-
 10 20 30

His-Arg-Leu-Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Glu-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Glu-Tyr-Leu-Thr-Ala-Glu-
 40 50 60

Ile-Leu-Glu-Leu-Ala-Gly-Asn-Ala-Ala-Arg-Asp-Asn-Lys-Lys-Thr-Arg-Ile-Ile-Pro-Arg-His-Leu-Gln-Leu-Ala-Ile-Arg-Asn-Asp-Glu-Glu-
 70 80 90

Leu-Asn-Lys-Leu-Leu-Gly-Lys-Val-Thr-Ile-Ala-Gln-Gly-Gly-Val-Leu-Pro-Asn-Ile-Gln-Ala-Val-Leu-Leu-Pro-Lys-Lys^{Ub}-Thr-Glu-Ser-His-
 100 110 120

His-Lys-Ala-Lys-Gly-Lys-(OH)

H2B: Pro-Glu-Pro-Ala-Lys^{ADP-R}-Ser-Ala-Pro-Ala-Pro-Lys-Lys^{Ac}-Gly-Ser-Lys^{Ac}-Lys-Ala-Val-Thr-Lys^{Ac}-Ala-Gln-Lys-Lys-Asp-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-
 10 20 30

Ser^{P*}-Arg-Lys-Glu-Ser^{P*}-Tyr-Ser-Val-Tyr-Val-Tyr-Lys-Val-Leu-Lys-Gln-Val-His-Pro-Asp-Thr-Gly-Ile-Ser-Ser-Lys-Ala-Met-Gly-Ile-Met-
 40 50 60

Asn-Ser-Phe-Val-Asn-Asp-Ile-Phe-Glu-Arg-Ile-Ala-Gly-Glu-Ala-Ser-Arg-Leu-Ala-His-Tyr-Asn-Lys-Arg-Ser-Thr-Ile-Thr-Ser-Arg-Glu-
 70 80 90

Ile-Gln-Thr-Ala-Val-Arg-Leu-Leu-Leu-Pro-Gly-Glu-Leu-Ala-Lys-His-Ala-Val-Ser-Glu-Gly-Thr-Lys-Ala-Val-Thr-Lys^{Ub}-Tyr-Thr-Ser-Ser-
 100 110 120

Lys-(OH)

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES HISTONES H3 ET H4 DE THYMUS DE VEAU ET PRINCIPAUX SITES DE MODIFICATION

H3: ^{Me 0,1,2}
^{Ac P} (H) -Ala-Arg-Thr-Lys-Gln-Thr-Ala-Arg-Lys-Ser-Thr-Gly-Gly-Lys-Ala-Pro-Arg-Lys-Gln-Leu-Ala-Thr-Lys-Ala-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Pro-
10 20 30

Ala-Thr-Gly-Gly-Val-Lys-Lys-Pro-His-Arg-Tyr-Arg-Pro-Gly-Thr-Val-Ala-Leu-Arg-Glu-Ile-Arg-Arg-Tyr-Gln-Lys-Ser-Thr-Glu-Leu-Leu-
40 50 60

Ile-Arg-Lys-Leu-Pro-Phe-Gln-Arg-Leu-Val-Arg-Glu-Ile-Ala-Gln-Asp-Phe-Lys-Thr-Asp-Leu-Arg-Phe-Gln-Ser-Ser-Ala-Val-Met-Ala-Leu-
70 80 90

Gln-Glu-Ala-Cys-Glu-Ala-Tyr-Leu-Val-Gly-Leu-Phe-Glu-Asp-Thr-Asn-Leu-Cys-Ala-Ile-His-Ala-Lys-Arg-Val-Thr-Ile-Met-Pro-Lys-Asp-
100 110 120

Ile-Gln-Leu-Ala-Arg-Arg-Ile-Arg-Gly-Glu-Arg-Ala-(OH)
130

H4: ^P Ac-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gly-Gly-Lys-Gly-Leu-Gly-Lys-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-His-Arg-Lys-Val-Leu-Arg-Asp-Asn-Ile-Gln-Gly-Ile-Thr-
10 20 30

Lys-Pro-Ala-Ile-Arg-Arg-Leu-Ala-Arg-Arg-Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Ile-Ser-Gly-Leu-Ile-Tyr-Glu-Glu-Thr-Arg-Gly-Val-Leu-Lys-Val-Phe-
40 50 60

Leu-Glu-Asn-Val-Ile-Arg-Asp-Ala-Val-Thr-Tyr-Thr-Glu-His-Ala-Lys-Arg-Lys-Thr-Val-Thr-Ala-Met-Asp-Val-Val-Tyr-Ala-Leu-Lys-Arg-
70 80 90

Gln-Gly-Arg-Thr-Leu-Tyr-Gly-Phe-Gly-Gly-(OH)
100

(H2A ET H4) 35 (H1 et H2B) ou 38 (H3) premiers résidus. A cette région fait suite une zone de 80 à 100 acides aminés contenant des résidus hydrophobes, des résidus acides et des résidus arginine, susceptible d'acquies une structure en hélice α . Dans le cas des histones H2B et H4 cette zone inclut l'extrémité C-terminale. Les histones H1, H2A et H3 se terminent par une séquence basique ; celle-ci avoisine 100 résidus dans le cas de l'histone H1, mais comprend seulement 10 résidus dans les histones H2A et H3. Le résidu basique qui est alors rencontré est la lysine dans le cas des histones H1 et H2A, et l'arginine dans le cas de l'histone H3.

I - 3 - 2. VARIATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE.

Les séquences d'histones d'origines très différentes ont été déterminées, en 1991 WELLS et BROWN en dénombrent 412 (revues : VON HOLT *et al.*, 1979 ; WU *et al.*, 1986 ; WELLS et McBRIDE, 1989 ; WELLS et BROWN, 1991).

Si toutes les histones ont leur zone hydrophobe très conservée, seules les histones H3 et H4 présentent en plus très peu de mutations dans leur zone basique N-terminale.

Les différences trouvées dans les structures d'histones peuvent être réparties en deux groupes :

1/ Les différences dues à l'espèce.

2/ Les différences dues à la régulation de l'expression des nombreux gènes d'histones présents dans le génome. Ainsi GROVE et ZWEIDLER (1984) distinguent :

- Une expression allant de pair strictement avec la réplication : cas des variants H2A.1, H2B.2, H3.1. Ces variants sont trouvés en grande quantité dans les cellules en voie de division rapide (thymus, rate).
- Une expression dépendant partiellement de la réplication, c'est-à-dire, induite aussi au commencement de la phase S, mais non complètement réprimée lors de l'arrêt de la réplication : H2A.2 et H2B.1.
- Une expression indépendante de la réplication correspondant à des gènes exprimés continuellement à un taux faible : H2A.3 et H3.3 et H5 chez le poulet (DALTON *et al.*, 1989). Ces histones s'accumulent lentement dans les cellules se divisant peu (ex : rein, foie, cerveau).

- Une expression déterminée par d'autres facteurs, par exemple la nature du tissu : H2A.4 appelée actuellement H2A.X, M1 appelée actuellement H2A.Z, H1°.

Les ARNm des variants dont la synthèse dépend de la réplication ont une extrémité 3' caractéristique repliée en épingle à cheveux. Ces ARNm sont dépourvus d'introns et ne sont pas polyadénylés (BIRNSTIEL *et al.*, 1985 ; SCHUMPERLI, 1988).

Les ARNm des variants exprimés continuellement à un taux faible ou dont l'expression dépend de la nature du tissu ont généralement une structure classique avec une extrémité 3' polyadénylée, ils peuvent contenir des introns (WELLS et KEDES, 1985).

Chez les organismes inférieurs et chez les végétaux cette distinction pourrait être moins nette, les ARNm polyadénylés étant fréquents (ex : WU *et al.*, 1989).

Le variant H2A.X (142 acides aminés) possède une séquence C-terminale similaire à celle trouvée chez les histones H2A des eucaryotes inférieurs (MANNIRONI *et al.*, 1989). Son ARNm existe sous les deux formes ; sous la forme courte ne contenant pas de poly A et, sous la forme longue polyadénylée.

Le variant H2A.Z (127 résidus) semble présent chez tous les eucaryotes. En dépit d'une bonne cinquantaine de différences avec la canonique H2A.1 il possède avec celle-ci quatre zones identiques (20-32, 42-72, 80-93, 99-109, numérotation correspondant au variant H2A.1). Cette dualité dans la conservation de la structure suggère que H2A.Z fonctionne comme H2A.1 dans l'organisation de base du nucléosome, mais qu'elle s'en différencie pour certaines propriétés fonctionnelles (HATCH et BONNER, 1988, 1990).

Les structures primaires d'histones ont souvent été déterminées sur des tissus différents d'organismes éloignés dans l'arbre phylogénétique (exemples : thymus de veau, érythrocytes de poulet, gonades d'oursin, embryon de pois). Il en résulte qu'il a longtemps été difficile d'établir l'origine et la signification des modifications rencontrées.

Il a été suggéré que les variants d'histones auraient un rôle dans la régulation de l'expression de la chromatine (revues : VON HOLT *et al.*, 1979 ; WU *et al.*, 1986). Si cette hypothèse semble valable dans le cas de l'histone H5 d'érythrocytes (qui peut être considérée comme un variant extrême de l'histone H1) cela est déjà beaucoup moins sûr en ce qui concerne le rôle de l'histone H1° et de l'histone H2A.Z, et reste à démontrer dans le cas des autres histones. Ainsi WALLIS *et al.* (1983) ont construit une série de mutants de

levure parfaitement viables où l'histone H2B était profondément modifiée. Ainsi dans certains mutants, la région N-terminale de l'histone H2B contenait deux résidus de phénylalanine (résidu qui n'est jamais trouvé dans cette région) ou présentait une délétion de 18 résidus : résidus 14 à 31 (ces résidus correspondent aux résidus 11 à 28 chez le veau). Des résultats comparables ont été obtenus avec l'histone H2A (SCHUSTER *et al.*, 1986).

I - 3 - 3. LA MACRO H2A (PEHRSON et FRIED, 1992).

Nous mettons cette "core histone" à part, vu qu'on ne connaît pas d'histone de structure analogue. Cette protéine de 367 résidus contient entre autres zones remarquables :

- une région H2A,
- une région très basique (résidus 132-159) assez semblable à une région C terminale d'histone H1,
- une "fermeture éclair" à leucines (résidus 181 à 208) structure impliquée dans la dimérisation de certains facteurs de transcription, son rôle reste à démontrer, elle pourrait reconnaître une séquence précise de l'ADN et ainsi dicter la position du nucléosome qui contient cette histone (environ un nucléosome sur trente dans le foie de rat).

I - 3 - 4. MODIFICATIONS POST-SYNTHÉTIQUES.

Quoique les histones soient parmi les protéines les mieux conservées au cours de l'évolution, elles sont très sujettes à des modifications post-synthétiques : acétylation, phosphorylation, méthylation, ADP-ribosylation, ubiquitination.

Les modifications des histones (figure I. 2) ont été revues en détail : DOENECKE et GALLWITZ, 1982 ; MATTHEWS et WATERBORG, 1985 ; WU *et al.*, 1986 ; CSORDAS, 1990 ; PFEFFER et VIDALI, 1991 ; BRADBURY, 1992)

L'acétylation.

Celle-ci peut concerner l'extrémité N-terminale des histones H1, H2A et H4, elle a alors lieu dans le cytoplasme et est irréversible. Son rôle n'est pas connu. Elle pourrait constituer une protection contre l'action des protéases ou simplement supprimer une charge positive.

L'acétylation, en tant que modification réversible, concerne la fonction ϵ -amine des lysines situées dans les trente premiers résidus des histones H2A, H2B, H3 et H4. Nous

citerons les résidus : 5 de l'histone H2A, 14 et 23 de l'histone H3, 5, 8, 12 et 16 de l'histone H4, qui sont souvent trouvés acétylés. L'acétylation des lysines qui empêche la formation d'ions alkylammonium passe pour diminuer les interactions entre les histones et les ions phosphodiester de l'ADN.

La phosphorylation.

L'hydrolyse acide limitée (HCl 6N, 2 heures à 110°C) des histones révèle la présence d'O-phosphosérine et d'O-phosphothréonine. La présence de N-phosphohistidine, N-phospholysine et de N-phosphoarginine a été suspectée (CHEN, C. C. *et al.*, 1977) mais le caractère acido-labile de ce type de liaison a rendu son étude difficile.

Dans l'histone H1 quatre résidus de sérine et trois résidus de thréonine peuvent être phosphorylés. Dans les autres histones, les résidus qui ont été trouvés phosphorylés *in vivo* sont les résidus de sérine 1 des histones H2A et H4 et le résidu de sérine 10 de l'histone H3.

La phosphorylation des histones H1 et H3 a lieu lors de la mitose. La phosphorylation de l'histone H4 concerne l'histone néosynthétisée, elle serait un phénomène cytoplasmique. La quantité d'histone H2A phosphorylée est quant à elle dépendante de la quantité d'hétérochromatine (GURLEY *et al.*, 1978).

La phosphorylation pourrait être sous-estimée car, à moins d'utiliser un inhibiteur de phosphatases, les groupements phosphates sont en grande partie hydrolysés lors de la préparation des histones.

La méthylation.

La méthylation correspond à la fixation d'un ou plusieurs radicaux méthyle sur un atome d'azote. La méthylation de la lysine concerne l'azote de la fonction ϵ -NH₂. On peut obtenir selon le nombre de radicaux méthyle fixés : l'amine secondaire, l'amine tertiaire, et même l'ammonium quaternaire. La méthylation ne modifie pas l'ionisation de la protéine dans un environnement physiologique (pH voisin de la neutralité) elle réduit toutefois son aptitude à former des liaisons hydrogène.

La lysine 20 de l'histone H4 de thymus de veau est soit monométhylée (pour 25 %), soit diméthylée (pour 75 %). Par contre, l'histone H4 isolée du pois n'est pas méthylée (DeLANGE *et al.*, 1969). Dans l'histone H4 de *Physarum* un deuxième site de méthylation

a été trouvé : la lysine 79. Ce site, contrairement à la plupart des sites de modification dans les histones, se trouve dans une zone structurée.

L'histone H3 contient deux sites de méthylation, les résidus de lysine 9 et 27, où on trouve de la mono-, de la di- ou de la triméthyllysine (DeLANGE *et al.*, 1973). Contrairement aux processus d'acétylation et de phosphorylation, et bien qu'une déméthylase (N6-alkyllysine) ait été découverte (PAIK et DiMARIA, 1984) la méthylation des lysines des histones est considérée comme un phénomène peu réversible. La mise en place de cette modification démarre sitôt la biosynthèse des histones et se termine avant la mitose (THOMAS, G. *et al.*, 1975).

HENDZEL et DAVIE (1989) ont une vue beaucoup plus dynamique de la méthylation et suggèrent que les histones H3 et H4 de la chromatine des gènes actifs, compétents, et réprimés sont différemment méthylés, dans l'ordre actifs > compétents >> réprimés. Il y aurait un certain parallélisme entre méthylation et acétylation, sans que ces deux types de modifications soient couplés. RENEKER et BROTHERTON (1991) trouvent une corrélation entre méthylation et acétylation à renouvellement (turnover) lent mais aucune relation dans le cas de la transcription.

Lors d'un stress (heat shock) il y a dans l'histone H3 de la drosophile un déplacement de la méthylation, la formation de méthyllysine diminue, une ou plusieurs arginines deviennent méthylées ; la méthylation de la proline N-terminale de l'histone H2B augmenterait (DESROSIERS et TANGUAY, 1988). Des arginines N-méthyltransférases existent aussi chez les mammifères (GHOSH *et al.*, 1988).

L'ADP-ribosylation et la poly(ADP-ribosylation) (revues : DE MURCIA *et al.*, 1988 ; BOULIKAS, 1991).

Dans ce type de modifications catalysées par des poly(ADP-ribose) polymérases, le ribose terminal est attaché par une liaison covalente à une fonction acide carboxylique. Celle-ci peut être le groupe γ carboxyle de l'acide glutamique ou le groupe α carboxyle de l'acide aminé en position C-terminale. Ainsi les résidus d'acides aminés se trouvant en position 2 de l'histone H2B, en position 2 et 14, et en position C-terminale de l'histone H1, peuvent être trouvés modifiés (OGATA *et al.*, 1980 a et b). D'autres acides aminés (lysine,

histidine, arginine, phosphosérine) pourraient être ADP-ribosylés par des enzymes spécifiques.

L'ubiquitination.

L'ubiquitine, petite protéine de 76 résidus, à la structure très conservée, très résistante aux enzymes protéolytiques, est trouvée dans le noyau et le cytoplasme de la plupart des cellules eucaryotes. L'ubiquitine existe à l'état libre ou liée à des protéines ; son groupement carboxylique terminal forme alors une liaison isopeptidique avec la fonction ϵ -NH₂ d'un résidu de lysine de la protéine cible ; les lysines 119 de l'histone H2A et 120 de l'histone H2B peuvent ainsi être liées à l'ubiquitine. Les complexes qui en résultent ont été appelés respectivement uH2A ou protéine A 24 et uH2B. Dans le thymus de veau environ 10 % des molécules d'histone H2A et 1 à 2 % des molécules d'histone H2B sont trouvées modifiées (GOLDKNOPF et BUSCH, 1977 ; WEST et BONNER, 1980 ; BUSCH, 1984 ; THORNE *et al.*, 1987). Dans le cytoplasme l'ubiquitination semble être un signal de protéolyse, l'ubiquitination des histones, par contre, n'entraînerait pas nécessairement leur dégradation, mais serait impliquée dans les processus de transcription et de réparation (FINLEY et VARSHAVSKY, 1985).

I - 3 - 5. LES INTERACTIONS HISTONE-HISTONE.

Nous verrons plus loin que les histones sont en quelque sorte les sous-unités d'une protéine multimérique. Cette protéine, pour exister dans les conditions physiologiques, doit être sanglée par deux supertours d'ADN ; des protéines acides pourraient néanmoins remplacer transitoirement l'ADN.

In vitro, en l'absence d'ADN, cet assemblage de 8 sous-unités existe seulement en présence de NaCl 2 M. (THOMAS, J. O. et KORNBERG, 1975). Si la force ionique est diminuée, cet octamère se disloque en un tétramère (H3-H4)₂ et en deux dimères H2A-H2B.

Le complexe H2A-H2B a été mis en évidence à Lille par SKANDRANI *et al.*, 1972. KELLEY (1973) a déterminé une masse molaire correspondant à l'existence d'un dimère.

KORNBERG et J. O. THOMAS, (1974) ROARK *et al.*, (1974) par ultracentrifugation de la fraction contenant les histones H3 et H4 obtenue par la méthode de

VAN DER WESTHUYZEN et VON HOLT (1971) obtiennent une masse correspondant à un tétramère (H3-H4)₂. Ce résultat est confirmé par l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant, effectuée après pontage des histones, qui révèle, quelle qu'ait été la concentration en histones lors du pontage, la présence de bandes correspondant à 1, 2, 3, 4 molécules d'histones liées.

De plus, de fortes interactions, détectées seulement par l'augmentation du pourcentage de structure en hélice α qu'elles induisent, existent entre les histones H2B et H4, et H2A et H3 (D'ANNA et ISENBURG, 1974c).

I - 3 - 6. LES INTERACTIONS HISTONES-ADN.

A partir de la chromatine, une augmentation progressive de la force ionique, dissocie séquentiellement les histones de l'ADN.

L'histone H1 est dissociée par NaCl 0,5 M, les histone H2A et H2B par NaCl 1 M, les histones H3 et H4 par NaCl 1,2 - 1,5 M.

La comparaison entre les courbes de fusion de l'ADN, obtenues après enlèvement par chromatographie de tamisage moléculaire des histones dissociées à ces paliers de force ionique, met en évidence une protection de l'ADN par toutes ces fractions d'histones contre la dénaturation thermique (WILHELM et CHAMPAGNE, 1969). En dichroïsme circulaire, les interactions histones-ADN se traduisent par une diminution de la bande positive à 260-290 nm (HJELM et HUANG, 1974).

D'autres systèmes d'étude des interactions histones-ADN, concernant spécifiquement la détermination de la structure de la chromatine, seront vus plus loin.

I - 4. LES PROTÉINES NON-HISTONES.

I - 4 - 1. CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES.

Ces protéines forment un ensemble complexe qui représente en masse 0,5 à 2,5 fois la masse de l'ADN. Il est possible de détecter quelques centaines de protéines en électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide ; nous citerons :

- Les protéines de structure, liées ou non à l'ADN, telles que les lamines et les protéines du réseau.

- Des protéines liées aux ARN messagers.
- Des protéines contractiles, actine, myosine, tropomyosine.
- Des récepteurs hormonaux.
- Des enzymes agissant sur l'ADN (méthylases, complexes de transcription, de réplication, de réparation...).
- Des enzymes agissant sur les protéines (kinases, phosphatases, acétylases...).
- Les protéines HMG, groupe relativement bien connu dont nous donnerons quelques caractéristiques.

I - 4 - 2. LES PROTÉINES HMG.

Elles sont ainsi appelées "High Mobility Group" à cause de leur comportement en électrophorèse (revue : BUSTIN *et al.*, 1990). Elles sont extraites du noyau ou de la chromatine par NaCl 0,35 M et sont solubles dans une solution d'acide perchlorique ou d'acide trichloracétique à 5 %. Ces protéines sont de plus partiellement extraites par les acides dilués lors de l'extraction des histones.

Les principales représentantes de cette famille sont les HMG 1 et 2 de masse molaire 28 000 et 27 000 respectivement, les HMG 14 et 17 de masse molaire 10 300 et 9 200, la HMG 20 qui est l'ubiquitine, les HMG I et Y.

Les protéines HMG 1, 2, 14 et 17 peuvent être sujettes aux mêmes modifications postsynthétiques que les histones : phosphorylation, acétylation, méthylation, ADP-ribosylation (revues : EINCK et BUSTIN, 1985 ; MATTHEWS et WATERBORG, 1985). Ces protéines peuvent être également glycosylées (REEVES *et al.*, 1981).

Les protéines HMG 1 et 2. Elles ont des séquences en acides aminés très voisines (WALKER *et al.*, 1980). Leur structure peut être divisée en quatre domaines (CARY *et al.*, 1983) :

- Résidus 1 à 11. Cette zone non structurée rappelle la région N-terminale des histones, elle comporte cinq résidus basiques dont deux lysines qui peuvent être acétylées de façon réversible.
- Résidus 12 à 75 et 96 à 169. Ces deux domaines contiennent 51 et 30 % d'hélice α respectivement. Cette structure semble être stabilisée par des résidus hydrophobes et par

une certaine alternance de résidus acides et de résidus basiques, ces derniers étant les plus nombreux. Les segments 1-82 et 86-166 présentent beaucoup de similitudes. Des domaines analogues sont trouvés dans plusieurs protéines se liant à l'ADN dont plusieurs facteurs de transcription ; ils sont appelés "HMG Box" (LILLEY, 1992 ; GROSSCHEDL *et al.*, 1994).

- Résidus 170 à 259. Ce domaine qui peut être divisé en trois parties, la première et la dernière étant basiques, est caractérisé par une zone centrale comportant une succession ininterrompue d'une quarantaine de résidus d'acide aspartique et d'acide glutamique. Dans la protéine entière cette zone acide pourrait être stabilisée en une hélice α .

Le rôle exact de ces deux protéines, présentes à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme est assez mal connu. Les zones basiques interagissent *in vivo* et *in vitro* avec l'ADN, préférentiellement avec l'ADN simple brin et l'ADN cruciforme (BIANCHI *et al.*, 1989). La zone acide pourrait interagir avec les histones (BRADBURY, 1983).

Les protéines HMG 14 et 17. Ces deux protéines de 100 et 89 résidus respectivement ont des zones de séquences analogues totalisant une quarantaine de résidus. Elles contiennent peu de résidus hydrophobes, alanine exceptée, une assez forte proportion de résidus chargés acides et surtout basiques. En solution ces protéines ont très peu de structure organisée. La HMG 14 se distingue par une extension de la région C-terminale. Parmi les onze résidus qui forment cette extension, six sont des résidus acides (WALKER *et al.*, 1977, 1979). Ces protéines sont capables d'interagir à la fois avec l'ADN et avec les histones, notamment lors de la transcription (GONZALEZ et PALACIAN, 1990).

Les protéines HMG I et HMG Y. Ces protéines basiques d'une centaine de résidus se lient à l'ADN. Leur extrémité C-terminale contient néanmoins 9 résidus d'acide glutamique et cette acidité peut être renforcée par la phosphorylation de 4 à 6 résidus d'acides aminés hydroxylés, cette extrémité pourrait alors se lier d'une façon modulable à des protéines basiques (FERRANTI *et al.*, 1992).

Chapitre II : Organisation de la chromatine.

II - 1. MISE EN ÉVIDENCE DE SOUS-UNITÉS RÉPÉTITIVES DANS LA CHROMATINE.

Les premières notions de sous-unités proviennent de la microscopie électronique, elles sont dues à WOODCOCK, 1973 ; OLINS et OLINS, 1974 ; OUDET *et al.*, 1975. La chromatine apparaît comme un chapelet formé de particules sphériques d'environ 10 nm de diamètre reliées par un filament d'ADN.

Une autre série d'arguments en faveur de l'existence de particules dans la chromatine a été apportée par l'action des nucléases. HEWISH et BURGOYNE (1973) incubent des noyaux de foie de rat de façon à laisser agir une endo-désoxyribonucléase. Après l'extraction de l'ADN et son analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide, ces auteurs obtiennent une série de bandes contenant des ADN dont les masses sont des multiples de la masse de l'ADN de la bande la plus rapide. D'une façon naturelle des particules contenant des histones et 160-200 paires de bases d'ADN sont produites lors de l'apoptose ("mort cellulaire programmée", revue : GERSCHENSON et ROTELLO, 1992).

Les spectres de diffraction des rayons X avaient permis à PARDON et WILKINS (1972) de proposer un modèle dans lequel l'ADN était enroulé en une superhélice contenant 100 paires de bases par tour.

La combinaison des notions d'existence de sous-unités et de structure superhéliçoïdale avec les résultats d'une étude par pontage des histones dans la chromatine, a amené KORNBERG (1974) à présenter un modèle de sous-unité composé d'un octamère d'histones [un tétramère (H3-H4)₂ et deux dimères H2A-H2B] associés à 200 paires de bases d'ADN. L'histone H1, une molécule par sous-unité, paraît avoir une position et une fonction différentes de celles autres histones.

L'hydrolyse de la chromatine par la DNase I, qui fournit une série de fragments d'ADN dont les longueurs sont des multiples de 10,4 paires de bases, plaide pour un modèle ne permettant l'attaque de l'ADN que par une seule face de la double hélice (NOLL, 1974 ; PRUNELL *et al.*, 1979) ; c'est-à-dire avec l'ADN enroulé (2 supertours) autour d'un noyau formé par les zones globulaires des histones de l'octamère. Les extrémités basiques sont supposées interagir avec l'ADN.

Une autre enzyme aux propriétés voisines de l'endonucléase de foie de rat, la nucléase de staphylocoque (appelée aussi nucléase de microcoque) a permis la mise en évidence de différents domaines à l'intérieur de cette sous-unité. Lors de l'attaque de la chromatine par cette nucléase on obtient successivement comme sous-unité (NOLL et KORNBERG, 1977 ; revue : WASSARMAN et KORNBERG, 1989) :

- Le nucléosome, entité résultant d'une coupure unique de l'ADN reliant les sous-unités entre elles. Il comporte environ 200 paires de bases associées à l'octamère d'histones et à une molécule d'histone H1 (ou H5 dans le cas de la chromatine d'érythrocyte). La longueur de l'ADN peut varier selon les tissus et les organismes entre 160 paires de bases (levure, neurones) et 240 paires de bases (sperme d'oursin).

- Le chromatosome (SIMPSON, 1978 a). En plus d'une action endonucléasique, cette nucléase possède une action exonucléasique qui tend à réduire la longueur de l'ADN à 166 paires de bases, le contenu en histones ne variant pas.

- La "core particle". L'action de la nucléase se prolongeant, on obtient une particule résistant assez bien à une attaque ultérieure, ne comportant plus que 146 paires de bases, dépourvue d'histone H1 (ou H5) mais contenant toujours l'octamère d'histones H2A, H2B, H3, H4 (pour cette raison ces quatre histones sont souvent appelées "core histones").

Le segment d'ADN qui, dans la chromatine, avant action de la nucléase, reliait les chromatosomes entre eux, est appelé "linker".

II - 2. ORGANISATION DES SOUS-UNITÉS.

II - 2 - 1. STRUCTURE DE LA "CORE PARTICLE".

La "core particle" représente une entité bien définie, stable en milieu de force ionique modérée et de pH voisin de la neutralité, apte à subir toutes sortes d'investigations.

Lors de son étude par diffusion des neutrons, il est possible en faisant varier le rapport D_2O/H_2O de masquer la contribution due, soit aux histones, soit à l'ADN. Les spectres de diffusion obtenus sont en accord avec un modèle en forme de disque de 11-11,5 nm de diamètre, 5,5-6 nm d'épaisseur, formé de 1,7 tour d'ADN enroulé avec un pas de 3,0 nm autour d'un octamère d'histones de 7 nm de diamètre et de 4 nm d'épaisseur. Les extrémités N-terminales des histones sont situées à l'extérieur de l'espace délimité par ces dernières dimensions. (PARDON *et al.*, 1975 ; BRADDOCK *et al.*, 1981)

LA RMN du ^{13}C des "core particles" et des (oligo)nucléosomes avant et après hydrolyse limitée par la trypsine et/ou la chymotrypsine confirme la position externe et mobile des extrémités N-terminales des histones H2A, H2B et H3 et de l'extrémité C-terminale de H2A. Ces extrémités ne semblent pas interagir avec l'ADN internucléosomal immédiatement adjacent à la "core particle" d'où elles s'échappent. Quant aux extrémités de H4, elles seraient attachées à l'ADN intranucléosomal (SMITH, R. M. et RILL, 1989).

Les régions des histones impliquées fortement dans les interactions avec l'ADN peuvent être déduites de la protection apportée par celui-ci, contre la méthylation des lysines par le formaldéhyde associé au cyanoborohydrure. Ainsi au moins une lysine dans chacun des peptides suivants : 72-77 (H2A), 30-33 H2B et 79-92 (H4), est inaccessible à la méthylation (LAMBERT et THOMAS, 1986). Dans l'histone H3, plusieurs lysines, situées aussi pour la plupart, dans la région globulaire de l'histone, sont protégées. Ces observations qui mettent en évidence le rôle des zones organisées des histones dans leurs relations avec l'ADN confirment les résultats obtenus antérieurement par action limitée de protéases sur la chromatine. Par exemple, après hydrolyse des extrémités N-terminales des histones par la trypsine, la structure globale de la "core particle" est peu modifiée ; les zones globulaires sont capables, à elles seules, de maintenir l'organisation de l'ADN (BÖHM et CRANE-ROBINSON, 1984).

Le groupe de MIRZABEKOV (MIRZABEKOV *et al.*, 1978 ; BAVYKIN *et al.*, 1985 ; EBRALIDSE *et al.*, 1988) a, par pontage, après dépurination, entre les fonctions aldéhyde des désoxyriboses et les groupements $\varepsilon-NH_2$ des lysines ou les azotes des noyaux imidazole des histidines, puis analyse des associations histone-ADN formées, déterminé l'arrangement des histones le long de l'ADN de la "core particle" (figure II. 1). L'action

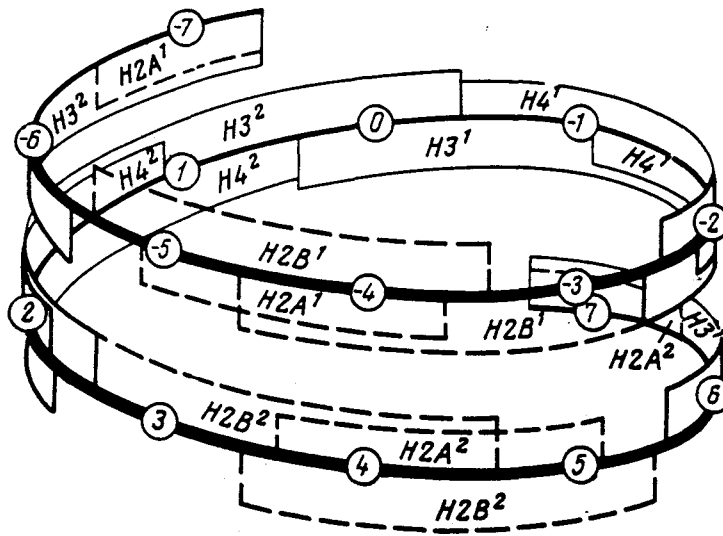


Figure II. 1 : Arrangement des histones le long de l'ADN de la "core particle". Les histones ont été placées au-dessus ou au-dessous de la superhélice d'ADN selon qu'elles ont été pontées à l'un ou à l'autre brin (BAVYKIN *et al.*, 1985).

d'endoprotéases, telles que la trypsine ou la protéase de staphylocoque, sur les produits du pontage devrait permettre, en plus, l'identification précise, pour chaque histone, des acides aminés concernés (EBRALIDSE et MIRZABEKOV, 1986). L'histidine 18 de l'histone H4, située au centre d'un segment de cinq acides aminés basiques (KRHRK) a ainsi été trouvée liée à l'ADN entre les sites 1 et 2 (voir les figures II. 1 et II. 2C) (EBRALIDSE *et al.*, 1988).

Le premier schéma d'organisation interne du noyau protéique (figure II. 2) a été obtenu, avec une résolution de 22 Å, à partir de photographies obtenues en microscopie électronique d'agrégats d'octamères d'histones plus ou moins organisés en tubes. Les agrégats ont été formés et précipités à partir d'une solution d'octamères en milieu NaCl 2 M amenée à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium (KLUG *et al.*, 1980).

L'obtention par la même équipe de cristaux de "core particles" de bonne qualité et leur étude par diffraction des rayons X (RICHMOND *et al.*, 1984) ont conduit à un affinement du modèle (figures II. 3 et II. 4). La structure de l'ADN et des protéines, a pu être déterminée avec une résolution de 7 Å. La "core particle" comprend bien deux tours de superhélice gauche d'ADN enroulés autour d'un noyau protéique en forme de coin. Chaque tour de superhélice comporte 7,6 tours de double hélice droite d'ADN forme B. Le pas de la superhélice n'est pas régulier mais varie entre 25 et 30 Å ; de plus, l'ADN est coudé en certains points d'interaction forte avec les histones, points correspondant aussi à des sites protégés de l'action de la DNase I. Les trois tours de double hélice d'ADN situés au milieu des 146 paires de bases ont une périodicité de 10,7 paires de bases par tour. En deça et au delà de ces trois tours, l'ADN a une périodicité de 10,0 paires de bases par tour (en solution la périodicité est de 10,5 paires de bases) (HAYES *et al.*, 1991).

L'ossature du noyau protéique central est formée par le tétramère (H3-H4)₂ qui possède la configuration d'un fer à cheval gauchi, formant une rampe hélicoïdale, capable d'organiser la spire centrale de superhélice et d'interagir plus faiblement avec les deux demi-spines restantes. Ces deux demi-tours sont stabilisés par deux dimères H2A-H2B logés de part et d'autre à l'intérieur du tétramère (H3-H4)₂. Dans ce modèle, l'ADN est fixé seulement en un petit nombre de sites jalonnant les protubérances du noyau protéique. D'un point de vue théorique, l'énergie représentée par dix liaisons ioniques est suffisante pour

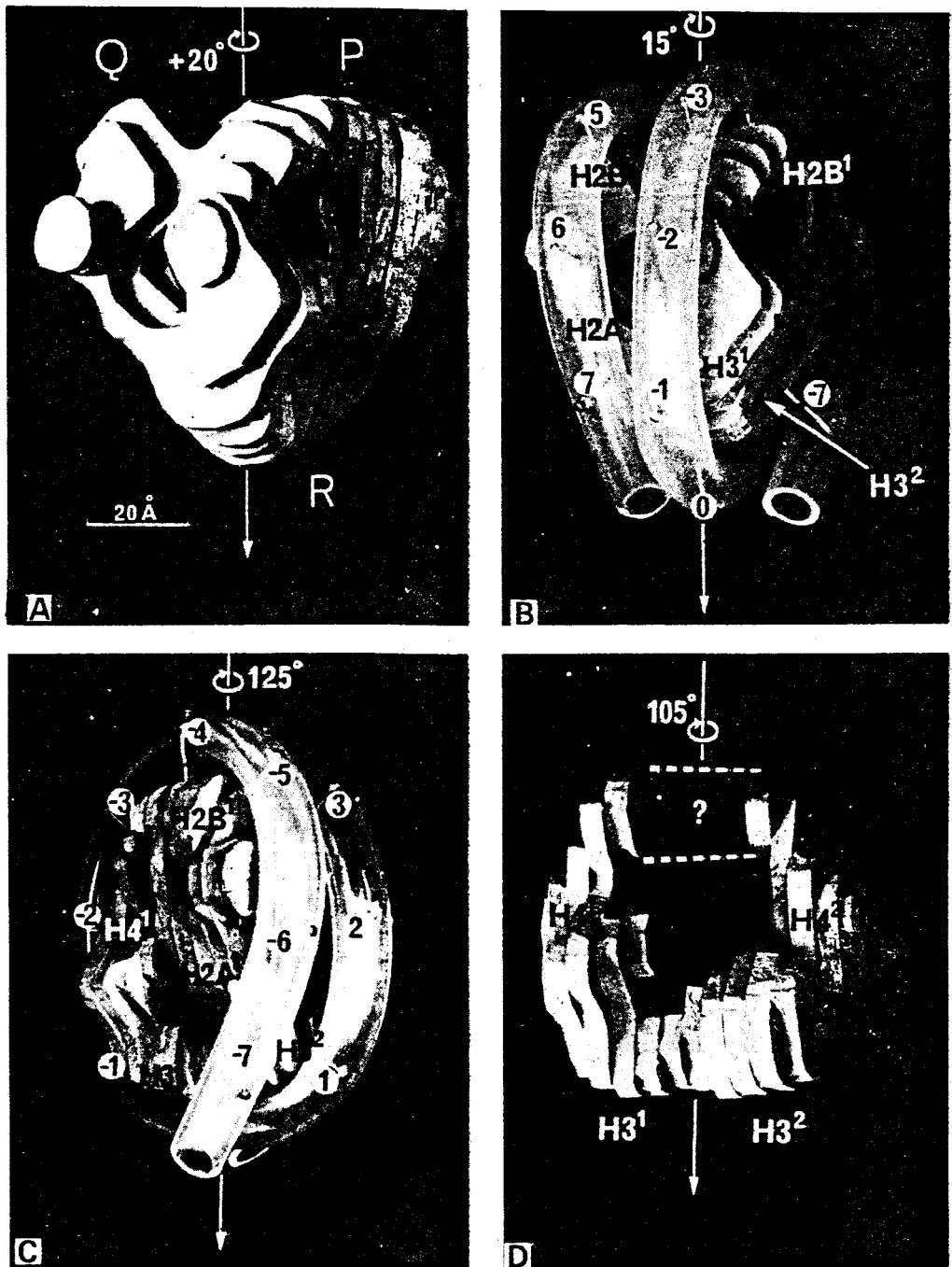


Figure II. 2 : Organisation générale de la "core particle" (KLUG *et al.*, 1980).

A et D : le noyau protéique vu sous deux angles différents.

B et C : arrangement de l'ADN autour du noyau protéique. L'ADN est figuré par un tube en matière plastique. Les 14 tours de double hélice d'ADN, correspondant aux 146 paires de bases, sont numérotés à partir de l'intersection de l'axe de dyade (flèche verticale blanche) avec l'ADN.

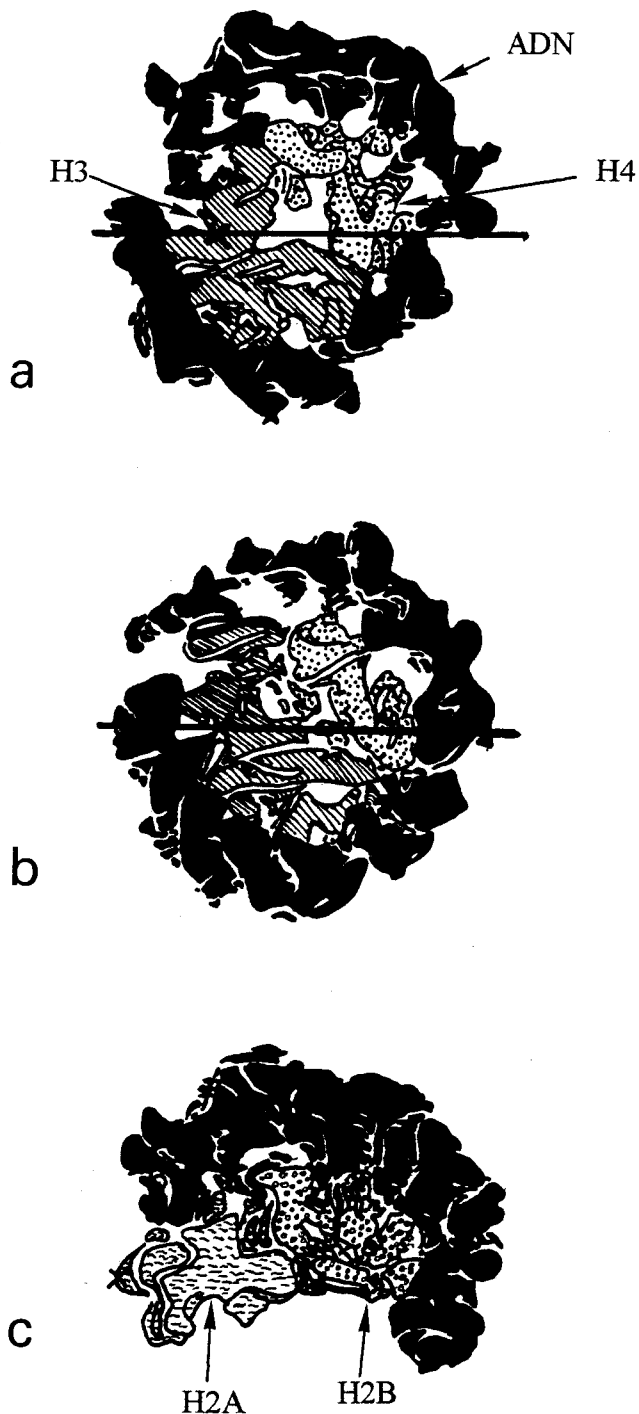


Figure II. 3 : D'une façon approximative, la "core particle" a été découpée en tranches selon des plans parallèles aux deux faces planes externes. Les tranches centrales a et b mettent en évidence le rôle du tétramère $(H3-H4)_2$. La tranche a, qui pour l'observateur était située dans la "core particle" entière, au-dessus de la tranche b, a subi une rotation de 180° autour de l'axe de dyade, placé ici horizontalement. Toutes les sections (a, b et c) sont ainsi vues de l'intérieur de la "core particle" vers l'extérieur. La tranche c plus externe, située pour l'observateur en dessous de la tranche b, montre le rôle d'un dimère H2A-H2B dans la stabilisation d'un demi-tour de superhélice ; on remarque, entre autre, un domaine de l'histone H2B dans le grand sillon de la double hélice d'ADN (RICHMOND *et al.*, 1984).

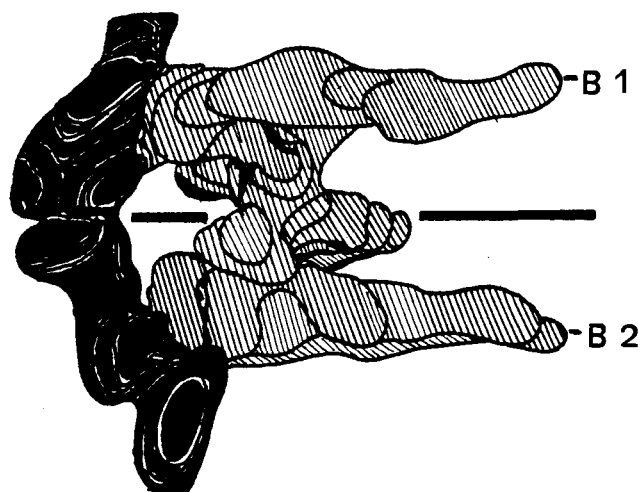


Figure II. 4 : Deux zones de contact entre le dimère $(H3)_2$ (zones hachurées) et le petit sillon de l'ADN (en noir). Les cystéines en position 110 des histones H3 se trouvent très proches de l'axe de dyade. Les extrémités des deux pièces allongées (35 Å de long) marquées B1 et B2, des hélices α , sont en contact étroit avec le petit sillon de l'ADN en deux points situés un demi-tour de double hélice de part et d'autre de l'axe de dyade (RICHMOND *et al.*, 1984).

maintenir le superenroulement de deux demi-tours d'ADN (ASHIKAWA *et al.*, 1982). Les extrémités N-terminales des "core histones" n'ont pas été prises en compte pour l'élaboration de ce modèle, car d'une part, elles semblent être trop mobiles pour se figer dans un cristal et d'autre part, il s'est avéré que dans les premiers cristaux obtenus, qui conduisaient à la même structure, celles-ci avaient été protéolysées.

Un second schéma d'organisation du noyau protéique à une résolution de 3,3 Å a été présenté par l'équipe de MOUDRIANAKIS en 1985 (BURLINGAME *et al.*, 1985). Dans ce travail l'octamère d'histones apparaît sous la forme d'un ellipsoïde aplati de 11 nm de long et de 6,5 nm de diamètre, parcouru par des canaux ("une éponge en forme de ballon de rugby"). Ce modèle totalement différent de celui du groupe de KLUG entraîna une polémique assez vive (KLUG *et al.*, 1985 ; MOUDRIANAKIS *et al.*, 1985). La détermination de structure par rayons X jouissant d'un grand prestige, ceci provoqua de nombreux travaux dans le but de réconcilier les deux modèles. En 1991 la même équipe de MOUDRIANAKIS (ARENTS *et al.*, 1991 ; ARENTS et MOUDRIANAKIS, 1993) publia une "redétermination" de la structure de l'octamère à une résolution de 3,1 Å. Ce dernier modèle (figure II. 5) est en accord avec les travaux du groupe de KLUG.

II - 2 - 2. POSITION ET RÔLE DE L'HISTONE H1.

Plusieurs types d'observation permettent de situer l'histone H1 à l'extérieur de la "core particle", aux points d'entrée et de sortie de l'ADN (figures II. 6-8) :

- Son extraction sélective par une force ionique relativement modérée.
- Sa sensibilité aux enzymes protéolytiques.
- Les pontages histone-histone : la région 74-106 de l'histone H1 est liée à la région 58-129 de l'histone H2A (BOULIKAS *et al.*, 1980).
- Les pontages histone-ADN. Cette technique démontre que l'histone H1 interagit avec 10 paires de bases situées en amont et 10 paires de bases situées en aval des 146 paires de bases composant l'ADN de la "core particle", scellant ainsi deux tours complets de superhélice d'ADN (BELYASKY *et al.*, 1980).
- L'observation en microscopie électronique, à faible force ionique, de chromatine possédant et ne possédant plus l'histone H1. Dans le premier cas, les deux filaments d'ADN qui

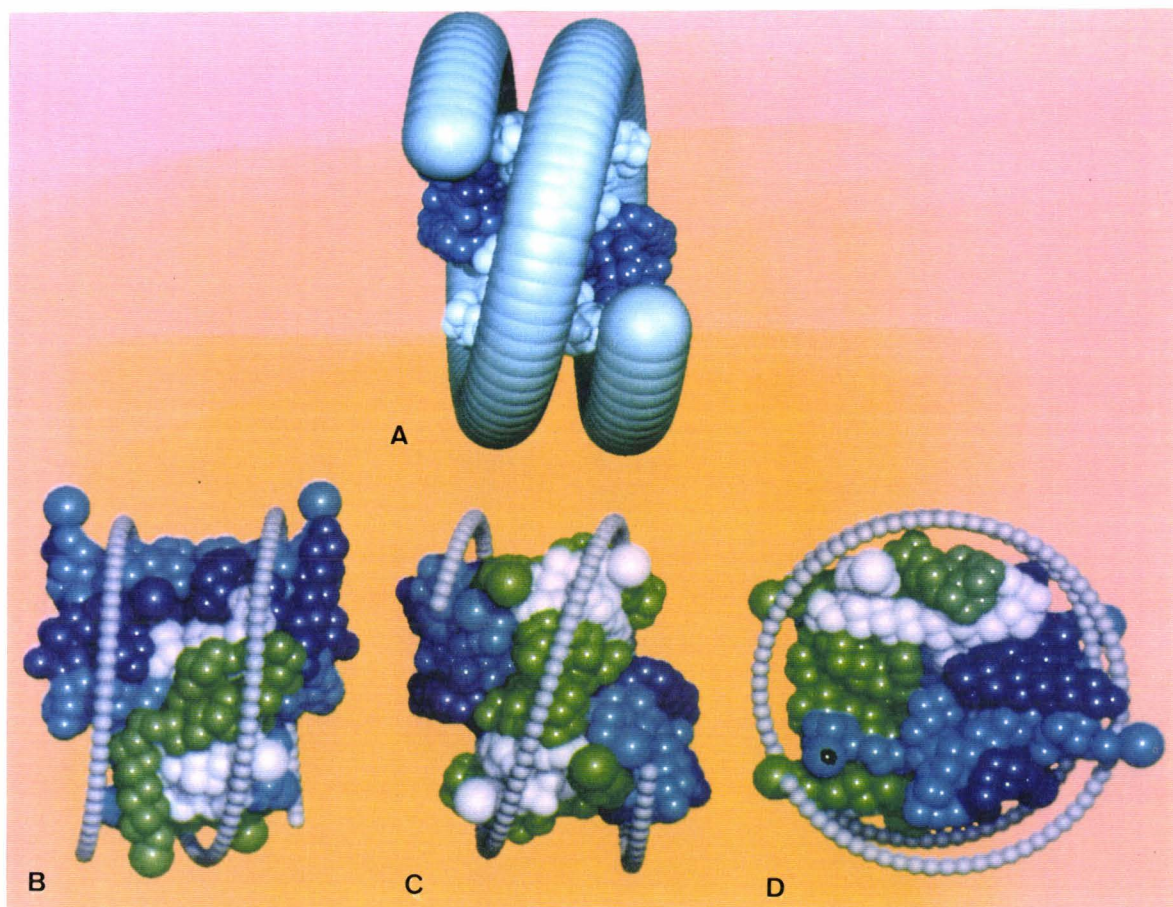


Figure II. 5 : Structure de l'octamère d'histones à 3,1 Å de résolution (ARENTS et MOUDRIANAKIS, 1993). L'histone H2A est en bleu clair, l'histone H2B en bleu foncé, l'histone H3 en vert et l'histone H4 en blanc. La position supposée de l'ADN est représentée par un tube annelé. Dans la figure A, les dimensions du tube correspondent à celles de l'ADN, dans les figures B, C et D, le diamètre du tube a été réduit et correspond seulement à 10 Å, ceci de façon à laisser mieux voir les histones. Les grosses sphères (7 Å de diamètre) réparties assez régulièrement de part et d'autre du tube symbolisant l'ADN, correspondent chacune à la limite entre extrémité N-terminale mobile et zone structurée de l'histone, ceci à l'exception de la sphère marquée d'un point noir (figure D) qui indique l'origine de l'extrémité C-terminale de l'histone H2A.

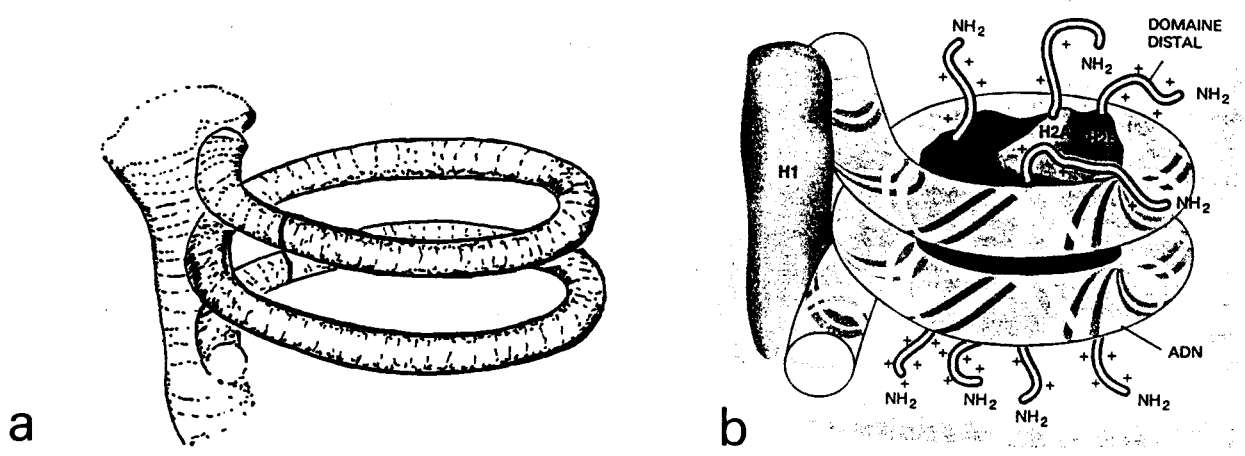


Figure II. 6 : Position de l'histone H1 selon THOMA *et al.* (1979).
 a : Seuls l'histone H1 et l'ADN sont représentés.
 b : Schéma de GRUNSTEIN (1992)

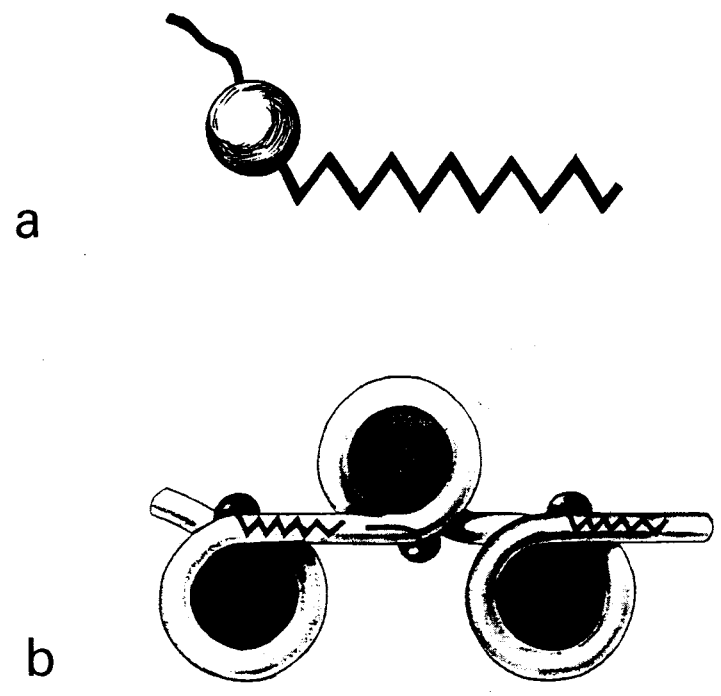


Figure II. 7 : Position de l'histone H1 selon BOULIKAS *et al.* (1980).
 a : Les trois domaines de H1 : une courte extrémité N-terminale, une zone structurée (sphère) et une longue extrémité C-terminale.
 b : Succession de trois nucléosomes et localisation des histones H1 (chaque nucléosome contient deux tours d'ADN, bien qu'un seul soit visible ici).

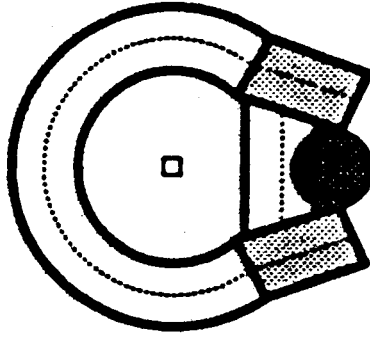


Figure II. 8 : Modèle de chromatosome (168 paires de bases) en accord à la fois, avec les différents rayons de giration et les positions respectives des centres de masses de l'octamère et de l'histone H1 calculés d'après la diffusion des neutrons, et la digestion de l'ADN par la DNase I.

Les 146 paires de bases de la "core particle" (1,45 tour de superhélice) en blanc, sont prolongés à chaque extrémité par 11 paires de bases indiquées en grisé. La sphère noire représente l'histone H1 (LAMBERT *et al.*, 1991).

aboutissent à chaque chromosome, convergent tangentiellement à celui-ci, vers un point unique (virtuellement l'histone H1) situé à sa périphérie. Dans le second cas l'enroulement de l'ADN correspond à moins de deux tours de superhélice.

- L'action de la nucléase de staphylocoque. Celle-ci hydrolyse dix fois plus rapidement la chromatine dépourvue d'histone H1 en produisant des "core particles" (146 paires de bases d'ADN). Le stade d'hydrolyse correspondant aux 166 paires de bases du chromosome n'est pas détecté.

- La diffraction des rayons X et la diffusion des neutrons. La seconde technique par exemple permet de calculer une distance de 5,5 nm entre le centre de masse de l'octamère et le centre de masse de l'histone H1 (LAMBERT *et al.*, 1991).

Parmi les différents domaines de l'histone H1, ce serait la zone globulaire structurée, capable d'assurer par elle-même une certaine protection de vingt paires de bases contre l'hydrolyse par la nucléase de staphylocoque, qui scellerait les deux supertours d'ADN autour de l'octamère d'histones (ALLAN *et al.*, 1980 ; PUIGDOMENECH *et al.*, 1983). Les zones N- et C-terminales pourraient interagir avec l'ADN d'une façon délocalisée (THOMAS et WILSON, 1986) mais néanmoins efficace dans le maintien des structures d'ordre supérieur (ALLAN *et al.*, 1982). Les zones N- et C-terminales pourraient ainsi être fixées entre les supertours, ou dans le petit sillon de l'ADN (STAYNOV et CRANE-ROBINSON, 1988).

II - 3. SUPERSTRUCTURE DE LA CHROMATINE.

II - 3 - 1. LA FIBRE DE 30 nm.

L'euchromatine, chromatine active ou potentiellement active, correspond à une forme décondensée très flexible. Selon la longueur de l'ADN internucléosomal, on peut observer en microscopie électronique, soit une fibre de 10 nm à l'aspect continu ("linker" très court) soit plus généralement une structure en "collier de perles" (figure II. 9) disposées en zigzag si le filament n'a pas été étiré.

L'hétérochromatine, chromatine inactive, constitue une structure condensée se présentant sous la forme d'une fibre d'environ 30 nm de diamètre (figure II. 9). A très faible force ionique, cette fibre se décondense en une fibre de 10 nm, ou en un "collier de perles".

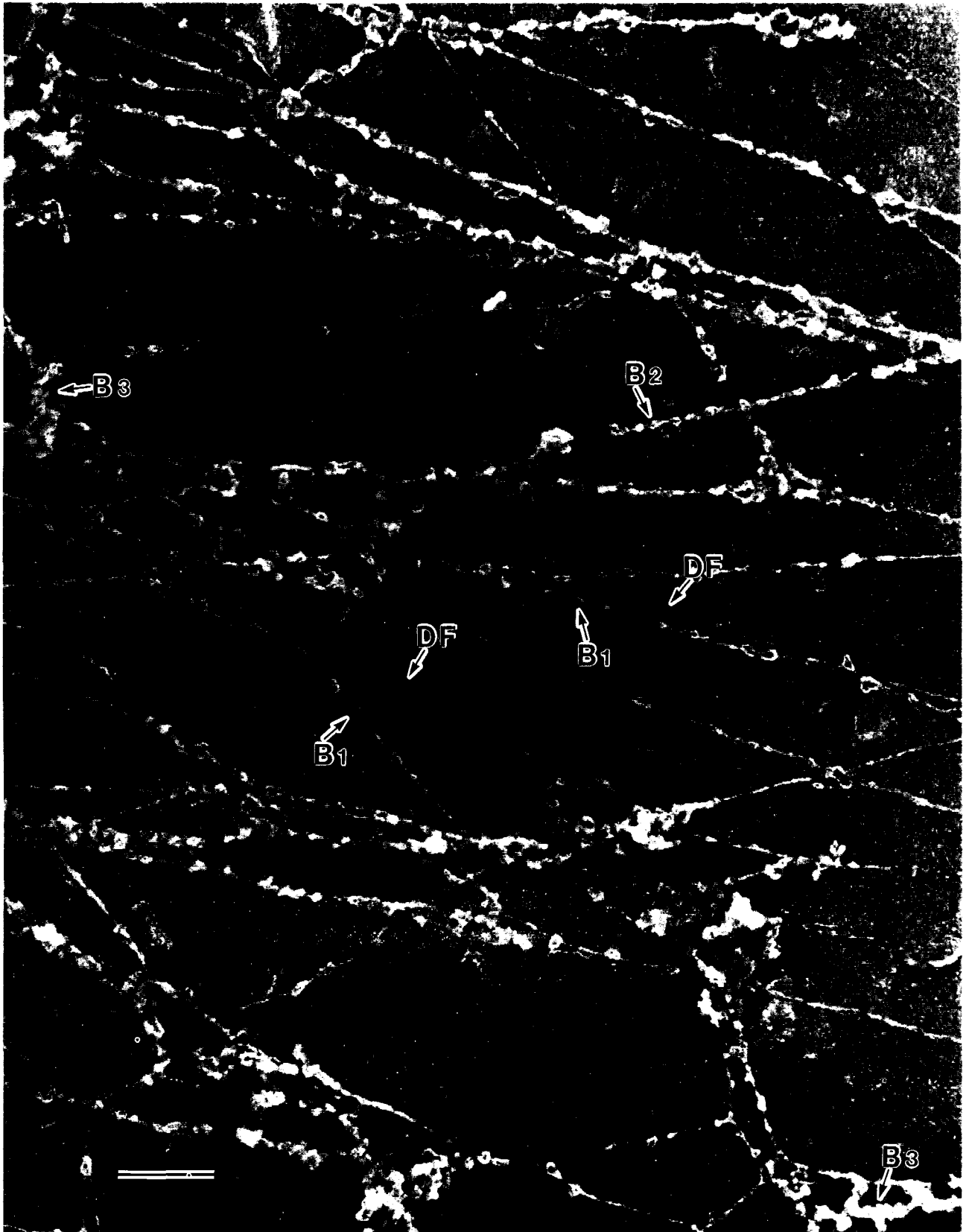


Figure II. 9 : Vue au microscope électronique à balayage, à haute résolution, de fibres étirées de chromatine (INAGA *et al.*, 1991).

DF : Fibre d'ADN nu.

B1 : "Collier de perles".

B2 : Fibre de 10 nm.

B3 : Fibre de 25-30 nm.

Le phénomène est réversible pourvu que l'histone H1 reste présente. Cette histone est indispensable à l'existence de la fibre de 30 nm.

De très nombreux modèles d'organisation en hélice de cette fibre de 30 nm ont été présentés (revus dans FELSENFELD et McGHEE, 1986). Cette fibre semble bien, d'après la majorité des observations en microscopie électronique et d'après les spectres de diffraction des rayons X, correspondre à l'organisation d'une structure de base plus simple ("collier de perles" ou fibre de 10 nm).

Les modèles en solénoïdes correspondent à une hélice simple contenant environ six nucléosomes par tour. Pour THOMA *et al.*, 1979 (figure II. 10a) ; BUTLER, 1984 ; WIDOM et KLUG, 1985 ; les molécules d'histone H1 se trouvent toutes à l'intérieur de la superhélice et pourraient y former un polymère en hélice. Les segments d'ADN interchromatosomal ("linkers") sont supposés former un coude ou une spire dans l'espace central. Pour McGHEE *et al.* (1983 a) (figure II. 10b) le "linker" forme une spire, ou une portion de spire qui continue approximativement l'enroulement de l'ADN du nucléosome. En conséquence, chaque nucléosome subira une certaine rotation par rapport au précédent. Ainsi, dans le cas de la chromatine de cellule HeLa ("linker" de 20 paires de bases) chaque nucléosome sera tourné d'environ un quart de tour par rapport au précédent ; dans la chromatine d'érythrocyte de poulet ("linker" de 44 paires de bases) la rotation sera d'un demi-tour, c'est-à-dire que l'histone H1 ou (H5) pourra être disposée alternativement à l'intérieur et à l'extérieur de la fibre ; pour la chromatine de sperme d'oursin ("linker" de 77 paires de bases) les nucléosomes seront en phase.

Les modèles en ruban vrillé, figure II. 11, intègrent dans leur structure la forme en zigzag du "collier de perles" (WORCEL *et al.*, 1981 ; SUBIRANA *et al.*, 1983 ; WOODCOCK *et al.*, 1984 ; SEN *et al.*, 1986). Les photographies de WOODCOCK *et al.* (1991 a, b) de fibres légèrement détordues font bien apparaître une hélice en double brin qui peut être expliquée par plusieurs schémas d'organisation (voir aussi WOODCOCK *et al.*, 1993).

Les modèles à "linkers" entrecroisés à l'intérieur de la fibre comportent une rampe hélicoïdale simple (STAYNOV, 1983), double (figure II. 12) (WILLIAMS *et al.*, 1986 ; ATHEY *et al.*, 1990) ou triple (MAKAROV *et al.*, 1985). Selon WILLIAMS et

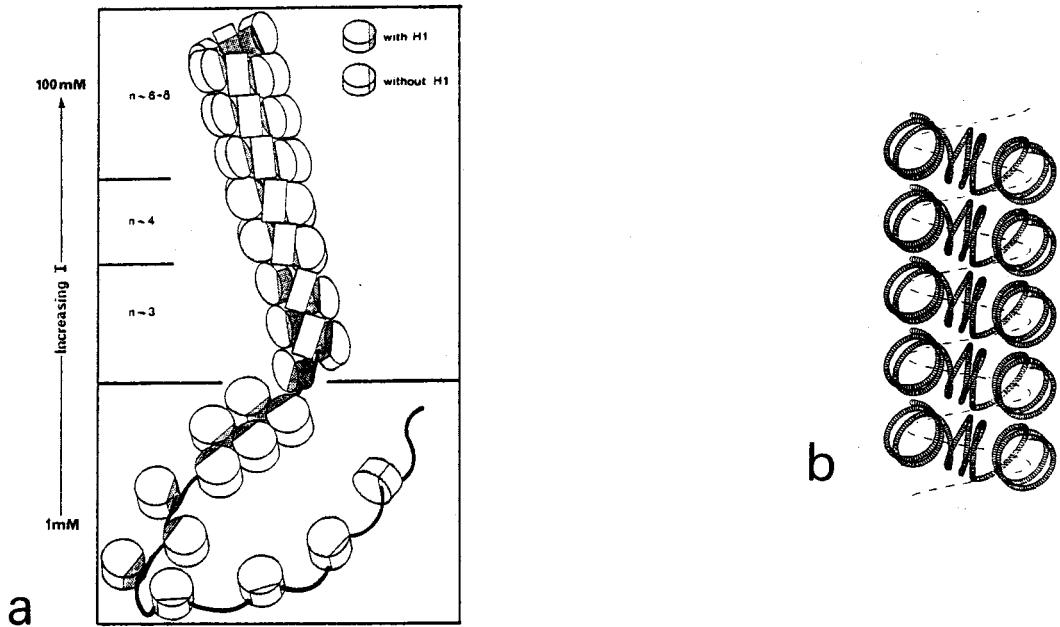


Figure II. 10 : Modèles de fibre de 30 nm en solénoïdes.

a : THOMA *et al.* (1979).

b : McGHEE *et al.* (1983 a).

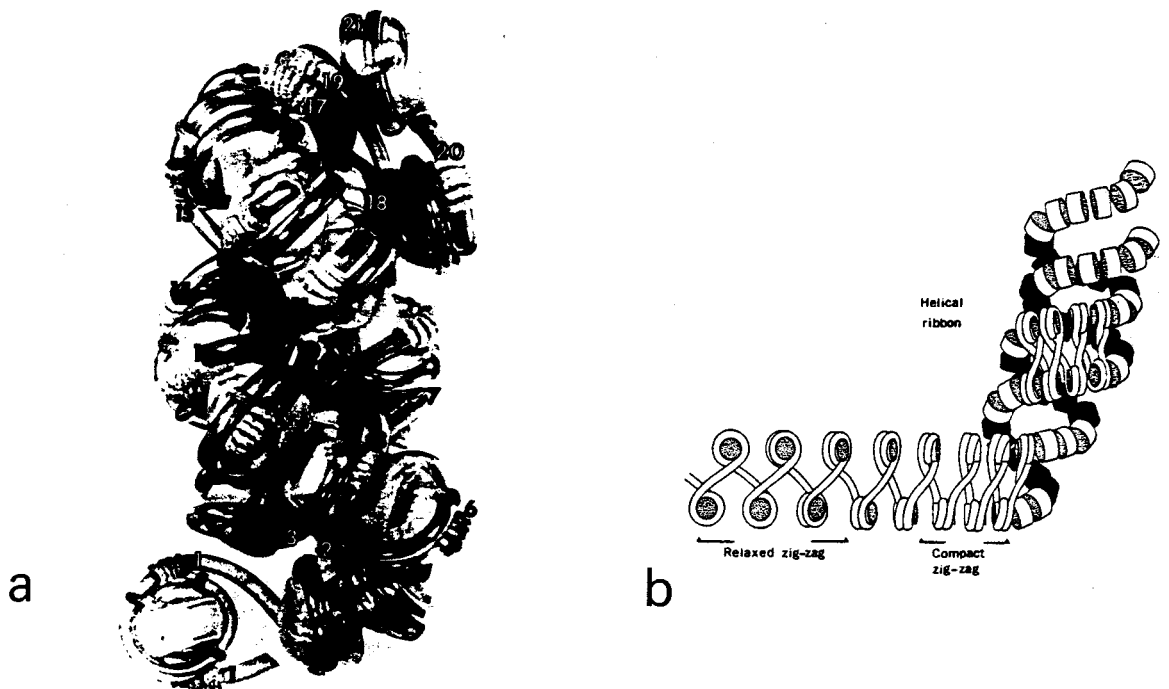


Figure II. 11 : Modèles de fibre de 30 nm en rubans vrillés.

a : WORCEL *et al.* (1981).

b : WOODCOCK *et al.* (1984).

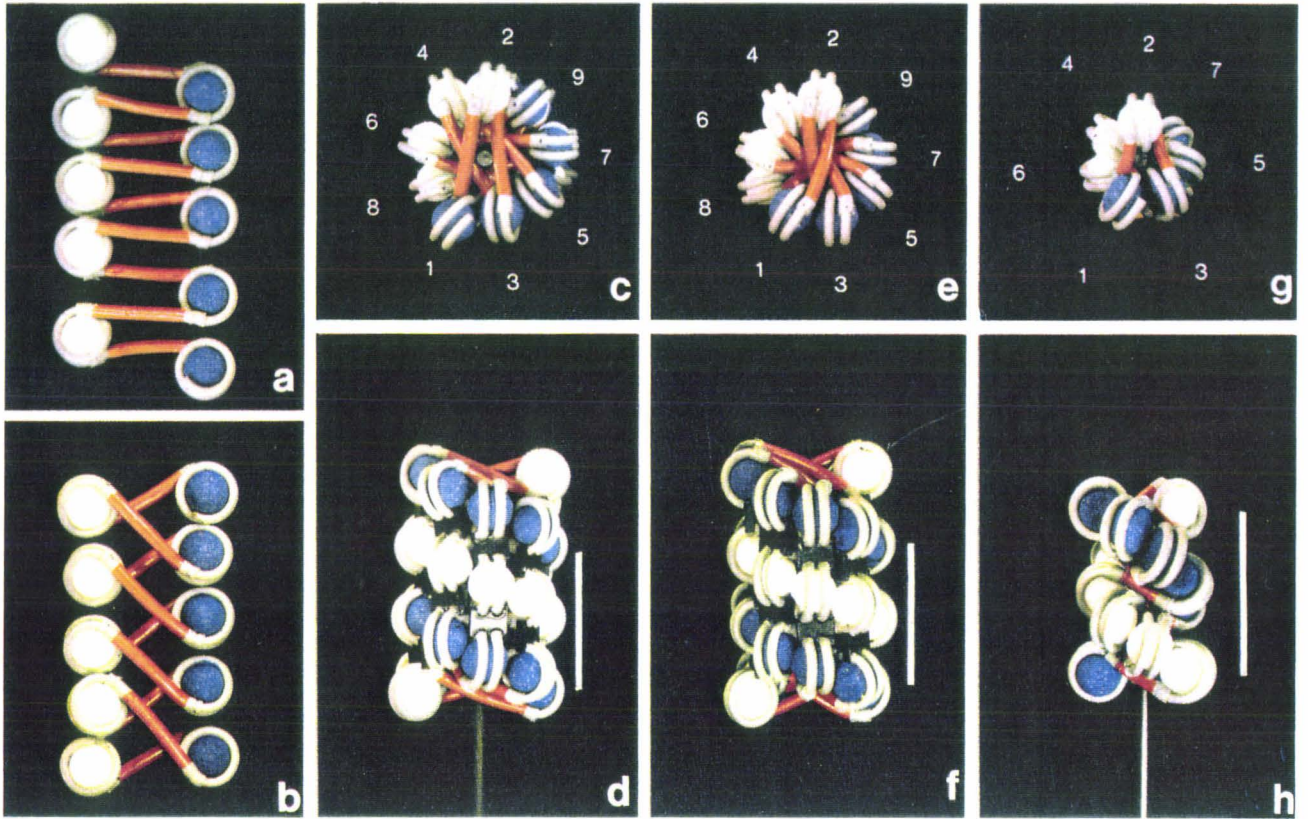


Figure II. 12 : Modèle de fibre de 30 nm à ADN "linker" entrecroisés et à rampe hélicoïdale double (WILLIAMS *et al.*, 1986).

a et b : Deux formes décondensées en zigzag.

c et d : Deux vues de l'état condensé incorporant la forme figure : a.

e et f : Deux vues de l'état condensé incorporant la forme figure : b.

g et h Structure obtenue dans le cas d'un linker très court (22 paires de bases au lieu de 48 pour les figures a-f).

collaborateurs, le diamètre D des fibres de "30 nm" varie linéairement avec le nombre de paires de bases N de l'ADN "linker" selon la formule $D = 19,3 + 0,23 N$; la superhélice tourne à gauche, son pas est de 26 nm. La complexité des deux modèles présentés figure II. 12 est seulement apparente : le passage de l'état décondensé (figure II. 12a) à l'état condensé (figures II. 12c et 12d) se fait par une simple torsion suivie d'un repliement à la façon d'un accordéon. Le passage de la figure II. 12b aux figures II. 12e et 12f se fait par un mouvement identique.

Pour DRINKWATER *et al.* (1987) tous ces modèles en torsade n'expliquent pas la production préférentielle de dinucléosomes lors de l'action des nucléases ou de la DNase.

ZENTGRAF et FRANKE (1984) proposent que la fibre de 30 nm soit formée par une succession de billes, constituée chacune de plusieurs nucléosomes. Pour ses détracteurs, ces billes observées en microscopie électronique résulteraient de cassures de la fibre de 30 nm en segments assez courts. Néanmoins, l'action de la nucléase de staphylocoque dans des conditions douces, qui produit des fragments d'environ 48 nucléosomes (spermatozoïdes d'oursin) 20 nucléosomes (érythrocytes de poulet) ou 8 nucléosomes (foie) n'a pas encore été expliquée de façon satisfaisante.

Un troisième grand type d'organisation serait qu'il n'y ait pas de structure interne répétée. La fibre de chromatine aurait un diamètre assez constant d'environ 30 nm, simplement parce que ce serait la taille optimale de l'ensemble ADN-protéines après neutralisation des charges négatives de l'ADN (SUBIRANA, 1992).

Curieusement, alors que le modèle de la "core particle" est accepté, la structure de la fibre de chromatine, théoriquement plus accessible à l'observation, puisque de taille supérieure, donne naissance à une multitude de modèles. Une explication de ce paradoxe tient à la difficulté d'en obtenir de bons spectres de diffraction des rayons X. Un autre point à considérer est notre ignorance concernant la localisation des extrémités basiques des histones. Ces régions qui passaient pour être les sites privilégiés des interactions histone-ADN et qui se sont révélées ne pas être nécessaires au maintien de la structure du chromatosome, sont supposées maintenant, jouer un grand rôle dans les niveaux d'organisations d'ordres supérieurs.

II - 3 - 2. LES BOUCLES D'ADN ET LA MATRICE NUCLÉAIRE.

Empaqueté en fibre de 30 nm, l'ADN d'un chromosome humain mesure encore 1 mm. Ceci implique l'existence d'un troisième niveau de repliement : l'ADN sera organisé en boucles par la matrice nucléaire (voir les revues : LEWIS *et al.*, 1984 ; GASSER et LAEMMLI, 1987 ; NEWPORT et FORBES, 1987 ; VERHEIJEN *et al.*, 1988 ; GASSER *et al.*, 1989).

La matrice nucléaire.

La matrice nucléaire (ou "scaffold") est définie comme le reste de chromosome ou de noyau après extraction des histones avec une haute concentration en sel ou en détergents ioniques et traitement avec la DNase. Elle est constituée de la lamina et du réseau interne. Ces deux structures ont des compositions protéiques nettement différentes. Une partie des protéines présentes dans chacune d'elles se retrouvent dans toutes les cellules de mammifère examinées (STUURMAN *et al.*, 1990 a et b)

La lamina est une couche protéique située à la périphérie du noyau et associée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (voir revue, HANCOCK, 1982). Elle est le résultat de la polymérisation des lamines A, B et C, protéines de 60000 à 70000 daltons. Lors de la division cellulaire ces protéines sont phosphorylées par la cdc2 kinase, et en plus la lamine B est déméthylée (CHELSKY *et al.*, 1989) ; ces phénomènes sont accompagnés de la dépolymérisation de la lamina.

Le réseau est une structure formée de fibres et de granules de nature surtout protéique mais contenant aussi de l'ARN et des lipides (JACKSON et COOK, 1988 ; HE *et al.*, 1990). Nous écarterons ici l'hypothèse selon laquelle celui-ci ne serait que le résultat d'un phénomène de copréciptation de protéines et d'acides nucléiques (COOK, 1988). Les nucléofilaments, environ 10 nm de diamètre, appartiennent à la famille des filaments intermédiaires qui ramifient à travers tout le cytoplasme.

Parmi les constituants de la matrice nucléaire il faut citer aussi les protéines à action enzymatique : ADN et ARN polymérases, topoisomérases I et II, les facteurs de reconnaissance de séquences spécifiques d'ADN, les récepteurs d'hormones.

D'autres protéines sont de caractérisation récente :

- La protéine ARBP ("attachement region binding protein") (VON KRIES *et al.*, 1991) abondante et capable de se lier à des séquences d'ADN particulières (séquences SAR ou MAR, définies ci-dessous).
- La chromatricine (260 kda) qui serait aussi une protéine d'ancrage des boucles d'ADN (NAKAYASU et BEREZNEY, 1988).
- Les matrines, elles forment une famille de huit protéines de 42 à 125 kda dont certaines se lient à l'ADN (BEREZNEY *et al.*, 1991).

La matrice nucléaire est le siège présumé de la réplication (VOGELSTEIN *et al.*, 1980 ; BEREZNEY et BUCHHOLTZ, 1981 ; revue : COOK, 1991) et de la transcription (COCKERILL et GARRARD, 1986 ; revue : COOK, 1989).

Les deux systèmes de boucles.

L'organisation de base correspond à un système permanent de boucles de 50 à 100 kilo paires de bases existant à la fois dans la chromatine interphasique et dans le chromosome mitotique (figure II. 13). L'ADN est fixé à la matrice nucléaire au niveau de séquences de plusieurs centaines de paires de bases, riches en adénine et en thymine, comprenant des sites de fixation de la topoisomérase II (COCKERILL et GARRARD, 1986) et voisin d'un site origine de réplication. Ces séquences d'ADN sont appelées SAR ou MAR ("scaffold ou matrix, attachement regions"). La topoisomérase II semble jouer un rôle essentiel, dans l'ancrage de la base des boucles, dans la rotation de l'ADN et dans la séparation des doubles brins les uns des autres lors de la réplication.

Au système de larges boucles, constitutif et permanent, s'ajouterait la formation de boucles (ou plutôt de sous-boucles) plus petites (figure II.13) et dont la localisation et la durée d'existence seraient fonction de l'exécution d'une tâche donnée (transcription, réparation, relaxation de l'ADN). Un autre mécanisme de formation impliquerait la liaison entre une protéine fixée sur un "enhancer" et l'ARN polymérase ou une autre protéine liée à l'ARN polymérase (revue : ECHOLS, 1990). L'existence de deux types d'attachement de l'ADN à la matrice nucléaire (LICHTENSTEIN *et al.*, 1991) un type impliquant des liaisons hydrogène et des liaisons ioniques et un type impliquant la séparation des deux brins d'ADN avec intercalation d'un complexe protéique, semble bien correspondre à l'existence de deux

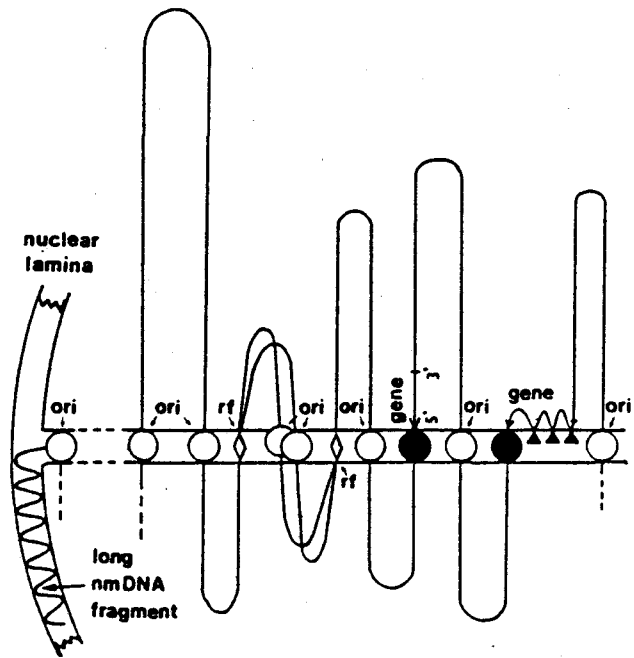


Figure II. 13 : Schéma hypothétique général de l'attachement de l'ADN d'un chromosome à la matrice nucléaire (GEORGIEV *et al.*, 1991). Chaque chromosome est fixé à la lamina par un segment de 10 kilobases d'ADN satellite ("long nm DNA fragment"). L'ADN du chromosome est aussi constitutivement attaché en des sites proches des origines de répllication (ori) aux protéines du réseau. Finalement, l'ADN se lie transitoirement au réseau lors de la répllication (rf : replication fork) et lors de la transcription (▲) ; les gènes potentiellement actifs sont aussi attachés au réseau (●).

types de boucles. Des ARN pourraient aussi être impliqués dans l'organisation de la matrice nucléaire ou dans la liaison matrice-ADN (PATRIOTIS *et al.*, 1990 ; NICKERSON *et al.*, 1989).

Après extraction des cellules par un détergent et par NaCl 2 M on obtient des nucléoïdes. Lorsque l'ADN est déroulé par le bromure d'éthidium on obtient un halo autour du nucléoïde. Ceci pourrait correspondre à un ancrage des boucles à la couche de lamines. BODNAR (1988) propose un modèle dans lequel les contacts stables lieraient l'ADN à la périphérie du noyau, les contacts dynamiques, labiles, seraient eux formés avec le réseau interne.

Les contraintes de torsion.

La présence aux points d'attache des boucles, tant dans la chromatine interphasique que dans la chromatine mitotique, d'enzymes capables de réguler la torsion de l'ADN, telle que la topoisomérase II, pose la question de l'existence ou de la non-existence de contraintes permanentes de torsion de l'ADN. En calorimétrie, la fusion de la chromatine des noyaux présente des transitions à 60°, 76°, 88° et 105°C. Une très brève action de la nucléase de staphylocoque ou de la DNase I amène la conversion de la structure qui fondait à 105° en une structure fondant à 88°. ALMAGOR et COLE (1987, 1989) attribuent la transition à 76° à l'effondrement de la structure nucléosomique, les transitions à 88° et à 105° correspondent à la fusion de la double hélice d'ADN. Ces observations peuvent être expliquées par l'existence d'un couple de torsion faisant effort sur l'ADN des boucles avant action de la nucléase (TOUCHETTE et COLE, 1985). BALBI *et al.* (1989) et CAVAZZA *et al* (1991) obtiennent aussi quatre transitions, à 66°, 75°, 92° et 107°. Ils attribuent la transition à 75° à la fusion de l'ADN internucléosomal, la transition à 92° à la fusion de l'ADN de la "core particle" située dans une boucle non structurée, la transition à 107° à la fusion de l'ADN de la "core particle" située dans une boucle structurée, dans une fibre de 30 nm par exemple. Dans leur interprétation les histones resteraient fixées à l'ADN tout au long des quatre transitions.

II - 4. LOCALISATION ORDONNÉE DE L'ADN DANS LE NOYAU INTERPHASIQUE.

L'ADN d'un chromosome pendant l'interphase n'est pas disséminé dans tout le noyau mais semble remplir un volume déterminé (figure II. 14) (CHAI et SANDBERG, 1988 ; LICHTER *et al.*, 1988 ; MANUELIDIS et BORDEN, 1988 ; revue : HILLIKER et APPELS, 1989).

Dans la cellule différenciée, seulement un faible pourcentage du génome est exprimé, la plus grande partie de la chromatine est réprimée et se trouve dans un état condensé. En conséquence le noyau est divisé en domaines fonctionnels, certains engagés dans la transcription, situés pour la plupart à la périphérie du noyau et dans la zone du nucléole (euchromatine) et certains, beaucoup plus nombreux, inactifs et situés vers l'intérieur (hétérochromatine) (SPECTOR, 1990 ; STURMAN *et al.*, 1990 b).

II - 5. NIVEAUX D'ORGANISATION SUPÉRIEURS DU CHROMOSOME MÉTAPHASIQUE.

Lors de la mitose, bien que les lamines soient relâchées dans le cytoplasme, l'ADN reste organisé en boucles, attachées radialement à l'armature protéique formant l'axe central du chromosome (PIENTA et COFFEY, 1984). Cette armature est formée entre autres de deux protéines ScI et ScII (LEWIS et LAEMMLI, 1982) ; ScI s'est avérée être une topoisomérase de type II (EARNSHAW *et al.*, 1985 ; voir aussi : MIRKOVITCH *et al.*, 1988 ; SAITOH et LAEMMLI, 1994).

La figure II. 15 présente un modèle d'organisation du chromosome (FILIPSKI *et al.*, 1990) qui tient compte des dernières données, à savoir : l'armature des chromatides à l'état condensé est hélicoïdale et les deux chromatides sœurs ont des sens de rotation opposés (BOY DE LA TOUR et LAEMMLI, 1988).

II - 6. CONCLUSION.

Au fur et à mesure des progrès de notre connaissance, la chromatine apparaît de plus en plus organisée. Dans cette organisation, les étapes "nucléosomes" et "boucles" semblent

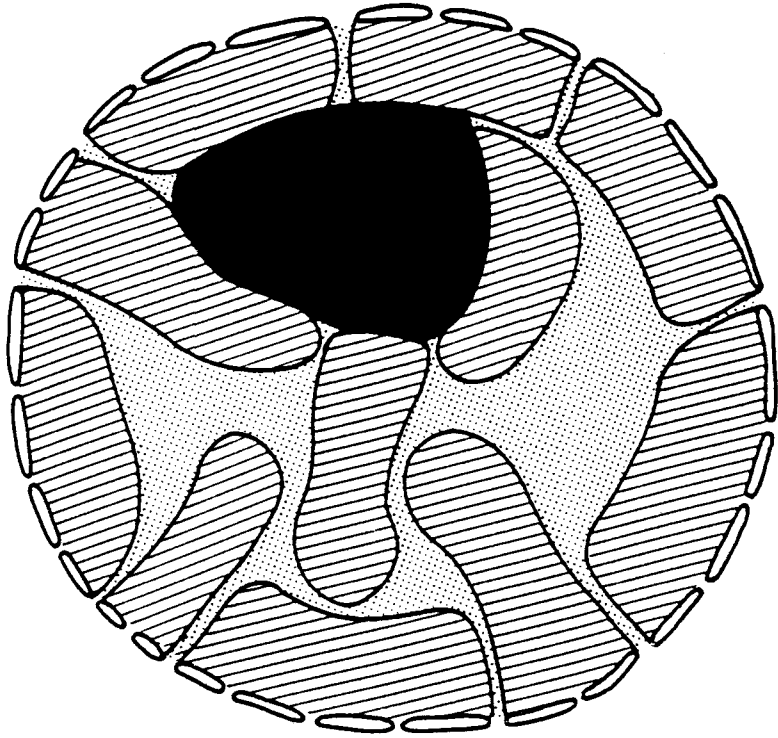


Figure II. 14 : Organisation d'un noyau interphasique de mammifère (CHAI et SANDBERG, 1988). Des portions de la matrice situées entre les chromosomes s'étendent radialement jusque certains pores nucléaires et délimitent les chromosomes (en hachuré). Tous les chromosomes sont associés avec l'enveloppe et des pores nucléaires. Le nucléole (en noir) pourrait être séparé des chromosomes voisins par une couche protéique assez similaire à la lamina.

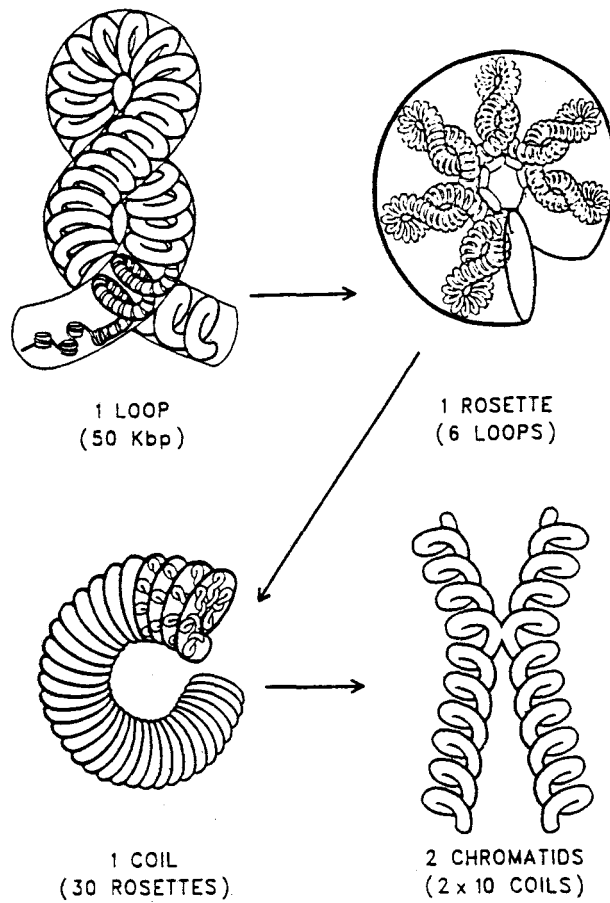


Figure II. 15 : Modèle pour le repliement de la chromatine en chromosomes (FILIPSKI *et al.*, 1990). Les boucles sont groupées hélicoïdalement en rosettes qui sont surenroulées pour former les chromatides.

les plus précises et les plus constantes tant dans le noyau interphasique que dans le chromosome métaphasique. Le nucléosome est l'objet de nombreuses modifications naturelles : modifications postsynthétiques des histones, fixation de protéines non histones, modifications dont les rôles et les modes d'action sont mal connus. L'étape "boucle" est moins certaine et de mise en évidence plus récente. La topoisomérase II, présente à la base des boucles, est néanmoins déjà la cible de médicaments anticancéreux (voir revue : ROSE, 1988).

Chapitre III : Quelques phénomènes dynamiques dans la chromatine.

En microscopie électronique le noyau apparaît formé de plages claires et de plages sombres. Les plages claires forment l'euchromatine, les plages sombres l'hétérochromatine. La transcription a lieu uniquement au niveau de l'euchromatine, par contre d'autres phénomènes, tout aussi complexes, tel que la réparation de l'ADN, la réplication, la mitose, concernent l'ensemble du génome. A tous ces processus pourra s'ajouter, dans les lignées germinales, le remplacement des histones par les protamines, phénomène conduisant à une chromatine hypercondensée dans le spermatozoïde.

III - 1. LA TRANSCRIPTION.

La transcription (voir revues : REEVES, 1984 ; HEINTZ, 1991 ; AUSIO, 1992) intéresse seulement 10 à 20 % de la chromatine. Les zones transcrites sont caractérisées par une absence de fibres de 30 nm. Cette observation paraît logique : on voit mal en effet, comment l'ARN polymérase, traînant derrière elle un long filament d'ARN, même empaqueté sous forme de ribonucléoprotéines, pourrait se frayer un chemin dans une structure très compacte. Par contre, en ce qui concerne l'état de condensation immédiatement inférieure, c'est-à-dire le "collier de perles", la réponse est moins simple.

III - 1 - 1. ASPECT DES ZONES TRANSCRITES.

En microscopie électronique, alors que la chromatine inactive présente un aspect granuleux, la chromatine fortement transcrite peut présenter un aspect en "arbre de Noël". Le tronc représente la fibre de chromatine, l'apex coïncide avec le point d'initiation de la transcription, les branches correspondent aux fibres de ribonucléoprotéines ancrées au tronc par des molécules d'ARN polymérase. Dans ces images la transcription apparaît

indépendante de la matrice nucléaire, ceci peut être dû au fait que les protéines du réseau sont solubles dans le milieu utilisé pour la préparation des échantillons.

LAMB et DANEHOLT (1979) ont mesuré l'ADN dans les anneaux de BALBIANI des chromosomes géants de larves de chironomes. Lors de la transcription, le coefficient de raccourcissement de l'ADN est compris entre 1,6 et 1,9, valeur nettement inférieure à la valeur de 5, trouvée dans l'hétérochromatine et qui peut être expliquée par une densité moindre en nucléosomes. En effet, le comptage direct de ceux-ci, donne 4 nucléosomes par micromètre, au lieu de 28, dans les zones non transcrites.

LEVY et NOLL (1981) n'observent plus la protection contre l'hydrolyse par la nucléase de staphylocoque, dans les gènes thermoinductibles de la drosophile, lorsque les cellules sont placées à une température supérieure à 30 °C. D'une façon générale les gènes transcrits sont plus sensibles aux nucléases (environ dix fois) que le reste du génome. Le domaine sensible comprend la région codante et s'étend aussi en deça et au delà, il semble être limité par les points d'ancrages de la boucle d'ADN (LEVY-WILSON et FORTIER, 1989).

Dans les cellules HeLa le gène de l'histone H4 et la région immédiatement en amont sont déficients en nucléosomes pendant le début de la phase S, période pendant laquelle le gène est activement transcrit (MORENO *et al.*, 1986).

L'absence totale de nucléosomes semble bien établie dans le cas des gènes codant pour les ARN ribosomiaux, activement transcrits par l'ARN polymérase I (LABHART et KOLLER, 1982 ; NESS *et al.*, 1986).

Cette diminution du nombre nucléosomes dans les zones transcrites semble être la conséquence d'un encombrement de l'ADN, plutôt qu'une condition nécessaire à la transcription. Il a été démontré que la transcription peut se faire en présence de nucléosomes ou du moins, de "core particles" : par exemple, la transcription chez le virus SV40 par l'ARN polymérase II (DE BERNARDIN *et al.*, 1986). Ces auteurs font agir du psoralène, qui en présence de lumière ultraviolette pontre d'une part l'ARN naissant avec l'ADN, et d'autre part les deux brins de l'ADN internucléosomique entre eux. Après déprotéinisation et relaxation, les micrographies obtenues en microscopie électronique dans des conditions dénaturantes permettent d'observer des filaments d'ARN, emplacements des

molécules d'ARN polymérase, attachés à des ADN circulaires. La plus grande partie de l'ADN de ces virus SV 40 forme des mailles (emplacement des "core particles") constituées d'ADN simple brin, reliées entre elles par des segments double brin (correspondant à l'ADN internucléosomique).

La polymérase se fixe sur l'ADN et initie la transcription seulement si l'ADN du promoteur n'est pas organisé en sous-unités (nucléosomes ou "core particles"). Une fois fixée, la polymérase est capable de déplacer les histones et de transcrire ainsi un ADN superenroulé en nucléosomes, ceux-ci se reformant après son passage (LORCH *et al.*, 1987).

III - 1 - 2. L'ADN DES ZONES TRANSCRITES.

ADN forme Z. Sites hypersensibles.

Au niveau de l'ADN, lors de l'activation des gènes, il y a souvent déméthylation de la 5-méthylcytosine en des sites spécifiques (voir revues : WEISBROD, 1982 ; ADAMS, 1990 ; DOERFLER *et al.*, 1990 ; SELKER, 1990). D'autre part, la présence de régions reconnues par des anticorps anti-ADN forme Z a été observée dans des noyaux de cellules de mammifère encapsulés dans des microbilles d'agarose en milieu isotonique (WITTIG *et al.*, 1989). Sachant que la méthylation de la cytosine stabilise la forme Z de l'ADN, une déméthylation peut entraîner un déroulement partiel de la double hélice. Ces modifications de la structure de l'ADN apporteraient une explication à la présence de sites hypersensibles aux nucléases situés en amont ou en aval des gènes transcritibles (voir revues : ELGIN, 1988 ; GROSS et GARRARD, 1988) (au niveau des sites hypersensibles l'ADN est environ cent fois plus hydrolysé que le reste du génome par les enzymes suivantes : DNase I, nucléase de staphylocoque, nucléase S1 spécifique de l'ADN simple brin). De plus l'ADN situé en amont ou dans la zone du site d'initiation de la transcription possède de façon intrinsèque un haut potentiel pour la formation d'une structure Z (SCHROTH *et al.*, 1992) ; lors de la transcription, cet ADN, situé à l'arrière de la polymérase, tend à être superenroulé négativement. Une autre explication à l'existence de ces sites serait la présence de protéines de régulation (EMERSON et FELSENFELD, 1984) capables de se fixer sur une séquence spécifique de l'ADN, empêchant ainsi la formation de nucléosomes et la protection qu'ils

apportent contre l'hydrolyse par les nucléases. L'ADN adjacent à ces sites serait couvert de "core particles" ou de nucléosomes dont la position sur l'ADN ne serait plus quelconque ("phasing") ; le positionnement des nucléosomes est affecté aussi par la séquence en bases de l'ADN (TRAVERS, 1987).

Contrainte de torsion et transcription.

L'ADN subit des contraintes de torsion en relation avec la transcription elle-même. Il est connu, depuis les travaux de RICHARDSON (1975) que le superenroulement affecte la transcription de nombreux gènes chez les procaryotes. Si l'ADN du minichromosome du virus SV40 (eucaryote) organisé en nucléosomes semble être relaxé (GERMOND *et al.*, 1975) l'ADN des zones transcrites qui a des propriétés différentes (sensibilité à la DNase I, nucléosomes modifiés ou en nombre restreint) pourrait exister sous la forme d'une hélice subissant des contraintes (LUCHNIK *et al.*, 1982 ; HARLAND *et al.*, 1983). Lors du déplacement de l'ARN polymérase il y a, comme on l'a vu ci-dessus, formation de supertours négatifs en amont, mais aussi formation de supertours positifs en aval. Les contraintes de torsion peuvent être relâchées, en des sites spécifiques de l'ADN, par la topoisomérase I, qui a été mise en évidence au niveau des zones transcrites (FLEICHMANN *et al.*, 1984 ; BUSK *et al.*, 1987). La topoisomérase II intervient aussi : les gènes activement transcrits sont attachés à la matrice nucléaire (CIEJEK *et al.*, 1983 ; COCKERILL et GARRARD, 1986) là où est localisée cette enzyme (BERRIOS *et al.*, 1985) de plus une unité de transcription correspond souvent à une boucle constitutive d'ADN. Dans le cas des gènes moins transcrits, lors de l'activation du gène ou d'une série de gènes, l'ADN correspondant à une unité de transcription s'unirait au réseau intranucléaire par l'intermédiaire de protéines se liant à des séquences de bases spécifiques, et formerait aussi une boucle dont l'état de superenroulement serait réglé, soit par une gyrase (à l'existence incertaine chez les eucaryotes) soit par le système nucléosome-topoisomérase (le départ d'un octamère d'histones provoque un superenroulement négatif de 1 tour) (voir ci-dessus II-3-2 ; revue : ECHOLS, 1990).

III - 1 - 3. LES PROTÉINES.

Les sous-unités nucléosomiques de la chromatine activement transcrite ou potentiellement transcribable ont, comme il a été vu (III. 1. 2) une conformation qui les rend sensibles à la DNase I pancréatique, ce phénomène étant indépendant de l'existence de zones hypersensibles. Cette sensibilité dépendrait du contenu protéique. Il peut y avoir, apparition de nouvelles protéines, disparition de certaines histones, modifications des histones présentes ou de leur arrangement.

Présence de protéines HMG et d'ubiquitine, déficience en histone H1.

Les protéines HGM 14 et 17 ont été impliquées dans la sensibilité à la DNase I (WEISBROD et WEINTRAUB, 1979 ; WEISBROD *et al.*, 1980). Le nucléosome et la "core particle" contiennent deux sites situés près des extrémités de l'ADN, capables de fixer indistinctement l'une ou l'autre de ces protéines (ALBRIGHT *et al.*, 1980 ; SANDEEN *et al.*, 1980 ; MARDIAN *et al.*, 1980). Une digestion de la chromatine par la nucléase de staphylocoque fournit, en plus des nucléosomes et des "core particles", des particules subnucléosomiques composées d'ADN et de protéines HMG. Ceci suggère que ces protéines peuvent s'associer à l'ADN internucléosomique. LEVY-WILSON *et al.* (1979a) par action douce de la nucléase de staphylocoque sur des noyaux de cellules de testicule de truite, ont obtenu une fraction enrichie en gènes actifs et en protéine HMG T (analogue à HMG 1 et 2) en protéine H6 (analogue à HMG 14 et 17) et en ubiquitine, mais déficiente en histone H1. Ce déficit en histone H1 est retrouvé dans les gènes actifs de chaînes légères d'immunoglobulines présentant une structure nucléosomique perturbée (ROSE et GARRARD, 1984). La déficience en histone H1 rendrait la chromatine sensible aux nucléases par la décondensation qu'elle provoque. R. D. SMITH *et al.* (1984) sont parvenus à rendre sensible à la DNase I le gène embryonnaire, non exprimé, de cellules érythroleucémiques de souris, en utilisant des conditions susceptibles de dérouler la fibre de 30 nm (faible force ionique, extraction de H1).

Modification de l'organisation des "core histones".

Les sous-unités capables de lier l'ARN polymérase II seraient l'objet d'un remaniement structural (figure III. 1) accompagné de la perte d'un dimère H2A-H2B (BAER et RHODES, 1983). La sous-unités pourrait aussi perdre deux dimères H2A-H2B ou se

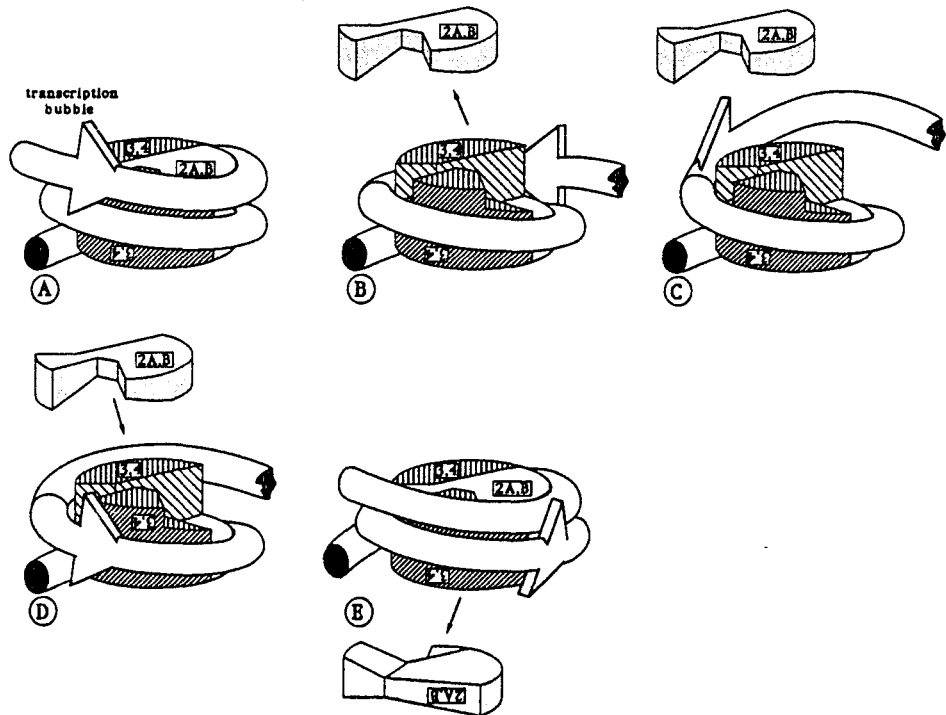


Figure III. 1 : Un modèle de transcription à travers le nucléosome (VAN HOLDE, 1992).

2. A. B. : Dimère H2A-H2B

3. 4 : Dimère H3-H4

Pointe de flèche : position de l'ARN polymérase.

A, B et C : La polymérase déplace un dimère H2A-H2B et transcrit le premier supertour d'ADN.

D et E : Elle déplace ensuite le second dimère et transcrit le second supertour, pendant que le premier dimère se refixe.

scinder en deux demi-"core particles" formées chacune d'un hétérotétramère H2A-H2B-H3-H4 et d'ADN (PRIOR *et al.*, 1983 ; RYOJI et WORCEL, 1985).

En plus, d'autres propriétés de la "core particle" des zones transcrites correspondent à une structure plus ouverte (voir revues : VAN HOLDE *et al.*, 1992 ; THOMA, 1991 ; MORSE, 1992) : la cystéine 110 de l'histone H3 devient accessible aux atomes de mercure fixés à du sépharose (PRIOR, *et al.*, 1983) ; avec les réactifs de pontage protéine-ADN le nombre d'histidines liées à l'ADN diminue de façon significative, alors que le nombre de liaisons lysine-ADN est peu modifié (NACHEVA *et al.*, 1989) ; certains gènes actifs soumis à l'action de nucléases sont clivés près de l'axe de dyade du nucléosome (ex : LEE et GARRARD, 1991). Une des causes de ces changements semble être le superenroulement positif devant l'ARN polymérase, celui-ci peut contribuer, soit à ouvrir le nucléosome (figure III. 2) soit à dissocier l'ADN de l'octamère (figure III. 3). Le superenroulement négatif laissé par le passage de l'enzyme doit lui, favoriser le réarrangement des histones en nucléosomes stables ; toutefois, selon LEE et GARRARD (1991) la structure ouverte du nucléosome subsisterait après le passage de la polymérase.

III - 1 - 4. MODIFICATIONS DES HISTONES.

Parmi les modifications des histones, il semble que seules l'acétylation et l'ubiquitination soient impliquées dans la transcription (revues : CSORDAS, 1990 ; PFEFFER et VIDALI, 1991 ; TURNER, 1991 ; BRADBURY, 1992).

Acétylation. Deux organismes permettent d'étudier de façon élégante la relation entre acétylation et transcription :

- Le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* possède deux noyaux : un micronoyau transcriptionnellement inactif qui se divise par mitose et un macronoyau, siège de la transcription, qui se divise sans mitose. Contrairement aux histones du micronoyau, les histones du macronoyau sont trouvées acétylées (H2A, H2B, H3, H4) ou phosphorylées (H2A, H1) (VAVRA *et al.*, 1982).

- Dans le macroplasmode de *Physarum polycephalum* (myxomycète) les divisions des noyaux se produisent de façon synchrone. Les histones H2A et H2B incorporent de la radioactivité (marquage par l'acétate tritié) seulement si la biosynthèse des histones a lieu

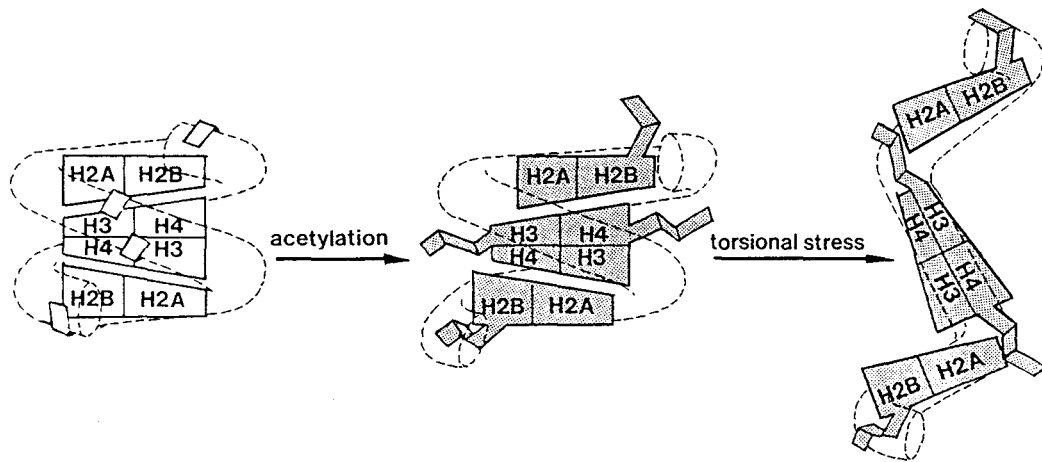


Figure III. 2 : Déplieement possible du nucléosome lors de l'activation de la chromatine (AUSIO, 1992). Après acétylation des histones, le nucléosome adopte une structure partiellement relâchée, qui sous l'action d'une contrainte de torsion se déploie.

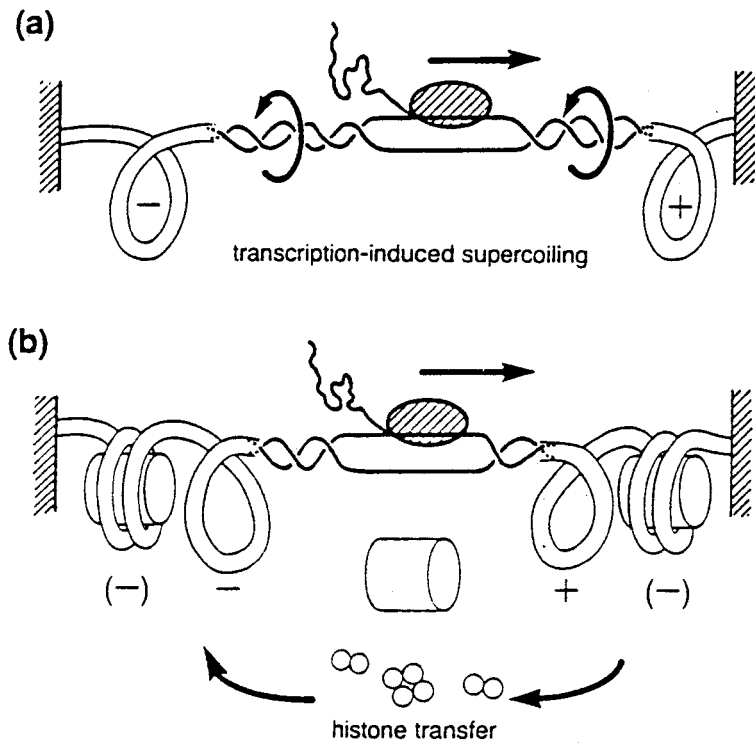


Figure III. 3 : Dissociation de l'ADN de l'octamère (THOMA, 1991).

a : Un déplacement de la polymérase (ellipse hachurée) et de l'ARN naissant, d'environ 10 paires de bases le long de l'ADN, crée un supertour positif devant et un supertour négatif derrière la polymérase.

b : Ces supertours facilitent le transfert des histones de l'avant à l'arrière de la polymérase. L'octamère peut soit être transféré en bloc (cylindre) soit sous formes des complexes H2A-H2B et (H3-H4)₂ (petits cercles).

(c'est-à-dire en phase S). Les histones H3 et H4 sont acétylées et désacétylées activement en dehors des périodes de biosynthèse d'histones. La transcription serait donc couplée à l'acétylation des seules histones H3 et H4 (MATTHEWS et WATERBORG, 1985).

Dès 1964, ALLFREY et collaborateurs avaient suggéré que l'acétylation était impliquée dans la régulation de la transcription. Par action de la nucléase de staphylocoque ou de la DNase II, DAVIE et CANDIDO (1978) LEVY-WILSON *et al.* (1979b) et NELSON *et al.* (1980) ont obtenu des fractions à la fois enrichies en séquences transcrites et en histones acétylées.

La découverte par RIGGS *et al.* (1977) de l'existence d'une hyperacétylation des histones dans les cellules HeLa et dans les cellules de leucémie érythroblastique de Friend, cultivées en présence de butyrate, inhibiteur de désacétylases (BOFFA *et al.*, 1978) a amené toute une série d'études concernant l'influence de l'acétylation des histones. L'utilisation de chromatine hyperacétylée obtenue en milieu butyrate comme modèle pour l'étude de la chromatine activement transcrite se justifie par le fait que ce sont les niveaux élevés d'acétylation qui semblent être impliqués dans la transcription (voir aussi ci-dessous III. 3. 1).

Lorsque la DNase I, qui est connue pour hydrolyser la chromatine active plus rapidement que la chromatine inactive, est utilisée pour hydrolyser les noyaux de cellules traitées au butyrate, elle libère une fraction qui est enrichie en histones acétylées (VIDALI *et al.*, 1978) ; de plus, elle hydrolyse, dans la "core particle", les sites situés à 60 nucléotides des extrémités de l'ADN.

La nucléase de staphylocoque digère elle aussi plus rapidement la chromatine acétylée et semble avoir une forte action exonucléasique sur les extrémités de l'ADN des "core particles" acétylées.

En résumé, les sites situés à 30, 80 et 110 nucléotides des extrémités restent protégés ; par contre les sites situés à 0, 60 et 140 nucléotides deviennent plus sensibles à l'attaque des nucléases (SIMPSON, 1978b).

Lorsque la "core particule" renferme 10 résidus d' ϵ -N-acétyllysine elle migre plus lentement en électrophorèse en gel non dénaturant. Ce ralentissement serait dû à une ouverture de la "core particle" (BODE *et al.*, 1983 ; MARVIN *et al.*, 1990) qui en

microscopie électronique apparaît partiellement ou complètement déployée avec un diamètre de 25 nm (BERTRAND *et al.*, 1984).

Par contre, en solution (voir revue : OLIVA *et al.*, 1990) la "core particle" hyperacétylée présente peu de caractéristiques spécifiques lorsqu'elle est étudiée par les méthodes biophysiques, telles que l'ultracentrifugation, le dichroïsme circulaire, la dénaturation thermique (SIMPSON, 1978b) et la diffusion des neutrons (IMAI *et al.*, 1986). Ceci a amené ces deux équipes à penser que l'acétylation affecte principalement les interactions entre sous-unités et doit être impliquée dans la déstabilisation de la superhélice de nucléosomes de 30 nm. L'acétylation peut aussi agir en diminuant l'aptitude des histones de types H1 à organiser les nucléosomes en fibre de 30 nm (RIDS DALE *et al.*, 1990). Ces travaux demandent à être confirmés : la chromatine acétylée peut présenter une structure en fibre de 30 nm (McGHEE *et al.*, 1983b ; DIMITROV *et al.*, 1986). L'acétylation agissant seule n'est donc pas suffisante pour induire une conformation active de la chromatine.

L'utilisation d'anticorps anti-acétyllysine a permis d'établir que dès l'activation des gènes leurs histones sont hyperacétylées (PFEFFER *et al.*, 1988). L'état d'hyperacétylation se poursuit durant toute la transcription (HEBBES *et al.*, 1988).

Selon NORTON *et al.* (1989) l'hyperacétylation diminue le superenroulement dû à la formation du nucléosome (il passe de -1,04 à -0,82 tour par nucléosome *in vitro*). L'acétylation a ainsi une action de gyrase, en tenant compte de la présence des topoisomérases et du fait que dans la transcription l'acétylation a un renouvellement rapide, ceci peut induire la torsion ou la détorsion de l'ADN de plusieurs tours. Ce raisonnement suppose toutefois que la variation du superenroulement due à l'acétylation existe aussi *in vivo*, ce qui n'a pas été retrouvé par LUTTER *et al.* (1992).

L'acétylation pourrait en plus avoir un effet direct sur l'initiation de la transcription en modulant l'interaction de protéines spécifiques avec les histones du nucléosome ; ceci est suggéré par la répression ou la dérpression de certains gènes de la levure observée après mutation de l'extrémité amino-terminale de l'histone H3 ou de l'histone H4 (GRUNSTEIN, 1992).

La caractérisation de plusieurs schémas d'utilisation des sites d'acétylation est en faveur de l'existence de plusieurs fonctions pour cette modification (voir revue : TURNER, 1993)

Ubiquitination. Une autre modification postsynthétique supposée être impliquée dans la transcription est l'ubiquitination des histones H2A et H2B. Il semble que l'ubiquitination des histones empêche la formation de la fibre de 30 nm, en tous cas l'histone H2A ubiquitinée n'est pas présente dans le chromosome métaphasique. La présence de sites hypersensibles en amont (surtout) et en aval des gènes transcritibles permet d'obtenir, par action douce d'une nucléase, des chaînons de nucléosomes, qui par hybridation avec des sondes convenables, se révèlent être enrichis en gènes transcrits. Par cette méthode, RIDSDALE et DAVIE (1987) et NICKEL *et al.* (1989) ont préparé une fraction de polynucléosomes, contenant le gène de la β -globine, à partir d'érythrocytes matures de poulet (cellules qui expriment cet ADN). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu acide acétique-urée et triton X100, des protéines isolées de ces polynucléosomes, montre une hyperacétylation des histones H4, H2A Z et H2B, un enrichissement en histones H2A Z et H3.3, un appauvrissement en histones H1 et H5 et un enrichissement en histones H2A, H2A Z et surtout en H2B mono- et polyubiquitinées.

III - 1 - 5. CONCLUSION.

La transcription nécessite un ensemble de phénomènes dynamiques conduisant à la décondensation de la fibre de 30 nm et à la formation d'ARN. Il apparaît bien que l'ARN polymérase II transcrit à partir d'un ADN couvert de "core histones" (revue : ZLATANOVA et VAN HOLDE, 1992). Par contre la transcription ne peut pas être initiée si le promoteur est occupé par un octamère d'histones (LORCH *et al.*, 1987). Les zones transcrites contiennent moins d'histone H1 que l'hétérochromatine. L'histone H1, associée aux "core histones" a ainsi un rôle de répresseur général de la transcription. Ce rôle de répresseur pourrait être levé par certains facteurs de transcription (LAYBOURN et KADONAGA, 1991). Les histones sont aussi un des éléments impliqués dans la régulation de la transcription chez les eucaryotes (voir revues : GRUNSTEIN, 1990, 1992 ;

FELSENFELD, 1992). L'unité de transcription correspondrait à la boucle d'ADN limitée par les séquences SAR (ou MAR).

La plupart des mécanismes évoqués dans les pages ci-dessus sont bien argumentés, d'autres, tels que l'existence de contraintes de torsion et l'attachement de l'ARN polymérase au réseau intranucléaire, pourraient avoir un rôle important, mais restent encore partiellement hypothétiques en raison des difficultés de leur étude. Par exemple, l'obtention d'une chromatine suffisamment décondensée pour pouvoir être observée nécessite souvent l'emploi d'une nucléase, qui par une seule coupure d'un seul brin d'ADN d'une boucle, supprime tout couple appliqué à celle-ci.

Citons quelques arguments en faveur de l'attachement de la polymérase à la matrice nucléaire :

- Les protéines HMG 14 et 17 présentes au niveau des zones transcrites sont capables de s'attacher à la matrice du noyau lorsqu'elles sont glycosylées (REEVES et CHANG, 1983).
- Après un marquage court par l'uridine tritiée, suivi d'une autoradiographie observée en microscopie électronique, la plupart des grains d'argent apparaissent au niveau du réseau intranucléaire. La biosynthèse de l'ARN est donc bien localisée à ce niveau.
- L'ARN polymérase ne peut être solubilisée et extraite, qu'en faible proportion, ceci malgré l'emploi de la sonication ou d'une incubation avec des ions Mg^{2+} .
- La polymérase extraite est relativement peu active.
- Selon les cellules et leur état de croissance, l'ADN trouvé attaché au réseau interne peut contenir jusque 50 % de séquences transcrites.

Ces considérations ont amené D. A. JACKSON *et al.* (1981, 1984) (voir aussi revue : COOK, 1989) à proposer un modèle dans lequel l'ADN, mobile, est transcrit par un complexe de transcription attaché au réseau nucléaire interne. L'ARN nouvellement formé, qui a également son extrémité 5' attachée à ces structures forme une boucle. Ce modèle qui souligne l'importance de la matrice du noyau dans le processus de transcription nécessite aussi la décondensation de la chromatine et n'exclut pas l'importance des diverses modifications observées dans la chromatine active.

III - 2. LA RÉPLICATION (revues : THÖMMES et HÜBSCHER, 1990 ; SO et DOWNEY, 1992 ; GRUSS et SOGO, 1992).

III - 2 - 1. LOCALISATION DE LA RÉPLICATION.

La réplication de l'ADN des eucaryotes semble se localiser au niveau, ou du moins à proximité, des points d'ancrage des boucles d'ADN au réseau intranucléaire (figure II. 13, ci-dessus page 55). C'est en effet dans ces structures qu'après un marquage court par la thymidine tritiée, est retrouvée la radioactivité correspondant à l'ADN néosynthétisé (SMITH, H. C. *et al.*, 1984) et qu'ont été localisées, à l'aide d'anticorps spécifiques, la polymérase α et la topoisomérase II, enzymes impliquées dans la duplication de l'ADN du génome (BENSCH *et al.*, 1982 ; BERRIOS *et al.*, 1985).

Pour VOGELSTEIN *et al.* (1980) la boucle entière constituerait l'unité élémentaire de réplication. Pour McCREADY *et al.* (1980) cette boucle s'attacherait au réseau par un petit nombre de séquences spécifiques pour former des boucles plus petites appelées réplicons. Lors de la réplication proprement dite, la boucle d'ADN parental traverserait le complexe de réplication, fixé (ou venu se fixer) au point d'attache ADN-réseau, en formant de l'autre côté du système deux boucles d'ADN répliqué. Chez la levure des séquences courtes d'ADN appelées ARS ("autonomously replicating sequences" ; revue : DIFFLEY et STILLMAN, 1990) permettent aux plasmides qui les contiennent de se répliquer ; ces mêmes séquences dans la chromatine du chromosome sont des origines de réplication. Les séquences d'ADN qui bordent ces séquences ARS correspondent à des sites d'attachement de l'ADN à la matrice nucléaire. Chez les eucaryotes supérieurs des sites d'initiation de la réplication peuvent correspondre aussi à des sites d'attachement à la matrice (MAR) (RAZIN *et al.*, 1986 ; DIJKWEL et HAMLIN, 1988). D'autres sites d'initiation de la réplication seraient attachés à la matrice nucléaire seulement lors de l'initiation de la réplication (MAH *et al.*, 1993).

Toutes ces données expérimentales sont en accord avec une réplication qui se ferait au niveau de la matrice nucléaire (revue : COOK, 1991). Les sites de synthèse de l'ADN ne sont pas dispersés dans le noyau mais groupés en une ou deux centaines de centres (granules) de réplication contenant chacun une vingtaine d'unités de réplifications

(ex : HÓZAK et HASSAN, 1993). La figure III. 4 présente un schéma de complexe multiprotéique (réplisome) agissant au niveau d'une fourche de réplication (TSURIMOTO et STILLMAN, 1989) ; il s'agit d'un modèle théorique tenant compte des propriétés respectives des polymérase α et δ et des principes de base de la réplication (THÖMMES et HÜBSHER, 1990).

III - 2 - 2. NUCLÉOSOME ET RÉPLICATION.

L'histone H1 est dissociée de l'ADN avant le passage de la fourche de réplication (D'ANNA et PRENTICE, 1983). Les "core histones" parentales restent avec le brin précoce, celui-ci semblant d'ailleurs être le brin qui code pour l'ARN messager (LEFFAK *et al.*, 1977 ; SEIDMAN et LEVINE, 1979). Quant aux histones néosynthétisées, elles se fixent sur le brin tardif. La ségrégation des histones parentales sur le brin précoce pourrait se limiter au tétramère (H3-H4)₂ (YAMASU et SENSU, 1990). L'association de l'octamère parental avec l'un (ou l'autre brin) peut correspondre à une duplication de l'ADN en présence de l'octamère, la structure de la "core particle" se modifiant pour laisser passer la fourche de réplication (BONNE-ANDREA *et al.*, 1990).

Lors de la réplication de la chromatine active, la répartition des histones se fait avec moins de sélectivité. L'équipe de LEFFAK (LEFFAK *et al.*, 1977) qui a mis en évidence une distribution conservative des octamères d'histones lors de la réplication, a obtenu, lors de l'étude de la réplication des zones transcrites, des nucléosomes hybrides composés d'anciennes et de nouvelles histones (KUMAR et LEFFAK, 1986).

Les schémas de distribution des "core histones" présentés ci-dessus n'ont pas été retrouvés par tous les investigateurs.

RUSSEV et HANCOCK (1982) trouvent les nouvelles histones (parfois mêlées aux anciennes dans le même nucléosome) et les anciennes histones, à la fois sur les deux doubles brins néorépliqués.

Pour V. JACKSON (1987 a et b, 1990) les histones sont dissociées de l'ADN lors de l'avancement de la fourche de réplication et relâchées sous forme de dimères H2A-H2B et de tétramères (H3-H4)₂. Les histones néosynthétisées existent aussi dans le noyau sous forme de complexes H2A-H2B et (H3-H4)₂ (complexes vraisemblablement formés dans le

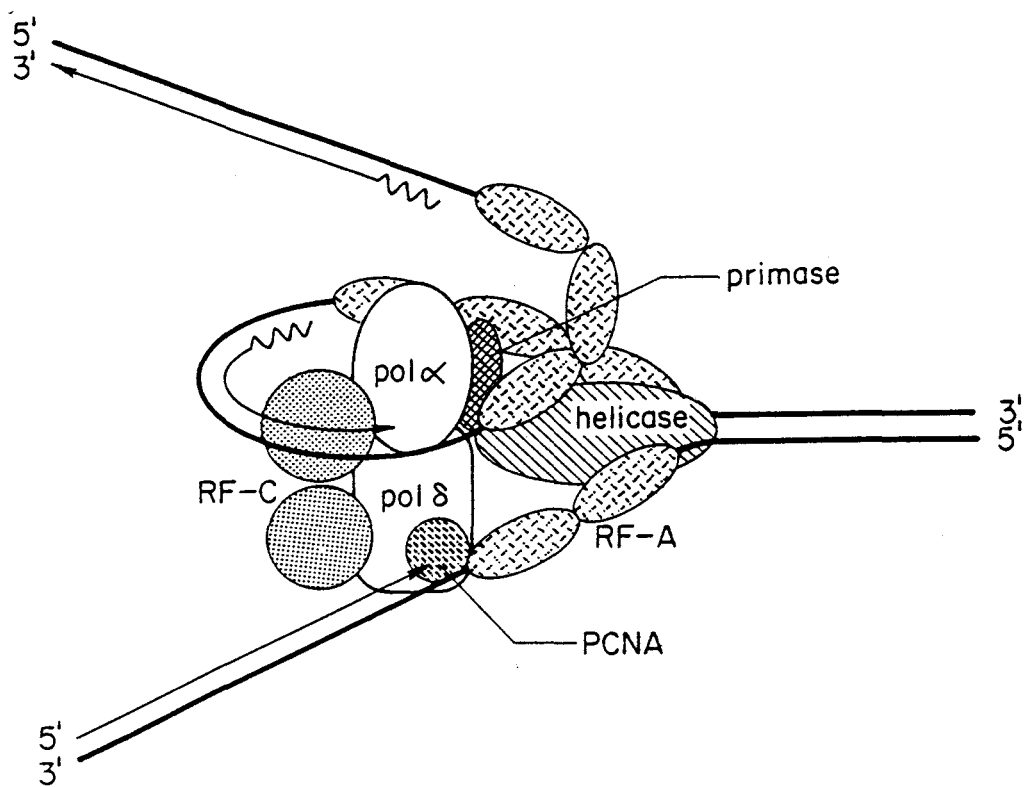


Figure III. 4 : Modèle eucaryote de complexe de réplication au niveau d'une fourche d'ADN (TSURIMOTO et STILLMAN, 1989).

RF-A, PCNA, RF-C : facteurs de réplication.

La polymérase α synthétise le brin tardif. La polymérase δ synthétise le brin précoce.

cytoplasme). Tous ces complexes se fixent sur l'ADN du noyau sans échanger leur matériel. La presque totalité des histones H3 et H4 et 30% des histones H2A et H2B néosynthétisées se fixent sur l'ADN nouvellement répliqué. La relativement faible proportion d'histones H2A et H2B nouvelles, fixées sur l'ADN nouveau, s'expliquerait par la présence d'un volant d'histones H2A et H2B en relation avec la transcription. Ce modèle n'exclut pas une fixation successive du complexe H3-H4, des dimères H2A-H2B et de l'histone H1 (WORCEL *et al.*, 1978) ; cette formation du nucléosome par étapes expliquerait la sensibilité pendant 10-20 minutes aux nucléases de la chromatine naissante (ANNUNZIATO et SEALE, 1982 ; CUSICK *et al.*, 1983).

La technique de pontage par le psoralène suivie de l'examen en microscopie électronique appliquée à l'ADN de *S.V. 40* en cours de réplication fournit des images en accord avec une absence d'histones ou à un faible attachement de celles-ci au niveau de la fourche de réplication et à la formation de façon transitoire de particules subnucléosomiques sur les brins néoformés (GRUSS *et al.*, 1993).

III - 2 - 3. LES MODIFICATIONS RÉVERSIBLES DES HISTONES LORS DE LA RÉPLICATION ET LORS DE LA MITOSE.

Deux types de modifications réversibles d'histones, l'acétylation et la phosphorylation, peuvent être mis en évidence lors des processus de réplication et de mitose.

L'acétylation liée à la réplication se distingue de l'acétylation liée à la transcription en ce qu'elle concerne ici les quatre histones, H2A, H2B, H3, H4, qui seront acétylées sur une ou deux lysines, alors que dans la transcription, seules les histones H3 et H4 sont acétylées, mais à des taux plus élevés (trois ou quatre lysines acétylées par molécule d'histone).

Les histones nouvellement synthétisées sont acétylées dans le cytoplasme par une acétylase de type B (GARCEA et ALBERTS, 1980) puis désacétylées lors de la formation des nucléosomes, ou peu après.

Pour des raisons techniques, ce processus a été surtout étudié dans le cas de l'histone H4. L'histone H4 est d'abord mono- ou diacétylée dans le cytoplasme et entrerait dans le noyau ainsi modifiée. Selon PESIS et MATTHEWS (1986) dans le plasmode de *Physarum polycephalum* la lysine 5 est soumise à un processus d'acétylation-désacétylation. L'histone

H4 nouvellement synthétisée, acétylée sur la lysine 5 est incorporée dans le nucléosome immature, puis désacétylée. La lysine 5 deviendrait alors inaccessible aux acétylases dans la chromatine non répliquée. Chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* l'histone H4 est acétylée sur les lysines 4 et 11 avant sa déposition sur l'ADN (lors de la transcription, les sites d'acétylation sont les lysines 4 et 7) (CHICOINE *et al.*, 1986). Dans les cellules en division de testicule de truite, cette diacétylation initiale rapide, est suivie d'une acétylation plus lente qui porte le nombre de résidus d' ϵ -N-acétyllysine à trois puis à quatre (LOUIE et DIXON, 1972).

Il n'a pas été établi, si dans le cas général, les histones parentales, situées au voisinage de la fourche de réplication, deviennent elles aussi modifiées. LOIDL et GRÖBNER (1987) par double marquage, lysine ^3H et acétate ^{14}C , obtiennent une incorporation de ^{14}C essentiellement sur les histones préexistantes (non marquées par ^3H). L'acétylation agirait ainsi sur les nucléosomes préexistants et les destabiliserait pour permettre la réplication. Ces histones resteraient acétylées jusque leur redéposition ou au plus tard jusque la métaphase. Il apparaît ainsi que s'il existe bien une acétylation liée à la réplication, il n'y a pas consensus sur la phase initiale d'acétylation. A cette acétylation pourrait s'ajouter une poly(ADP-ribosylation) résultant de l'activation de l'enzyme correspondante par les extrémités libres des segments d'OKAZAKI (BOULIKAS, 1990).

Lors de l'utilisation du butyrate, qui inhibe l'action des désacétylases, le maintien des groupes acétyle sur les résidus de lysines des histones nouvellement déposées sur l'ADN, altère peu la structure des "core particles" et n'empêche, ni l'établissement de l'espacement normal des nucléosomes, ni l'établissement de la résistance à la digestion par la nucléase de staphylocoque. La désacétylation des histones n'est donc pas un préalable à une organisation en nucléosomes (ANNUNZIATO et SEALE, 1983). Dans ces conditions les régions nouvellement répliquées restent néanmoins sensibles à la DNase I, ce qui s'explique si l'acétylation des "core histones" change la capacité qu'a l'histone H1 à induire la structure d'ordre supérieur (RIDS DALE *et al.*, 1990) peut être en perturbant la fixation de cette histone sur la "core particle" (PERRY et ANNUNZIATO, 1989). La question reste, de savoir si cette sensibilité résulte de la modification des nucléosomes par-elle même, ou si elle persiste par le biais d'une absence de formation de la fibre de 30 nm. Quel qu'en soit le

mécanisme, la maturation de la chromatine et l'organisation de la résistance à la DNase I nécessite la désacétylation.

Dans l'érythroblaste de poulet, l'histone H4 cytoplasmique apparaît essentiellement à la fois monoacétylée et monophosphorylée. Dans le noyau, après fixation sur l'ADN, elle est déphosphorylée et désacétylée (RUIZ-CARRILLO *et al.*, 1975).

Dans la culture de cellules d'hépatome en division, l'histone H4 est d'abord diacétylée mais n'est pas phosphorylée, par contre les histones H2A et H1 sont concernées par cette dernière modification. Ces deux histones sont les seules à être phosphorylées en phase S. L'histone H2A néosynthétisée sera phosphorylée jusqu'à atteindre le taux de modification des histones parentales. L'histone H1 deviendra hyperphosphorylée à la fin de la phase G2 (JACKSON, V. *et al.*, 1976). A la fois l'histone H1 néosynthétisée et l'histone H1 parentale seront modifiées. Cette phosphorylation semble être en relation avec la séparation et la condensation prémitotique des chromatides (MARKS *et al.*, 1973).

Dans les cultures de cellules CHO ("chinese hamster ovary cells") les phénomènes de phosphorylation de l'histone H1 se succèdent dans le temps (GURLEY *et al.*, 1975) (figure III. 5) :

- Le 1er phénomène F1G1 commence 2 heures avant l'entrée en phase S et est impliqué dans les changements de la structure de la chromatine nécessaire à la prolifération des cellules.
- Le 2ème phénomène F1S, quantitativement deux fois plus important que le précédent, commence avec l'initiation de la synthèse de l'ADN et est impliqué dans la réplication.
- Le 3ème phénomène F1M amènera un doublement ou un triplement du nombre de résidus phosphorylés, le nombre de résidus sérine ou thréonine modifiés pourra atteindre sept par molécule d'histone (AJIRO *et al.*, 1981) ; il semble concerner des points d'interaction entre l'histone et l'ADN, il aura lieu simultanément avec la phosphorylation de l'histone H3 (qui n'est pas phosphorylée en phases G1, S ou G2). L'enzyme qui phosphoryle l'histone H1 doit être, d'après ses propriétés *in vitro*, le MPF ("maturation promoting factor"). Le MPF correspond à une sous-unité catalytique, la protéine p34^{cdc2} (masse molaire 34000, produit du gène *cdc2* chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*) activée par une cycline B. Le MPF phosphoryle aussi nombre d'autres protéines, dont des protéines associées aux

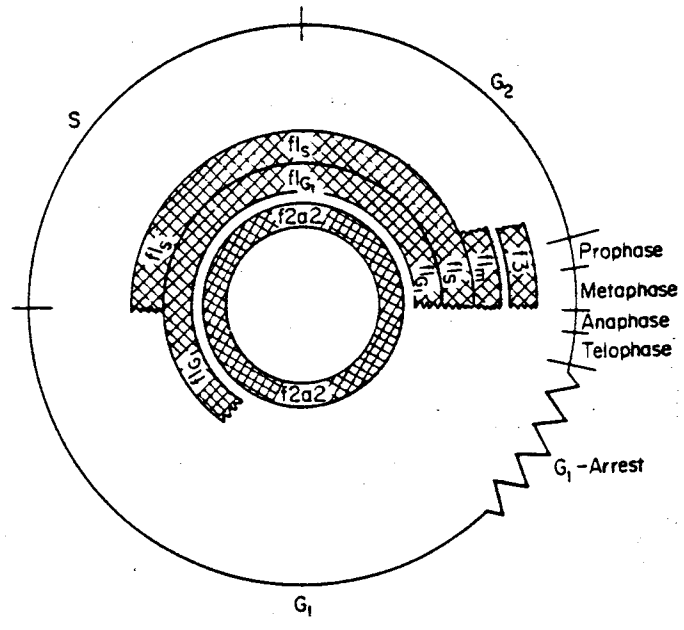


Figure III. 5 : Phosphorylation des histones au cours du cycle cellulaire dans les cellules CHO ("chinese hamster ovary cells") (GURLEY *et al.*, 1975). Les zones hachurées correspondent aux périodes durant lesquelles les histones sont phosphorylées.
-f2a2 : phosphorylation de l'histone H2A.
-f1_m, f1_S, f1_{G1} : phosphorylations de l'histone H1 qui commencent lors de la mitose, lors de la phase S et lors de la phase G1, respectivement.
-f3 : phosphorylation de l'histone H3.

microtubules et les lamines, ceci permet la condensation et la séparation des chromosomes (NURSE, 1990 ; revue : MURRAY et KIRSCHNER, 1991) et la solubilisation de la lamina. A noter que cette enzyme ne doit pas phosphoryler les "core histones", vu que celles-ci ne contiennent pas de séquences SP ou TP, sites d'action de la kinase p34^{cdc2}. L'histone H3 pourrait être phosphorylée par une kinase calcium/calmoduline dépendante (WAKIM *et al.*, 1990) ; ainsi, bien que l'histone H3 soit, à notre échelle d'observation, phosphorylée en même temps que l'histone H1, la phosphorylation de l'histone H3 dépend d'un autre système de régulation. Les conséquences de la phosphorylation dépendent aussi de l'histone : le rôle de la phosphorylation de H1 a été entrevu ci-dessus, la phosphorylation de l'histone H3 stabilise la "core particle", la phosphorylation de l'histone H2A augmente la longueur de l'ADN internucléosomique (BANERJEE *et al.*, 1991).

Les histones H1 et H3 seront déphosphorylées rapidement à la fin de la mitose et au début de la phase G1.

La figure III. 6 résume les modifications des histones et les principales transitions de structure subies par la chromatine lors des processus, de réplication, de division cellulaire et de transcription.

III - 3. AUTRES PHÉNOMÈNES IMPLIQUANT DES MODIFICATIONS D'HISTONES.

Des processus divers, tels que la surveillance et la réparation de l'ADN ou la spermiogenèse conduisent à des modifications des histones et mènent dans les spermatozoïdes à leur remplacement par des protamines.

Nous ne considérerons ici que le devenir des histones dans ces phénomènes.

III - 3 - 1. SURVEILLANCE DE L'ADN.

Les cellules d'hépatome en culture (HTC) possèdent deux types différents de processus d'acétylation-désacétylation (COVAULT et CHALKLEY, 1980) :

- Un processus rapide impliquant 10 à 15 % des histones, mis en évidence après une action courte (10 mn) du butyrate.

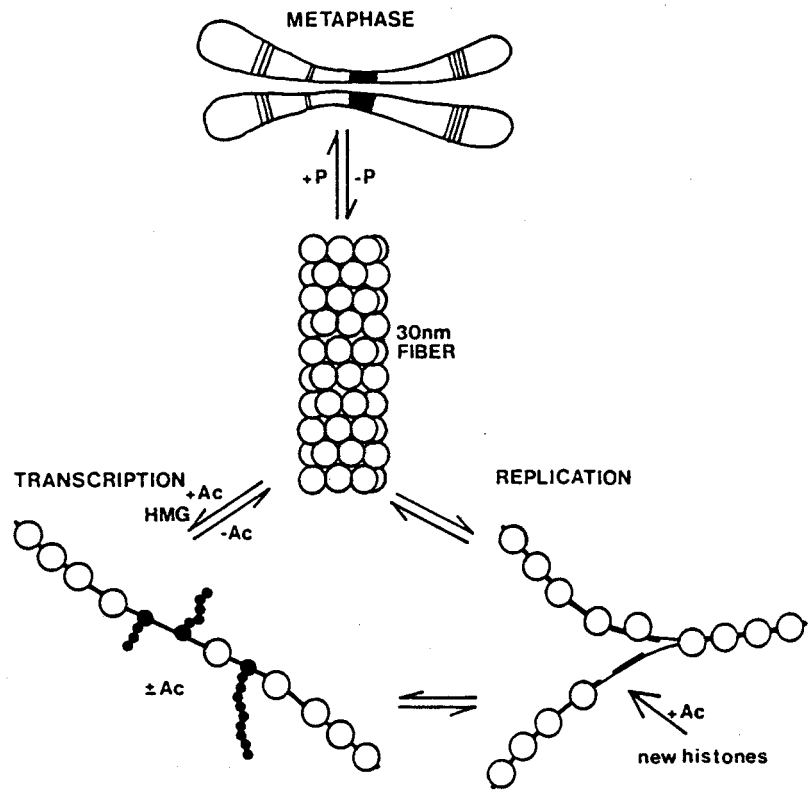


Figure III. 6 : Modifications des histones lors des processus de réplication, de division cellulaire et de transcription (MATTHEWS et WATERBORG, 1985).

- Un processus lent concernant le reste des histones susceptibles d'être acétylées, environ 25 % des histones, mis en évidence après une action longue du butyrate (2 heures).

L'extraction par les solutions de force ionique croissante, des noyaux soumis à l'action douce de la nucléase de staphylocoque (méthode de SANDERS, 1978) permet de séparer les chaînons de nucléosomes obtenus, selon leur contenu en histones acétylées (les chaînons les plus acétylés sont solubles aux forces ioniques les plus faibles). Tant après action courte, qu'après action longue du butyrate sur les cellules HTC, l'ADN des polynucleosomes acétylés n'est pas enrichi en séquences transcrites. Dans le cas de la cinétique rapide, les polynucleosomes sont formés de nucléosomes contigus fortement acétylés. Dans les expériences ci-dessus, PERRY ET CHALKLEY (1982) ont bloqué la synthèse des protéines par la cycloheximide. L'acétylation ne peut donc pas être due, non plus, à la présence d'histones néosynthétisées. Les auteurs suggèrent que les phénomènes d'acétylation et de désacétylation permettent l'exposition séquentielle du génome entier aux enzymes (de réplication, transcription, réparation...) et aux autres facteurs. Il n'a pas été établi si ces polynucleosomes sont localisés dans un grand domaine couvrant 10 % du génome ou dans plusieurs petits domaines.

L'utilisation en immunofluorescence d'anticorps anti-histones H4 acétylées ou non, fournit des arguments en faveur de cette dernière hypothèse, une partie des îlots marqués pourrait correspondre aux zones flanquant les gènes transcrits ou susceptible de l'être ; quant aux sous-unités des gènes transcrits, elles contiendraient de l'histone H4 nonacétylée (TURNER *et al.*, 1990). D'autres zones acétylées pourraient, en dehors de la période de réplication, être impliquées dans la réparation de l'ADN et dans la différenciation, le dénominateur commun étant une destabilisation transitoire de la structure nucléosomique.

Le rôle de l'acétylation dans l'accessibilité de l'ADN est à rapprocher des résultats obtenus par les chercheurs du groupe de SMULSON, qui par fractionnement de la chromatine traitée par la nucléase de staphylocoque ou par la DNAase I, sur colonne de Sephadex anti-poly(ADP-ribose) ont établi une relation topologique entre acétylation et ADP-ribosylation des histones (MALIK et SMULSON, 1984 ; HOUGH et SMULSON, 1984). La poly(ADP-ribosylation) des protéines nucléaires concerne la poly(ADP-ribose) polymérase elle-même, les histones, la ligase, les topoisomérases I et II, des protéines

HMG, des protéines de la matrice nucléaire ; la réaction est activée par les coupures simple brin et double brin de l'ADN. Ce processus est impliqué dans la réplication, la différenciation, la recombinaison et la réparation de l'ADN. La poly(ADP-ribosylation) de l'histone H1 provoquerait la décondensation de la chromatine (revues : DE MURCIA *et al.*, 1988 ; BOULIKAS, 1991). L'automodification de l'enzyme est entre autre liée à la réparation de l'ADN. REALINI et ALTHAUS (1992) ont proposé dans ce cas un mécanisme d'action : les chaînes de poly(ADP-ribose) liées de manière covalente à l'enzyme captent les histones et les dissocieraient de l'ADN. Après l'action d'un complexe de réparation de l'ADN les polymères d'ADP-ribose seraient dégradés par la poly(ADP-ribose)glycohydrolase, les histones regagneraient alors l'ADN.

III - 3 - 2. SPERMIOGENÈSE.

Chez de nombreuses espèces lors de la spermiogenèse (l'étape haploïde de la spermatogenèse) les histones sont remplacées, directement ou non, par des protéines plus petites, très riches en arginine, les protamines. De plus, chez les mammifères notamment, les protamines peuvent contenir de nombreux résidus cystéines (10 à 20 %) qui, par formation de ponts disulfure intermoléculaires, augmentent la résistance de l'ensemble. L'hypercondensation obtenue est telle que le volume du noyau d'un spermatozoïde de mammifère, par exemple le taureau, ne représente que 5% du volume du noyau d'une cellule somatique. Malgré ceci, certaines caractéristiques fondamentales du noyau interphasique et du chromosome métaphasique existent toujours, telles que l'arrangement non quelconque de l'ADN (POWELL *et al.*, 1990) et la présence de la topoisomérase II (ROCA et MEZQUITA, 1989).

Alors que l'organisation de la structure de la chromatine somatique à partir du nucléosome semble assez universelle, l'organisation de la chromatine du spermatozoïde est assez variable. Selon les organismes, on trouve :

- Des histones classiques (carpe, oursin).
- Surtout les histones H3 et H4 (amphibiens, exemple : le xénope).
- Des histones particulières (exemple : *Platynereis dumerilli*, Annélides Polychètes).

- Des protamines dépourvues de cystéine remplaçant directement et complètement les histones (poissons téléostéens).
- Des protamines riches en cystéines, ne remplaçant pas toujours totalement les histones (mammifères).

La compaction de la chromatine est le résultat d'une suite d'étapes précises, plus ou moins complexes. Dans le cas des mammifères, au stade spermatogonie, il y a déjà expression de variants particuliers d'histones, spécifiques ou non du testicule. Ce processus se poursuit dans le spermatocyte avec l'expression des mêmes variants, ou d'autres variants (ex : SMITH, F. F. *et al.*, 1992). Dans la spermatide ronde interviennent des protéines de basicité intermédiaire entre histones et protamines. Les protamines n'interviennent qu'ultérieurement au stade spermatides allongées, la maturation avec formation de ponts disulfure intermoléculaires se poursuit jusque dans le spermatozoïde épидидymaire.

Lorsque s'effectue ce remaniement l'histone H4 est hyperacétylée, la chromatine devient beaucoup plus sensible à la dénaturation thermique. (revues POCCIA, 1986 ; GRIMES, 1986). Dans les spermatides de truite, et vraisemblablement aussi chez les autres organismes, les molécules d'histones H4 hyperacétylées ne sont pas dispersées dans le noyau, mais sont, à un instant donné, groupées dans des zones de la chromatine à la structure particulièrement décondensée. L'acétylation et la décondensation se déplaceraient à travers tout le noyau, et constitueraient une étape transitoire, avant le départ des histones et la fixation des protamines (CHRISTENSEN *et al.*, 1984 ; MEISTRICH *et al.*, 1992).

La corrélation qui existe entre acétylation, décondensation de la chromatine et présence de protamines, est bien établie : chez une autre espèce de poisson, la carpe, chez laquelle les histones somatiques persistent totalement dans les spermatozoïdes, il n'y a pas hyperacétylation des histones ni présence de zones de chromatine altérée.

Dans le testicule de truite, cette acétylation serait accompagnée d'une inhibition des désacétylases. Le fait que cette inhibition ne soit pas retrouvée dans le testicule de coq (OLIVA et MEZQUITA, 1982) pourrait s'expliquer par la très grande efficacité de la galline (protamine du coq) dans le déplacement des histones (OLIVA et MEZQUITA, 1986). En dépit de cette complexité, l'acétylation, qui affaiblit les liaisons histone-ADN doit favoriser le remplacement des histones par les protamines ; les protamines sont capables

néanmoins, de remplacer *in vitro* des histones peu acétylées telles que des histones d'érythrocytes de poulet (OLIVA *et al.*, 1987). *In vivo*, contrairement à ce qui se passe *in vitro*, l'histone H4 est la première, et l'histone H1 la dernière à être remplacée. Dans le spermatozoïde humain où environ 15% des histones restent attachées à l'ADN, les histones H3 et H4 sont acétylées à un degré comparable à celui des histones de truite durant la spermiogenèse. Un haut degré d'acétylation des histones dans les spermatides n'est donc pas nécessairement suivi de leur départ. D'autres mécanismes, tels que, l'activité des topoisomérases, la phosphorylation des protamines nouvellement synthétisées, la protéolyse des histones partiellement ou complètement déplacées, sont ou pourraient être nécessaires. L'acétylation pourrait même être non la cause, mais la conséquence, de l'altération de la chromatine (CSORDAS, 1990).

Conclusion de la revue bibliographique.

Dans les pages qui précèdent, nous nous sommes efforcé de dégager, malgré le nombre de travaux contradictoires, un modèle cohérent de structure de la chromatine.

Le modèle de "core particle" de FINCH et KLUG (KLUG *et al.*, 1980, 1985) semble une donnée sûre ; les structures qui lui sont supérieures sont moins bien établies. Notre préférence va, pour une fibres de 30 nm de WILLIAMS (WILLIAMS *et al.*, 1986) c'est le modèle qui a été le mieux présenté ! (ceci dans la mesure où la fibre de 30 nm existe) ; fibres organisées en boucles ; boucles capables de se déplacer devant des machineries de réplication (c'est à dessein, que nous n'employons pas le terme "ADN polymérase", dont l'apparente précision est trompeuse) et de transcription.

Le nucléosome, rouage élémentaire de cette organisation, a une composition bien définie. Un schéma (statique) situant l'ADN et chaque histone a été proposé ; il semble dans ses grandes lignes être accepté. La position externe de l'ADN a été établie indépendamment par plusieurs techniques.

En ce qui concerne les protéines, la résolution de 7 Å obtenue ne permet pas de localiser les différents acides aminés. L'emplacement assigné à chaque histone résulte de la synthèse de tous les résultats publiés avant 1984 ; cet arrangement est confirmé par la deuxième structure de l'octamère d'histones publiée par l'équipe de MOUDRIANAKIS (ARENTS *et al.*, 1991).

La nature des processus dans lesquels est impliqué l'ADN fait suspecter un rôle dynamique pour le nucléosome. Abordés sous cet angle, les phénomènes simples ou complexes, soulèvent nombre de questions. Ainsi dans le déplacement du nucléosome sur l'ADN, ou plus précisément dans le mouvement l'un par rapport à l'autre du noyau protéique et de l'ADN :

- Le noyau protéique progresse-t-il par bonds sur l'ADN ?

- Le noyau protéique roule-t-il sur l'ADN ? Si oui, le système cabestan-cable est-il une bonne image mécanique, ou bien l'ensemble protéique a-t-il tendance à décrire en plus une hélice ayant pour axe l'ADN internucléosomique ?

- Le noyau protéique glisse-t-il ? Les histones restent-elles alors immobiles les unes par rapport aux autres ? Ou bien modifient-elles leurs interactions de façon cyclique de manière à diminuer l'énergie d'activation de la réaction :

rupture de liaisons ADN-histones → formation de nouvelles liaisons ADN-histones.

Lors de la réplication, existe-t-il un rapport entre nucléosomes et segments d'OKAZAKI. Relation qui expliquerait la petite taille de ceux-ci chez les eucaryotes, 100 à 200 paires de bases, comparée à ce qu'elle est chez les procaryotes, 1 000 à 2 000 paires de bases.

La très grande conservation au cours de l'évolution de la structure primaire de la majorité des régions des histones pourrait refléter l'existence d'au moins une fonction demandant une très grande précision dans l'organisation du nucléosome. Cette fonction, qui serait d'une importance vitale pour la cellule, semble encore échapper à nos investigations.

A l'autre extrémité du schéma d'organisation de la chromatine, la notion de matrice nucléaire apparaît encore comme à travers un brouillard, même sa composition est incertaine. L'élucidation de sa structure et de ses relations avec les boucles d'ADN devrait constituer à l'avenir une étape aussi importante et aussi passionnante que le furent les étapes histones et nucléosomes.

Deuxième partie

Travaux

Chapitre IV : Préparation des histones.

IV - I. INTRODUCTION.

Pour la réalisation des travaux présentés dans les chapitres suivants, nous avons été amené à préparer plusieurs grammes d'histones pures de thymus de veau. Le thymus nous a semblé constituer un modèle plus actif, du point de vue chromatine, que l'érythrocyte de poulet, autre tissu très employé. Le thymus contient un échantillonnage assez complet de protéines acido-solubles (histones conventionnelles, variants d'histones, histones modifiées postsynthétiquement, protéines HMG). La richesse de ce matériel amène toutefois de nombreuses difficultés lors de la purification des histones.

D'une façon simplifiée, la préparation des histones comporte, successivement :

- l'isolement des noyaux,
- la préparation de la désoxyribonucléoprotéine : la désoxyribonucléoprotéine correspond au matériel nucléaire insoluble dans une solution isotonique de pH neutre.
- l'extraction des histones.
- le fractionnement et la purification des histones.

Dans le cas du thymus de veau, tissu où le cytoplasme est peu important, la première étape est le plus souvent omise. La désoxyribonucléoprotéine est obtenue directement par broyage de l'organe.

L'extraction globale des histones peut se faire : soit en milieu acide (HCl ou H₂SO₄, 0,2-0,4 M) soit en milieu de force ionique élevée (NaCl 2 M). Dans ce dernier cas, l'ADN est précipité par l'addition de protamines de poisson (VAN DER WESTHUYSEN et VON HOLT, 1971). L'extraction des histones par ces méthodes conduit à des mélanges difficiles à fractionner.

Lorsque le but de la préparation est la production d'histones séparées, on emploie généralement les méthodes d'extractions sélectives. Ces méthodes, qui ont été surtout

développées par JOHNS reposent, pour la part qui nous intéresse, sur la faible solubilité des histones les plus riches en lysine (H1 et H2B) dans des milieux contenant 75 à 80 % d'éthanol. La dissociation des histones de l'ADN est provoquée :

- soit par un milieu acide (éthanol / HCl 1,25 M, 4 : 1, v/v) "méthode 2 de JOHNS" (1964) voir aussi JOHNS, 1977.
- soit à pH 7,0 par une force ionique élevée (éthanol / chlorure de guanidinium 40 %, 3 : 1, v/v) (JOHNS, 1967).

La "méthode 2" de 1964 permet l'obtention des cinq histones avec un très bon rendement, mais elle a l'inconvénient de fournir une histone H2A très contaminée par l'histone H2B.

La méthode de 1967 prévoit uniquement la préparation des histones H2A et H4. Une extraction ultérieure du sédiment par l'acide chlorhydrique 0,25 M permet néanmoins la récupération des histones H1 et H2B. L'histone H3, mal extraite ou dégradée, est retrouvée, en partie, comme contaminant des histones H2A et H2B. L'avantage de cette technique est de fournir une histone H2A exempte d'histone H2B. Cette histone H2A contient aussi des protéines non histones.

Les fractions d'histones obtenues par toutes ces méthodes sont plus ou moins intercontaminées, ou contaminées par des protéines étrangères, elles doivent être purifiées. Les nombreux systèmes de séparation des histones font appel à trois types de techniques :

- électrophorèse en gel de polyacrylamide.
- chromatographie haute performance.
- chromatographie basse pression.

Seule l'utilisation des méthodes de ce dernier type a été envisagée pour la préparation des quantités d'histones dont nous avons besoin.

Nous citerons :

- la chromatographie de tamisage moléculaire (CANDIDO et DIXON, 1972 ; BÖHM *et al.*, 1973).
- la chromatographie d'échange d'ions (LUCK *et al.*, 1958 ; SENSHU et IWAI, 1970).
- la chromatographie d'interaction hydrophobe (ARFMANN et SHALTIEL, 1976 ; SELIGY, 1978).

- la chromatographie d'affinité pour les groupements thiol (RUIZ-CARRILLO et ALLFREY, 1973 ; ISHIKAWA et IWAI, 1975).

La chromatographie sur Biogel P10 (CANDIDO et DIXON, 1972) s'est révélée être un système simple pour l'élimination des intercontaminations entre les histones H1, H2A, H3 et H4.

La chromatographie sur colonne de CM Cellulose, éluée par un gradient d'éthanol / acide formique / formiate de sodium (SENSHU et IWAI, 1970) permet la séparation totale de l'histone H2B, des histones H2A, H3 et H4. Cette méthode est assez complexe, notamment au niveau de la récupération des histones dans le tampon d'élution.

Les caractéristiques des fractions obtenues par les méthodes d'extractions sélectives et les possibilités de séparation des systèmes chromatographiques publiés, conduisent finalement à employer la "méthode 2" de 1964 de JOHNS pour la préparation des histones H1, H2B et H3 et la méthode de 1967 de JOHNS, pour la production des histones H2A et H4.

Les études, faites à Lille et ailleurs, sur les complexes d'histones nous ont amené à mettre au point un système de chromatographie sur SP Sephadex à pH 2,0 pour séparer l'une de l'autre les histones H2A et H2B. L'utilisation de cette méthode, en association avec la précipitation fractionnée des histones par l'acétone et la chromatographie sur Biogel P10, nous permet actuellement de préparer les cinq histones à partir des fractions obtenues par la seule "méthode 2" d'extraction de JOHNS (1964). Le protocole utilisé, résumé dans la figure IV. 1 est exposé ci-dessous.

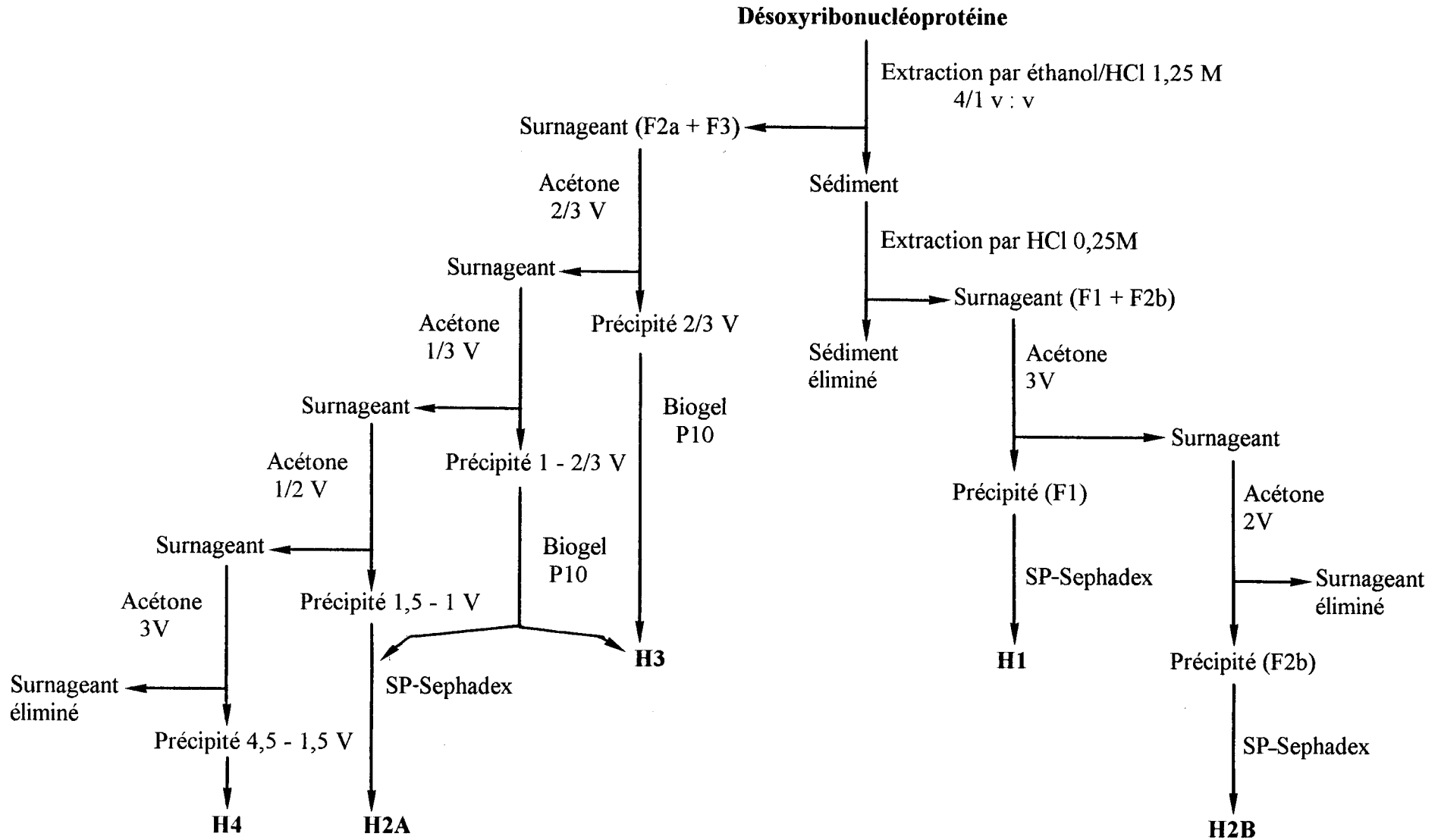
IV - 2. EXTRACTION DES HISTONES ET FRACTIONNEMENT PAR LES "MÉTHODES CHIMIQUES".

Les opérations sont réalisées à 4° C, à l'exception des précipitations par l'acétone qui sont effectuées à - 20° C.

IV - 2 - 1. ISOLEMENT DE LA DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINE (DNP).

300 grammes de thymus congelé sont homogénéisés, à l'aide d'un appareil Waring Blendor pendant 1 mn à grande vitesse, dans 1500 ml de tampon NaCl 0,14 M citrate

Figure IV. 1 : Extraction et purification des histones de thymus de veau.



trisodique 0,01 M, pH 7,0 diisopropylfluorophosphate 0,1 mM (inhibiteur de protéases). La suspension est filtrée sur de la gaze hydrophile. La DNP est récupérée par centrifugation (3000 X g, 15mn). Les opérations d'homogénéisation (20 secondes) et de centrifugation sont répétées cinq fois en utilisant le tampon ci-dessus, puis deux fois en utilisant de l'éthanol à 80%.

IV - 2 - 2. EXTRACTION DES HISTONES TOTALES.

En vue de constituer un matériel de référence pour les électrophorèses analytiques et les systèmes de chromatographie, nous avons préparé des histones totales. Nous avons aussi utilisé les histones totales comme matériel de départ pour la préparation de complexes H3-H4 et H2A-H2B par chromatographie de tamisage moléculaire. Cette utilisation ne sera pas exposée dans cette thèse.

L'extraction à partir de la DNP (correspondant à 300 g de thymus) est faite par 600 ml d'HCl 0,25M pendant 15 heures sous agitation. Après centrifugation, le surnageant est dialysé contre de l'eau désionisée puis lyophilisé.

IV - 2 - 3. EXTRACTIONS SÉLECTIVES DES HISTONES PAR LA "MÉTHODE 2 DE JOHNS" (1964).

La DNP est d'abord extraite deux fois par 1200 ml du mélange éthanol / HCl 1,25 M, 4 : 1, v/v (une fois pendant 6 heures, une fois pendant 15 heures). Après centrifugation (une heure à 3000 X g) les surnageants sont rassemblés ; ils constituent la fraction F2a + F3 formée principalement des histones H2A, H3 et H4. Le sédiment qui contient encore les histones H1 et H2B est extrait par 900 ml d'HCl 0,25 M pendant 8 heures, le matériel non soluble (ADN, etc...) est éliminé par centrifugation. Le surnageant est additionné de 3 volumes d'acétone (2700 ml) le précipité formé est récupéré par centrifugation et constitue la fraction F1 qui contient surtout l'histone H1. Le surnageant est à nouveau additionné d'acétone (2 volumes, 1800 ml) ; le nouveau précipité, appelé fraction F2b, contient surtout l'histone H2B.

IV - 2 - 4. LES MODIFICATIONS APPORTÉES A LA "MÉTHODE 2 DE JOHNS" (1964).

Ces modifications concernent la séparation des histones contenues dans la fraction F2a + F3.

Dans sa méthode originale, JOHNS dialyse cette fraction contre de l'éthanol absolu. Le précipité qui se forme dans le boudin de dialyse constitue la fraction F3 qui contient l'histone H3. Les histones H2A et H4, et aussi l'histone H3 restante, sont précipitées en bloc à partir du surnageant par addition de 3 volumes d'acétone.

A cette technique difficile à contrôler, nous avons substitué un système de précipitation fractionnée, par addition successives, de quantités suffisamment faibles d'acétone pour éviter les phénomènes d'entraînement, avec à chaque fois la récupération du précipité formé.

L'extrait éthanol / HCl (2400 ml) est ainsi additionné successivement de 2/3 de volume (1600ml) de 1/3 de volume (800 ml) de 1/2 volume (1200 ml) et de 3 volumes (7200 ml) d'acétone. Chaque addition amène un trouble de la solution, qui après quelques jours à -20° C, se clarifie en donnant un précipité qui est recueilli par centrifugation. On obtient ainsi à partir de la fraction F2a + F3 successivement quatre sous-fractions que nous avons appelées :

F2a + F3 précipité 2/3 V (H3 presque pure)

F2a + F3 précipité 1 - 2/3 V (mélange H3 et H2A, fraction quantitativement peu importante)

F2a + F3 précipité 1,5 - 1 V (surtout H2A)

F2a + F3 précipité 4,5 - 1,5 V (H4).

La "méthode 2 de JOHNS" avec les modifications que nous lui avons apportées est présentée dans la figure IV. 1.

IV - 3. CRITÈRES DE PURETÉ.

Les différentes étapes de précipitation et de purification sont suivies par électrophorèse analytique en gel de polyacrylamide à 17 %, en milieu urée 2,5 M, pH 2,9 (PANYIM et CHALKLEY, 1969). Ce système sépare les cinq histones de thymus de veau.

Les identifications obtenues par le système "acide-urée", sont confirmées, lorsqu'un doute subsiste, par l'électrophorèse en présence d'un détergent non ionique, le triton X 100 à 0,4 %, en milieu urée 6 M, pH 2,9 (ZWEIDLER, 1978).

Une autre méthode de contrôle, moins utilisée, est la détermination de la composition en acide aminés après hydrolyse de la protéine par l'acide chlorhydrique 6 M à 110°, sous vide, pendant 24 heures.

IV - 4. OBTENTION DES HISTONES H2A ET H2B A L'ÉTAT PUR

La séparation, l'une de l'autre, des histones H2A et H2B en grande quantité et leur obtention à l'état pur est un problème complexe qui nous a causé beaucoup de difficultés. Une partie de celles-ci provenaient d'une mauvaise connaissance des variants de l'histone H2A et des modifications postsynthétiques de cette histone.

Comportement des histones H2A et H2B en tamisage moléculaire. Ces histones ont des masses molaires voisines (H2A : 14005, H2B : 13774) ce qui empêche leur séparation par un simple tamisage moléculaire sur Sephadex. Sur Biogel des phénomènes d'interaction entre les acides aminés aromatiques et la matrice du gel tendent à provoquer une élution plus tardive de l'histone H2B (7 résidus tyrosine et phénylalanine, contre 4 dans l'histone H2A). Cet avantage est toutefois en partie annihilé par l'existence d'autres interactions, notamment entre les résidus arginine et le gel (H2B : 8 arginines, H2A : 12 arginines). La chromatographie sur Biogel est ainsi utilisable seulement pour préparer des quantités de l'ordre de la dizaine de milligrammes d'histone ; ceci, à condition de parvenir à se débarrasser des protéines non histones.

Comportement général des histones H2A et H2B en chromatographie d'échange d'ions. La propriété qu'ont les histones H2A et H2B d'interagir ensemble dès pH 4,0 (MOSS *et al.*, 1976) complique la séparation de ces deux histones à partir de leur mélange. Les conditions utilisées habituellement pour la chromatographie d'échange d'ions - pH compris entre 5 et 8, élution par un gradient de force ionique - sont idéales pour la formation du complexe H2A-H2B. Pour empêcher la formation de ce complexe il faut utiliser un agent dissociant, ou travailler à pH acide.

L'utilisation d'urée 6 M ne nous a pas permis de séparer ces deux histones lors d'un essai effectué à pH 5,0 sur une colonne de CM cellulose éluée par un gradient de NaCl.

Le travail à pH 2,0, en dépit de son caractère apparemment drastique, est à la base de la mise au point d'un système efficace de séparation.

IV - 4 - 1. CHROMATOGRAPHIE DES HISTONES TOTALES SUR COLONNE DE SP-SEPHADEX à pH 2,0.

Ce milieu acide nécessite l'emploi d'un "échangeur fort" : le SP-Sephadex, dont les fonctions acide sulfonique sont encore suffisamment ionisées dans cette zone de pH. La colonne est éluée par du chlorure de guanidinium (gdm Cl) et non par du chlorure de sodium, ceci afin de diminuer les phénomènes d'agrégation. Cette précaution nous a semblé nécessaire, les phénomènes d'agrégation ayant tendance à s'amplifier chaque fois que la formation des complexes histone-histone est perturbée. La colonne de SP-Sephadex C50 est équilibrée en milieu gdm Cl 0,65 M pH 2,0 (ajusté avec HCl) et éluée par un gradient linéaire de 0,65 à 1,35 M gdm Cl à ce même pH. Les histones non éluées par ce gradient sont décrochées de la colonne par une solution de gdm Cl 4 M. Toutes les solutions contiennent du 2-mercaptoéthanol 0,1 M ; ceci implique :

- de maintenir les réservoirs de l'appareil à gradient sous azote, afin d'éviter l'oxydation directe du 2-mercaptoéthanol par l'air.
- de suivre l'élution de la colonne par turbidimétrie (étant donné la forte absorption des groupements thiol dans l'ultraviolet) : le trouble, dû à l'agrégation des protéines provoquée par l'addition d'acide trichloracétique à la concentration finale de 1,1 M, est mesuré à 400 nm.

L'emploi d'un agent réducteur a non seulement pour but de prévenir la formation de ponts disulfure entre les cystéines, mais aussi d'empêcher l'oxydation des résidus de méthionine en méthionine sulfoxyde et en méthionine sulfone.

La figure IV. 2. présente le diagramme d'élution obtenu à partir d'histones totales de veau. Les trois pics élués par le gradient, fraction 1, fractions 2 et 3, fractions 5, 6 et 7, correspondent respectivement aux histones H1, H2B et H2A. L'épaulement (fraction 8) dans la partie descendante du pic d'histone H2A est constitué par de l'histone H3. Le

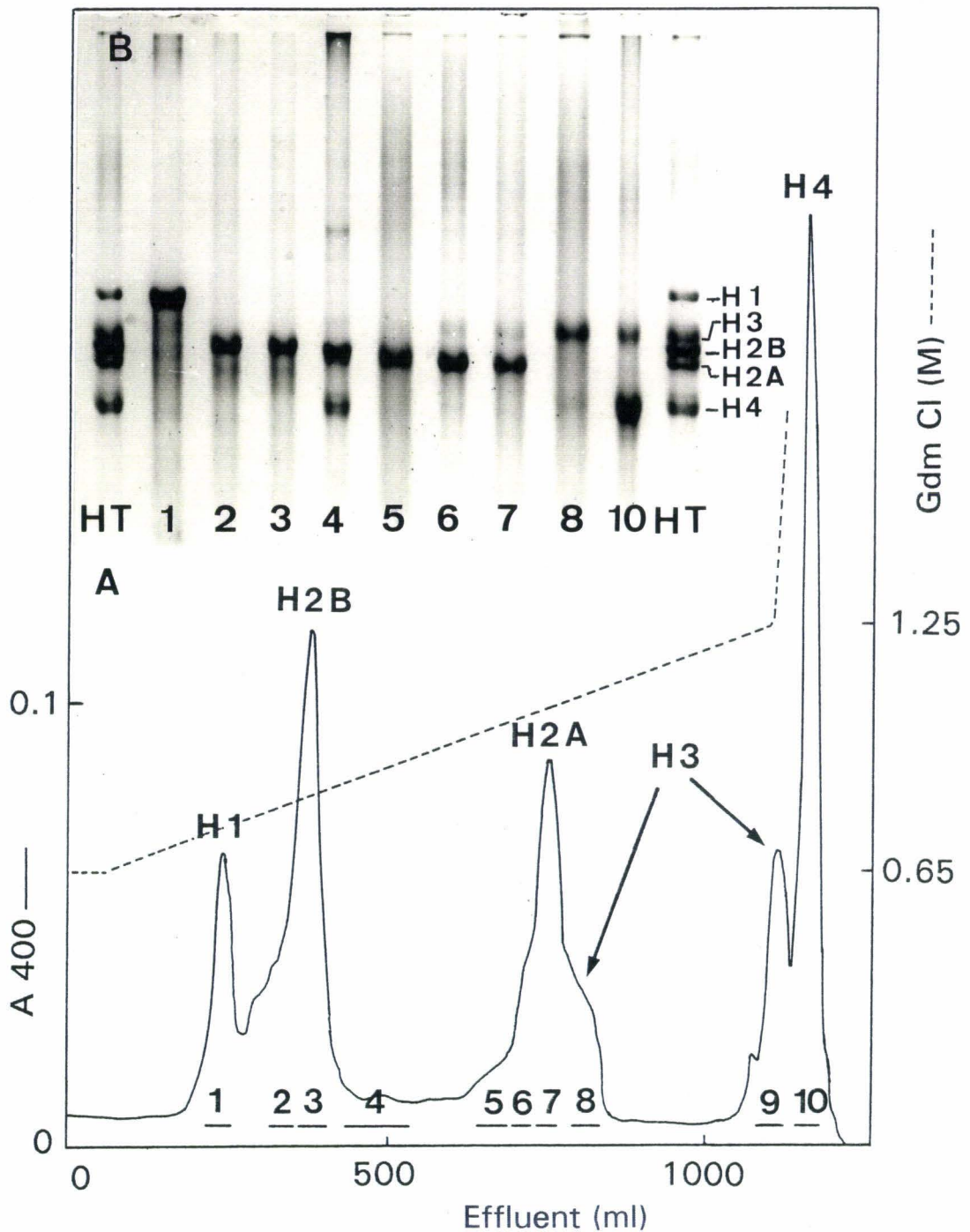


Figure IV. 2 : Chromatographie des histones totales de thymus de veau sur colonne de SP-Sephadex C50.

A. Diagramme d'élution. 50 mg d'histones ont été déposés sur une colonne de 1,6 X 80 cm équilibrée en milieu chlorure de guanidinium (gdm Cl) 0,65 M, pH 2,0, 2-mercaptoéthanol 0,1 M et éluée par un gradient de gdm Cl de 0,65 M à 1,35 M, pH 2,0 en présence de 2-mercaptoéthanol 0,1M (volume total : 1000 ml) débit : 5 ml/h.

B. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à 17 % , pH 2,9, en milieu urée 2,5 M.

HT : histones totales. Les numéros des couloirs correspondent aux numéros des fractions du diagramme d'élution (la fraction 9 similaire à la fraction 8 ne figure pas sur le gel).

quatrième pic, obtenu lors du passage du gdm Cl 40 %, est constitué par l'histone H4 et par l'histone H3 non éluée dans la fraction 8. Ce pic représente les molécules d'histones qui s'étaient agrégées dans les conditions du gradient. La présence d'une quantité minime d'histone H4 entre le pic d'histone H2B et le pic d'histone H2A dans la fraction 4 pourrait marquer la position théorique d'élution de l'histone H4 non agrégée ; toutefois la logique voudrait que l'histone H4, même non agrégée, soit éluée après l'histone H3.

Afin de vérifier les considérations exposées ci-dessus, concernant la formation des complexes sur les colonnes échangeuses d'ions, nous avons répété cette chromatographie en utilisant cette fois un pH de 6,8. Toutes les histones sont alors éluées dans le gradient sous forme de complexes. Les histones H2A et H2B forment un seul grand pic surmontant deux ou trois pics incomplètement séparés contenant des complexes d'histones H3-H4 diversement modifiées (par acétylation ou phosphorylation).

Dans ce système de chromatographie à pH 2,0 les histones semblent d'autant plus retenues que le rapport arginine / lysine est grand. Nous avons testé cette affirmation en déposant des histones d'érythrocyte de poulet. L'histone H5 nettement plus riche en arginine que l'histone H1 est éluée beaucoup plus tardivement, dans le voisinage de l'histone H2A. Cette élution plus tardive des histones contenant beaucoup de résidus d'arginine ne semble pas être due uniquement au pHi plus élevé de celles-ci, car l'addition d'urée au milieu, à ce même pH 2,0, suffit à diminuer fortement la séparation des différentes classes d'histones.

L'utilisation de SP-Sephadex C25 au lieu de C50 augmente la séparation des pics d'histones H1 et H2B, mais diminue la séparation des histones H2B et H2A. L'explication de ce résultat se trouve plus, dans une notion de nombre de charges du support accessibles à une protéine donnée, qu'à un phénomène de tamisage moléculaire. Le SP-Sephadex C25 donne une séparation suffisante des histones tout en ayant une résistance mécanique meilleure que le C50. Nous utilisons toutefois ce dernier dans le cas du thymus, pour des raisons de positions différentes, dans le diagramme d'élution, de certaines protéines non histones.

En résumé, ce système de chromatographie d'échange d'ions associé à la chromatographie de tamisage moléculaire sur Biogel P10, permet l'obtention des cinq histones (ou six dans le cas de l'érythrocyte de poulet) à partir d'histones totales. Nous

avons utilisé cette méthode pour isoler les histones de poulet à partir d'histones totales (résultats non exposés) ; le système s'est révélé capable aussi, de séparer partiellement les variants de l'histone H1.

IV - 4 - 2. CHROMATOGRAPHIE SUR SP-SEPHADEX à pH 2,0 DE FRACTIONS OBTENUES PAR EXTRACTIONS ET PRÉCIPITATIONS SÉLECTIVES.

L'utilisation, comme matériel de départ, de fractions enrichies en une histone – sous-fractions "F2a + F3 précipité 1 - 2/3" ou "F2a + F3 précipité 1,5 - 1", pour l'obtention de l'histone H2A et fraction "F2b" pour l'obtention de l'histone H2B – permet d'augmenter fortement les quantités utiles déposées, tout en diminuant les risques de chevauchement de pics, lors de la chromatographie.

Nous présentons dans la figure IV. 3, l'obtention de l'histone H2A pure à partir d'une fraction "F2a + F3 précipité 1,5 - 1" déposée sur une colonne de SP-Sephadex C50 et dans la figure IV. 4, la purification d'une fraction F2b de JOHNS, afin d'obtenir l'histone H2B.

IV - 5. OBTENTION DE L'HISTONE H3.

L'histone H3 est obtenue à partir de la sous fraction "F2a + F3 précipité 2/3 V". Les contaminants de cette sous fraction : un peu d'histone H2A et H2B et une protéine non histone, sont éliminés par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Biogel P10 éluée par une solution HCl 0,01 M saturée en chloroforme. (Nous avons remplacé l'azide de sodium, généralement utilisé comme antibactérien, par le chloroforme, afin de pouvoir lyophiliser directement l'éluat).

Avant le dépôt sur la colonne, la protéine est dissoute (20 mg/ml) dans une solution de chlorure de guanidinium 6 M, Tris 0,1 M, pH 8,0, 2-mercaptoéthanol 0,7 M, puis laissée 24 heures à la température du laboratoire, afin d'obtenir la réduction totale des cystéines de l'histone H3. Cette étape est nécessaire : l'histone H3 de thymus de veau possède une cystéine (pour 20 % des molécules d'histone H3 : variants H3.2 et H3.3) ou deux cystéines (pour le reste des molécules : variants H3.1) qui par oxydation forment des ponts disulfure intra- et intermoléculaires entraînant l'élution de l'histone dans plusieurs pics.

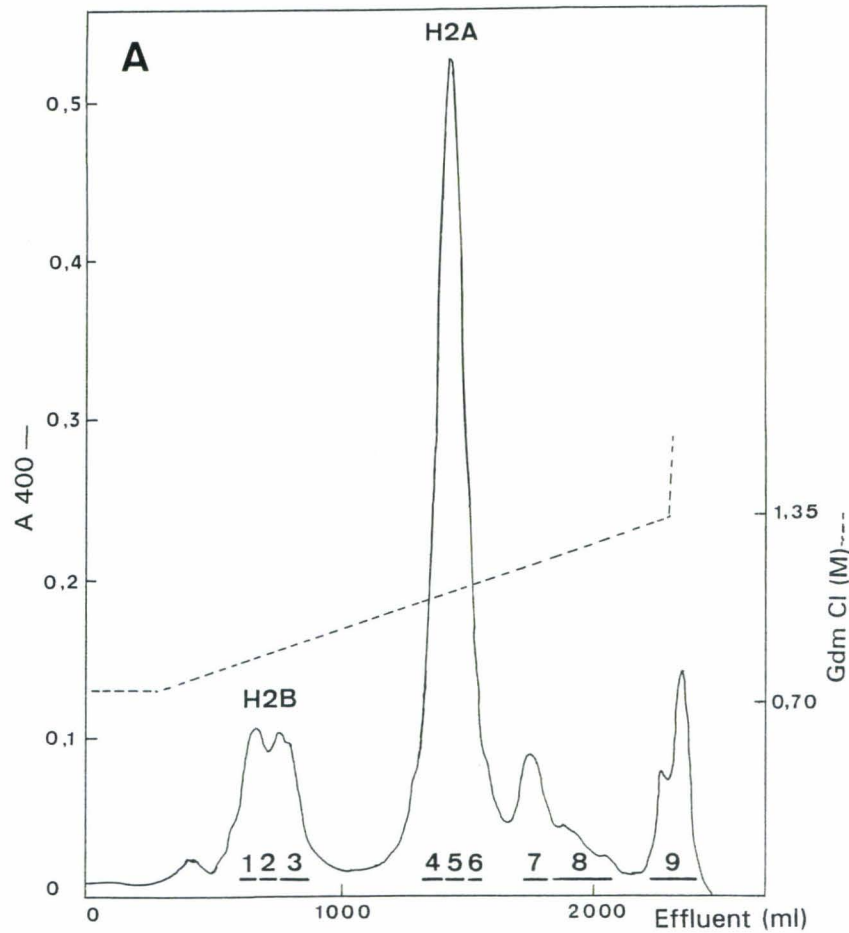


Figure IV. 3 : Purification de l'histone H2A sur SP-Sephadex C50.

A : Diagramme d'élution. 250 mg de la fraction "F2a + F3 précipité 1,5 - 1 V" ont été déposés sur une colonne de 2,5 X 85 cm équilibrée en milieu chlorure de guanidinium (gdm Cl) 0,7 M, pH 2,0, 2-mercaptoéthanol 0,1 M et éluée par un gradient de gdm Cl de 0,7 M à 1,35 M, pH 2,0 en présence de 2-mercaptoéthanol 0,1M (volume total : 2200 ml) débit : 13 ml/h.

B : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à 17 % , pH 2,9, en milieu urée 2,5 M.

M : fraction déposée sur la colonne ; 1 à 9 : fractions 1 à 9 du diagramme figure A ; HT : histones totales.

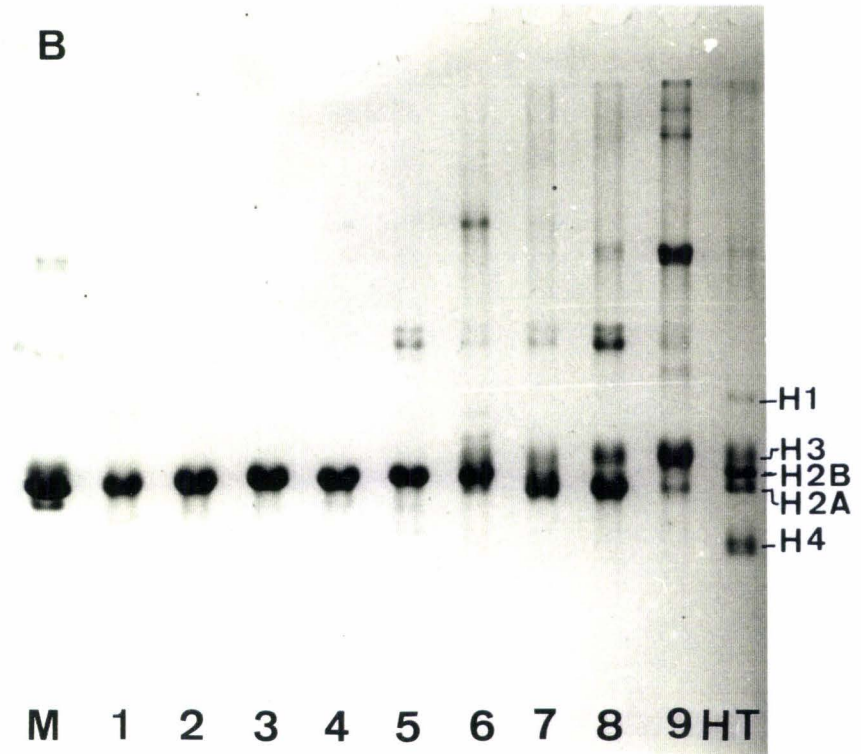
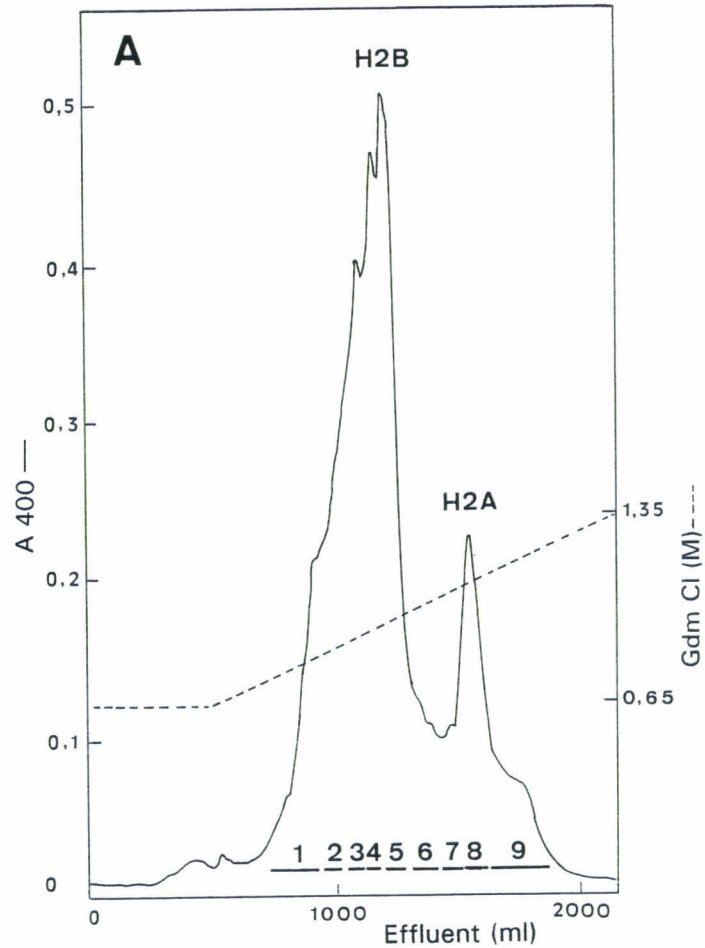


Figure IV. 4 : Purification de l'histone H2B sur SP-Sephadex C50.

A : Diagramme d'éluion. 365 mg de la fraction "F2b" ont été déposés sur une colonne de 2,5 X 85 cm équilibrée en milieu chlorure de guanidinium (gdm Cl) 0,65 M, pH 2,0, 2-mercaptoéthanol 0,1 M et éluee par un gradient de gdm Cl de 0,65 M à 1,35 M, pH 2,0 en présence de 2-mercaptoéthanol 0,1M (volume total : 1700 ml) débit : 13 ml/h.

B : Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide à 17 % , pH 2,9, en milieu urée 2,5 M.

M : fraction déposée sur la colonne ; 1 à 9 : fractions 1 à 9 du diagramme figure IV. 4 A ; HT : histones totales.

La figure IV. 5 montre le diagramme d'élution obtenu sur un gel usagé (plus d'une année de service) particulièrement apte à séparer les histones H2A, H2B, et H3. Cette résolution accrue semble être due à l'apparition de groupements acide carboxylique par hydrolyse des fonctions amide.

IV - 6. OBTENTION DE L'HISTONE H4.

L'histone H4 est obtenue à partir de la fraction "F2a + F3 précipité 4,5 - 1,5 V". Dans le cas où cette fraction est contaminée, elle est purifiée selon une technique adaptée de la méthode d'extraction de 1967 de JOHNS. L'histone est dissoute à raison de 3 mg/ml dans une solution d'éthanol / gdm Cl 40 %, 3 : 1 v/v. Les contaminants de l'histone H4 sont précipités par l'addition de 1,25 volume d'acétone. Après centrifugation et élimination du culot, l'histone H4 est précipitée par addition de 2 volumes d'acétone.

IV - 7. CONCLUSION.

Dans ce chapitre, qui peut sembler élémentaire car il décrit la préparation des histones, nous sommes allé à contre-courant de l'évolution générale des techniques. Nous n'avons pas cherché à miniaturiser les méthodes ; nous avons, d'une façon délibérée, opté pour les erlenmeyers de cinq litres et les colonnes de 5 x 150 cm.

La possibilité de pouvoir utiliser des quantités de l'ordre de 100 mg d'histones par manipulation a influencé, autant que les considérations d'ordre théorique, la façon de poursuivre ce travail. Ainsi, des systèmes d'hydrolyses peu spécifiques conduisant après fractionnement à la production, avec un faible rendement, de peptides susceptibles de présenter un grand intérêt pour des techniques peu gourmandes, telles que, le dichroïsme circulaire et l'immunologie, ont pu être employés. Ces mêmes quantités hydrolysées par des méthodes plus spécifiques ont permis l'utilisation de la spectroscopie infrarouge et de la résonance magnétique nucléaire, techniques qui nécessitent des quantités de l'ordre de 10 mg de chaque peptide. Enfin, le fractionnement des histones en fonction de leur degré de modification postsynthétique (par exemple, acétylation) demande la mise en oeuvre de quantités du même ordre, si l'on veut obtenir quelques mg des espèces les plus modifiées.

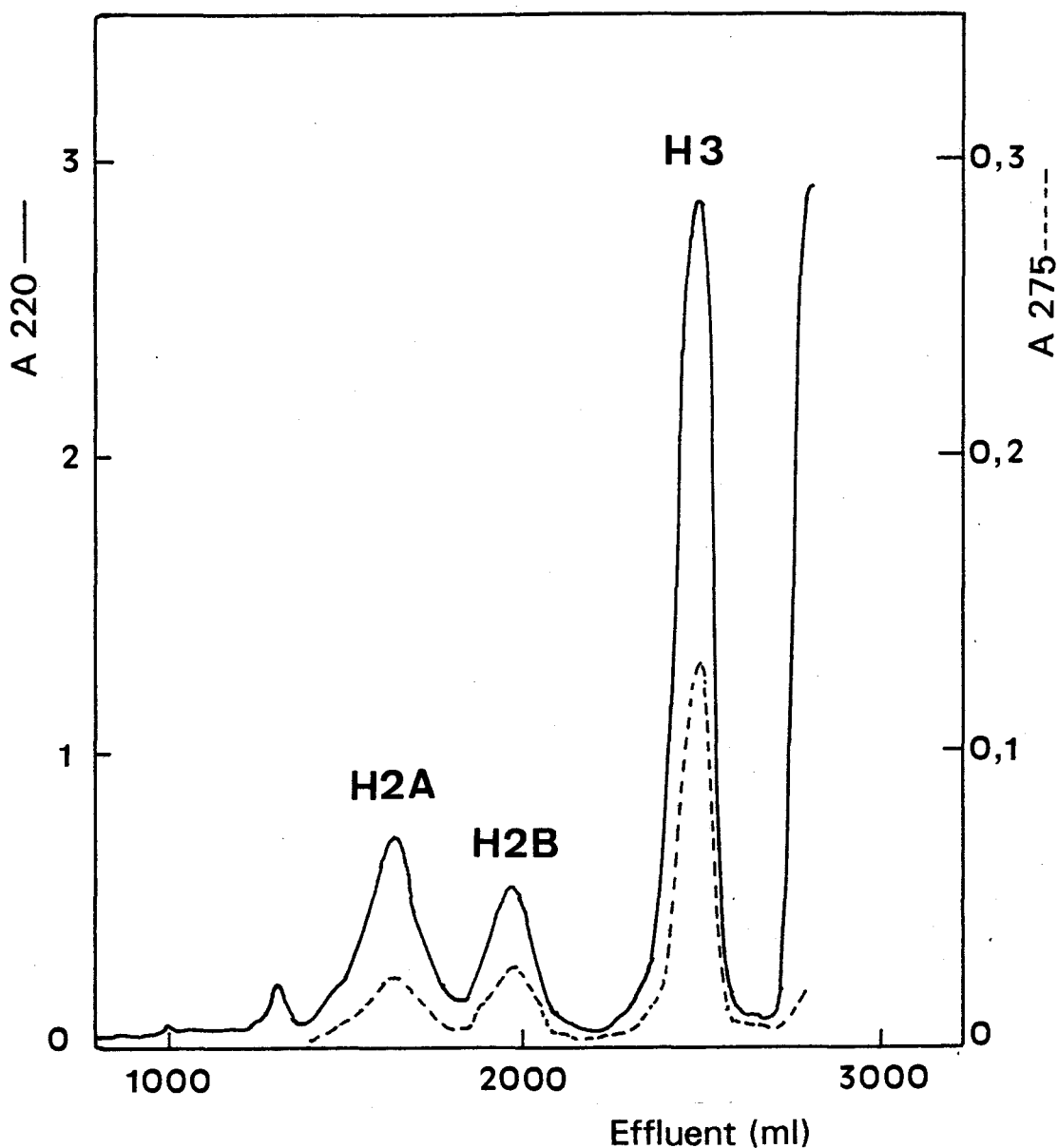


Figure IV. 5 : Purification de l'histone H3 sur Biogel P10. 110 mg de la fraction "F2a + F3 précipité 2/3 V" ont été déposés, après réduction, sur une colonne de Biogel P10, 200 - 400 mesh (5 X 130cm) prolongée par une colonne de Sephadex G 25F (5 X 25 cm). Les colonnes sont éluées par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme, à un débit de 50 ml/h. La forte augmentation de l'absorbance en fin de diagramme correspond à l'éluion du 2-mercaptoéthanol et du chlorure de guanidinium présents dans le dépôt.

Chapitre V : Préparation des peptides.

Le plus souvent nous avons préparé les peptides au "coup par coup", pour une utilisation précise. Dans ce chapitre nous tenterons néanmoins de faire une synthèse cohérente, sinon idéale, de ces travaux, nous ferons ainsi abstraction des tâtonnements et autres essais ratés.

V - 1. MÉTHODES UTILISÉES.

V - 1 - 1. LES MÉTHODES D'HYDROLYSE.

Coupure au niveau des résidus de méthionine par le bromure de cyanogène (GROSS et WITKOP, 1962). A une solution d'histone dans l'acide formique à 70 % (10 mg de protéine/ml) on ajoute 10-15mg/ml de BrCN (100 fois excès / résidu de méthionine) le mélange est maintenu 24 heures à l'obscurité à température ambiante sous agitation.

Hydrolyse au niveau des résidus acide aspartique. Celle-ci est effectuée selon la méthode de SCHROËDER *et al.* (1963) par l'acide acétique 0,25 M (10 mg de protéine/ml) à 105° C.

Hydrolyse des liaisons glutamate par la protéase staphylococcale V8 (HOUMARD et DRAPEAU, 1972). L'enzyme a été utilisée à pH 4,0 dans un tampon acétate d'ammonium 0,05 M (10 mg de protéine/ml) rapport enzyme/substrat 1/50 à 37° C.

Hydrolyse de l'histone H2A par la pepsine. L'histone dissoute dans une solution d'acide formique à 5 % (10 mg de protéine/ml) est hydrolysée par la pepsine, rapport enzyme/substrat 1/200, pendant 2 heures à 37° C. L'hydrolyse est arrêtée par réduction des ponts disulfure et dénaturation de l'enzyme : le milieu est amené à pH 8 - 9 avec de la soude puis additionné de deux volumes de tampon : chlorure de guanidinium 6 M, tris 0,3 M, pH 8,3, 2-mercaptoéthanol 0,45 M et laissé 15 heures à la température du laboratoire avant le dépôt sur une colonne de Sephadex G 25.

Hydrolyse de l'histone H2B par la chymotrypsine à pH 5,0 (OHE *et al.*, 1979).

L'histone dissoute dans l'acétate de sodium 0,1 M, pH 5,0 (10 mg de protéine/ml) est hydrolysée avec un rapport enzyme/substrat de 1/5000, à 20° C, pendant 2 heures 30 minutes.

Hydrolyse en milieu NaCl 0,5 M. La protéine dissoute (10 mg/ml) dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,5 - 9 est hydrolysée par la trypsine ou la chymotrypsine avec un rapport enzyme/substrat de 1/1000 - 1/5000, à 20° C, pendant 1 à 5 heures.

V - 1 - 2. SÉPARATION DES PEPTIDES.

Séparation par chromatographie de tamisage moléculaire. Nous avons utilisé surtout les gels suivants :

- Biogel P6, minus 400 mesh.
- Biogel P10, 200 - 400 mesh.
- Sephadex G 50 F ou SF, Sephadex G 100.

Ces gels ont été équilibrés et élués par une solution d'acide chlorhydrique 0,01M (0,02M pour le Biogel P6) saturée en chloroforme (1 à 5ml de chloroforme dans le fond du flacon de verre servant de réservoir à éluant) afin d'inhiber tout développement bactérien.

Chromatographie d'échange d'ions. Ce mode de séparation a été réalisé sur SP-Sephadex C25 en milieu urée 6M, pH 3,0, la force ionique étant apportée par du chlorure de sodium ou de guanidinium (Sigma, grade I).

L'éluion est suivie par mesure de l'absorbance à 225 nm. Les fractions retenues sont dessalées sur une colonne de Sephadex G 25 en milieu HCl 0,01 M.

V - 1 - 3. CRITÈRES DE PURETÉ ET CARACTÉRISATION.

Selon leur taille les fragments ont été contrôlés, soit avec les systèmes d'électrophorèse en gel de polyacrylamide utilisés pour les histones entières, soit par chromatographie en couche mince sur plaque de cellulose, en milieu butanol 1 : pyridine : acide acétique : eau (7 : 5 : 2 : 6).

Les fragments ont été caractérisés par leur composition en acides aminés. En cas d'incertitude la séquence N-terminale a été déterminée par dégradation d'Edman. Dans

quelques cas, il a été nécessaire d'identifier les acides aminés de l'extrémité C-terminale, à l'aide de carboxypeptidases.

V - 2. DIAGRAMMES DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ET DISCUSSION.

La table V. 1 qui résume les méthodes utilisées et indique les peptides obtenus, contient certains détails techniques non précisés dans les paragraphes ci-dessus.

V - 2 - 1. HYDROLYSE DE L'HISTONE H2B PAR LE BROMURE DE CYANOGENÈNE.

L'action du bromure de cyanogène sur l'histone H2B qui contient deux méthionines produit théoriquement les peptides 1 - 59, 60 - 62 et 63 - 125.

D'un point de vue pratique la formation de formes oxydées de la méthionine lors de l'hydrolyse (et éventuellement leur préexistence) qui limite le taux de clivage à environ 70 % à chaque site, implique l'existence dans l'hydrolysate des peptides 1 - 62 et 60 - 125 et en faible quantité, de l'histone H2B entière.

Les deux peptides principaux 1 - 59 et 63 - 125 ont des masses molaires similaires et ne peuvent être séparés par un simple phénomène de tamisage moléculaire. Ces peptides ont pu néanmoins être séparés sur Biogel P10 (figure V. 1). Sur Biogel P, il peut exister, selon la documentation du fabricant, des interactions entre les noyaux aromatiques des substances à éluer et la matrice du gel. Le peptide 1 - 59 est élué en premier, le peptide 63 - 125 est élué plus tardivement. De même, mais dans une moindre mesure, il semble que les résidus d'arginine provoquent aussi une élution retardée (comme cela a été vu dans le chapitre IV pour les histones entières) les résidus de proline et de lysine ayant un effet inverse (peptide 1 - 59, 3 Tyr, 3 Arg, 5 Pro, 15 Lys ; peptide 63 - 125, 2 Tyr, 2 Phe, 5 Arg, 1 Pro, 5 Lys).

V - 2 - 2. HYDROLYSE DES HISTONES H2A ET H2B PAR L'ACIDE ACÉTIQUE 0,25 M.

Ces histones contiennent peu de résidus aspartate : histone H2A, Asp 72 et 90 ; histone H2B, Asp 25, 51, 68. Ce système d'hydrolyse doit conduire, à première vue, à un

Table V. 1 : Obtention des peptides à partir des histones H2A et H2B.

Histone hydrolysée	Type d'hydrolyse Conditions Rapport E/S en masse	Quantité déposée sur la colonne	Fractionnement de l'hydrolysate : gel, dimensions de la colonne en cm, débit.	Purification des peptides après fractionnement (éventuellement)	Principaux peptides obtenus. Les peptides dont il est question dans ce mémoire sont écrits en caractères gras		
H2A	CH ₃ COOH 0,25 M 105° - 5h	130 mg	P10 5 X 140 53 mL/h	S G 100 S G 50F 2,6 X 190	1-71	73-129	
					1-89	73-89	91-129
H2A	CH ₃ COOH 0,25 M 105° - 16h	100 mg	SP-Sephadex C25 2,5 X 85 12 mL/h Gradient de Na Cl 0,1-0,7 M 1300mL	S G 50F 2,6 X 190	1-71	73-89	91-129
H2A	S. P. V 8 pH 4,0 1/50 - 4,5 h	60 mg	P10 2,6 X 190 19 mL/h	S G 50F 2,6 X 190	1-56	65-92 93-129 65-129	
H2A	Pepsine 1/200 - 2h	200 mg	SP-Sephadex C25 2,5 X 85 12 mL/h Gradient de Gdm Cl 0,1-1 M 2000mL	S G 50F 2,6 X 60	1-39	62-85 86-108 113-129 1-51 64-85 94-108 114-129 65-85 94-112 66-85	
H2A	Chymotrypsine Na Cl 0,5 M pH 9,0 1/1000 - 2h	65 mg	S G 100 Deux colonnes de 5 X 90 en série 45mL/h		32-129		

Table V. 1 : Obtention des peptides à partir des histones H2A et H2B (suite).

Complexe H2A-H2B	Trypsine Na Cl 0,5 M pH 9,0 1/2000 - 5h	80 mg	P10 5 X 140 70 mL/h	S G 100	18-118 (H2A) 18-129 (H2A) 32-125 (H2B)
H2B	Br CN	100 mg	P10 5 X 140 53 mL/h		1-59 63-125
H2B	CH ₃ COOH 0,25 M 105° - 16h	100 mg	SP-Sephadex C50 2,5 X 85 12 mL/h Gradient de Na Cl 0,1-0,7 M 1300 mL	S G 50F 2,6 X 60	1-24 26-50 52-67 69-125 1-50 52-125 26-125
H2B	S. P. V 8 pH 4,0 1/50 18 h	40 mg	P 6 2,6 X 170 13 mL/h	S G 50F 2,6 X 90	1-35 36-76 77-93 94-113 114-125
H2B	Chymotrypsine pH 5,0 1/5000 2,5 h	50 mg	P10 5 X 140 50mL/h		1-40 41-121 1-42 43-121 1-121
H2B	Chymotrypsine Na Cl 0,5 M pH 8,5 1/1000 - 1h	100 mg	S G 100 Deux colonnes de 5 X 90 en série 45mL/h	S G 50F 2,6 X 190	1-83 84-121

PEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQKKDGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTIT
 59↓ 63↓
 SREIQTAVRILLPGELAKHAVSEGTKAVTKYTSSK

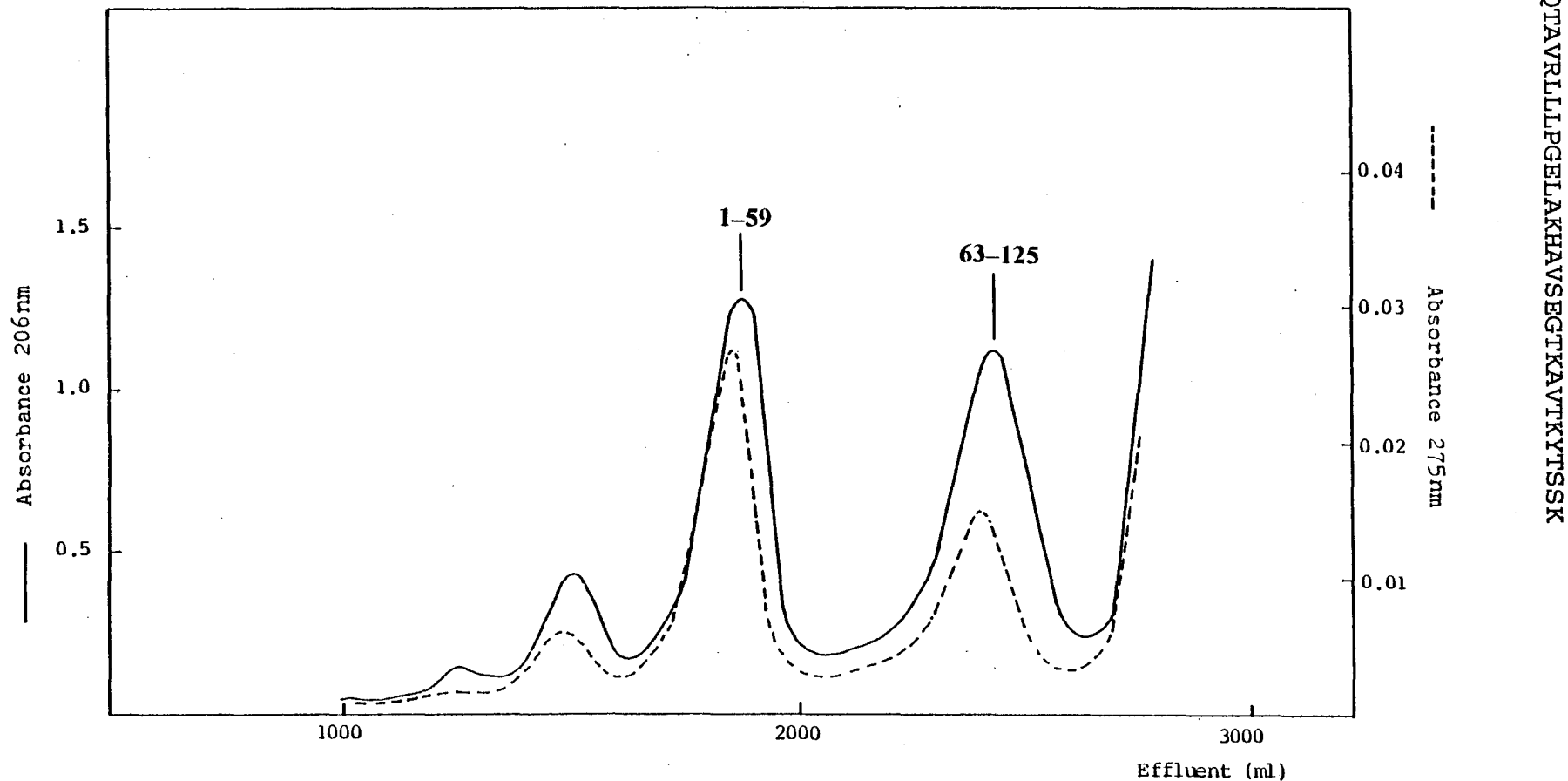


Figure V. 1 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par coupure au bromure de cyanogène. L'hydrolysat (100 mg) a été déposé sur une colonne de Biogel P10, 200 - 400 mesh (5 X 130cm) éluée à un débit de 53 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme. L'absorption de l'éluat est mesurée à 206 et à 275 nm par deux Uvicord S (LKB) couplés en série et équipés chacun d'une cellule de 2,5mm de trajet optique.

petit nombre de peptides. Les résultats expérimentaux concordent avec un traitement théorique, impliquant une cinétique d'ordre I pour chaque site de coupure et une constante de vitesse sensiblement identique pour tous les sites (il n'y a pas de liaison Asp-Pro dans les histones étudiées). Cette méthode a toutefois deux inconvénients :

- le résidu aspartate du site de coupure peut rester attaché à l'un ou à l'autre des deux peptides formés (l'acide aspartique est trouvé plus souvent en position C-terminale qu'en position N-terminale). Avec la prolongation de l'hydrolyse cet acide aspartique tend à être éliminé.
- Il y a possibilité de désamidation des résidus de glutamine et d'asparagine (avec apparition dans ce dernier cas d'un nouveau site d'hydrolyse). Le risque de désamidation augmente avec la durée d'hydrolyse, c'est pourquoi nous n'avons jamais poursuivi l'hydrolyse au delà de 16 heures. Ce temps, qui est insuffisant pour une énucléation totale de tous les résidus acide aspartique (et même pour une coupure totale au niveau de tous les résidus aspartate) conduit à des mélanges complexes.

Diverses méthodes de séparation ont été essayées : Sephadex, Biogel, SP-Sephadex. Sur Biogel P10 les grands peptides de l'histone H2A se répartissent en deux groupes : les peptides 73 - 129 et 91 - 129 sont élués juste après l'histone non hydrolysée, les peptides 1 - 71 et 1 - 89 contenant tous deux les quatre résidus aromatiques existant dans l'histone entière sont élués plus tardivement (figure V. 2). Après plusieurs étapes de chromatographie de tamisage moléculaire (Biogel et Sephadex), le peptide central (73 - 89) donne encore en gel de polyacrylamide plusieurs bandes.

Afin d'obtenir le peptide 73 - 89 sous une forme homogène, nous sommes parti d'un échantillon d'histone qui a été hydrolysé plus longuement (15 heures au lieu de 5 heures, les peptides produits sont alors surtout le 1 - 71, le 73 - 89 et le 91 - 129) cet hydrolysate a été déposé sur une colonne de SP-Sephadex. Ce système, du moins lorsqu'on utilise le chlorure de sodium comme force ionique (nous n'avons pas essayé le chlorure de guanidinium, dans ce cas) convient mal à la purification des peptides N-terminaux (1 - 71 et 1 - 89) qui malgré l'utilisation d'urée 6M et d'un pH acide (3,0) forment sur le diagramme d'éluion un dôme large. Toutefois de ce dôme jaillissent des pics étroits correspondant à l'éluion de peptides

SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLAADVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNK
 ↓ ↓ 72
 ↓ ↓ 90
 LLGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKTESHKAKGK

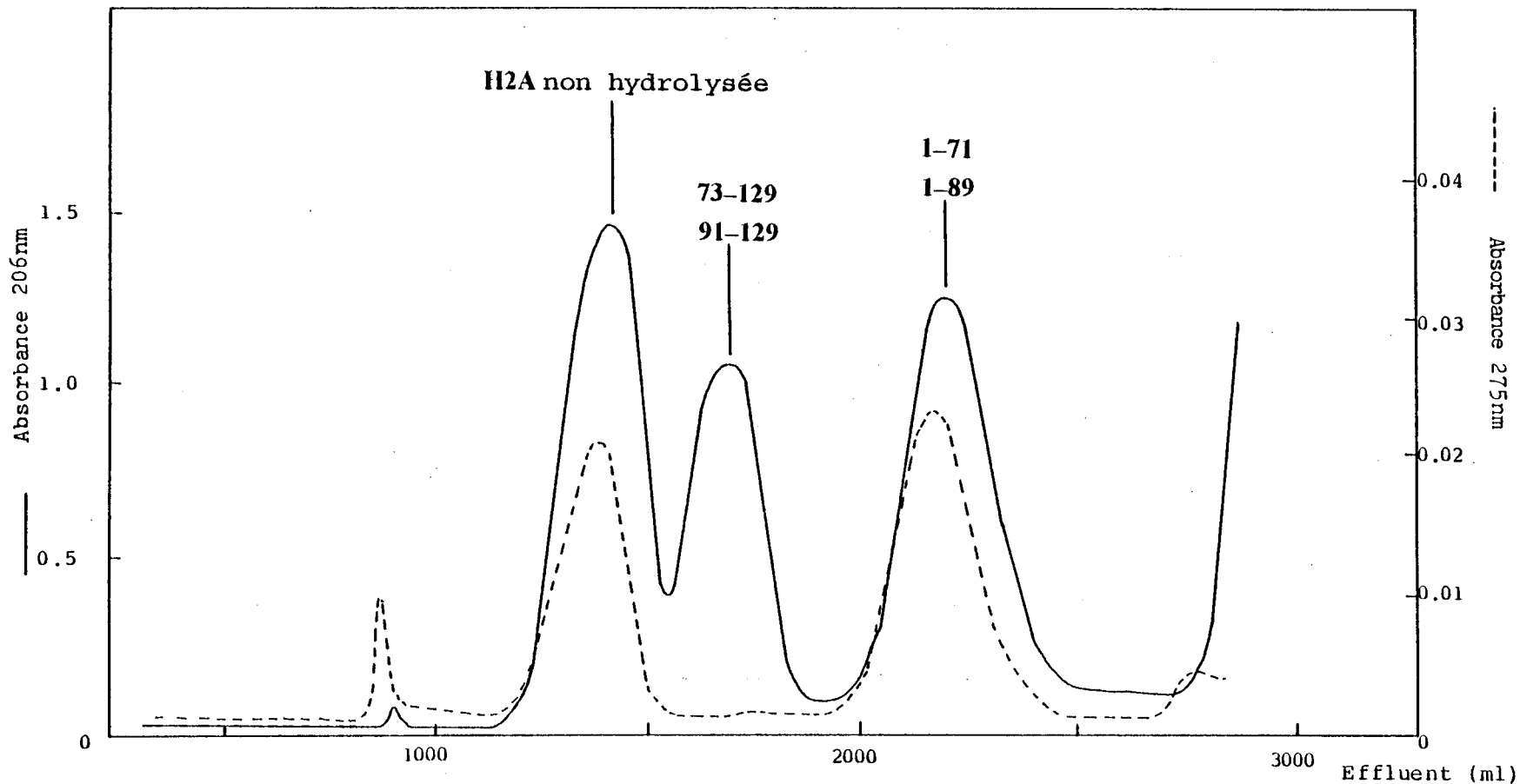


Figure V. 2 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par coupure à l'acide acétique 0,25 M à 105 °C pendant 5 heures. L'hydrolysate (130 mg) a été déposé sur une colonne de Biogel P10, 200 - 400 mesh (5 X 130cm) éluée à un débit de 53 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme. L'absorption de l'éluat est mesurée à 206 et à 275 nm par deux Uvicord S (LKB) couplés en série et équipés chacun d'une cellule de 2,5 mm de trajet optique.

provenant des zones centrales et C-terminales, qui après rechromatographie sur colonne de Sephadex G 50 F ont donné des fractions pures. Nous avons obtenu un peptide dont la composition correspond à celle attendue pour le 73 - 89, une fraction de composition identique sauf en ce qu'elle compte un résidu d'acide aspartique en moins, fraction qui pourrait résulter de la perte d'un des résidus d'asparagine situés aux extrémités du peptide 73 - 89. Le peptide C-terminal semble exister et être fractionné selon trois formes : 90 - 129, 91 - 129 avec l'extrémité N-terminale bloquée et 91 - 129 non bloqué. Le premier peptide résulterait d'une énucléation incomplète du résidu acide aspartique 90. Nous n'avons pas tenté de dégrader les deux peptides 91 - 129 obtenus au cours de cette séparation. Un essai antérieur de comportement du peptide 91 - 129 (obtenu par chromatographie de tamisage moléculaire) en HPLC sur colonne de C18 en milieu acide trifluoroacétique (TFA) 0,05 % - acétonitrile, a conduit à l'obtention de deux pics de composition identique en acides aminés, l'un élué vers 34,5 % d'acétonitrile, dégradable par la méthode d'Edman et l'autre de surface un peu plus importante, élué vers 38 % d'acétonitrile, non dégradable. Nous attribuons ce blocage à la formation d'un résidu de pyroglutamate, mais il faut remarquer que nous avons affaire ici à un résidu d'acide glutamique et non à un résidu de glutamine, résidu pour lequel la cyclisation est un phénomène bien connu.

Le diagramme de séparation sur SP-Sephadex des peptides "acide acétique" de l'histone H2B est montré figure V. 3. Les fractions rassemblées ont été de façon systématique passées en chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Sephadex G 50 F.

Deux points sont à signaler dans la préparation de ces peptides.

- Lors des contrôles électrophorétiques, le peptide 52 - 67 (de même que les peptides 51 - 67 et 52 - 68) n'est jamais coloré par le Bleu de Coomassie.
- Le dernier massif du diagramme (figure V. 3) comprend tous les peptides contenant la région 26 - 50. Il est vraisemblable que la fixation de ces peptides sur la colonne est dictée par le segment très basique 27 - 34 : KKRKRSRK, segment qui par ailleurs détermine la localisation de l'histone H2B dans le noyau (MORELAND *et al.*, 1987).

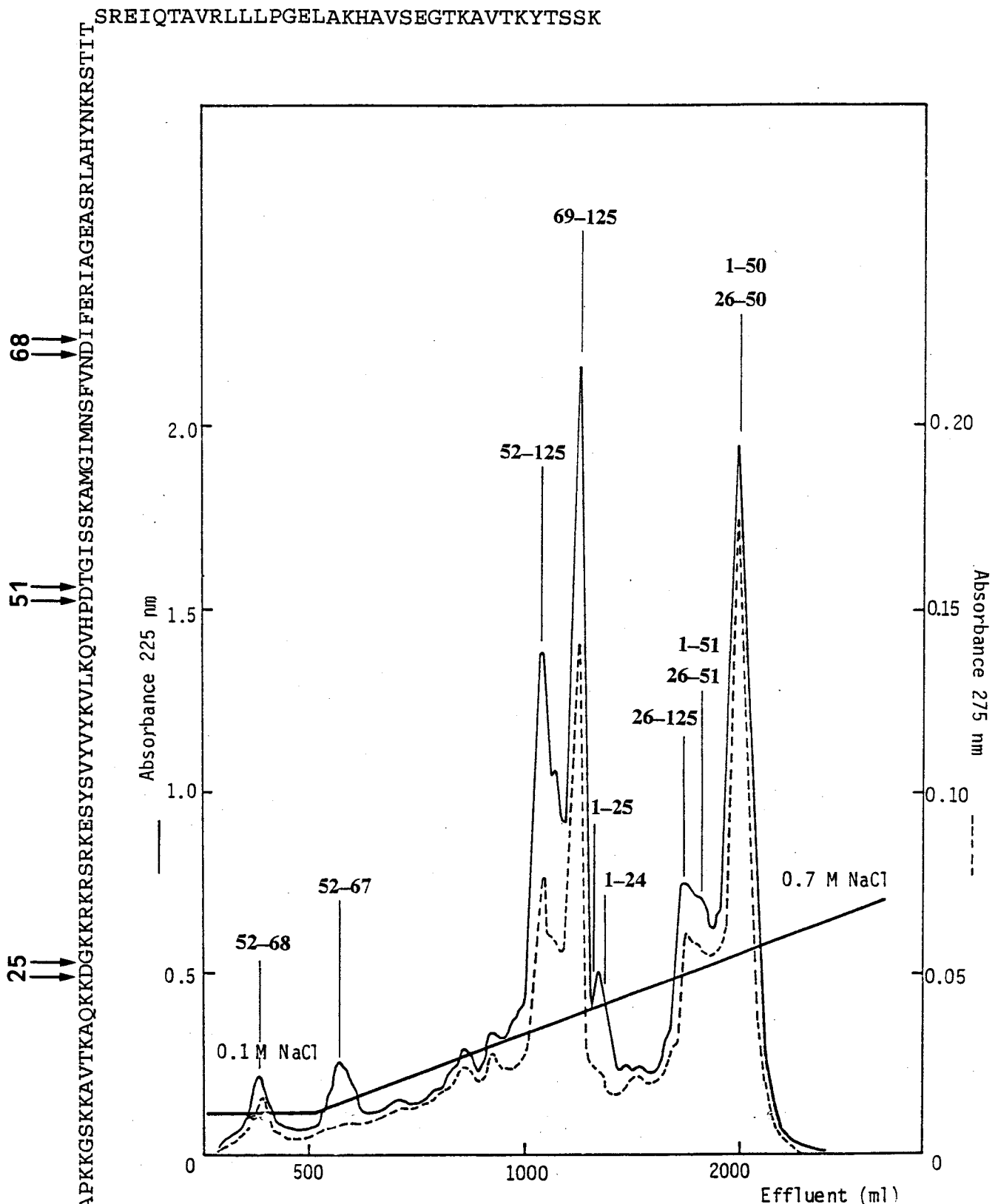


Figure V. 3 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par coupure à l'acide acétique 0,25 M à 105 °C pendant 16 heures. L'hydrolysate (100 mg) a été déposé sur une colonne de SP-Sephadex C50 (2,5 X 85 cm) équilibrée en milieu Na Cl 0,1 M, urée 6 M, pH 3,0 et éluée par un gradient de Na Cl de 0,1 à 0,7 M, urée 6 M, pH 3,0 (volume total : 1300 ml) débit : 13 ml/h.

V - 2 - 3. HYDROLYSE DES HISTONES H2A ET H2B PAR LA PROTÉASE DE STAPHYLOCOQUE, SOUCHE V8.

Selon HOUMARD et DRAPEAU (1972) l'enzyme coupe uniquement les liaisons glutamate lorsqu'elle est utilisée à pH 7,8 en tampon bicarbonate d'ammonium ou à pH 4,0 en tampon acétate d'ammonium. A ce dernier pH certaines liaisons glutamate ont été épargnées (H2A : Glu₄₀-Arg₄₁, Glu₉₁-Glu₉₂, Glu₁₂₁-Ser₁₂₂ ; H2B : Glu₇₁-Arg₇₂, Glu₁₀₅-Leu₁₀₆) ces mêmes liaisons sont hydrolysées lorsque l'enzyme est employée à pH 7,8.

Les diagrammes d'élution sur Biogel sont présentés dans les figures V. 4 et V. 5 ; les peptides contenant des résidus aromatiques sont élués à des volumes nettement supérieurs aux volumes théoriques correspondant à leurs masses molaires.

V - 2 - 4. HYDROLYSE DE L'HISTONE H2A PAR LA PEPSINE.

Cette hydrolyse est à la fois susceptible de produire des peptides moyens convenant particulièrement bien pour les études immunologiques, et des peptides courts.

Dans le but d'obtenir des diagrammes d'élution plus simples lors des étapes chromatographiques ultérieures, l'hydrolysate a été d'abord passé sur une colonne de Sephadex G 25. Cette étape permet à la fois l'élimination des petits peptides (< 15 résidus) et de l'acide formique utilisé dans le milieu d'hydrolyse.

La séparation des peptides a été ensuite conduite selon le schéma utilisé pour le fractionnement des "peptides obtenus par coupure à l'acide acétique" de l'histone H2B. Une étape de chromatographie sur échangeur d'ions SP-Sephadex, suivie du passage systématique des fractions rassemblées sur une colonne de tamisage moléculaire Sephadex G 50 F.

Le fractionnement sur colonne SP-Sephadex est présenté figure V. 6. Tandis que l'enregistrement à 224nm permet de suivre l'élution de l'ensemble des peptides, la lecture à 275nm permet de visualiser les deux peptides (1 - 51 et 1 - 39) contenant des résidus de tyrosine, les deux pics correspondant sont précédés chacun d'un petit pic. Ce petit pic qui, après hydrolyse totale acide, présentent une composition identique à celle du pic principal pourrait résulter de la préexistence d'une forme modifiée de l'histone H2A.

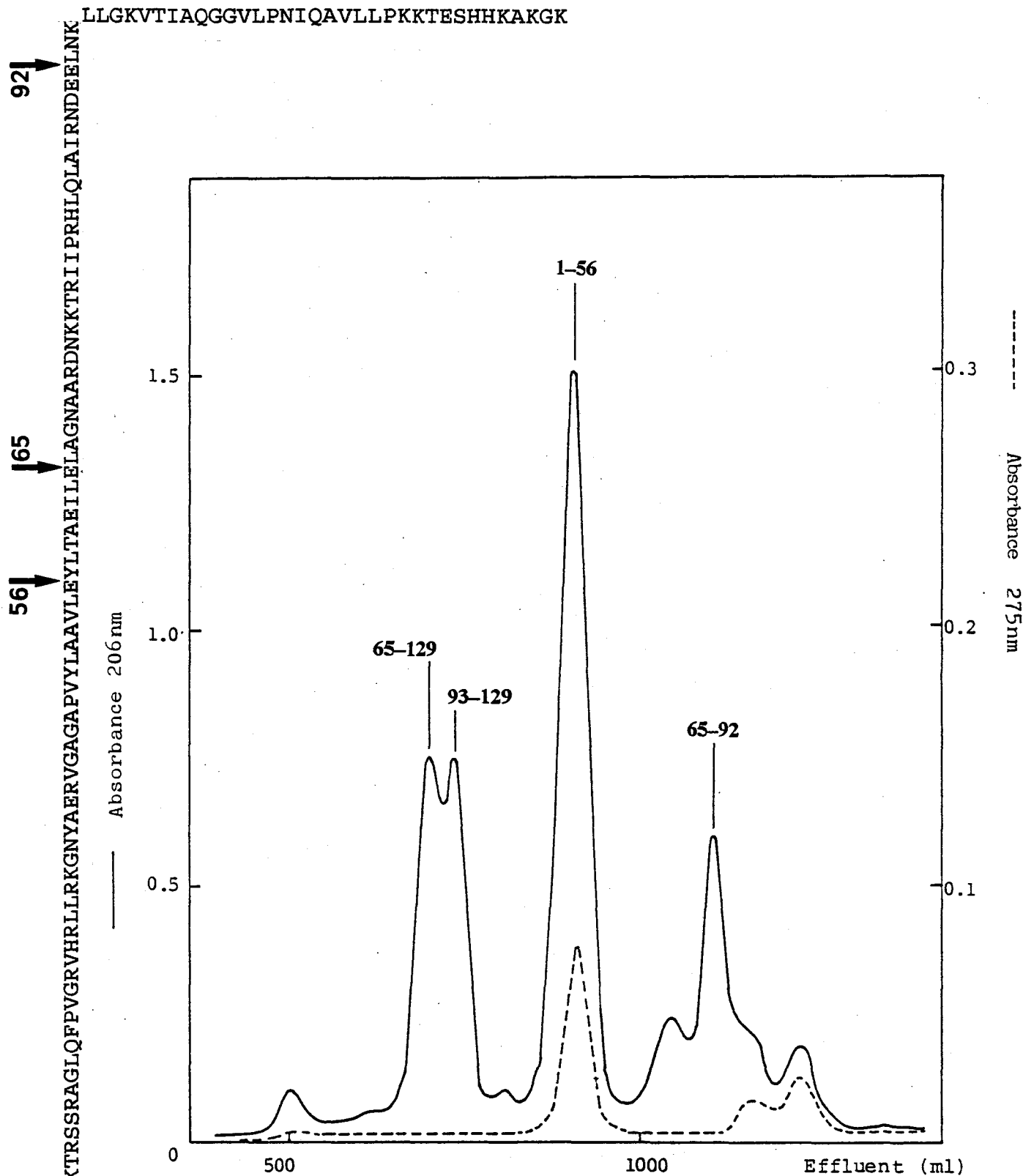


Figure V. 4 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par action de la protéase de staphylocoque V8 à pH 4,0. L'hydrolysate (60 mg) a été déposé sur une colonne de Biogel P10, 200 - 400 mesh (2,6 X 190cm) éluée à un débit de 19 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme.

PEPAKSAPAPKKGSKKAVTKAQQKKGKKRKRSRKESYSVYVYKVLKQVHPDTGISSKAMGIMNSFVNDIFERIAGEASRLAHYNKRSTIT

35↓

76↓

SREIQTAVRLLLPGELAKHAVSEGTAKAVTKYTTSSK
 93↓
 113↓

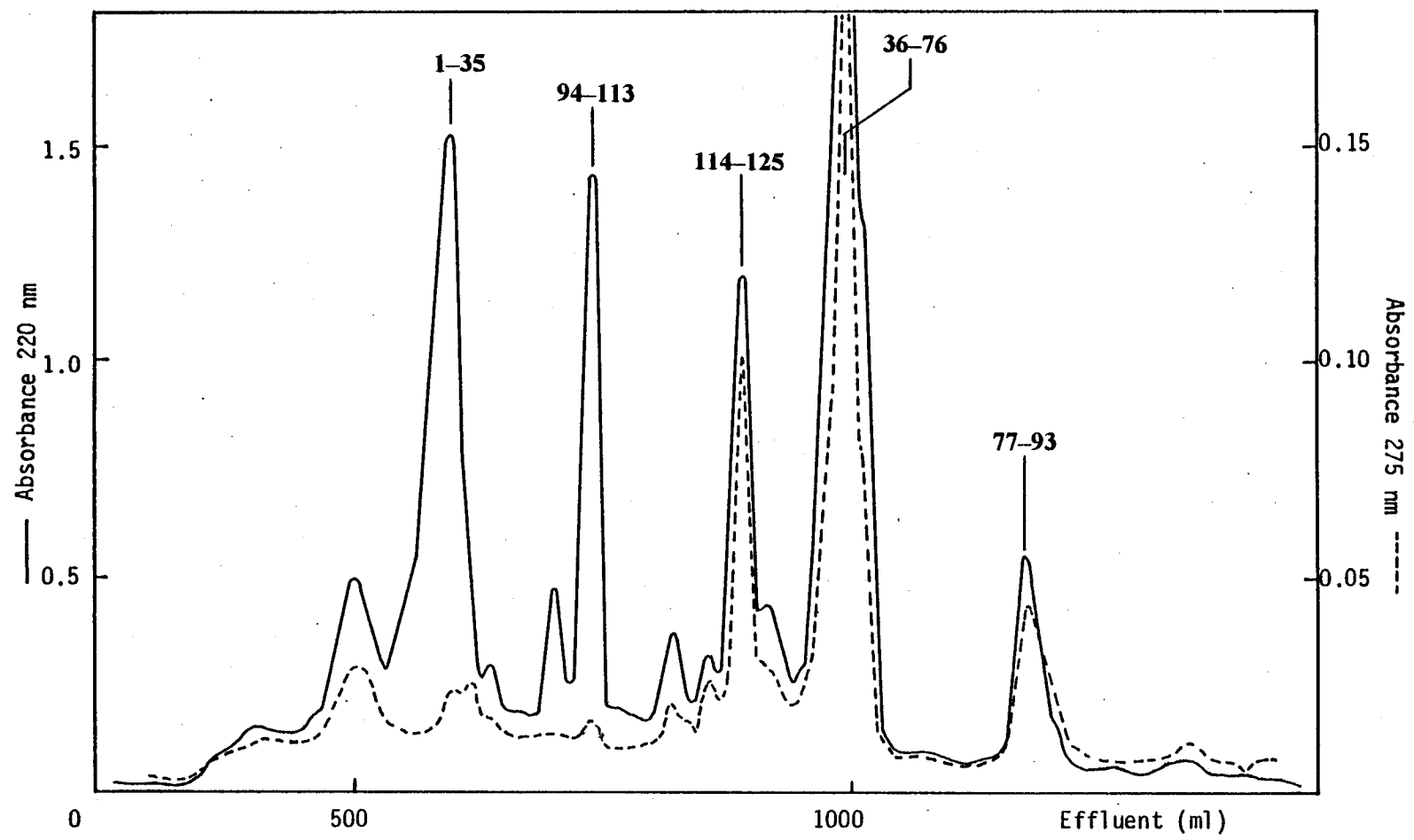


Figure V. 5 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par action de la protéase de staphylocoque V8 à pH 4,0. L'hydrolysate (40 mg) a été déposé sur une colonne de Biogel P6, minus 400 mesh (2,6 X 170cm) éluée à un débit de 13 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme.

SGRGKQGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLLRKGNYAERVGAGAPVYLAADVLEYLTAELLELAGNAARDNKKTRIIPRHLQLAIRNDEELNK

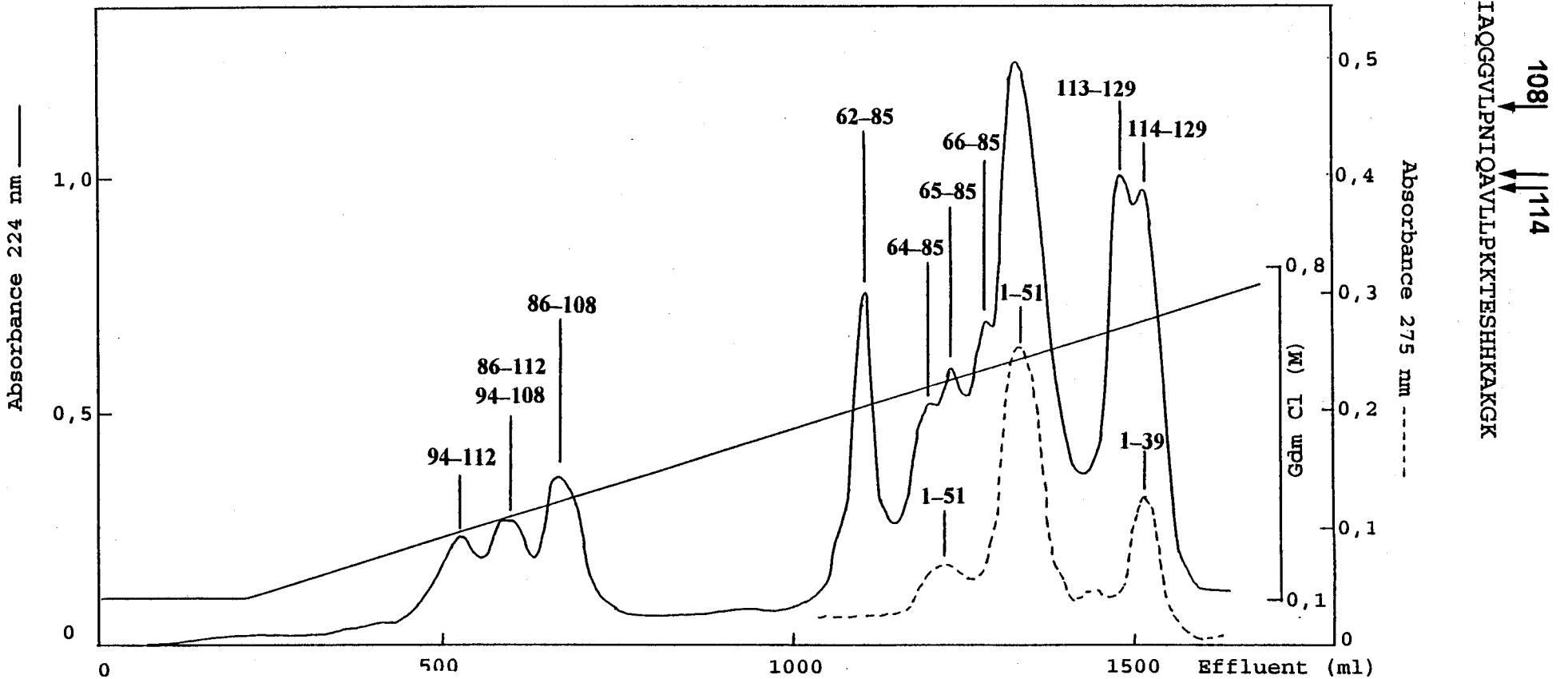


Figure V. 6 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par action de la pepsine. L'hydrolysate (200 mg) a été déposé sur une colonne de SP-Sephadex C25 (2,5 X 85 cm) équilibrée en milieu chlorure de guanidinium (gdm Cl) 0,1 M, urée 6 M, pH 3,0 et éluée par un gradient de gdm Cl de 0,1 à 1,0 M, urée 6 M, pH 3,0 (volume total : 2000 ml) débit : 13 ml/h. Les absorbances à 224 et à 275 nm correspondent respectivement à une cellule de 0,25 et à une cellule de 1 cm.

V - 2 - 5. HYDROLYSE DE L'HISTONE H2B PAR LA CHYMOTRYPSINE A pH 5,0.

Avec ce type d'hydrolyse nous abordons les méthodes d'hydrolyse limitée. Les conditions expérimentales qui influencent ce type d'hydrolyse agissent à la fois au niveau de l'enzyme et au niveau de la protéine substrat :

- Hydrolyse préférentielle de certaines liaisons selon le tampon, le pH, la force ionique, la température.
- Hydrolyse séquentielle de certains sites. L'ordre de coupure, d'abord pleinement dépendant de la structure spatiale de la protéine dépend ensuite de la structure spatiale des peptides formés. Il résulte que tous les facteurs susceptibles de modifier les structures secondaire, tertiaire et quaternaire peuvent avoir une action sur le résultat final.

Lors de l'hydrolyse de l'histone H2B par la chymotrypsine, OHE *et al.* (1979) qui emploient des conditions d'hydrolyse plus dures que nous (rapport enzyme/substrat 1/100, une heure à 15 °C) obtiennent une coupure totale et très spécifique au niveau des résidus de tyrosine 40, 42 et 121. Avec des conditions plus douces (enzyme/substrat 1/5000, 2 heures 30 minutes à 20 °C) la coupure au niveau des tyrosines 40 et 42 a été partielle. Les peptides 1 - 40, 1 - 42, 41 - 121 et 43 - 121 ont été obtenus (figure V. 7).

V - 2 - 6. HYDROLYSE ENZYMATIQUE EN MILIEU NaCl 0,5M.

Nous avons fait une utilisation générale de la méthode employée pour l'obtention de la zone globulaire de l'histone H1 par HARTMAN *et al.* (1977). Ces auteurs font agir la trypsine en faible concentration sur l'histone placée dans un milieu favorable à la structuration. Nous avons augmenté le pH de 8,0 à 8,5 - 9 dans le but de favoriser la coupure des liaisons arginyle (avec la trypsine) ou histidyle (avec la chymotrypsine).

Hydrolyse des histones H2A et H2B par la chymotrypsine.

Ce système nous a fourni le peptide 32 - 129 (H2A) (figure V. 8) résultant de l'hydrolyse de la liaison His₃₁-Arg₃₂. Nous n'avons pas obtenu de coupure au niveau des résidus de tyrosine, bien que la liaison Tyr₃₉-Ala₄₀ soit un site de coupure lorsque la chymotrypsine est utilisée dans les conditions habituelles (YEOMAN *et al.*, 1972 ; SAUTIÈRE *et al.* 1974).

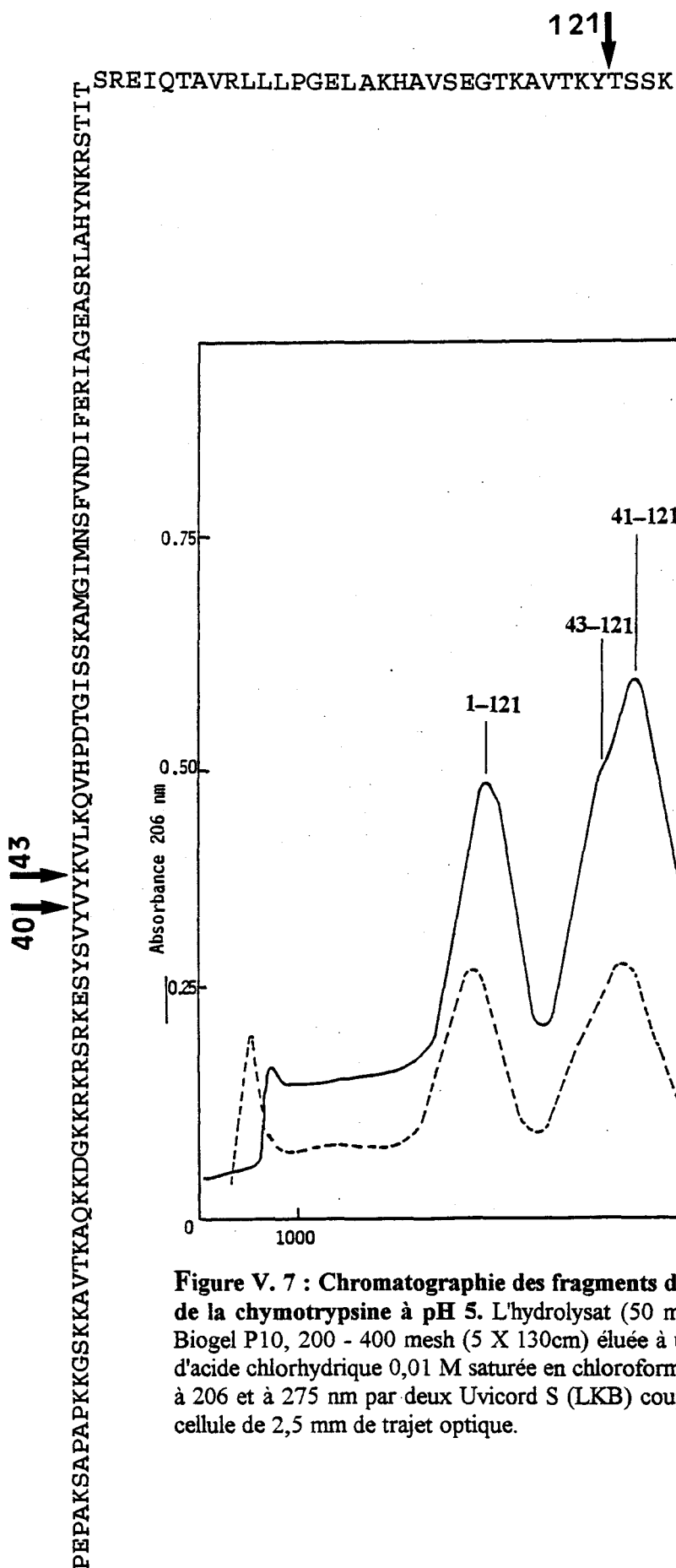


Figure V. 7 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par action de la chymotrypsine à pH 5. L'hydrolysate (50 mg) a été déposé sur une colonne de Biogel P10, 200 - 400 mesh (5 X 130cm) éluée à un débit de 53 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme. L'absorption de l'éluat est mesurée à 206 et à 275 nm par deux Uvicord S (LKB) couplés en série et équipés chacun d'une cellule de 2,5 mm de trajet optique.

↓ 32

SGRGKQGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGNYAERVGAGAPVYLA AVLEYLTAEILELAGNAARDNKKTRI I PRHLQLAIRNDEELNK
 ILGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKTESHKAKGK

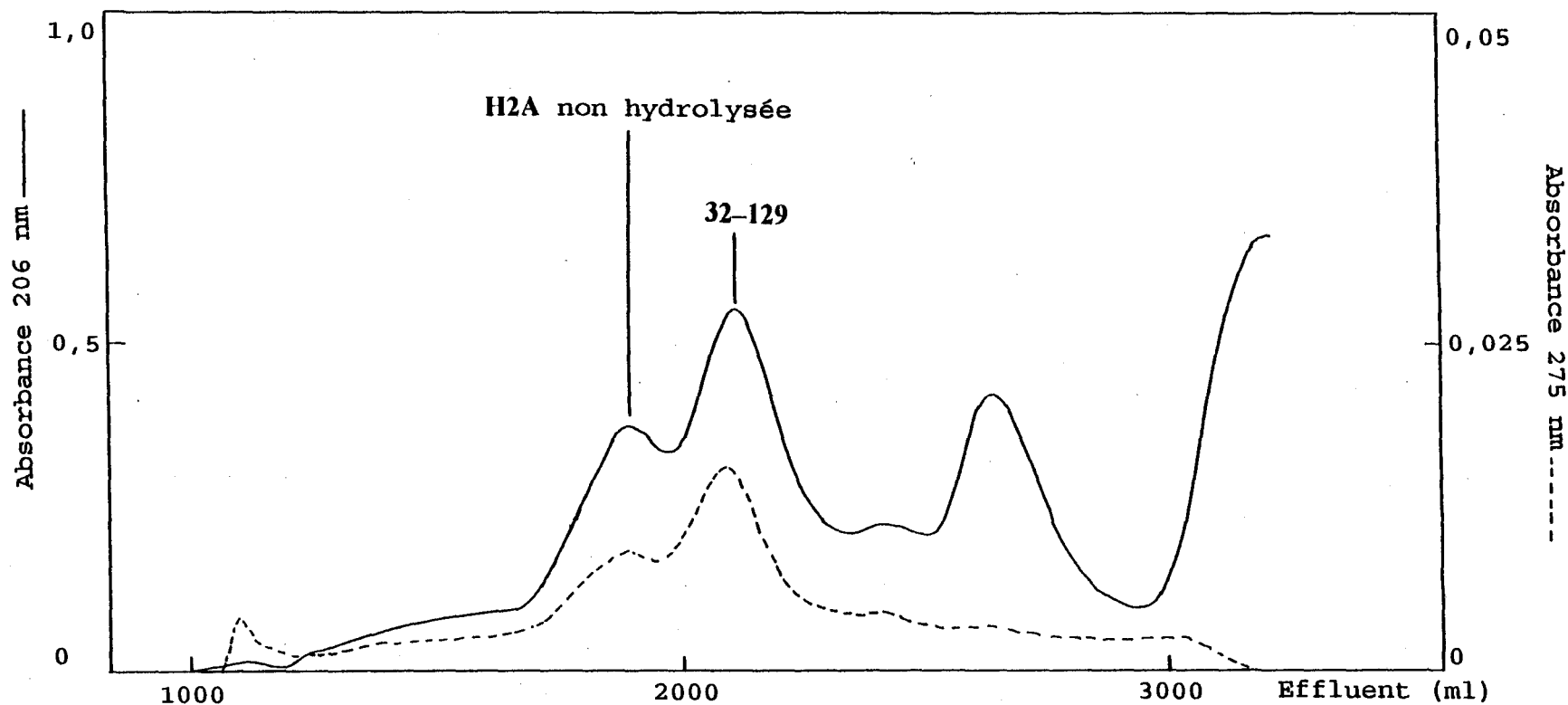


Figure V. 8 : Chromatographie des fragments de l'histone H2A obtenus par action de la chymotrypsine à pH 9. A partir de 65 mg d'hydrolysate la séparation a été effectuée sur deux colonnes de Sephadex G 100 (5 X 90 cm) couplées en série et éluées à un débit de 45 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme. L'absorption de l'éluat est mesurée à 206 et à 275 nm par deux Uvicord S (LKB) équipés respectivement d'une cellule de 2,5mm et d'une cellule de 5 mm de trajet optique.

ILGKVTIAQGGVLPNIQAVLLPKTESHKAKGK

L'hydrolyse de l'histone H2B dans ces mêmes conditions fournit le peptide 1 - 83 (figure V. 9). Il y a donc, lorsqu'on augmente la force ionique et le pH, masquage des sites de coupure de la zone 40 - 42 et démasquage du site Tyr₈₃-Asn₈₄.

L'action sur les résultats de l'hydrolyse, d'une force ionique et d'un pH élevés, peut s'expliquer avec deux types d'arguments :

- Les histones ont dans ces conditions une teneur plus grande en structure organisée, qui coïncide ou non avec une augmentation de la concentration en dimères, tétramères et autre polymères ; ceci peut entraîner l'inaccessibilité de certains sites. La non hydrolyse au niveau des résidus de tyrosine 40 et 42 de l'histone H2B pourrait ainsi correspondre à la formation de structure β , le segment 39 - 48 est prédit en feuillets β par FASMAN *et al.* (1976). D'une façon plus précise, la polymérisation des histones dans ce milieu donnerait les structures en bâtonnets de 22 Å de diamètre et en fibres de 44 Å de diamètre observées par SPERLING et BUSTIN (1975) ; ce seraient ces structures, ou leurs ébauches qui seraient attaquées par l'enzyme.

- Les cinétiques d'hydrolyse que nous avons réalisées indiquent d'une façon générale que l'hydrolyse enzymatique d'une histone se fait avec un certain ordre. Après une ou deux coupures dans la protéine, l'un des fragments formés peut être hydrophobe et s'agréger, agrégation favorisée par le milieu utilisé. Le peptide concerné est alors protégé des attaques ultérieures de l'enzyme.

Hydrolyse du complexe H2A-H2B par la trypsine.

Le fractionnement de l'hydrolysate sur Biogel P10 (figure V. 10) permet la séparation des grands fragments produits en deux groupes :

- 1^{er} groupe : peptides de l'histone H2A (4 résidus aromatiques / peptide).
- 2^{ème} groupe : peptides de l'histone H2B (7 résidus aromatiques / peptide).

Chaque groupe de peptides est ensuite passé sur une colonne de Sephadex G 100. Nous avons isolé les peptides 20 - 128 (H2A), 20 - 129 (H2A) et 32 - 125 (H2B).

Les sites d'action des enzymes sur le complexe H2A-H2B et sur les histones H2A et H2B prises isolément sont différents. Dans le complexe il y a protection de certaines régions contre l'hydrolyse, notamment au niveau des séquences voisines des arginines 32 et 81 de l'histone H2A, qui sont hydrolysées rapidement dans le cas de l'histone isolée.

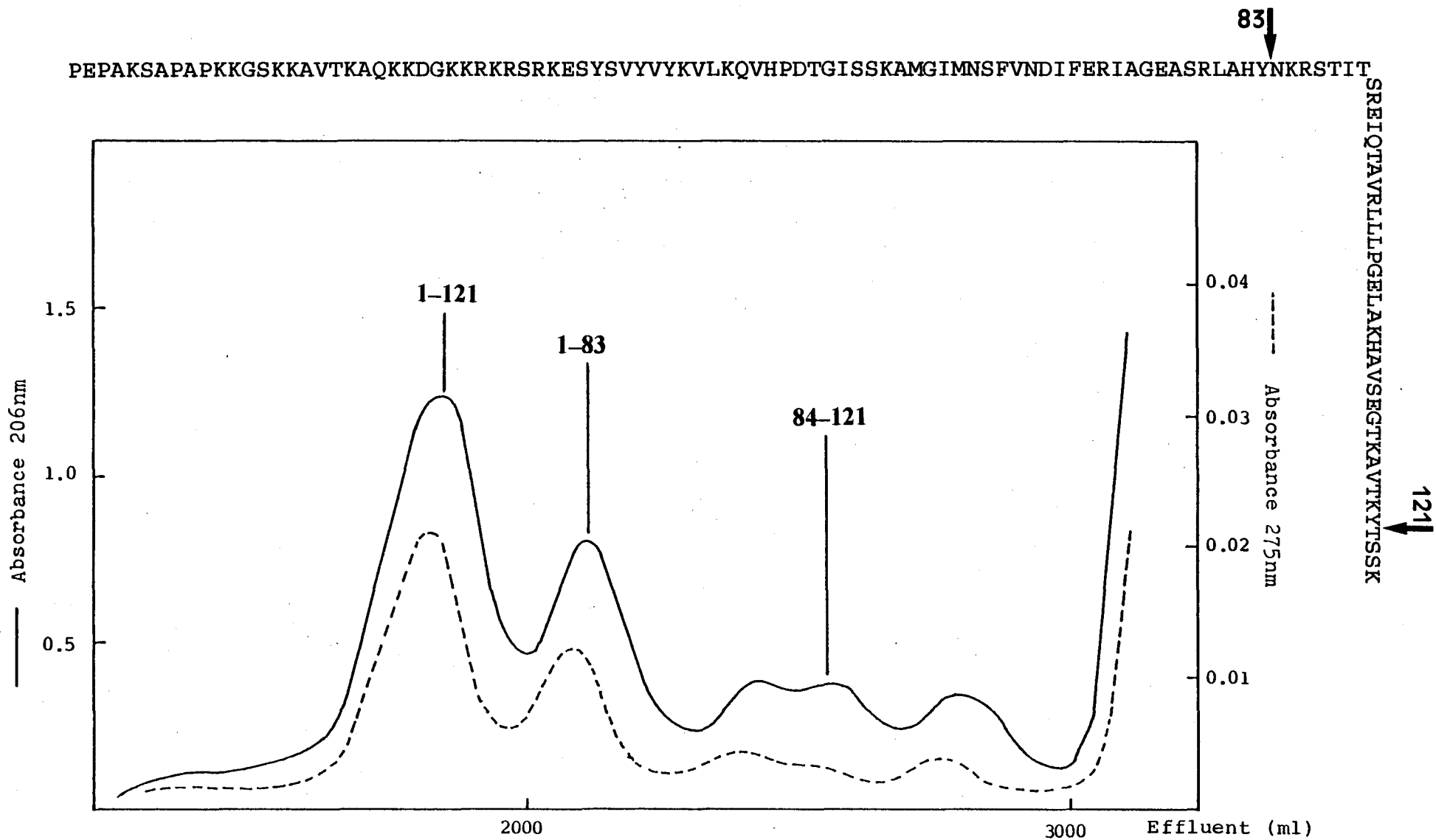


Figure V. 9 : Chromatographie des fragments de l'histone H2B obtenus par action de la chymotrypsine à pH 8,5. A partir de 100 mg d'hydrolysate la séparation a été effectuée sur deux colonnes de Sephadex G 100 (5 X 90cm) couplées en série et éluées à un débit de 45 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme. L'absorption de l'éluat a été mesurée à 206 et à 275 nm par deux Uvicord S (LKB) équipés respectivement d'une cellule de 2,5 mm et d'une cellule de 5 mm de trajet optique.

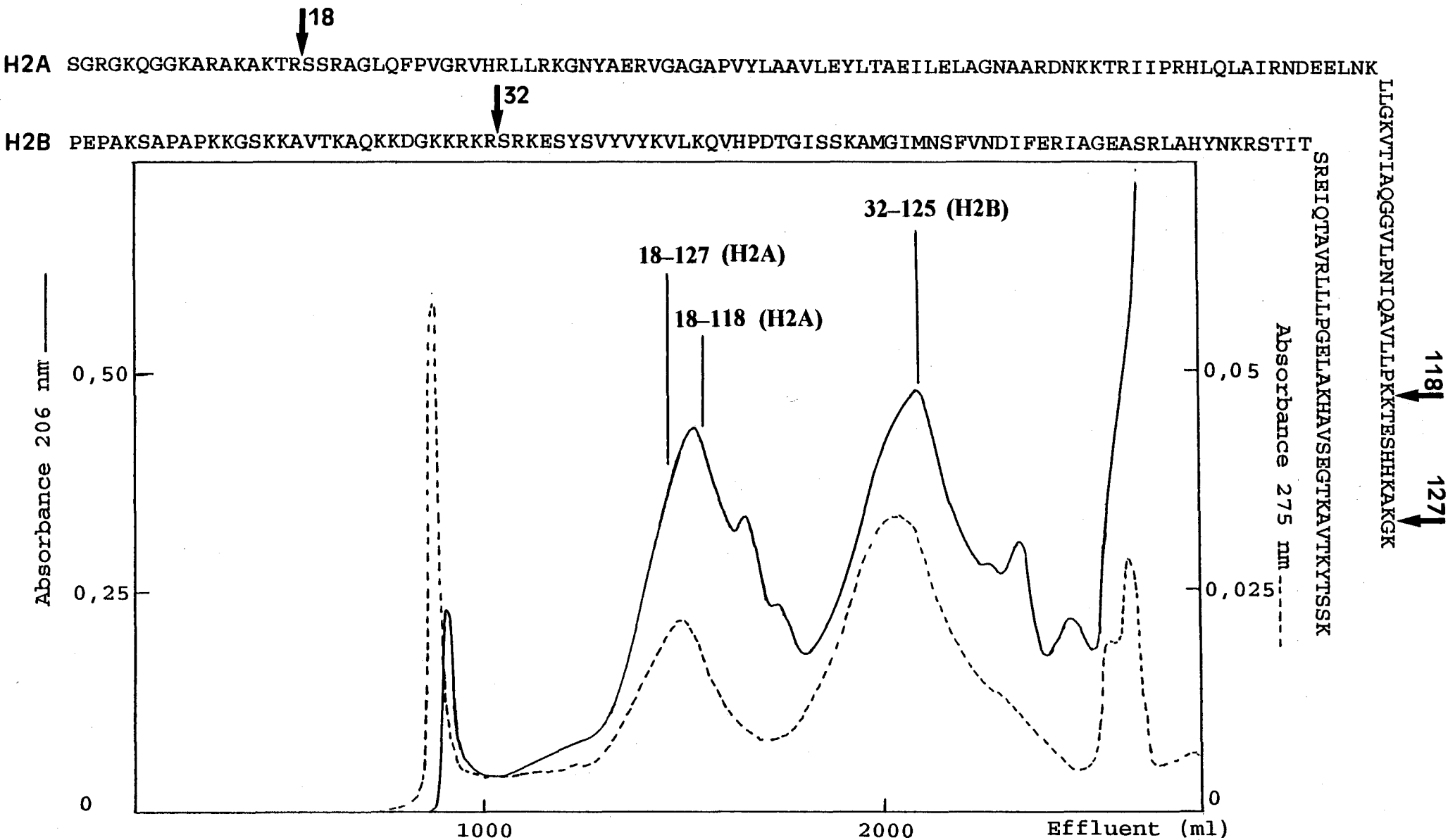


Figure V. 10 : Chromatographie des fragments obtenus par action de la trypsine sur le complexe H2A-H2B. L'hydrolysate (80 mg) a été déposé sur une colonne de Biogel P10, 200 - 400 mesh (5 X 130cm) éluée à un débit de 70 ml/h. par une solution d'acide chlorhydrique 0,01 M saturée en chloroforme. L'absorption de l'éluat a été mesurée à 206 et à 275 nm par deux Uvicord S (LKB) équipés respectivement d'une cellule de 2,5 mm et d'une cellule de 5 mm de trajet optique.

Chapitre VI : Structure secondaire et immunologie des histones H2A et H2B, et de leurs peptides.

Nous présentons ces deux approches dans le même chapitre. Les propriétés immunologiques d'un peptide ou d'une protéine dépendent étroitement de la structure spatiale. La structure spatiale d'un fragment de protéine dépend de son environnement. C'est à dire qu'une portion de séquence donnée d'histone peut adopter des structures spatiales diverses selon qu'elle fait partie d'un fragment court (environ 30 résidus) d'un fragment long (environ 80 résidus) de la protéine entière ou d'un complexe.

Nous avons effectué la partie "dichroïsme circulaire" de ce travail dans le laboratoire de M.-H. LOUCHEUX, avec ses conseils et l'aide de son équipe. La partie "préparation de peptides synthétiques" et la partie "immunologie" proprement dite ont été réalisées dans les laboratoires de M. H. V. VAN REGENMORTEL à Strasbourg (voir : MULLER et VAN REGENMORTEL, 1989) et de M. J. FRITZLER à Calgary (Canada).

VI - 1. ÉTUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE.

VI - 1 - 1. GÉNÉRALITÉS.

La chromatine native et les systèmes étudiés *in vitro* qui s'en approchent le plus, nucléosomes, octamères d'histones, complexes H2A-H2B et H3-H4 dans certaines conditions, contiennent peu de structure β mais jusque environ 50 % de structure en hélice (THOMAS, G. J. *et al.*, 1977 ; BIDNEY et REECK, 1977 ; BEAUDETTE *et al.*, 1981).

Les travaux sur la structure des histones isolées font état à la fois de structure α et de structure β . Si à partir d'une histone en solution dans l'eau, non structurée, on augmente la force ionique, la formation de structure en hélice α se fait instantanément. Cette "étape rapide" est suivie de la formation de structure β , "étape lente", qui peut être suivie au cours du temps. Ce dernier type de structure apparaît en même temps que la formation de grands

polymères d'histones, ceux-ci en équilibre avec des formes plus simples, monomères, dimères, tétramères (WICKETT *et al.*, 1972 ; D'ANNA et ISENBERG, 1972, 1974a, 1974b).

La structure β correspond surtout à l'existence *in vitro* d'histones individuelles. Dans la cellule, étant donné l'aptitude des histones à former les complexes H2A-H2B et H3-H4, il est probable que dès le cytoplasme ces complexes sont formés. Il y a donc en fait peu de structure β dans les systèmes physiologiques.

Nos travaux de biophysique sur les histones ont fait appel pour une large part au dichroïsme circulaire, technique de choix pour l'étude des protéines contenant surtout de la structure en hélice.

Localisation des hélices. La fragmentation d'une protéine et la détermination du nombre de résidus en hélice de chaque fragment permet dans une certaine mesure de localiser les hélices α .

Il faut remarquer qu'après coupure d'une protéine en fragments la somme des résidus en hélice des fragments est souvent inférieure au nombre total de résidus en hélice contenus dans la protéine native. Ceci résulte soit de la coupure à l'intérieur d'une hélice, soit le plus souvent de la coupure entre zones organisées, qui dans la protéine se stabilisent l'une l'autre, par des interactions hydrophobes, par exemple.

Rôle de la force ionique dans la structuration de l'histone. D'un point de vue théorique une augmentation de la force ionique peut renforcer ou diminuer la structuration en hélice α :

- Une augmentation de la force ionique favorisera les interactions entre chaînes latérales des acides aminés hydrophobes. Ces interactions peuvent exister à l'intérieur d'une même hélice (interactions entre les résidus i et les résidus $i + 3$ et $i + 4$ notamment) ou entre deux hélices. Ces interactions peuvent stabiliser aussi les feuilletts β (interactions entre résidus i et $i + 2$) ou provoquer la formation d'agrégats.
- Une augmentation de la force ionique diminuera la répulsion entre deux acides aminés chargés de même signe, et à l'opposé tendra à rompre la liaison entre la chaîne latérale d'un acide aminé acide et la chaîne latérale d'un acide aminé basique, type de liaison qui stabilise

une hélice lorsqu'il concerne des résidus acides aminés situés en position i et $i + 3$ ou $i + 4$ (MARQUSEE et BALDWIN, 1987 ; PERUTZ et FERMI, 1988 ; SUNDARALINGAM *et al.*, 1987).

- La force ionique interviendra encore dans les interactions entre les acides aminés chargés et les extrémités des hélices. Dans la structure hélicoïdale, les liaisons peptidiques ont leurs moments dipolaires alignés presque parallèlement à l'axe de l'hélice, il en résulte un macrodipôle dont le pôle positif correspond à l'extrémité N-terminale de l'hélice et le pôle négatif à l'extrémité C-terminale (revue : HOL, 1985). Une augmentation de la force ionique diminuera l'effet déstabilisant d'un bloc d'acides aminés basiques situé à l'extrémité N-terminale d'une hélice, ou d'un bloc d'acides aminés acides situé à l'extrémité C-terminale. A l'opposé une augmentation de la force ionique tendra à diminuer la cohésion des hélices qui ont leur extrémité N-terminale stabilisée par des acides aminés acides ou leur extrémité C-terminale stabilisée par des acides aminés basiques (FAIRMAN *et al.*, 1989).

Dans le cas des histones dont le rôle est d'interagir avec les acides nucléiques, le mode d'action d'une force ionique élevée peut de plus être comparé au mode d'action des groupements phosphodiester de l'ADN. Les augmentations d'hélicité observées lors de l'addition de chlorure de sodium et lors de la formation de nucléosomes, mettraient en jeu les mêmes mécanismes.

VI - 1 - 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.

Les spectres dichroïques ont été obtenus avec un dichrographe JOBIN-YVON R. J. MARK III. Les mesures ont été effectuées à 4° C à une concentration en peptides ou en protéines de 0,1-1 mg/ml dans une cellule de 0,1-1 mm de trajet optique.

La concentration protéique a été calculée à partir de la valeur de l'absorbance à 275 nm de la solution en prenant comme coefficient d'extinction molaire de la tyrosine $\Sigma = 1350 \text{ L. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Les peptides dépourvus de tyrosine ont été dosés par analyse d'acides aminés.

L'ellipticité (θ) est exprimée en degré. $\text{cm}^2. \text{dmol}^{-1}$. de résidu. Le pourcentage d'hélicité est estimé d'après l'ellipticité à 222 nm, en prenant une valeur de $-30\,000$ pour 100% de

structure en hélices, et en admettant l'existence d'une relation linéaire entre l'ellipticité et le contenu en hélices (CHEN, Y. H. *et al.*, 1974) :

$$\% \text{ d'hélicité} = [\theta_{222} \times 100 / 30000].$$

Le nombre de résidus en hélice d'un peptide (ou d'une histone entière) est égal à :

$$\% \text{ d'hélicité} \times \text{nombre total de résidus d'acide aminé} / 100$$

$$\text{ou à : } [\theta_{222} \times \text{nombre total de résidus d'acide aminé} / 30000]$$

VI - 1 - 3. LOCALISATION DES HÉLICES DANS L'HISTONE H2A.

Les courbes de la figure VI. 1 donnent le nombre de résidus en hélice α , calculé d'après l'ellipticité à 222 nm, en fonction de la concentration en NaCl, pour l'histone H2A et ses peptides. Cette figure est la base de notre discussion sur l'organisation de cette histone.

Les nombres de résidus en hélice, observés dans les divers polypeptides, nous amènent à envisager un modèle d'histone contenant un minimum de trois hélices α (à faible force ionique) :

- L'histone entière contient 27 résidus en hélice, le peptide 32 - 129 contient cinq résidus en hélice en moins. Il y aurait ainsi une première hélice en deça ou au niveau du résidu 32.
- Le peptide 1 - 71 renferme une douzaine d'acides aminés en hélice, le peptide 1 - 56 n'en contient pas (tant que la force ionique est inférieure à 0,6M NaCl). Le segment 57 - 71 formerait ainsi une deuxième hélice.
- Le peptide 73 - 129 contient 6 résidus en hélice alors que le peptide 93 - 129 en contient très peu. Ceci correspond, soit à l'existence d'un segment en hélice dans la zone 73 - 93, soit indique l'existence dans le peptide 73 - 129 d'une hélice stabilisée par la présence à son extrémité N-terminale du bloc de résidus acides aminés dicarboxyliques 90 - 92 Asp-Glu-Glu.

La coupure de l'histone au niveau du résidu aspartate 72 entraîne une diminution globale de l'hélicité de 9 résidus (dans NaCl 0,15 M : histone H2A entière 27 résidus en hélice, peptide 1 - 71 et peptide 73 - 129, 12 et 6 résidus en hélice respectivement, soit un total de 18) qui semble résulter de la suppression des contacts entre hélice(s) de la région N-terminale et hélice(s) de la région C-terminale. Ces contacts, étant donné la facilité avec

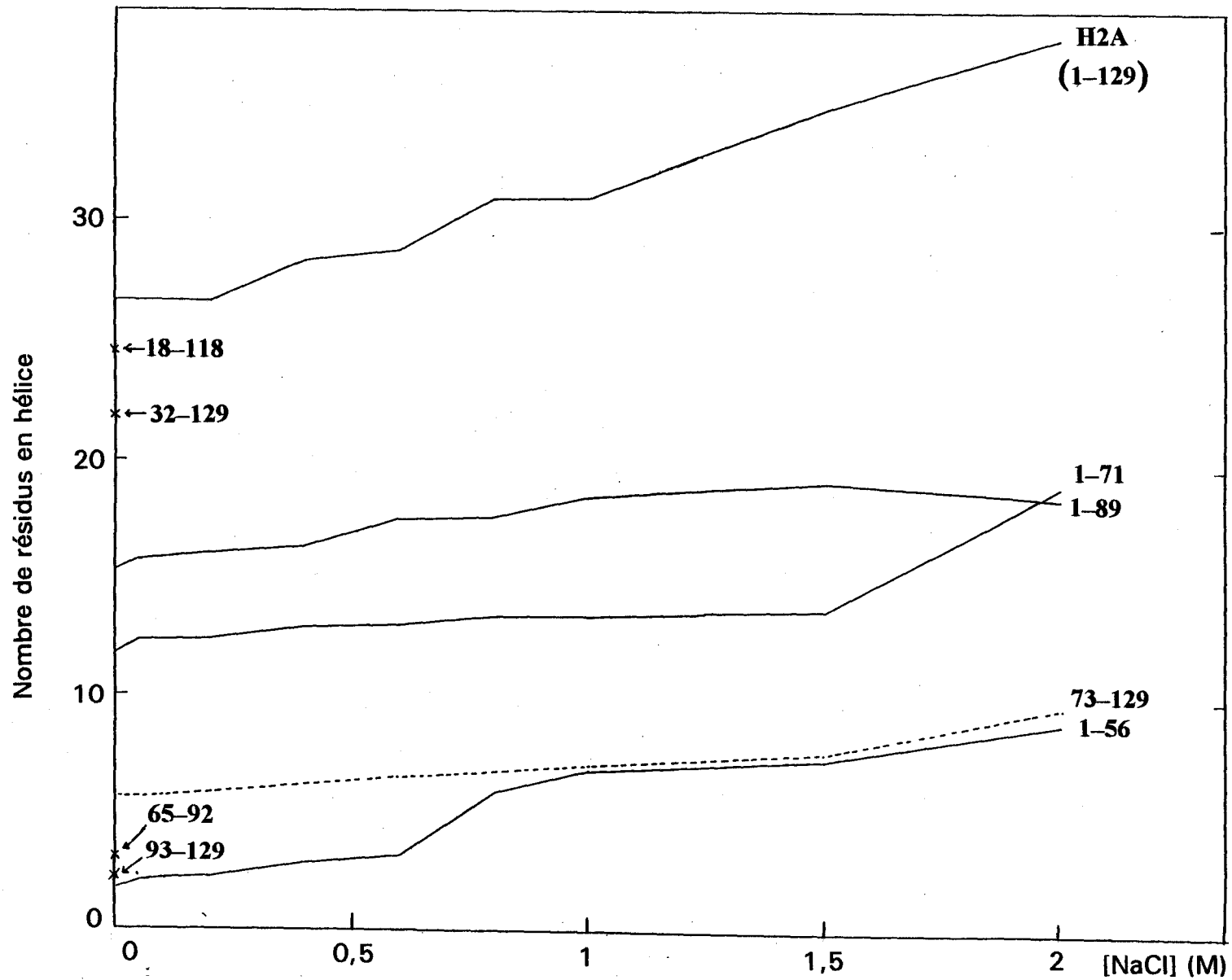


Figure VI. 1 : Nombre de résidus en hélice dans l'histone H2A et dans ses peptides, en fonction de la concentration en Na Cl. Les mesures ont été effectuées en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,5. Les peptides 18-118, 32-129, 65-92 et 93-129 ont été étudiés seulement dans le tampon phosphate.

laquelle l'histone H2A forme des dimères et des tétramères peuvent correspondre, pour cette histone, à des interactions intermoléculaires.

Influence de l'augmentation de la force ionique sur la structure secondaire de l'histone H2A. Lorsque la concentration en NaCl varie de 0 à 2 M le nombre de résidus en hélice α de l'histone H2A augmente linéairement de 27 à 38. Par contre l'hélicité des fragments 1 - 71, 1 - 89 et 73 - 129 augmente peu avec la force ionique. Ceci pourrait signifier que dans cette histone la force ionique agit sur l'hélicité en augmentant les interactions (intra et/ou intermoléculaires) entre les régions N-terminale et C-terminale.

VI - 1 - 4. LOCALISATION DES HÉLICES DANS L'HISTONE H2B.

Structure à force ionique modérée (figure VI. 2). La comparaison des nombres de résidus en hélice α , de l'histone entière, du peptide 32 - 125 et du peptide 43 - 121 (respectivement 25, 29 et 18 dans 0,15 M NaCl) met en évidence à la fois, la non organisation de la région 1 - 32 et l'existence de résidus en hélice (au maximum 7 résidus dans 0,15M NaCl) dans la zone 33 - 42. Le fait que le fragment 1 - 59 ne se structure pas (ou peu) en hélice signifie que la structuration en hélice de la zone 32 - 42 est conditionnée par des interactions avec des acides aminés situés au-delà du résidu 59.

Le peptide 1 - 83 contient (dans 0,15M NaCl) 15 résidus en hélice α soit 10 de moins que l'histone entière. Ceci s'explique par l'existence d'une zone en hélice dans la région 84 - 125. Le fait qu'il n'est pas possible de faire apparaître de l'hélice dans le fragment 84 - 121 signifie que la structuration en hélice dans cette région est conditionnée par des interactions avec des acides aminés de la zone 32 - 83.

Le peptide 63 - 125 contient (dans 0,15M NaCl) 9 résidus en α , soit 9 de moins que le peptide 43 - 121. On peut conclure à l'existence d'hélice α dans la zone 43 - 62.

Seuls les peptides possédant la zone 63 - 83 contiennent un nombre significatif de résidus en hélice. Cette zone clef pourrait correspondre à une hélice centrale interagissant directement ou indirectement avec toutes les autres hélices de la molécule.

Influence de l'augmentation de la force ionique sur la structure de l'histone H2B. Lorsque la concentration en NaCl varie de 0 à 2 M le nombre de résidus en hélice de l'histone H2B passe de 21 à 37. Le peptide 32 - 125 contient pour les forces ioniques

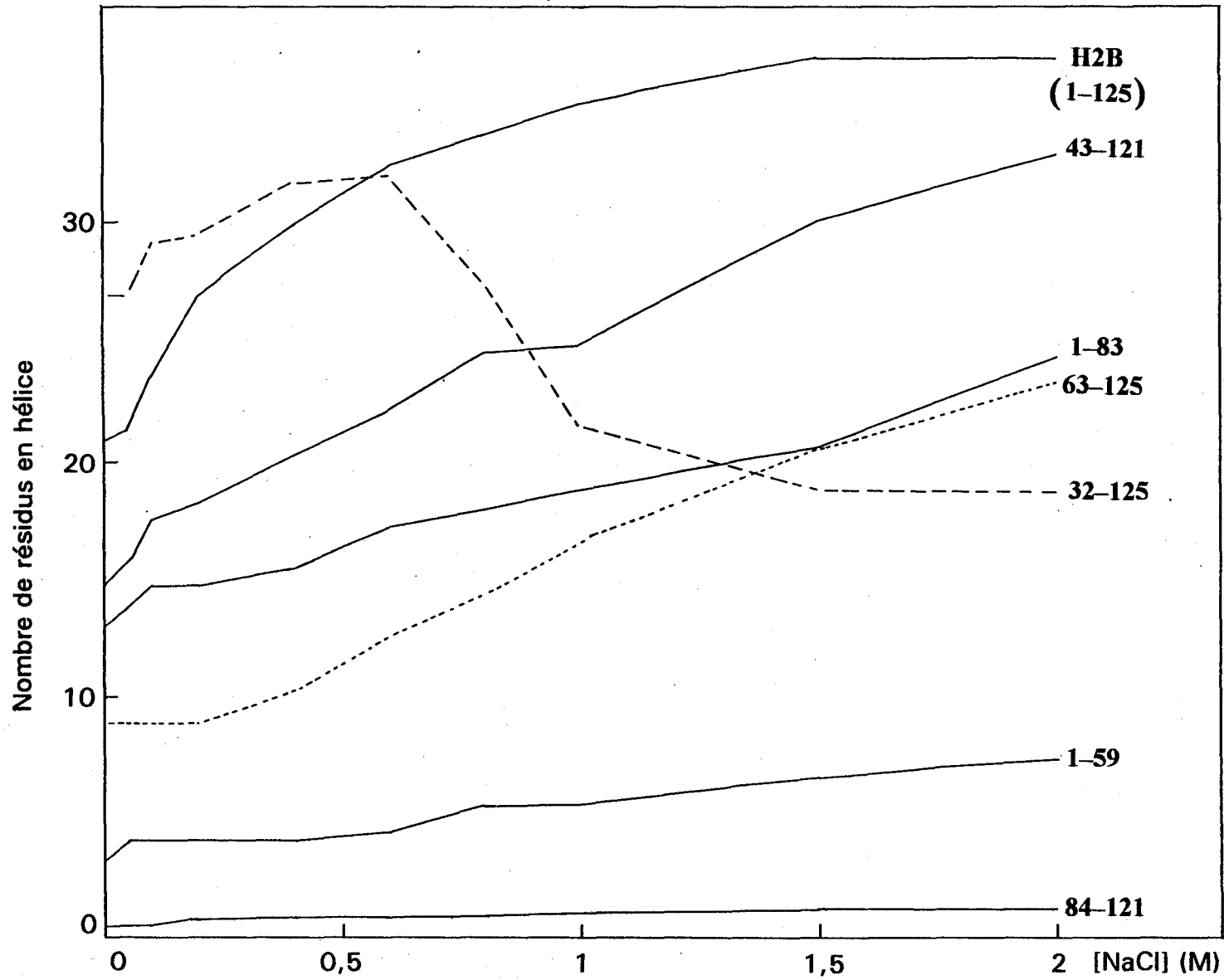


Figure VI. 2 : Nombre de résidus en hélice dans l'histone H2B et dans ses peptides, en fonction de la concentration en Na Cl. Les mesures ont été effectuées en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6,5.

inférieures à 0,6 M plus de résidus en hélice que l'histone entière. La comparaison entre la courbe (figure VI. 2) de l'histone entière et la courbe du peptide 32 - 125 en amont de leur point d'intersection ($\text{NaCl} < 0,6 \text{ M}$) pourrait illustrer l'action défavorable sur la structuration, d'un bloc basique (résidus 27 - 34 notamment) situé à l'extrémité N-terminale d'une zone potentiellement en hélice. La zone descendante de la courbe du peptide 32 - 125 observée pour une force ionique supérieure à 0,6 M correspond à d'autres phénomènes tel que agrégation et formation de feuillets β dans lesquels la région 32 - 42 est alors impliquée.

L'hélicité des peptides 1 - 83, 43 - 121 et 63 - 125 double lorsque la concentration en NaCl passe de 0 à 2 M. Ceci pourrait indiquer que la structure secondaire de l'histone H2B tend à être déstabilisée par des acides aminés chargés (surtout basiques). Les allures différentes des courbes correspondant au peptide 1 - 83 et à l'histone entière, pour des forces ioniques comprises entre 0 et 0,6 M, pourraient signifier que dans le fragment 1 - 83 la zone 32 - 43 n'est pas en hélice, contrairement à ce qui existe dans l'histone entière. L'existence d'une hélice dans cette zone 32 - 43 serait conditionnée par sa possibilité d'interagir avec une hélice située dans la région C-terminale (84 - 121) hélice elle-même en interaction avec l'hélice centrale (zone 63 - 83).

VI - 1 -5. DISCUSSION.

En conclusion, il apparaît que les histones H2A et H2B possèdent chacune au moins trois zones en hélice. La zone centrale qui joue un rôle capital *in vitro* pourrait *in vivo* constituer l'amorce initiale de structuration de l'histone à sa sortie du ribosome.

Le mode d'action principal de la force ionique semble différent dans les deux histones. Dans le cas de l'histone H2A la force ionique favorise les interactions à longue distance intra- et intermoléculaire. Les peptides correspondant aux demi-histones sont eux, peu sensibles à la force ionique.

Dans le cas de l'histone H2B la force ionique semble agir à un niveau local, c'est à dire avoir une action sur les acides aminés chargés de l'hélice elle-même ou de son environnement immédiat. Les peptides de l'histone H2B se structurent quand on augmente la force ionique.

Nous ajouterons, non pas d'après les travaux ci-dessus (nous n'avons pas abordé l'étude de la conformation des histones en fonction de leur concentration) mais d'après nos essais de séparation en chromatographie de tamisage moléculaire à pH 5 et d'après les données de la littérature, que l'histone H2A forme plus facilement des polymères que l'histone H2B. Selon SPERLING et BUSTIN (1975) à pH 7, et sous une force ionique de 0,15 M, l'histone H2A est un dimère alors que l'histone H2B est encore sous forme de monomère ; lorsque la force ionique est augmentée, le degré de polymérisation augmente pour les deux histones. La polymérisation des histones est un phénomène ordonné, réversible (équilibre : monomère \longleftrightarrow dimère \longleftrightarrow tétramère, etc...) dû à des interactions hydrophobes favorisées par la force ionique. Dans les pages ci-dessus, nous avons négligé ce phénomène, car sans nier son existence, nous estimons qu'il se produit après l'augmentation de l'hélicité.

VI - 2. IMMUNOLOGIE DES HISTONES H2A ET H2B ET DE LEURS PEPTIDES.

VI - 2 -1. INTRODUCTION : LA REPOSE IMMUNITAIRE HUMORALE.

Afin de mieux comprendre l'immunochimie des histones, nous rappellerons quelques caractéristiques de la réponse humorale.

L'établissement de cette réponse immunitaire implique l'intériorisation de la substance étrangère par une "cellule spécialisée dans la présentation de l'antigène" (un macrophage, une cellule dendritique ou une cellule de Langerhans) cellule qui exprime à sa surface le complexe d'histocompatibilité de type II (CMH II). La substance étrangère sera hydrolysée en fragments dont certains, capables de se lier aux glycoprotéines du CMH II, seront exprimés avec celles-ci à la surface de la cellule. Les deux étapes, hydrolyse et fixation aux molécules du CMH ne sont pas nécessairement indépendantes, la fixation des molécules du CMH sur l'immunogène pouvant orienter la protéolyse. Les complexes peptide-CMH II pourront alors être reconnus par un lymphocyte T auxiliaire (helper) portant des récepteurs spécifiques. Les résidus du peptide qui se lient aux molécules du CMH forment l'agrétope, les résidus qui se lient au récepteur du lymphocyte T forment l'épitope T. Ce lymphocyte T sera "activé" il se multipliera pour donner des lymphocytes T auxiliaires capables d'aider des

lymphocytes B (ou d'aider des lymphocytes T cytotoxiques ou d'aider des macrophages). Un lymphocyte B portant des immunoglobines membranaires spécifiques d'un épitope B de l'immunogène fixera cet immunogène à sa surface, l'intériorisera et le découpera en peptides qui seront exprimés à la surface de la cellule avec les molécules du CMH II. Un lymphocyte T auxiliaire spécifique produit ci-dessus reconnaîtra ce complexe et provoquera la multiplication du lymphocyte B, puis la différenciation des cellules filles en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines solubles spécifiques (MARRACK et KAPPLER, 1987 ; LASSILA *et al.*, 1988 ; CLARK et LEDBETTER, 1994).

Ce système ne doit pas fonctionner contre les propres molécules de l'hôte. Lors de la mise en place des mécanismes de tolérance, les lymphocytes T immatures sont soumis dans le thymus, à une double sélection : une sélection positive dont le but est de conserver les cellules capables de reconnaître les glycoprotéines du CMH et une sélection négative qui élimine à la fois les cellules se liant trop fortement au CMH et les cellules reconnaissant les molécules du soi liées au CMH. Ce processus empêche la maturation de lymphocytes T capables d'aider spécifiquement des lymphocytes B dirigés contre les propres molécules de l'individu.

D'autre part les lymphocytes B sont eux aussi l'objet d'une sélection. Dans la moelle osseuse, les lymphocytes B qui présentent une trop grande affinité pour les molécules du soi les plus exprimées sont éliminés ou neutralisés (anergie).

Cas particulier des histones. Ces données permettent de comprendre pourquoi les histones, protéines très conservées, ne sont pas de bons immunogènes. L'obtention d'anticorps nécessite ici l'injection de complexes histones-acides nucléiques. Le système utilisant l'ARN, le plus efficace et le plus utilisé est une monstruosité biologique. Cette caractéristique lui vaut sans doute d'être immunogène, les fragments d'histones présentés par les macrophages aux lymphocytes T auxiliaires pourraient être différents de ceux qui ont été essayés lors de la maturation des lymphocytes dans le thymus (et qui ont entraîné la délétion des lymphocytes immatures, réactifs contre ceux-ci).

Les sites de ce complexe histone-ARN reconnus par les lymphocytes B peuvent être eux aussi différents des sites qui seraient reconnus à partir de la protéine seule ; la surface externe entière d'une protéine est potentiellement antigénique. Dans le cas de notre

complexe cette surface pourrait être diminuée des zones de la protéine couvertes d'ARN. Ce raisonnement simple postule que la structure tridimensionnelle de l'histone est peu affectée par l'ARN.

L'immunisation contre des peptides d'histone peut être obtenue sans utiliser d'acide nucléique. Ici aussi la réponse immunitaire s'explique par la mise en jeu d'épitopes T différents de ceux reconnus dans la protéine entière non complexée. Les longs peptides seraient immunogènes, soit à cause d'un traitement (processing) différent, soit à cause de la suppression d'épitopes T dominants, ce qui conduirait à la présentation de séquences peptidiques non essayées dans le thymus. Les peptides courts qui demandent à être couplés à une protéine porteuse peuvent être considérés comme des haptènes ; d'une façon idéale, le peptide formera l'épitope B, la protéine porteuse donnera le(s) épitope(s) T. Par ce moyen, il est possible, du moins en théorie, d'obtenir un anticorps contre à peu près n'importe quelle portion de la chaîne peptidique d'une protéine, ce qui, bien sûr, ne veut pas dire que tous ces anticorps réagiront avec la protéine native.

VI - 2 - 2. IMMUNOLOGIE DES HISTONES H2A ET H2B ET DE LEURS PEPTIDES.

Publications 1, 2 et 3, ci-dessous.

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR LOCALIZING ANTIGENIC REGIONS IN HISTONE H2A

SYLVIANE MULLER, SERGE PLAUE, MAURICE COUPPEZ* and MARC H. V. VAN REGENMORTEL
 Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 rue Descartes, 67084 Strasbourg Cédex, France
 and *Institut de Recherche sur le Cancer, Unité 409 CNRS, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

(Received 31 October 1985; accepted in revised form 24 December 1985)

Abstract—Four different variations of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were used to analyze the antigenic structure of histone H2A. Eleven natural and 10 synthetic peptides of H2A were tested for their capacity to bind antibodies raised against the complete molecule in a direct binding assay. Results were compared to those obtained in a direct test using several peptide-BSA conjugates. The capacity of peptides to inhibit the reaction between H2A antibodies and the complete H2A molecule or large fragments of it was also measured. Inhibition assays detected antigenic activity in a larger number of peptides than did direct binding assays. Antisera raised against eight synthetic, unconjugated peptides all reacted with histone H2A in ELISA. Using as probes peptides of 14–21 residues, at least 11 antigenic regions could be recognized, indicating that virtually the entire H2A polypeptide chain possessed antigenic activity.

INTRODUCTION

Interest in the antigenic structure of histones stems from the fact that histone antibodies of known specificity are useful tools for studying the topography of chromatin subunits as well as the functional role of postsynthetic modifications of chromatin (Muller *et al.*, 1982a, 1984). In recent years a series of continuous epitopes have been localized in histones H2B, H3 and H4. These epitopes were identified by measuring the capacity of short natural fragments and synthetic peptides of these molecules to bind antibodies raised against histones. In histone H3, one epitope was identified in the C-terminal residues 130–135 (Muller *et al.*, 1982b) while in histone H4 two epitopes were identified in the regions 1–53 and 88–96 (Muller *et al.*, 1983). In histone H2B seven epitopes were identified in residues 1–11, 6–18, 15–25, 26–35, 50–65, 94–113 and 114–125 using polyclonal as well as monoclonal antibodies (Muller *et al.*, 1985).

In the present report, the antigenic activity of a series of peptides of histone H2A obtained by chemical cleavage or by solid-phase synthesis is described. Several types of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) based either on the direct binding or inhibition format were compared to assess their suitability for revealing the presence of antigenic activity in peptides. In addition, antisera were raised against eight synthetic peptides of H2A of a length of 14–21 residues. All of these antisera were able to bind to H2A in ELISA. Results obtained by the different methods made it possible to identify 11 continuous epitopes in histone H2A. The identification of these epitopes will make it possible to use the corresponding antibodies to determine whether these regions of

the H2A molecule are exposed at the surface of core particles and nucleosomes. These antibodies may also prove to be very sensitive probes for monitoring conformational changes taking place in chromatin (Muller *et al.*, 1982a, 1984).

MATERIALS AND METHODS

Histone H2A and natural fragments of H2A

Histone H2A was obtained from calf thymus or chicken erythrocytes chromatin by the saline method of Van der Westhuyzen and Von Holt (1971) or by the selective extraction method of Johns (1964) and was purified as described by Michalski-Scrive *et al.* (1982). The purity of the proteins was controlled by electrophoresis on 18% polyacrylamide–SDS gel. The fragments 1–56 and 93–129 were obtained by action of the V8 staphylococcal protease on glutamyl bonds. Hydrolysis of histone H2A and fractionation of the reaction product were performed as described by Taillandier *et al.* (1984). The peptide 93–129 was further purified on Sephadex G50 Fine in 0.01 M HCl saturated with chloroform.

Cleavage of histone H2A at aspartyl residues by acetic acid 0.25 M at 105°C (Schroeder *et al.*, 1963) yielded five fragments. Hydrolysis of histone H2A was performed for 16 hr in order to obtain a good yield of peptides 1–71, 73–89 and 91–129 or for 4 hr only to increase the amount of peptides 1–89 and 73–129. All these fragments were isolated and purified through gel filtration on Biogel P10 and Sephadex G50 or G100 equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

Fragments 1–39, 86–108, 94–112 and 113–129 were obtained by hydrolysis with pepsin; histone H2A

(200 mg) dissolved in 20 ml of 5% formic acid was hydrolyzed with pepsin (Worthington) at 37°C for 2 hr, using an enzyme-to-substrate ratio of 1:200. The digest was freeze-dried and applied to a sulfopropyl Sephadex C25 column (85 × 2.5 cm) equilibrated in 0.1 M guanidinium chloride, 6 M urea pH 3.0 and eluted with a linear gradient of guanidinium chloride in 6 M urea pH 3.0 from 0.1 M to 1 M (total vol 2000 ml). After desalting on Sephadex G25 the peptides were further purified by chromatography on a Sephadex G50 Fine column (60 × 2.6 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

The purity of the histone fragments was checked by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea (Panyim and Chalkley, 1969) using a 17% acrylamide concn and by thin-layer chromatography on cellulose sheets (Polygram Cel 300, Macherey and Nagel, Düren, West Germany) in 1-butanol:pyridine:acetic acid:water (7:5:2:6).

The histone fragments were characterized by amino acid analysis performed on a Beckman 119 CL amino acid analyzer after hydrolysis in 6 M HCL at 110°C for 24 hr in vacuo, with one drop of 1% phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Synthesis of H2A peptides

Ten synthetic peptides of calf thymus H2A were prepared by the solid-phase method of Merrifield (Barany and Merrifield, 1980) as previously described (Muller *et al.*, 1985). The purity of peptides was monitored by high pressure liquid chromatography on a reverse phase 4.5 × 250 mm Ultrasphere ODS C18 column (Altex, USA). Amino acid compositions of peptides were controlled using a Durrum D500 analyzer.

Coupling of synthetic peptides to carrier proteins

Some synthetic peptides were coupled to bovine serum albumin (BSA) for measuring their antigenic activity. For coupling, glutaraldehyde was used at a final concn of 0.05 or 1.0% depending on the peptide composition (Briand *et al.*, 1985). The starting molar ratio of BSA to peptide was 1:30. The yield of conjugation and the presence of intact residues after coupling were controlled by amino acid analysis as described previously (Briand *et al.*, 1985).

Antisera

Four antisera to H2A were used in this study. Three of them (Nos 1–3) were obtained by immunizing rabbits with chicken erythrocyte H2A-RNA complexes and one (No. 4) was raised in a rabbit by injection of calf thymus H2A-RNA complexes.

As the synthetic peptides had a length of 14–21 residues, antisera were obtained by a series of biweekly subcutaneous injections of about 100 µg free (i.e. unconjugated) peptide emulsified in complete Freund's adjuvant. Sera were collected at regular intervals over a period of 2 months.

Measurement of antigenic reactivity of peptides

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out as follows. Wells of flexible microtiter plates (Falcon, USA, No. 3912) were coated overnight at 37°C in 0.05 M carbonate buffer pH 9.6, with H2A (200–400 ng/ml), free peptide or peptide conjugate (0.2–5 µM as peptide). After rinsing, the plates were incubated with 1% BSA for 1 hr at 37°C. Antibodies diluted in phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 (PBS-T) were then added for 2 hr at 37°C. After further rinsing, goat anti rabbit globulins conjugated with alkaline phosphatase, and the substrate *p*-nitrophenyl phosphate were added successively as described previously (Muller *et al.*, 1982b). The absorbance at 405 nm was read using a Titertek Multiskan MC photometer (Flow laboratories).

For inhibition experiments, peptides were incubated with anti H2A sera overnight at 4°C or for 2 hr at 37°C. The mixture was then added to wells pre-coated with the antigen (H2A or peptide) and incubated for 2 hr at 37°C.

RESULTS

The antigenic activity of 21 peptides (11 natural fragments and 10 synthetic peptides) corresponding to different regions of calf thymus H2A has been studied. Their location is listed in Table 1. The sequences of calf thymus and chicken erythrocyte

Table 1. Binding of H2A antisera to H2A fragments in ELISA

Sequence	H2A antisera			
	1	2	3	4
H2A (Calf)	N 1.98	1.34	1.28	1.96
H2A (Chicken)	N 1.87	1.32	1.41	1.64
1–15	S 0.11	0.12	0.62	0.04
1–39	N 0.18	0.09	0.18	0.03
1–56	N 0.06	0.08	0.04	0.03
1–71	N 0.58	0.21	0.18	0.12
1–89	N 1.51	1.03	1.35	1.66
5–18	S 0.05	0.14	0.03	0.03
12–26	S 0.21	0.11	0.12	0.02
28–42	S 0.08	0.06	0.03	0.05
44–61	S 0.02	0.04	0.02	0.07
56–70	S 0.03	0.05	0.04	0.02
65–85	S 1.81	1.02	1.79	0.46
73–89	N 0.23	0.08	1.36	1.83
73–129	N > 2	1.83	1.79	1.27
85–100	S 1.48	0.05	0.58	0.14
86–108	N 1.12	0.03	0.77	0.22
90–105	S 0.07	0.06	0.03	0.03
91–129	N 1.96	1.87	1.37	0.98
93–129	N 1.26	> 2	0.19	0.22
94–112	N 0.03	0.06	0.08	0.03
113–129	N 0.08	0.08	0.09	0.13
116–129	S 0.04	0.15	0.14	0.02

The binding of H2A antisera was measured in ELISA by coating wells with 200 ng/ml H2A (0.015 µM) or H2A fragments (2 µM). All natural (N) or synthetic (S) fragments correspond to the sequence of calf thymus H2A. Antisera were diluted 1:1000. Values are expressed in absorbance units measured at 405 nm after 50 min incubation with substrate. Background values detected in absence of antigen were 0.05–0.10 and with normal rabbit serum less than 0.15.

H2A differ by three substitutions at residues 16, 121 and 128 where conservative changes are observed, and by one deletion (His 124) in chicken erythrocyte H2A (Yeoman *et al.*, 1972; Laine *et al.*, 1978). The three antisera obtained against chicken erythrocyte H2A (antisera Nos 1-3) bound calf thymus H2A in ELISA to the same extent as chicken erythrocyte H2A (data not shown). Likewise antiserum No. 4 (anti calf thymus H2A) reacted equally well with calf thymus H2A and chicken erythrocyte H2A.

Binding of H2A antisera to H2A fragments in ELISA

Using peptide-coated microtiter plates, the four antisera were tested for their ability to bind in ELISA to the 21 peptides. In view of the unique composition of each peptide, the amount of material absorbed to the plastic was not necessarily the same in each case. For this reason all binding tests were performed with very large quantities of peptide ($0.5-5 \mu\text{M}$). This molar concn of peptide is 35-350 times higher than that used in the case of H2A (200 ng/ml). Several binding tests using $0.5-5 \mu\text{M}$ of different peptides are illustrated in Fig. 1. The results obtained with the 21 peptides are summarized in Table 1 which shows the ability of the four anti H2A sera to bind to each peptide used at a concn of $2 \mu\text{M}$.

In the region 1-89, only peptides 65-85 and 1-89 possessed binding activity with all four antisera. When *N*-terminal peptides of increasing length (1-15, 1-39, 1-56, 1-71 and 1-89) were tested, antisera 1 and 3 revealed weak antigenic activity in peptides 1-71 and 1-15, respectively. However, when antiserum 3 was used at a dilution of 1:200 instead of 1:1000, binding to peptide 1-15 was considerably stronger (Fig. 1). Both antisera 3 and 4 reacted

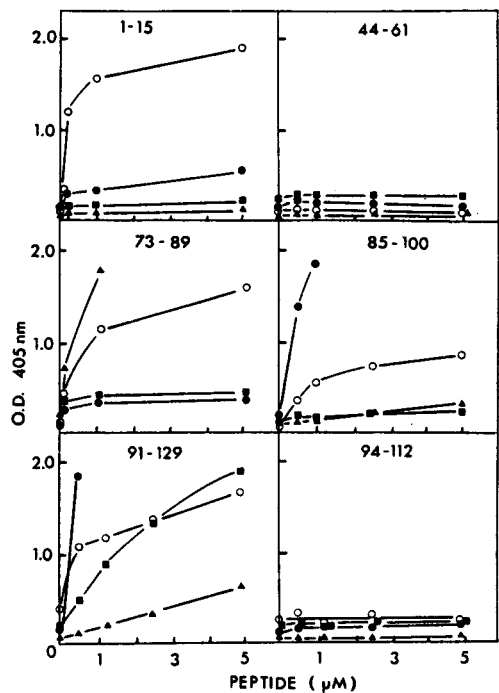


Fig. 1. Binding in ELISA of peptide fragments 1-15, 44-61, 73-89, 85-100, 91-129 and 94-112 of histone H2A to four H2A antisera diluted 1:200. Antiserum 1 (●—●), 2 (■—■), 3 (○—○), 4 (▲—▲). Binding of normal rabbit serum was insignificant. Hydrolysis time of the substrate was 1.5 hr.

strongly with peptide 73-89 while no activity could be demonstrated in peptides 5-18, 12-26, 28-42, 44-61 and 56-70 with any of the antisera (Table 1).

A series of overlapping peptides (residues 73-89, 85-100, 86-108, 90-105, 91-129, 93-129, 94-112,

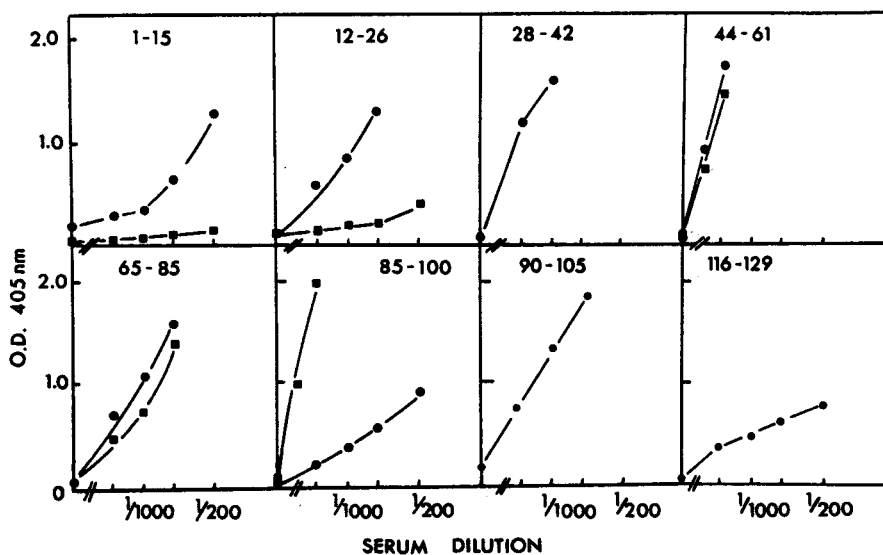


Fig. 2. Binding in ELISA of anti-peptide antisera using plates coated with $1 \mu\text{M}$ homologous free peptide (●—●) and with conjugated peptide (■—■). The coupling ratios of peptide/carrier calculated from amino acid analysis were: peptide 1-15 = 7:1, peptide 12-26 = 9:1, peptide 44-61 = 24:1, peptide 65-85 = 10:1, peptide 85-100 = 13:1. Absorbance values were measured after substrate hydrolysis time of 35 min. Background values detected in absence of antigen or with nonrelated antigens (other peptides and BSA-peptide conjugates) were less than 0.1.

113-129 and 116-129) were used to locate antigenic activity in the region 73-129. Although all four antisera reacted strongly with peptides 73-129 (57 residues) and 91-129 (39 residues), only antisera 1 and 2 reacted strongly with peptide 93-129, indicating the particular importance of residues 91 and 92. Both peptides 85-100 and 86-108 were recognized strongly by antiserum 1, weakly by antiserum 3 and not at all by antisera 2 and 4. No activity was found in peptides 90-105, 94-112, 113-129 and 116-129.

Since the inability of some of the peptides to react with H2A antisera could have been due to a low level of attachment to the plastic, the presence of the peptides on the solid-phase was verified by testing their ability to react with anti-peptide antisera (see next section). It was found that peptides 1-15, 12-26, 28-42, 44-61, 65-85, 85-100, 90-105 and 116-129 induced the formation of antibodies detectable by ELISA using peptide-coated plates (Fig. 2). It can thus be concluded that each of these peptides was satisfactorily attached to the solid-phase.

Natural fragments 94-112 and 113-129 as well as synthetic peptides 5-18 and 56-70 were inactive when tested with H2A antisera (Table 1). Since these peptides were not used to raise anti-peptide antibodies, there is no information available regarding their capacity to become attached to the plastic.

Binding of H2A antisera to peptide-BSA conjugates

The presence of antigenic activity in some of the peptides was also tested by measuring the ability of peptide-BSA conjugates to react with H2A antisera. The peptide/carrier ratio of conjugates was found to vary from 7 to 25 depending on the concn (0.05-1%) of glutaraldehyde used for conjugation (Table 2).

In control experiments, anti-peptide sera were first tested for their ability to recognize the homologous peptide-BSA conjugates. It was found that some of the peptides that were reactive when attached directly to the solid-phase (e.g. peptides 1-15 and 12-26) possessed very little or no antigenic activity after conjugation to BSA (Fig. 2). On the other hand, anti-peptide 85-100 antibodies reacted more strongly with the homologous conjugated peptide than with the free peptide on the plastic, while the anti-peptide 44-61 and 65-85 antibodies reacted equally well with the coupled and uncoupled peptides (Fig. 2).

When the six peptide-BSA conjugates listed in Table 2 were tested with the four H2A antisera, only peptides 65-85 and 85-100 were found to possess antigenic activity (Fig. 3). In the case of peptide 65-85, antisera 1-3 reacted both with the peptide conjugate and the free peptide while antiserum 4 reacted only weakly with the free peptide (Table 1). In the case of peptide 85-100, antisera 1 and 3 reacted both with the conjugated and unconjugated peptide while antisera 2 and 4 reacted only with the peptide conjugate (Fig. 3).

In summary the ELISA results obtained by direct binding experiments between peptides and anti H2A

Table 2. Preparation of H2A peptide conjugates using BSA as carrier

Residues	Sequence of H2A ^a	% Glutaraldehyde used for conjugation	Degree of substitution ^b	Yield (%)	% Free lysine residues after coupling
1-15	A ^a S-G-R-G- (K) -Q-G-G- (K) -A-R-A- (K) -A- (K)	0.05	7	23	34
12-26	(A) - (K) -A- (K) -S-R-S-R-A-G-L-Q-F-P	0.10	9	30	52
44-61	(Q) -A-G-A-P-V-Y-L-A-A-V-L-Q-Y-L-T-A-E	1.0	24	80	—
56-70	(E) -Y-L-T-A-E-I-L-E-L-A-G-N-A-A	1.0	25	83	—
65-85	(L) -A-G-N-A-A-R-D-N- (K) -T-R-I-I-P-R-H-L-Q-L	0.05	10	33	70
85-100	(L) -A-I-R-N-D-E-E-L-N- (K) -L-L-G- (K) -V	0.10	13	43	36

^aCircled residues correspond to possible points of attachment to carrier protein.

^bNumber of peptides per carrier molecule determined by amino acid analysis.

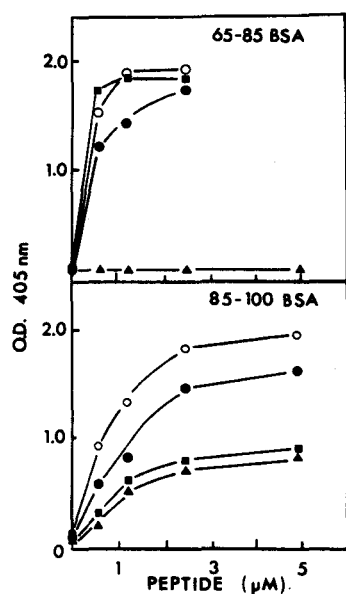


Fig. 3. Binding in ELISA of H2A antisera using plates coated with conjugated peptides. Peptide/carrier ratios were 10:1 for peptide 65-85 and 13:1 for peptide 85-100. Antisera 1 (●—●) and 3 (○—○) were diluted 1:1000; Antisera 2 (■—■) and 4 (▲—▲) were diluted 1:200. Binding of normal rabbit serum was insignificant. No reaction was observed using glutaraldehyde-treated BSA used as control. Hydrolysis time of the substrate was 45 min.

antibodies indicate the presence of antigenic activity in the regions corresponding to residues 1-15, 65-85, 73-89 and 85-100. In addition one or more epitopes are also located in the region 91-129. Only peptides 65-85 and 85-100 appear to be recognized by all four antisera.

Inhibition of the ELISA reaction with H2A peptides

The ability of different peptides to bind H2A antibodies was also studied by ELISA inhibition of the H2A-anti H2A reaction. The inhibitory activity of 10 synthetic peptides was first tested using H2A-coated plates. The parameters of the test were adapted in each experiment in order to obtain the maximum possible inhibitory effect for each peptide (Altschuh and Van Regenmortel, 1982). Thus different concns of H2A were used (25-100 ng/ml) as well as various serum dilutions (1:1000-1:5000). Figure 4 shows inhibition of the ELISA reaction between H2A and antiserum 2 by increasing concns (25-200 nmoles/ml) of the 10 synthetic peptides (residues 1-15, 5-18, 12-26, 28-42, 44-61, 56-70, 65-85, 85-100, 90-105 and 116-129). Table 3 shows the maximum inhibition obtained when these 10 peptides were tested with the four H2A antisera.

Peptides 44-61, 56-70, 65-85, 85-100 and 90-105 possessed the highest inhibitory activity (30-95%). Fragment 1-56 was found to possess 25-50% inhibitory activity (data not shown) while the four shorter *N*-terminal peptides 1-15, 5-18, 12-26 and 28-42 showed only a weak activity (13-20%). No

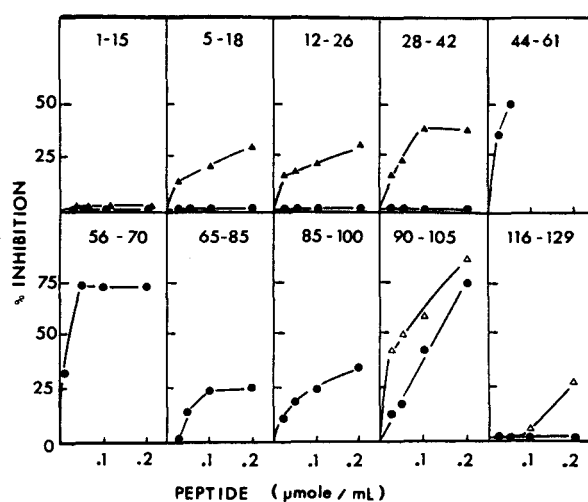


Fig. 4. Inhibition of the ELISA reaction between H2A antiserum 2 and whole H2A (●), histone fragment 1-89 (▲) and 91-129 (△) with increasing concns of 10 short synthetic peptides of H2A (1-15, 5-18, 12-26, 28-42, 44-61, 56-70, 65-85, 85-100, 90-105, 116-129). Antigen concns deposited in the wells were: H2A = 25-100 ng/ml, fragment 1-89 = 0.5-2.5 μ M, fragment 91-129 = 2 μ M; the antiserum was diluted 1:1000-1:5000. No effect was observed with peptides 1-21 of H3 or 36-50 of H2B used as controls.

significant activity was found in peptide 116-129. The specificity of inhibition experiments was demonstrated by the absence of any reaction when unrelated peptides were used in the assay.

Attempts were also made to detect inhibitory activity in peptides using plates coated with fragments 1-89 and 91-129 instead of with whole H2A. This approach ensures that only a subpopulation of the antibodies present in H2A antisera will react in ELISA; as a result, the inhibitory capacity of short peptides located within these fragments could be enhanced, since antibodies corresponding to other regions of the histone would be eliminated from the reaction. The results obtained with antiserum 2 are shown in Fig. 4, and the maximum inhibition obtained with the four H2A antisera is indicated in

Table 3. ELISA inhibition of the H2A anti H2A reaction by ten synthetic peptides of H2A

Sequence of H2A peptide	Maximum inhibition (%) measured with H2A antisera			
	1	2	3	4
1-15	20	0	16	20
5-18	0	0	18	13
12-26	0	0	0	13
28-42	0	0	16	0
44-61	18	50	36	40
56-70	74	75	79	95
65-85	26	26	34	33
85-100	35	35	43	52
90-105	52	75	92	28
116-129	11	0	0	0

Values represent the maximum percentage inhibition observed in the reaction between calf thymus H2A (25-100 ng/ml) and four H2A antisera diluted 1:1000-1:5000. Peptides were used at a concn of 25-200 nmoles peptides/ml. No inhibition effects was observed when peptides 1-21 of H3 and 36-50 of H2B were used as controls.

Table 4. ELISA inhibition of the reaction between H2A antisera and plates coated with 0.25–2 μ M fragments 1–89 and 91–129 of H2A by short synthetic peptides of H2A

Residues	Coated antigen	Maximum inhibition (%) measured in ELISA with H2A antisera			
		1	2	3	4
1–15	1–89	18	0	6	0
5–18	1–89	11	30	20	0
12–26	1–89	0	31	0	2
28–42	1–89	16	38	20	0
90–105	91–129	92	86	97	69
116–129	91–129	2	29	0	0

Values represent the maximum percentage inhibition observed with the four antisera diluted 1:1000–1:5000. Synthetic peptides were used at a concn of 25–200 nmoles peptides/ml.

Table 4. Some of the short *N*-terminal regions (peptides 5–18, 12–26 and 28–42) previously found to be unable to inhibit the reaction between H2A and certain antisera were shown to possess 20–38% inhibitory activity with histone fragment 1–89 (Table 4). The high inhibitory activity of peptide 90–105 in the H2A anti-H2A system (Table 3) was confirmed by showing that it could inhibit 69–87% of the reaction between H2A antibodies and peptide 91–129 (Table 4). The *C*-terminal peptide 116–129 was found to inhibit slightly but significantly the reaction between antiserum 2 and peptide 91–129 (Fig. 4).

Thus, by using inhibition experiments, seven additional synthetic peptides corresponding to residues 5–18, 12–26, 28–42, 44–61, 56–70, 90–105 and 116–129 were found to be antigenically active. It is interesting to observe that the two peptides that possessed the highest activity in inhibition experiments, namely peptides 56–70 and 90–105, were not recognized by any of the four H2A antisera when the peptides were attached to the plastic (Table 1).

Binding of anti-peptide antisera with protein

Antisera were raised against eight synthetic peptides corresponding to residues 1–15, 12–26, 28–42, 44–61, 65–85, 85–100, 90–105 and 116–129. Five of these peptides (12–26, 28–42, 44–61, 90–105, 116–129) had shown no reactivity with any of the H2A antisera (Table 1). In each case, 2–4 rabbits were immunized with the unconjugated peptide as described in Materials and Methods. After two injections, the level of anti-peptide antibodies in successive bleedings taken at regular intervals was measured in ELISA using plates coated with homologous peptide. In the case of peptides 28–42, 44–61 and 90–105, the antibody level rose rapidly in the immunized rabbits, whereas with peptides 12–26, 65–85, 85–100 and 116–129 only one rabbit induced a satisfactory response after 2 months, i.e. after 3–4 injections of peptide. Four rabbits were used with peptide 1–15; three failed to respond after 3 months, while the fourth one gave a significant response after 4 injections (2 months).

The anti-peptide antisera were also tested in ELISA to assess their ability to react with H2A. As shown in Fig. 5, the ability of each antiserum to recognize

the homologous peptide and H2A did not always develop in parallel. In Fig. 5(B) for instance, the reactivity of one anti-28–42 serum increased with time with respect to the peptide and decreased with respect to the histone molecule. In the case of another

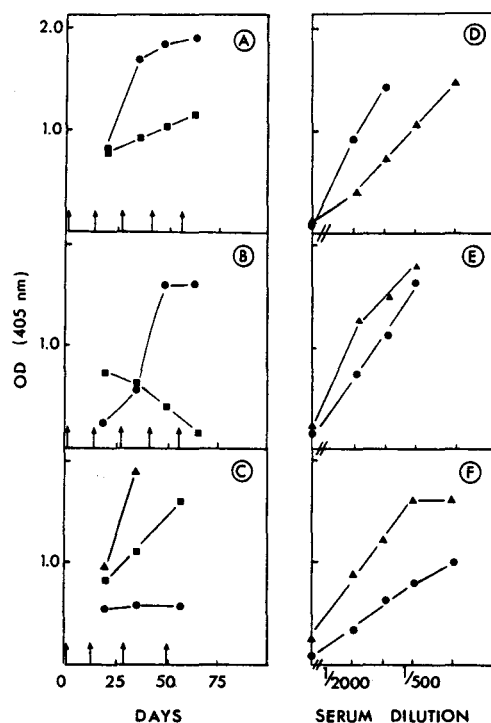


Fig. 5. (A), (B), (C): Production of anti-peptide antibodies by immunization of rabbits with peptide fragments of H2A. (A) and (B) correspond to two animals injected with peptide 28–42, (C) corresponds to one rabbit immunized with peptide 85–100. Antibody levels were measured by ELISA using plates coated either with 400 ng H2A/ml (■—■), with 2 μ M homologous free peptide (●—●) or with homologous peptide conjugates (2 μ M expressed in peptide) (▲—▲). Antiserum dilutions were 1:500 in (A) and (B), 1:1000 in (C). Arrows indicate the injection schedule. (D), (E), (F): Binding of anti-peptide antisera with H2A and homologous peptide. Three anti-peptide antisera raised against peptides 44–61 (D), 65–85 (E) and 85–100 (F) were tested in ELISA using plates coated with 400 ng/ml H2A (▲—▲), and 1 μ M homologous free peptide (●—●). Substrate hydrolysis time was 25 min. Background values detected in absence of antigen or with non-related peptides were less than 0.1.

anti-28-42 serum, both types of reactivities increased in parallel [Fig. 5(A)].

The eight peptides used for raising antibodies [see Fig. 5(D), (E), (F)], including peptides 12-26, 28-42, 44-61, 90-105 and 116-129 which did not react in direct ELISA binding (Table 1), induced antibodies that were able to recognize the whole histone molecule. Some of the peptide antibodies bound H2A better than the corresponding peptides [Fig. 5(E), (F)].

DISCUSSION

The natural fragments and synthetic peptides of H2A used in this work correspond to the sequence of the histone from calf thymus. Antiserum 4 was raised against calf thymus H2A while antisera 1-3 were raised against chicken erythrocyte H2A. The two H2A histones which differ only at four residue positions could not be differentiated by any of these

antisera. One deletion (His 124) and two substitutions are located in the region 116-129 of chicken erythrocyte H2A (Glu 121→Asp and Gly 128→Ala 127). Fragment 116-129 of calf thymus histone H2A in which all these substitutions are located was not recognized by the homologous antiserum in any of the immunoassays. The fourth substitution at position 16 (Thr→Ser) also had no discernible influence on the reactivity of any peptide.

The most widely used method of identifying epitopes in proteins consists in measuring the capacity of natural fragments or synthetic peptides to bind antibodies raised against the complete molecule. Binding of the peptide fragments is usually demonstrated by their capacity to inhibit the reaction between the complete antigen and its specific antibodies, although direct binding assays have also been used. In the present study, four different variations of ELISA were used to analyze the antigenic structure of histone H2A and considerable differences were observed

Table 5. Demonstration of antigenic activity in ten synthetic peptides of H2A using four different immunoassays

Sequence	H2A antisera	Binding assay (ELISA) with		Inhibition of reaction	
		Peptide	Peptide conjugate	H2A	between H2A antisera and H2A fragment (1-89 or 91-129)
1-15	1	-	-	+	+
	2	-	-	-	-
	3	+	-	+	-
	4	-	-	+	-
5-18	1	-	-	-	-
	2	-	ND ^a	-	+
	3	-	-	+	+
	4	-	-	-	-
12-26	1	-	-	-	-
	2	-	-	-	+
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
28-42	1	-	-	-	+
	2	-	ND	-	+
	3	-	-	+	+
	4	-	-	-	-
44-61	1	-	-	+	-
	2	-	-	+	ND
	3	-	-	+	-
	4	-	-	+	-
56-70	1	-	-	+	-
	2	-	-	+	ND
	3	-	-	+	-
	4	-	-	+	-
65-85	1	+	+	+	-
	2	+	+	+	ND
	3	+	+	+	-
	4	+	-	+	-
85-100	1	+	+	+	-
	2	-	+	+	ND
	3	+	+	+	-
	4	-	+	+	-
90-105	1	-	-	+	+
	2	-	ND	+	+
	3	-	-	+	+
	4	-	-	+	+
116-129	1	-	-	-	-
	2	-	ND	-	+
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-

^aND = Not determined.

in the results obtained by the different methods. This is illustrated in Table 5 which summarizes the results obtained in different assays with 10 synthetic peptides of 14–21 residues.

It should be emphasized that the percentage inhibition observed in any assay depends greatly on the sensitivity of the test and on the precise way the test is performed (Altschuh and Van Regenmortel, 1982; Van Regenmortel, 1982; Quesniaux *et al.*, 1983). In ELISA inhibition tests where the absorbance reading depends on the concn of any one of a number of reactants that could be limiting, there is no unique relationship between the percentage inhibition caused by a peptide and the amount of antibody to that peptide present in the antiserum. As discussed elsewhere (Van Regenmortel, 1982) inhibition percentages do not simply reflect the proportion of each antibody population in an antiserum. When a particular peptide completely inhibits the immunochemical reaction between the complete antigen and its specific antibodies, this does not mean that the antiserum contained no antibodies specific for other peptides. When 100% inhibition is observed, this pertains only to the antiserum dilution used in the test and it does not mean that the entire antibody activity of the antiserum has been exhausted by the inhibitor.

The best agreement between the different methods was observed with peptides 65–85 and 85–100 which showed antigenic activity in all assays, although individual differences were noted with some of the antisera. These two regions correspond to the highest peaks of the hydrophilicity profile of H2A (Fig. 6) calculated according to Hopp and Woods (1981) and probably represent immunodominant regions. It is interesting to note that in the case of H2A the *N*- and *C*-terminal region of the molecule are not particularly antigenic. It should be noted, however, that with the exception of the hydrophobic region 100–105 (a region present in the inactive peptide 94–112; Table 1), the entire H2A polypeptide chain appears to possess antigenic activity. This situation is similar to that observed recently with tobacco mosaic virus protein (Al Moudallal *et al.*, 1985) and agrees with the current paradigm in protein immunochemistry according to which the entire accessible surface of

proteins consists of a continuum of overlapping epitopes (Benjamin *et al.*, 1984).

Differences in peptide conformation are probably responsible for the fact that certain peptides reacted with H2A antibodies in only some of the immunoassays. In the direct binding assay using unconjugated peptide, only one antiserum (No. 3) revealed antigenic activity in peptide 1–15 when it was bound to the plastic solid-phase. Conjugation of this peptide to BSA rendered it inactive. In inhibition assays where the peptide is free in solution, three of the antisera showed that peptide 1–15 possessed inhibitory activity in the H2A anti H2A system (Table 5). It is interesting to note that the overlapping peptides 1–39, 1–56 and 1–71 encompassing the 1–15 region did not react with antiserum 3 that recognized the 1–15 fragment. It is not justified, therefore, to conclude that when a long peptide is devoid of antigenic activity in a particular assay, any shorter peptide fragment situated within the long sequence will also necessarily be inactive.

Long-range effects of certain residues on the antigenicity of peptides is also demonstrated by the results of direct binding assays with peptides 91–129 and 93–129 (Table 1). All four H2A antisera reacted with peptide 91–129 while only two reacted with peptide 93–129, indicating the importance of the two Glu residues 91 and 92. However, peptide 90–105 which contains both these residues was inactive with all four antisera while peptides 85–100 and 86–108 reacted only with antisera 1 and 3.

Tests with conjugated peptides were included in the study as it seemed plausible that in some cases the peptides may be more accessible to antibody when conjugated via a single residue than when absorbed directly to the solid-phase. However, no additional antigenic activity beyond that already found with unconjugated peptides was demonstrated in any peptide by this approach (Table 5). In particular, conjugated peptides 12–26, 44–61 and 56–70 were inactive although they possessed inhibitory activity when tested in the free form. It is difficult to couple lysine-rich peptides by means of glutaraldehyde without involving several internal lysine residues which could modify the antigenic activity (Briand *et al.*, 1985). Peptide 44–61 which contains no internal lysine residues (Table 2) was equally recognized by anti-peptide antibodies when tested as a conjugate and as a free peptide (Fig. 2). In contrast, peptides 1–15 and 12–26 which contain several internal lysines (Table 2) were not recognized after conjugation by the corresponding anti-peptide antibodies (Fig. 2). It is not possible to generalize, however, since in the case of peptide 65–85, conjugation seemed not to alter the activity, while in the case of peptide 85–100 conjugation actually enhanced the reactivity (Fig. 2).

When short peptides were used to inhibit the reaction between H2A antibodies and large histone fragments (instead of the whole histone) it became possible to reveal the presence in H2A antisera of

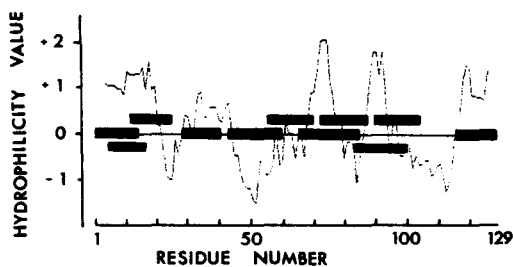


Fig. 6. Hydrophilicity profile of calf thymus H2A. The hydrophilicity value of each residue of H2A calculated according to Hopp and Woods (1981) was plotted against residue number after averaging the value over six residues. Bars represent the positions of antigenic regions of H2A.

antibodies able to recognize peptides 12–26 and 116–129; no antigenic activity could be demonstrated in these peptides by any other assay (Table 5).

Inhibition assays detected antigenic activity in the largest number of peptides; furthermore by using large histone fragments instead of the whole histone molecule it was possible to show that four additional peptides (residues 5–18, 12–26, 28–42, 116–129) inhibited the reaction with antisera 1 and 2. The superiority of inhibition assays compared to direct binding assays may be linked to the fact that in this test format, the antigen is in a more native conformation than when it is absorbed to the solid-phase. It is increasingly recognized that protein antigens become at least partly denatured when they are used as the first coating layer in a solid-phase assay (Friguet *et al.*, 1984; Altschuh *et al.*, 1985).

All the antisera raised against the unconjugated peptides of 14–21 residues were able to react with both the immunogen and the complete H2A molecule. In some instances the anti-histone reactivity in the antiserum appeared before the anti-peptide activity [Fig. 5(A), (B)] and sometimes the anti-histone activity disappeared as the level of anti-peptide antibodies increased. This finding underlines the importance of testing immunized animals over the entire course of immunization.

In summary, our data clearly demonstrate the importance of using different experimental approaches for identifying protein epitopes, and they illustrate the validity of the now growing generalization that for proteins of low mol. wt, the whole molecule is potentially immunogenic.

Acknowledgements—The authors would like to thank Dr J. P. Briand for helpful advice on preparation and purification of synthetic peptides. They are grateful to G. Sommermeyer for help with the preparation of antisera, G. de Marcillac for hydrophilicity analysis, Dr J. Reinbolt for amino acid analysis and Dr P. Sautière for helpful discussions. The skillful technical assistance of F. Boutteau, M. J. Dupire, T. Ernout and A. Hemez is gratefully acknowledged. This work was supported by grants to M. H. V. Van Regenmortel from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and from the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- Al Moudallal Z., Briand J. P. and Van Regenmortel M. H. V. (1985) A major part of the polypeptide chain of tobacco mosaic virus protein is antigenic. *EMBO J.* **4**, 1231–1235.
- Altschuh D. and Van Regenmortel, M. H. V. (1982) Localization of antigenic determinants of a viral protein by inhibition of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with tryptic peptides. *J. Immun. Meth.* **50**, 99–108.
- Altschuh D., Al Moudallal Z., Briand J. P. and Van Regenmortel M. H. V. (1985) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus. V. Attempts to localize viral epitopes with monoclonal antibodies. *Molec. Immun.* **22**, 329–337.
- Barany G. and Merrifield R. B. (1980) Solid-phase peptide synthesis. In *The Peptides* (Edited by Gross E. and Meienhofer J.), Vol. 2, pp. 1–284. Academic Press, New York.
- Benjamin D. C., Berzofsky J. A., East I. J., Gurd F. R. N., Hannum C., Leach S. J., Margoliash E., Michael J. G., Miller A., Prager E. M., Reichlin M., Sercarz E. E., Smith-Gill S. J., Todd P. A. and Wilson A. C. (1984) The antigenic structure of proteins: a reappraisal. *A. Rev. Immun.* **2**, 67–101.
- Briand J. P., Muller S. and Van Regenmortel M. H. V. (1985) Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immun. Meth.* **78**, 59–69.
- Friguet B., Djavadi-Ohanian L. and Goldberg M. E. (1984) Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to the denatured antigen. *Molec. Immun.* **21**, 673–677.
- Hopp T. P. and Woods K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3824–3828.
- Johns E. W. (1964) Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. *Biochem. J.* **92**, 55–59.
- Laine B., Kmiecik D., Sautière P. and Biserte G. (1978) Primary structure of chicken erythrocyte histone H2A. *Biochimie* **60**, 147–150.
- Michalski-Scrive C., Aubert J. P., Couppez M., Biserte G. and Loucheux-Lefebvre M. H. (1982) UV differential study of the histones H2A-H2B-H3-H4 octamer. *Biochimie* **64**, 347–355.
- Muller S., Erard M., Burggraf E., Couppez M., Sautière P., Champagne M. and Van Regenmortel M. H. V. (1982a) Immunochemical detection of changes in chromatin subunits induced by histone H4 acetylation. *EMBO J.* **1**, 939–944.
- Muller S., Himmelsbach K. and Van Regenmortel M. H. V. (1982b) Immunochemical localization of the C-terminal hexapeptide of histone H3 at the surface of chromatin subunits. *EMBO J.* **1**, 421–425.
- Muller S., Soussanah A., Bouley J. P., Reinbolt J. and Van Regenmortel M. H. V. (1983) Localization of two antigenic determinants in histone H4. *Biochim. biophys. Acta* **747**, 100–106.
- Muller S., Mazen A., Martinage A. and Van Regenmortel M. H. V. (1984) Use of histone antibodies for studying chromatin topography and the phosphorylation of chromatin subunits. *EMBO J.* **3**, 2431–2436.
- Muller S., Couppez M., Briand J. P., Gordon J., Sautière P. and Van Regenmortel M. H. V. (1985) Antigenic structure of histone H2B. *Biochim. biophys. Acta* **827**, 235–246.
- Panyim S. and Chalkley R. (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337–346.
- Quesniaux V., Jaegle M. and Van Regenmortel M. H. V. (1983) Immunochemical studies of turnip yellow mosaic virus. III. Localization of two viral epitopes in residues 57–64 and 183–189 of the coat protein. *Biochim. biophys. Acta* **743**, 226–231.
- Schroeder W. A., Shelton J. R., Shelton J. B., Cormick J. and Jones, R. T. (1963) *Biochemistry* **2**, 992–1008.
- Taillandier E., Fort L., Liguier J., Couppez M. and Sautière P. (1984) Role of the protein α helices in histone-DNA interactions studied by vibrational spectroscopy. *Biochemistry* **23**, 2644–2650.
- Van der Westhuyzen D. R. and Von Holt C. (1971) A new procedure for the isolation and fractionation of histones. *FEBS Lett.* **14**, 333–337.
- Van Regenmortel M. H. V. (1982) *Serology and Immunology of Plant Viruses*, pp. 302. Academic Press, New York.
- Yeoman L. C., Olson M. O. J., Sugano N., Jordan J. J., Taylor C. W., Starbuck W. C. and Busch M. (1972) Amino acid sequence of the center of the arginine-lysine rich histone from calf thymus. The total sequence. *J. biol. Chem.* **247**, 6018–6023.

BBA 32125

Antigenic structure of histone H2B

Sylviane Muller ^a, Maurice Couppez ^b, Jean-Paul Briand ^a, Julian Gordon ^{c,*},
Pierre Sautière ^b and Marc H.V. van Regenmortel ^a

^a *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du C.N.R.S., 15 rue Descartes, 67000 Strasbourg,* ^b *Unité 409 CNRS, Institut de Recherche sur le Cancer, B.P. 311, 59045 Lille Cedex (France) and* ^c *Friedrich-Miescher-Institut, P.O. Box 2543, 4002 Basel (Switzerland)*

(Received July 23rd, 1984)

Key words: Histone H2B; Antigenic determination; Immunochemistry; Chromatin; Synthetic peptide

Antigenic determinants of histone H2B were localized using a series of 23 overlapping fragments of H2B obtained either by chemical and enzymatic cleavage of the histone or by solid-phase peptide synthesis. The ability of peptides to bind H2B antibodies was measured in an enzyme-linked immunosorbent assay, using antisera directed against calf thymus and chicken erythrocyte H2B as well as four anti H2B monoclonal antibodies obtained from autoimmune mice. Seven antigenic determinants were localized in the H2B molecule in the vicinity of residues 1–11, 6–18, 15–25, 26–35, 50–65, 94–113 and 114–125. Two of these determinants (residues 6–18 and 26–35) were revealed only through the binding properties of antibodies isolated from autoimmune mice. The usual correlation between hydrophilicity and antigenicity was found to hold for four of the epitopes, and the N- and C-termini of H2B were both antigenically active.

Introduction

Most immunochemical studies of chromatin reported so far have used histone antibodies as analytical probes [1,2]. Unfortunately, very few of the antigenic determinants or epitopes of histones have been located with any precision, and as a result it has been difficult to use immunochemical data for studying the topography of chromatin subunits. In the case of histone H3, one antigenic determinant was found to be located in the C-terminal hexapeptide of the molecule [3]. This information made it possible to show that the C-terminal region of histone H3 was exposed at the surface of nucleosomes and that its accessibil-

ity to antibody binding was lowered by conformational changes induced by the acetylation of histone H4 [4].

Of the four histones present in the core particle, histone H2B has been found to be the most accessible at the surface of chromatin subunits [5–11]. A precise knowledge of the location of the antigenic determinants of H2B would thus be particularly useful for studying the surface topography of chromatin subunits by immunological means. The two halves of the H2B molecule corresponding to the fragments 1–59 and 63–125 obtained by cyanogen bromide cleavage have been shown both to possess antigenic reactivity [12]. Furthermore, a peptide corresponding to residues 36–50 of H2B has also been claimed to be antigenically active [8].

In recent years, two important methodological developments have facilitated the localization of epitopes in proteins, i.e., solid-phase peptide synthesis [13–16] and the hybridoma technology

Abbreviations: MBS, *m*-maleimide-*N*-hydroxysuccinimide ester; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.

* Present address: Abbott Laboratories, North Chicago, IL 60064, U.S.A.

[17–19]. Synthetic peptides have already been used to locate epitopes in histones H3 and H4 [3,11], while the availability of monoclonal autoantibodies specific for histones including H2B [20,21] has made the hybridoma approach also feasible for the study of histone antigenicity.

In the present report, we describe the antigenic activity of a series of peptides of histone H2B obtained either by chemical cleavage or by solid-phase synthesis. The peptides were used in immunochemical binding assays, and after coupling to carrier molecules, some were used for raising antibodies. The results show the presence of at least seven antigenic determinants in the isolated H2B molecule.

Experimental procedures

Histone H2B and natural fragments of H2B

Histone H2B was obtained from calf thymus or chicken erythrocytes chromatin by the selective extraction method of John [22] and purified as described by Michalski-Scrive et al. [23].

The fragments 1–59 and 63–125 were obtained by cyanogen bromide cleavage of calf thymus H2B according to the method of Gross and Witkop [24] followed by gel filtration chromatography on Bio-Gel P-10 with 0.01 M HCl saturated with chloroform as eluent.

The fragment 1–59 (20 mg) was further digested with Arg-C endoproteinase (Boehringer, Mannheim) for 18 h at 20°C in 2 ml of 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8.0) using an enzyme-to-substrate ratio of 1:100 (w/w), or with L-(1-tosylamido-2-phenyl)ethylchloromethyl ketone-treated trypsin (Worthington) for 2 h at 37°C in 2 ml of 0.1 M ammonium bicarbonate (pH 8.0) using an enzyme-to-substrate ratio of 1:50. In both experiments the hydrolysis was stopped by lowering the pH at 2.0 and the hydrolysates were fractionated on Bio-Gel P-6 (minus 400 mesh) column (2.6 × 200 cm) equilibrated and eluted with 0.02 M HCl saturated with chloroform. The endoproteinase digest yielded the two peptides 1–11 and 32–59 with a recovery of 33% and 75%, respectively, whereas the trypsin digest yielded in pure form the peptide 35–43 (Couppez and Sautière, personal communication).

Limited chymotryptic hydrolysis of histone H2B

(100 mg) was carried out in 10 ml 0.1 M ammonium bicarbonate/0.5 M NaCl at pH 8.5 and 20°C for 5 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:5000 (w/w). Limited digestion of histone H2B (50 mg) with chymotrypsin was also performed in 5 ml of 0.1 M sodium acetate at pH 5.0 [25] and 20°C for 2.5 h using an enzyme-to-substrate ratio of 1:5000 (w/w). The action of the enzyme was stopped by lowering the pH at 2.0 and addition of solid urea up to a final concentration of 6 M. The chymotryptic hydrolysate 'pH 5.0' was applied to a Bio-Gel P-10 (200–400 mesh) column (150 × 5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform. This hydrolysate yielded peptides 1–40, 1–42 and 43–121 in pure form. The peptide 1–40 was further cleaved with acetic acid as described below in order to obtain peptide 26–40. The chymotryptic hydrolysate 'pH 8.5' was fractionated on two columns of Sephadex G-100 (90 × 5 cm) coupled in series, using 0.01 M HCl saturated in chloroform as eluent, and yielded peptide 84–121.

Cleavage at aspartic acid residues was performed according to Schroeder et al. [26]. Histone H2B (100 mg) was hydrolysed in 0.25 M acetic acid (10 mg protein/ml) at 105°C for 16 h. The peptides were separated by ion-exchange chromatography on sulfopropyl Sephadex C-50 column (85 × 2.5 cm) equilibrated in 0.1 M NaCl/6 M urea (pH 3.0) and eluted with a linear gradient of NaCl in 6 M urea (pH 3.0) from 0.1 M to 0.7 M (total volume 1300 ml). After desalting by chromatography through Sephadex G-25, the peptides 1–50, 1–24, 26–50 and 52–67 were further purified by chromatography on Sephadex G-50 equilibrated and eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform.

Cleavage at glutamine residues was performed by hydrolysis of 40 mg histone H2B with V8 staphylococcal proteinase (Miles Laboratories, Israel) in 4 ml 0.05 M ammonium acetate at pH 4.0 and 37°C for 18 h [27]. The hydrolysate was made in 6 M urea by addition of solid urea and applied to a Bio-Gel P-6 column (2.5 × 200 cm). The peptides were further purified on a Sephadex G-50 column equilibrated and eluted in 0.01 M HCl. The V8 staphylococcal proteinase digest yielded peptides 77–93, 94–113 and 114–125. It is noteworthy that the bond glutamine 105-leucine

106 was not hydrolysed by the V8 staphylococcal proteinase (Couppez and Sautière, unpublished results).

The purity of the histone fragments was checked by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea [28] using a 17% acrylamide concentration. The histone fragments were characterized by amino acid analysis performed on a Beckman 119 CL amino acid analyzer after hydrolysis in 6 M HCl (1 ml/mg protein) at 110°C for 24 h in vacuo, with one drop or 1% phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Synthesis of H2B peptides

Nine synthetic peptides of chicken erythrocyte histone H2B were prepared by the solid phase method of Merrifield [29]. When necessary for the purpose of coupling to the carrier protein, an additional cysteine was added. The initial *t*-Butyloxycarbonyl amino acid was attached to a hydroxymethyl resin (Peninsula Laboratories, Belmont, CA; 0.5 milliequiv. per g resin). The *t*-butyloxycarbonyl group was removed with 40% distilled trifluoroacetic acid (Aldrich-Chimie, France) in methylene chloride. The peptide resin was then washed and deprotonated with 5% *N,N*-diisopropylethylamine (Aldrich). The next coupling cycle was initiated using equimolar amounts of *t*-butyloxycarbonyl amino acid and dicyclohexyl carbodiimide (Peninsula Laboratories) in 3 molar excess over available amine. After 1 h coupling reaction, the coupling efficiency was assessed by ninhydrin assay. When the coupling reaction was not efficient, the reaction was repeated. For asparagine and glutamine reactions, an equimolar amount of 1-hydroxybenzotriazol in freshly distilled dimethylformamide (SdS, Peypin, France) was added to the protected amino acid.

The following side-chain protecting groups were used: *o*-benzyl for threonine, serine, benzyl ester for aspartic acid and glutamic acid; tosyl for arginine and histidine; *p*-methoxybenzyl for cysteine; *o*-chlorobenzoyloxycarbonyl for lysine; *o*-bromobenzoyloxycarbonyl for tyrosine. The final peptide-resin was cleaved in liquid hydrogen fluoride/10% anisole/1% 1,2-dimercaptoethane. The peptide resin was then washed twice with diethyl ether and the peptide was extracted in 10% acetic acid and lyophilized. Crude peptide was dissolved

in 10% acetic acid (6 M urea and 0.1 M 2-mercaptoethanol were added for cysteine-containing peptides) and desalted on a Sephadex G-25 column (150 × 2.2 cm) equilibrated with 10% acetic acid (and 0.01 M 2-mercaptoethanol for cysteine-containing peptides). The purity of peptide containing fractions was monitored by thin-layer chromatography on precoated TLC silica-gel 60 plates and precoated cellulose TLC plates (Merck, Darmstadt, F.R.G.) in the following solvent systems: *n*-butanol/acetic acid/H₂O/pyridine (15 : 3 : 12 : 10), *n*-butanol/acetic acid/H₂O/pyridine (5 : 1 : 4 : 5), *n*-butanol/ethyl acetate/acetic acid/H₂O (1 : 1 : 1 : 1). After lyophilization, amino acid analysis was performed using a Durum D500 Analyzer. Peptides were also analyzed by high-pressure liquid chromatography on a reverse-phase 4.5 × 250 mm Ultrasphere ODS C18 column (Altex, U.S.A.). Peptides (100 μg) were eluted either with a linear gradient of 0–60% acetonitrile (CH₃CN) containing 0.05 M NaH₂PO₄ or with a linear gradient of 0–100% CH₃CN containing 0.05% trifluoroacetic acid.

Coupling of natural and synthetic peptides to carrier proteins

In order to measure the immunogenicity and antigenic activity of short peptides, they were bound to carrier proteins such as bovine serum albumin, ovalbumin or keyhole limpet hemocyanin by three different coupling methods. Some peptides were coupled by means of 0.1% glutaraldehyde using a 40-fold molar excess of peptide to carrier. Some peptides were bound to bovine serum albumin through the C-terminal additional cysteine using *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) as the coupling reagent [30,31]. Briefly, 1.5 mg bovine serum albumin dissolved in 0.25 ml 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) was reacted with 0.28 mg (40-fold molar excess) MBS (Pierce, U.S.A.) dissolved in dimethylformamide and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. The excess of MBS was removed by filtration through a Sephadex G-50 column (40 × 1.1 cm) equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0). The activated bovine serum albumin was then reacted with a 40-fold molar excess of peptide (to bovine serum albumin) dissolved in 0.5 ml of 100

mM phosphate buffer (pH 7.5). The pH was adjusted to 7–7.5 and the reaction mixture was stirred 3 h at room temperature. Conjugates were finally extensively dialyzed against phosphate-buffered saline.

Some peptides were coupled to carrier protein with EDC hydrochloride. In order to protect lysines from coupling, peptides were first citraconylated using the method of Atassi and Habeeb [32]. Addition of citraconic anhydride (Merck, Darmstadt) to peptide was performed at room temperature and pH 8–9. When the addition of blocking agent was completed, the pH remained constant around 8.5. The reaction was stirred for 1 h at pH 8.5. EDC (Pierce, U.S.A.) was then added to the peptide solution at a final concentration of 5 mg/ml. After stirring for 2–3 min at room temperature, carrier protein (bovine serum albumin, ovalbumin or keyhole limpet hemocyanin) was added in a molar ratio carrier to peptide of 1:40. The solution was slowly mixed during 1 h at 40°C and then extensively dialysed overnight against 5% acetic acid to remove the protecting groups from citraconylated peptides. After de-blocking, the protein peptide conjugates were extensively dialyzed against phosphate-buffered saline.

All conjugates were controlled by 8% polyacrylamide SDS gel electrophoresis and the yield of coupling was determined from amino acid composition data. To establish the number of moles of peptide bound per mole of carrier, the amino acid composition of carrier protein and conjugate was determined. The differential content of amino acids measured in both samples provided the number of peptide molecules bound per carrier molecule.

Antisera and monoclonal antibodies

Antisera to chicken erythrocyte H2B were obtained by immunizing rabbits with H2B-RNA complexes as described by Stollar and Ward [33]. Calf thymus H2B serum was a gift from D. Stollar (Boston, MA). Antisera to peptides 36–43 and 43–50 of H2B were raised by a series of biweekly intramuscular injections of about 100 µg peptide coupled to carrier protein as described before (Table III). The first four injections were performed with keyhole limpet hemocyanin peptide conjugates and the subsequent ones with ovalbumin

peptide conjugates. Conjugates were emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Globulins were prepared from H2B serum by Rivanol precipitation [34].

Four monoclonal antibodies specific for H2B were used in this study. C13 was produced by fusion of splenocytes from autoimmune NZB/NZW F1 mice with X63-Ag8.653 cells (NS1/1 derivative cell line). The hybridization conditions and the characteristics of this hybridoma have been described previously [21].

Antibodies 73 C3, 69 B4 and 41 A5 were from a series of hybridoma constructed from autoimmune MRL lpr/lpr strain of mice (Gordon, J., Kuster, H. and Rordorf, C. unpublished data). Initial screening of culture supernatants was performed by a multi-dot immunobinding assay [35]. Ascites were prepared by injecting Balb/c mice with $2 \cdot 10^7$ hybridoma cells.

The isotypes of C13, 73 C3, 69 B4 and 41 A5 determined by enzyme-linked immunosorbent assay were found to be respectively IgG 2b, IgM, IgG2a and IgM; all of them had K light chains.

Immunological tests

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was carried out with rabbit antisera as described by Muller et al. [11] and with monoclonal antibodies as described by Laskov et al. [21]. For coating microtiter plates, the histones, histone fragments and peptide conjugates were diluted in 0.05 M sodium carbonate (pH 9.6). Antisera specific for mouse IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, λ and K chains were purchased from Miles Yeda (Rehovot, Israel) and Nordic (Tilburg, The Netherlands).

Results

The location and composition of the 16 natural and 7 synthetic peptides used in this work are presented in Table I and II. The natural fragments were obtained from calf thymus H2B, while the synthetic peptides corresponded to different regions of chicken erythrocyte H2B. These two histones differ in their sequence at positions 21, 25, 26, 31, 39 and 61 [36,37]. The antigenic reactivity of the H2B peptides was studied by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using two antisera

TABLE I

AMINO ACID COMPOSITION OF NATURAL FRAGMENTS OF CALF THYMUS H2B

Results are expressed as numbers of amino acid residues per mole of peptide. No corrections were made for hydrolytic losses. The figures in parentheses are the numbers of residues given by the sequence of calf histone H2B [36].

Amino acid	Cyanogen bromide fragments					Chymotryptic and acetic fragments								Staphylococcal V8 proteinase fragments		
	1-59	63-125	1-11	32-59	35-43	1-42	26-40	84-121	1-50	1-24	26-50	43-121	52-67	77-93	94-113	114-125
Asp	2.1 (2)	4.0 (4)	-	1.1 (1)	-	1.4 (1)	-	1.3 (1)	1.7 (1)	-	-	4.8 (5)	1.4 (2)	1.0 (1)	-	-
Thr	2.1 (2)	5.6 (7)	-	1.0 (1)	-	1.3 (1)	-	3.8 (5)	1.1 (1)	1.1 (1)	-	6.1 (6)	1.1 (1)	1.8 (2)	1.0 (1)	2.8 (3)
Ser	6.7 (7)	6.5 (6)	1.1 (1)	4.6 (5)	1.9 (2)	4.5 (5)	2.6 (3)	2.9 (3)	4.9 (5)	1.9 (2)	2.6 (3)	6.8 (7)	2.7 (3)	2.6 (3)	0.9 (1)	1.8 (2)
Glu	4.3 (4)	6.2 (6)	1.2 (1)	2.3 (2)	1.2 (1)	3.3 (3)	1.1 (1)	4.1 (4)	4.0 (4)	1.9 (2)	2.0 (2)	7.1 (7)	-	1.3 (1)	3.0 (3)	-
Pro	5.1 (5)	1.0 (1)	3.5 (4)	1.1 (1)	-	3.6 (4)	-	1.3 (1)	4.5 (5)	3.3 (4)	1.0 (1)	2.2 (2)	-	-	1.0 (1)	-
Gly	3.4 (3)	3.5 (3)	-	1.1 (1)	-	2.3 (2)	1.1 (1)	2.5 (2)	2.6 (2)	1.2 (1)	1.1 (1)	4.7 (5)	2.3 (2)	-	1.0 (1)	1.0 (1)
Ala	6.3 (6)	7.1 (7)	2.9 (3)	1.2 (1)	-	4.7 (5)	-	4.5 (4)	4.7 (5)	4.6 (5)	-	8.1 (8)	1.2 (1)	2.1 (2)	3.0 (3)	1.1 (1)
Val	4.6 (5)	4.1 (4)	-	3.8 (4)	2.0 (2)	2.9 (3)	0.9 (1)	2.7 (3)	4.9 (5)	1.2 (1)	3.7 (4)	6.1 (6)	0.9 (1)	-	2.0 (2)	1.0 (1)
Met	(1) ^a	-	-	(1) ^a	-	-	-	-	-	-	-	1.7 (2)	1.5 (2)	-	-	-
Ile	1.1 (1)	3.7 (4)	-	1.1 (1)	-	-	-	1.6 (2)	-	-	-	5.5 (6)	2.3 (2)	1.1 (1)	1.0 (1)	-
Leu	1.0 (1)	5.0 (5)	-	1.0 (1)	-	-	-	3.2 (4)	1.1 (1)	-	0.9 (1)	5.9 (6)	-	0.9 (1)	4.1 (4)	-
Tyr	2.6 (3)	1.9 (2)	-	2.8 (3)	3.1 (3)	2.4 (3)	1.8 (2)	0.9 (1)	3.0 (3)	-	2.8 (3)	2.1 (2)	-	0.9 (1)	-	1.0 (1)
Phe	-	1.8 (2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.9 (2)	0.9 (1)	-	-	-
His	0.9 (1)	2.0 (2)	-	0.8 (1)	-	-	-	1.0 (1)	0.9 (1)	-	0.8 (1)	2.6 (3)	-	1.0 (1)	1.0 (1)	-
Lys	15.8 (15)	5.7 (5)	2.3 (2)	4.1 (4)	0.9 (1)	11.4 (12)	4.0 (4)	5.4 (4)	14.0 (14)	8.0 (8)	6.3 (6)	8.4 (7)	1.3 (1)	0.9 (1)	1.1 (1)	3.0 (3)
Arg	2.9 (3)	4.8 (5)	-	1.0 (1)	-	3.0 (3)	3.2 (3)	2.9 (3)	3.4 (3)	-	3.1 (3)	4.9 (5)	-	3.1 (3)	1.0 (1)	-

^a Homoserine was found to be present, but was not determined.

TABLE II

AMINO ACID COMPOSITION OF SYNTHETIC PEPTIDES OF H2B

Results are expressed as numbers of amino acid residues per mole of peptides. The numbers in parentheses indicate the values expected from the sequence of chicken erythrocyte H2B [37].

Amino acid	6-18	32-50	36-43	36-50	39-47	43-50	48-63
Asp	-	-	-	-	-	-	2.0 (2)
Thr	-	-	-	-	-	-	1.0 (1)
Ser	2.0 (2)	2.4 (3)	2.0 (2)	1.9 (2)	-	-	3.0 (3)
Glu	-	2.0 (2)	-	1.2 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	-
Pro	2.6 (2)	1.1 (1)	-	1.3 (1)	-	1.0 (1)	0.9 (1)
Gly	1.1 (1)	-	-	-	-	-	2.2 (2)
Ala	2.7 (3)	-	-	-	-	-	1.0 (1)
Val	0.8 (1)	2.9 (3)	0.9 (1)	2.6 (3)	2.6 (3)	1.6 (2)	0.4 (1)
Met	-	-	-	-	-	-	1.8 (2)
Ile	-	1.0 (1)	1.0 (1)	0.8 (1)	-	-	0.9 (1)
Leu	-	1.1 (1)	-	1.0 (1)	1.0 (1)	1.0 (1)	-
Tyr	-	3.0 (3)	2.4 (3)	2.8 (3)	2.0 (2)	-	-
Phe	-	-	-	-	-	-	-
His	-	0.9 (1)	-	1.1 (1)	-	0.8 (1)	0.8 (1)
Lys	3.9 (4)	3.4 (3)	1.1 (1)	2.3 (2)	2.2 (2)	2.1 (2)	1.1 (1)
Arg	-	0.7 (1)	-	-	-	-	-

directed against H2B (chicken erythrocyte), one antiserum specific for H2B (calf thymus) obtained from Dr. D. Stollar and four monoclonal antibodies reacting with H2B that were derived from autoimmune mice. In control experiments, no binding was observed in ELISA when these reagents were tested with histones H1, H5, H2A, H3 and H4.

The microtiter plates used in ELISA were coated

in the presence of carbonate buffer (pH 9.6) either with free peptides or with peptides coupled to various carrier proteins. The degree of carrier protein substitution was determined by amino acid analysis (Table III). The stability of the conjugates was also verified over a period of several weeks by measuring the molecular weight of conjugates by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Since different peptides vary in their ability to

TABLE III

COUPLING PROCEDURE OF NATURAL AND SYNTHETIC PEPTIDES OF H2B TO CARRIER PROTEINS

GL, glutaraldehyde; BSA, bovine serum albumin; OVA, ovalbumin; KLH, keyhole limpet hemocyanin.

H2B fragments	Sequence	Attachment procedure	Carrier protein	Degree of substitution ^a
1-11	P-E-P-A-(K)-S-A-P-A-P-(K) ^b	GL	BSA	20
35-43	(E)-S-Y-S-V-Y-V-Y-(K)	GL	BSA	25
36-43	(S)-Y-S-I-Y-V-Y-(K)	GL	BSA	24
		GL	OVA	11
		GL	KLH	n.d.
39-47 (CYS) ^c	V-Y-V-Y-L-V-L-K-Q-(C)	MBS	BSA	14
43-50	K-V-L-K-Q-V-H-(P)	EDC	BSA	8
		GL	KLH	n.d.

^a Number of peptides per carrier molecule determined by amino acid analysis as described in Material and Methods.

^b Circled residues correspond to points of attachment to carrier protein.

^c Residue added to sequence for attachment purpose.

stick to plastic, initial binding tests were performed to ascertain the quantity of peptide needed to produce adequate absorbance readings. Coating of plates with bovine serum albumin conjugates presented no problem. On the other hand, it could be argued that some free peptides may appear to be non-reactive in ELISA simply because they do not attach themselves to the plastic. However, with the exception of peptides 36–50 and 77–93, all peptides studied in Tables IV and V were reactive with at least one antiserum or monoclonal anti-

TABLE IV

BINDING OF H2B ANTISERA TO H2B FRAGMENTS IN ELISA

The binding of H2B antiserum was measured in ELISA by coating wells with 200 ng/ml H2B (0.015 μ M). H2B fragments (5 μ M) or BSA-H2B peptide conjugates (5 μ M). The coupling ratios of peptide/carrier are indicated in Table III. All natural fragments (N) were prepared from calf thymus (CT) H2B; synthetic peptides (S) correspond to the sequence of chicken erythrocyte (CE) H2B. Antisera to H2B were diluted 1:500. values are expressed in absorbance units measured at 405 nm. Background values detected in absence of antigen were about 0.05 and with normal rabbit serum less than 0.20.

Sequence	Antisera		
		H2B (CE)	H2B (CT)
Whole H2B (CT)	N	1.54	1.57
Whole H2B (CE)	N	1.68	1.80
1–11 (BSA)	N	1.96	0.26
1–24	N	1.63	1.40
1–42	N	1.19	1.29
1–50	N	1.12	1.06
1–59	N	1.20	1.22
6–18	S	0.07	0.20
26–40	N	0.35	0.19
26–50	N	0.29	0.17
32–50	S	0.10	0.24
32–59	N	1.30	1.17
35–43 (BSA)	N	0.21	0.18
36–43 (BSA)	S	0.24	0.17
36–50	S	0.09	0.24
39–47 (BSA)	S	0.29	0.11
43–121	N	> 2	> 2
43–50 (BSA)	S	0.34	0.35
48–63	S	1.86	1.81
52–67	N	1.58	1.61
63–125	N	1.19	> 2
77–93	N	0.07	0.21
84–121	N	1.30	1.86
94–113	N	1.13	0.46
114–125	N	0.49	1.37

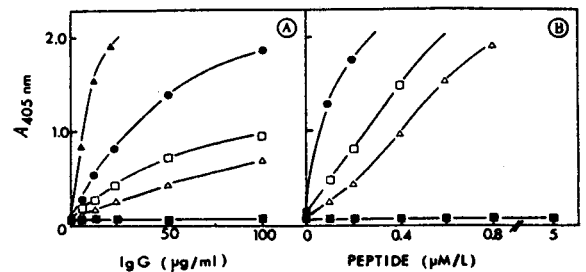


Fig. 1. Binding in ELISA of H2B antibodies to H2B (▲—▲) and H2B fragments 1-59 (●—●), 84-121 (□—□), 63-125 (△—△) and 26-40 (■—■). (A) Various concentrations of anti H2B IgG were used with a constant concentration of peptide (200 nM). (B) 50 μ g anti H2B IgG were used with various concentrations of peptide. Binding of normal rabbit globulins was insignificant.

body, indicating that they had coated the plates satisfactorily.

The differential ability of a series of peptides (residues 1–59, 26–40, 63–125, 84–121) to bind H2B antibodies is shown in Fig. 1A. The extent of antibody binding to peptide 63–125 was about 20-fold less than to histone H2B, but the amount of binding shown by this peptide increased considerably at higher peptide concentration (Fig. 1B). In order to ensure that weak binding by any peptide would not go undetected, an excess of 5 μ M of each peptide was used in all subsequent

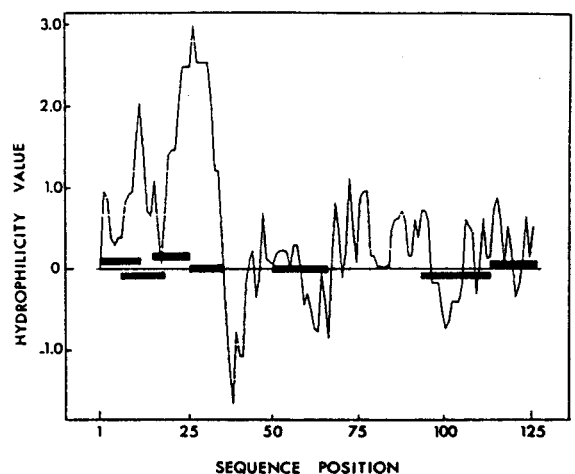


Fig. 2. Hydrophilicity profile of chicken erythrocyte H2B. Average hydrophilicity values are plotted against sequence position in the peptide chain, according to Hopp and Woods [15]. Bars represent the position of antigenic regions of H2B

TABLE V
BINDING OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO H2B FRAGMENTS IN ELISA

The binding of monoclonal antibodies specific for H2B was measured in ELISA by coating wells with 200 ng/ml H2B (0.015 μ M), H2B fragments (5 μ M) or BSA-H2B peptide conjugates (5 μ M). The coupling ratios of peptide/carrier are indicated in Table III. All natural peptides (N) were prepared from calf thymus (CT) H2B. Synthetic peptides (S) correspond to the sequence of chicken erythrocyte (CE) H2B. Ascites 73 C3, 41 A5 and 69 B4 were diluted 1:10000; antibody C13 was used at 1 μ g Ig/ml. Values are expressed in absorbance units measured at 405 nm. Background values detected in absence of antigen or with non-related ascitic fluids were less than 0.10. n.d. not determined.

H2B sequence		Monoclonal antibodies			
		73C3	41A5	69B4	C13
Whole H2B (CT)		1.81	1.87	1.23	n.d.
Whole H2B (CE)		1.87	1.43	1.12	1.27
1-11 (BSA)	N	> 2	0.01	0.06	0.25
1-24	N	1.71	1.59	0.31	n.d.
1-42	N	1.69	1.82	1.71	1.13
1-50	N	1.86	1.76	1.12	n.d.
1-59	N	1.80	1.80	1.00	> 2
6-18	S	0.32	1.90	0.13	n.d.
26-40	N	0.12	0.09	1.39	n.d.
26-50	N	0.24	0.10	> 2	n.d.
32-59	N	0.14	0.23	0.27	0.24
35-43 (BSA)	N	0.17	0.03	0.11	n.d.
36-50	S	0.13	0.17	0.10	n.d.
39-47 (BSA)	S	n.d.	0.02	0.07	n.d.
43-121	N	n.d.	0.07	0.04	n.d.
48-63	S	0.12	0.18	0.06	n.d.
52-67	N	0.08	0.01	0.01	n.d.
63-125	N	0.10	0.08	0.04	0.22
84-121	N	0.21	0.03	0.05	0.41

assays. This concentration corresponds to 4-40 μ g/ml of peptide depending on peptide length. It should be stressed, however, that the absorbances obtained in ELISA with each peptide, whether free or coupled to a carrier, are not strictly comparable as their absorption to the plastic surface could vary considerably.

The two halves of the H2B molecule (residues 1-59 and 63-125) were both found to harbor antigenic activity, which confirms the results obtained by Di Padua Mathieu and Stollar [12]. Attempts were then made to locate with more precision the position of the epitopes on these two fragments. When N-terminal peptides of decreasing length (residues 1-59, 1-50, 1-42, 1-24 and 1-11) were tested with H2B (chicken erythrocyte) antiserum, the shortest peptide 1-11 was found to possess a high degree of antigenic activity (Table IV). When the same peptides were tested with H2B (calf thymus) antiserum, the region 1-11

appeared to be devoid of activity, whereas the longer peptides were all active. These results point to the presence of at least two epitopes in the N-terminal half of the molecule, one in the region 1-11 that is recognized only by H2B (chicken erythrocyte) antibodies and a second one in the region 12-59. From the results presented in Table IV according to which H2B (calf thymus) antibodies bind to peptides 1-24, 1-42 and 1-50 but not to peptides 6-18, 26-40 and 26-50 it seems that a second epitope is located in the region 15-25 of peptide 1-59. The possible presence of a third epitope in the region 26-59 was then examined by testing a series of overlapping peptides corresponding to residues 26-40, 35-43, 36-43, 39-47, 43-50, 32-50, 26-50 and 32-59. Since the only peptide that was able to bind H2B (chicken erythrocyte) antibodies contained residues 50-59, it seems that a third epitope is located in the vicinity of the C-terminal end of peptide 1-59.

One of the shortcomings of localizing antigenic determinants in proteins by testing the activity of natural fragments lies in the possibility that the cleavage may have occurred within the boundaries of the epitope. The availability of natural peptide 52-67 made it possible to test whether the cleavage at the two methionine residues 59 and 62 could have impaired the activity of an epitope in this region. The considerable antigenic activity of peptide 52-67 as well as that of the synthetic peptide 48-63 indicates that the epitope identified earlier in the vicinity of residues 50-59 may stretch to the region 50-65.

Attempts to locate the antigenic activity in the region 63-125 were made with peptides corresponding to residues 77-93, 84-121, 94-113 and 114-125. The H2B (chicken erythrocyte) antiserum was able to recognize an epitope in peptide 94-113, while H2B (calf thymus) antiserum recognized one in peptide 114-125 (Table IV). The results of all assays with polyclonal antisera described so far pointed to the presence of at least five epitopes in the H2B molecule located in the vicinity of residues 1-11, 15-25, 50-65, 94-113 and 114-125.

The availability of four monoclonal antibodies specific for H2B made it possible to delineate further the exact position of some of the H2B epitopes. As shown in Table V, the four monoclonal antibodies 73C3, 41A5, 69B4 and C13 recognized epitopes that were all situated in the N-terminal half of histone H2B. Antibody 73C3 reacted strongly with the region 1-11; antibody 41A5 did not recognize the fragment 1-11 nor 26-40 but reacted strongly with synthetic peptide 6-18. This peptide had been synthesized because it corresponds to a turn in the secondary structure prediction of Fasman et al. [38]. Antibody 69B4 was able to bind to peptide 26-40 but not to peptides 1-24 and 32-59; the epitope recognized by this antibody is then probably located in residues 26-35. Only a small quantity of antibody C13 was available for testing; from a limited number of assays performed with only a few peptides it seems that this antibody recognizes an epitope in the region 10-35 (Table V).

The results obtained with monoclonal antibodies confirmed the existence of an epitope in residues 1-11 established with polyclonal antisera

and allowed two other epitopes to be localized in residues 6-18 and 26-35. The combined results presented in Table IV and V indicate that the H2B molecule may possess as many as seven epitopes, located in residues 1-11, 6-18, 15-25, 26-35, 50-65, 94-113 and 114-125.

One unexpected result in the localization of these seven epitopes was the absence of antigenic activity in the region 36-50 which had previously been shown to contain an epitope of H2B [8]. Neither of the two antisera used in the present study reacted with the natural fragment 35-43 nor with the synthetic peptides 36-43, 39-47, 43-50 and 36-50 (Table IV). In complement fixation tests, peptides 36-43 and 43-50 were unable to inhibit the binding between H2B and its antibodies using 1000-fold molar excess of peptide over histone H2B. The presence of antigenic activity in the region 36-50 was also tested by raising antibodies to the synthetic peptides 36-43 and 43-50. Rabbits were immunized with these fragments coupled to keyhole limpet hemocyanin and ovalbumin (see Table III). Antibodies obtained after four injections were tested in ELISA using the fragment 32-59 and H2B as antigen. Antibodies raised against the 36-43 and 43-50 peptides reacted with the fragment 32-59 but not with whole histone H2B. From all these results obtained by direct binding or inhibition tests it seems that the region 36-50 does not correspond to an epitope of H2B.

Discussion

Previous work on the location of antigenic determinants in histone H2B showed that the two halves of the molecule (corresponding to residues 1-59 and 63-125) possessed antigenic reactivity [12]. As both fragments were able to give a complement fixation reaction, it was inferred that each one contained at least two epitopes. Within the fragment 1-59, the region 1-34 seemed to play a major role in antigenicity, since various H2B histones that showed sequence differences in this region were found to be antigenically distinct [12]. In addition to the antigenic reactivity of the region 1-34, the assignment of a second epitope to the region 36-50 reported by Absolom and Van Regenmortel [8] appeared to be in agreement with the

existence of at least two epitopes in the fragment 1–59. However, the presence of antigenic activity in the region 36–50 of H2B could not be confirmed with the antisera used in the present study. As this region corresponds to the most hydrophobic part of the H2B molecule (Fig. 2), it is possible that the earlier report was based on a nonspecific reaction. The discrepancy may also reflect the individual immune response of the different animals used in the present and earlier studies. Several examples of the differential ability of individual antisera to recognize separate epitopes on the same molecule are shown in Table IV. Epitopes 1–11 and 94–113 are not recognized by H2B (calf thymus) antiserum, while epitope 114–125 is not recognized by H2B (chicken erythrocyte) antiserum, in spite of the fact that there are no amino acid substitutions in these regions of the two histones.

The localization of the antigenic determinants of H2B was first attempted by measuring the ability of natural fragments of the molecule to bind to H2B antibodies in an indirect ELISA. Using different fragments obtained by enzymatic and chemical cleavage of H2B, the peptides 1–11, 26–40, 32–59, 94–113 and 114–125 were found to harbor antigenic activity. No activity was found in the natural fragment 35–43, but since an earlier study had indicated that residues 36–50 were antigenic, it was decided to synthesize a series of overlapping peptides in this region. However, none of the synthetic peptides corresponding to residues 36–43, 43–50, 39–47 and 36–50 was found to be antigenically active. This in turn led to the hypothesis that the activity of fragment 32–59 was due to the residues between 50 and 59. Peptide 48–63 was then synthesized and found to be recognized by H2B antibodies, a result confirmed by the activity found in the natural fragment 52–67. The position of the epitope in this region was then tentatively assigned to residues 50–65.

Recently, Hopp and Woods [15,39] have shown that it is possible to predict the location of epitopes in proteins by defining points of greatest local hydrophilicity in the amino acid sequence. This method is based on the generalization that hydrophilic regions are predominantly surface-oriented and therefore more likely to be antigenic. The hydrophilicity profile of H2B together with

the location of the proposed epitopes is shown in Fig. 2. The decision to synthesize the antigenically active peptide 6–18 was made on the strength of the local maximum in Fig. 2 and because this region corresponds to a turn in the secondary structure prediction of Fasman et al. [38]; Although the correlation between hydrophilicity and antigenicity holds for only four of the H2B epitopes, two of these correspond to the highest peaks of the plot (Fig. 2). The presence of antigenic activity in the C- and N-termini of H2B is in line with the situation observed in many proteins [3,16,40,41]. The surface orientation of many termini together with their relative flexibility [42] could explain the frequency with which they are found to represent epitopes.

The approach used in the present study namely to analyse the antigenic structure of a molecule by measuring the antigenicity of peptide fragments allows only the localization of continuous epitopes, i.e., epitopes made up of a continuous sequence of surface amino acid residues [43]. The identification of so-called discontinuous epitopes consisting of residues which are not contiguous in the primary structure but are brought together at the surface of the protein by the folding of the polypeptide chain is precluded by the type of analysis used in this work. Discontinuous and topographic determinants that cannot be defined solely by a linear sequence of residues appear to be numerous in globular proteins [14,55] and there is evidence that they also exist in histones [21].

It is also possible that the quaternary structure arising from histone-histone interactions within chromatin subunits induces the formation of new epitopes absent in the histone monomers. Such novel epitopes, known as neotopes, are commonly found, for instance, in the polymerized proteins of viral capsids [44]. The existence of such neotopes in chromatin would explain why certain antisera fail to reveal any antigenic cross-reactivity between histones and chromatin subunits [45].

Although the immunogenic stimulation responsible for the appearance of histone antibodies in lupus mice is not known, it is noteworthy that the two monoclonal antibodies specific for the peptides 6–18 and 26–35 recognized the H2B molecule in solution (Table V). This suggests that these two regions are accessible at the surface of

the native molecule, in spite of the fact that the corresponding fragments are not recognized by the anti H2B polyclonal antisera used in this work. These results show that monoclonal autoantibodies are useful reagents for delineating antigenic determinants in histones that may have escaped detection with polyclonal antisera.

Several authors have found that the H2B antibodies present in patients suffering from autoimmune disease are directed against the trypsin-sensitive N-terminal part of the molecule [20,46-48]. This region is fairly unstructured and is not involved in histone interactions [38,49-52]. The N-terminal 40 residues of H2B have undergone most of the mutations during evolution [53] and it is also in this region that most post-translational modifications are taking place. The presence of four epitopes in this region has made it possible to use the corresponding antibodies to study functional aspects of chromatin [54].

Acknowledgements

We are grateful to Dr. R. Laskov for a gift of monoclonal antibody C13 and to Dr. D. Stollar for antiserum to calf thymus H2B (No. 392F). We thank Drs. I. Amiri for helpful suggestions in coupling experiments, J. Reinbolt for amino acid analysis and G. de Marcillac for hydrophilicity analysis. The skillful technical assistance of Mr. M.J. Dupire, T. Ernout, A. Hémez and H. Kuster is gratefully acknowledged. J.P.B. is grateful to Peninsula Laboratories, Inc, San Carlos, CA for advice on synthesis and purification of peptides.

References

- 1 Bustin, M. (1978) in *The Cell Nucleus* (Busch, H., ed.), Vol. IV, Part A, pp. 195-238, Academic Press, New York
- 2 Bustin, M. (1979). *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 88, 105-142
- 3 Muller, S., Himmelpach, K. and Van Regenmortel, M.H.V. (1982) *EMBO J.* 1, 421-425
- 4 Muller, S., Erard, M., Burggraf, E., Couppez, M., Sautière, P., Champagne, M. and Van Regenmortel, M.H.V. (1982) *EMBO J.* 1, 939-944
- 5 Bustin, M. (1973) *Nature New Biol.* 245, 207-209
- 6 Goldblatt, D. and Bustin, M. (1975) *Biochemistry* 14, 1689-1695
- 7 Bustin, M., Simpson, R.T., Sperling, R. and Goldblatt, D. (1977) *Biochemistry* 16, 5381-5385
- 8 Absolom, D. and Van Regenmortel, M.H.V. (1978) *FEBS Lett.* 85, 61-64
- 9 Goldblatt, D., Bustin, M. and Sperling, R. (1978) *Exp. Cell Res.* 112, 1-14
- 10 Romac, J., Bouley, J.P. and Van Regenmortel, M.H.V. (1981) *Anal. Biochem.* 113, 366-371
- 11 Muller, S., Soussanich, A., Bouley, J.P., Reinbolt, J. and Van Regenmortel, M.H.V. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 747, 100-106
- 12 Di Padua Mathieu, D. and Stollar, D. (1980) *Biochemistry* 19, 2246-2252
- 13 Atassi, M.Z. (1979) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 6, 337-369
- 14 Todd, P.E.E., East, I.J. and Leach, S.J. (1982) *Trends Biochem. Sci.* 7, 212-216
- 15 Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3824-3828
- 16 Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Green, N. and Lerner, R.A. (1983) *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 425-446
- 17 Berzofsky, J.A., Buckenmeyer, G.K., Hicks, G., Gurd, F.R.N., Feldmann, R.J. and Minna, J. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3189-3198
- 18 Leach, S.J. (1983) *Biopolymers* 22, 425-440
- 19 Van Regenmortel, M.H.V. (1984) in *Hybridoma Technology in Agricultural and Veterinary Research* (Stern, N. and Gambe, R., eds.), pp. 42-80, Rowman & Allenheld, Totowa, NJ
- 20 Turner, B.M. (1982) *Chromosoma (Berl.)* 87, 345-357
- 21 Laskov, R., Muller, S., Hochberg, M., Giloh, H., Van Regenmortel, M.H.V. and Eilat, D. (1984) *Eur. J. Immunol.* 14, 75-81
- 22 Johns, E.W. (1964) *Biochem. J.* 92, 55-59
- 23 Michalski-Scrive, C., Aubert, J.P., Couppez, M., Biserte, G. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1982) *Biochimie* 64, 347-355
- 24 Gross, E. and Witkop, B. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1856-1860
- 25 Ohe, Y., Hayashi, H. and Iwai, K. (1979) *J. Biochem. Tokyo* 85, 615-624
- 26 Schroeder, W.A., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Cormick, J. and Jones, R.T. (1963) *Biochemistry* 2, 992-1008
- 27 Houmard, J. and Drapeau, G.R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3506-3509
- 28 Panyim, S. and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346
- 29 Barany, G. and Merrifield, R.B. (1980) in *The Peptides* (Gross, E. and Meienhofer, J. eds.), Vol. 2, Part A, Academic Press, New York
- 30 Kitagawa, T. and Aikawa, T. (1976) *J. Biochem.* 79, 233-236
- 31 Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. and Lerner, R.A. (1982) *Cell* 28, 477-487
- 32 Atassi, M.Z. and Habeeb, A.F.S.A. (1972) *Methods Enzymol.* 25B, 546-553
- 33 Stollar, B.D. and Ward, M. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1261-1266
- 34 Horejsi, J. and Smetana, R. (1956) *Acta Med. Scand.* 155, 65-70
- 35 Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. (1982) *Anal. Biochem.* 119, 142-147

- 36 Iwai, K., Hayashi, H. and Ishikawa, K. (1972) *J. Biochem.* 72, 357-367
- 37 Van Helden, P.D., Strickland, W.N., Strickland, M. and Von Holt, C. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 703, 17-20
- 38 Fasman, G.D., Chou, P.Y. and Adler, A.J. (1976) *Biophys. J.* 16, 1201-1238
- 39 Hopp, T.P. and Woods, K.R. (1983) *Mol. Immunol.* 20, 483-489
- 40 Walter, G., Scheidtmann, K.H., Carbone, A., Laudano, A.P. and Doolittle, R.F. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 5197-5200
- 41 Altschuh, D., Hartman, D., Reinbolt, J. and Van Regenmortel, M.H.V. (1983) *Mol. Immunol.* 20, 271-278
- 42 Thornton, J.M. and Sibanda, B.L. (1983) *J. Mol. Biol.* 167, 443-460
- 43 Atassi, M.Z. and Smith, J.A. (1978) *Immunochemistry* 15, 609-610
- 44 Van Regenmortel, M.H.V. (1982) *Serology and Immunochemistry of Plant Viruses*, 302 pp., Academic Press, New York
- 45 Tahourdin, C.S.M. and Bustin, M. (1980) *Biochemistry* 19, 4387-4394
- 46 Rekvig, O.P. and Hannestad, K. (1979) *J. Immunol.* 123, 2673-2681
- 47 Rekvig, O.P. and Hannestad, K. (1981) *Scand. J. Immunol.* 13, 597-604
- 48 Hardin, J.A. and Thomas, J.O. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7410-7414
- 49 Boublik, M., Bradbury, E.M., Crane-Robinson, C. and Johns, E.W. (1970) *Eur. J. Biochem.* 17, 151-159
- 50 Bradbury, E.M. and Rattle, H.W.E. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 270-281
- 51 Moss, T., Cary, P.D., Abercrombie, B.D., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E.M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 71, 337-350
- 52 Tancredi, T., Temussi, P.A., Paolillo, L., Trivellone, E., Crane-Robinson, C. and Bradbury, E.M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 403-408
- 53 Von Holt, C., Strickland, W.N., Brandt, W.F. and Strickland, M.S. (1979) *FEBS Lett.* 100, 201-218
- 54 Muller, S., Mazon, A., Martinage, A. and Van Regenmortel, M.H.V. (1984) *EMBO J.* 3, 2431-2436
- 55 Benjamin, D.C., Berzofsky, J.A., East, I.J., Gurd, F.R.N., Hannum, C., Leach, S.J., Margoliash, E., Michael, J.G., Miller, A., Prager, E.M., Reichlin, M., Sercarz, E.E., Smith-Gill, S.J., Todd, P.E. and Wilson, A.C. (1984) *Annu. Rev. Immunol.* 2, 67-101

ANTIBODIES FROM PATIENTS WITH DRUG-INDUCED AND IDIOPATHIC LUPUS ERYTHEMATOSUS REACT WITH EPITOPES RESTRICTED TO THE AMINO AND CARBOXYL TERMINI OF HISTONE¹

JITENDRA GOHILL,* PETER D. CARY,[†] MAURICE COUPEZ,[‡] AND MARVIN J. FRITZLER^{2*}

From the *Departments of Medicine and Medical Biochemistry, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada; the [†]Biophysics Laboratories, Portsmouth Polytechnic, Portsmouth, UK; and [‡]Unite 124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer, Lille, France

The sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and drug-induced lupus (DIL) were used to study the antigenic epitopes on nuclear histones that bind antibodies in these sera. ELISA and immunoblotting techniques showed that antibodies from both patient groups bound all classes of intact histone: H1 > H2B > H2A > H3 > H4. The different classes of histone were enzymatically or chemically cleaved to produce a series of peptide fragments which were then used to map the reactive epitopes by ELISA and immunoblotting. Ten of 11 DIL sera and 11 of 12 SLE sera bound the carboxy and amino terminal peptides. Only one sera of each group bound to the central hydrophobic polypeptide. The reactivity of DIL sera with fractionated histone polypeptides was similar to that observed with SLE sera. This observation suggests that the histone epitopes reacting with DIL sera are no less restricted than those reacting with SLE.

Antibodies directed against histones are one of many autoantibodies found in the sera of patients with systemic rheumatic diseases. The evidence that histone is a major autoantigen dates to studies demonstrating that sera from patients with systemic lupus erythematosus (SLE) react with calf thymus nucleohistone (1). On the basis of complement fixation assays, antibodies to histone in the sera of patients with systemic rheumatic diseases were thought to occur relatively infrequently and in low titer (2). However, the complement fixation assay may lack sensitivity, due in part to the anticomplementary activity of histone (3). In 1976, Tan et al. (4) described an immunofluorescence assay for antihistone antibodies which was based on the observation that nuclear proteins could be extracted from tissue nuclei, leaving the DNA behind to recombine with purified histones added at a later step. Several investigators have found that antihistone antibodies detected by using this assay are present in at least 30% of patients with idiopathic

SLE and in greater than 90% of patients with procainamide-induced lupus erythematosus (LE)³ (5-8). It was determined that idiopathic SLE sera reacted with all of the histone classes (H1, H2A, H2B, H3, H4), although the majority reacted with the bimolecular complex of H2A/H2B (5, 7). In contradistinction, the sera from patients with procainamide-induced LE reacted with a more restricted set of histones and, in particular, the H2A/H2B complex (5). These studies have been confirmed by using other techniques such as radioimmunoassay (9) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (10, 11). These newer techniques were also used to show that sera from patients with hydralazine-induced LE reacted with other classes of histone such as H3 and H4 (6). All of these reports have suggested that the sera of drug-induced lupus (DIL) patients are more restricted in their reactivity with histones than the sera of patients with idiopathic SLE. These observations have led to our study of the antigenic epitope(s) on histones which react with sera of these patients.

Nuclear histone is bound to DNA in a series of structures resembling "beads on a string" (12). These "beads", known as nucleosomes, consist of octamers of H2A, H2B, H3, and H4 separated from each other by internucleosomal H1 bound to a strand of DNA (13). The exact molecular structure of the nucleosome is currently debated, but the experimental evidence suggests that each nucleosome is composed of an inner core of two molecules each of H3 and H4 and an outer portion of two molecules each of H2A and H2B. Interwound in this protein polymer are 140 to 160 base pairs of DNA. The nucleosomal structure is compact, but relatively exposed, and loosely bound portions of the histone molecules are available for protease cleavage (14, 15). These protein "tails," along with other peptide fragments of chicken erythrocyte and calf thymus histones, were prepared and were tested for their reactivity with DIL and SLE sera by ELISA and immunoblotting techniques. By using this approach, we have been able to identify and map the antigen epitopes that react with DIL and SLE sera.

Received for publication May 29, 1985.

Accepted for publication July 29, 1985.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This research was supported by the Alberta Heritage Foundation for Medical Research and the Medical Research Council of Canada (Grant MA 6700).

² Address reprint requests to: Dr. M. J. Fritzler, Faculty of Medicine, University of Calgary, 3330 Hospital Drive N.W. Calgary, Alberta, T2N 4N1, Canada.

MATERIALS AND METHODS

Serum. Sera were obtained from SLE patients who had antihistone antibodies as determined by the extraction-reconstitution assay (4) and who met at least four of the revised American Rheumatism Association criteria for that disease (16). All patients with procain-

³ Abbreviations used in this paper: DIL, drug-induced lupus; E:S, enzyme to substrate ratio; LE, lupus erythematosus; NHS, normal human sera.

amide-induced LE had antihistone antibodies and were diagnosed on the basis of clinical and serologic features that resolved after drug withdrawal. All sera were heated for 30 min at 56°C to inactivate complement and were stored at -20°C. Normal human sera (NHS) and a serum with anti-nRNP (U1RNP) antibodies were used as controls (17).

Purification of histone fractions. Calf thymus and chicken erythrocyte histones were extracted from nuclear chromatin with 0.2 M H₂SO₄ and were fractionated on a Bio-gel P60 column (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) as described (18). To prepare protease-digested histones, chicken erythrocyte nuclei were digested with trypsin and were extracted with 0.2 M H₂SO₄ (8). This procedure produces a group of polypeptides referred to as limit peptides. Separation of limit peptides by high performance liquid chromatography was accomplished by loading 500 µg of limit peptides in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA, v/v in distilled water) onto a reverse-phase µBondapak C18 column (Waters Associates, Milford, MA) and eluted over 1 hr with a 25 to 100% linear gradient of 0.1% TFA in H₂O to 0.1% TFA-60% acetonitrile. The eluted samples were lyophilized and the purity of the peptides were confirmed by amino acid analysis on a Beckman 119 CL amino acid analyzer after hydrolysis in 6 M HCl (1 mg/ml protein) at 110°C for 24 hr in vitro. One drop of 1% phenol was added before incubation to avoid excessive degradation of tyrosine.

Cleavage of histone H2A. Peptide 91-129 was obtained by hydrolysis of 100 mg of H2A in 4 ml of 0.25 M acetic acid at 107°C for 20 hr. Peptide 1-56 was obtained by Staphylococcal V8 protease digestion at 37°C for 1 hr at an enzyme to substrate ratio (E:S) of 1:1000. Peptide 32-129 was obtained by chymotryptic digestion at 37°C for 30 min at an E:S ratio of 1:1000. The peptides were separated by Sephadex column chromatography as described (19). Peptides 12-20, 21-32, 30-32, 36-77, 78-81, and 89-129 were obtained by high performance liquid chromatography separation of the hydrolysate obtained after digestion of H2A with murine submaxillary protease at an E:S of 1:50 at 37°C for 2 hr.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) and immunoblotting. Eighteen percent SDS-PAGE gels were cast at a dimension of 120 × 1.5-mm and electrophoresis was performed (20). The proteins were electrophoretically transferred by using a modified technique of Hardin and Thomas (21). Nitrocellulose strips were preincubated in 10% fetal calf serum and 0.5% gelatin in PBS overnight at 4°C, and were then transferred to a 1/40 dilution of SLE sera or a 1/20 dilution of DIL sera in buffer A (0.25% gelatin, 0.05 M Tris pH 7.5; 5 mM EDTA, 0.15 mM NaCl) and were allowed to incubate at 4°C for 1 hr. The strips were then washed for 20 min in three changes of buffer A containing 0.05% Nonidet P-40 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and 0.1% Triton X-100 (Sigma), and were then incubated in a buffered solution of ¹²⁵I-protein A (Amersham, Arlington Heights, IL; specific activity 30 µCi/µg, 2 × 10⁵ dpm/ml) for 1 hr. The strips were then washed in four changes of buffer B (0.25% gelatin, 0.05 M Tris, pH 7.5, 5 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.4% Sarkosyl (Ciba-Geigy, Toronto, ON) and 0.1% Triton X-100), were dried, and were then transferred to a Picker cassette fitted with an enhancing screen and Kodak X-omat film for autoradiographic development overnight at -70°C.

ELISA. ELISA of intact histone fractions, and histone peptides followed the protocol of other investigators (11), with the following modifications: Immunolon II microtiter plates (Dynatech, Alexandria, VA) were coated with 200 µl of 100 nM of intact histone or histone peptides by incubation for 16 hr at 4°C. Sera were added at a dilution of 1/100, and excess antibody was removed by washing with 0.05% Tween-20 PBS. Alkaline phosphatase-conjugated anti-human Ig (Sigma) diluted 1/1000 was then added, the plates were washed to remove unbound enzyme-antibody conjugate, and 10 mg/ml *p*-nitrophenyl disodium phosphate (Sigma) in 1 M diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂ was added as substrate. The plates were read at 405 nm after 60 min of incubation in a Titertek Multiscanner (Flow Laboratories, McLean, VA).

RESULTS

Equimolar quantities of purified histone fractions H1, H2A, H2B, H3, and H4 were coated onto ELISA plates and were tested for reactivity with SLE and DIL sera (Table I and Fig. 1). Of 39 idiopathic SLE sera tested, 37 showed reactivity with H1 at a median value of 1.79 optical density (OD) units. Similarly, nine of 11 DIL sera that were tested showed reactivity with H1 and had a median OD of 1.55. H1 was the most reactive of the histone fractions in both DIL and SLE. Thirty-one of the

TABLE I
Median antibody levels^a to histone classes in sera of patients with DIL, SLE, and control groups

Group	No. of Sera	Histone Class				
		H1	H2A	H2B	H3	H4
SLE	39	1.79	1.00	1.58	0.76	0.54
DIL	11	1.55	1.02	1.32	0.66	0.43
NHS	10	0.09	0.05	0.04	0.03	0.04

^a Antibody levels for histone classes are the medians of ELISA values (OD 405) for each group.

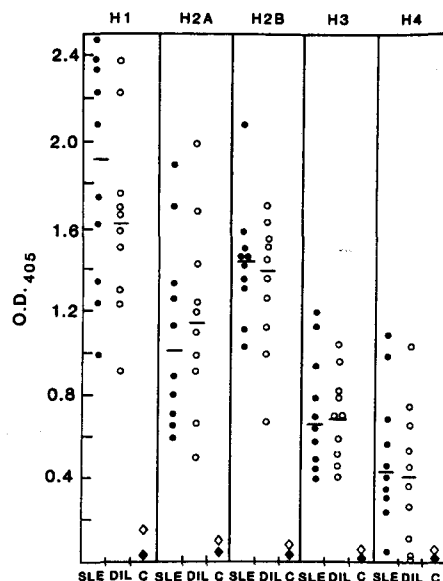


Figure 1. Immunoreactivity of histone fractions with SLE (●) and DIL (○) sera. One hundred nanomoles of each histone fraction were coated onto Immunolon II microtiter plates. The plates were incubated with a 1/100 dilution of sera followed by alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human Ig, and the reaction was developed with *p*-nitrophenyl disodium phosphate. Plates were read at 405 nm on a Titertek Multiskan. NHS (◇) and anti-nRNP (◆) sera were used as controls.

39 SLE and seven of 11 DIL sera showed reactivity with H2B, having an OD of greater than 0.25 OD units and median values of 1.58 and 1.32, respectively. Five of the 11 DIL and 21 of 39 SLE reacted with H2A, with median OD of 1.02 and 1, respectively. Seventeen of the 39 SLE sera (median OD = 0.76) and three of 11 DIL sera (median OD = 0.66) reacted with H3. H4 showed the lowest reactivity with both DIL (median OD = 0.43) and SLE (median OD = 0.54). NHS and serum containing antibodies against U1RNP showed background levels (<0.1 OD) of reactivity in the ELISA.

Epitope specificity of H2A. Having established that the ELISA is specific for antihistone antibodies, we next analyzed sera from DIL, SLE, and normal controls for reactivity with peptide fragments of different histone classes. With respect to SLE and DIL, we assayed the sera of 10 different individuals and an equal number of control individuals. At the Ig dilution of 1/100, the OD distribution for both DIL and SLE when tested with intact histones had an approximate normal distribution, with a peak at 1.8 to 2, whereas the normal values were uniformly low, with values of less than 0.10. When limit peptides were used, the OD values and the ranges for the DIL and SLE groups were small, with extensive overlap between the disease group and normal controls. Because the group as a whole had a roughly Poisson distribution, we have chosen to use median rather than average values. Because H2A was one of the reactive histone frac-

tions, the antigenic determinant(s) of H2A was examined in greater detail. The H2A peptides prepared by chemical and enzymatic cleavage were coated onto microtiter plates at a concentration of 100 nM, and the reactivity of five DIL and five SLE sera were compared (Table II). Intact H2A showed highest reactivity with SLE (OD median = 1.69) and DIL (OD median = 1.22). The limit peptide produced by trypsinization of intact chromatin (peptide 12-118) showed a markedly reduced reactivity with four of the five SLE sera (average OD 0.44) and four of the five DIL sera (OD average 0.48). This suggested that the major antigenic determinants of H2A reacting with both DIL and SLE are located outside the central portion of the molecule and in either the first 11 N-terminal (peptides 1-11) or the last 10 C-terminal residues (peptides 119-129). Equimolar quantities of peptides containing portions of the C-terminal regions (i.e., peptides 32-129, 89-129, and 91-129) had equal binding activity with SLE sera with an OD range of 0.96 to 1.20. Similarly, the OD range for the DIL sera was 1.04 to 1.13. Because the reactivities of equimolar quantities of these peptides are not different, the antigenic site must lie in the C-terminal decapeptide 119-129 of H2A. The peptide 1-56, containing the N-terminal region, showed reactivity with all five SLE sera (median OD = 0.98) and all five DIL sera (median OD = 0.81). Because major antigenic determinants do not appear to lie in the limit peptide 12-118, it must lie in the first 11 N-terminal residues of H2A in both DIL and SLE sera. The C-terminal region of H2A appears to be more reactive with SLE and DIL than with the N-terminal region. One DIL and one SLE serum bound to the internal limit peptide (OD average = 1.29 and 1.40, respectively), indicating that an antigenic determinant(s) other than those located at the C and N termini can be present.

The reactivity of one DIL and one SLE serum with the limit peptide 12-118 accounts for the OD values of 0.48 and 0.44 which are above control NHS values of 0.03 (Table II). If these sera are disregarded in the computation of the median value, OD values near controls would be achieved. This supports the impression that the major linear determinant of H2A lies outside the limit peptide. Another SLE sera also bound peptide 12-20 as well as to the N and C terminal-containing peptides, indicating that some sera are heterogeneous and bind to at least three antigenic sites on H2A.

The binding of these sera to the N and C terminal peptides was then confirmed by examining their reactivity with histone fragments prepared by murine submaxillary protease digestion of histone (Fig. 2). This enzyme produces peptides by cleavage at sites different from those obtained by trypsin cleavage. Five of five DIL sera and four of the five SLE demonstrated only weak binding (OD <0.30) to the peptides obtained by murine submax-

illary protease digestion of H2A (peptides 12-20, 21-32, 30-32, 36-77, and 78-81). This supports the observation that the major antigenic determinants reacting with SLE and DIL sera lie outside of the central limit peptide region of H2A.

Because experiments with H2A had shown that the major antigenic determinants in SLE and DIL are in regions removed by trypsin digestion of intact chicken erythrocyte nuclei, experiments were undertaken to determine if similar reactive sites are present in H3, H4, and H2B. Trypsin digestion of chicken erythrocyte nuclei has been shown to result in a reproducible set of three histone limit peptides labeled A, B, and C (Fig. 3, lane B), as demonstrated by SDS-PAGE (14). Band A was identified by amino acid analysis as the limit peptide of histone H3 sequence 27-129; band B as the limit peptide H2A sequence 12-118 and limit peptide H2B sequence 21-125; and band C as the limit peptide H4 sequence 20-102. Immunoblotting of the intact histones and limit peptides was performed with SLE and DIL sera (Fig. 3). The intensity of the observed bands as measured by immunoblotting varied from one serum to another in agreement with the ELISA results. All of the DIL sera reacted with H5, whereas nine of the 12 SLE sera reacted with H5. A representative sample of four sera from both groups of patients is shown in Figure 3. The reactivity with H5 can be explained by the observation that antibodies to H5 cross-react with H1^o (22). One of nine DIL and one of 12 SLE sera showed weak reactivity with band 2, i.e., limit peptide H2A and/or limit peptide H2B. These results indicate that the major histone determinants do not lie in the limit peptides obtained by trypsin digestion of intact chromatin, and therefore must lie in trypsin-sensitive regions. Therefore, the H2A epitopes reactive with DIL and SLE antibodies are in the 11 N-terminal and/or 10 C-terminal regions; the H2B epitope lies in the 20 N terminal region; the H3 antigenic determinant is in the 26 N terminal and/or 6 C terminal residues; and the H4 determinant is in 19 N-terminal residues.

ELISA of intact histones and limit peptides. Because the tertiary structure of intact histone and limit peptides are more likely to be preserved on microtiter plates than in SDS solution or on nitrocellulose, a quantitative reactivity of 10 SLE and 10 DIL sera with intact core histones and limit peptides was examined (Table III). All 10 SLE sera showed higher reactivity with intact H2A (median OD = 0.86) than with H2A limit peptide 12-118 (median OD = 0.12). Similarly, the reactivity of sera with the other intact core histones was much greater than with the limit peptides: H3 median OD = 0.52, H3 limit peptide 27-129 median OD = 0.10; H2B median OD = 1.20, H2B limit peptide 21-125 median OD = 0.36; H4 median OD = 0.32, H4 limit peptide 20-102 median OD = 0.18. One of the SLE sera showed reactivity with the limit peptide of H2B (OD = 0.85), and another sera with the limit peptide H2A (OD = 0.64). None of the 10 DIL sera had a higher reactivity when tested against the intact core histones than with the limit peptides: intact H2A median OD = 1.08; limit H2A median OD = 0.19; intact H2B median OD = 1.24, limit H2B median OD = 0.25; intact H3 median OD = 0.80; limit H3 median OD = 0.24; intact H4 median OD = 0.72, limit H4 median OD = 0.20. One DIL sera had similar reactivity with intact H2A and H2B and the limit peptides of H2A and H2B, indicating that anti-

TABLE II

Reactivity of SLE and DIL antibodies with H2A peptide fractions^a

Group	No. Sera	Peptide ^b					
		Intact H2A 1-129	12-118	1-56	32-129	89-129	91-129
SLE	5	1.69	0.44	0.98	1.48	1.35	1.46
DIL	5	1.22	0.48	0.81	1.20	0.96	0.98
NHS	5	0.05	0.03	0.02	0.06	0.09	0.02

^a Antibody levels for histone peptides are the medians of ELISA values (OD 405) for each group.

^b Peptides were prepared as described in *Materials and Methods*. Numbers refer to amino acid sequence.

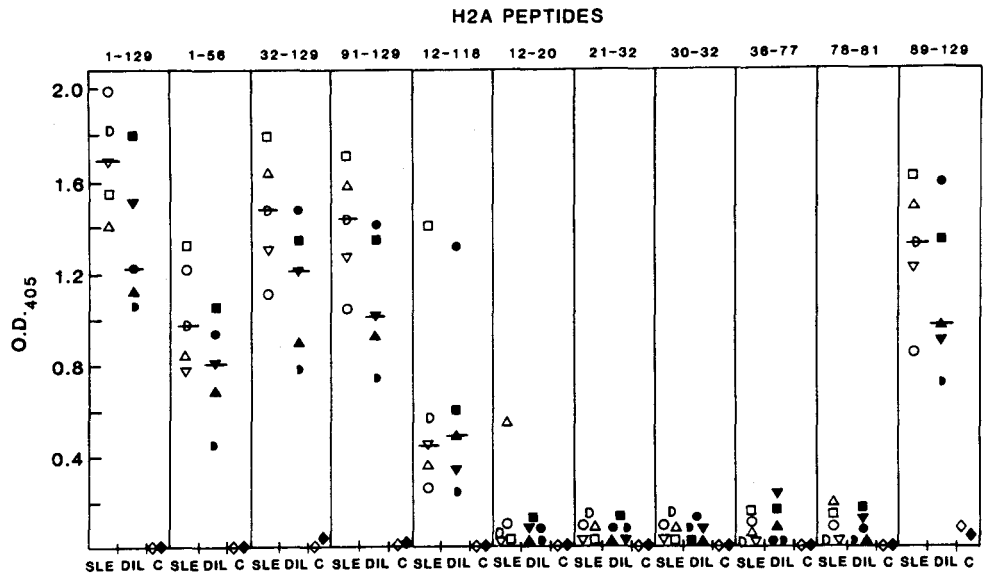


Figure 2. Immunoreactivity of histone H2A peptides with SLE (open symbols) and DIL (closed symbols). Each symbol represents one sera. One hundred nanomoles of each peptide were coated onto the plates and ELISA was performed as described for Figure 1. NHS (\diamond) and anti-rNCP (\blacklozenge) sera were used as controls.

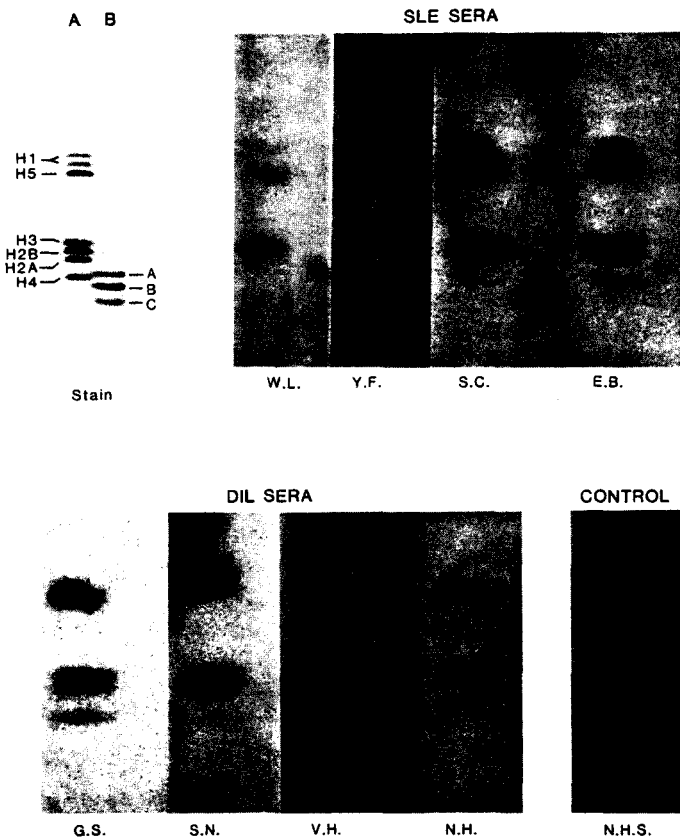


Figure 3. Immunoblot of intact chicken erythrocyte histones and trypsinized histones with SLE and DIL serum. Lane A contains intact histones and lane B has trypsinized histone. Nitrocellulose strips containing both intact (A) and trypsinized (B) histones were incubated in SLE DIL serum.

genic determinants in regions other than the N and/or C terminal ends of H2A and H2B are occasionally seen. These data are in agreement with the study of larger numbers of SLE sera, and confirm that the antigenic determinants of core histones that react with DIL and SLE antibodies are located in the domains removed by trypsin digestion of intact chromatin.

DISCUSSION

The goal of this study was to identify the antigenic epitopes on nuclear histones that react with autoantibod-

TABLE III
Reactivity of SLE and DIL antibodies with chicken erythrocyte histone fractions^a

Group	No. Sera	Histone ^b							
		H2A		H2B		H3		H4	
		intact	limit	intact	limit	intact	limit	intact	limit
SLE	10	1.08	0.19	1.24	0.25	0.80	0.24	0.72	0.20
DIL	10	0.88	0.12	1.20	0.36	0.52	0.10	0.32	0.18
NHS	10	0.05	0.03	0.08	0.09	0.04	0.04	0.09	0.08

^a Antibody levels for intact and limit peptide are the medians of ELISA values (OD 405) for each group.

^b Histone fractions and peptides were prepared as described in *Materials and Methods*. Amino acid sequences are: H2A limit: 12-118; H2B limit: 21-125; H3 limit: 27-129; H4 limit: 20-102.

ies in the sera of patients with SLE and DIL. One of the hypotheses being tested was that the epitopes reacting with DIL sera are more restricted than those reacting with SLE sera. This hypothesis was based on earlier extraction-reconstitution studies that had shown that the majority of DIL sera bound to the bimolecular complex of H2A/H2B, whereas SLE sera bound to all histones (5, 6). The present study has confirmed that the reactivity of DIL sera with various histone classes is not more restricted than SLE sera. In addition, we have shown that antibodies from DIL and SLE bind classes of histone other than H2A/H2B. We have observed, as have other investigators (6, 7), that DIL sera also bind H1 and are predominantly of the IgM class. These observations appear to be at variance with the data obtained with the extraction-reconstitution techniques (17). However, studies using the extraction-reconstitution technique were limited in their ability to detect antibodies to H1, H3, and H4. For example, extraction-reconstitution techniques failed to show reactivity of sera from hydralazine-induced LE patients with histone (unpublished data), whereas the more recently developed radioimmunoassay (6) and ELISA (10, 11) techniques show that high titers of antibodies binding these three classes of histone were characteristic of these sera. Likewise, using extraction-reconstitution techniques, antibodies binding H1 were infrequently found in DIL sera. The reasons for these apparent discrepancies are not completely understood, but may be related to the presentation of antigenic epitopes on histones reconstituted onto DNA in one instance, and to the arrangement

of histones in nucleosomes in the other instances. In the native form, H3 and H4 form the inner, relatively inaccessible core of nucleosomes. H2A and H2B are found on the outer portion of the nucleosome sphere and would be expressed as topographic determinants, and therefore relatively more accessible for antibody binding (see Reference 13 for review). Reconstitution experiments have shown that H3 and H4 are prerequisites for efficient binding of H2A and H2B to DNA (23). It is possible that during such reconstitution, H3 and H4 epitopes are concealed by H2A and H2B, and are therefore relatively inaccessible for antibody binding. This would explain the reactivity of H3 and H4 in other test systems such as the ELISA technique. H1 is believed to primarily bind to the internucleosomal regions of DNA. Although H1 may reconstitute onto DNA, it is not clear if the binding of H1 to the tissue sections used for the extraction-reconstitution assay is sufficient to detect antibody binding.

A study of the binding of DIL and SLE antibodies to H2A and peptide fragments of H2A showed that antibodies from both groups of patients bind to domains in the 11 amino and 10 carboxyl terminal residues removed by limited trypsin digestion of intact chromatin. This observation is in agreement with immunoblotting studies that have shown that some SLE antibodies are directed against trypsin-sensitive regions of histones (8). In addition, we have shown that DIL antibodies bind to antigenic epitopes indistinguishable from those bound by SLE antibodies. Therefore, the hypothesis that DIL antibodies are more restricted in histone epitope binding is not supported by the current data. We have extended the study to an investigation of binding sites on H2B, H3, and H4, and have shown that the reactive epitope is most commonly found in the amino terminal regions of all four core histones (first 26, 20, 11, and 19 residues of H3, H2B, H2A, and H4, respectively) and on the last 10 and six carboxyl residues of H2A and H3, respectively.

The trypsin-sensitive reactive amino terminal sequences are thought to be the most exposed in chromatin and the major sites of *in vivo* acetylation and phosphorylation of H2A, H2B, H3, and H4 (24). Accessibility of these histone regions are presumably a requisite for the enzymes required for these modifications. The highly polar amino terminal sequences correspond to the free and mobile regions identified by nuclear magnetic resonance studies of core particles (15) and to regions of core complexes not believed to be involved in histone-histone interactions (25-28). The enzyme-insensitive regions are hydrophobic and would likely form compact folded structures, and hence are relatively unexposed regions of the core particles. Nuclear magnetic resonance studies of core particles have also shown that the carboxy terminal residues 117-129 of H2A are also relatively exposed (15). Polyclonal antibodies raised against the C terminal hexapeptide of H3, corresponding to residues 130-135, have been shown to bind native chromatin, indicating that the six carboxy terminal residues of H3 are exposed in native chromatin (29, 30). The amino terminal region of H2B, containing residues 6-18, was found to be exposed in chromatin, whereas residues 1-11, 26-35, and 36-43 were not (29). Other investigators have shown that the amino terminal region of H2B and H4 in chromatin was accessible for antibody binding, whereas the C terminal region was not (31-33).

The mechanism by which certain drugs induce certain features of autoimmunity is not completely known. Hydralazine and procainamide have been shown to bind DNA or nucleoprotein and to alter their physical properties (34-36). It has been suggested that the drug or metabolite of the drug may bind to nucleoprotein, rendering it immunogenic, or a new antigen recognition site may be produced by the drugs acting as a carrier (37). This hypothesis was not supported by the observation that immunization of animals with hydralazine-DNP conjugates does not result in the production of antibodies directed against deoxyribonucleoprotein (38). Of parallel interest is the observation that therapeutic concentrations of hydralazine covalently bind DNA, and the binding is significantly enhanced by exposure to UV light (36). These observations and other findings have suggested that alteration of DNA by certain drugs could lead to increased immunogenicity of DNA or chromatin, and that the secondary and tertiary structure of histones in chromatin is an important feature of these physicochemical changes (39). Therefore, the immunogenicity of histones could be explained, but details of these mechanisms have yet to be studied in detail. Our studies with DIL and SLE sera suggest that the major reactive histone epitopes are in regions normally exposed in chromatin. Therefore, it may not be necessary to postulate neoantigens or carrier phenomena induced by drugs or other agents. Another explanation for the presence of predominately anti-histone antibodies in DIL is that the antigenic sites of chromatin may be protected from proteolytic degradation and therefore become potentially immunogenic (34). The drugs may covalently bind to the trypsin-sensitive regions and protect them from proteolytic digestion. Hydralazine has been shown to alter and substantially inhibit DNAase I, thereby potentially increasing the concentration of immunogenic DNA and/or chromatin (39). It is unlikely that the antihistone antibodies from DIL sera recognize only trypsin-sensitive sites covalently modified by drugs, because the histones used in our studies and in others were not exposed to these drugs.

Other recent evidence has suggested that drugs such as procainamide alter the balance of mechanisms that regulate antibody production. For example, *in vitro* experiments have shown that suppressor T cell activity is diminished when lymphocytes are incubated with procainamide (40). Although a depression of suppressor T cell activity is likely to account for the production of a heterogeneous population of autoantibodies found in SLE, it does not explain the restricted autoantibody profile characteristic of DIL. Therefore, an explanation for the high frequency of antihistone antibody in this clinical syndrome remains unclear. The importance of the current study is that the epitopes on individual histone molecules which react with DIL sera are no less heterogeneous than those observed in SLE, and may point to a common etiology at an antigen-specific level.

Acknowledgments. The authors are grateful to Drs. C. Crane-Robinson and Pierre Sautiere for helpful discussions and suggestions, and to Dr. Jean O. Thomas for assisting with the immunoblotting technique. The authors are also grateful for the technical assistance of Mrs. Winona Wall.

REFERENCES

1. Friou, G. J., and F. P. Quisimorio. 1975. The LE cell factor and antinuclear antibodies. In *Laboratory Diagnostic Procedure in the Rheumatic Diseases*. 2nd edition. A. S. Cohen, ed. Little Brown and Co., Boston. P. 159.
2. Stollar, B. D. 1971. Reactions of systemic lupus erythematosus sera with histone fractions and histone-DNA complexes. *Arthritis Rheum.* 14:485.
3. Hekman, A., and M. Sluyser. 1973. Antigenic determinants on lysine-rich histones. *Biochim. Biophys. Acta* 295:613.
4. Tan, E. M., J. Robinson, and P. Robitaille. 1976. Studies of antibodies to histones by immunofluorescence. *Scand. J. Immunol.* 5:811.
5. Fritzler, M. J., and E. M. Tan. 1978. Antibodies to histones in drug-induced and idiopathic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* 62:560.
6. Portanova, J. P., R. L. Rubin, F. G. Joslin, V. P. Agnello, and E. M. Tan. 1982. Reactivity of anti-histone antibodies induced by procainamide and hydralazine. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 25:67.
7. Rubin, R. L., F. G. Joslin and E. M. Tan. 1982. Specificity of antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:779.
8. Thomas, J. O., C. M. Wilson, and J. A. Hardin. 1984. The major core histone antigenic determinants in systemic lupus erythematosus are in the trypsin-sensitive regions. *FEBS Lett.* 169:90.
9. Rubin, R. L., F. G. Joslin, and E. M. Tan. 1982. A solid-phase radioimmunoassay for antihistone antibodies in human sera: comparison with an immunofluorescence assay. *Scand. J. Immunol.* 15:63.
10. Aitkaci, A., J. C. Monier, and N. Momelle. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for anti-histone antibodies and their presence in systemic lupus erythematosus sera. *J. Immunol.* 44:311.
11. Gioud, M., B. L. Kotzin, R. L. Rubin, F. G. Joslin, and E. M. Tan. 1983. In vivo and in vitro production of anti-histone antibodies in NZB/NZW mice. *J. Immunol.* 131:269.
12. Olins, A. L., and D. E. Olins. 1974. Spheroid chromatin units (V bodies). *Science* 183:330.
13. Sperling, R., and E. J. Wachtel. 1981. The histones. *Adv. Protein Chem.* 34:1.
14. Boehm, L., and C. Crane-Robinson. 1984. Proteases as structural probes for chromatin: the domain structure of histones. *Biosci. Rep.* 4:365.
15. Cary, P. D., T. Moss, and E. M. Bradbury. 1978. High-resolution proton-magnetic resonance studies of chromatin particles. *Eur. J. Biochem.* 89:475.
16. Tan, E. M., A. S. Cohen, J. F. Fries, A. T. Masi, D. J. McShane, N. F. Rothfield, J. G. Schaller, N. Talal, and R. J. Winchester. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 25:1271.
17. Fritzler, M. J. 1980. Fluorescent antinuclear antibody test. In *Manual of Clinical Immunology*. 2nd edition. N. R. Rose and H. Friedman, eds. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Pp. 852-857.
18. Boehm, E. L., W. N. Strickland, M. Strickland, B. H. Thwaites, D. R. Van Der Westhuizen, and C. Von Holt. 1973. Purification of the five main calf thymus histone fractions by gel exclusion chromatography. *FEBS Lett.* 34:217.
19. Sautière, P., D. Tyron, B. Laine, J. Mizon, P. Ruffin, and Gérard Biserte. 1974. Covalent structure of calf thymus ALK-histone. *Eur. J. Biochem.* 41:563.
20. Thomas, J. O., and R. D. Kornberg. 1978. The study of histone-histone associations by chemical cross-linking. *Methods Cell Biol.* 18:429.
21. Hardin, J. A., and J. O. Thomas. 1983. Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7410.
22. Mura, C. V., and B. D. Stollar. 1981. Serological detection of homologies of H1^o with H5 and H1 histones. *J. Biol. Chem.* 256:9767.
23. Sollner-Webb, B., R. D. Camerini-Otero, and G. Felsenfeld. 1976. Chromatin structure as probed by nucleases and proteases: evidence for the central role of histone H3 and H4. *Cell* 9:179.
24. Goldknopf, I., and H. Busch. 1977. Isopeptide linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:864.
25. Delange, R. J., L. C. Williams, and H. G. Martinson. 1979. Identification of interacting amino acids at the histone 2A-2B binding site. *Biochemistry* 18:1942.
26. Moss, T., P. D. Cary, C. Crane-Robinson, and E. M. Bradbury. 1976. Physical studies of the H3/H4 tetramer. *Biochemistry* 15:2261.
27. Moss, T., P. D. Cary, B. D. Abercrombie, C. Crane-Robinson, and E. M. Bradbury. 1976. A pH-dependent interaction between histones H2A and H2B involving secondary and tertiary folding. *Eur. J. Biochem.* 71:337.
28. Crane-Robinson, C. 1979. High resolution NMR studies of histones. *Biological Magnetic Resource* 1:33.
29. Muller, S., K. Himmelspoch, and M. H. V. Regenmortel. 1982. Immunohistochemical localization of the C terminal hexapeptide of histone H3 at the surface of chromatin subunits. *EMBO J.* 1:421.
30. Muller, S., A. Mozen, A. Martinage, and M. H. V. Regenmortel. 1984. Use of histone antibodies for studying chromatin topography and the phosphorylation of chromatin subunits. *EMBO J.* 3:2431.
31. Di Padua Mathieu, D., C. V. Mura, L. Y. Frado, C. L. F. Woodcock, and B. D. Stollar. 1981. Differing accessibility in chromatin of the antigenic sites of regions 1-58 and 63-125 of histone H2B. *J. Cell Biol.* 91:135.
32. Di Padua Mathieu, D., and B. D. Stollar. 1980. Antibodies specific for histone H2B fragments 1-58 and 63-125 in antisera to H2B and to the fragments probes for histone evolution. *Biochemistry* 19:2246.
33. Muller, S., A. Sonssarieh, J. P. Bonley, J. Reinbolt, and M. H. V. Van Regenmortel. 1983. Localization of two antigenic determinants in histone H4. *Biochim. Biophys. Acta* 747:100.
34. Tan, E. M. 1974. Drug-induced autoimmune disease. *Fed. Proc.* 33:1894.
35. Eldredge, N. T., W. B. Robertson, and J. J. Miller III. 1974. The interaction of lupus inducing drugs with DNA. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 3:263.
36. Dubroff, L. M., and R. J. Reid, Jr. 1980. Hydralazine-pyrimidine interactions may explain hydralazine lupus erythematosus. *Science* 208:404.
37. Stollar, B. D. 1981. The antigenic potential and specificity of nucleic acids, nucleoproteins and their modified derivatives. *Arthritis Rheum.* 24:1010.
38. McDuffie, F. C. 1981. Relationship between immune response to hydralazine and to deoxyribonucleoprotein in patients receiving hydralazine. *Arthritis Rheum.* 24:1079.
39. Dubroff, L. M., R. Reid, Jr., and M. Papalian. 1981. Molecular models for hydralazine related systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 24:1082.
40. Ochi, T., R. A. Goldings, P. E. Lipsky, and M. Ziff. 1983. Immunomodulatory effect of procainamide in man. Inhibition of human suppressor T-cell activity *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 74:36.

Figure VI. 3 : Principaux sites antigéniques mis en évidence dans les publications 1, 2 et 3. (Pages 163 - 165)

En dessous de la structure primaire figure la structure secondaire de l'histone dans l'octamère cristallisé en présence d'une force ionique de 5 M (ARENTS *et al.* 1991 ; voir la figure VII. 2, page 196). En milieu de force ionique physiologique il y a deux à trois fois moins de structure hélicoïdale.

DDDDDD et **IIIIIIIIII** : Propriétés des anticorps induits chez le lapin par des complexes histones entières - ARN.

DDDDDD : Peptides qui attachés à la plaque ELISA se complexent à l'antisérum.

IIIIIIIIII : Peptides qui sont antigéniques uniquement par la méthode d'inhibition.

EEEEEEEE et **PPPPPPP** : Propriétés des anticorps induits chez le lapin par des peptides.

EEEEEEEE : Peptides induisant des anticorps qui réagissent à la fois contre le peptide et contre l'histone entière.

PPPPPPP : Peptides induisant des anticorps qui ne réagissent qu'avec le peptide.

LHLHLHLH et **SASASASA** : Zone antigéniques dans les maladies autoimmunes.

LHLHLHLH : Lupus érythémateux disséminé humain.

SASASASA : Souris autoimmunes.

VI - 2 - 3. DISCUSSION : RELATION ÉPITOPE - STRUCTURE SPATIALE.

Les épitopes peuvent être continus ou discontinus. La localisation des épitopes à l'aide de peptides conduit à l'identification des épitopes continus (on ne peut toutefois pas exclure que certains épitopes mis ainsi en évidence soient des portions d'épitopes discontinus).

Résultats obtenus par immunisation à l'aide de complexe histone-ARN

Nous distinguerons dans l'histone H2A deux groupes d'épitopes (voir la publication 1).

Les épitopes situés dans les régions 1 - 15, 65 - 85, 73 - 89, 85 - 100 qui peuvent être mis en évidence par l'attachement direct de l'anticorps anti-histone, à des peptides courts adsorbés à la surface de la plaque ELISA. Ces zones, d'après nos travaux en dichroïsme circulaire et d'après les méthodes de prédictions de structures, à l'exception du segment 90 - 99, ont une structure non hélicoïdale et correspondent soit à l'extrémité N-terminale soit à une grande boucle joignant deux hélices. Ces résultats sont en accord avec l'idée selon laquelle les sites antigéniques sont situés dans les zones externes et mobiles des protéines.

Les épitopes localisés uniquement par les méthodes d'inhibition. Les principaux épitopes sont situés dans les segments 44 - 65 et 90 - 105 qui selon la méthode de prédiction de structure de LEVIN et GARNIER (1988) contiennent chacune environ trois tours d'hélice (figure VII. 1, ci-dessous page 195).

Pour tenter d'expliquer la non réactivité des anticorps anti-zones en hélice vis à vis des petits peptides correspondant adsorbés sur le plastique des plaques de titration, nous rappellerons d'abord que les peptides d'une longueur inférieure à une vingtaine de résidus ne forment qu'exceptionnellement une hélice en solution, même s'ils correspondent à une zone hélicoïdale dans la protéine native. Ces peptides se fixent à la plaque de titration en conservant selon toute vraisemblance cette absence de structure hélicoïdale. Nous postulerons que dans ces conditions ces peptides n'ont pas la liberté d'acquérir la structure en hélice qui a induit la production de l'anticorps et qui est nécessaire pour qu'ils soient reconnus par celui-ci. Par contre dans les tests d'inhibition ils auraient, soit la possibilité d'adapter leur structure à celle du paratope de l'anticorps, soit que leur structure oscillant

entre un grand nombre de conformations, la conformation capable de se fixer au paratope serait piégée au fur et à mesure de sa formation.

Dans le cas de l'histone H2B (publication 2) la méthode d'inhibition n'a pas été utilisée pour situer les épitopes. Les épitopes mis en évidence doivent correspondre à des zones non structurées, notamment les épitopes situés dans les 35 premiers résidus et dans la région 50 - 65. En tous cas les deux zones en hélices bien caractérisées par notre travail en dichroïsme circulaire : 32 - 43 et 63 - 83 ne contiennent pas d'épitope. Les fragments 94 - 113 et 114 - 125 sont tous deux antigéniques. Par dichroïsme circulaire nous avons trouvé de l'hélicité dans cette région. La méthode de LEVIN et GARNIER (1988) (figure VII. 1, ci-dessous page 195) permet d'y prédire deux hélices : 92 - 97 et 105 - 112 ; l'épitope contenu dans le fragment 94 - 113 serait alors la boucle unissant celles-ci. L'antigénicité du fragment 114 - 125, peut soit être due à la présence d'un épitope situé vers l'extrémité C-terminale de l'histone, soit être la conséquence d'une réactivité croisée entre les pentapeptides 16 - 20 et 116 - 120 dont la séquence KAVTK est identique.

Apports des anticorps anti-peptides

Les anticorps anti-peptides ont été obtenus après immunisation à l'aide de peptides courts ; la structure de ces peptides est désordonnée, même si dans la protéine entière les séquences correspondantes forment une structure spatiale bien définie. Ces anticorps ne réagiront avec la protéine native que s'ils y retrouvent cette structure désordonnée. Il en résulte que les peptides qui induisent la formation d'anticorps réagissant avec la protéine native, correspondent à des régions externes et mobiles de la protéine. A l'inverse, les peptides qui induisent des anticorps ne réagissant pas avec la protéine correspondent dans celle-ci à des régions bien structurées, soit internes et hydrophobes, soit externes, telle la face hydrophile d'une hélice amphipathique.

Les propriétés réactives des anticorps induits par les peptides des histones H2A et H2B (publication 1, page 141-142 ; publication 2, page 153) interprétées avec les principes énoncés ci-dessus, confirment et complètent les éléments de structure obtenus par dichroïsme circulaire. Les anticorps anti-peptide 65 - 85 (H2A) reconnaissent très bien l'histone entière, la région 65 - 85 ne contient pas d'hélice. Certains anticorps anti-peptides tel que celui dirigé contre le peptide 28 - 42 (H2A) ne reconnaissent pas l'histone : cette

région est pour moitié en hélice et pour moitié en structure désordonnée. Cette dualité de structure se retrouve dans les régions 44 - 61 et 85 - 100 de cette même histone, mais dans ces deux cas les anticorps reconnaissent l'histone.

Les hélices α ont une longueur moyenne de l'ordre de 5 à 15 résidus seulement ; il peut par conséquent, être avantageux d'augmenter la précision des sondes de structures que sont les anticorps. Une des solutions consiste à utiliser des peptides courts. Cette approche a été employée pour l'étude de la zone 36 - 50 de l'histone H2B, zone particulièrement importante pour l'organisation spatiale de la molécule (nous avons montré précédemment que la perte des résidus 33 à 42 fait chuter le nombre de résidus en hélice de 10 à 12 unités). Des anticorps dirigés contre les peptides 36 - 43 et 43 - 50 ont été obtenus. Nous avons pu vérifier pour chaque sérum à l'aide d'un fragment plus long - le peptide 32 - 59 - que la réaction antigène-anticorps n'était pas tributaire de la présence d'une extrémité N-terminale ou C-terminale libre. Néanmoins ces anticorps ne reconnaissent pas l'histone entière, celle-ci est donc bien structurée dans cette région.

Dans les paragraphes ci-dessus, l'épitope type correspond à une boucle hydrophile située entre deux hélices, assez peu d'épitopes semblent localisés dans les régions très basiques, régions N-terminales des histones H2A et H2B, région C-terminale de l'histone H2A, pourtant ces zones sont hydrophiles et doivent être externes et mobiles. Une explication pourrait être que l'ARN, utilisé lors de l'immunisation, se fixe sur ces zones basiques et les masque. L'immunisation avec l'histone seule, sans acide nucléique fournit une réaction immunitaire d'intensité plus faible dans le cas des "core histones" et de spécificité quelque peu différente. Toutefois les anticorps obtenus ne semblent pas tellement plus réactifs vis à vis de ces régions basiques (SREBREVA et ZLATANOVA, 1986 ; MULLER *et al.*, 1991).

Apports des maladies autoimmunes

Une autre façon de se procurer des anticorps consiste à tirer profit du dérèglement immunitaire accompagnant certaines pathologies. Des anticorps anti-histones sont produits dans certains lupus humains (revue TAN, 1989) et dans une maladie apparentée trouvée chez des souris génétiquement prédisposées (revue THEOFILOPOULOS *et al.*, 1989). Les sérums humains testés (publication 3) et les anticorps monoclonaux obtenus à partir des

souris MRL lpr/lpr ou NZB/NZB F1 (publication 2) reconnaissent les zones d'histones qui sont hydrolysées lors de l'action de la trypsine sur la chromatine, le nucléosome ou la "core particle" (à l'exception de l'anticorps 69B4 dont le cas sera discuté plus loin).

Tout se passe comme si le nucléosome ou la chromatine était l'immunogène induisant, telle une protéine complètement étrangère, la formation d'anticorps contre ses régions accessibles (HARDIN et THOMAS, J. O., 1983 ; THOMAS, J. O. *et al.*, 1984 ; publications 2 et 3 ; PORTANOVA *et al.*, 1988 ; MULLER *et al.*, 1989).

Certains virus (ex : polyomavirus, papillomavirus) qui organisent leur ADN avec des histones provenant de la cellule hôte pourraient être à l'origine de la production de ces anticorps (FLAEGSTAD *et al.*, 1988 ; voir aussi : BORZAKIAN, 1993).

La raison des spécificités différentes de nos deux séries d'anticorps (anticorps issus de l'immunisation et anticorps de lupus) peut être recherchée au niveau de l'immunotolérance : l'organisme normal serait très tolérant aux zones basiques des histones qui sont hydrophiles, mobiles et externes. Nous devons d'ailleurs remarquer que la perle nucléosomique avec son octamère d'histones, l'histone H1 et son fragment d'ADN double brin est produite en très grande quantité dans la zone médullaire du thymus au cours de l'apoptose (mort cellulaire programmée) des lymphocytes autoréactifs. Par conséquent l'organisme normal fabriquera difficilement, en dépit de l'injection d'histones, des anticorps contre ces zones terminales. Par contre dans le cas où l'immunotolérance est diminuée, ce qui semble être le cas dans le lupus érythémateux disséminé et dans le lupus induit par la procainamide, le haut potentiel immunogène intrinsèque des extrémités d'histones pourra s'exprimer, ceci sans même l'injection de ces protéines.

Les zones antigéniques mises en évidence ci-dessus dans le cas du lupus ne constituent pas une liste exhaustive : PORTANOVA *et al.* (1988) LOSMAN *et al.* (1992) RUBIN *et al.* (1992) mettent en évidence la présence d'épitopes spécifiques du complexe H2A-H2B ou de l'ensemble (H2A-H2B)-ADN ; MULLER *et al.* (1989) démontrent l'existence d'anticorps dirigés contre les régions 55 - 85 (H2A) et 40 - 55 (H3). Les méthodes que nous avons utilisées - ELISA et immunotransfert - ne sont pas spécialement adaptées à la mise en évidence d'épitopes ayant une structure spatiale très organisée.

Il doit exister à la surface du cylindre protéique du nucléosome et notamment au niveau de ses deux faces planes des épitopes qui correspondent, même pour les épitopes continus, à une structure bien définie de la chaîne protéique. Le nucléosome contient 50 % d'hélice, si nous excluons du calcul les extrémités basiques (qui seules apparaissent mobiles en RMN) le taux d'hélicité atteint 60 %. Dans un ensemble aussi contraint, même les boucles externes interhélices doivent être ancrées aux zones plus internes, soit par des liaisons hydrogène ou ioniques, soit par l'intermédiaire d'un résidu acide aminé hydrophobe appartenant à la boucle, et plongeant vers l'intérieur du système.

Quant à l'histone isolée, utilisée pour la détection des anticorps, elle contient seulement 15 à 20 % d'hélice. On conçoit alors que nombre d'épitopes, même continus ne soient pas détectés, la zone de l'histone correspondant au site antigénique ne prenant pas nécessairement lors du test ELISA ou autre, la conformation qu'elle a dans le nucléosome. Il est remarquable que les anticorps dirigés contre les "zones organisées" 55 - 85 (H2A) et 40 - 55 (H3) mis en évidence par MULLER *et al.* (1989) reconnaissent le peptide mais non l'histone ; le peptide serait plus libre de prendre la conformation complémentaire de l'anticorps que la même zone dans l'histone. Dans la protéine entière ces régions auraient leur liberté réduite par la préexistence d'une structure bien stabilisée et/ou par des interactions nombreuses avec le support de titration.

S'il est tentant de voir dans les épitopes reconnus par les sérums de lupus le reflet de la surface du nucléosome, cette interprétation doit être modulée. En effet un des quatre anticorps monoclonaux : l'anticorps 69B4 reconnaît un épitope dans le segment 26 - 35 de l'histone H2B. Ce segment qui est contenu dans les peptides 21 - 125 et 24 - 125, peptides résistant à l'hydrolyse de la chromatine par la trypsine (BÖHM et CRANE-ROBINSON, 1984) est de façon évidente (il contient 7 résidus de lysine ou d'arginine) non accessible à l'enzyme et par extension, non accessible au système immunitaire. Nous pensons que pour cet anticorps 69B4 le nucléosome ou la chromatine considérée d'un point de vue statique n'est pas l'immunogène. Ceci est confirmé par le fait que l'anticorps ne reconnaît pas le nucléosome.

Deux hypothèses peuvent être avancées concernant l'immunogène :

- Lorsque nous hydrolysons par la trypsine le complexe H2A-H2B le peptide issu de l'histone H2B est le 32 - 125. Ainsi la zone 24 - 32 qui est cachée dans le nucléosome est accessible dans le complexe. L'immunogène serait alors le complexe H2A-H2B. D'une façon plus générale l'immunogène serait la chromatine prise dans la plénitude de ses aspects statiques et dynamiques.
- L'épitope considéré englobe le signal de localisation de l'histone dans le noyau (MORELAND *et al.*, 1987) ; cette caractéristique pourrait lui valoir d'être immunogène en application du principe général émis par TAN (1989) selon lequel les épitopes dans les maladies autoimmunes sont des sites particulièrement importants.

Une variante serait que l'on ait affaire à un processus de réaction croisée, le véritable coupable étant un signal de localisation nucléaire appartenant à une autre protéine.

Chapitre VII : Contribution à la détermination du rôle de la structure secondaire dans les interactions histone-ADN.

VII - 1. INTRODUCTION

Dans le chapitre I nous avons vu que l'ADN pouvait selon sa composition et les conditions ambiantes se présenter sous la forme A, B, ou Z. La transition B→A a lieu à faible concentration en sel lorsque la teneur en eau diminue. A partir de fibres ou de films d'ADN cette diminution peut être provoquée par un abaissement de l'humidité relative de l'air ambiant. A partir d'ADN en solution elle est provoquée par l'addition d'alcool au milieu (72%).

La transition B→A est ainsi d'abord une économie d'eau : treize molécules d'eau par nucléotide suffisent pour maintenir la forme A alors que la structure B en nécessite au moins dix-neuf. Ces molécules d'eau sont réparties en trois couches. La première couche correspond, entre autre, dans la forme B à l'existence d'un fil d'hydratation dans le petit sillon qui crée une interaction supplémentaire entre les deux brins (CHUPRINA *et al.*, 1991).

Les phosphates ont une plus grande affinité pour les molécules d'eau que les atomes d'azote et d'oxygène des bases situés en bordure des sillons. Quand le coefficient d'activité de l'eau est grand tous ces groupements sont solvatés ; quand l'activité de l'eau diminue (par déshydratation directe ou par addition d'alcool) les atomes d'azote et d'oxygène des sillons perdent leur coquille d'hydratation avant les phosphates. Quand le fil d'hydratation du petit sillon n'existe plus, la structure B est détruite, l'hélice acquiert la structure A dans laquelle les phosphates encore hydratés participent à un réseau de solvation qui relie les deux crêtes de désoxyriboses-phosphates à travers le grand sillon qui devient étroit. Ceci correspond aussi à une modification générale de la structure spatiale de l'ADN (voir aussi chapitre I table I et figure 1) :

- La conformation du désoxyribose passe de la forme C_2' endo à la forme C_3' endo. Le cycle des pentoses peut adopter plusieurs conformations. Celles-ci sont nommées d'après la position qu'occupent les atomes de carbone 2' et 3' par rapport au plan défini par les atomes C_1' et C_4' et l'atome d'oxygène du cycle. Si l'atome C_2' - ou C_3' - est fortement déplacé du côté de l'atome C_5' la structure est dite C_2' endo - ou C_3' endo -. Si l'atome C_2' - ou C_3' - est fortement déplacé du côté opposé à l'atome C_5' la structure est dite C_2' exo - ou C_3' exo -.
- L'inclinaison du plan des bases par rapport à un plan normal à l'axe de l'hélice (tilt) passe de 6° à 20° .
- Le nombre de paires de bases par tour passe de 10 à 11.
- Le pas de l'hélice passe de 33,8 à 28,2 Å.
- Le petit sillon devient large et peu profond.
- Le grand sillon devient étroit et profond.
- Les groupements phosphate deviennent orientés vers l'intérieur du grand sillon.

Le travail présenté dans ce chapitre concerne surtout l'action des peptides des histones H2A, H2B, H3 et H4 sur la transition B→A de l'ADN en fibres lorsque l'humidité relative diminue. Les conditions d'étude de cette transition semblent, à première vue, assez éloignées à la fois des conditions habituelles dans le tube à essai et de ce qui se passe dans la cellule. Nous ne devons pas oublier toutefois que l'hétérochromatine du noyau interphasique et des chromosomes métaphasiques, et surtout celle du noyau des spermatozoïdes, correspondent à des milieux concentrés proches d'un gel.

Lorsque nous avons commencé à participer à cette étude, le groupe de E. TAILLANDIER avait obtenu les résultats importants ci-dessous (LIQUIER, 1980 et références incluses).

- Les histones du noyau du nucléosome empêchent la transition B→A, le nombre de paires de bases stabilisées en forme B par molécule d'histone est de 18, 25, 35 et 54 pour H2A, H4, H2B et H3 respectivement.
- Les histones H1 et H5, la polylysine et la polyarginine ainsi que le cytochrome c n'empêchent pas cette transition.

Le blocage de l'ADN en forme B est donc une propriété spécifique des "core histones".

Nous nous sommes attachés à localiser dans ces histones les zones efficaces dans la stabilisation de l'ADN en forme B. Notre contribution à ce travail a été d'une façon générale, la préparation, l'étude en dichroïsme circulaire, ainsi que le choix des peptides. La préparation et l'étude en D. C. ont été développés dans les chapitres IV, V et VI. Le choix des peptides a été dicté à la fois par les caractéristiques propres de ceux-ci : solubilité, longueur, position dans l'histone, structure secondaire, et par des considérations plus générale, par exemple : l'utilisation de série de peptides contenant tous l'extrémité N-terminale, mais de longueur différente : 1-56 (H2A), 1-89 (H2A), 1-59 (H2B), 1-83 (H2B), 1-53 (H4), 1-67 (H4), 1-84 (H4). L'étude de la transition B→A a été faite essentiellement par spectrométrie infrarouge (publications 4, 5 et 6). Cette technique est très sensible à l'orientation des groupements phosphate (pour une revue et une discussion approfondies voir LIQUIER, 1980). L'interaction entre le peptide 1-53 (H4) et l'ADN a de plus été étudiée par spectrométrie RAMAN dans le laboratoire de J. BRAHMS (publication 4)

VII - 2. ÉTUDE PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE ET/OU PAR SPECTROSCOPIE RAMAN DES INTERACTIONS ENTRE LES HISTONES (ET LEURS PEPTIDES) ET L'ADN.

Publications 4, 5 et 6, ci-dessous.

Site and Role of the N-Terminal Fragment of the Nucleosomal Core Histones in Their Binding to Deoxyribonucleic Acid As Determined by Vibrational Spectroscopy[†]

M. Couppez, P. Sautiere, S. K. Brahmachari, J. Brahms, J. Liquier, and E. Taillandier*

ABSTRACT: The site and role of the binding of the 1-53 N-terminal part of H4 on DNA have been studied by optical spectroscopy. The structure of the 1-53 H4 fragment determined by vacuum ultraviolet circular dichroism and infrared spectroscopy is essentially aperiodic. The site of the interaction between the fragment and free DNA is localized by Raman laser spectroscopy in the small groove of the DNA, similar to the interaction site of the whole histone with DNA in nucleosomes. Infrared linear dichroism measurements show that

the two 1-53 and 54-102 H4 fragments play a very important role in the histone-DNA interactions, but the roles are extremely different: the N-terminal part of the histone remains effectless on the DNA conformational flexibility and it is proposed that the structurally important interaction occurs between the globular part of the histone and the DNA. The N-terminal fragment appears to be responsible for finding the correct place on the DNA of the nucleosomal core particles.

Vibrational spectroscopy is a powerful tool for the investigation of the secondary structure of nucleic acids and proteins and the localization of the interactions between the different constituents of chromatin. This method is successful to study the influence of different regions of histones on chromatin DNA. Histones can be cleaved into fragments containing various numbers of peptides. The structure of such fragments has been studied by NMR (Crane-Robinson et al., 1977), and complexes formed with DNA have been examined by circular dichroism and thermal denaturation (Adler et al., 1975).

It has recently been proved by infrared and Raman spectroscopy (Liquier et al., 1979; Goodwin & Brahms, 1978) that DNA in chromatin is in a high humidity B-type conformation. Infrared studies of DNA interactions with the four histones belonging to the core particle, single or preassociated, have shown that in such complexes the DNA also remains blocked in a B-type conformation, in contrast to what is observed for free DNA which can easily adopt two different types of geometries (A and B) (Pilet & Brahms, 1973; Liquier et al., 1977; Taillandier et al., 1979). The localization of the interaction responsible for this loss of conformational flexibility is unknown. In the different models proposed for the chromatin structure it is usually accepted that the histone-DNA interactions occur between the N-terminal parts of the histones and the DNA, whereas the more hydrophobic parts of the histones interact between themselves to constitute a nucleosomal protein core. Thus, it seems important to examine the role and influence of this N-terminal fragment of histones on the DNA secondary structure.

In this study we have used the N-terminal fragment of H4 (peptides 1-53). The question arises as to whether the interaction between DNA and a histone fragment is the same as that between DNA and the intact histones of the proteic core in chromatin. It is found by Raman spectroscopy that

the site of fixation is similar in the interaction between DNA and the histone fragment to that in chromatin. Infrared linear dichroism allows us to examine in detail the possible secondary structures of DNA when associated with this H4 fragment. We show that when the 1-53 fragment of H4 is bound to the DNA, the latter remains able to undergo conformational transitions. Moreover, we have examined the secondary conformation of the protein by ultraviolet circular dichroism and infrared spectroscopy and confirmed that the 1-53 fragment of H4 is essentially in an aperiodic random structure.

Materials and Methods

Isolation of Histone H4. Calf histone H4 was obtained directly in pure form through a slight modification of the procedure of Johns (1967). The extract guanidine hydrochloride-ethanol at pH 7.0 was treated by 1.5 volumes of acetone (instead of 1 volume as recommended in the original method) in order to ensure a complete precipitation of the histone H2A in the fraction F2a2. The fraction F2a1 was recovered by adding 1.5 volumes of acetone to the supernatant. This fraction F2a1 was indeed constituted of pure histone H4.

Hydrolysis of Histone H4 with Staphylococcal Protease. Histone H4 (50 mg) was dissolved in 10 mL of 0.05 M ammonium acetate buffer, pH 4.0, and hydrolyzed with staphylococcal protease (Miles) at 37 °C for 18 h, using an enzyme/substrate ratio of 1:50. The hydrolysate was then frozen, lyophilized, and fractionated on a Sephadex G-100 column (200 × 2.5 cm) equilibrated and eluted with 0.01 M HCl. The fractions thus obtained were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea (Panyim & Chalkley, 1969) by using 17% acrylamide.

Complex Preparation. H4 fragment was dissolved in 10⁻³ M HCl. An appropriate amount of NaCl solution was added so as to obtain a final 2 M NaCl-histone solution immediately before adding the DNA solution. DNA (salmon sperm) was purchased from Serva and dissolved in 2 M NaCl. DNA concentrations (12.5 mg/mL) were determined by ultraviolet spectroscopy, assuming $OD_{260nm}^{1cm} = 20$ for a 1 mg/mL solution. The mixtures were then dialyzed in the cold room. Dialysis steps were 1.5 M NaCl, 0.75 M NaCl, 0.3 M NaCl, and a final adequate NaCl solution (between 3 and 5 × 10⁻³ M NaCl) which ensures an NaCl/DNA weight ratio of 6%.

[†] From the U.E.R. Expérimentale de Médecine, Université Paris XIII, Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire, 93000 Bobigny, France (J.L. and E.T.), the Unité 124 de l'INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer, F-59020 Lille Cedex, France (M.C. and P.S.), and the Institut de Recherches en Biologie Moléculaire (CNRS), Université Paris VI, 75221 Paris Cedex 05, France (S.K.B. and J.B.). Received January 3, 1980. This work was supported by Grants ATP 2875 and L.A. 268 of the Centre National de la Recherche Scientifique.

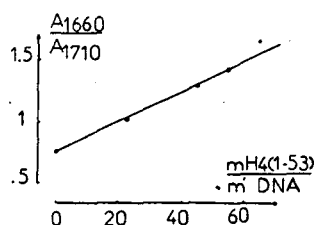


FIGURE 1: Determination of the composition of the H4 (1-53)-DNA complexes.

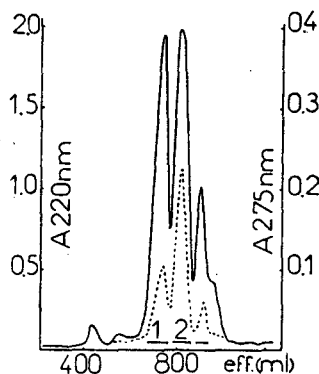


FIGURE 2: Sephadex G-100 chromatography of the staphylococcal protease hydrolysate of calf histone H4. The column (200 × 2.5 cm) was equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. The flow rate was 14.4 mL/h, and 7.2-mL fractions were collected. Fractions were pooled according to the solid bars. Peak 1 corresponds to peptide SP-1.

in the sample. Under these salt conditions it has previously been shown that pure DNA is able to undergo a complete reversible B → A conformational transition. Protein/DNA ratios were estimated by infrared spectroscopy using the amide I and amide II bands for the protein and a characteristic DNA absorption located at 1710 cm^{-1} (Figure 1). The weight input ratios of the prepared complexes were 0.25:1, 0.35:1, 0.45:1, 0.55:1, and 0.65:1. For Raman laser scattering measurements, the lowering of the salt concentration of the initial mixture of N-terminal fragment with DNA in 2 M NaCl was obtained by dilution with a buffer containing 20 mM Tris, pH 8, and 0.2 mM EDTA, followed by a dialysis against 5 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0, and 0.2 mM EDTA. Protein/DNA ratios (w/w) of the prepared complexes were 0.20–0.50:1, i.e., 4–10 molecules of the fragment per 200 base pairs of DNA.

Spectroscopic Measurements. The infrared spectra were recorded between 4000 and 700 cm^{-1} with a Perkin-Elmer 180 double-beam ratio recorder grating spectrophotometer equipped with a grid polarizer. The polarizer was placed in the common beam and rotated at $\pm 45^\circ$ with respect to the slits and the gratings. The samples were deposited on Irtran 2 windows and oriented by unidirectional stroking. The obtained films were sealed in a constant relative humidity cell and oriented at 45° with respects to the slits. The relative humidity of the cells was monitored by saturated salt solutions and controlled by the water absorption measurement at 3400 cm^{-1} .

Raman laser scattering measurements were performed as described previously (Goodwin & Brahms, 1978). Vacuum ultraviolet circular dichroism was measured by applying a previously described approach (Brahms et al., 1977; Brahms & Brahms, 1980). The vacuum ultraviolet circular dichroism measurements were performed on the N-terminal fragment dissolved in D_2O .

Results

Characterization of the Histone Fragment. The Sephadex G-100 elution pattern of the histone H4 hydrolyzed with

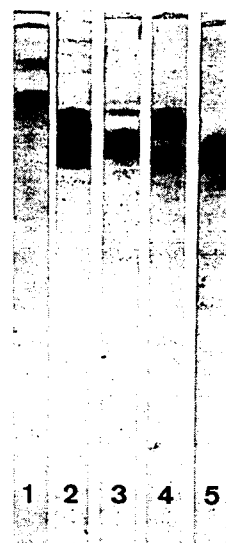


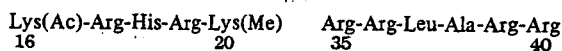
FIGURE 3: Polyacrylamide gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea of staphylococcal protease peptides from calf histone H4. Electrophoresis was performed at 1.5 mA/tube for 90 min. Gels were stained for 30 min with 1% amido black 10B in acetic acid-ethanol-water (1:2:7 v/v/v). Slot 1, histone H4; slot 2, staphylococcal protease hydrolysate of histone H4; slot 3, peak 1; slot 4, peak 2; slot 5, peak 3.

Table I: Amino Acid Composition of Peptide SP-1 Obtained by Staphylococcal Protease Cleavage of Calf Histone H4^a

amino acids	H4-SP-1 1-53	histone H4
Asp	2.4 (2)	5
Thr	1.1 (1)	7
Ser	1.9 (2)	2
Glu	2.8 (3)	6
Pro	1.2 (1)	1
Gly	11.9 (12)	17
Ala	3.3 (3)	7
Val	2.2 (2)	9
Met	0.0 (0)	1
Ile	4.7 (5)	6
Leu	4.3 (4)	8
Tyr	1.2 (1)	4
Phe	0.0 (0)	2
His	1.2 (1)	2
Lys ^b	7.1 (7)	11
Arg	9.1 (9)	14
no. of residues	(53)	102

^a Results are expressed as the number of amino acid residues. Figures in parentheses are the nearest integers. ^b Including N^ϵ -methyllysine.

staphylococcal protease (see Materials and Methods) is shown in Figure 2. Three major fractions were obtained. Fraction 1, which appears as a broad band on gel electrophoresis (Figure 3, slot 3), corresponds to the amino-terminal half of the histone H4 (peptide SP-1, residues 1–53), assessed by the amino acid composition (Table I). This H4 fragment, produced by the specific cleavage of the bond between Glu-53 and Thr-54, is 50% acetylated at Lys-16 (De Lange et al., 1969). It contains 17 of the 27 basic residues present in histone H4, which gives it a markedly basic character. The peptide 1–53 is also characterized by two basic sequences



which makes it of peculiar interest with a view of studying histone-DNA interactions.

Vacuum Ultraviolet Circular Dichroism Studies. The results of vacuum ultraviolet circular dichroism allow us to determine the secondary structure of the 1–53 fragment in

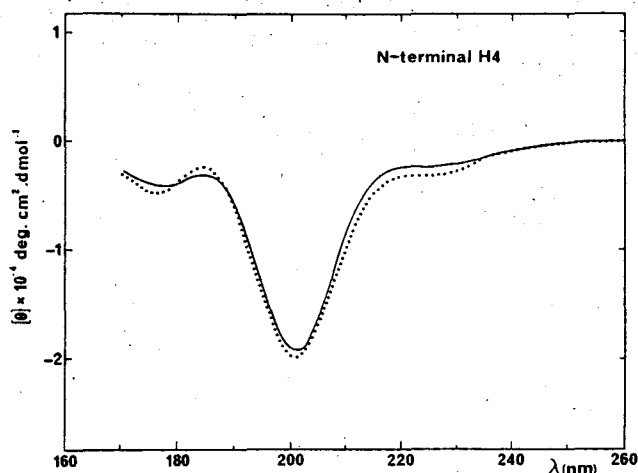


FIGURE 4: Vacuum ultraviolet circular dichroism spectrum of N-terminal 1-53 fragment of histone H4 measured in D_2O solution, neutral pH.

D_2O , which appears essentially in an aperiodic, random conformation (Figure 4). The quantitative analysis of the conformational parameter indicates that the N-terminal fragment is characterized by the following contributions: 65% of aperiodic random structure; 15% of β turns; 14% of α -helical and 6% of β structures. This seems to be in agreement with its amino acid composition (Table I), indicating that glycines and proline, α -helix breakers, are in a very important amount (25 mol %) and that positively charged arginines and lysines are concentrated in the N-terminal portion of the molecule, bringing a high positive charge density. This predominant contribution of aperiodic structure is essentially in agreement with the previous qualitative investigation performed in a limited ultraviolet spectral region by Lewis et al. (1975) on a smaller fragment (1-23). For a much larger N-terminal fragment (1-84) Adler et al. (1975) found 60% of the residues in random conformation and 40% in β structure, which according to the authors reflects an overestimate of the β structure by the method used. The circular dichroism spectra show that the conformation of the 1-53 N-terminal fragment was not changed upon increasing the ionic strength to 0.1 M KF and by formation of complexes with DNA.

Raman Laser Scattering Studies. Raman laser scattering investigations were performed on complexes of N-terminal fragment-DNA in solution and in fibers. The Raman laser spectra of N-terminal fragment-DNA complex at low protein/DNA ratios ($r = 0.2$) in H_2O solution and D_2O solution are shown in parts a and b of Figure 5. The formation of complexes is reflected in some changes of the intensity of Raman bands characteristic of base vibrations. Quantitative comparison of the intensity of these bands with respect to that of the phosphate $O\cdots P\cdots O$ symmetric stretching vibration at $\sim 1094\text{ cm}^{-1}$ leads to the following observations.

(1) The intensity of the band at $\sim 1490\text{ cm}^{-1}$ is not changed and remains essentially identical with that of free DNA. This band is assigned predominantly to the guanine ring vibrations (Petitcolas, 1971) involving N7-C8 stretching vibrations with a relatively small contribution from adenine (Goodwin & Brahms, 1978). This indicates that the N7 position of guanine and the large groove of DNA are not the sites of interaction with the N-terminal fragment of H4.

(2) A reduction of the intensity of the 1578-cm^{-1} band has been observed in Raman spectra of complexes of N-terminal fragment when compared with spectra of DNA. The 1578-cm^{-1} Raman band results from purine base vibrations and in DNA has been assigned predominantly to adenine vibrations

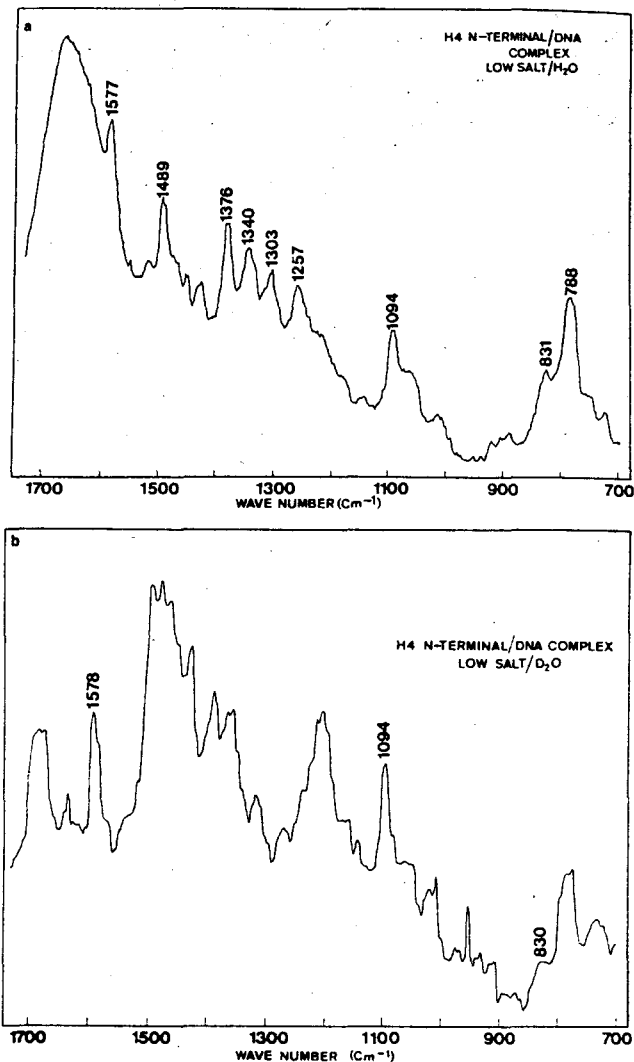


FIGURE 5: (a) Raman spectrum of the H4 N-terminal fragment-DNA complex in the ratio of 4 molecules of fragment per 200 base pairs in H_2O solution. Reconstituted complex (see text) was exposed to a final dialysis against 5 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 8.0, and 0.2 mM EDTA. (b) Raman spectrum of H4 N-terminal fragment-DNA complex in D_2O solution. The protein/DNA ratio is as in spectrum a, and the final dialysis was achieved against D_2O solution.

Table II: Relative Intensities of the Raman Bands at 1578 and 1490 cm^{-1} with Respect to the Phosphate 1094-cm^{-1} Band

sample	1578 cm^{-1}	1490 cm^{-1}
DNA	1.35	1.15
N-terminal fragment-DNA complex ($r = 0.2$)	1.1	1.1
N-terminal fragment-DNA complex ($r = 0.5$)	1.0	0.9

(Petitcolas, 1971) involving the N3 position of adenine. A similar decrease in intensity of the 1578-cm^{-1} band of DNA was observed in native and reconstituted nucleosomes (Goodwin et al., 1979; S. K. Brahmachari and J. Brahms, unpublished results). This strongly suggests that the binding of the N-terminal fragment of H4 to DNA is occurring similarly in our complexes and in nucleosomes.

The complex, N-terminal fragment 1-53 of H4 histone with DNA, was also prepared at a higher protein/DNA ratio, $r = 0.5$, i.e., 10 molecules of fragment 1-53 of H4 per 200 base pairs of DNA. This concentration corresponds to an excess of protein if compared to the expected protein/DNA ratio in nucleosomes. Under this condition the formation of the

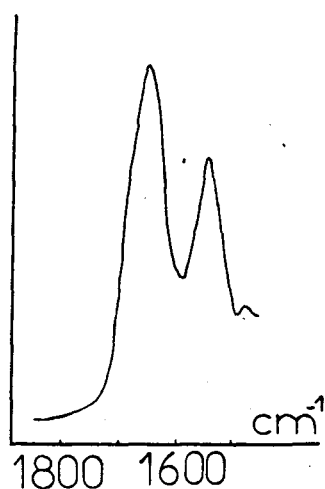


FIGURE 6: Infrared absorption spectrum in the amide I and amide II regions of the H₄ 1-53 fragment bound to the DNA.

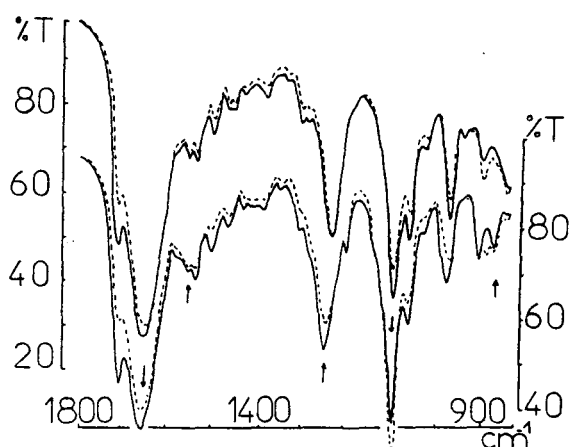


FIGURE 7: Infrared dichroic spectra of a H₄ (1-53)-DNA complex (input weight ratio 0.45:1). Top: high relative humidity spectrum. Bottom: low relative humidity spectrum. (—) Electric field polarized perpendicularly to the orientation axis; (---) electric field polarized parallelly to the orientation axis. Arrows indicate characteristic absorptions (from left to right): amide I, amide II, phosphate antisymmetrical and symmetrical valence vibrations, and phosphodiester chain skeleton vibration.

complex leads to a slightly more pronounced decrease of the intensity of the 1578-cm⁻¹ band; moreover, the 1490-cm⁻¹ band has its intensity significantly reduced, with respect to the phosphate band (Table II). This strongly suggests that under the condition of an excess of N-terminal fragment molecules, not only the sites of attachment in the small groove involving N3 of adenine are occupied but also the sitelike N7 position of guanine (i.e., the 1490-cm⁻¹ band) in the large groove is the site of interaction.

The Raman laser spectra of all complexes in solution and in fibers at high relative humidity show a band at ~830 cm⁻¹ characteristic of the phosphodiester stretching vibration of DNA (Erfurth et al., 1975; Goodwin & Brahms, 1978) which is essentially similar to that of free DNA under the same conditions of relative humidity.

Infrared Linear Dichroism Studies. (1) *Protein Conformations.* In the studied spectral region two main absorptions are observed: the amide I and amide II bands. Figure 6 shows the spectrum of the protein bound to the DNA obtained by differential spectroscopy or recalculated with the help of a computer. The amide I absorption at 1650 cm⁻¹ presents a symmetrical profile with no significant shoulder detected either at 1625 cm⁻¹ or at 1675 cm⁻¹, usually considered as due

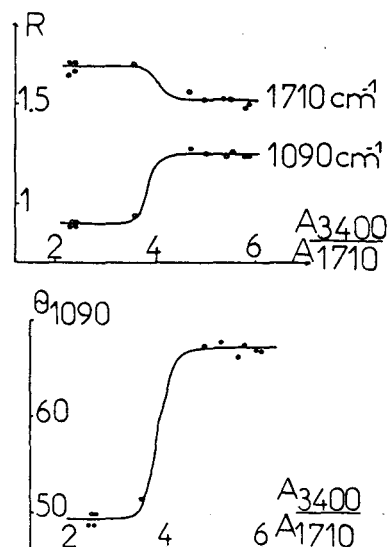


FIGURE 8: Variation of the dichroic ratios (top) and orientation parameter (bottom) of a H₄ (1-53)-DNA complex (weight ratio 0.45:1) with relative humidity.

Table III: Composition and Angular Parameter of H₄ (1-53)-DNA Complexes Determined by Infrared Spectroscopy

protein/ DNA wt ratio	protein/DNA ratio determined by IR spectroscopy		Θ ₁₀₉₀ at low rel humidity
	amide I A ₁₆₆₀ /A ₁₇₁₀	amide II A ₁₅₅₀ /A ₁₇₅₀	
0	0.83 ± 0.03	0	49.5
25	1.02 ± 0.04	0.13 ± 0.02	50
45	1.30 ± 0.05	0.28 ± 0.06	49
55	1.42 ± 0.03	0.62 ± 0.02	51
60	1.56 ± 0.04	0.66 ± 0.03	49
65	1.67 ± 0.02	0.70 ± 0.03	ppt

to a β-sheet structure. Similarly, no shoulder is observed on the amide II band located at 1540 cm⁻¹ (Chirgadze & Nevskaja, 1976). This is in good agreement with our data issued by circular dichroism; the structure of the N-terminal fragment bound to the DNA is essentially a random conformation.

(2) *DNA Conformations.* Figure 7 shows the dichroic spectra of a H₄ (1-53)-DNA complex at high and low relative humidities. Details about the infrared linear dichroism measurements and calculations have been given previously (Pilet & Brahms, 1973; Liquier et al., 1977). Qualitatively the observation of the spectra shows that the DNA bound to the N terminal of H₄ is in a B-family-type conformation at high relative humidity (top) and an A-type conformation at low relative humidity (bottom): the absorptions at 1710, 1230, and 1090 cm⁻¹ are respectively polarized perpendicularly, nondichroically, and perpendicularly in the first case and perpendicularly, perpendicularly, and parallelly in the second case; the phosphodiester deformation modes below 1000 cm⁻¹ show that the B → A transition is totally observed [presence of a band at 835 cm⁻¹ in the B form (top) and at 860 cm⁻¹ in the A form (bottom)].

Quantitatively the measurement of the dichroic ratios of the 1090-cm⁻¹ band allows us, when the relative humidity of the sample is modified, to follow the variation of the orientation of the transition dipole moment with respect to the helix axis (Figure 8). The values calculated for the different H₄ (1-53)-DNA complexes are presented Table III. It is clear that the low relative humidity geometry of the DNA is not modified by the presence of the N-terminal histone fragment. The same

computation shows that the high relative humidity conformation of the DNA in the complexes belongs to the B family.

Discussion

The present study of the interactions of the N-terminal fragment of H4 with DNA may serve as a model for the understanding of the structural organization in chromatin. We have found that the isolated N-terminal fragment binds to DNA in a similar manner and in a similar region of the DNA as when it belongs to the reconstituted or native whole nucleosomal core.

The Raman spectra of reconstituted and native nucleosomes exhibit a decrease of the relative intensity of the 1578-cm⁻¹ band whereas the 1490-cm⁻¹ band is not changed (Goodwin et al., 1979; S. K. Brahmachari and J. Brahms, unpublished results). These two bands at 1490 and 1578 cm⁻¹ are assigned in DNA to guanine and adenine, respectively (Peticolas, 1971). On the basis of Raman spectra of DNA methylated by dimethyl sulfate and the previous methylation data of Maxam & Gilbert (1977) and Lawley & Brookes (1963), the bands at 1490 and 1578 cm⁻¹ were assigned predominantly to vibrations involving N7 of guanine and N3 of adenine, respectively. Thus, the site of interaction of the N-terminal fragment involves N3 of adenine exposed in the narrow groove whereas the large groove remains free.

The similitude between the binding of the N-terminal fragment of H4 and the whole H4 molecule to DNA may be explained by the very dissymmetrical structure of H4 (see Table I). It contains 17 of the 27 basic residues of H4. On the basis of previous sequence determination (De Lange et al., 1969; Ogawa et al., 1969), it was largely accepted that the N-terminal fragment of H4, which is the cationic part, binds to DNA. NMR studies of histones essentially confirmed this representation of N-terminal parts of histones as responsible for binding to DNA (Bradbury & Rattle, 1972; Lewis et al., 1975). Previous experiments indicated that after trypsin digestion there is an increased sensitivity of chromatin to the digestion by staphylococcal nuclease (Weintraub & Van Lente, 1974). The trypsin digestion of nucleosome (PS) particles by Sahasrabudhe & Van Holde (1974) indicated that DNA becomes unfolded and its hydrodynamic behavior is approximately that expected for an extended rodlike DNA covered with some remaining proteins. It appears thus that the N-terminal fragment protects DNA against staphylococcal nuclease digestion, whereas its digestion by trypsin leads to the loss of the folded DNA structure.

The present experiments suggest that this N-terminal part, which has a very flexible, essentially random, conformation as shown by circular dichroism and infrared determinations, not only binds to DNA like an arm but also has the function to choose its place on DNA following the narrow groove. This mechanism occurs independently, whether the nucleosomal particles are entire or whether only the N-terminal fragment is present. Despite the fact that the binding of nucleosomes to DNA is not sequence specific (Prunell & Kornberg, 1978; Prunell, 1979), this interaction occurs in a particular region of DNA, i.e., in its narrow groove. This may have an important biological role in view of the possible sliding or movement of nucleosomes (Steinmetz et al., 1978; Weischet, 1979), and this mechanism may ensure the finding of a correct position on DNA.

Vacuum ultraviolet circular dichroism allows a very precise analysis of the conformation of the 1-53 fragment and detects essentially an aperiodic random conformation and only a slight presence of β -turn conformation and α and β structures. The β -sheet structure is very well characterized by infrared spec-

troscopy. In the spectra of DNA-chromosomal nonhistone protein complexes we detect this structure in the amide I spectral region by two strong absorptions distant of ~ 50 cm⁻¹ at 1675 and 1625 cm⁻¹. These two characteristic frequencies are very clearly different from those of α helices or random structures which are observed between 1650 and 1655 cm⁻¹.

The infrared spectra of complexes between DNA and whole H4 as well as the 1-84 fragment of H4 (for protein/DNA weight ratios above 0.25:1) show such β -structure characteristic absorptions (unpublished results). On the contrary, the infrared method sensibility does not allow us to detect any β structure in the complexes with the 1-53 fragment of H4. The β structure is therefore mostly located beyond residue 53 in H4. This is in good agreement with NMR studies which show that among the 102 residues of H4 the structured parts (α helix and β structure) are located in the 53-102 region.

Each part of the histone H4 has a different role in the histone-DNA interaction. The infrared spectroscopy shows that the effect of the binding of this H4 fragment to DNA is very different from that of the whole H4 molecule. In the latter case, the B \rightarrow A conformational transition is progressively inhibited with increasing histone/DNA ratios. One H4 molecule blocks 2.5 DNA helix turns in a B-type conformation. On the contrary, the presence of only the 1-53 N-terminal part does not modify the conformational flexibility of the DNA which remains able to adopt any of the two A and B configurations. Thus, the two fragments 1-53 and 54-102 play a totally different structural role in the DNA-histone interactions. The strong electrostatic binding between the phosphates of the DNA and the charged groups of the lysine and arginine residues of the N-terminal fragment is not responsible for the loss of the DNA flexibility. This is in good agreement with our results concerning the very lysine-rich histones H1 (Taillandier et al., 1979) and H5 (unpublished results) which remain without effect on the DNA flexibility, as well as the structures of complexes between DNA and basic polypeptides (Liquier et al., 1975): polyarginine and polylysine bound to DNA leave it free to undergo all the possible conformational transitions. Therefore, it is the globular part strongly structured α helix and the partial β sheet of the histone H4 54-102 which stabilize the DNA in the high humidity (B type) conformation.

In conclusion, the binding of the N-terminal fragment of H4 is shown to occur to the similar DNA region as in the whole nucleosomes. It is shown by infrared investigation that the binding of the N-terminal fragment has no effect on the conformational flexibility of DNA in contrast to the effect of the globular nucleosomal core which stabilizes the DNA in its high humidity form. This interaction of the N-terminal fragment with DNA represents a general model in nonspecific protein-DNA interactions which can also be exemplified by other nonspecific interactions occurring in biology, and this study may help in better understanding of the biological processes, such as transcription in eukaryotic cells.

Acknowledgments

We acknowledge with pleasure the skillful technical assistance of A. Hemez and M. J. Dupire.

References

- Adler, A. J., Fulmer, A. W., & Fasman, G. D. (1975) *Biochemistry* 14, 1445.
- Bradbury, E. M., & Rattle, H. W. E. (1972) *Eur. J. Biochem.* 27, 270.
- Brahms, S., & Brahms, J. (1980) *J. Mol. Biol.* 138, 749.

- Brahms, S., Brahms, J., Spach, G., & Brack, A. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 3208.
- Chirgadze, Y. N., & Nevskaja, N. A. (1976) *Biopolymers* 15, 607.
- Crane-Robinson, C., Hayashi, H., Cary, P. D., Briand, G., Sautière, P., Krieger, D., Vidali, G., Lewis, P. N., & Tom-Kun, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 535.
- De Lange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L., & Bonner, J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 319.
- Erfurth, S. C., Bond, P. J., & Peticolas, W. L. (1975) *Biopolymers* 14, 1245.
- Goodwin, D. C., & Brahms, J. (1978) *Nucleic Acids Res.* 5, 835.
- Goodwin, D. C., Vergne, J., Brahms, J., Defer, N., & Kruh, J. (1979) *Biochemistry* 18, 2057.
- Johns, E. W. (1967) *Biochem. J.* 105, 611.
- Lawley, P. D., & Brookes, P. (1963) *Biochem. J.* 89, 127.
- Lewis, P. N., Bradbury, E. M., & Crane-Robinson, C. (1975) *Biochemistry* 14, 3391.
- Liquier, J., Pinot-Lafaix, M., Taillandier, E., & Brahms, J. (1975) *Biochemistry* 14, 4191.
- Liquier, J., Taboury, J., Taillandier, E., & Brahms, J. (1977) *Biochemistry* 16, 3262.
- Liquier, J., Gadenne, M. C., Taillandier, E., Defer, N., Favatier, F., & Kruh, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 1479.
- Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 560.
- Ogawa, Y., Quagliarotti, G., Jordan, J., Taylor, C. W., Starbuck, W. C., & Bush, H. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4387.
- Panyim, S., & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337.
- Peticolas, W. L. (1971) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 2, 94.
- Pilet, J., & Brahms, J. (1973) *Biopolymers* 12, 387.
- Prunell, A. (1979) *FEBS Lett.* 107, 285.
- Prunell, A., & Kornberg, R. D. (1978) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 103.
- Sahasrabudhe, C. G., & Van Holde, K. E. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 152.
- Steinmetz, M., Streeck, R. E., & Zachau, H. G. (1978) *Eur. J. Biochem.* 83, 615.
- Taillandier, E., Taboury, J., Liquier, J., Gadenne, M. C., Champagne, M., & Brahms, J. (1979) *Biopolymers* 18, 1877.
- Tsuboi, M. (1974) *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, p 399, Academic Press, New York.
- Weintraub, M., & Van Lente, F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4249.
- Weischet, W. (1979) *Nucleic Acids Res.* 7, 291.

Structural transitions in DNAs and nucleohistones studied by I.R. spectroscopy.

E. TAILLANDIER \diamond , J. TABOURY,
J. LIQUIER, P. SAUTIERE *
and M. COUPEZ *.

Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire,
U.E.R. de Médecine, Université Paris XIII,
74, rue Marcel Cachin, 93000 Bobigny (France)
* Unité 124 de l'INSERM,
Institut de Recherche sur le Cancer,
F59020 Lille Cedex (France).

Mots-clés : spectroscopie infrarouge / DNA /
poly(dG-dC)-poly(dG-dC) / fragments de
l'histone H4.

Key-words : infrared spectroscopy / DNA /
poly(dG-dC)-poly(dG-dC) / histone H4
fragments.

Introduction.

Double stranded polynucleotides are known to adopt various secondary structures depending on base composition, counterion content and sample

hydratation. Fiber X ray diagrams (for review see [1] and infrared linear dichroism measurements on oriented films [2] have shown the existence of several main right handed helical conformations for native DNAs (A, B and C forms). Recently X ray

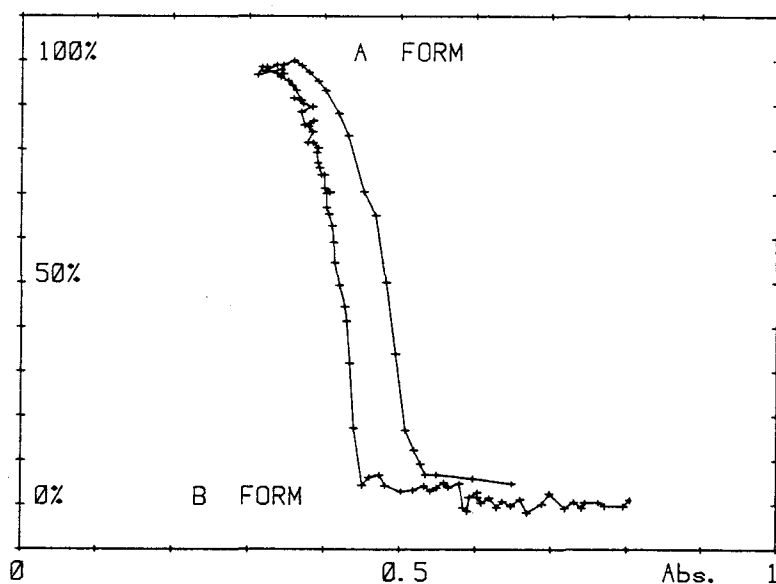


FIG. 1. — $B \rightarrow A$ conformational transition of salmon sperm DNA. During the transition, the ratio $A_{2910}/A_{2900} + A_{2885}$ of the integrated characteristic absorptions is directly plotted by the computer coupled to the spectrophotometer versus the simultaneously measured hydratation of the sample determined by the water absorption contribution in the $750-700 \text{ cm}^{-1}$ region. Linear absorbance scale is arbitrary.

\diamond To whom all correspondence should be addressed.

diffraction diagrams of synthetic DNA oligomer crystals and polymer fibers have been interpreted in terms of left handed helices [3, 4, 5]. We pre-

sent here a quantitative method for the determination of right-handed helix geometries in DNAs and nucleohistones, particularly interesting when no oriented samples can be obtained, in which case neither X ray fiber diagrams nor linear dichroism methods can be successfully used. The right handed-helix - left handed helix transition in the case of poly(dG-dC) has also been investigated.

Materials and Methods.

Salmon sperm DNA was purchased from Worthington Co and dissolved in 1.5 M NaCl. Concentrations (between 2 and 5 mg/ml) were determined by UV absorbance measurements assuming $\epsilon_{290\text{ nm}} 1\text{ mg/ml} = 20$ for a 1 cm cell. Poly(dG-dC)-Poly(dG-dC) was purchased from P.L. Biochemicals (lots n° 658-5 and 676-7) dissolved in 50 to 100 mM NaCl or MgCl_2 at a concentration of 10D/ml and ethanol precipitated. The precipitate is washed in 80 per cent ethanol and the desired amount of Na^+ or Mg^{2+} counterion (around 4 cations per phosphate) adjusted by addition of 50 to 100 μl of NaCl or MgCl_2 solution to the precipitate.

Calf thymus histone H4 fragments have been prepared by staphylococcal treatment (fragment 1-53 [6]) by cyanogen bromide cleavage (fragment 1-84 [7]) and by acetic acid treatment (fragment 69-84 [8]); fragments were characterized by polyacrilamide slab gel electrophoresis [9] and amino acid analysis. Histone fragment-DNA complexes were prepared by salt gradient dialysis as previously described [10].

Infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer 180 Spectrophotometer. Digital data issued by the radiometer was directly treated by a Hewlett Packard 9825 A Calculator allowing base line corrections for water contributions and to follow conformational transitions. Sample films were placed in cells with controlled relative humidity; sample hydration was determined by the measurement of the 750 cm^{-1} - 700 cm^{-1} region of the broad water absorption normalized with respect to the area of the DNA absorptions between 1850 cm^{-1} and 700 cm^{-1} . Thus the thickness of the film is implicitly introduced in the measurement of the hydration parameter of the film. All spectra were recorded at the temperature of the spectrophotometer (35°C).

Results.

The infrared spectra of DNAs and nucleohistones are now well known [11, 12]. However the spectral region between 800 - 900 cm^{-1} , very rich in structural information has been seldom used for the determination of nucleic acid conformations. In this spectral domain several absorptions can be correlated with the A and B DNA helical geometries:

thus two absorptions located at 860 cm^{-1} and 805 cm^{-1} reflect an A type conformation, while a band at 835 cm^{-1} is due to a B type geometry. When the B \rightarrow A conformational transition takes place (for example with decreasing hydrata-

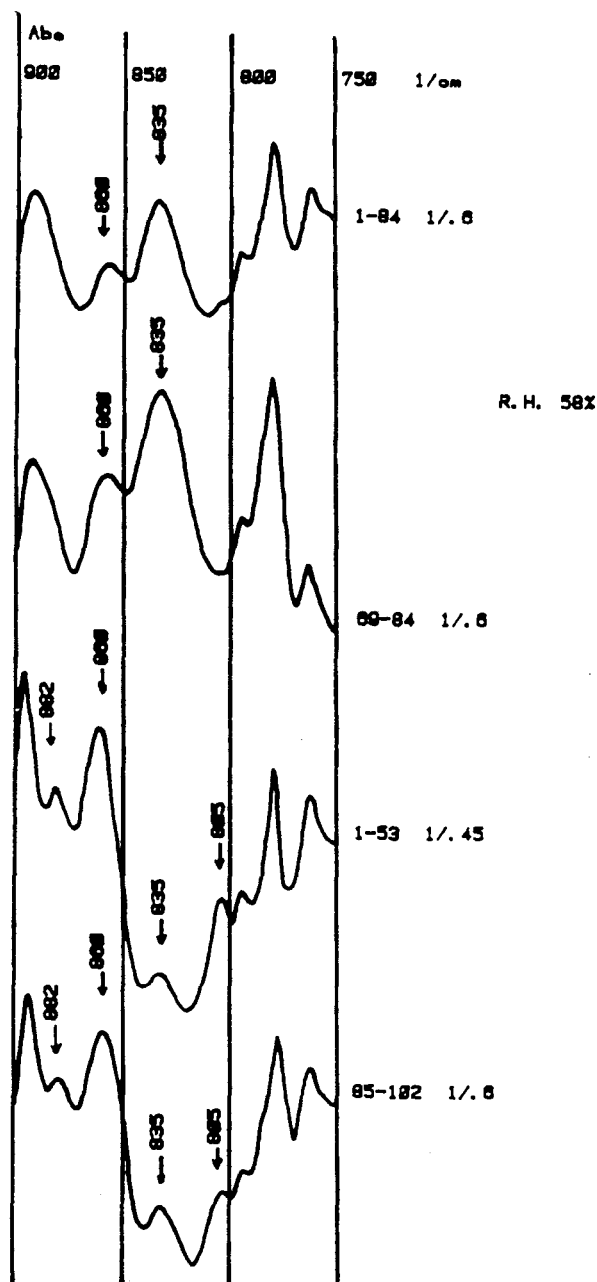


FIG. 2. — Infrared absorption spectra in the phosphodiester main chain vibration region of complexes reconstituted with different H4 fragments and salmon sperm DNA. Spectra are recorded at low Relative Humidity (58 per cent R.H.). The DNA/Protein weight input ratio is shown next to the corresponding histone fragment. Linear absorbance scale is arbitrary.

tion of the sample) the relative intensities of these bands vary. The same spectral region allows us moreover to determine the hydration of the sample thanks to the presence of a broad strong water absorption at about 700 cm^{-1} . Thus the simultaneous measurement of the water content of the

hydration a very cooperative $B \rightarrow A$ transition occurs and can be followed by the steep curve figure 1. Finally at low relative humidity the A form is obtained. As can be seen on the figure this transition is totally reversible. The slight hysteresis detected is due to the difficulty to reduce suffi-

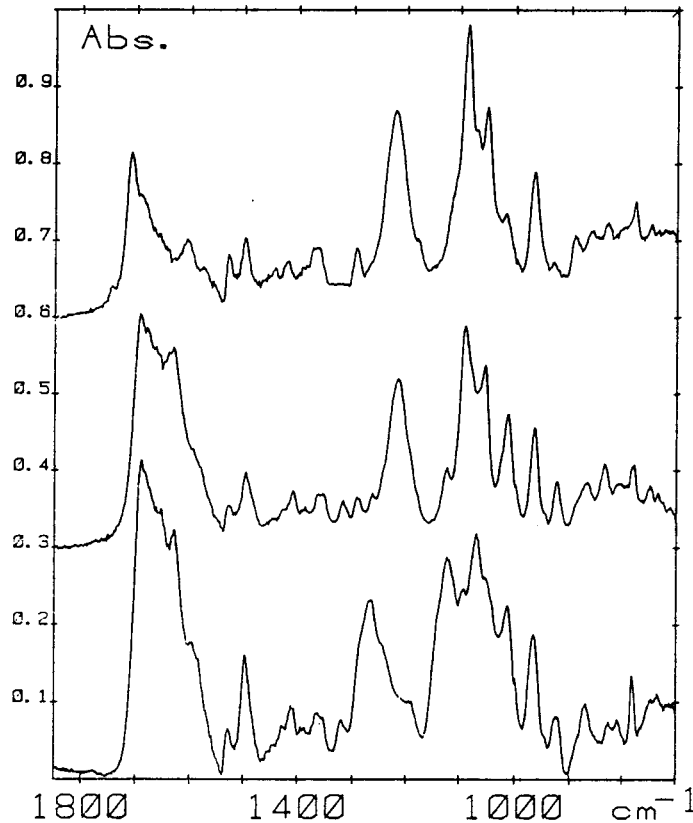


FIG. 3. — Infrared absorption spectra of Poly(dG-dC)-Poly(dG-dC) film.

- a. Right handed configurations (~ 100 per cent R.H.)
Na⁺ or Mg⁺⁺ counterion.
 - b. Left handed configurations (90 per cent R.H.)
Na⁺ or Mg⁺⁺ counterion.
 - c. Left handed configurations (30 per cent R.H.)
Only Mg⁺⁺ counterion.
- Linear absorbance scale is arbitrary.

sample and of the relative intensities of the B and A geometry characteristic bands at 835 cm^{-1} and 860 cm^{-1} enables us to follow the conformational transition of the DNA when the relative humidity varies. Figure 1 shows the plot recorded directly by the computer coupled to the I.R. spectrophotometer of the ratio $A_{860}/(A_{835} + A_{860})$ versus the water content of the film. For a high relative humidity a perfect B form is observed. With decreasing

hydration speed of the sample. The same measurements achieved on histone - DNA complexes, either reconstituted or native (chromatin, nucleosomes, core particles) can show the existence of a strong protein-DNA interaction which stabilizes the DNA in a B type geometry. Figure 2 presents the absorption spectra in the $900 - 750\text{ cm}^{-1}$ region of complexes reconstituted with various H4 fragments and salmon sperm DNA. All

spectra were recorded in the same experimental conditions. It is clear that the relative intensities of the 860 cm^{-1} and 835 cm^{-1} absorptions measured on these spectra are very different depending on the H4 fragment used, showing the existence of various protein-DNA interactions. Thus the stabilizing effect of the N(1-53) and C(85-102) terminal parts of the histone seem very weak, while a very important interaction occurs in the case of the 69-84 fragment. Thus the amount of B geometry stabilized at low relative humidity by one (69-84) H4 histone fragment is 5 ± 1 DNA base pairs.

The structural transition of Poly(dG-dC)-Poly(dG-dC) containing Mg^{2+} or Na^+ counterions have been investigated by infrared spectroscopy (figure 3 a, b). This transition has been monitored by decreasing the relative humidity from 100 per cent to 90 per cent R.H. We have studied the same films by U.V. absorbance spectroscopy and determined the variation of the $A_{295\text{ nm}}/A_{260\text{ nm}}$ ratio in the same range of decreasing relative humidity. This variation in U.V. absorbance has been earlier correlated with the right handed - left handed helix transition [13, 14]. Thus we can identify the spectrum 3a as reflecting a right handed structure and the 3b as reflecting a left handed structure. Absorptions at 1320 cm^{-1} , 1265 cm^{-1} , 1122 cm^{-1} , 1013 cm^{-1} and 925 cm^{-1} reflect the new arrangement of the double helix in the left handed geometry (figure 3b). In the $800\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ region, the two simultaneous absorptions at 830 cm^{-1} and 865 cm^{-1} observed at very high Relative Humidity in the right handed structure are found at 835 cm^{-1} and 870 cm^{-1} in the left handed helix. The presence of these two absorptions is a new result which shows that the high Relative Humidity right handed structure of Poly(dG-dC) - Poly(dG-dC) does not belong to the classical B form family of native DNAs. This new spectrum could be related to the regular alternating purine-pyrimidine sequence [15, 16] and its consequence on the phosphodiester skeleton arrangement. At intermediate Relative Humidity (figure 3b) the two absorptions at 870 cm^{-1} and 835 cm^{-1} could reflect the two diffe-

rent geometries observed by X ray diffraction for the CpG and the GpC residues. In the case of the samples with Mg^{2+} counterions, when the relative humidity is still lowered, (figure 3c) a new transition occurs in the Z family structures. These results are in agreement with the X ray diffraction patterns of Poly(dG-dC) - Poly(dG-dC) hexamer crystals [3, 5, 17], and with recent Raman spectra of the hexamer crystal and hexamer and polymer solutions [18].

REFERENCES.

1. Leslie, A. G. W., Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Ratcliff, R. L. (1980) *J. Mol. Biol.*, **143**, 49-72.
2. Pilet, J. & Brahms, J. (1973) *Biopolymers*, **12**, 387-403.
3. Wang, A. H. J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., Crawford, J. L., Van Boom, J. H., Van der Marel, G. & Rich, A. (1979) *Nature*, **282**, 680-686.
4. Arnott, S., Chandrasekaran, R., Birdsall, D. L., Leslie, A. G. W. & Ratcliff, R. L. (1980) *Nature* **283**, 743-745.
5. Drew, H., Takano, T., Tanaka, S., Itakura, K. & Dickerson, R. E. (1980) *Nature*, **286**, 567-573.
6. Couppez, M., Sautiere, P., Brahmachari, S. K., Brahms, J., Liquier, J. & Taillandier, E. (1980) *Biochem.*, **19**, 3358-3363.
7. Gross, E. & Witkop, B. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1856-1860.
8. Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormick, J. & Jones, R. T. (1963) *Biochem.*, **2**, 992-1008.
9. Panyim, S. & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337-346.
10. Taillandier, E., Taboury, J., Liquier, J., Gadenne, M. C., Champagne, M. & Brahms, J. (1979) *Biopolymers*, **18**, 1877-1888.
11. Liquier, J., Taboury, J., Taillandier, E. & Brahms, J. (1977) *Biochem.*, **16**, 3262-3266.
12. Liquier, J., Gadenne, M. C., Taillandier, E., Defer, N., Favatier, F. & Kruh, J. (1979) *Nucl. Acad. Res.*, **6**, 1479-1493.
13. Pohl, F. M. (1976) *Nature*, **260**, 365-366.
14. Pohl, F. M., Ranade, A. & Stockburger, M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **335**, 85-92.
15. Patel, D. J., Canuel, L. L. & Pohl, F. M. (1979) *Proc. Nat. Sci. USA*, **76**, 2508-2511.
16. Klug, A., Jack, A., Viswamitra, M. A., Kennard, O., Shakked, Z. & Steitz, T. A. (1979) *J. Mol. Biol.*, **131**, 669-680.
17. Wang, A. H. J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., Van der Marel, B., Van Boom, J. H. & Rich, A. (1981) *Science*, **211**, 171-176.
18. Thamann, T. J., Lord, R. C., Wang, A. H. J. & Rich, A. (1981) *Nucl. Ac. Res.*, **20**, 5443-5457.

Role of the Protein α Helices in Histone-DNA Interactions Studied by Vibrational Spectroscopy[†]

E. Taillandier,* L. Fort, J. Liquier, M. Couppez, and P. Sautiere

ABSTRACT: The localization of structurally important histone-DNA interactions has been investigated by vibrational spectroscopy. Histones H2A, H2B, and H4 and their fragments (H2A, 1-56, 1-89, 73-129; H2B, 1-59, 1-83; H4, 1-53, 1-67, 1-84, 69-84, 85-102) have been prepared, characterized, and used to reconstitute protein-DNA complexes. Evidence is given for the existence of a direct relationship between the presence of ordered α -helical structures in the histones and a stabilization of the DNA in a B geometry. Infrared linear and ultraviolet dichroism measurements indicate that the

N-terminal fragments, rich in basic residues and mostly in a random conformation, remain without any influence on the secondary structure of the nucleic acid, leaving it free in the complexes to undergo a total B \rightarrow A conformational transition. On the contrary, histone fragments that involve some α -helical parts of the protein partially stabilize the DNA in a B geometry. Histone fragments that contain all of the α helices of the protein block the DNA in the same way as the whole corresponding histone. A model for histone-DNA interactions in the core particle is discussed.

The main features of chromatin structure have now been known for some years, and the repetitive unit of this nucleoprotein, the core particle, has been characterized with precision [for a review, see Felsenfeld (1978) and Weisbrod (1982)]. However, the exact location of the important DNA-histone

interactions and particularly the involved histone residues is not known. Recent cross-linking experiments (Shick et al., 1980) have shown that in the core particle histones are bound to regularly arranged discrete DNA segments. Thus, starting from the 5'-end of the 144-bp core DNA, three main sites are obtained for H4 (around positions 45, 55, and 65) and likewise for the other core histones, each DNA fragment being about six nucleotides long. Earlier trypsin and nuclease digestion studies (Weintraub & Van Lente, 1974) are consistent with models in which the N terminal basic ends of histones do not belong to the protein core of the nucleosome. We have previously shown that vibrational spectroscopy is a very useful

[†] From the Laboratoire de Spectroscopie Biomoléculaire, Université Paris-Nord, 93000 Bobigny, France (E.T., L.F., and J.L.), and the Unité associée CNRS No. 409, Institut de Recherches sur le Cancer 59045, Lille, France (P.S. and M.C.). Received August 12, 1983; revised manuscript received December 28, 1983. P.S. and M.C. are indebted to the Centre National de la Recherche Scientifique for Grant Action Thématique Programmée Chromatine 4203.

technique to study the secondary structures of DNA free or in nucleoproteins, as well as the conformational transitions of the nucleic acid (Liquier et al., 1977; Taillandier et al., 1979). In these studies, the stabilization of the B geometry of the DNA by the core histones has been proved. Here, we investigate the localization of the interaction responsible for this loss of conformational flexibility of DNA, by studying nucleohistones reconstituted with well-defined H2A, H2B, and H4 fragments. A direct relationship between the presence of ordered secondary structure in the protein and its stabilizing effect on the DNA is found: the N-terminal fragments of H2A, H2B, and H4 remain quite inefficient with respect to the stabilization of the nucleic acid in a particular geometry, whereas the α helical parts of these histones block the DNA in a B geometry.

Materials and Methods

Preparation of Histone Fragments. Histones H2A, H2B, and H4 were extracted from calf thymus chromatin by selective extraction methods of Johns (1964, 1967) and purified as described by Michalski-Scrive et al. (1982).

The H4 fragments 1-84 and 85-102 and the H2B fragment 1-59 were obtained by cyanogen bromide cleavage of the histones according to the method of Gross & Witkop (1962). The H4 fragments 1-67 and 69-84 and the H2A fragments 1-89 and 73-129 were obtained by cleavage at aspartyl residues with 0.25 M acetic acid (10 mg of protein/mL) at 105 °C (Schroeder et al., 1963). V8 staphylococcal protease hydrolysis in 0.05 M ammonium acetate at pH 4.0 and 37 °C was used to prepare the fragments 1-53 from H4 (Couppez et al., 1980) and 1-56 from H2A. All these fragments were isolated and purified through gel filtration chromatography on Bio-Gel P-10 and/or Sephadex G-50 or G-100 equilibrated and eluted with 10 mM HCl saturated with chloroform (see paragraph at end of paper regarding supplementary material).

Limited chymotryptic hydrolysis of histone H2B (100 mg) was performed in 10 mL of 0.1 M ammonium bicarbonate-0.5 M NaCl at pH 8.5 and 20 °C for 5 h with an enzyme-to-substrate ratio of 1:5000 (w/w). The enzyme was inactivated by addition of solid guanidinium chloride up to a final concentration of 4 M and of 2-mercaptoethanol up to a final concentration of 0.3 M. The digest was left overnight at room temperature. It was then acidified to pH 2.0 and fractionated on two columns of Sephadex G-100 (90 × 5 cm) coupled in series, with 10 mM HCl saturated in chloroform as eluant.

The purity of the histone fragments was checked by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea (Panyim & Chalkley, 1969) at a 17% acrylamide concentration. The histone fragments were characterized by amino acid analysis performed on a Beckman 119 CL amino acid analyzer after hydrolysis in 6 M HCl (1 mL/mg of protein) at 110 °C for 24 h in vacuo, with one drop of 1% phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Complex Preparation. Salmon sperm DNA (Worthington or Sigma) was dissolved in 1.5 M NaCl at a concentration of 5-7 mg/mL. Exact concentrations were determined by UV absorbance measurements under the assumption of $A_{260} = 20$ for a 1 mg/mL solution and a 1-cm path length. Histones were dissolved in 10^{-3} M HCl (concentration 1 mg/mL). An identical volume of 3 M NaCl was added to the solution immediately before mixing with the DNA. A stepwise dialysis was then performed at 4 °C against 1.2, 0.75 and 0.35 M NaCl (2 h each) and finally overnight dialysis against NaCl solutions between 10^{-2} and $5 \cdot 10^{-3}$ M, determined to obtain a NaCl to DNA weight ratio of 6-9% in the sample (free DNA in such conditions undergoes a total B \rightarrow A transition). The

exact amount of Na⁺ was measured by flame photometry. The DNA to protein ratios were controlled by infrared spectroscopy, and the histone content of the samples was checked by Lowry measurements (Lowry et al., 1951).

Circular Dichroism. CD spectra were obtained on a Jobin-Yvon dichrograph R. J. Mark III with a 0.1-mm path-length cell. Measurements were performed at 4 °C, at a concentration of histone or histone fragment of 0.5-1 mg/mL in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, in absence or in presence of 2 M NaCl. θ is expressed in deg cm² (dmol of residues)⁻¹. Protein or peptide concentrations were determined from the tyrosine absorption coefficient at 275 nm ($\epsilon \approx 1350$ M⁻¹ cm⁻¹) and from amino acid analysis for peptides devoid of tyrosine.

Infrared Spectroscopy. The infrared spectra were recorded on a Perkin-Elmer 180 double-beam ratio recorder spectrophotometer (between 4000 and 700 cm⁻¹) equipped with a wire grid polarizer (KRS 5 support) placed in the common beam and oriented at 45° with respect to the slits and the preferential stretching direction of the samples. The complexes were simply gently dried after being deposited on Irtran 2 windows and oriented by unidirectional mechanical stroking when polarized measurements were wished. Relative humidity monitoring of the sample cells was achieved as described previously (Liquier et al., 1977). The infrared data (wavenumber and ratio of sample and reference beam intensities) are directly transferred to a HP 9825 A computer associated to the spectrophotometer. The absorbance values of the bands are calculated by using as a base line the spectrum of the measurement cell stored in the computer, thus eliminating any possible differential contribution between sample and reference cells. The water contents of the hydrated films are determined by using the absorption below 750 cm⁻¹, where no important DNA or protein band is observed. The water spectrum is then recalculated, and scaled spectrum subtraction is achieved, leaving only the DNA and protein absorptions. Several possibilities of data treatment such as determination of DNA conformations in mixtures of geometries, computation of dichroic ratios and orientation parameters, and characterization of protein absorptions in the nucleoproteic complexes were systematically used.

Results

Identification of Histone Fragments. The amino acid compositions of the different fragments used in this study are presented in Table I.

The hydrolysis of calf histone H2B with chymotrypsin at high ionic strength (0.5 M) and at a very low enzyme-to-substrate ratio (1:5000) reduced drastically the number of bonds susceptible to chymotryptic cleavage. Indeed, at this salt concentration, histone H2B has a maximum of secondary and tertiary structures, and most of the potential sites for chymotryptic cleavage, which are located in the organized regions of the molecule, have become inaccessible to the enzyme. Thus, the H2B fragment 1-83 was preferentially obtained and was separated from the uncleaved protein and from smaller fragments by chromatography on Sephadex G-100 (Figure 1). Fragment 1-83 was obtained in pure form in the fraction indicated by a solid bar. Due to the way in which it was obtained, fragment 1-83 was determined not only from amino acid analysis (Table I) but also from structural data provided by manual Edman degradation and hydrolysis with carboxypeptidase A.

The secondary structure of the histone fragments has been studied by circular dichroism, and we present in Table II the results that were obtained for H2A and H2B fragments. CD

Table I: Amino Acid Composition of Histone Fragments^a

amino acid	H2A fragments			H2B fragments			H4 fragments			
	1-56 ^b	1-89 ^c	73-129 ^c	1-83 ^d	1-59 ^e	63-125 ^e	1-84 ^e	85-102 ^e	1-67 ^c	69-84 ^c
aspartic acid	1.1 (1)	5.6 (5)	4.9 (5)	5.2 (5)	2.1 (2)	4.0 (4)	4.3 (4)	1.0 (1)	3.3 (3)	0.3 (0)
threonine	1.0 (1)	3.1 (3)	2.9 (3)	3.0 (2)	2.1 (2)	5.6 (7)	5.8 (6)	1.0 (1)	2.1 (2)	3.6 (4)
serine	3.2 (3)	3.3 (3)	1.1 (1)	8.0 (9)	6.7 (7)	6.5 (6)	2.2 (2)	0.0 (0)	1.9 (2)	0.0 (0)
glutamic acid	4.0 (4)	7.4 (7)	6.0 (6)	6.8 (6)	4.3 (4)	6.2 (6)	6.0 (5)	1.1 (1)	4.3 (4)	1.1 (1)
proline	2.1 (2)	3.1 (3)	2.9 (3)	4.5 (5)	5.1 (5)	1.0 (1)	1.0 (1)	0.0 (0)	1.1 (1)	0.0 (0)
glycine	8.8 (9)	10.0 (10)	3.8 (4)	5.3 (5)	3.4 (3)	3.5 (3)	12.7 (13)	3.9 (4)	12.7 (13)	0.0 (0)
alanine	8.6 (9)	13.5 (14)	4.0 (4)	9.4 (9)	6.3 (6)	7.1 (7)	6.3 (6)	1.1 (1)	3.6 (3)	3.1 (3)
valine	4.9 (5)	5.3 (5)	3.0 (3)	5.4 (6)	4.6 (5)	4.1 (4)	5.9 (7) ⁱ	1.0 (2) ^f	4.6 (5) ⁱ	2.0 (2)
methionine	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	1.8 (2)	(1) (0)	0.0 (0)	g (0)	0.0 (0)	0.0 (0)	0.9 (1)
isoleucine	0.0 (0)	3.3 (4) ^h	4.0 (5) ^h	4.1 (4)	1.1 (1)	3.7 (4)	5.3 (6) ⁱ	0.0 (0)	5.5 (6) ⁱ	0.0 (0)
leucine	5.0 (5)	10.1 (10)	7.8 (8)	3.4 (2)	1.0 (1)	5.0 (5)	6.2 (6)	2.0 (2)	6.2 (6)	0.0 (0)
tyrosine	2.0 (2)	3.1 (3)	0.0 (0)	3.3 (4)	2.6 (3)	1.9 (2)	2.0 (2)	1.8 (2)	1.0 (1)	1.0 (1)
phenylalanine	1.2 (1)	1.3 (1)	0.0 (0)	1.9 (2)	0.0 (0)	1.8 (2)	1.0 (1)	0.9 (1)	1.0 (1)	0.0 (0)
histidine	1.0 (1)	1.9 (2)	2.7 (3)	1.9 (2)	0.9 (1)	2.0 (2)	2.1 (2)	0.0 (0)	1.1 (1)	1.0 (0)
lysine	5.1 (5)	7.0 (7)	8.9 (9)	13.9 (15)	15.8 (15)	5.7 (5)	9.9 (10)	1.2 (1)	7.8 (8)	2.1 (2)
arginine	7.8 (8)	11.6 (12)	3.1 (3)	5.1 (5)	2.9 (3)	4.8 (5)	12.1 (12)	2.1 (2)	10.9 (11)	1.2 (1)

^a Results are expressed as numbers of amino acid residues per mole of peptide. No corrections were made for hydrolytic losses. The figures in parentheses are the numbers of residues given by the sequences of calf histones H2A (Yeoman et al., 1972), H2B (Iwai et al., 1972), and H4 (Delange, 1969). ^b Fragment generated by V8 staphylococcal protease hydrolysis. ^c Fragments obtained by cleavage at aspartyl residues. ^d Fragments generated by limited chymotryptic digestion. ^e Fragments obtained by cyanogen bromide cleavage. ^f Low value because of incomplete cleavage of a Val-Val bond during a 24-h hydrolysis. ^g Homoserine was found to be present but was not determined. ^h Low value because of incomplete cleavage of a Ile-Ile bond during a 24-h hydrolysis. ⁱ Low value because of incomplete cleavage of a Val-Ile bond during a 24-h hydrolysis.

Table II: α -Helix Content of Calf Thymus Histones and Histone Fragments from CD Spectra^a

histone fragments	0.01 M sodium phosphate, pH 6.5			0.01 M sodium phosphate-2 M NaCl, pH 6.5		
	θ_{222} (deg)	% α	no. of residues in α helix	θ_{222} (deg)	% α	no. of residues in α helix
H2B (1-59)	-800	2.7	1.6	-1900	6.3	3.7
H2B (1-83)	-4700	15.7	13	-8800	29.3	24.4
H2B (63-125)	-4300	14.3	9.0	-11100	37.0	23.3
H2B (1-125)	-5150	17.2	21.5	-9000	30.0	37.5
H2A (1-56)	-900	3.0	1.7	-4700	15.7	8.8
H2A (1-89)	-5100	17.0	15.1	-6400 ^b	21.3 ^b	19.0 ^b
H2A (73-129)	-3500	11.7	6.7	-5000	16.7	9.5
H2A (1-129)	-6000	20.0	25.8	-8600	28.7	37.0

^a A 100% α -helical ellipticity value of $-30\,000^\circ$ at 222 nm was taken from Chen et al. (1974). ^b Values obtained in 0.01 M sodium phosphate-1.5 M NaCl, pH 6.5.

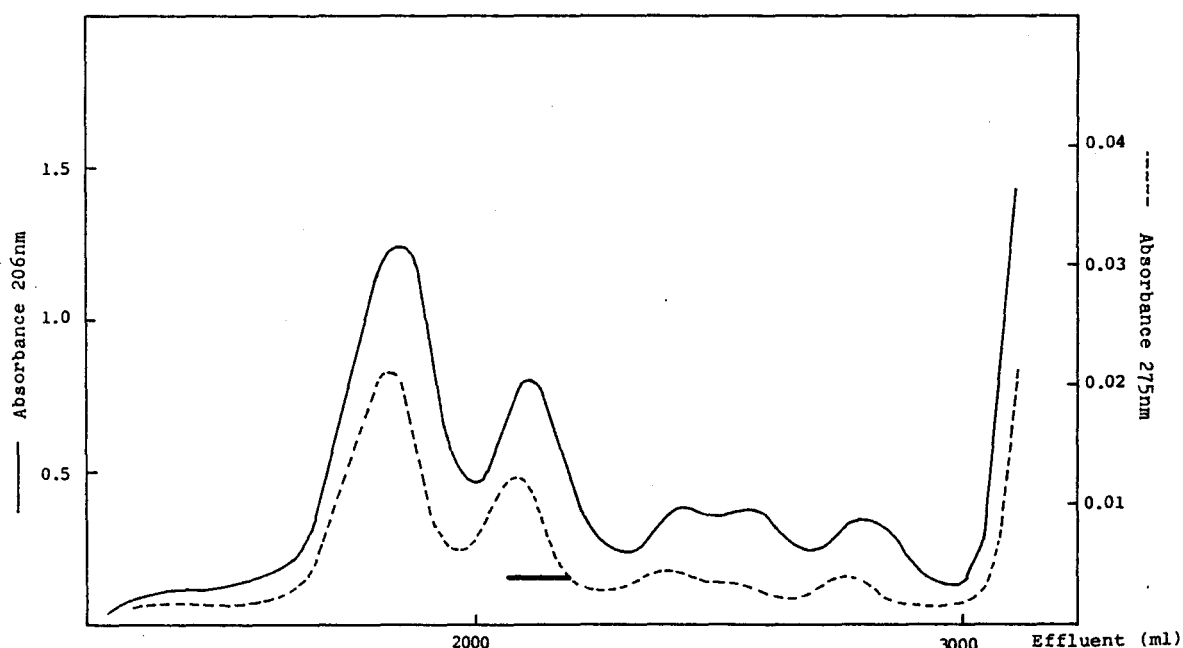


FIGURE 1: Sephadex G-100 chromatography of limited chymotryptic digest of calf histone H2B. The two columns (90 × 5 cm) coupled in series were equilibrated and eluted with 10 mM HCl. The eluate was monitored continuously at both 206 and 275 nm with two LKB Uvicord S (Bromma Sweden) columns coupled in series. The path length of the cell was 2.5 mm. The flow rate was 41 mL/h, and 13.7-mL fractions were collected. The fraction containing fragment 1-83 was pooled according to solid bar.

Table III: Characteristic Absorptions of A- and B-Type Geometries of DNA^a

A-type helix		B-type helix	
pol	cm ⁻¹	cm ⁻¹	pol
⊥	1708	1715	⊥
		1280	⊥
⊥	1240	1220	0
0	1185		
//	1090	1085	⊥
⊥	1055	1050	⊥
//	882		
0	860	835	//
⊥	805		

^a Pol, polarization in case of oriented samples; ⊥, perpendicular; //, parallel; 0, nondichroic.

spectra at different ionic strengths will be presented elsewhere. Data previously published concerning H4 fragments (Crane-Robinson et al., 1977) were used for the discussion of our IR results.

Analysis of the Vibrational Spectroscopy Data. The A and B family geometries of the DNA in the complexes can be easily characterized by infrared spectroscopy by the positions, relative intensities, and polarizations of many absorption bands. Table III summarizes the main differences of the spectra of these two conformations. During the B → A conformation transition, the 1715-cm⁻¹ band, characteristic of the DNA base pairing, is shifted to 1708 cm⁻¹. The nondichroic 1220-cm⁻¹ absorption due mainly to the antisymmetric OPO⁻ stretching vibration becomes perpendicularly polarized and is shifted to 1240 cm⁻¹. The 1280-cm⁻¹ band is no longer observed whereas a new absorption at 1185 cm⁻¹ is present. The strong absorption involving the symmetric stretching of the phosphate groups at 1085 cm⁻¹ is shifted to 1090 cm⁻¹ and becomes parallel polarized instead of perpendicularly. Finally, in the phosphodiester chain vibrations below 1000 cm⁻¹, the 835 cm⁻¹ band is no longer detected, while three absorptions at 882 (strongly parallel), 860 (nondichroic), and 805 cm⁻¹ (strongly perpendicular) are observed.

It is thus possible to identify the geometry of the DNA helix in the nucleoproteic complexes. Moreover, the relative amount of both geometries in the case of the coexistence of the two conformations can be computed by using either the ratio of the integrated absorptions at 835 and 860 cm⁻¹ or the determination of a very sensitive conformational probe, the orientation of the dipole transition moment of the absorption band at 1090 cm⁻¹ with respect to the double helix axis θ_{1090} . Both methods issue similar results. A simple computation allows us then to obtain the number of DNA base pairs stabilized at low relative humidity in a B geometry by each histone fragment [for details, see Liquier et al. (1977)]. This has been systematically obtained for complexes prepared with H2A, H2B, and H4 fragments and exposed to relative humidities (RH) varying between 98 and 47%. The spectra of all the complexes obtained in high relative humidity conditions (RH >81%) show the same characteristic features concerning the DNA absorptions bands: in these nucleoproteins, the DNA adopts at high RH a B family form geometry. An example of such spectra is shown Figure 2 (top) in the case of a complex prepared with the (1-59) fragment of H2B (weight input ratio 1:0.24). In low relative humidity conditions (RH <71%), the spectra of the complexes differ depending on the histone fragment present in the sample. Thus, nucleoproteins reconstituted with N terminal fragments of (1-53) H4, (1-59) H2B, and (1-56) H2A present in these conditions spectra reflecting mainly an A-type geometry of the DNA (Figure 2, bottom).

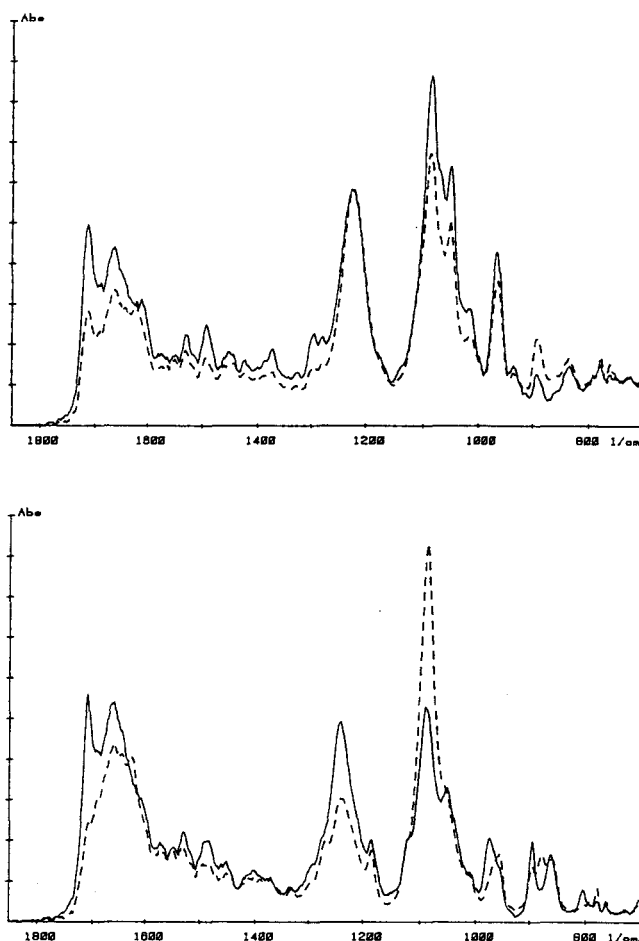


FIGURE 2: Infrared absorption polarized spectra of a DNA-H2B (1-59) complex (N-terminal fragment). Weight input ratio was 1:0.24. (Top) High relative humidity; (bottom) low relative humidity; (full line) electric vector of polarized light perpendicular to the orientation axis; (dotted line) electric vector of polarized light parallel to the orientation axis.

On the contrary, if we consider complexes obtained with histone fragments involving the central part of the protein, 1-67 (H4), 1-84 (H4), 69-84 (H4), 1-83 (H2B), 73-129 (H2A), and 1-89 (H2A), the spectra show the coexistence of the two A and B geometries of the DNA in low RH conditions, the relative amounts of these conformations depending on the DNA to protein input ratio. In Figure 3 are shown the spectra obtained at low relative humidity (RH 58%) in the 750-900-cm⁻¹ region of complexes prepared with various H4 fragments in similar conditions. One can clearly observe that the two A and B geometries are present in the DNA-H4 (1-84) and DNA-H4 (69-84) complexes while almost only the A conformation is detected for the DNA-H4 (85-102) and DNA-H4 (1-53) complexes. The results obtained for the various complexes studied are presented in Table IV. We clearly observe that the different histone fragments have extremely different efficiencies as far as the stabilization of the DNA in a B geometry is concerned.

The infrared spectra of the complexes give us also informations about the protein structure of the histones. The positions and intensities of the amide I (primarily C=O stretch) and amide II (C-N stretch and N-H bend) absorptions allow to interpret the secondary structure of proteins (Chirgadze & Nevskaya, 1970a,b; Nevskaya & Chirgadze, 1976); however, the amide I band at about 1650 cm⁻¹ is obscured in aqueous solutions and hydrated films by the 1640-cm⁻¹ band of liquid water. Besides, in nucleoproteic complexes strong absorptions of DNA are observed in the same spectral

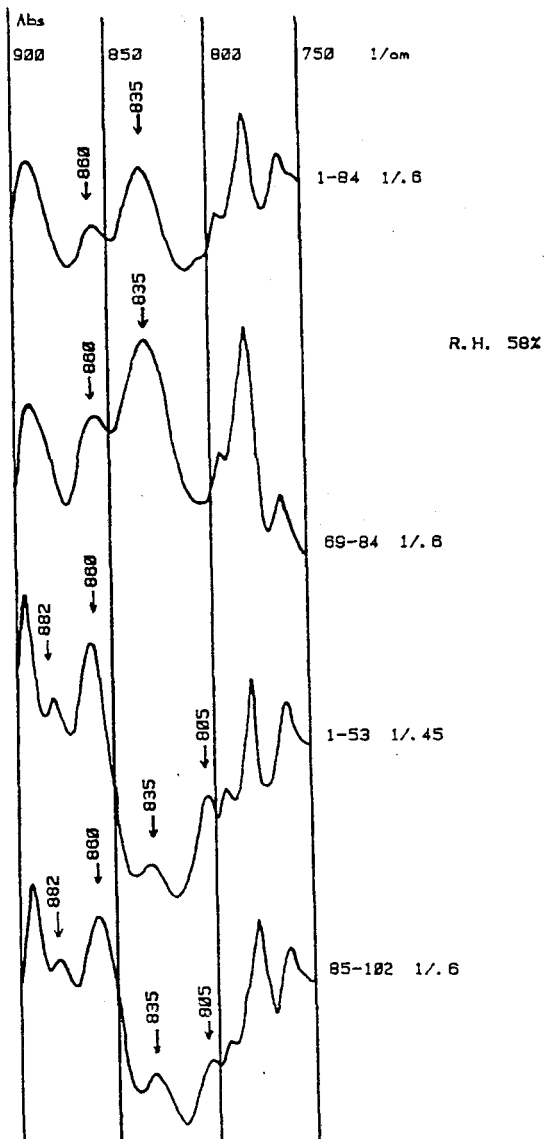


FIGURE 3: Absorption spectra in the phosphodiester chain vibration region of DNA-H4 fragment complexes obtained in low relative humidity conditions. Arrows point out characteristic absorptions of A (882, 860, and 805 cm^{-1}) and B (835 cm^{-1}) geometries.

region. Various efforts to get around this problem have been employed, including the use of D_2O . D_2O solutions pose the additional problem of the hydrogen-deuterium exchange resulting in a change in the intensity of the undeuterated amide II band at the same frequency as the HDO band. We obtain here the spectra of the histone fragments in a hydrated form and in the presence of the DNA in the complex thanks to the computer associated to the spectrophotometer. The nucleoprotein spectra are corrected for the water contribution. The relative amounts of the different DNA geometries present in the sample are then determined by the measurement of the integrated characteristic absorptions located at 835 and 860 cm^{-1} (respectively for a B- and an A-type helix). The spectrum of the DNA present in the nucleoprotein is then computed by using "perfect A and B" memorized data. The DNA spectrum is normalized and subtracted from the spectrum of the complex, leaving the absorptions of the protein. A flat plot obtained between 1300 and 1000 cm^{-1} , where the phosphate groups of the DNA absorb strongly, is a test for the validity of the computation. An example is presented Figure 4 in the case of the DNA-H2A (1-89) complex with a DNA to protein weight input ratio of 1:0.45. We have thus observed the amide

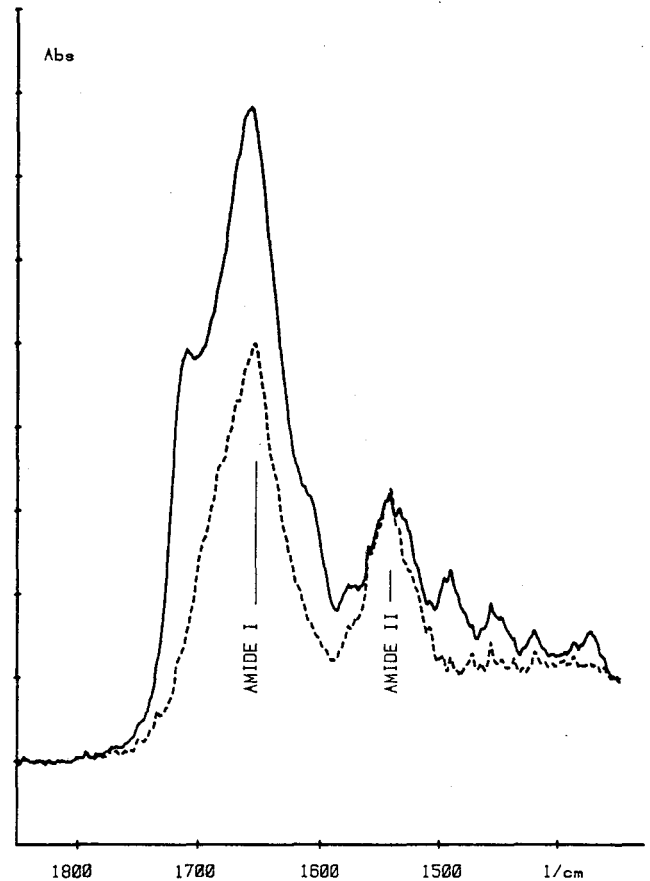


FIGURE 4: Infrared absorption spectrum of a DNA-H2A (1-89) complex. Weight input ratio was 1:0.45. Low relative humidity (66% RH) was used. (Full line) complex; (dotted line) histone in the complex.

I absorption characteristic of an α -helical conformation at 1665 cm^{-1} . Except in the case of extremely high protein to DNA ratio, no absorptions characteristic of β -sheet structure (1680 and 1625-1630 cm^{-1}) were observed.

Discussion

The simultaneous study of the protein structure and of the DNA conformational flexibility in the nucleoprotein complexes gives us an opportunity to determine precisely the important role played by the histone conformation in maintaining the DNA geometry and may serve as a model for structurally important DNA-histone interactions in the nucleosomal core particle. In fact, we shall see that the α -helical parts of the histones interact with the DNA.

It is well established that in native and reconstituted core particles, histones contain a high amount of α -helical structure (about 50%) (Cotter & Lilley, 1977). In the case of DNA-H2A, DNA-H2B, and DNA-H4 complexes, virtually no β -sheet structure can be detected by IR spectroscopy except in the case of DNA to histone ratios higher than 1:0.45. In the latter case, we must however notice that the amount of β -sheet structure is relatively small when compared to the data corresponding to the free histones and their peptides [for example, we find about 10% of β structure in the DNA-H4 complex whereas 27-30% of β structure was measured for free H4 in D_2O (Shestopalov & Chirgadze, 1976)]. This decrease in the amount of β -sheet structure is still more important in the histone belonging to native or reconstituted core particles; in these nucleoproteins almost no β structure was detected in our laboratory, in good agreement with the conclusion of previous studies of chromatin subunits (Cotter & Lilley, 1977). The α -helical and partly random conformation of the histones

Table IV: Stabilization of the DNA B Geometry by Histone Fragments Determined by Infrared Linear Dichroism^a

complex	protein to DNA wt ratio (%)	θ_{1090} at low RH (deg)	no. of base pairs of DNA blocked in B geometry per fragment	complex	protein to DNA wt ratio (%)	θ_{1090} at low RH (deg)	no. of base pairs of DNA blocked in B geometry per fragment
DNA		49		DNA-H2B	12	48	
DNA-H4 (1-53)	25	50		(1-59)	24	49	6
	45	49	0		38	51	
	55	51			50	54	
	60	49		DNA-H2B (1-83)	19	54	
DNA-H4 (1-67)	20	52			33	60	24
	40	54.5	10		52	63	
	60	56.5			67	<i>b</i>	
DNA-H4 (1-84)	15	53		DNA-H2B (1-125)	12	49	
	25	57	18		26	50	24
	30	56			40	56.5	
	60	62		DNA-H2A (1-56)	15	49	
DNA-H4 (1-102)	10	51.5			30	54	
	25	55	22		45	53	5
	35	57			60	53.5	
	45	58		DNA-H2A (1-89)	14	52	
DNA-H4 (69-84)	10	53			31	57	20
	20	55.5	5		44	58.5	
	30	59		DNA-H2A (73-129)	15	51	
	40	62			30	58.5	14
DNA-H4 (85-102)	20	51			45	61	
	40	52	<2		60	62	
	60	54.5		DNA-H2A (1-129)	14	52	
					30	56	
					40	57	21
					50	57	

^a For the computation method, see Liquier et al. (1977). ^b Nondichroic.

in these complexes must therefore have an important structural role in the DNA-histone interactions.

The location of α helices has been theoretically predicted (Lewis & Bradbury, 1974) and experimentally determined by NMR, CD and IR measurements. In the case of H2A, two α -helical segments have been proposed extending from residues 47-66 and 78-88 (Bradbury et al., 1975). For H2B, our CD results in good agreement with previous estimations (Bradbury & al., 1972; d'Anna & Isenberg, 1972) allow one to localize the α -helical structure in the 59-85 region. For H4, the proposed α helices are located between residues 55 and 67 on one hand, and 12 residues forming an α helix are expected in the 70-90 region on the other (Crane-Robinson et al., 1977).

If we consider the results concerning the complexes prepared with the N-terminal fragments of (1-56) H2A, (1-59) H2B, and (1-53) H4, which are almost completely in a random conformation, no stabilization of the DNA in a B geometry is found. The DNA in these nucleoproteins is able to undergo a total B \rightarrow A transition. On the contrary, if an α -helical part of the histone is involved in the histone-DNA interaction, as, for example, in the case of the (1-67) H4 or (73-129) H2A fragment, the DNA is partially blocked in a B geometry. Histone fragments that contain most of the α -helical parts of the corresponding histone have a similar stabilizing effect on the DNA as the whole histone (20 base pairs of DNA blocked by the 1-89 fragment of H2A instead of 21 for the whole H2A molecule, 24 base pairs for the 1-83 fragment of H2B as for H2B, and 18 base pairs for the 1-84 fragment of H4 instead of 22 for H4). Moreover, the C-terminal fragment 85-102 of H4, which does not possess any α -helical structure, remains quite effectless concerning the stabilization of the DNA B form.

Our results show that the structurally important interactions do not imply the N-terminal basic regions of the histones. This is supported by trypsin- and nuclease-digestion experiments showing that the N terminal parts of the histones do not belong

to the kernel of the core particle (Weintraub & Van Lente, 1974) and by the model proposed by Pardon et al. (1977) in which the N-terminal parts of the histones protrude as arms outside of the core particle. More recently, X ray diffraction diagrams of H1-depleted chromatin were interpreted as reflecting the presence of the N-terminal parts of the histones on the spacer DNA (Azorin et al., 1980), and neutron-scattering experiments on nucleosome core particles showed that about 25% of the histones are located outside of the core (Braddock et al., 1981).

The fundamental role of the α -helical structure of the protein is in good agreement with our earlier results concerning native and reconstituted core particles in which no β structure was detected and which showed the suppression of the B \rightarrow A transition of the DNA in the presence of the four histones (Liquier et al., 1979). In native core particles, Shick et al. (1980) have shown that histones are bound to discrete DNA stretches of about six nucleotides long. Thus, H2A has been found to interact at positions 75, 125, and 135 (18 nucleotides), H2B at positions 25, 35, 105, 125, and (partially) 95 (24-30 nucleotides), and H4 at positions 45, 55, and 65 (18 nucleotides). Our infrared results show that the α -helical parts of these histones are responsible for the stabilization in a B form of respectively about 21, 24, and 22 DNA base pairs. It seems thus reasonable to propose that the DNA that has been found as bound to the histones is the DNA interacting with the α -helical parts of the proteins. If we consider the α -helical parts of these histones, we can observe that all the basic residues, lysine and arginine, are clustered on one side of the helix. Thus, we can imagine that an interaction between these residues and the phosphates brings the histone α helix in close contact with the DNA, stabilizes it in a B geometry, and leaves the other side of the protein α helix free for interhistone interactions.

The important role of α -helical protein structures in protein-DNA interactions has recently been proposed in specific

systems. Thus, the DNA binding subunit of CRO protein possesses two α helices with a 2-fold symmetry, which fit precisely into the large groove of a B-DNA structure. Similarly, the CAP protein and the λ repressor both possess α -helical parts with extremely important sequence analogies, which both are supposed to interact with the DNA. Moreover, recent crystallographic studies of CRO-DNA and CAP-DNA cocrystals have shown that the DNA is locally bent by the interaction with these proteins (McKay & Steitz, 1981; Anderson et al., 1981).

It seems thus possible to propose that in the core particle, the histones stabilize the DNA in a B geometry by interactions between the α -helical parts of the proteins and the DNA. These interactions tend to bend the DNA, making it more easy for the DNA to adopt a superhelical conformation; the N-terminal parts of the histone are not implied in this folding mechanism and, though interacting with the DNA by electrostatic interactions, remain outside of the core particle.

Acknowledgments

The skillful technical assistance of M. J. Dupire, T. Ernout, A. Hemez, and M. P. Hildebrand is gratefully acknowledged. We are indebted to Dr. M. H. Loucheux-Lefebvre, who gave us the facilities for CD experiments.

Supplementary Material Available

Five figures showing isolation of the histone fragments (5 pages). Ordering information is given on any current masthead page.

References

- Anderson, W. F., Ohlendorf, D. H., Takeda, Y., & Matthews, B. W. (1981) *Nature (London)* 290, 754.
- Azorin, F., Martinez, A. B., & Subirana, J. A. (1980) *Int. J. Biol. Macromol.* 2, 81-92.
- Bradbury, E. M., Cary, P. D., Crane-Robinson, C., & Riches, P. L. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26, 482.
- Bradbury, E. M., Cary, P. D., Crane-Robinson, C., Rattle, M. W. E., Boublik, M., & Sautiere, P. (1975) *Biochemistry* 14, 1876.
- Braddock, G. W., Baldwin, J. P., & Bradbury, E. M. (1981) *Biopolymers* 20, 327-343.
- Chen, Y. H., Yang, J. T., & Chau, K. H. (1974) *Biochemistry* 13, 3350.
- Chirgadze, Yu. N., & Nevskaya, N. A. (1970a) *Biopolymers* 15, 607-625.
- Chirgadze, Yu. N., & Nevskaya, N. A. (1970b) *Biopolymers* 15, 626-636.
- Cotter, R. I., & Lilley, D. H. (1977) *FEBS Lett.* 82, 63-68.
- Coupez, M., Sautiere, P., Brahmachari, S. K., Brahms, J., Liquier, J., & Taillandier, E. (1980) *Biochemistry* 19, 3358-3363.
- Crane-Robinson, C., Hayashi, H., Cary, P. D., Briand, G., Sautiere, P., Krieger, D., Vidali, G., Lewis, P. N., & Tom Kun, J. (1977) *Eur. J. Biochem.* 79, 535.
- d'Anna, J. A., & Isenberg, I. (1972) *Biochemistry* 11, 4017.
- Felsenfeld, G. (1978) *Nature (London)* 271, 115-122.
- Gross, E., & Witkop, B. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1856-1860.
- Iwai, K., Hayashi, H., & Ishikawa, K. (1972) *J. Biochem. (Tokyo)* 72, 357-367.
- Johns, E. W. (1964) *Biochem. J.* 92, 55-59.
- Johns, E. W. (1967) *Biochem. J.* 105, 611-614.
- Lewis, P. N., & Bradbury, E. M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 336, 153.
- Liquier, J., Taboury, J., Taillandier, E., & Brahms, J. (1977) *Biochemistry* 16, 3262-3266.
- Liquier, J., Gadenne, M. C., Taillandier, E., Defer, N., Favatier, F., & Kruh, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* 6, 1479-1493.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- McKay, D. B., & Steitz, T. A. (1981) *Nature (London)* 30, 744.
- Michalski-Scrive, C., Aubert, J. P., Coupez, M., Biserte, G., & Loucheux-Lefebvre, M. H. (1982) *Biochimie* 64, 347-355.
- Nevskaya, N. A., & Chirgadze, Yu. N. (1976) *Biopolymers* 15, 637-648.
- Panyim, S., & Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 337-346.
- Pardon, J. F., Worcester, D. L., Wooley, J. C., Cotter, R. I., Lilley, D. M. J., & Richards, B. M. (1977) *Nucleic Acids Res.* 4, 3199-3214.
- Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormick, J., & Jones, R. T. (1963) *Biochemistry* 2, 992-1008.
- Shestopalov, B. V., & Chirgadze, Yu. N. (1976) *Eur. J. Biochem.* 67, 123-128.
- Shick, V. V., Belyavsky, A. V., Bavykin, S. G., & Mirzabekov, A. D. (1980) *J. Mol. Biol.* 139, 491-517.
- Taillandier, E., Taboury, J., Liquier, J., Gadenne, M. C., Champagne, M., & Brahms, J. (1979) *Biopolymers* 18, 1877-1888.
- Weintraub, H., & Van Lente, F. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 4249-4253.
- Weisbrod, S. (1982) *Nature (London)* 297, 289-295.

VII - 3. DISCUSSION : IMPORTANCE DES ZONES EN HÉLICE

La spectrométrie RAMAN effectuée avec un rapport protéine/ADN de 0,7 (exprimé en masse) a permis de localiser l'interaction du peptide 1-53 (H4) avec l'ADN dans le petit sillon. Cette interaction ressemble à l'interaction des histones dans le nucléosome.

CARY *et al.* (1982) qui ont examiné par RMN la fixation des peptides 4-17, 1-23 et 1-37 (H4) à l'ADN évoquent la possibilité d'un attachement de ces peptides par les chaînes latérales des résidus de lysine et surtout d'arginine, aux groupements phosphates de l'ADN. Les interactions entre ces peptides et les bases de l'ADN se feraient selon ces auteurs dans l'un ou l'autre des sillons par liaisons hydrogène avec les -C-N- de la chaîne peptidique. Cette fixation, d'après notre travail, aurait lieu ainsi dans le petit sillon. Cette possibilité s'accorde avec le fait que l'extrémité N-terminale de l'histone H4 contient surtout des résidus peu volumineux (8 résidus de glycine dans les 14 premiers résidus).

Par diffraction des rayons X, WACHTEL et SPERLING (1983) localisent l'interaction, peptide 1-53 (H4)-ADN en fibres, au niveau de la chaîne désoxyribose-phosphate, du côté du grand sillon. Il faut noter que ces auteurs ont utilisé un rapport protéine/ADN de 0,4 (exprimé en masse). Lorsque nous utilisons un rapport de 0,4 au lieu de 0,2 nous obtenons une fixation du peptide dans le petit sillon, mais aussi dans le grand sillon ce qui concilie en partie, les résultats de WACHTEL et SPERLING avec les nôtres.

MIRZABEKOV *et al.* (1977) n'obtiennent pas avec les histones entières de protection du petit sillon contre la méthylation chimique des bases de l'ADN, tandis que dans le grand sillon il y a 14 % de masquage. De nombreux travaux mettent toutefois en évidence une protection du petit sillon. Par exemple, MOYER et RAMSAY-SHAW (1990) utilisent un agent alkylant spécifique de l'atome d'azote N3 de l'adénine. Dans une expérience de compétition contenant des quantités égales d'ADN libre et d'ADN nucléosomique, 90 % de l'agent alkylant se fixe à l'ADN libre.

Ainsi nos résultats en spectrométrie RAMAN concernant une fixation dans le petit sillon pourraient s'appliquer soit à tout le peptide 1-53 soit seulement aux vingt-cinq résidus N-terminaux de l'histone (zone riche en résidus de glycine). Nous serons prudent en ce qui concerne la seconde moitié du fragment : nous verrons plus loin que la structure secondaire

de la région 25-53, dans le peptide, nous semble différente de la structure qui existe dans l'histone entière.

L'autre volet de ce travail a trait aux zones d'histones actives dans la stabilisation de l'ADN en forme B. D'un point de vue chronologique cette recherche a d'abord été effectuée avec des peptides de l'histone H4 (publications 4 et 5) puis avec des peptides provenant des histones H2A et H2B (publication 6). La présence de deux résidus de cystéine dans l'histone H3 semble avoir empêché l'étude en spectropie I. R. des peptides de cette histone, par ailleurs très efficace dans le maintien en forme B.

La stabilisation en forme B correspond dans tous les cas à la présence d'au moins une zone en hélice dans le peptide. Nous nous garderons d'une interprétation trop simple. Ainsi le fait que le peptide 1-83 (H2B) stabilise l'ADN en forme B, et que le peptide 1-59 (H2B) lui ne stabilise pas la forme B, ne signifie pas nécessairement que dans le peptide 1-83 la zone responsable du maintien de la forme B est la région 60-83. Les spectres en dichroïsme circulaire obtenus sur les grands fragments (chapitre VI) nous ont montré qu'il existe dans la protéine entière une hélice située aux environs des résidus 40. Cette zone qui ne s'enroule pas en hélice dans le peptide 1-59 semble le faire dans le peptide 1-83. Le même raisonnement peut être tenu pour les fragments 1-89 et 1-56 de l'histone H2A.

Dans le cas de l'histone H4 nous n'avons pas fait les spectres en dichroïsme circulaire des grands peptides 20-102 et 40-102 que nous a fournis l'hydrolyse limitée par la trypsine (publication 9). Nous pensons néanmoins qu'il existe une analogie de structure et de comportement entre les quatre histones : ainsi, le peptide 1-50 de l'histone H3 (travail non exposé) ne possède pas plus de structure que ses homologues 1-56 (H2A) 1-59 (H2B) et 1-53 (H4). La comparaison des structures prédites pour chaque histone plaide aussi pour cette similitude.

Nous avons utilisés les méthodes de CHOU et FASMAN (CHOU et FASMAN, 1978 ; FASMAN *et al.*, 1976) de GARNIER *et al.* (1978) (prédictions obtenues à l'aide d'un programme écrit par Frédéric CHIRAT) de LIM (1978) et de LEVIN et GARNIER (1988).

La dernière méthode citée qui repose sur l'hypothèse que des séquences homologues en acides aminés ont une tendance à avoir la même structure, a fourni les prévisions les plus

en accord à la fois avec nos spectres de D. C. et les données de la littérature. Pour sa mise en œuvre, une fenêtre de 17 résidus d'acides aminés est déplacée d'un résidu à la fois le long de la séquence à étudier. L'ordinateur recherche dans une banque de données (67 protéines dont la structure spatiale a été résolue par rayons X) toutes les séquences homologues de ces segments de 17 résidus. Lorsqu'une séquence homologue est trouvée, sa structure secondaire est notée. La structure retenue et indiquée pour l'acide aminé central de la fenêtre, sera celle rencontrée le plus grand nombre de fois.

Les prédictions obtenues par la méthode de LEVIN et GARNIER sont seules présentées figure VII. 1, elles constituent une approximation de la structure des histones isolées, en solution dans un milieu de force ionique physiologique.

La structure des quatre histones du noyau du nucléosome, ensembles et à haute force ionique nous est fournie par ARENTS *et al.* (1991) (figure VII. 2) elle est en accord avec nos spectres de D. C. réalisés en milieu NaCl, 2 M (chapitre VI).

Les régions des histones susceptibles de former des hélices sont souvent caractérisées par des résidus basiques situés à des positions i , $i + 3-4$, $i + 7$, c'est à dire situés à des intervalles d'un tour ou de deux tours d'hélice (par exemple dans le segment 72-99 de l'histone H2B). L'existence de doublets basiques dans ce genre de séquences renforcerait l'interaction avec l'ADN. Dans beaucoup de cas on aurait affaire à une hélice amphipathique. TURNELL *et al.* (1988) proposent un mécanisme de liaison protéine-ADN s'appliquant à la région 32-41 de l'histone H4. Trois ou quatre résidus basiques situés sur une face de l'hélice interagiraient avec deux phosphates adjacents de l'ADN d'un brin et avec deux phosphates adjacents sur l'autre brin, ceci à travers le petit sillon, formant ainsi une structure en forme de cage. Un tel système pourrait empêcher le petit sillon de s'élargir et donc la transition B→A.

Parmi les résidus qui composent la face hydrophile de nos hélices, les résidus de lysine, d'arginine et de tyrosine ont attiré l'attention des investigateurs.

LAMBERT et THOMAS (1986) (voir aussi II. 2. 1. ci-dessus) marquent par méthylation suivie d'une réduction les lysines protégées par l'ADN dans le nucléosome. Ils identifient une partie de celles-ci : elles se trouvent soit dans des zones particulièrement basiques, telle que la région 27-34 (H2B), soit dans des zones susceptibles d'être en hélice :

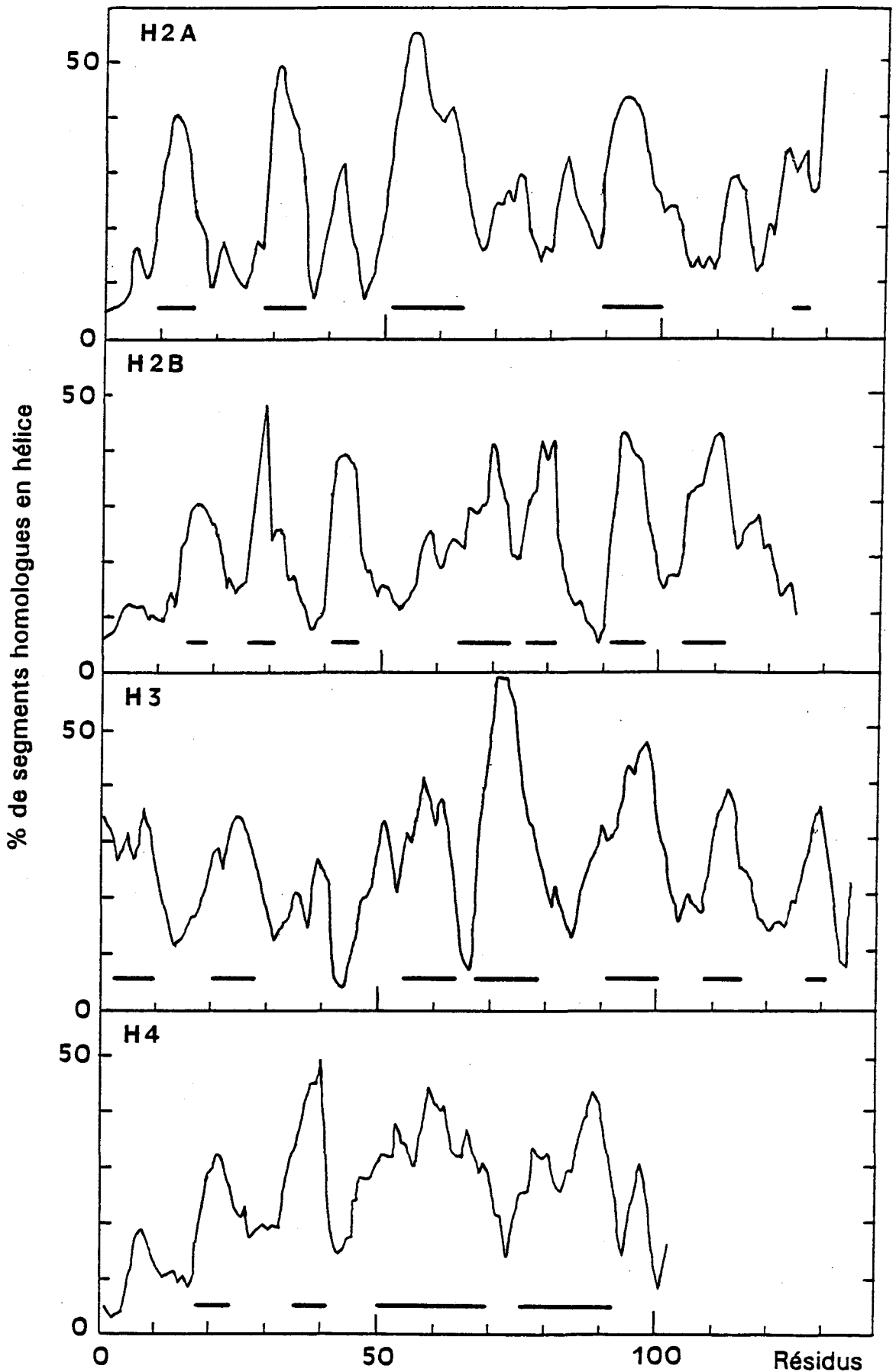


Figure VII. 1 : Prédications de la structure secondaire des histones H2A, H2B, H3 et H4 obtenues avec la méthode de LEVIN et GARNIER, 1988.

Abscisse : position dans la séquence

Ordonnée : pourcentage de segments en hélice parmi les segments homologues trouvés dans la banque de données.

Barres horizontales : zones prédites en hélice.

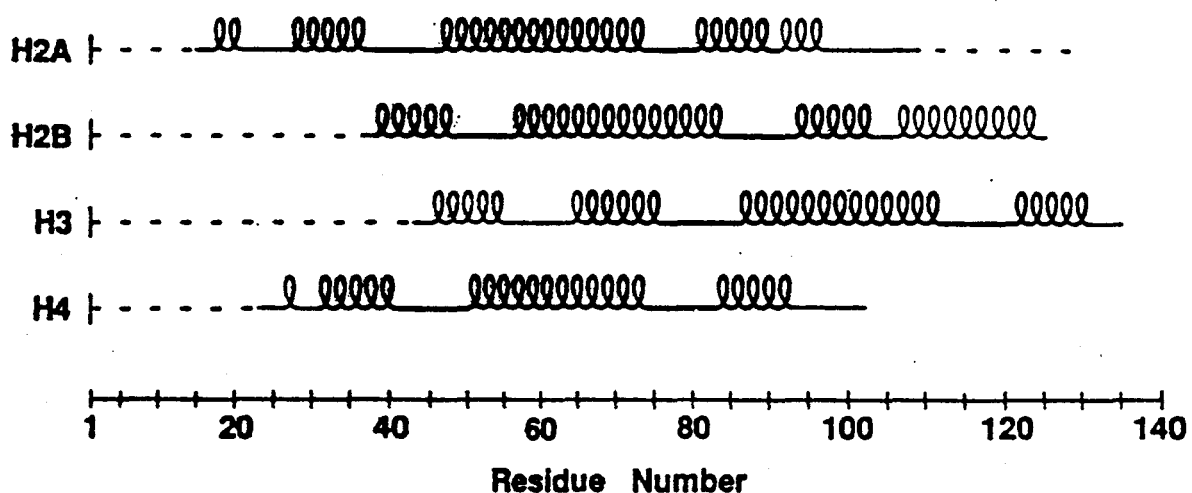


Figure VII. 2 : Structure des histones H2A, H2B, H3 et H4 dans l'octamère, cristallisé avec une force ionique de 5 M en $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (ARENTS et al., 1991).

Spires : hélices α .

Traits droits: zones non structurées.

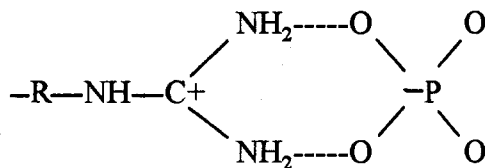
Traits épais : zones impliquées dans les interactions histone-histone.

Traits fins : zones non impliquées dans les interactions histone-histone.

Traits pointillés : zones non vues.

72-77 (H2A), 117-128 (H3), 79-92 (H4). Il faut noter que ce travail fournit assez peu de renseignements sur les zones structurées. En effet nombre de peptides hydrophobes (ce caractère a été renforcé par la méthylation) n'ont pas été récupérés.

Un petit nombre de résidus d'arginine (<14) seraient fortement liés aux phosphates de l'ADN, ils joueraient un rôle essentiel dans la structure du nucléosome (ICHIMURA *et al.*, 1982). Le groupement guanidinium des résidus d'arginine pourrait former une structure en cercle avec un phosphate :



Tous les atomes du groupement guanidinium se trouvent dans un même plan, ce groupement peut former jusque cinq liaisons hydrogène (donneur). Il est ainsi capable de se lier à deux phosphates adjacents sur une chaîne d'ADN, et même, peut-être, à deux phosphates appartenant à chacune des deux chaînes (au niveau de la surface du noyau protéique le petit sillon peut n'avoir que 7 Å de large).

Douze résidus de tyrosine : 37, 40, 42 et 121 (H2B) et 41 et 54 (H3) - deux fois - sont localisés à la surface du noyau protéique et sont capables d'interagir avec l'ADN par liaisons hydrogène avec les phosphates ou les atomes d'azote du cycle des bases (ZWEIDLER, 1992).

Les hélices par elles-mêmes doivent aussi être impliquées dans les liaisons avec l'ADN. Le dipôle d'hélice correspond approximativement à 0,5-0,75 charge positive au niveau de l'extrémité N-terminale et à 0,5-0,75 charge négative au niveau de l'extrémité C-terminale (HOL *et al.*, 1978 ; HOL, 1985). Le champ électrique à l'interface extrémité de l'hélice-solvant pourrait être important (LOCKHART et KIM, 1992). L'extrémité N-terminale interagirait avec l'ADN. En fait, la formation d'une hélice protéique et l'interaction avec l'ADN seraient deux phénomènes liés. L'approche de la chaîne désoxyribose-phosphate par une zone d'histone correspondant à l'extrémité d'une hélice potentielle, provoquerait la mise en hélice de cette portion de la protéine. La formation de l'hélice induirait le dipôle et sa portion de charge positive près de l'extrémité N-terminale ; celle-ci fixerait en retour l'ADN.

Deux types d'arguments appuient cette façon de voir :

- la formation du nucléosome est un phénomène dynamique, qui dans le tube à essai entraîne à peu près le doublement du nombre de résidus en hélice.
- dans l'octamère d'histones, cristallisé à haute force ionique, sur les 32 hélices α , 28 pointent leur extrémité N-terminale vers la surface de la crête protéique, supposée en contact avec l'ADN (ARENTS et MOUDRIANAKIS, 1993) (figure VII. 3).

La stabilisation de l'ADN en forme B n'est pas due à un acide aminé donné, même très basique, se trouvant dans une hélice quelconque. Ainsi ni la polylysine ni la polyarginine n'ont cette propriété, ni même le cytochrome c qui est pourtant une protéine basique avec beaucoup de structure hélicoïdale. Cette stabilisation dépend d'un environnement bien particulier, qui conditionne d'ailleurs aussi la structure secondaire et qui semble être une propriété spécifique des histones H2A, H2B, H3 et H4 prises individuellement ou dans leur ensemble.

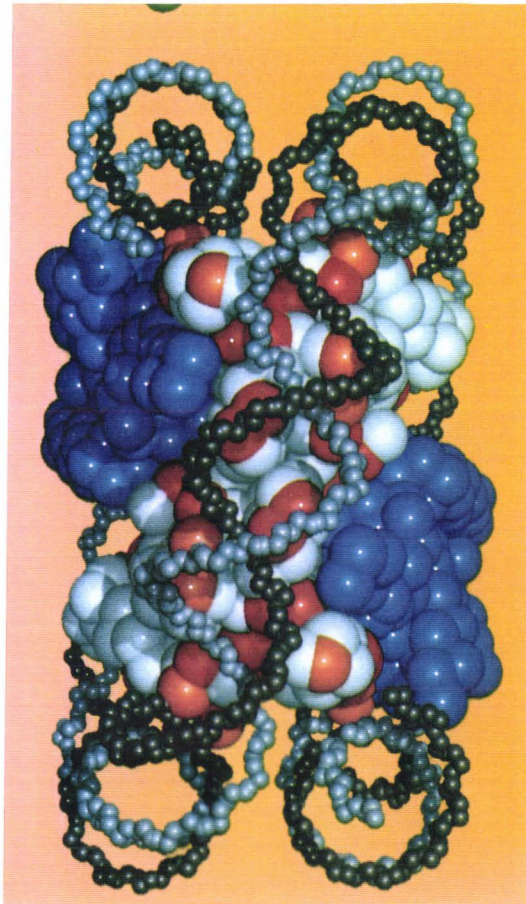


Figure VII. 3 : Coïncidence entre charges positives des histones et ADN. Le tétramère H3-H4 est en blanc, les dimères H2A-H2B sont en bleu. Les atomes de carbone α des lysines et des arginines de la surface cylindrique de l'octamère sont en rouge. Les atomes indiquant les positions des dipôles positifs des extrémités d'hélices sont en orange. Les atomes du squelette de l'ADN ont leur diamètre réduit pour permettre de voir la surface protéique (ARENIS et MOUDRIANAKIS, 1993 ; vue reprise de "Journal of Biomolecular Structure & Dynamics" Vol. 11, n° 4, couverture)

Chapitre VIII : Contribution à l'étude de l'acétylation des histones H3 et H4.

VIII - 1. INTRODUCTION

Le travail présenté dans ce chapitre repose sur deux méthodes de chromatographie, à grande échelle, de séparation des histones selon leur degré d'acétylation. La première méthode (publication 7) est issue des multiples essais de purification de l'histone H2A que nous avons effectués. Les complexes H3-H4 de degrés d'acétylation différents obtenus se sont révélés aptes à la reconstitution de "core particles" (publication 8). Ce fait est important, les histones extraites en milieu acide ont souvent été considérées comme irrémédiablement dénaturées. Nous avons largement utilisé les solutions acides pour la préparation des histones. Il est évident pour nous que la qualité et la pureté des protéines obtenues dépend de paramètres variés, souvent non signalés dans les publications : JOHNS, (1977) écrit au sujet des précipitations différentielles des histones que dans certains cas au rang de ces paramètres "certains suspectent même les phases de la lune".

Quant aux histones extraites par les méthodes salines, elles sont tenues, pour avoir conservé une "structure native". Les méthodes salines bouleversent beaucoup moins la structure spatiale si on arrête le fractionnement au stade des complexes H2A-H2B et H3-H4. La méthode de VAN DER WESTHUYZEN et VON HOLT (1971) - méthode saline d'extraction des histones en grande quantité - fournit des complexes bien aptes aux études biophysiques. Néanmoins aucune mention n'est faite dans la littérature concernant la reconstitution avec succès de nucléosomes à partir de ce matériel, en dépit des essais effectués. Nous pensons que l'explication pourrait être l'action des ions bisulfite et sulfite sur les acides aminés soufrés : sulfitolyse des ponts disulfure, oxydation de la méthionine en méthionine sulfoxyde lorsque l'air est présent (voir : YANG, 1970). En tous cas, la séparation chromatographique des histones H2B et H3 en milieu acétate plus bisulfite de

sodium, a conduit au laboratoire à une histone H2B ne se complexant pas à l'histone H2A et résistant à la coupure au bromure de cyanogène, ce qui correspond à une oxydation des méthionines (Catherine MICHALSKI-SCRIVE, résultats non publiés).

Nous nous sommes par la suite efforcés d'éviter l'emploi du bisulfite tout en préservant les méthionines de l'oxydation. Nous avons pour ce faire largement utilisé le 2-mercaptoéthanol, celui-ci pouvant être avantageusement remplacé par le dithiothreitol (ou le dithioerythritol) à une concentration beaucoup plus faible (1 mM au lieu de 100 mM) concentration permettant le repérage des protéines dans l'éluat des colonnes par simple lecture dans l'ultraviolet. L'utilisation d'un milieu réducteur lors de la chromatographie sur Biorex de mélange d'histones H3 et H4 a entraîné l'élution successive des complexes H3-H4 dans l'ordre décroissant de leur degré d'acétylation (publication 7). Ces complexes ont permis la reconstitution de "core particles" contenant soit des histones H3 et H4 acétylées soit des histones H3 et H4 non acétylées (publication 8).

La deuxième méthode de séparation des histones selon leur degré d'acétylation qui a été utilisée (exposée dans la publication 9) est dérivée de notre système de séparation des histones H2A et H2B par chromatographie d'échange d'ions sur SP Sephadex, exposée chapitre IV. L'introduction d'urée (6M) dans le milieu amène une élution dans le gradient des histones H3 et H4 et la séparation des histones selon le degré d'acétylation (le pH acide utilisé permet l'utilisation d'urée sans risque de carbamylation des lysines). Avec ces dernières conditions les cinq histones ne sont pratiquement plus séparées l'une de l'autre et doivent être chromatographiées une à une. La présence d'urée perturbe les liaisons hydrogène entre les groupements ionisés des résidus lysine ou arginine d'une part et les groupements sulfonate du gel d'autre part, ce qui a pour effet de supprimer l'élution des histones selon leur contenu relatif en lysines et en arginines ; l'urée (qui dissocie aussi les liaisons hydrophobes) empêche en plus la formation de polymères. Chaque histone est éluee essentiellement selon sa charge. A pH 2 celle-ci correspond au nombre de résidus basiques ; les résidus acide aspartique, acide glutamique, et les phosphates des résidus serine et thréonine phosphorylés ont eux une ionisation négligeable. L'acétylation d'une ou plusieurs lysines qui supprime une ou plusieurs charges positives provoque l'élution de l'histone à une force ionique plus faible dans un ou plusieurs pics bien séparés (figure 1 de la publication 9)

ceci pour l'histone H4. Dans le cas de l'histone H3 (résultats non exposés) le profil d'élution semble correspondre à l'addition de deux diagrammes, l'un pourrait correspondre à H3.1, l'autre à H3.2 et à H3.3. Dans ce qui suit, cette technique de chromatographie ne concernera que l'histone H4.

La présence dans le laboratoire d'une équipe engagée dans l'étude des protéines nucléaires associées à la spermatogenèse chez les invertébrés marins nous a permis d'effectuer une étude comparative des sites d'acétylation dans des processus très différents : acétylation liée à la transcription et à la réplication dans l'histone de thymus de veau ; acétylation impliquée dans le départ des histones lors de la spermiogenèse dans le testicule de seiche. Pendant le même temps l'immunogénéité des fractions d'histones H4, acétylées ou non, étaient mesurée dans le laboratoire de M. H. V. VANREGENMORTEL à Strasbourg (publication 10).

VIII - 2. SÉPARATION DES HISTONES SELON LEUR DEGRÉ D'ACÉTYLATION. INFLUENCE DE L'ACÉTYLATION SUR LA STRUCTURE DE LA "CORE PARTICLE". UTILISATION NON QUELCONQUE DES SITES D'ACÉTYLATION. IMMUNOGÉNÉICITÉ DE L'HISTONE H4 ACÉTYLÉE.

Publications 7 - 10

Successive Elution by Ion-Exchange Chromatography of H3–H4 Histone Complexes Differing in Their Degree of Acetylation

Maurice Couppez*^{†1} and Denise Belaïche*[‡]

**Institut de Recherches sur le Cancer and †Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine; and ‡CJF 92-03 INSERM, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France*

Received September 8, 1995

On Biorex 70 ion exchanger at neutral pH the histones H3 and H4 are usually eluted by 4 M guanidinium chloride (gdm Cl). In order to protect cysteines and methionines from oxidation we systematically added 2-mercaptoethanol to the elution buffer. This resulted in the two histones being unexpectedly eluted together at around 1 M gdm Cl. The use of a shallower gradient resulted in a division in the peak of histones, with the acetylated species of H3 and H4 being eluted first and the nonacetylated species of H3 and H4 eluted last. When histone H3 or histone H4 was applied alone or when the chromatography was performed at low pH, these histones were eluted in the usual position at about 4 M gdm Cl. These events mean that the simultaneous elution of the histones H3 and H4 at about 1 M gdm Cl involves the formation of H3–H4 complexes. Therefore, the H3–H4 complex may be obtained by ion-exchange chromatography as the H2A–H2B complex was previously; furthermore, the former was fractionated according to postsynthetic modifications. This finding provides a new basis for explaining some of the previous elution profiles of chromatin extracts.

© 1996 Academic Press, Inc.

Key Words: histones; complexes; acetylation; post-synthetic modifications; ion exchange chromatography.

In eukaryotic cells, DNA is packaged in nucleosomes (for a recent review, see 1). These subunits consist of about 200 bp of DNA wrapped in two turns around an octamer of proteins: the core histones (2) and one other protein, the linker histone, which binds to the DNA

outside. In 2 M NaCl solution these three constituents can be separated from one another; when the ionic strength of the fraction containing the octamer is reduced it dissociates into two H2A–H2B histone dimers and one (H3–H4)₂ histone tetramer (3, 4).

The crystal structures of the nucleosome core particle (146 bp of DNA looping around the octamer) and that of the octamer alone have been resolved at 7.0 and 3.1 Å, respectively (5, 6). Contrary to previous reports (7), it appears today that the arrangement of the octamer of histones in solution is similar to that of the proteic core in the nucleosome. This observation supports the continuation of studies of histone complexes, because they constitute the level of organization directly below that of the octamer.

The structure and the biological significance and function of the dimer and tetramer as a unit are not yet well understood. These histone complexes could be the biological forms of histones when they do not interact with DNA, as occurs from the time of their biosynthesis in the cytosol to their fixation on DNA in the nucleus. At the replication site, nucleosome core particles seem to be assembled in two steps: (H3–H4)₂ is deposited first followed by H2A–H2B dimers (8, 9); the reverse order may occur upstream of the replication fork (10–12). On the other hand free complexes might also appear in transcription, during which the nucleosome could lose one or two H2A–H2B dimers (11, 13, reviewed in 14). These straightforward views do not rule out the existence of more elaborate systems involving specialized proteins (reviewed in 15) or other types of reshaping or opening of the nucleosomal structure in replication, repair, and transcription (16–23). These dynamic behaviors are directed in part by interactions between histones.

The H2A–H2B complex was first discovered by ion-exchange chromatography on Amberlite IRC 50 from

¹ To whom correspondence should be addressed at Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France. Fax: 33.20.62.68.68.

acid-extracted histones (24). Gel filtration chromatography of salt-extracted histones (25) followed by cross-linking (3) provided confirmation of the occurrence of heterodimer H2A–H2B and established in addition that histones H3 and H4 form a heterotetramer. In this paper we show that the separation, by chromatography on Biorex 70 (an analogue of Amberlite CG 50 and IRC 50) in reductive medium, of histones H3 and H4 differing in their acetylation degrees, histones that we used to prepare octamer (26) or core particle (27), corresponds to the formation of privileged interactions between these histones. The necessary conditions for elution of histones H3 and H4 at around 1 M guanidinium chloride (gdm Cl),² and for their separation in acetylated and nonacetylated states, were defined by varying the chromatographic parameters such as gradient slope, sample composition, and temperature. This work provides an explanation for the unusual chromatographic behavior of certain plant histones H3 and H4 during ion-exchange chromatography (28–30).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of histones. Calf thymus deoxyribonucleoprotein was recovered as an insoluble material after extraction from cells with dilute saline solutions in the presence of 0.1 mM diisopropylfluorophosphate according to the method of Busch (31).

Whole histone was extracted with 0.25 M HCl, dialyzed against water, and freeze-dried.

A mixture of H2A, H3, and H4 was obtained after extraction of the deoxyribonucleoprotein with ethanol/water (3/1, v/v) containing gdm Cl (10%, w/v) (32) followed by addition at pH 7.0 and at -20°C of 1.5 volumes of acetone; 1.25 or 1.5 volumes of acetone was used instead of 1 volume as indicated in the original method, in order to completely precipitate histone H2A and to recover pure histone H4 after the later addition of acetone.

Selective extractions were also performed by method 2 of Johns (33, 34). However, fractionation of the ethanol–HCl extract was not carried out by dialysis against ethanol but by addition of acetone. To the ethanol–HCl fraction (1000 ml starting from 150 g of thymus) was added successively 0.7 (700 ml), 0.3 (300 ml), 0.5 (500 ml), and 3.5 volumes (3500 ml) of acetone. After each addition of acetone the mixture was left to settle at -20°C for 1 to 3 days and the precipitate was then removed by centrifugation at 3000g for 1 h, dissolved in 0.01 M HCl, dialyzed against water, and freeze-dried. Histone H3, the major component of the fraction precipitated by 0.7 volume of acetone, was isolated from this fraction by exclusion chromatography. Routinely, 120 mg of protein was dissolved in 6 ml of 6 M gdm Cl, 0.7 M 2-mercaptoethanol, 0.1 M Tris, pH 8.1; left overnight at room temperature; and applied to a $5 \times 150\text{-cm}$ Bio-Gel P10 (200–400 mesh) column equilibrated and eluted at a flow rate of 50 ml/h with 0.01 M HCl saturated in chloroform. Protein concentration was monitored at 205 nm with an UVICORD S (Pharmacia LKB). Fractions containing histone H3 were pooled and lyophilized. Pure histone H2A, used in this work as a marker in electrophoresis, was obtained by ion-exchange chromatography from the fraction precipitated at the 1.5 volumes of acetone step, where it is the major component. As an alternative to the method using ethanol–gdm Cl extract indicated above, histone H4 was obtained from the fraction precipi-

tated at the addition of 3.5 volumes of acetone step. This fraction, in which H4 is the major component, was dissolved in ethanol–gdm Cl mixture (34), impurities were precipitated by adding 1.25 volumes of acetone, then pure H4 was recovered from the supernatant by adding 1.75 volumes of acetone.

Histone H4 from cuttlefish testis was obtained as in (35).

Biorex ion-exchange chromatography. Chromatography was performed in the presence of 2-mercaptoethanol as in (29). Histones were dissolved in 4 M gdm Cl, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8, at 10 mg protein/ml and left overnight at room temperature. The gdm Cl concentration was then reduced by dialysis to the starting conditions of the chromatography, and the protein solution was applied to the Biorex 70 (200–400 mesh) column equilibrated in about 0.75 M gdm Cl (precise conditions are indicated in figure legends). The column was eluted with a linear gradient of gdm Cl followed by 4 M gdm Cl. All these gdm Cl solutions contained 0.1 M 2-mercaptoethanol and were buffered to pH 6.8 with 0.1 M sodium phosphate. The concentration of gdm Cl in the eluate was determined by refractometry. Protein was assayed in 0.1- to 0.2-ml aliquots taken from the eluate by measurement of the turbidity at 400 nm after addition of 11 volumes of 1.2 M trichloroacetic acid. Fractions containing histones were dialyzed exhaustively against water and lyophilized.

Separation of H3 and H4 from each other. The fractionations of the H3–H4 complexes obtained by Biorex 70 were performed on a Bio-Gel P10 column ($2.6 \times 180\text{ cm}$) as indicated above for purification of histone H3.

Characterization of proteins. Seventeen percent polyacrylamide acid urea gel electrophoresis was performed by the method of Panyim and Chalkley (36) using 2.5 M urea, 0.9 M acetic acid, pH 2.7. Samples were dissolved in 0.01 M HCl, 6 M urea, 0.5 M 2-mercaptoethanol and stored overnight at room temperature to ensure maximum dissociation of histones. Gels were stained for 15 h with 0.5% Coomassie blue R in acetic acid:ethanol:water (1:2:7) and destained for 24 h in the same mixture. Acetylated and nonacetylated histone H3 were sequenced on a Beckman 890 C liquid-phase sequencer in the presence of polybrene with 0.33 M quadrol as coupling buffer. The phenylthiohydantoin (PTH) derivatives of amino acids were identified and quantified as described by Hermann *et al.* (37). PTH of ϵ -N-acetylysine that is not commercially available was prepared by carrying out a single sequencing cycle on ϵ -N-acetylysine manually.

RESULTS

Evidence for the simultaneous elution of calf thymus histones H3 and H4 at about 1 M gdm Cl on Biorex chromatography in reductive medium. The elution profile of a mixture of histones H2A, H3, and H4 chromatographed on Biorex 70 in the presence of 2-mercaptoethanol is shown in Figs. 1A and 1B. In Fig. 1A three major histone fractions are observed, fractions 1 and 2, which are eluted in the gradient, and fraction 3, eluted by the 4 M gdm Cl step. Fraction 1 is H2A, fractions 2 and 3 each contain the two histones H3 and H4. Fractions 1 and 3 correspond to the normal positions of H2A and of H3 and H4, respectively (38–40). Fraction 2 is unusual, particularly for animal histones.

Separation of H3–H4 according to their degree of acetylation. Figure 1B corresponds to an experiment similar to that in Fig. 1A, but the elution was developed with a shallower gradient. Fractions 6 and 7 correspond to the subfractionation of fraction 2 in Fig. 1A.

² Abbreviations used: gdm Cl, guanidinium chloride; PTH, phenylthiohydantoin derivatives of amino acids.

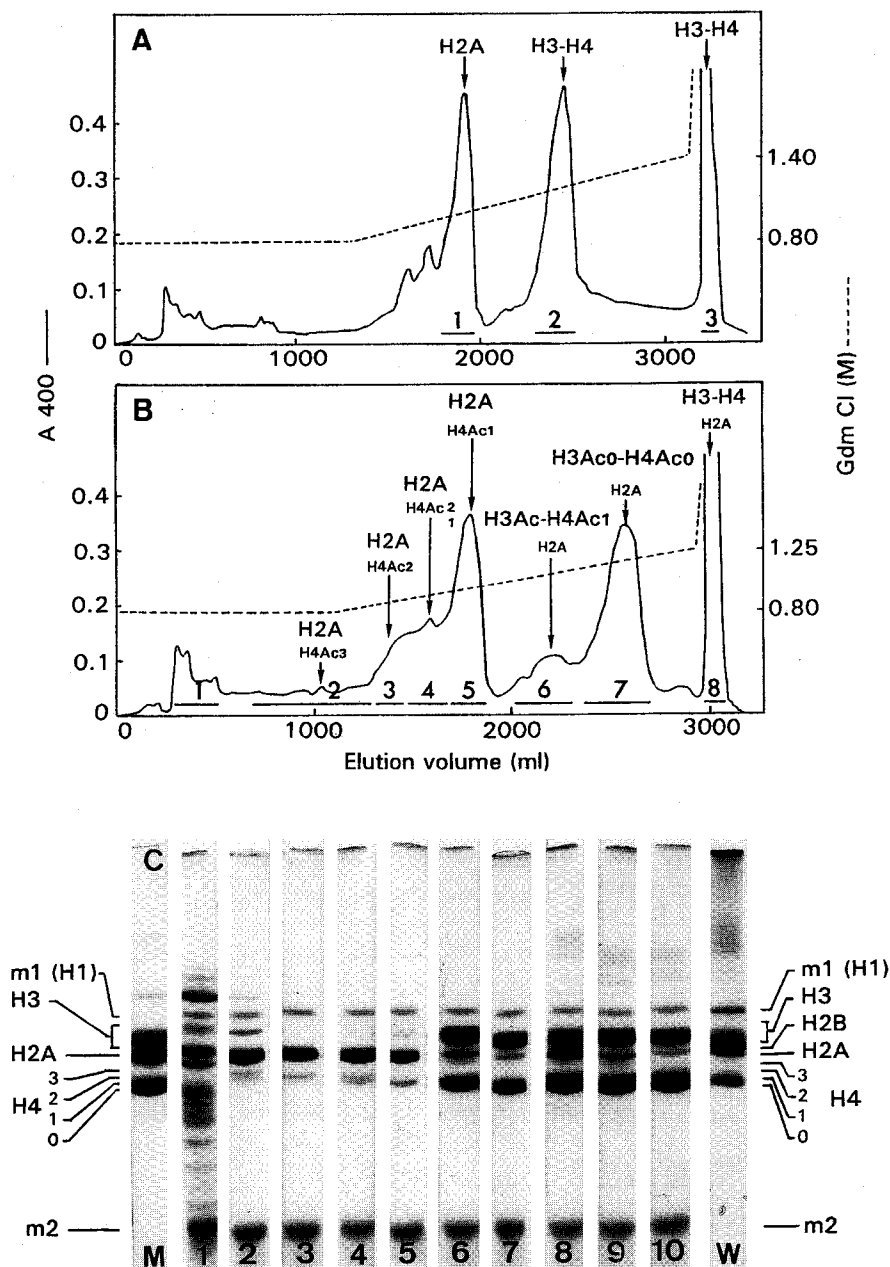


FIG. 1. Behavior of a fraction F2a2 of Johns containing histones H2A, H3, and H4 on Biorex 70 in reductive medium. Chromatography was performed as described under Experimental Procedures. The composition deduced from electrophoresis is indicated above the elution profiles, the main components are indicated in large and the minor components are indicated in smaller characters. H4 Ac 0, Ac 1, Ac 2, and Ac 3, non-, mono-, di-, and triacetylated H4; H3 Ac 0, nonacetylated H3; H3 Ac, H3 enriched in acetylated species; H3 or H4 without other specification means a mixture of acetylated and nonacetylated species like in the material loaded onto the column. (A) Chromatogram of 300 mg of histones applied to a 2.6×90 -cm Biorex 70 column and eluted with a linear gradient (total volume 2000 ml) from 0.8 to 1.4 M guanidinium chloride (gdm Cl) in 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.1 M sodium phosphate, pH 6.8, followed by 4 M gdm Cl. The flow rate was 30 ml/h; fractions were collected at 30-min intervals and pooled as indicated by solid bars. (B) Same experiment as in A, but the gradient was from 0.8 to 1.25 M, total volume 2000 ml. Flow rate was 28 ml/h. Fraction 1 corresponds to the material not retained by the column in 0.8 M gdm Cl. Fraction 2 contains in addition to histones an unidentified protein that in electrophoresis migrates like H3. Fraction 8 corresponds to aggregated material which is dissociated and eluted only by the 4 M gdm Cl step. (C) Analysis of fractions obtained in B. Electrophoresis was performed in 17% polyacrylamide gel, at 1.5 mA per tube, for 4 h, in 0.9 M acetic acid, pH 2.7, 2.5 M urea (36), and stained with Coomassie blue R. Migration was from top to bottom. Lane M, starting mixture applied to the column; calf thymus H1 and a very basic peptide of 92 residues (residues 94 to 185 from chicken erythrocyte H5) were added to lanes 1-10 as top and bottom markers and labeled m1 and m2, respectively; lanes 1-8, fractions 1-8 from B; lanes 9 and 10, fractions 6 and 7 from B plus whole H4; lane W, whole histone. The bands corresponding to the forms of H4 are denoted by the small numerals on the sides of the photograph and refer to the number of acetylated lysine residues present.

Fraction 6 contained monoacetylated H4 and acetylated H3; fraction 7 contained nonacetylated H4 and nonacetylated H3; tri-, di-, and a part of monoacetylated H4 were eluted earlier with H2A (fractions 2–5). Although in calf thymus H4, half of the molecules are acetylated (41, 42), the area of fraction 6, in the diagram, is smaller than that of fraction 7. This was due in part to partial elution of these species with H2A and in part to the nature of the mixture applied to the column. At the time of the preparation of the mixture H2A, H3 and H4 histones were precipitated by acetone, but histone H4 was precipitated only partially, the nonacetylated species precipitating better than the acetylated species. This fraction was thus enriched in the former. On the other hand, the pure fraction of histone H4, obtained at the next addition of acetone, was enriched in the acetylated species. During the rest of this work care was taken to use histones comprising the different acetylated and nonacetylated species in a ratio similar to the natural contents.

The presence of H2A in the chromatogram illustrates the relative position of elution of the histones. In Fig. 1B histone H2A is eluted at 1 M gdm Cl (top of the peak), monoacetylated H3 and H4 at 1.07 M, and nonacetylated H3 and H4 at 1.15 M. It is noteworthy that when histone H2B contaminated with histone H2A is applied to the same column, histone H2B is eluted at 1 M and the complex H2A–H2B at 1.10 M. The intricacy of these results prompted us to use pure histone H3 and/or H4 for the further chromatographies on Biorex.

Necessity of the presence of both H3 and H4. In order to check that elution of H3–H4 at about 1 M gdm Cl is due to the interaction between H3 (reduced) and H4, we applied successively to the column H3 alone (Fig. 2A), H4 alone (Fig. 2B), and a mixture of H3 and H4 (Fig. 2C). In the two first chromatograms the histone is eluted by 4 M gdm Cl (fraction 1 in Figs. 2A and 2B). Only in the last-mentioned case are histones eluted in the gradient (fractions 1, 2, and 3 in Fig. 2C; analytical electrophoresis performed from a large-scale chromatography is shown below in Figs. 3A and 3D). Therefore, elution of arginine-rich calf thymus histones at about 1 M gdm Cl requires not only the absence of disulfide bridges, but also the presence of both H3 and H4. These results led us to think that we were dealing with a histone complex.

Effect of temperature. Figures 3A, 3B, and 3D show two preparative chromatographies of a mixture of histones H3 and H4 performed at room temperature (22°C, Figs. 3A and 3D) and in a cold room (4°C, Fig. 3B). At 22°C the monoacetylated complexes were eluted at 1.1 M and the nonacetylated at 1.2 M gdm Cl. The material not eluting in the gradient and washed down from the column by the 4 M step corresponded to 21% of the material applied to the column. At 4°C the complexes

were eluted at 1.0 and 1.1 M gdm Cl with a very good recovery, the protein eluted by the 4 M gdm Cl representing only 5% of the material applied to the column. Thus when the temperature is brought down the H3–H4 complexes are eluted at a lower concentration of gdm Cl. This observation applies also to other histones, at least to H2A and H2B and to the H2A–H2B complex (data not shown). It is noteworthy that the opposite generally occurs, that is, a drop in temperature raises the affinity of proteins for ion exchangers by an increase in hydrogen bonding.

Effects of a change in the ratio between the different acetylated and nonacetylated forms of H4. According to the material from which they are extracted, histones are acetylated to various extents. Cuttlefish testis H4 contains more of tri- and di- and less of the monoacetylated species than the calf thymus does (43).

Figures 3C and 3E correspond to the chromatography at 4°C of a mixture of calf thymus H3 and of cuttlefish testis H4. The use of cuttlefish testis H4 decreased the overlap between the different forms of H4. An explanation might be that the proportions of di-, mono-, and nonacetylated forms in the cuttlefish H4 were similar enough to the corresponding contents in calf thymus H3 to allow elution of a peak of di-, a peak of mono-, and a peak of nonacetylated H3 and H4.

Characterization of acetylated and nonacetylated forms of histone H3. Probably due to the presence of variants (44–46) and of two lysine residues methylated in various ways (47), acetylated and nonacetylated forms are less well separated in H3 than in H4 (in 0.9 M acetic acid, 2.5 M urea) polyacrylamide gel electrophoresis. This, in addition to the fact that histone H3 has a free amino terminus, prompted us to subject both acetylated and nonacetylated forms of histone H3 to automatic Edman degradation to investigate the modification level. Since histone H4 has a blocked amino terminus, the H3–H4 complexes could have been put straight to the cup of the sequenator. However, since the separation of these histones from each other is easy on Biogel P10, we preferred to work with isolated H3. Chromatographic fractionations into the two components of the H3–H4 complexes found in fractions 5 and 8 of Fig. 3A are shown in Figs. 4A and 4B, respectively. Figure 5 shows the recovery of the PTH amino acid corresponding to the published sequence (47) at each cycle for the H3 histone found in peak 1 of Fig. 4A and for the H3 histone found in peak 1 of Fig. 4B. H3 histone in peak 1 of Fig. 4A (corresponding to H3 present in fraction 5 of Fig. 3A), unlike H3 in peak 1 of Fig. 4B (corresponding to H3 present in fraction 8 of Fig. 3A), contained PTH acetyllysine at cycles 14 and 23; these represent 56 and 42%, respectively, of the total PTH acetyllysine plus PTH lysine recovered at these cycles. In the diagrams the two deep valleys that occur at

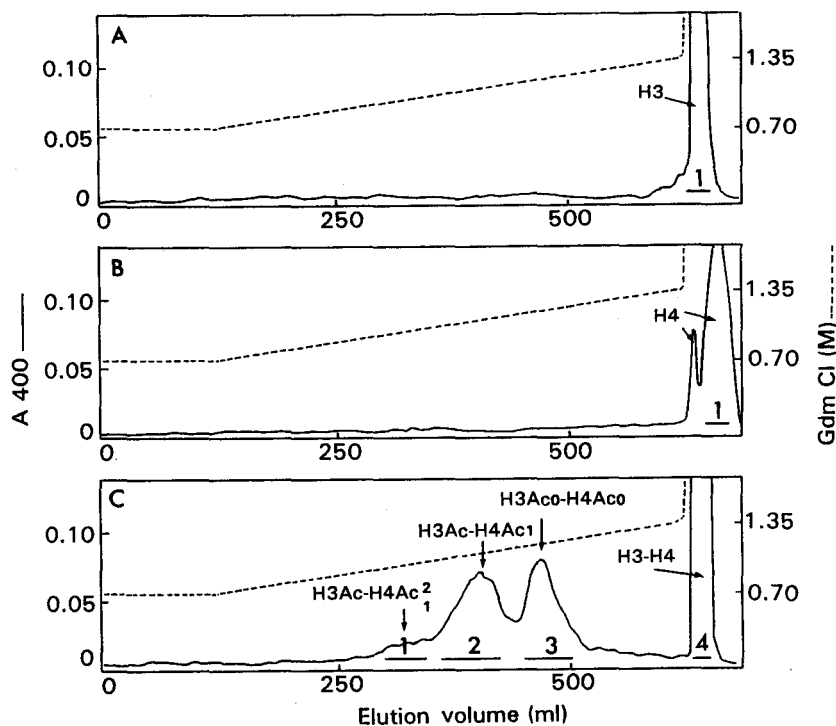


FIG. 2. Behavior of H3 alone, H4 alone, and a mixture of H3 and H4 on Biorex 70 in reductive medium. Chromatographies of 23 mg of histone H3 and/or 17 mg of histone H4 were performed as is shown in Fig. 1, but a 1.2×50 -cm column was used. Gradient was from 0.7 to 1.35 M gdm Cl, total volume was 500 ml. Flow rate was 5 ml/h. Five-milliliter fractions were collected. Contents of the peaks are labeled according to electrophoresis (data not shown) as in Fig. 1. (A) Histone H3 alone. (B) Histone H4 alone. (C) Mixture of histones H3 and H4.

cycles 9 and 27 indicate the presence in both acetylated and nonacetylated H3 of methyllysine at residues 9 and 27. Thus, the histone H3 eluted with monoacetylated H4 on a Biorex matrix contains on average 1 mol of acetyllysine per mole of histone. The four modified sites found here are known as major acetylation or methylation sites in histone H3 (47-49).

It should be noted that in Fig. 3A, H3 in fraction 8, unlike H3 in fraction 5, does not show bands of variants H3.2 and H3.3 when run on Triton X-100 gel electrophoresis (data not shown). This may be explained by a greater acetylation (44) and/or by a lower affinity of the variants H3.2 and H3.3 for the resin.

DISCUSSION

This work describes the use of an ion-exchange chromatographic method, with 2-mercaptoethanol included in the elution buffer, for the preparation of histones (29). We used a reducing agent in order to stop oxidation of methionine residues to methionine sulfoxide or methionine sulfone. In the case of histones, it has been shown that oxidation of methionines in histone H2B stops the formation of the H2A-H2B complex (50). Histones H3 and H4 contain two and one methionines, respectively, therefore there is a possibility of an arti-

fact if a methionine is oxidized. This possibility has to be considered in view of the variety of types of interactions in which these histones are involved: formation of the H3-H4 dimer, combination of two dimers to form the tetramer, interaction between the tetramer and two H2A-H2B dimers, and association with DNA, just considering the core particle level.

Disulfide bridges are broken or prevented by reducing agents. Histone H3 contains one (variants H3.2 and H3.3) or two (variants H3.1) cysteines (45, reviewed in 51, 52). In chicken erythrocyte H3 and in plant H3 the variants with two cysteines are missing. In this case only dimers of histone H3 joined by a disulfide bridge between the cysteines 110 can be formed (H3-Cys₁₁₀-S-S-Cys₁₁₀-H3). These particular dimers can form (H3-H4)₂ complexes and nucleosomes (53, 54). In calf thymus H3 there are both the variants with one cysteine (10-20%) and the variants with two cysteines (80-90%) (44, 55); this mixture produces monomers containing one internal disulfide bridge between the cysteines 96 and 110; dimers, of which five types can be formed in theory; and larger polymers. Most of all these species do not form the classic tetramer (H3-H4)₂ (54, 56). When the histones H3 and H4 from calf thymus are chromatographed on the Biorex 70 column or equivalent resins as described under Experimental proce-

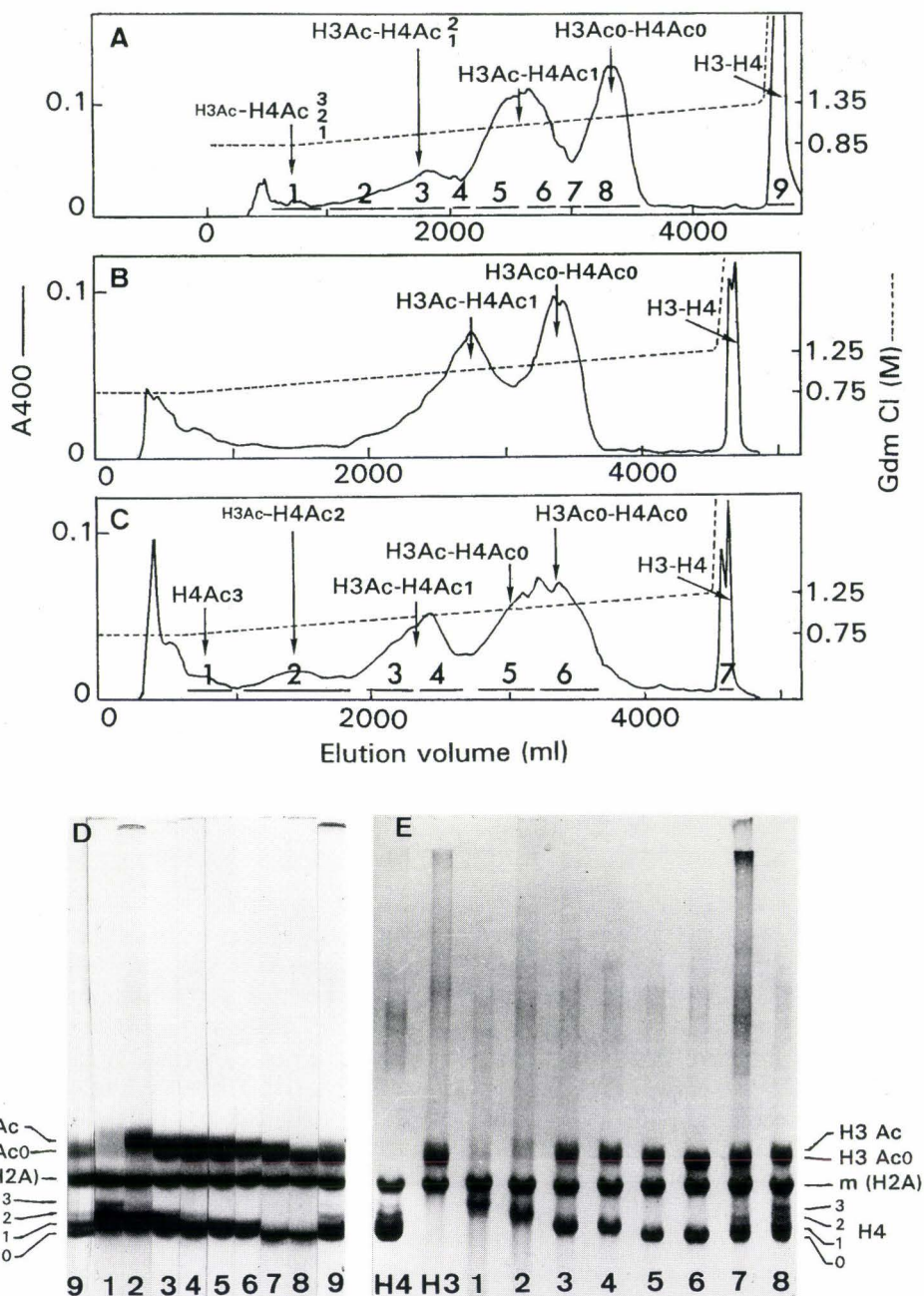


FIG. 3. Influence of the temperature and of the ratio of the different acetylated forms on the elution pattern and resolution of the Biorex 70 column. Contents of the fractions are labeled as in Fig. 1. Control electrophoresis of B is not shown. (A) Chromatography at room temperature of a mixture of 230 mg of H3 and 170 mg of H4 from calf thymus loaded on the 2.6×90 -cm Biorex 70 column used in Fig. 1. The gradient was from 0.85 to 1.35 M gdm Cl, total volume was 4200 ml. The flow rate was 19.5 ml/h; fractions were collected at 40-min intervals and pooled as indicated by solid bars. The pattern is moved to the right in order to get the gdm Cl concentrations to coincide in the three diagrams A, B, and C. (B) Chromatography in cold room (4°C) of a mixture of 160 mg of H3 and 110 mg of H4. The gradient was from 0.75 to 1.25 M. The other parameters are as in A. (C) Chromatography as in B, but the H4 was from cuttlefish testis. (D) Analysis of the chromatogram shown in A. Electrophoresis was performed in polyacrylamide tube gel in 0.9 M acetic acid, 2.5 M urea as in Fig. 1C, but for 6 h. Calf thymus H2A is added as marker (m) to all fractions. The numbers correspond to the fractions in the chromatogram. The bands corresponding to the forms of H4 are denoted by the small numerals on the side of the photograph and refer to the number of acetylated lysine residues present. H3 Ac₀, nonacetylated H3; H3 Ac, H3 enriched in acetylated forms. (E) Analysis of the chromatogram shown in C. Electrophoresis was performed in 17% polyacrylamide slab gel $120 \times 140 \times 1$ mm in 0.9 M acetic acid, pH 2.7, 2.5 M urea, at 22 mA for 6 h and stained with Coomassie blue R. Calf thymus H2A is added to all fractions as marker (m). The numbered lanes 1-7 correspond to the numbered fractions in the chromatogram; lane 8, mixture of fractions 1, 2, 4, and 5; H3, calf thymus H3; H4, cuttlefish testis H4. The nonacetylated and acetylated forms of H3 and H4 are labeled as in D.

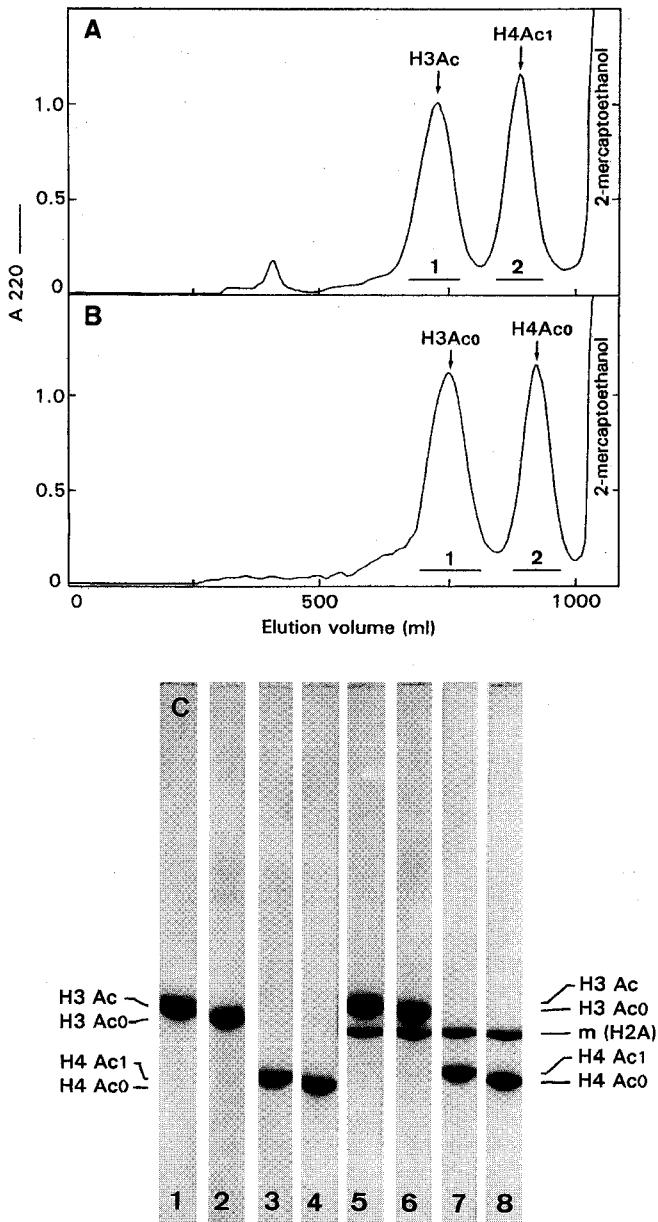


FIG. 4. Isolation of histones H3 and H4 from acetylated and non-acetylated H3-H4 complexes. Contents of the fractions were labeled as in Fig. 1. (A and B) Gel filtration chromatographies. Samples of 35 mg of H3-H4 complexes dissolved in 3 ml of 6 M gdm Cl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.4 M 2-mercaptoethanol were left to stand overnight at room temperature and were applied to a 180×2.5 -cm column of Bio-Gel P10 (200-400 mesh) eluted with 0.01 M HCl saturated with chloroform, at room temperature. The flow rate was 15 ml/h. Eluant absorbance was monitored at 220 nm in 1-cm path-length cell. (A) Chromatography of H3-H4 complexes from fraction 5 of Fig. 3A. (B) Chromatography of H3-H4 complexes from fraction 8 of Fig. 3A. (C) Analysis of fractions obtained in A and B. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed as in Fig. 3D. Histone H2A was added as an internal marker (m) to lanes 5-8. Lanes 1 and 5, fraction 1 of Fig. 4A; lanes 2 and 6, fraction 1 of Fig. 4B; lanes 3 and 7, fraction 2 of Fig. 4A; lanes 4 and 8, fraction 2 of Fig. 4B. H3 Ac 0, nonacetylated H3; H3 Ac, H3 enriched in acetylated species; H4 Ac 0, nonacetylated H4; H4 Ac 1, monoacetylated H4.

dures, but without the use of 2-mercaptoethanol, they are eluted only by the 4 M gdm Cl (39, 57). With the system containing 2-mercaptoethanol they elute at about 1 M gdm Cl. We thought that elution at this low concentration was due to a decrease in the self-aggregation phenomenon, since reduced calf histone H3 can form a complex with histone H4, whereas non-reduced calf H3 cannot. To test this hypothesis we tried some other experimental conditions which prevent the formation of complexes. We applied to the column in a reducing medium the histone H3 alone, but this histone was eluted only by a high concentration of gdm Cl; therefore, preventing the formation of disulfide bonds is not sufficient to stop self-aggregation of histone H3. When histone H4 alone is applied to the column in reducing medium this histone is also eluted at a high concentration of gdm Cl. Thus, in order that aggregation be prevented or at least very much decreased, histone H3 must be in a reduced state and histone H4 must also be present. Under these conditions the two histones are eluted together at about 1 M gdm Cl only.

Histone complexes can be prevented by use of a low pH. We used chromatography on SP Sephadex in gdm Cl medium at pH 2.0 containing 2-mercaptoethanol, according to a procedure perfected to separate calf thymus histones H2A and H2B from their mixture on a large scale (M.C., unpublished) and which is also efficient in the fractionation of *Physarum polycephalum* histones (58) (data not shown). Under these conditions the majority of histones H3 and H4 are eluted only by 4 M gdm Cl, thus showing that the aggregation phenomena were considerable. At first glance it is surprising that aggregation of histones H3 and H4 is much greater at pH 2.0 than at pH 6.8. The explanation seems to be that at pH 6.8 these histones interact and form an organized complex that inhibits or restricts aggregation. On the other hand these experiments with histones at pH 2.0, as well as at pH 6.8, show that at a concentration of about 1 M the influence of the ionic strength of the gdm Cl prevails over the disruption of hydrophobic bonds.

Temperature is able to act upon the organization of complexes. A decrease in temperature shifts the equilibrium polymer-tetramer-dimer from the high weight toward the low molecular weight fraction (59). Comparative observation of Figs. 3A and 3B shows that this assertion applies also to the chromatographic behavior of our H3-H4 complexes. When the chromatography is carried out at 4°C, the amount of H3 and H4 histones eluted by the 4 M gdm Cl, corresponding to high molecular weight polymers, decreases, whereas the amount of H3 and H4 histones eluted in the gradient, corresponding to dimers or tetramers, increases.

Another argument in favor of the formation of the complex stems from the chromatographic behavior of histone H3 on Bio-Gel P10 in 0.01 M HCl. When histone

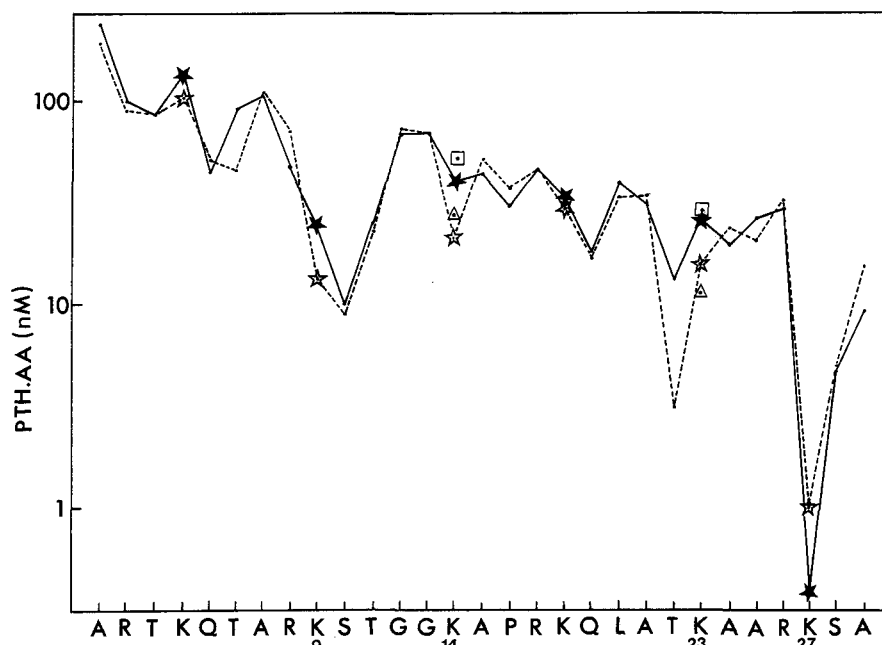


FIG. 5. Characterization of histone H3 eluted with acetylated histone H4 and of histone H3 eluted with nonacetylated histone H4 by Edman degradation. Prior to automated sequencing H3 was separated from H4 by chromatography on Bio-Gel P10 in HCl 0.01 M (see Fig. 4). The number of nanomoles of the specific PTH amino acid after subtraction of the background level (logarithmic scale) is plotted against the number of degradations performed. Sites of acetylation or methylation are numbered. PTH lysine are marked with stars. Dashed line and open symbols, H3 Ac from peak 1 of Fig. 4A (H3 eluted with monoacetylated H4 in fraction 5 of Fig. 3A); open triangles, PTH acetyllysine at residues 14 and 23 of this H3; open squares, PTH lysine plus PTH acetyllysine at these same residues. Solid line and closed stars, H3 Ac 0 from peak 1 of Fig. 4B (H3 eluted with nonacetylated H4 in fraction 8 of Fig. 3A).

H3 is chromatographed for the first time, histone H3 is eluted in a sharp peak. If after lyophilization the histone is rechromatographed under the same conditions, the new peak of histone H3 is spread toward the trailing edge and a poorer resolution is obtained. When the fractions from Biorex 70 containing histone H3 and H4 are chromatographed on Bio-Gel P10, the histones are eluted in peaks as sharp as that obtained on the first chromatographic run, even though the histone H3 had been chromatographed once already on P10 for its purification before the Biorex 70 step. These observations seem to correspond to a refolding of histone H3 in a native or at least in a homogeneous conformation due to complex formation and/or to interaction with the acid groups of the Biorex resin. This reconfiguration may involve the *cis-trans* isomerization of some peptide bonds adjacent to proline residues.

Histones are not only eluted as H3-H4 complexes but in addition are separated according to their degree of acetylation. If we assume that, considering acetylation, association between H3 and H4 is random in the mixture before loading onto the column, we have to admit that specific associations between acetylated H3 and acetylated H4 and between nonacetylated H3 and nonacetylated H4 found in the eluate are formed in the column while the chromatography is developed. This

implies that the complexes, in the medium used, are not fixed systems but are likely subject to dynamic equilibrium; this equilibrium would contain among others the monomer species. By comparison with data obtained in different buffers, both a (monomer-tetramer) equilibrium (60, 61) and an equilibrium which also contains the dimer step (59) may exist. Histones H3 and H4 existing mainly as heterodimers have also been found (62).

Two phenomena are able to explain or to have an impact on the specific arrangement and separation of histone complexes. (i) When a protein is chromatographed by ion exchange its behavior is determined by fewer than 10 charges acting simultaneously (63). These 10 charges might correspond for the most part to the basic residues found in the flexible N-terminal tails of histone complexes and consequently would include the lysine residues subject to acetylation. The acetylated histones (monomers) and acetylated histone complexes (dimers and tetramers) are thus less retained by the resin than the corresponding nonacetylated entities. This property would give the basic separation according to the acetylation level. (ii) The presence of factors that modify the arrangement and/or the association coefficient of histone complexes. It is known for example that a dimer is eluted at higher ionic

strength than a monomer. This is attributed to an increase in charge density on the surface of the protein set. Thus, the dimer H2A-H2B is eluted at a higher ionic strength than the histone H2A alone or the histone H2B alone (24). In the same way a tetramer (H3-H4)₂ must be eluted at a higher strength than a dimer H3-H4, and the dimer must be eluted at a higher strength than a monomer. These factors may be presence of other histones, histone concentration, salt concentration, temperature, existence of disulfide bridges, and perhaps histone modifications. Considering a single chromatographic run, the histone concentration in the elution buffer is not constant throughout the chromatography and is likely the main variable factor acting on histone association. The histone concentration in the first fractions eluted may be low (for instance, fraction 1 in Fig. 3A and fractions 1 and 2 in Fig. 3C) and consequently histones are mostly dissociated and their elution is moved forward. The triacetylated H4 being less retained by the resin than the acetylated H3, a partial fractionation of the complex occurs. On the other hand, histone concentration in peaks (for instance, fraction 8 in Fig. 3A and fractions 5 and 6 in Fig. 3C) is much greater and histones are more associated (a great proportion of dimers and tetramers) and consequently their elution is delayed. The differences in binding to the resin that ensue from the differences in histone concentration and association do not seem to be the primary cause of the separation according to acetylation but seem to constitute an epiphenomenon that modifies the theoretical elution profile depending on the number of positive charges.

Our results allow us to comment on some previous chromatographic work. In a study of histones from plant origin, a peak of H3 and H4 histones was found at about 1 M gdm Cl, where we found it. Patthy *et al.* (29), from whom we took the use of 2-mercaptoethanol in the chromatographic buffer, noted that in the presence of high concentrations of 2-mercaptoethanol the arginine-rich histones were eluted in a single peak at a much lower gdm Cl concentration than had been observed previously. These authors did not attempt to give an explanation, but without any doubt were dealing with the same H3-H4 complexes as us. The reason why these authors did not obtain any acetylated fractions is not clear. It is possible that histone H3 from pea embryo is not acetylated or that the acetylated species was present in very small quantities, like H4, and was eluted as an acetylated H3-H4 complex before the nonacetylated H3-H4 complex. The acetylated complex may also be eluted near the H2A-H2B complex and so be hidden by it. In other studies on histones from pea and on histones from wheat germ (28, 30) the simultaneous elution of H3 and H4 around 1 M gdm Cl was obtained without the use of 2-mercaptoethanol. Fazal and Cole (30) ascribed the early elution of these

histones to their association with phospholipids. In our work this hypothesis cannot be retained because we used pure isolated histones in several experiments. The explanation for the elution of plant histones H3 and H4 around 1 M gdm Cl without reducing agent may stem from the presence of only one cysteine residue (Cys₁₁₀) in plant histone H3. This may mean that this H3 histone is less easily oxidized than histone H3 containing two cysteines, or that the dimer H3-Cys₁₁₀-S-S-Cys₁₁₀-H3 can still form the complex in the chromatographic medium as it does in classic buffers (53, 54). Regarding this latter possibility it must be pointed out that when chicken erythrocyte histones (H3 containing one cysteine, the Cys₁₁₀) were chromatographed under normal conditions (without a reducing agent) the H3 and H4 were not eluted in a gradient ranging from 0.95 to 1.25 M gdm Cl (40). The H3-Cys₁₁₀-S-S-Cys₁₁₀-H3, (H4)₂ complex, which is probably a tetramer if it forms, might require a higher gdm Cl concentration to be eluted than the standard H3-H4 complex, perhaps a dimer, obtained in a reductive medium.

As a process of fractionation of histones according to acetylation, this method of chromatography is milder than the available procedures (43, 48, 49). The use of this method has to be considered if the starting material is "native" complexes. In this case it might allow a fractionation which also takes into account other postsynthetic modifications, such as amide phosphorylation that is destroyed by the acid pH often used in histone isolation; histone isolation may also lead to elimination of poly(ADP-ribosylated) histones. Moreover the results obtained at 4°C allow us to consider replacing gdm Cl with NaCl in order to restrict the exchanges of histone molecules between complexes, if desired.

This paper shows that even nonphysiological conditions, which allow interactions between histones H2A and H2B, allow also interactions between histones H3 and H4 as long as oxidation is prevented.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Dr. Danièle Wouters-Tyrou for the kind gift of cuttlefish histone H4, Dr. Jerry Johnson (U.S.A.) and Dr. Catherine Michalski-Scrive for helpful advice and discussions in the beginning of this work, Dr. Pierre Sautière for constant interest, and Annie Hemez for skillful technical assistance.

REFERENCES

1. Van Holde, K. E. (1989) *Chromatin*, Springer-Verlag, New York.
2. Kornberg, R. D. (1974) *Science* **184**, 868-874.
3. Kornberg, R. D., and Thomas, J. O. (1974) *Science* **184**, 865-868.
4. Eickbush, T. H., and Moudrianakis, E. N. (1978) *Biochemistry* **17**, 4955-4963.
5. Richmond, T. J., Finch, J. T., Rushton, B., Rhodes, D., and Klug, A. (1984) *Nature* **311**, 532-537.

6. Arents, G., Burlingame, R. W., Wang, B.-C., Love, W. E., and Moudrianakis, E. N. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10148–10152.
7. Burlingame, R. W., Love, W. E., Wang, B.-C., Hamlin, R., Xuong, N.-H., and Moudrianakis, E. N. (1985) *Science* **228**, 546–553.
8. Worcel, A., Han, S., and Wong, M. L. (1978) *Cell* **15**, 969–977.
9. Jackson, V., and Chalkley, R. (1981) *Cell* **23**, 121–134.
10. Svaren, J., and Chalkley, R. (1990) *Trends Genet.* **6**, 52–56.
11. Jackson, V. (1990) *Biochemistry* **29**, 719–731.
12. Annunziato, A. T., Schinder, R. K., Riggs, M. G., and Seale, R. L. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 8507–8515.
13. Baer, B. W., and Rhodes, D. (1983) *Nature* **301**, 482–488.
14. Van Holde, K. E., Lohr, D. E., and Robert, C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2837–2840.
15. Gruss, C., and Sogo, J. M. (1992) *BioEssays* **14**, 1–8.
16. Weintraub, H., Worcel, A., and Alberts, B. (1976) *Cell* **9**, 409–417.
17. Prior, C. P., Cantor, C. R., Johnson, E. M., Littau, V. C., and Allfrey, V. G. (1983) *Cell* **34**, 1033–1042.
18. Nacheva, G. A., Guschin, D. Y., Preobrazhenskaya, O. V., Karpov, V. L., Ebralidse, K. K., and Mirzabekov, A. D. (1989) *Cell* **58**, 27–36.
19. Yamasu, K., and Senshu, T. (1990) *J. Biochem.* **107**, 15–20.
20. Locklear, L., Ridsdale, A. J., Bazett-Jones, D. P., and Davie, J. R. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 7015–7024.
21. Bonne-Andrea, C., Wong, M. L., and Alberts, B. M. (1990) *Nature* **343**, 719–726.
22. Chen, T., Sterner, R., Cozzolino, A., and Allfrey, V. G. (1990) *J. Mol. Biol.* **212**, 481–493.
23. Lee, M. S., and Garrard, W. T. (1991) *EMBO J.* **10**, 607–615.
24. Skandrani, E., Mizon, J., Sautière, P., and Biserte, G. (1972) *Biochimie* **54**, 1267–1272.
25. Van der Westhuyzen, D. R., and Von Holt, C. (1971) *FEBS Lett.* **14**, 333–337.
26. Michalski-Scrive, C., Aubert, J.-P., Couppez, M., Biserte, G., and Loucheux-Lefebvre, M.-H. (1982) *Biochimie* **64**, 347–355.
27. Muller, S., Erard, M., Burggraf, E., Couppez, M., Sautière, P., Champagne, M., and Van Regenmortel, M. H. V. (1982) *EMBO J.* **1**, 939–944.
28. Fambrough, D. M., Fujimura, F., and Bonner, J. (1968) *Biochemistry* **7**, 575–585.
29. Patthy, L., Smith, E., and Johnson, J. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 6834–6840.
30. Fazal, M., and Cole, R. D. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 4068–4072.
31. Busch, H. (1968) in *Methods in Enzymology* (Grossman, L., and Moldave, K., Eds.), Vol. 12, Part B, pp. 65–84, Academic Press, San Diego.
32. Johns, E. W. (1967) *Biochem. J.* **105**, 611–614.
33. Johns, E. W. (1964) *Biochem. J.* **92**, 55–59.
34. Johns, E. W. (1977) in *Methods in Cell Biology* (Prescott, D., Ed.), Vol. 16, pp. 183–203, Academic Press, New York.
35. Wouters-Tyrou, D., Martin-Ponthieu, A., Sautière, P., and Biserte, G. (1981) *FEBS Lett.* **128**, 195–200.
36. Panyim, S., and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337–346.
37. Hermann, J., Titani, K., Ericsson, L. H., Wade, R. D., Neurath, H., and Walsh, K. A. (1978) *Biochemistry* **17**, 5672–5679.
38. Luck, J. M., Rasmussen, P. S., Satake, K., and Tsvetkov, A. N. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 1407–1414.
39. Fambrough, D. M., and Bonner, J. (1966) *Biochemistry* **5**, 2563–2569.
40. Murray, K., Vidali, G., and Neelin, J. M. (1968) *Biochem. J.* **107**, 207–215.
41. DeLange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L., and Bonner, J. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 319–334.
42. Ogawa, Y., Quagliarotti, G., Jordan, J., Taylor, C. W., Starbuck, W. C., and Busch, H. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4387–4392.
43. Couppez, M., Martin-Ponthieu, A., and Sautière, P. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 2854–2860.
44. Marzluff, W. F., Sanders, L. A., Miller, D. M., and McCarthy, K. S. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 2026–2033.
45. Franklin, S. G., and Zweidler, A. (1977) *Nature* **266**, 273–275.
46. Urban, M. K., Franklin, S. G., and Zweidler, A. (1979) *Biochemistry* **18**, 3952–3960.
47. DeLange, R. J., Hooper, J. A., and Smith, E. L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 3261–3274.
48. Marvin, K. W., Yau, P., and Bradbury, E. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 19839–19847.
49. Thorne, A. W., Kmiecik, D., Mitchelson, K., Sautière, P., and Crane-Robinson, C. (1990) *Eur. J. Biochem.* **193**, 701–713.
50. Spiker, S., and Isenberg, I. (1977) *Biochemistry* **16**, 1819–1826.
51. Wells, D., and McBride, C. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 311–346.
52. Wells, D., and Brown, D. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 2173–2188.
53. Camerini-Otero, R. D., and Felsenfeld, G. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5519–5523.
54. Lewis, P. N., and Chiu, S. (1980) *Eur. J. Biochem.* **109**, 369–376.
55. Zweidler, A. (1992) *Biochemistry* **31**, 9205–9211.
56. Lewis, P. N. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 329–335.
57. Rasmussen, P. S., Murray, K., and Luck, J. M. (1962) *Biochemistry* **1**, 79–89.
58. Champagne, M., Demouveau, M.-F., Couppez, M., and Sautière, P. (1982) *Eur. J. Biochem.* **126**, 89–94.
59. Sperling, R., and Bustin, M. (1975) *Biochemistry* **14**, 3322–3331.
60. D'Anna, J. A., Jr., and Isenberg, I. (1974) *Biochemistry* **13**, 4992–4997.
61. D'Anna, J. A., Jr., and Isenberg, I. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**, 343–347.
62. Kawashima, S., and Imahori, K. (1982) *J. Biochem.* **91**, 959–966.
63. Regnier, F. E. (1988) *Science* **238**, 319–323.

Immunochemical detection of changes in chromatin subunits induced by histone H4 acetylation

S. Muller*, M. Erard¹, E. Burggraf¹, M. Couppez²,
P. Sautière², M. Champagne¹, and
M.H.V. Van Regenmortel

Laboratoire de Virologie and ¹Laboratoire de Biophysique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15, rue Descartes, 67084 Strasbourg cédex, and ²Unité 124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer, B.P. 311, 59020 Lille cédex, France

Communicated by G. Dirheimer
Received on 28 June 1982

Native, reassociated, and reconstituted core particles from chicken erythrocytes were compared by both biophysical and immunochemical methods. No significant difference between the three types of core particles could be demonstrated by electron microscopy, circular dichroism, or immunochemical analysis with antisera to histone H2B, H2A, and H3. Core particles were also reconstituted with calf thymus non-acetylated H3, H2A, and H2B with either mono-, di-, or tri-acetylated H4 isolated from cuttle-fish testes. The hyperacetylation of H4 did not significantly alter the biophysical characteristics of core particles but it induced several changes in their immunochemical reactivity. Binding to core particles of antibodies specific for H2A, H3, and for the IRGERA (synthetic C-terminal) peptide of H3 was considerably decreased when di- or tri-acetylated H4 was used for reconstitution, whereas binding of H2B antibodies remained the same. Our results suggest that the presence of hyperacetylated H4 within core particles leads to conformational changes that alter the antigenic determinants of several of the histones present at the surface of chromatin subunits. Since histone acetylation is correlated with the open structure of active chromatin, it may become possible to monitor the activity of chromatin by immunochemical methods.

Key words: histone acetylation/chromatin/immunochemistry/antibodies to histones

Introduction

Antibodies to histones represent one of the most specific probes for determining the accessibility of histones at the surface of chromatin. Only a few epitopes (antigenic determinants) of histones H2B, H3, and H5 have been localized in the primary structure of these proteins (Absolom and Van Regenmortel, 1977, 1978; Mura *et al.*, 1980) and only one epitope each of H2B and H3 has been found to be expressed at the periphery of the nucleosome (Absolom and Van Regenmortel, 1978; Muller *et al.*, 1982). In spite of the limited amount of information concerning the molecular structure of epitopes found at the surface of chromatin subunits, antibodies to histones are nevertheless valuable tools for analysing fine details of the chromatin surface. Antibodies to globular proteins recognize epitopes made up of a small patch of 5–7 amino acid residues that are kept in a particular conformation by the folding of the polypeptide chain; the residues comprising the epitope may be contiguous in the se-

quence or may only be juxtaposed in space as a result of chain folding (Sela, 1969; Arnon and Geiger, 1977; Atassi and Smith, 1978). In macromolecular assemblies such as nucleosomes it is also conceivable that some epitopes arise from the juxtaposition of residues from separate peptide chains. Furthermore, bonds formed between the core histones are likely to lead to conformational changes in the constituent molecules which may alter the epitopes. For these various reasons antibodies to histones may be expected to be sensitive tools for detecting any conformational changes that may occur at the surface of chromatin as a result of changes in histone-histone or DNA-histone interactions (Romac *et al.*, 1981).

We have used histone antibodies to probe for any antigenic differences between native, reassociated, and reconstituted core particles from chicken erythrocytes. We have also compared reconstituted core particles that contained the usual histone H4 (i.e., ~90% non-acetylated) with core particles containing either mono-, di-, or tri-acetylated H4. Although these various particles appeared to be identical when analysed by electron microscopy and circular dichroism (c.d.), the core particles that contained tri-acetylated H4 showed considerable antigenic changes when tested with different histone antisera. It seems that the presence of hyperacetylated H4 within core particles leads to a conformational change that alters the accessibility or nature of the epitopes of several of the histones present at the surface of chromatin subunits.

It is generally assumed that post-synthetic histone acetylation is one of the mechanisms that produce the open configuration of active chromatin. In hyperacetylated H4, the acetylation of lysine residues 5, 8, 12, and 16 leads to a less positively charged N-terminal region which is correlated with a weakening of histone-DNA interaction, an expansion of α -helical regions of histones (Bode *et al.*, 1980), and an increased sensitivity towards DNase I (Vidali *et al.*, 1978; Nelson *et al.*, 1978; Simpson, 1978). The conformational changes are believed to cause partial nucleosome disassembly and to allow RNA polymerase read-through. Although the exact sequence of events linking histone acetylation to the promotion of transcription is not yet fully elucidated (Mathis *et al.*, 1980), it is clear that acetylated chromatin subunits possess an altered and more open conformation than that of inactive chromatin. The data we present demonstrate that this altered conformation can also be monitored by immunochemical methods.

Results

Analysis of non-acetylated reassociated and reconstituted core particles

Native chicken erythrocyte core particles prepared as previously described (de Murcia *et al.*, 1980) were characterized by their c.d. spectrum and by electron microscopy. As shown in Figure 1, the maximum ellipticity value $|\theta|_{\max}$ at 283.5 nm was 1300 degrees/cm²/dmol (± 150) and the minimum value $|\theta|_{\min}$ at 294.5 nm was -590 (± 150), indicating a correct DNA folding (de Murcia *et al.*, 1980). This spectrum indicates the total absence of any unfolded core particles since the presence of non-constrained DNA would have led to

*To whom reprint requests should be sent.

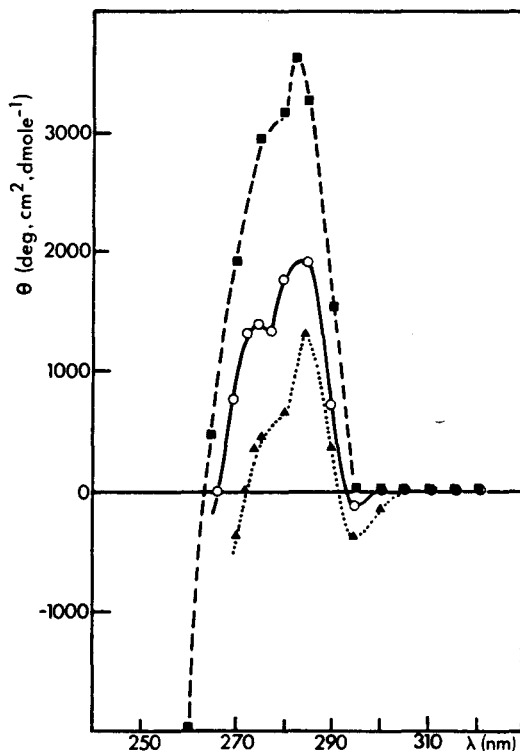


Fig. 1. C.d. spectra of native chicken erythrocyte core particles (\blacktriangle — \blacktriangle); core particles reconstituted with non-acetylated chicken erythrocyte core histones (\circ — \circ); core particles reconstituted with non-acetylated calf thymus H2B, H2A, H3, and acetylated cuttle-fish testis H4 (\blacksquare — \blacksquare). Modified H4 of different degrees of acetylation were used. Data are expressed as molar ellipticity per dmol of DNA phosphate (degrees/cm²/dmol).

much higher ellipticity values. In the electron microscope native core particles appeared as totally folded particles (Figure 2A). When native core particles were rapidly dissociated in 2 M NaCl and immediately reassociated by a one-step decrease in ionic strength, the resulting reassociated core particles displayed the same c.d. spectrum and microscopic appearance as the native core particles (data not shown).

Reconstituted core particles were prepared by mixing native core particle DNA (146 bp) with stoichiometric amounts of the four isolated chicken erythrocyte core histones. The c.d. spectrum of these reconstituted particles indicated a shift of ellipticity to slightly higher values (Figure 1). On the other hand, electron microscopy of this preparation showed a high proportion of native-like core particles with only a small quantity of free DNA (Figure 2B). It is this free DNA which is responsible for the increase in c.d. values. Correlated results from c.d. spectroscopy and electron microscopy indicated that the reconstitution yield was $\sim 90\%$ ($\pm 2\%$).

The correctness of assembly within the reassociated and reconstituted core particles was also tested by measuring the comparative binding of various histone antisera to the native, reassociated, and reconstituted core particles. This study was performed using a solid-phase radioimmunoassay (RIA). As shown in Figure 3A, the native core particles reacted with antibodies to H2B, H2A, H3, and to the IRGERA peptide (synthetic C-terminal hexapeptide of H3) but not with antibodies to H4. The inability of H4 antibodies to react with native core particles was verified with three H4 antisera

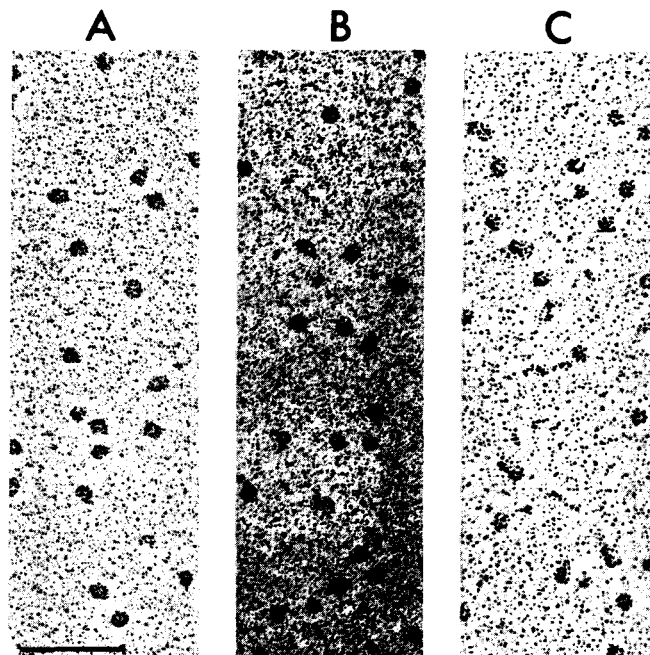


Fig. 2. Electron microscopy of native chicken erythrocyte core particles (A); core particles reconstituted with non-acetylated core histones (B); core particles reconstituted with acetylated H4 (C). The preparations are the same as those used for obtaining Figure 1. The bar = 1000 Å.

prepared in different rabbits. The binding of the different histone antisera to the reassociated and reconstituted core particles was roughly similar to that observed with native core particles (Figure 3B and C) although in some experiments with H2B antisera it was 20% lower in reconstituted particles. In separate experiments (not shown in Figure 3C), H2A antisera were also found to react with reconstituted core particles (see Figure 5). Although the extent of antibody binding varied somewhat in different reconstitution experiments, the results obtained with the three types of core particles (native, reassociated, and reconstituted) were sufficiently similar to warrant the conclusion that the reassociation and reconstitution procedures did not produce a major rearrangement of histone epitopes at the surface of the chromatin subunits.

Analysis of acetylated core particles

To study the influence of histone acetylation on the structure of core particles, reconstitution experiments were performed with native core particle DNA and non-acetylated calf thymus H2A, H2B, and H3 plus H4 of different degrees of acetylation (Ac₁H4, Ac₂H4, and Ac₃H4). The various acetylated forms of H4 were isolated from cuttle-fish testis chromatin in which high levels of natural acetylation are present (Wouters-Tyrou *et al.*, 1981). The purity of the mono-, di-, and tri-acetylated forms of H4 was controlled by urea-polyacrylamide gel electrophoresis (Figure 4). The reconstitution yield was evaluated by counting several thousand core particles and free DNA molecules present on electron micrographs of reconstituted material and was found to be $67 \pm 2\%$ in all three cases of mono-, di-, and tri-acetylated core particles. This somewhat low reconstitution yield is probably due to some denaturation of H4 during the purification procedure, but is obviously not linked to the degree of acetylation of H4. The reconstituted core particles containing acetylated H4 were found to be correctly folded as judged by electron microscopy (Figure 2C); their molar ellipticity $|\theta|_{\max}$

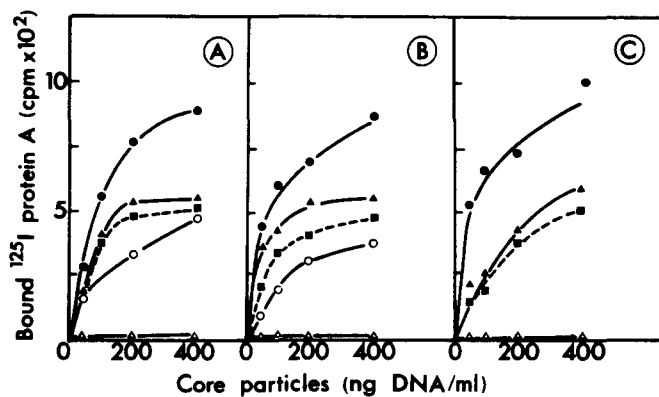


Fig. 3. Binding of various histone antisera (diluted 1:100) in RIA to increasing quantities of native chicken erythrocyte core particles (A); reassociated core particles (B); and reconstituted core particles (C). Antisera used: anti H2B (●—●), anti H3 (▲—▲), anti IRGERA (■—■), anti H2A (○—○), anti H4 (△—△). Binding of normal rabbit serum to the various preparations was insignificant.

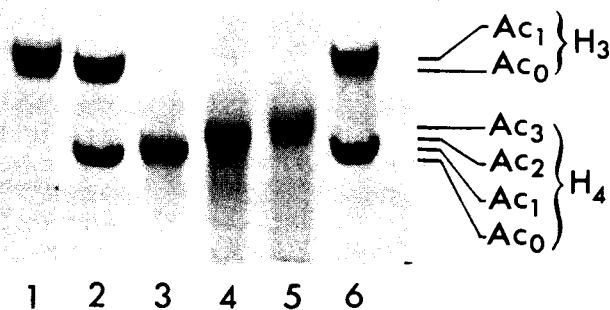


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the H3 and H4 used in core particles reconstituted experiments. (1) Control non-acetylated calf thymus H3; (2) calf thymus non-acetylated (H3-H4) complex; (3) mono-acetylated cuttle-fish testis H4; (4) di-acetylated cuttle-fish testis H4; (5) tri-acetylated cuttle-fish testis H4; (6) mono-acetylated calf thymus (H3-H4) complex. Electrophoresis was performed in 2.5 M urea (Panyim and Chalkley, 1969). The differently acetylated forms of H4 and H3 are indicated Ac₀ to Ac₃.

at 283.5 nm was found to be 3600 (\pm 150) degrees/cm²/dmol (Figure 1). This value is consistent with the presence of 67% properly folded core particles (θ = 1300) and 33% free DNA (θ = 8000). The remaining 33% of free histones (in aggregated state) had been eliminated by centrifugation. It seems, therefore, that the hyperacetylation of H4 does not lead to a major alteration of the biophysical characteristics of the core particles.

The influence of H4 acetylation on the immunochemical reactivity of the reconstituted core particles was tested with the histone antisera described above. Several binding curves obtained with particles showing different degrees of H4

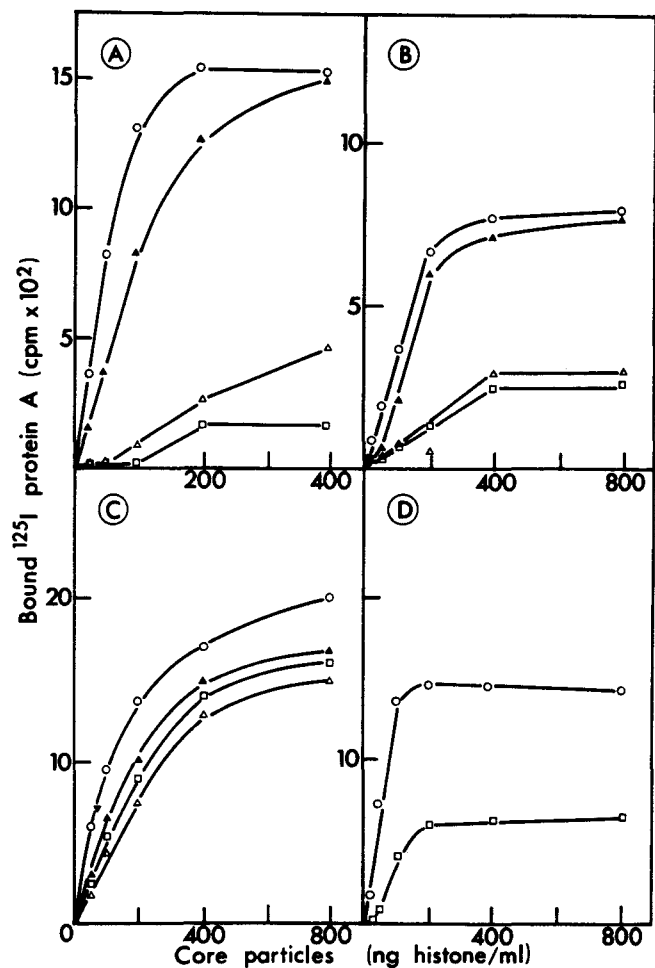


Fig. 5. Binding of various antisera (diluted 1:100) in RIA to increasing quantities of reconstituted chicken erythrocyte core particles (○—○) and reconstituted core particles containing the three calf thymus histones H3, H2A, H2B, and different forms of cuttle-fish H4: mono-acetylated form (▲—▲), di-acetylated form (△—△), or tri-acetylated form (□—□). Antisera used: anti H3 (A), anti IRGERA (B), anti H2B (C), anti H2A (D). Binding of normal rabbit serum was insignificant in all cases. The histone concentration was determined by assuming a histone/DNA ratio of 1.2 for the core particle and taking the reconstitution yield into account.

acetylation are presented in Figure 5 and the comparative binding percentages obtained in several experiments are summarized in Table I. The interaction between H3 and its specific antibodies decreased when the degree of acetylation of H4 increased from 0 to 3 (Figure 5A), the major effect being observed in the change from Ac₁H4 to Ac₂H4. When IRGERA antiserum was used, the same phenomenon was observed (Figure 5B). This means that increasing acetylation of H4 diminishes the accessibility of the C-terminal end of H3 at the surface of the core particle. Likewise, the accessibility of H2A to specific antibodies was also greatly decreased when tri-acetylated H4 was incorporated into core particles (Figure 5D) since a 56% decrease in antibody binding was observed (Table I). The binding of H2B antibodies (Figure 5C) seemed to be the least affected since only ~25% decrease in binding occurred and this was not dependent on the degree of H4 acetylation (Table I). This last result also demonstrates that the three populations of acetylated core particles bind equally well to the solid-phase in the RIA test, and confirms that the measured decrease in antibody binding is not due to an artefactual variation of antigen concentration in the test.

Table I. Comparative binding of histone antisera to core particles reconstituted with non-acetylated and acetylated H4 (Ac₀ to Ac₃) measured by RIA

Histones present in reconstituted core particles ^a : H3, H2B, H2A, and	Antisera ^b			
	anti H3	anti IRGERA ^c	anti H2A	anti H2B
Ac ₀ H4	100%	100%	100%	100%
Ac ₁ H4	59–98 ^d	47–100	–	74–86
Ac ₂ H4	17–32	23–41	–	62–79
Ac ₃ H4	10–12	16–32	44	72–86

^aCore particles used at 400 ng histone/ml.

^bAntisera were diluted 1:100.

^cIRGERA: C-terminal hexapeptide of histone H3 (see Muller *et al.*, 1982).

^dRange of percentage values obtained in three separate experiments.

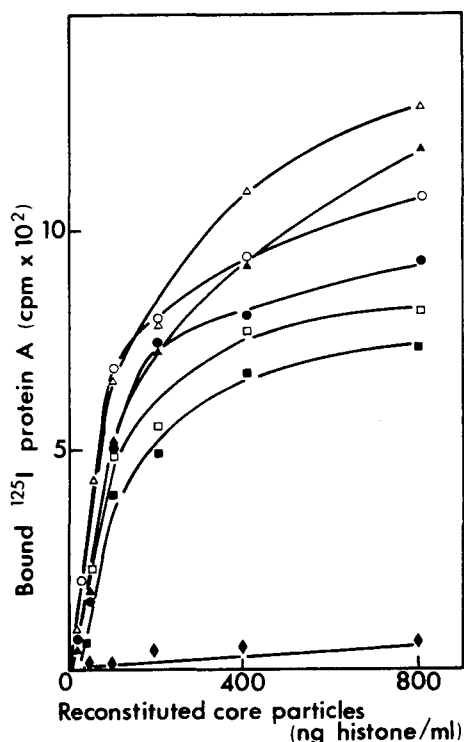


Fig. 6. Binding of various histone antisera (diluted 1:100) in RIA with increasing quantities of reconstituted core particles containing calf thymus H2B, H2A, and non-acetylated (closed symbols) or mono-acetylated (open symbols) H3-H4 complex. Antisera used: anti H2B (▲), anti H3 (●), anti IRGERA (■), normal rabbit serum (◆).

In a second series of experiments, core particles were reconstituted with calf thymus core histones H2A and H2B and non-acetylated or mono-acetylated H3 and H4 extracted as a complex (see Figure 4). In both cases, the reconstitution yield was ~90% and the core particles were correctly folded as shown by c.d. analysis and electron microscopy (data not shown). There was no significant difference in the binding of the various histone antisera to core particles with incorporated non-acetylated or mono-acetylated H3 and H4 (Figure 6). Although the presence of mono-acetylated H3 and H4 introduces the same number of acetyl groups in the core particles as when the diacetyl H4 is used for reconstitution

(four acetyl groups per core particle), the reactivity of the mono-acetylated H3-H4 core particles with respect to the H3 and IRGERA antibodies was not altered (compare Figures 5A and B with Figure 6). It seems that the location of the acetylation sites is more critical than the total number of acetyl groups introduced in the core particles.

Discussion

Among the possible histone modifications, it is chiefly acetylation that has been invoked as an activation mechanism of chromatin at the level of core particles. Acetylation is found in the N-terminal part of the core histones (De Lange *et al.*, 1975) and is likely to loosen DNA-histone interaction, thus offering an increased accessibility to RNA polymerase (Nelson *et al.*, 1980). Several workers have emphasized the correlation between an enhancement of histone acetylation and hypersensitivity to DNase I (Vidali *et al.*, 1978; Nelson *et al.*, 1978), and it is well-known that active chromatin regions show such a pattern of DNase I hypersensitivity (Weintraub *et al.*, 1976; Garel *et al.*, 1976). Furthermore, this modification is generally transient (Jackson *et al.*, 1975; Cousens *et al.*, 1979), which is a prerequisite to a dynamic process such as transcription.

The level of acetylation found in bulk chromatin and in preparations of core particles is normally rather low. At least two approaches have been used to obtain more highly acetylated core particles. One method consists of increasing the acetylation level of chromatin by growing cells in the presence of butyrate (Ripp *et al.*, 1977) and then extracting hyperacetylated core particles that are modified at the proper *in vivo* sites of H3 and H4. It has been shown that butyrate is a non-competitive inhibitor of deacetylases (Perry *et al.*, 1979). Simpson (1978) and Bode *et al.* (1980) detected no noticeable difference between core particles from butyrate-treated cells and control core particles by c.d. measurements.

Another method consists of selectively isolating acetylated histones from native bulk chromatin and using them to reconstitute core particles that are homogeneous with respect to the acetylation degree of H3 and/or H4. It is this approach which has been adopted in the present work, since it enables one to study the effect of a given acetylation pattern on the configuration of core particles. The Ac₃H4 used in this work was known to be acetylated at lysines 5, 12, and 16 (Wouters-Tyrou *et al.*, 1981). Our c.d. measurements showed no difference between various types of acetylated reconstituted core particles and non-acetylated ones, which means that no drastic structural modification had occurred upon acetylation. This conclusion is consistent with the similar appearance of all core particles in the electron microscope (Figure 2).

The use of antibodies for measuring the exposure of histone epitopes in core particles represents another sensitive method for determining the correctness of assembly in reconstituted core particles. Using antisera to the core histones, we found that the introduction of acetylated H4 into core particles led to several changes in their immunochemical reactivity. Binding to core particles of antibodies specific for H3 and for the IRGERA peptide of H3 was considerably reduced when Ac₂H4 or Ac₃H4 were used for reconstitution. It is known that the C-terminal IRGERA sequence of H3 is not involved in complex formation and is mobile and immunoreactive in free histone and chromatin (Moss *et al.*, 1976; Morris and Lewis, 1977; Böhm *et al.*, 1977, 1981; Muller *et al.*, 1982). Since in the Ac₃H4 used for

reconstitution the lysines are modified at positions 5, 12, and 16 (Wouters-Tyrou *et al.*, 1981), the resulting local decrease in positive charge probably induces in the core particle a conformational change that sterically hinders the binding of IRGERA antibodies. This result is consistent with the core particle model of Ohlenbusch (1979, 1981) that is based on an antiparallel alignment of histone homodimers and in which the N-terminal region of H4 and the C-terminal part of H3 are close neighbours. The fact that the reactivity of IRGERA antibodies was not affected when both mono-acetylated H3 and H4 were incorporated into core particles also supports this model, since it proposes that the acetylated N-terminal regions of H3 and H4 are at opposite ends of the particle (Ohlenbusch, 1981).

The conformational change induced by the presence of acetylated H4 in the core particle also caused a major decrease in the binding of H2A antibodies but had less influence on the binding of H2B antibodies. In the latter case, the binding to core particles was only reduced by ~25% and it made no difference whether H4 was mono-, di-, or tri-acetylated (Table I). The smaller effect of H4 acetylation on the binding of H2B antibodies may simply reflect the fact that histone H2B is the most accessible and immunoreactive histone in core particles (Bustin, 1979; Absolom and Van Regenmortel, 1978). In the case of H3, which is one of the least accessible histones in chromatin, it was found that specific H3 and IRGERA antibodies showed the largest drop in binding activity to acetylated core particles.

Furthermore, the immunochemical reactivity of H3 was progressively decreased when H4 of increasing degree of acetylation was incorporated into core particles. It is known that the conformational changes in chromatin induced by H4 acetylation are more pronounced when more lysine residues are modified; this finding is in agreement with the view that structural changes involved in the promotion of transcription are correlated with the presence of the most highly acetylated histones (Chahal *et al.*, 1980). Although other factors such as absence of H1, presence of HMG proteins, or presence of histone variants may also be required for promoting transcription, it is clear that the reversible acetylation of histones is correlated to the open structure of active chromatin. Acetylation of H4 is minimal at prophase and metaphase when chromosomes are highly condensed and little RNA synthesis is taking place, while it is maximal in mid S-phase and mid G2 phase (Chahal *et al.*, 1980).

Our results indicate that conformational changes induced by acetylation can be monitored with histone antibodies, and thus open the way to the development of immunochemical probes for identifying various stages of the cell cycle. If antibodies specific for the active configuration of chromatin components could be prepared, it may become possible to isolate active chromatin regions by immunochemical means.

Materials and methods

Preparation of core particles

Chicken erythrocyte native core particles were prepared and characterized as previously described (de Murcia *et al.*, 1980). Reassociated core particles were prepared from native core particles as follows: core particles were suspended, at a concentration of 2 mg DNA/ml, in buffer 'R' containing 20 mM Tris pH 7.4 and 1 mM EDTA, then dissociated by the addition of an equivalent volume of buffer R-4 M NaCl and finally reassociated by direct dilution of the histone-DNA mixture from 2 M to 0.25 M NaCl with buffer R.

Reconstituted core particles were made with native core particle DNA (146 bp) and stoichiometric amounts of the four isolated core histones. In a first

step, the four core histones, at a concentration of 2.5 mg/ml, were dissolved together in a medium containing 6 M urea, 4% v/v 2-mercaptoethanol, 0.01 M HCl, and left at room temperature for 12 h. The core histone solution was then dialysed against buffer R-2 M NaCl, 5 mM dithiothreitol and mixed with a core particle DNA solution (2 mg/ml) in buffer R-2 M NaCl. The ionic strength of this mixture was decreased by direct dilution with buffer R from 2 M to 0.25 M NaCl. When required, turbid solutions were clarified by centrifugation (20 min, 47 000 g); this treatment did not produce a significant decrease of o.d. 260 nm.

Preparation of histones

Chicken erythrocyte and calf thymus core histones, H2A, H2B, H3, and H4, were either acid-extracted and purified by chromatography (Johns, 1964) or purified by the saline method of Van der Westhuyzen and Von Holt (1971). The purity of the proteins was assessed by electrophoresis on 18% polyacrylamide-SDS gel. Calf thymus non-acetylated or mono-acetylated H3 and H4 were isolated as equimolecular complexes (H3-H4) by ion-exchange chromatography on Bio-Rex 70 (Bio Rad) of an equimolecular mixture of pure H3 and H4 histones (Coupez *et al.*, in preparation). The di- and tri-acetylated forms of H4, which are naturally present in large amount in cuttle-fish testes, were obtained as such by the same chromatographic procedure. The degree of acetylation was checked by polyacrylamide gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea (Panyim and Chalkley, 1969) using a 17% acrylamide concentration. The amino acid sequence of cuttle-fish histone H4 is similar to that of calf thymus H4 and three residues of lysine at positions 5, 12, and 16 were found to be acetylated (Wouters-Tyrou *et al.*, 1981).

C.d. experiments

C.d. measurements on core particles were performed in buffer R-0.25 M NaCl as previously described (de Murcia *et al.*, 1980). The results are presented in terms of molar ellipticity $[\theta]$ (in degrees/cm²/dmol) based on the molar nucleotide concentration determined from an extinction coefficient of 6600.

Electron microscopy

The samples used for c.d. measurements were diluted to 0.5 µg/ml in 10 mM triethanolamine pH 7.4 and spread on carbon-coated grids positively charged, according to the method of Dubochet *et al.* (1971).

Preparation of antisera

Antisera against purified H2B, H2A, H3, and H4 of chicken erythrocyte were prepared by immunizing rabbits with histone-RNA complexes (3:1 w/w) as described by Stollar and Ward (1970). Antisera were also raised against the C-terminal hexapeptide of H3 (of sequence IRGERA) as described previously (Muller *et al.*, 1982). In control RIA experiments, no binding was observed between each specific histone antiserum and non-related histones used at a concentration of 400 ng histone/ml. It has been verified that histone antisera reacted about equally strongly with homologous chicken erythrocyte histones as with the corresponding calf thymus histones.

Solid-phase RIA

The assay was performed as described by Muller *et al.* (1982). Briefly, flexible microtitre plates were coated overnight at 37°C with 250 µl antigen in phosphate buffered saline (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20 and 1 mM EDTA. Washed coated wells were then incubated for 3 h at 37°C with diluted antiserum. After washing, 250 µl (4 × 10⁴ c.p.m./ml) of ¹²⁵I-labelled protein A (60–100 mCi/mg) was added (Radiochemical Centre, Amersham, UK). After 1 h incubation at 37°C and extensive rinsing, the individual wells were cut out and the bound radioactivity counted in a gamma counter. The counting background was ~100 c.p.m. and was subtracted from the specific counts. The coefficient of variation of net counts observed in the same plate was ~10%.

Acknowledgements

Thanks are due to Drs. M. Daune and H. Ohlenbusch for helpful discussions, and to D. Buhr for technical assistance. This work was supported in part by grants (to M.H.V., V.R., and E.B.) from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

References

- Absolom, D., and Van Regenmortel, M.H.V. (1977) *FEBS Lett.*, **81**, 419-422.
- Absolom, D., and Van Regenmortel, M.H.V. (1978) *FEBS Lett.*, **85**, 61-64.
- Arnon, R., and Geiger, B. (1977) in Glynn, N.E., and Steward, M.W. (eds.), *Immunochemistry: an Advanced Textbook*, Wiley, NY, pp. 307-363.
- Atassi, M.Z., and Smith, J.A. (1978) *Immunochemistry*, **15**, 609-610.
- Bode, J., Henco, K., and Wingender, E. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **110**, 143-152.

S. Muller et al.

- Böhm, L., Hayashi, H., Cary, P.D., Moss, T., Crane-Robinson, C., and Bradbury, E.M. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **77**, 487-493.
- Böhm, L., Briand, G., Sautière, P., and Crane-Robinson, C. (1981) *Eur. J. Biochem.*, **119**, 67-74.
- Bustin, M. (1979) in Arber, W., Falkow, S., Henle, W., Hofschneider, P.H., Humphrey, J.H., Klein, J., Koldovsky, P., Koprowski, H., Maaloe, O., Melchers, F., Rott, R., Schweiger, H.G., Syrucek, L., and Vogt, P.K. (eds.), *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer Verlag, Berlin, vol. **88**, pp. 105-142.
- Chahal, S.S., Matthews, H.R., and Bradbury, E.M. (1980) *Nature*, **287**, 76-79.
- Cousens, L.S., Gallwitz, D., and Alberts, B.M. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 1716-1723.
- De Lange, R.J., and Smith, E.L. (1975) *Ciba Found. Symp.*, **28**, 59-70.
- De Murcia, G., Mazen, A., Erard, M., Pouyet, J., and Champagne, M. (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 767-779.
- Dubochet, J., Duncannon, M., Zollinger, M., and Kellenberger, E. (1971) *J. Ultrastruct. Res.*, **35**, 147-167.
- Garel, A., and Axel, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3966-3970.
- Jackson, V., Shires, A., Chalkley, R., and Cranner, D.K. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 4856-4863.
- Johns, E.W. (1964) *Biochem. J.*, **92**, 55-59.
- Mathis, D., Oudet, P., and Chambon, P. (1980) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, **24**, 1-55.
- Morris, G., and Lewis, P.N. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **77**, 471-477.
- Moss, T., Cary, P.D., Crane-Robinson, C., and Bradbury, E.M. (1976) *Biochemistry (Wash.)*, **15**, 2261-2267.
- Muller, S., Himmelspach, K., and Van Regenmortel, M.H.V. (1982) *EMBO J.*, **1**, 421-425.
- Mura, C.V., Mazen, A., Neelin, J.M., Briand, G., Sautière, P., and Champagne, M. (1980) *Eur. J. Biochem.*, **108**, 613-620.
- Nelson, D., Perry, M., Sealy, L., and Chalkley, R. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 1346-1353.
- Nelson, D., Covault, J., and Chalkley, R. (1980) *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1745-1763.
- Ohlenbusch, H.H. (1979) *Naturwissenschaften*, **66**, 206-207.
- Ohlenbusch, H.H. (1981) *Speculations Sci. Technol.*, **4**, 359-366.
- Panyim, S., and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, **130**, 337-346.
- Perry, M., Nelson, D., Moore, M., and Chalkley, R. (1979) *Biochem. Biophys. Acta*, **561**, 517-525.
- Ripp, M.G., Whittaker, R.G., Neumann, J.R., and Ingram, V.M. (1977) *Nature*, **268**, 462-464.
- Romac, J., Bouley, J.P., and Van Regenmortel, M.H.V. (1981) *Anal. Biochem.*, **113**, 366-371.
- Sela, M. (1969) *Science (Wash.)*, **166**, 1365-1374.
- Simpson, R.T. (1978) *Cell*, **13**, 691-699.
- Stollar, B.D., and Ward, M. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 1261-1266.
- Van den Westhuyzen, D.R., and Von Holt, C. (1971) *FEBS Lett.*, **14**, 333-337.
- Vidali, G., Boffa, L.C., Bradbury, E.M., and Allfrey, V.G. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2239-2243.
- Weintraub, H., and Groudine, M. (1976) *Science (Wash.)*, **193**, 848-856.
- Wouters-Tyrou, D., Martin-Ponthieu, A., Sautière, P., and Biserte, G. (1981) *FEBS Lett.*, **128**, 195-200.

Histone H4 from Cuttlefish Testis Is Sequentially Acetylated

COMPARISON WITH ACETYLATION OF CALF THYMUS HISTONE H4*

(Received for publication, July 14, 1986)

Maurice Coupez†, Annie Martin-Ponthieu, and Pierre Sautière*From the Unité 409 Centre National de la Recherche Scientifique, Institut de Recherche sur le Cancer, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France*

The differently acetylated subfractions of histone H4 isolated from cuttlefish testis and from calf thymus were separated by ion exchange chromatography on sulfopropyl-Sephadex, using a shallow linear gradient of guanidine hydrochloride in the presence of 6 M urea at pH 3.0.

The tetra-, tri-, di-, mono-, and nonacetylated forms of cuttlefish H4 represent 2, 6.4, 18, 32.2, and 41.4% of the whole histone, respectively. The di-, mono-, and nonacetylated forms of calf H4 represent 11.7, 41.3, and 44% of the whole histone, respectively.

The acetylation sites were determined in each subfraction by identification of the acetylated peptides. In each acetylated H4 subfraction, the acetylated tryptic peptides were identified by peptide mapping and amino acid analysis with reference to the peptide map of nonacetylated H4.

In cuttlefish testis H4, lysine 12 is the main site of acetylation in the monoacetylated subfraction; lysines 5 and 12 are found acetylated in diacetylated H4; lysines 5, 12, and 16 are found acetylated in triacetylated H4. From these results and the stoichiometry of the different H4 subfractions, it can be concluded that lysine 5 is acetylated after lysine 12.

In calf thymus, lysine 16 is the only site of acetylation in the monoacetylated subfraction. All the diacetylated forms are acetylated in lysine 16, the second site of acetylation being, in decreasing order, lysine 12, lysine 5, or lysine 8. These observations suggest that acetylation occurs in a sequential manner. Moreover, the sites of acetylation depend upon the biological event in which acetylation is involved.

review, see Refs. 1 and 2). It has been suggested that these amino-terminal regions could, in interacting with the DNA, play a role either in the nucleosomal organization and/or in the formation and the keeping of higher order structures of the chromatin (3-5). By contrast with the amino-terminal regions of histones H2A and H2B, the amino-terminal regions of histone H3 (fragment 1-30) and H4 (fragment 1-20) are highly conserved (6, 7), with the single exception of *Tetrahymena* H4 (8, 9).

The interaction between DNA and the amino-terminal regions of the core histones can be modulated by postsynthetic modifications such as acetylation, which particularly affect histones H3 and H4, and to a lesser extent histones H2A and H2B (2, 6). Thus, the 4 lysine residues at positions 5, 8, 12, and 16 of the amino acid sequence of histone H4 can be reversibly acetylated. Histone acetylation is correlated with biological events such as DNA transcription and replication, histone synthesis, and the protamine deposition on DNA (2, 10, 11).

In this paper, we present a study of histone H4 4 subfractions of known degree of acetylation, isolated from two different tissues, cuttlefish testis and calf thymus, where histone acetylation can be correlated more specifically with a biological process (e.g. spermatogenesis in testis). In each subfraction, the acetylated sites were determined from the peptide map of the tryptic hydrolysate. Before precise identification by amino acid analysis, the interesting spots for our purpose (spots corresponding to nonacetylated and to acetylated peptides from the amino-terminal region) were pointed out by comparing the tryptic map of the nonacetylated H4 with: (i) those of H4 fragments 1-23 and 20-102 and (ii) the tryptic peptide maps obtained from the different acetylated H4 subfractions.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of Histone H4—Histone H4 was directly obtained in pure form, from cuttlefish testis or calf thymus chromatin by a slight modification of the method of Johns (12-14).

Fractionation of Histone H4 According to the Content in N^ε-Acetyllysine—Cuttlefish or calf thymus histone H4 was dissolved in a solution containing 0.47 M (4.5%) GdnHCl¹ (from Sigma, grade I), 6 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol, adjusted to pH 3.0 with HCl and applied to a sulfopropyl-Sephadex C-25 column equilibrated in the same solution. The column was then eluted with a linear gradient of GdnHCl in 6 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol, pH 3.0, from 0.47 M-0.66 M (6.3%). Finally, after washing with a solution containing 2 M GdnHCl, 6 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol and equilibration, the column was ready for another run. The protein concentration in the eluate was determined from aliquots by absorbance at 400 nm after precipitation by trichloroacetic acid at a final concentration of 1.1 M. Fractions were then pooled and desalted on a Sephadex G-25 column (5 × 70 cm) equilibrated in 10 mM HCl. After lyophilization, the

The amino-terminal regions of the core histones have a composition, a conformation, and a function quite different from those of the remaining part of the histone molecules. Indeed, these regions contain a large amount of basic amino acids and very few dicarboxylic and hydrophobic amino acids. In solution and in the absence of DNA, they are in random-coil conformation. They do not participate in histone-histone interactions and in the keeping of the structural organization of the core particle: thus, the fundamental structure of the core particle is maintained when the amino-terminal regions of the core histones are removed by tryptic hydrolysis (for

* This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique and by a grant from la Fondation pour la Recherche Médicale. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence and requests for reprints should be addressed.

¹ The abbreviation used is: GdnHCl, guanidine hydrochloride.

protein fractions were analyzed by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 3.2 in 6.25 M urea (15) using a 17% acrylamide concentration.

Limited Trypsin Hydrolysis—In order to obtain large fragments, hydrolysis of whole calf histone H4 (80 mg) with trypsin (EC 3.4.21.4) (treated with tosylphenylalanyl chloromethyl ketone) was carried out in 8 ml of 0.5 M NaCl, 0.1 M ammonium bicarbonate, pH 8.3, at 20 °C for 3 h using an enzyme to substrate ratio of 1:5000 (w/v). The reaction was stopped by the addition of solid GdnHCl up to a final concentration of 4 M and of 2-mercaptoethanol up to a final concentration of 0.3 M. The hydrolysate was left overnight at room temperature. It was then acidified to pH 2.0 and fractionated on two columns of Sephadex G-100 (5 × 90 cm) connected in series, equilibrated, and

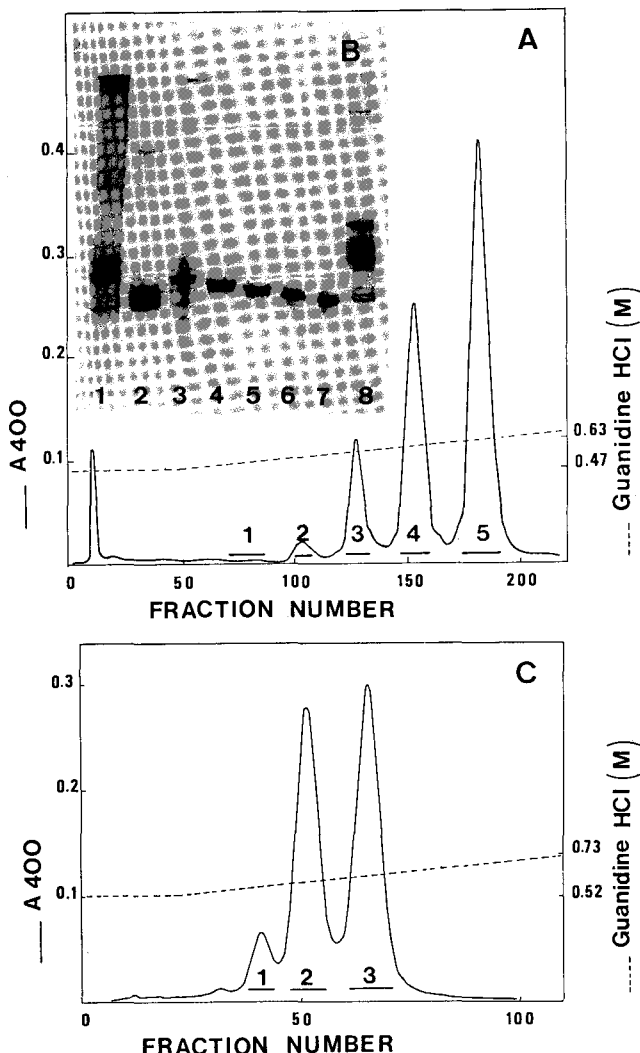


FIG. 1. Separation of acetylated and nonacetylated forms of histone H4. Ion exchange chromatography and gel electrophoresis were carried out as described under "Materials and Methods." A, 170 mg of cuttlefish histone H4 were applied to a sulfopropyl-Sephadex C-25 column (2.5 × 85 cm). Elution was performed with a linear gradient of guanidine HCl in 6 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol, pH 3.0, from 0.47–0.66 M (total volume 3000 ml) at a flow rate of 11.1 ml/h. 16.7-ml fractions were collected and pooled as indicated by solid bars. B, analytical electrophoresis on polyacrylamide slab gel (160 × 140 × 0.75 mm) in 0.9 M acetic acid, 6.25 M urea. Gel was run for 4 h at 22 mA and stained for 15 h with 0.5% Coomassie Blue R in acetic acid:ethanol:water (1:2:7). Lane 1, whole histone from cuttlefish testis; lane 2, cuttlefish testis histone H4; lanes 3–7, peaks 1 to 5 from Fig. 1A; lane 8, whole histone from calf thymus. C, 90 mg of calf thymus histone H4 were applied to a sulfopropyl-Sephadex C-25 column (1.6 × 85 cm). Elution was performed with a linear gradient of guanidine HCl in 6 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol, pH 3.0, from 0.52–0.66 M (total volume 715 ml) at a flow rate of 6 ml/h. 10.5-ml fractions were collected and pooled as indicated by solid bars.

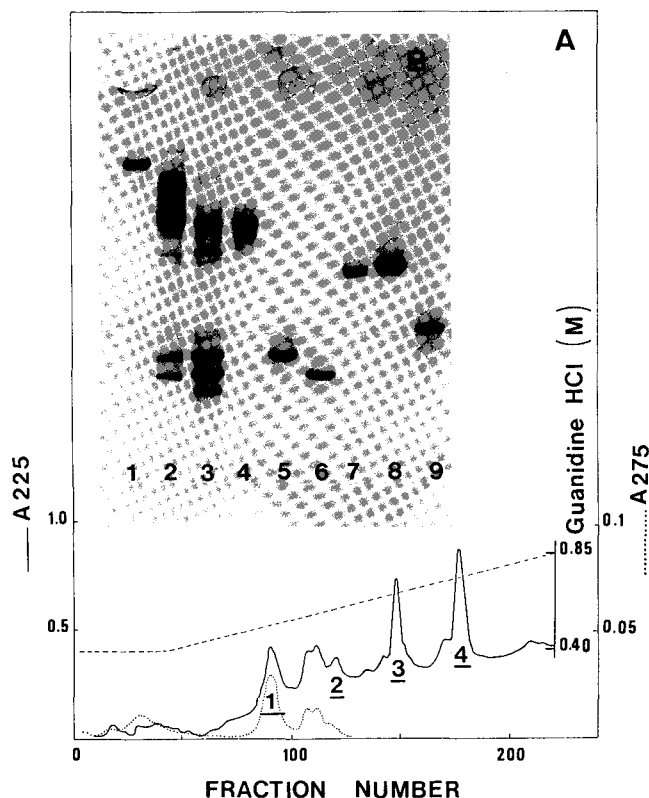


FIG. 2. Purification of peptide 1–23 generated by cleavage of histone H4 at aspartyl residues. A, separation on a sulfopropyl-Sephadex C-25 column (1.6 × 80 cm) of the mixture of peptides 1–23 and 69–102 obtained by Sephadex G-50 chromatography (see "Materials and Methods"). Elution was performed with a linear gradient of guanidine HCl in 6 M urea, pH 3.0, from 0.4–0.85 M (total volume 1100 ml) at a flow rate of 6.2 ml/h. 6.2-ml fractions were collected. B, analytical electrophoresis on polyacrylamide slab gel (160 × 140 × 0.75 mm) in 0.9 M acetic acid, 2.5 M urea. Gel was run for 75 min at 22 mA and stained with Coomassie Blue R as described in legend of Fig. 1B. Lane 1, calf thymus histone H4; lane 2, total acetic acid hydrolysate; lane 3, mixture of peptides 1–23 and 69–102; lanes 4, 5, 6, fractions 1, 3, and 4 from Fig. 2A. Lanes 7 and 8, chemically tetraacetylated peptide 1–23; lane 9, fraction 2 from Fig. 2A after further purification on a Bio-Gel P-10 column eluted with 10 mM HCl.

eluted with 10 mM HCl saturated in chloroform.

Acetic Acid Cleavage—Cleavage at aspartyl residues was performed by the method of Schroeder *et al.* (16). 200 mg of whole calf thymus histone H4 were hydrolyzed in 20 ml of 0.25 M acetic acid for 16 h at 105 °C. The mixture of peptides obtained was first fractionated on a Sephadex G-50 fine column (5 × 150 cm) equilibrated and eluted with 10 mM HCl saturated with chloroform. The fractions containing peptide 1–23 were pooled, freeze-dried, and applied to a sulfopropyl-Sephadex C-25 column (1.6 × 80 cm) equilibrated in 0.4 M GdnHCl, 6 M urea, pH 3.0, and eluted with a linear gradient of GdnHCl in 6 M urea, pH 3.0, from 0.4–0.85 M. The peptides were recovered by lyophilization after desalting on a Sephadex G-25 column (5 × 30 cm) equilibrated and eluted with 10 mM HCl.

Chemical Acetylation of Peptide 1–23 (H4)—The procedure was essentially that described by Riordan and Vallee (17). 5 mg of peptide 1–23 (H4) were dissolved in 0.5 ml of water; an equal volume of saturated solution of sodium acetate was added. The solution was stirred on ice and 5 μ l of acetic anhydride were added. The pH was kept to 8.0 with 1 M NaOH. Stirring was continued for 2 h. The solution was then adjusted to pH 3.0 with acetic acid. The modified peptide was desalted on a Sephadex G-25 column (1.6 × 30 cm) and lyophilized.

Characterization of the Fragments—The purity of the histone fragments was checked by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M urea (15) using a 20% acrylamide concentration. The histone fragments were characterized by amino acid analysis performed on a Beckman 119 CL amino acid analyzer after hydrolysis

Acetylation Sites in Histone H4 Subfractions

TABLE I

Amino acid composition of histone H4 peptides

The results are expressed in moles of residues per mole of peptide. The numbers in parentheses are deduced from the sequence (21, 22). No correction for hydrolytic losses was made. Contaminations smaller than 0.25 mol/mol of peptide are not indicated. Fragment 1-23 was obtained by cleavage at aspartyl residues. Fragment 20-102 was generated by limited tryptic hydrolysis. The other peptides were derived from the tryptic digestion of acetylated or nonacetylated forms of histone H4. The peptide maps were stained with fluorescamine, and the peptides were eluted as described under "Materials and Methods."

Amino acid	Nonacetylated peptides						Acetylated peptides					
	1-23	20-102	4-5 (spot 6)	6-8 (spot 5)	4-8 (spot 7)	9-12 (spot 2)	13-16 (spot 4)	4-8 (spot f)	6-12 (spot d)	9-16 (spot c)	9-17 (spot b)	13-17 (spot e)
Asp		5.5 (5)			0.4 (0)			0.4 (0)	0.3 (0)			
Thr		6.4 (7)						0.3 (0)	0.3 (0)		0.3 (0)	
Ser	0.9 (1)	1.6 (1)		0.3 (0)	1.0 (0)	0.4 (0)	0.3 (0)	0.7 (0)	0.6 (0)	0.5 (0)	0.4 (0)	
Glu		7.1 (6)	0.3 (0)	0.3 (0)	0.7 (0)	0.4 (0)	0.3 (0)	0.9 (0)	0.6 (0)	0.5 (0)	0.6 (0)	
Pro		1.3 (1)										
Gly	8.0 (8)	8.5 (9)	1.0 (1)	1.9 (2)	3.2 (3)	2.0 (2)	2.1 (2)	3.3 (3)	4.1 (4)	4.0 (4)	3.5 (4)	1.6 (2)
Ala	1.1 (1)	7.0 (6)			0.4 (0)	0.3 (0)	1.0 (1)	0.4 (0)	0.5 (0)	1.2 (1)	1.3 (1)	1.0 (1)
Val	1.1 (1)	7.3 (9)						0.4 (0)				
Met		0.9 (1)										
Ile		5.1 (6)									0.4 (0)	
Leu	2.1 (2)	7.6 (7)				1.0 (1)			1.2 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)	
Tyr		3.7 (4)										
Phe		1.9 (2)										
His	1.0 (1)	1.6 (1)										
Lys	4.8 (5)	6.8 (7)	1.0 (1)	1.1 (1)	1.8 (2)	1.0 (1)	0.8 (1)	1.7 (2)	1.8 (2)	1.9 (2)	2.0 (2)	1.0 (1)
Arg	4.0 (4)	10.7 (11)	0.4 (0)	0.6 (0)		0.7 (0)	0.4 (0)		0.4 (0)		1.1 (1)	1.4 (1)

in 6 M HCl (1 ml/mg protein) at 110 °C for 24 h *in vacuo*, with one drop of 1% phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Complete Digestion with Trypsin and Peptide Mapping—Tryptic digestion was performed at 37 °C for 3 h in a conical tube using a magnetic flea for stirring. Usually, 0.5 mg of histone or peptide was dissolved in 50 μ l of 0.1 M *N*-methylmorpholine acetate, pH 8.0. 10 μ g of trypsin (treated with tosylphenylalanyl chloromethyl ketone) were added at zero time and after 90 min (final enzyme to substrate ratio, 1:25 by weight). The hydrolysis was stopped by addition of 12 μ l of 70% formic acid. 5-10- μ l aliquots of the acidified hydrolysate were directly spotted onto a cellulose thin layer plate (20 \times 20 cm) (Polygram Cel 300, 0.1 mm, Macherey and Nagel, Düren, West Germany). Prior to use, the plates were washed successively with 5% pyridine and 10% acetic acid. The sheets were first developed by ascending chromatography in 1-butanol:pyridine:acetic acid:water (7:5:2:6), followed by electrophoresis in the perpendicular direction at pH 3.4 in pyridine:acetic acid:water (1:10:289) for 80 min at 330 V. The peptides were located by staining with ninhydrin-cadmium reagent (18). Amounts of peptides ranging from 2-10 nmol were easily detectable on the thin layer plates. The arginine-containing peptides and the free arginine were revealed with the phenanthrenequinone reagent. Alternatively, the peptides were detected with fluorescamine, and the spots were scraped off. The peptides were eluted from the cellulose with 6 M HCl and hydrolyzed at 110 °C for 24 h for amino acid analysis.

RESULTS

Separation of the Different Acetylated Forms of Histone H4 on Sulfopropyl-Sephadex—The chromatographic separations on sulfopropyl-Sephadex were performed at pH 3.0. At this pH, histone aggregation is minimized, and carbamylation by urea of the lysine residues is avoided. On the other hand, the use of GdnHCl for the equilibration and the elution buffers increases the dissociating properties of the buffers. The proteins were recovered with an approximate yield of 80%.

The elution profile of the fractionation of acetylated and nonacetylated forms of cuttlefish histone H4 is presented in Fig. 1A.

Fig. 1B shows the electrophoretic migration of chromatographic fractions 1-5 corresponding to H4 tetra-, H4 tri-, H4 di-, H4 mono-, and H4 nonacetylated, respectively, and representing 2, 6.4, 18, 32.2, and 41.4% of the whole H4, respectively.

Fig. 1C represents the elution profile obtained from calf thymus histone H4.

The di-, mono-, and nonacetylated calf H4 (fractions 1, 2, and 3, respectively) represent 11.7, 41.3, and 44% of the whole H4, respectively. The small fraction eluted earlier than fraction 1 (diacetylated H4) contains triacetylated H4 and accounts for only 3% of the whole H4.

These results are in complete agreement with those of Wangh *et al.* (19) who have used CM-cellulose chromatography with the ethanol:formic acid mixture to separate the acetylated subspecies of calf histone H4.

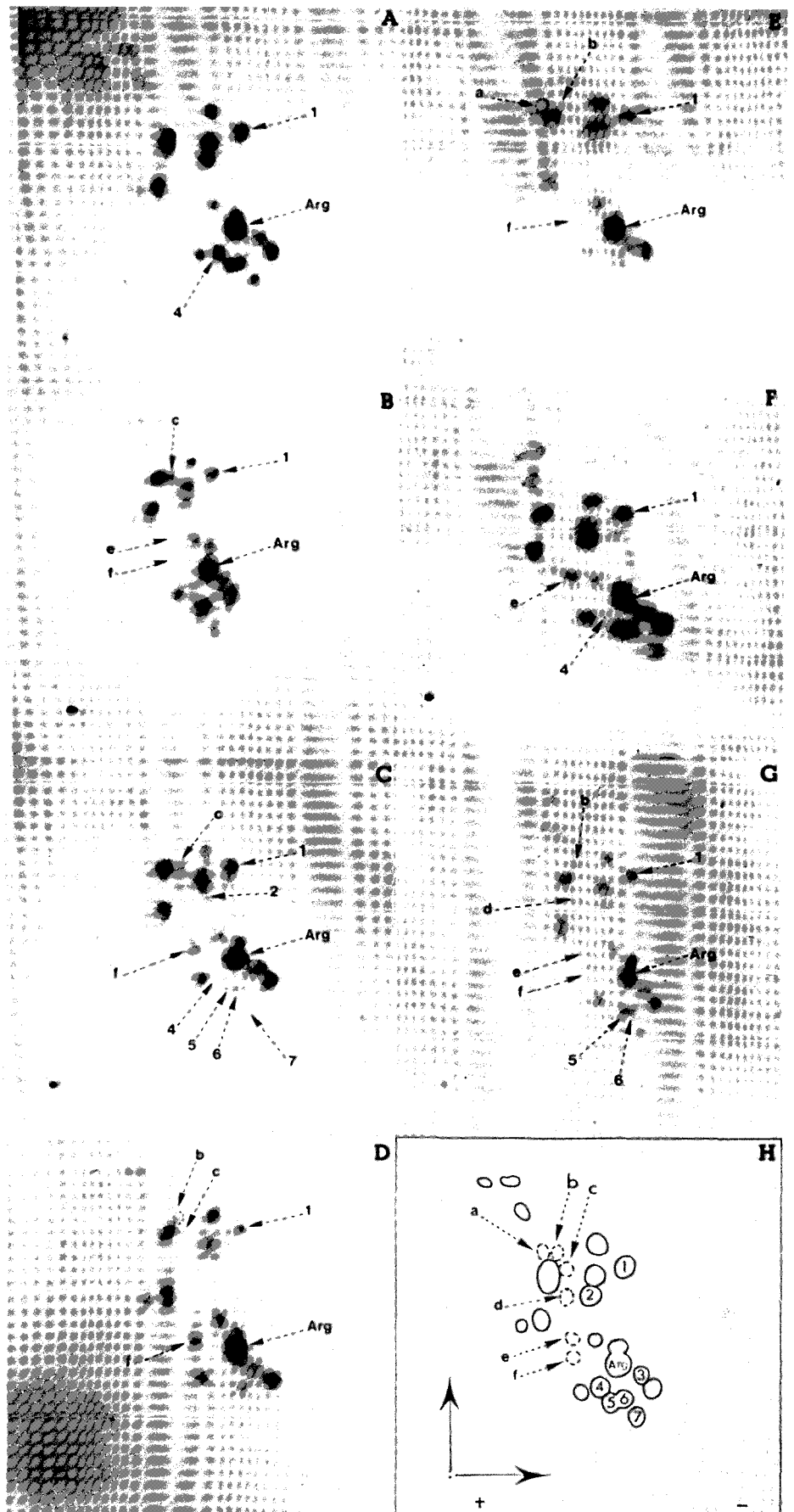
Peptides Obtained by Cleavage at Aspartyl Residues—The fragments obtained by cleavage of histone H4 at aspartyl residues were separated first by gel filtration chromatography on Sephadex G-50. The elution profile (not shown) was very similar to that obtained by Lewis *et al.* (20). Fragment 1-23, co-eluting with fragment 69-102, was further purified by ion exchange chromatography on sulfopropyl-Sephadex with a methodology identical with that used for the separation of the acetylated subspecies of histone H4. Four fractions were obtained. The first fraction corresponds to fragment 69-102. The fractions 2-4 correspond to diacetylated, monoacetylated, and nonacetylated fragment 1-23, respectively (Fig. 2 and Table I).

The small peaks which appear before fractions 3 and 4 contain fragment 1-24 resulting from an incomplete enucleation of aspartyl residue at position 24 in H4 histone (data not shown).

Peptides Obtained by Limited Hydrolysis with Trypsin—The limited hydrolysis of histone H4 with trypsin in 0.5 M NaCl at pH 8.3 yields at first two large fragments (18-102 and 20-102) which undergo further hydrolysis to give the fragment 40-102. Thus, we have obtained the peptide 20-102 (in small amount) and the peptide 40-102. These peptides were identified by amino acid composition and manual Edman degradation.

Peptide Mapping of H4 Subfractions—The degree of acetylation, as well as the site(s) of acetylation of the different subspecies of histone H4, were checked by mapping the tryptic peptides generated from these substrates. The narrow speci-

FIG. 3. Peptide mapping of tryptic hydrolysates of nonacetylated and acetylated forms of histone H4 from cuttlefish testis and calf thymus. Chromatography was from *bottom to top*. Electrophoresis was from *left to right*. Peptides were stained with ninhydrin cadmium reagent. Most of the peptides were stained in purple or brown-orange, except the carboxyl-terminal peptide (located near the running front of chromatography) and the acetylated peptides lettered *a*, *b*, and *e* which were light yellow-colored and are barely visible on the pictures. *A*, *B*, *C*, *D*, and *E* are the tryptic peptide maps of non-, mono-, di-, tri-, and tetraacetylated cuttlefish histone H4. *F* and *G* are the tryptic peptide maps of mono- and diacetylated calf histone H4. *H* is the diagram of the peptide maps of nonacetylated histone H4 with superimposed acetylated peptides. Peptides from nonacetylated H4 are outlined by a *solid line*, those from the amino-terminal region (residues 1–23) being numbered as follows: *spot 1* (residues 20–23), *spot 2* (residues 9–12), *spot 3* (residues 18–19), *spot 4* (residues 13–16), *spot 5* (residues 6–8), *spot 6* (residues 4–5), *spot 7* (residues 4–8). Peptides found only in acetylated subfractions are outlined by a *broken line* and are marked with *small letters* (see also Fig. 5).



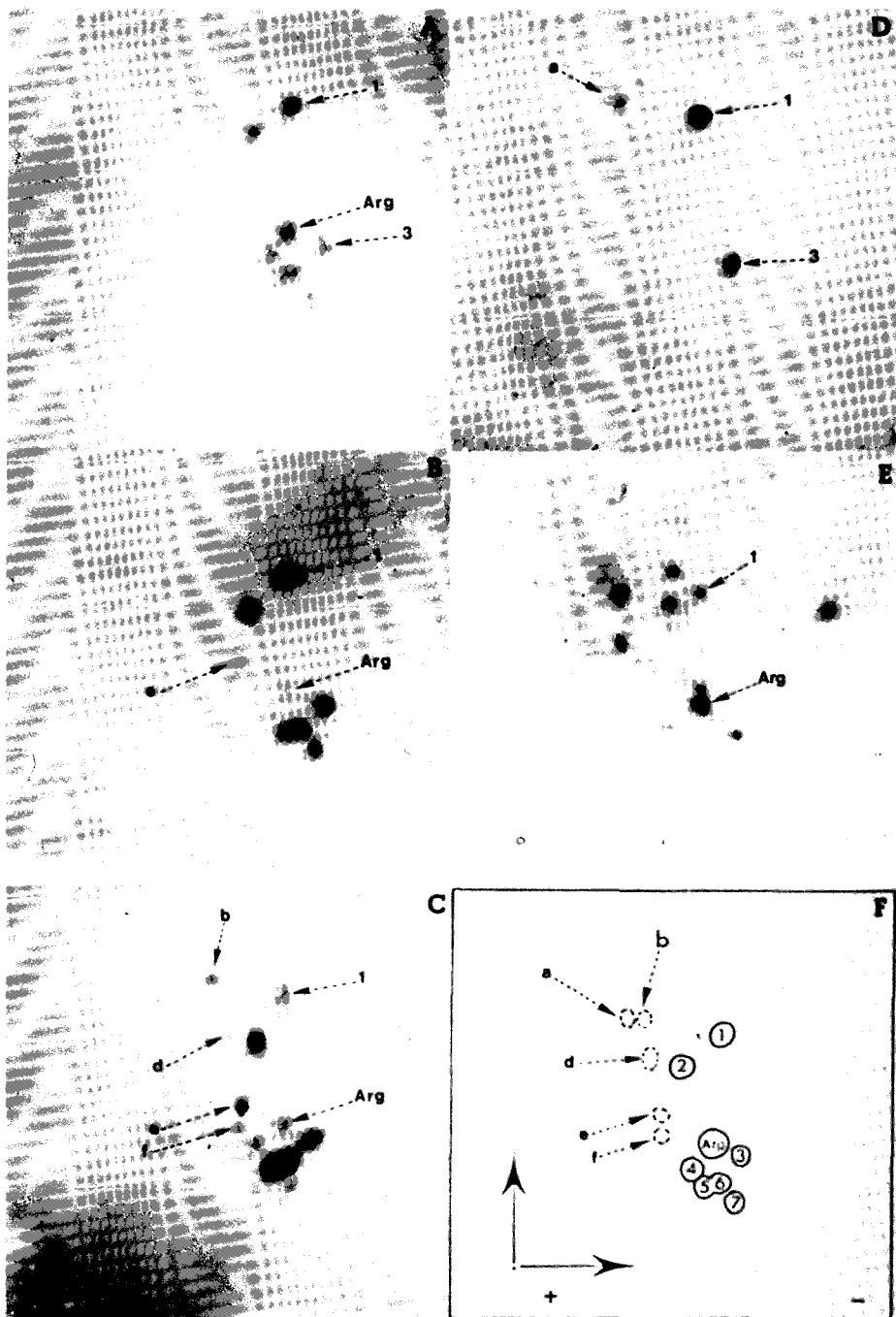


FIG. 4. Peptide mapping of tryptic hydrolysates of fragments 1-23 and 20-102 from calf thymus H4. Chromatography, electrophoresis, and staining were performed as in Fig. 3. A, B, C, and D are the peptide maps of tryptic hydrolysates of fragments 1-23. A, nonacetylated; B, naturally monoacetylated; C, naturally diacetylated; D, chemically tetraacetylated. E, the peptide map of tryptic hydrolysate of fragment 20-102; F, diagram of peptide maps A, B, C, and D. Spots from the nonacetylated fragment 1-23 (A) are outlined by a solid line, acetylated peptides found in B, C, and D are outlined by a broken line. The identification of the spots is indicated in the legend of Fig. 3.

ficity of the trypsin and the absence of cleavage of the N^{ϵ} -acetyllysyl bonds were taken into account for the purpose of our study.

The tryptic peptide maps obtained from non-, mono-, di-, tri-, and tetraacetylated cuttlefish histone H4 are presented in Fig. 3, A-E. The nonacetylated calf thymus H4 gives a map identical with that obtained for nonacetylated cuttlefish H4 and is not shown. The map from mono- and diacetylated calf thymus H4 are different from those of the homologous cuttlefish H4 subfractions and are shown in Fig. 3, F-G.

The examination of these peptide maps leads to the distinguishing of three sets of peptides.

The first set consists of peptides (*lettered spots*, Figs. 3 and 4) appearing only in acetylated species. These spots correspond to acetylated peptides. The amino acid analysis of the peptides corresponding to the lettered spots is in accordance with the presence of N^{ϵ} -acetyllysine in these peptides (Table

I) and with the sequences shown in Fig. 5.

The second set corresponds to peptides found in nonacetylated H4 and likely to be absent in acetylated histone H4. Examination of the amino-terminal sequence of histone H4 shows that these spots must correspond to lysine-containing peptides 4-5, 6-8, 9-12, and 13-16. The amino acid composition performed on spots 2 and 4 led us to identify unequivocally the peptide 9-12 and 13-16, respectively. The three spots 5, 6, and 7 only contain glycine and lysine and correspond to peptides Gly-Gly-Lys (residues 6-8), Gly-Lys (residues 4-5), and Gly-Lys-Gly-Gly-Lys (residues 4-8), respectively. The latter results from an incomplete hydrolysis of the Lys-Gly bond at residues 5-6 by trypsin, mentioned previously by De Lange *et al.* (21) and Ogawa *et al.* (22).

The third set of peptides corresponds to the spots which are not modified when histone H4 is acetylated, *i.e.* spots of tryptic peptides located beyond the residue 17. (Noteworthy,

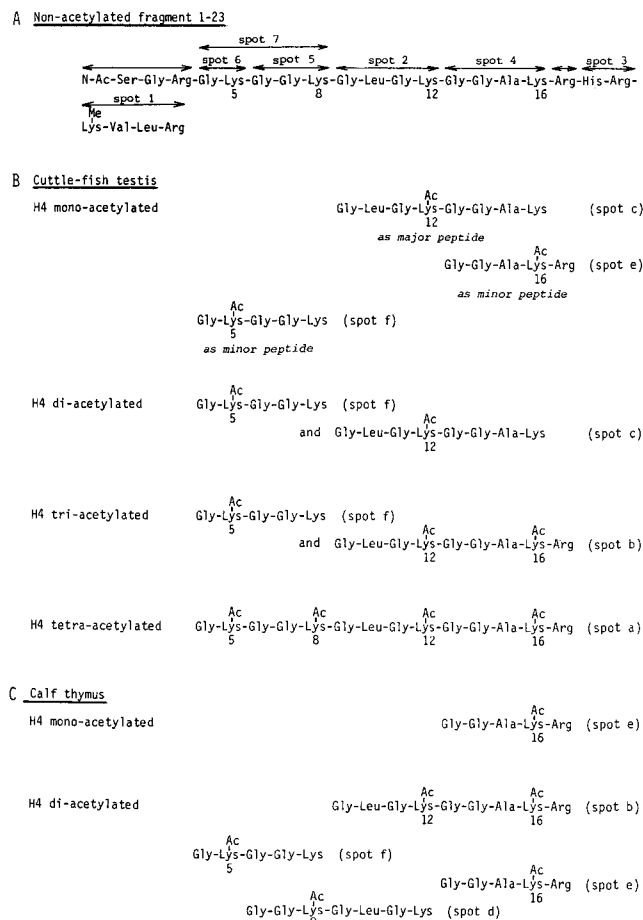


FIG. 5. Peptides of amino-terminal region of histone H4. Peptides are identified as in Fig. 3H and Fig. 4F. Sequence of histone H4 is taken from De Lange *et al.* (21) and Ogawa *et al.* (22). A, nonacetylated fragment 1-23. The tryptic peptides are indicated above the sequence. B and C, acetylated peptides found in tryptic hydrolysates of subfractions of histone H4 from cuttlefish testis (B) and calf thymus (C).

the amino-terminal peptide N-Ac-Ser-Gly-Arg is not revealed by ninhydrin.)

Mapping of Tryptic Peptides Generated from Calf H4 Fragments 1-23 and 20-102—The peptide maps of non-, mono-, di-, and tetraacetylated fragments 1-23 and fragment 20-102 are shown in Fig. 4, A-E. These maps were of great value for localizing precisely the tryptic peptides originating from the amino-terminal region of histone H4. The map of the nonacetylated fragment 1-23 (Fig. 4, A and F) shows all the spots of the above-mentioned second set of peptides plus spots corresponding to free arginine (Arg 17), to peptide 18-19 (spot 3), and to peptide 20-23 (spot 1). The map of the chemically tetraacetylated fragment 1-23 (Fig. 4D) shows only three spots: spot a corresponding to peptide 4-17 acetylated at all 4 lysine residues, and spots 1 and 3. The peptide map of fragment 20-102 (Fig. 4E) shows the spots of the third set of peptides (spots which do not vary with acetylation) minus the spot corresponding to peptide 18-19. Two spots: spot 1 (peptide 20-23) and free arginine, common to fragments 20-102 and 1-23 nonacetylated, and to all H4 subfractions, allow superimposition of these maps.

Acetylation Site(s) in Cuttlefish H4 Subfractions—The map of monoacetylated cuttlefish H4 (Fig. 3B) shows, among others, the spot c corresponding to peptide 9-16, Gly-Leu-Gly-Lys(Ac)-Gly-Gly-Ala-Lys. This peptide results from the acetylation of lysine 12 which is the major site of acetylation

in cuttlefish H4. The very faint spots e and f which can also be observed in this map result from the acetylation of lysines 16 and 5, respectively.

In the map of diacetylated cuttlefish H4 (Fig. 3C), spots c and f appear clearly and point out the acetylation of lysines 12 and 5. The total acetylation of lysines 5 and 12 is still emphasized by the disappearance of spots 2, 4, 5, 6, and 7.

The map of triacetylated cuttlefish H4 (Fig. 3D) shows by comparison with Fig. 3C: (i) the persistence of spot f resulting from the acetylation of lysine 5 and (ii) the disappearance of spot c and appearance of spot b, light yellow-colored, corresponding to peptide 9-17 (Fig. 5). Both the absence of spot c and the presence of spot b have to be related to the simultaneous acetylation of lysines 12 and 16.

The map of tetraacetylated cuttlefish H4 (Fig. 3E) by comparison with Fig. 3D shows the disappearance of spots b and f, and appearance of spot a, light yellow-colored, corresponding to peptide 4-17 acetylated on its 4 lysine residues. A map identical with that presented in Fig. 4E was obtained by mixing tryptic hydrolysates of chemically tetraacetylated fragment 1-23 and of fragment 20-102 (not shown).

Acetylation Site(s) in Calf Thymus H4 Subfractions—The map of monoacetylated calf thymus H4 (Fig. 3F) shows, by comparison with the map of nonacetylated H4 (Fig. 3A), the appearance of spot e corresponding to peptide 13-17, Gly-Gly-Ala-Lys(Ac)-Arg, and the disappearance of spot 4, residues 13-16, Gly-Gly-Ala-Lys. Moreover, the map of monoacetylated fragment 1-23 (Fig. 4B) shows, when compared to the map of the nonacetylated fragment (Fig. 4A), the almost complete disappearance of the spot corresponding to the arginine 17. These observations point out acetylation of lysine 16 which is the main acetylation site in calf thymus as determined previously (21, 22).

The examination of the map of diacetylated calf thymus H4 (Fig. 3G) leads to the deduction of the presence of two subfamilies of diacetylated molecules. The first, related to the presence of spot b, peptide 9-17, Gly-Leu-Gly-Lys(Ac)-Gly-Gly-Ala-Lys(Ac)-Arg, corresponds to acetylation of lysines 12 and 16; the second, related to the presence of spot e characteristic of acetylation on lysine 16 without acetylation of lysine 12 and to the presence of spot f, peptide 4-8, Gly-Lys(Ac)-Gly-Gly-Lys, pointing out acetylation of lysine 5. The map shows strong spots 5 (peptide 6-8, Gly-Gly-Lys) and 6 (peptide 4-5, Gly-Lys), meaning that the first combination where lysines 12 and 16 are acetylated is predominant with respect to the second combination where lysines 5 and 16 are acetylated. Moreover, the presence in this pattern of a faint spot d identified as peptide 6-12, Gly-Gly-Lys(Ac)-Gly-Leu-Gly-Lys, emphasizes the acetylation of lysine 8 at a small extent.

DISCUSSION

The possibility of separating the acetylated and nonacetylated forms of histones relies upon the fact that the acetylation of the ϵ -amino group of a lysine gives rise to the loss of a positive charge. Two separation systems can be considered: electrophoresis and ion exchange chromatography. Gel electrophoresis allows an excellent separation, but is not easily applicable to the preparation of a large amount of protein or peptide. The ion exchange chromatography of histones performed under the usual conditions (pH close to neutrality and elution with an ionic strength gradient) may lead to aggregation of histones.

The use of urea abolishes the aggregation phenomena, but care must be taken to avoid completely the carbamylation of amino groups of histones. In the chromatographic procedure

that we have developed, the complete separation of the H4 subfractions and the peptide maps, namely that of calf monoacetylated H4, indicate that no carbamylation has taken place since no sign of intercontamination between the subfractions was detected. This absence of intercontamination has made possible the localization of acetylation sites in the different subfractions.

On the other hand, from the examination of the elution profiles obtained in the separation of cuttlefish and calf thymus H4 subfractions and from the study of the tryptic peptide maps of these subfractions, it is obvious that the scheme of H4 acetylation is very different from testis to thymus.

In the cuttlefish testis, where acetylation of H4 is mainly involved in the replacement of histones by protamines during spermiogenesis, the elution profile suggests a random acetylation of the H4 molecules. However, the study of the acetylation sites in the mono- and diacetylated forms, clearly shows that cuttlefish histone H4 is first acetylated at lysine 12 and then at lysine 5. The relative proportions of nonacetylated and diacetylated molecules mainly suggest the possibility that lysine 5 becomes more accessible or reactive only after an extensive acetylation of lysine 12.

In calf thymus, where acetylation of H4 can be related to DNA replication and transcription and to histone biosynthesis, about 50% of the histone H4 molecules are acetylated at lysine 16, of which 20% are also acetylated at lysine 12, 5, or 8 in the approximate distribution ratios of 6:3:1.

An interesting comparison can be made between our observations and those of Chicoine *et al.* (23) in *Tetrahymena* H4 who found that lysines 4 and 11 are used exclusively in newly synthesized diacetylated H4. Thus, the acetylation of lysines 12 and 5 in cuttlefish H4 would be correlated with histone deposition or removal. These two acetylation sites are different from those found in calf H4 (lysines 16 and 12) emphasizing the occurrence of two acetylation patterns of histone H4, each of them being related to a specific biological phenomenon.

Acknowledgments—We wish to thank Dr. Alain Richard and the Station Marine de Wimereux (62930 Wimereux, France) for providing the cuttlefishes. We acknowledge with pleasure the skillful technical assistance of F. Boutteau, M. J. Dupire, T. Ernout, and A. Hemez.

We are grateful to T. Ernout for editorial assistance and to M. C. Duvieuxbourg and M. T. Garet for the photographs.

REFERENCES

1. McGhee, J. D., and Felsenfeld, G. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1115–1156
2. Matthews, H. R., and Waterborg, J. H. (1985) *The Enzymology of Post-Translational Modification of Proteins*, Vol. 2, pp. 125–185, Academic Press, London
3. Whitlock, J. P., and Stein, A. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 3857–3861
4. Chahal, S. S., Matthews, H. R., and Bradbury, E. M. (1980) *Nature* **287**, 76–79
5. Allan, J., Harborne, N., Rau, D. C., and Gould, A. (1982) *J. Cell Biol.* **93**, 285–297
6. Isenberg, I. (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 159–191
7. Von Holt, C., Strickland, W. N., Brandt, W. F., and Strickland, M. S. (1979) *FEBS Lett.* **100**, 201–218
8. Glover, C. V. C., and Gorovsky, M. A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 585–589
9. Hayashi, H., Nomoto, M., and Iwai, K. (1984) *J. Biochem. (Tokyo)* **96**, 1449–1456
10. Candido, E. P. M., and Dixon, G. H. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5506–5510
11. Dixon, G. H., Candido, E. P. M., Honda, B. M., Louie, A. J., Macleod, A. R., and Sung, M. T. (1975) *Ciba Found. Symp.* **28**, 229–258
12. Johns, E. W. (1967) *Biochem. J.* **105**, 611–614
13. Wouters-Tyrou, D., Martin-Ponthieu, A., Sautière, P., and Biserte, G. (1981) *FEBS Lett.* **128**, 195–200
14. Michalski-Scrive, C., Aubert, J. P., Couppez, M., Biserte, G., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1982) *Biochimie (Paris)* **64**, 347–355
15. Panyim, S., and Chalkley, R. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **130**, 337–346
16. Schroeder, W. A., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Cormick, J., and Jones, R. T. (1963) *Biochemistry* **2**, 992–1008
17. Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1967) *Methods Enzymol.* **11**, 505
18. Liu, T. Y., Stein, W. H., Moore, S., and Elliott, S. D. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1143–1149
19. Wangh, L., Ruiz-Carrillo, A., and Allfrey, V. G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 44–56
20. Lewis, P. N., Bradbury, E. M., and Crane-Robinson, C. (1975) *Biochemistry* **14**, 3391–3400
21. De Lange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L., and Bonner, J. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 319–334
22. Ogawa, Y., Quagliarotti, G., Jordan, J., Taylor, C. W., Starbuck, W. C., and Busch, H. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4387–4392
23. Chicoine, L. G., Schulman, I. G., Richman, R., Cook, R. G., and Allis, C. D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1071–1076

SPECIFICITY OF ANTIBODIES RAISED AGAINST TRIACETYLATED HISTONE H4

SYLVIANE MULLER, AGNÈS ISABEY, MAURICE COUPPEZ,* SERGE PLAUE,
 GHISLAINE SOMMERMEYER and MARC H. V. VAN REGENMORTEL

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, 15 rue Descartes, 67084 Strasbourg Cédex, France; and *Unité 409 CNRS, Institut de Recherche sur le Cancer, 1 Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

(First received 20 October 1986; accepted in revised form 14 January 1987)

Abstract—Ten monoclonal antibodies (mAbs) were obtained by immunizing animals with triacetylated histone H4 from cuttle-fish. The fine specificity of these antibodies was studied using various populations of acetylated H4, (H3H4)₂ tetramers and histone octamers as well as with acetylated and nonacetylated peptides of H4. None of these mAbs were found to recognize triacetylated H4. Only five of them bound to diacetylated, monoacetylated and nonacetylated H4. One antibody was specific for H4 associated in the form of histone octamers and did not bind to any nonacetylated or acetylated form of H4 monomers. Eight of the antibodies were specific for residues situated in the region 9-23 of H4. None of the mAbs was completely specific for acetylated forms of H4. In contrast, antisera raised in rabbits against triacetylated H4 reacted strongly with tri and diacetylated H4, weakly with monoacetylated H4 and barely or not at all with nonacetylated H4.

INTRODUCTION

The weak immunogenicity of histones has been ascribed to the fact that their sequence has been highly conserved during evolution and contains very few aromatic amino acid residues (Stollar, 1978; Bustin, 1979). The poor immunogenicity of the core histones H2A, H2B, H3 and H4 has been overcome by immunizing animals with histone-RNA (or DNA) complexes (Stollar and Ward, 1970). Histone H1, which is a less conserved molecule, and histone H5, which is specific for nucleated avian erythrocytes, have been found to elicit an immune response in rabbits even when injected in uncomplexed form (Sotirov and Johns, 1972; Markose and Rao, 1985; Srebrevna and Zlatanova, 1986). It is unknown to what extent the results of earlier antigenic analyses of the core histones (Bustin and Stollar, 1973; Mura *et al.*, 1980; Muller *et al.*, 1983, 1985a, 1986) were influenced by the fact that the antibodies used had been raised against complexed histones.

Antibodies to histones have also been obtained from non-immunized autoimmune mice by the hybridoma technology (Laskov *et al.*, 1984; Muller *et al.*, 1985a) but in this case the exact nature of the immunogenic stimulus is unknown. Since the fine specificity of these histone autoantibodies appears to be directed mainly to the N-terminal domains of the histones, i.e. those regions that are particularly exposed at the surface of core particles, it has been suggested that chromatin structures rather than free histones could be the immunogen in autoimmune mice.

The only successful attempts at producing monoclonal antibodies to histones by direct immunization

with purified histone material concern histone H5 (Mendelson and Bustin, 1984; Rozalski *et al.*, 1985). Monoclonal antibodies (mAbs) to H2B have been obtained from mice immunized with human chromatin (Turner, 1982) and total histone fraction from trout (Whitfield *et al.*, 1986) and one mAb reacting with H3 was obtained using a rat liver nuclear extract as immunogen (Muller *et al.*, 1985b).

In the present study, we report attempts to produce mAbs to histone H4 by immunizing mice with cuttle-fish triacetylated H4 complexed to RNA. In cuttle-fish chromatin, H4 is extensively acetylated, the three lysine 5, 12 and 16 being acetylated approximately to the same extent (Wouters-Tyrou *et al.*, 1981). It seemed possible that a chemically modified histone would possess superior immunogenicity compared to the unmodified molecule.

Ten mAbs were obtained and characterized with respect to their ability to recognize various populations of acetylated and nonacetylated H4 as well as their capacity to bind short peptide fragments of H4. The fine specificity of these mAbs was compared to that of polyclonal antisera raised in rabbits against triacetylated H4.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of histones, histone complexes and natural peptides of H4

Histone H4 was directly obtained in pure form from calf thymus or cuttle-fish testis chromatin by the method of Johns (1967) slightly modified by Wouters-Tyrou *et al.* (1981) and Michalski-Scrive *et al.* (1982). Tri, di and monoacetylated H4 were

prepared by ion exchange chromatography on a sulfopropyl Sephadex C25 column (Coupez *et al.*, 1987). The degree of acetylation was checked by polyacrylamide gel electrophoresis at pH 3.2 in 6.25 M urea (Panyim and Chalkley, 1969) using a 17% acrylamide concn. The amino acid sequence of cuttle-fish histone H4 is similar to that of calf thymus H4. In cuttle-fish chromatin, H4 is extensively acetylated while the three lysine residues 5, 12 and 16 are acetylated approximately to the same extent (Wouters-Tyrou *et al.*, 1981). In calf thymus, four sites of acetylation have been identified at lysine residues 5, 8, 12 and 16 with residue 16 being preferentially modified (DeLange *et al.*, 1969). Non-acetylated and monoacetylated (H³H₄)₂ tetramers were obtained as described by Michalski-Scrive *et al.* (1982).

Core histone octamers were prepared by mixing equal vols of equimolar aqueous solutions of the four core histones according to Daban and Cantor (1982).

Natural mono and nonacetylated fragments 1–23 were prepared by acetic acid cleavage at aspartyl residues of H4; fragment 40–102 was generated by limited tryptic hydrolysis of H4 (Coupez *et al.*, 1987).

Chemical acetylation of peptide 1–23 was performed by the procedure of Riordan and Vallee (1967) slightly modified by Coupez *et al.* (1987). The four lysine residues 5, 8, 12 and 16 were found fully acetylated in these conditions.

The purity of the histone fragments was checked by polyacrylamide slab gel electrophoresis at pH 2.7 in 2.5 M (Panyim and Chalkley, 1969) using a 20% acrylamide concn. The histone fragments were characterized by amino acid analysis performed on a Beckman 119 CL amino acid analyser after hydrolysis in 6 M HCl (1 ml/mg protein) at 110°C for 24 hr *in vacuo*, with one drop of 1% phenol to avoid excessive degradation of tyrosine.

Synthesis of H4 peptides

Three synthetic peptides corresponding to the N-terminal residues 1–8, 1–17 and 1–23 of calf thymus H4 were prepared by the solid-phase method of Barany and Merrifield (1980) as previously described (Muller *et al.*, 1985a). A C-terminal tyrosine was added to peptide 1–8 for coupling purposes.

During the synthesis of peptide 1–23 a special procedure was used to introduce two acetylated lysines at positions 12 and 16. The base labile fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) group was used for side-chain protection while the α -amino group was protected with *t*-butyloxycarbonyl (*t*-Boc). Boc Lys (Fmoc) (Novabiochem, Switzerland) was coupled as preformed active-ester of 1-hydroxybenzotriazole. After coupling the Fmoc group was removed with 50% piperidine in dimethylformamide (2 × 1 min). The free amino group was then acetylated using acetic anhydride and triethylamine (ten molar excess) for 10 min. The reaction efficiency was

assessed by classical ninhydrin assay. All peptides were purified on a preparative MPLC (middle pressure liquid chromatography, Labomatic, F.R.G.) and the final purity was then assessed by high pressure liquid chromatography on a reversed phase C18 column (Ultraspher ODS 4.5 × 250 mm, Altex, U.S.A.). The amino acid composition of peptides was determined using a Beckman 6300 analyser. The C-terminal synthetic peptide 85–102 of H4 was previously described (Muller *et al.*, 1983).

Coupling of synthetic and natural peptides 1–8, 1–17, 1–23 and 69–84 of H4 to BSA

In order to measure their antigenic activity, peptides 1–8, 1–17, 1–23 and 69–84 were conjugated to BSA. Peptide 1–8 to which a C-terminal tyrosine had been added during synthesis was first citraconylated to block the two internal lysines (positions 5 and 8) and then conjugated to carrier protein using bis-diazotized benzidine (BDB) as coupling reagent (Briand *et al.*, 1985). Peptides 1–17 and 1–23 were coupled to BSA after protection using *N*-cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide metho-*p*-toluol-sulfonate (MCDI; Aldrich, F.R.G., Cat. No. C 10640-2) as described by Briand *et al.* (1985) for 1-ethyl-3-(3 dimethyl aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) coupling. When EDC was used instead of MCDI the final peptide 1–17 BSA conjugate was insoluble.

The natural peptide 69–84 of H4 was coupled to BSA with 0.05% glutaraldehyde (Briand *et al.*, 1985).

The peptide/carrier ratio was 8:1, 9:1, 4:1 and 11:1 for 1–8 BSA, 1–17 BSA, 1–23 BSA and 69–84 BSA conjugates, respectively. The percentage of lysines affected by the coupling was respectively 35, 28, 37 and 22% as determined from amino acid analysis.

Polyclonal and monoclonal antibodies

Antisera to calf thymus H4 and triacetylated H4 from cuttle-fish were obtained by immunizing rabbits with H4-RNA complexes as described by Stollar and Ward (1970). Antisera to peptide 1–17 of H4 were raised by a series of bi-weekly s.c. injections of about 100 μ g unconjugated peptide emulsified in complete Freund's adjuvant. Sera were collected at regular intervals over a period of 3 months.

For monoclonal antibody (mAb) preparation, three mice of three different lines (Balb/c, C57 B1 and B10 Br) were immunized with triacetylated H4 from cuttle-fish testis. Two different immunization protocols were used: for Balb/c mice, triacetylated H4-RNA complexes were mixed (v/v) with alugel S (Serva, F.R.G., Cat. No. 12 261). After 1 hr at 4°C, the mixture was emulsified with an equal vol of complete Freund's adjuvant and injected intradermally (100 μ g triacetylated H4/injection). Injections were given on days 0, 14, and 28 and a booster injection at days 50 and 51, i.e. –4 and –3 before fusion. For B10 Br and C57 B1 mice, the procedure used was similar to the protocol "B" described by

Cianfriglia *et al.* (1983): triacetylated H4 (50 μ g/injection) complexed with RNA was emulsified with complete Freund's adjuvant and injected i.p. at days 0 and 7. Mice that reacted positively were boosted intravenously with 21 μ g triacetylated H4 at days 16 and 17, i.e. -4 and -3 before fusion. The spleens of the mice showing the highest titers against non-acetylated H4 (one Balb/c and one B10 Br) were independently perfused and washed 3 times with modified Eagle's medium (MEM, Gibco, Cat. No. 074-2100) in order to collect lymphocytes.

Splenocytes from Balb/c (6×10^7 cells) and from B10 Br mice (3.4×10^7 cells) were respectively fused with 5×10^7 myeloma PAI cells (Stocker *et al.*, 1982) in 50% polyethylene glycol 4000 (Merck). After fusion, cells were seeded in two times five 96-well microtiter plates, each culture cup containing about 2×10^5 cells. No feeder cells were used for culture. Cells were incubated at 37°C under 5% CO₂ in air. Hybridomas were selected in HAT medium (hypoxanthine, aminopterin, thymidine in MEM supplemented by 10% foetal calf serum, Gibco Cat. No. 011-6180). After 8-10 days, clones were dispersed and 2 days later, cells were transferred in 24-well plates. The presence of antibodies in the supernatant of clones was detected by ELISA (see below) using either triacetylated H4, nonacetylated H4, (H3H4)₂ tetramer or a mixture of the four core histones (H3, H4, H2A, H2B) as antigens. Positive hybridomas were grown by sequential transfer to bottles (25 and 75 cm²-plating surface). Hybridomas that secreted antibodies as determined by ELISA were recloned by limiting dilution, using 10^7 mouse thymocytes/ml as feeder cells. Positive clones were subsequently amplified as ascitic tumors in Balb/c mice (2×10^6 cells/mouse) primed with 0.5 ml of pristane (2,6,10,14-tetra-methylpentadecane). Ascitic fluids were collected and cleared by centrifugation. Cell stocks were stored frozen in 90% foetal calf serum and 10% dimethylsulfoxide in liquid nitrogen (2×10^6 cells/0.5 ml).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Several ELISA procedures were used to measure the activity of polyclonal and monoclonal antibodies.

ELISA procedure 1 was used to measure the antibody activity of rabbit antisera and consisted of the following steps: flexible microtiter plates (Falcon, U.S.A., Cat. No. 3912) were coated overnight at 37°C with histones (25-200 ng/ml) peptides (0.1-2 μ M) in 200 μ l of 0.05 M sodium carbonate buffer pH 9.6. After rinsing with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS-T was added for 1 hr at 37°C. Coated wells were then incubated for 2 hr at 37°C with rabbit antiserum diluted in PBS-T. After rinsing with PBS-T, goat anti-rabbit globulins conjugated with alkaline phosphatase (Sigma, U.S.A., Cat. No. A80-25) were incubated for 2 hr at 37°C. Finally the bound enzyme conjugate was de-

tected by adding 200 μ l of the substrate *p*-nitrophenyl phosphate (Boehringer, F.R.G., Cat. No. 107905) at 1 mg/ml in 0.1 M diethanolamine buffer, pH 9.8. The absorbance at 405 nm was directly read in a Titertek Multiskan MC photometer (Flow Laboratories, U.K.).

ELISA procedure 2 was used for screening hybridoma culture supernatants and for determining the subclass and specificity of mAbs. The first steps of procedure 2 were as described for procedure 1. After post-coating wells with BSA, 200 μ l of mAb (supernatant or ascites) diluted in PBS-T containing 1% BSA were added for 2 hr at 37°C. After rinsing with PBS-T, rabbit immunoglobulins specific for mouse globulins (Miles Yeda, Israel, Cat. No. 65-157-2) were incubated for 2 hr at 37°C (generally diluted 1:2000 in PBS-T-BSA). Antisera specific for IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, mouse λ and κ chains (Miles Yeda, Israel and Nordic, Tilburg, The Netherlands) were used for isotype determination. After further washing, goat anti-rabbit globulins conjugated with alkaline phosphatase were incubated for 2 hr at 37°C. Finally the bound enzyme conjugate was detected as described above.

ELISA procedure 3 was used to ascertain whether the mAbs reacted differently with the antigen when it had been bound by a first layer of antibodies adsorbed to the plastic surface (Kennel, 1982; Friguet *et al.*, 1984; Al Moudallal *et al.*, 1984; McCullough *et al.*, 1985; Dierks *et al.*, 1986). In this procedure rabbit H4 antibodies were used to coat the wells (2 μ g Ig/ml in carbonate buffer, pH 9.6). After rinsing and incubation with BSA, H4 (25-200 ng/ml in PBS-T) was incubated for 2 hr at 37°C. After further rinsing, diluted ascitic fluids were allowed to interact for 2 hr. The enzyme conjugate (sheep anti-mouse Ig coupled to alkaline phosphatase, Jackson, U.S.A., Cat. No. 515-5503 diluted 1:4000 in PBS-T) was incubated for 2 hr at 37°C. The final step was as described above.

The antigenic activity of peptides was also measured using the inhibition format and ELISA procedure 2: peptides were incubated with diluted ascites for 3 hr at 37°C and then 6 hr at 4°C. The mixture was added to wells precoated with appropriate antigens and incubated for 2 hr at 37°C. Further steps of the assay were as described above.

RESULTS

Characterization of monoclonal antibodies

Mice from three different lines (Balb/c, C57 B1 and B10 Br) were immunized with acetylated H4-RNA complexes. Only two mice (one Balb/c and one B10 Br) gave a positive response in ELISA when their antisera were tested using nonacetylated H4 as antigen. The spleens of these animals were used for obtaining hybridoma. None of the sera tested showed a detectable reaction with triacetylated H4.

Hybridomas secreting anti-H4 antibodies were de-

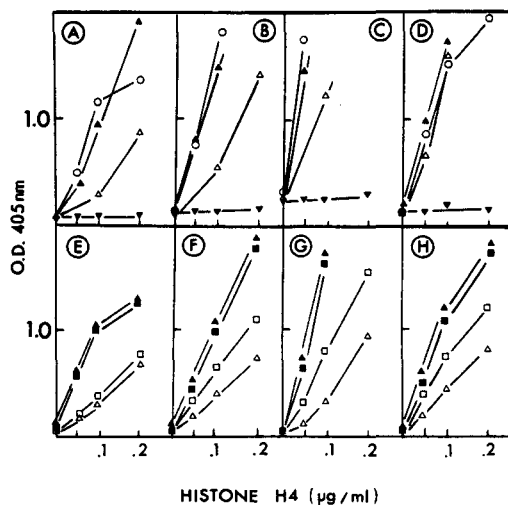


Fig. 1. Binding of mAbs in ELISA procedure 2 to various populations of acetylated and nonacetylated cuttle-fish and calf H4. (A)–(D): Comparison of antigenic reactivity of triacetylated (∇), diacetylated (Δ), monoacetylated (\blacktriangle) and nonacetylated (\circ) cuttle-fish H4. (E)–(H): Comparison of antigenic reactivity of cuttle-fish and calf thymus H4, (\blacktriangle) monoacetylated cuttle-fish H4, (Δ) diacetylated cuttle-fish H4, (\blacksquare) monoacetylated calf thymus H4, (\square) diacetylated calf thymus H4. Antibodies 2C6 [(A) and (E)], 2F5 [(B) and (F)], 33D3 [(C) and (G)], 2D5 [(D) and (H)]. Ascitic fluids were diluted 1×10^{-4} . Note that (A)–(D) and (E)–(H) correspond to two independent series of ELISA experiments which explain why the absolute O.D. values in the pairs (A) and (E), (B) and (F) etc. are not necessarily the same.

tected by ELISA using as antigen triacetylated H4, nonacetylated H4, (H3H4)₂ tetramers and an equimolar mixture of the four core histones H3, H4, H2A and H2B. Only 30 out of the 480 initial wells containing B10 Br hybrids and five out of the 480 wells containing Balb/c hybrids showed cell growth and were tested for antibody activity. From these 35 cultures, five were found to react with at least one of the antigens used for the screening and were subsequently recloned by limiting dilution into 96-well plates. Finally 10 clones (2F5, 2D5, 2C6, 2F9, 3B10,

3C7, 21C2, 30D8, 33A6 and 33D3) obtained from positive wells 2, 3, 21, 30 and 33 were selected and analysed in detail. All of them except one (21C2) were derived from B10 Br splenocytes. All these clones secreted antibodies of the μ , κ isotype.

Binding of mAbs to acetylated forms of H4 from cuttle-fish testis. The 10 clones were analysed for their ability to bind the cuttle-fish triacetylated H4 used for immunization as well as preparations of cuttle-fish H4 presenting decreasing levels of acetylation (di, mono and nonacetylated H4) [see Fig. 1(A)–(D) and Table 1]. None of the 10 mAbs were able to bind to cuttle-fish triacetylated H4 modified at lysine residues 5, 12 and 16, and four of the antibodies (2F9, 3C7, 21C2 and 30D8) did not bind to nonacetylated or any acetylated form of isolated histone H4. Five of the antibodies (2F5, 2D5, 2C6, 33A6 and 33D3) recognized diacetylated H4 which is mainly acetylated on residues 5 and 12 and four of them (2F5, 2C6, 33A6 and 33D3) reacted even better with mono and nonacetylated H4 [Fig. 1(A)–(C)]. Monoclonal antibody 2D5 reacted equally well with di, mono and nonacetylated H4 [Fig. 1(D)]. Antibody 3B10 reacted weakly with mono and nonacetylated H4 and not at all with diacetylated H4.

Comparison of the binding of mAbs to cuttle-fish testis and calf thymus H4. The ability of the 10 mAbs to distinguish between calf thymus and cuttle-fish testis H4 was then investigated. The H4 histone from these two species has the same sequence but differs in the position of acetylation sites. The six clones 2F5, 2D5, 2C6, 3B10, 33A6 and 33D3 reacted in an identical fashion with the nonacetylated and monoacetylated H4 molecules [for some examples see Fig. 1(E)–(H)]. Four of the clones (2F5, 2D5, 33A6, 33D3) reacted less well with the diacetylated cuttle-fish H4 (acetylated at positions 5 and 12) than with the diacetylated calf thymus H4. This latter histone contains molecules acetylated at either positions 5 and 16 or positions 12 and 16. The clone 2C6 reacted equally well with both diacetylated H4 species [Fig. 1(E)].

Table 1. Binding in ELISA (procedure 2) of monoclonal antibodies to acetylated H4, nonacetylated H4 and different associated forms of H4

Clones	Cuttle-fish testis H4				Calf thymus H4			Four core histones		
	Ac3	Ac2	Ac1	Ac0	Ac2	Ac1	Ac0	Mixture	Octamer	Tetramer (H3H4) ₂
	LYS 5, 12, 16	5, 12	5 or 12 or 16	–	5 + 16 or 12 + 16	16	–	–	–	–
2F5	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+
2D5	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+
2C6	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+
2F9	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
3B10	–	–	(+)	(+)	–	(+)	(+)	(+)	–	+
3C7	–	–	–	–	–	–	–	(+)	–	+
21C2	–	–	–	–	–	–	–	(+)	–	–
30D8	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
33A6	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33D3	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+

– Indicates no reactivity in ELISA.

(+) Indicates weak reactivity (less than 0.8 absorbance after 30 min hydrolysis time).

+ Indicates strong reactivity.

Ac0: nonacetylated H4, Ac1 monoacetylated H4, Ac2 diacetylated H4, Ac3 triacetylated H4.

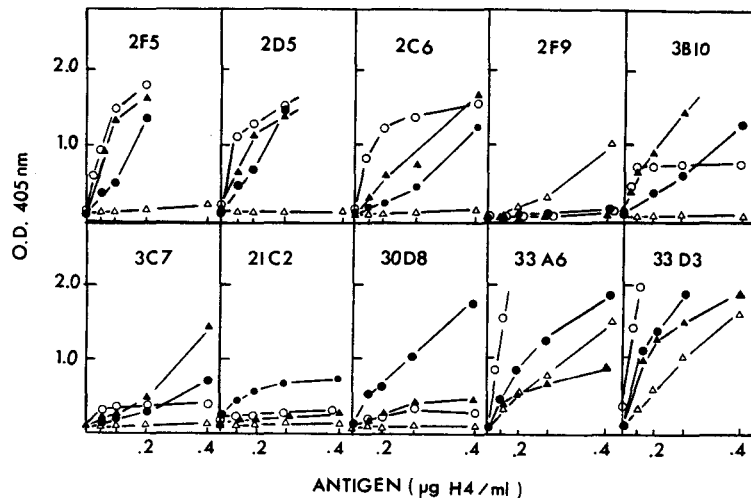


Fig. 2. Binding of mAbs to different forms of H4 using ELISA procedure 2: calf thymus H4 (○), mixture of the four core histones H2B, H2A, H3 and H4 from calf thymus (●), histone octamers stabilized in 2 M NaCl (△), (H3H4)₂ tetramers (▲). Ascitic fluids were diluted 1×10^{-4} except 3C7 (1×10^{-3}). Substrate hydrolysis time was 30 min except for histone octamers (2 hr).

Reaction of mAbs with associated forms of non-acetylated H4. The 10 mAbs were also tested for their ability to recognize H4 associated with the other three core histones in the form of random equimolar mixtures (H4, H3, H2A, and H2B) or as octamers stabilized with 2 M NaCl (Table 1). As shown in Fig. 2, the six clones (2F5, 2D5, 2C6, 3B10, 33A6 and 33D3) reacting with isolated nonacetylated H4 were also able to bind H4 present in the mixture of the core histones.

In addition antibody 30D8, and to a lesser extent antibodies 3C7 and 21C2, also recognized H4 in the core histone mixture but not the isolated histone (Fig. 2). Antibody 2F9 did not bind to the mixture of core histones.

When the 10 mAbs were tested with octamers, only three (2F9, 33A6 and 33D3) were found to react with them (Fig. 2). Monoclonal antibody 2F9 did not bind to any form of H4 except the octamer. In a control experiment in which H4 was used as antigen, it was shown that antibodies 33D3 and 33A6 reacted equally well with H4 when the reaction occurred in PBS (ionic strength 220 mM) or in 2 M NaCl. On the other hand, the other eight antibodies did not bind H4 in 2 M NaCl. Therefore, the fact that antibodies 2F5, 2D5, 2C6 and 3B10 did not recognize the histone octamer (Fig. 2) could have been due to the fact that histone octamers were necessarily tested in the presence of 2 M NaCl rather than to the absence of the corresponding epitope in the associated form of H4 present in the octamer. It should also be noted that mAb 2F9 did not bind to H4 either at low or high ionic strength but only to H4 present in histone octamers. This antibody appears to be specific for the quaternary structure resulting from histone-histone interactions and is similar to previously described

antibodies that bind to epitopes present on nucleosomes and octamers but absent on free histones (Rekvig and Hannestad, 1979; Feldman *et al.*, 1980; Laskov *et al.*, 1984).

The ability of the mAbs to bind to nonacetylated (H3H4)₂ tetramers was also tested; all clones except three (2F9, 21C2 and 30D8) were able to bind to H4 when it was associated in the form of tetramers (Fig. 2). No difference was observed when tetramers containing monoacetylated H3 and monoacetylated H4 were used instead of nonacetylated tetramers (data not shown).

Influence of ELISA format on mAb activity. As it is well known that adsorption of protein antigens to plastic surfaces can alter their antigenic properties (Kennel, 1982; Friguier *et al.*, 1984; Al Moudallal *et al.*, 1984; McCullough *et al.*, 1985; Dierks *et al.*, 1986), the reactivity of the mAbs was also tested by ELISA procedure 3 in which H4 is not directly adsorbed to the solid-phase but is bound to a first layer of rabbit antibodies adsorbed to the plastic wells. The anti-H4 polyclonal antibody used for coating the microtiter plates was selected because it was found (in binding assays with overlapping fragments of H4) to bind to the C-terminal part of H4 and not to the N-terminal region (unpublished results). Figure 3 shows a representative experiment where mAbs were allowed to react with H4 bound to antibody-coated plates. The four antibodies 2F5, 2D5, 33A6 and 33D3 reacted with H4 in both ELISA procedures 2 and 3; mAbs 2F9, 21C2 and 30D8 did not bind to H4 in either ELISA procedure while mAb 3C7 reacted only in procedure 3. Antibody 3B10 appeared to react better in ELISA procedure 3 than in procedure 2 whereas antibody 2C6 reacted less well in procedure 3 (Fig. 3).

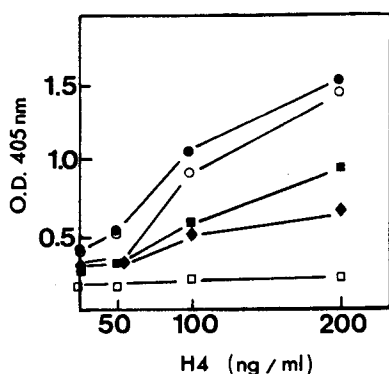


Fig. 3. Binding of mAbs to cuttle-fish testis H4 using ELISA procedure 3: (●) 2F5, (○) 3B10, (■) 3C7, (◆) 2C6, (□) 21C2. Anti-H4 IgG (2 μ g/ml) was used to coat the wells for 2 hr at 37°C; after the BSA incubation, H4 from cuttle-fish testis was allowed to react overnight at 4°C. After washing, mAbs diluted 1×10^{-4} (except 3C7: 1×10^{-3}) were incubated for 2 hr at 37°C. Sheep anti-mouse Ig coupled to alkaline phosphatase (1:4000) was then added for 2 hr at 37°C. Substrate hydrolysis time was 2 hr.

Epitope mapping

Binding of mAbs to plates coated with peptides of H4. In initial experiments three natural and three synthetic peptides were used to determine which portions of the H4 molecule were recognized by different mAbs. The location of the six peptides in the H4 sequence is shown in Table 2. Their antigenic reactivity was measured in ELISA procedure 2 using peptide-coated microtiter plates. For this purpose, free peptides were either directly adsorbed to plastic (peptides 1-17, 1-23, 40-102, 85-102) or used in the form of peptide-BSA conjugates (peptides 1-8, 1-17, 1-23, 69-84). The results are summarized in Table 3 and some individual experiments are presented in Fig. 4. None of the 10 mAbs were found to bind to any fragments of H4 located in the C-terminal half of the molecule (40-102, 69-84 and 85-102). All but one (30D8) recognized N-terminal conjugated peptides corresponding to residues 1-17 and 1-23 in these direct binding assays.

According to their reactivity with H4 fragments, four groups of antibodies could be distinguished: a first group of clones (2F5, 2D5, 2C6, 3B10 and 3C7) bound free peptide 1-23 adsorbed to plastic as well as conjugated 1-23 and 1-17 peptides, but not conjugated peptide 1-8 (see Fig. 4 and Table 2). A second group of antibodies comprising 2F9, 33A6 and 33D3 reacted with conjugated peptides 1-23 and 1-17 but not with free peptides 1-23 and 1-17 adsorbed to the microtiter plate; these clones also did not bind conjugated peptide 1-8. Antibody 21C2 which was the only one able to bind conjugated peptides 1-23, 1-17 and 1-8, did not bind unconjugated peptides 1-23 and 1-17. Monoclonal antibody 30D8 did not bind to any of the peptides used in this study.

Since some of the peptides, when adsorbed directly to the wells, seemed to be recognized by none of the mAbs (Table 2) it was necessary to establish that they did in fact become attached to the solid-phase. Control experiments, using H4 antisera, showed that peptides 40-102 and 85-102 were adsorbed to the plastic but that peptide 1-17 was not. This was confirmed with an antiserum to free peptide 1-17 raised in rabbits which was found to bind to the 1-17 BSA conjugate but not to unconjugated peptide 1-17 directly adsorbed to plastic.

Inhibition of the ELISA reaction with peptide 1-17 of H4. The antigenic activity of peptide 1-17 was also tested in ELISA inhibition experiments using either the free H4 or associated forms of H4 that reacted well with the different mAbs (see Table 1). For each mAb, experimental conditions were adapted in order to obtain the maximum possible inhibitory activity (Altschuh and Van Regenmortel, 1982; Muller *et al.*, 1986). Representative ELISA inhibition results are illustrated in Fig. 5. These results clearly demonstrated that mAbs recognizing the free histone (2F5, 2C6, 33A6, 33D3) as well as those recognizing the assembled forms (3C7, 3B10, 21C2 and 30D8) are able to bind to free peptide 1-17 in the liquid-phase. It is interesting to note that antibody 30D8 reacted with peptide 1-17 in solution whereas it did not react with the same peptide when it was conjugated to BSA.

Table 2. Antigenic reactivity of H4 peptides measured in ELISA with 10 different monoclonal antibodies to H4

mAbs	H4 Peptides									Unrelated 1-15 of H2A S
	1-8 BSA S	1-17 BSA S	1-17 S	1-23 BSA N	1-23 N	40-102 N	69-84 BSA N	85-102 S	1-15 of H2A S	
2F5	0.07	>2	0.02	>2	>2	0.17	0.00	0.05	0.06	
2D5	0.08	>2	0.04	>2	>2	0.21	0.00	0.10	0.15	
2C6	0.09	>2	0.05	>2	1.85	0.17	0.01	0.10	0.15	
3B10	0.14	>2	0.08	>2	1.56	0.14	0.01	0.07	0.07	
3C7	0.07	>2	0.12	>2	1.66	0.12	0.01	0.05	0.05	
2F9	0.08	1.42	0.03	1.78	0.16	0.04	0.01	0.09	0.08	
33A6	0.12	1.79	0.06	>2	0.21	0.17	0.05	0.33	0.22	
33D3	0.20	>2	0.15	>2	0.51	0.10	0.04	0.10	0.06	
21C2	1.57	1.22	0.03	1.75	0.23	0.05	0.10	0.06	0.05	
30D8	0.25	0.38	0.08	0.27	0.13	0.09	0.01	0.26	0.32	

Microtiter plates were coated either directly with 1 μ M synthetic (S) or natural (N) peptides or with BSA-peptide conjugates (1 μ M expressed as peptide). Unrelated peptide 1-15 of H2A was used as control. Ascitic fluids were diluted 1×10^{-3} (3C7), 1×10^{-4} (2F5, 2D5, 2C6, 2F9, 3B10, 30D8, 33A6, 33D3), or 1×10^{-5} (21C2) and incubated in the wells for 2 hr according to ELISA procedure 2 described in Table 1. Rabbit anti-mouse globulins and anti-rabbit globulin conjugate were used to reveal the reaction. Substrate hydrolysis time was 25 min.

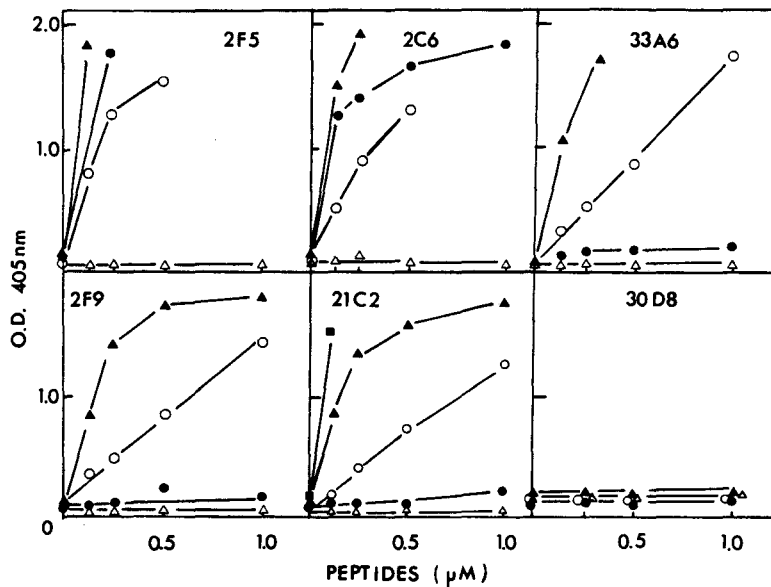


Fig. 4. Binding of mAbs to H4 peptides 1-23 (●), 1-23 BSA conjugate (▲), 1-17 (△), 1-17 BSA conjugate (○), 1-8 BSA conjugate (■) using ELISA procedure 2. The coupling ratios of peptide/carrier calculated from amino acid analysis were: peptide 1-23 = 5:1, peptide 1-17 = 9:1, peptide 1-8 = 1:8. Ascitic fluids were diluted 1×10^{-4} except 21C2 (1×10^{-5}). Binding of unrelated ascitic fluids was insignificant (O.D. ≤ 0.1). Substrate hydrolysis time was 25 min.

Antigenic activity of acetylated peptides 1-23 of H4. The 10 mAbs were also tested by ELISA to assess their ability to react with various acetylated peptides 1-23. Three acetylated peptides were studied: tetraacetylated fragment 1-23 modified *in vitro* on lysines 5, 8, 12 and 16, diacetylated synthetic peptide 1-23 incorporating acetylated lysines at positions 12 and 16, and monoacetylated natural fragment 1-23 modified only at lysine 16. The five clones (2F5, 2D5, 2C6, 3B10 and 3C7) which recognized the non-

acetylated fragment 1-23 of H4 reacted with monoacetylated peptide 1-23 but not with the di or tetraacetylated peptides. The antigenic activity of synthetic diacetylated peptide 1-23 was also tested by ELISA inhibition, using plates coated with H4, (H3H4)₂ tetramers or a mixture of the four core histones; no inhibition was observed with any of the mAbs in these assays. The five mAbs that failed to react with the nonacetylated 1-23 fragment also did not react with the acetylated forms of the peptide.

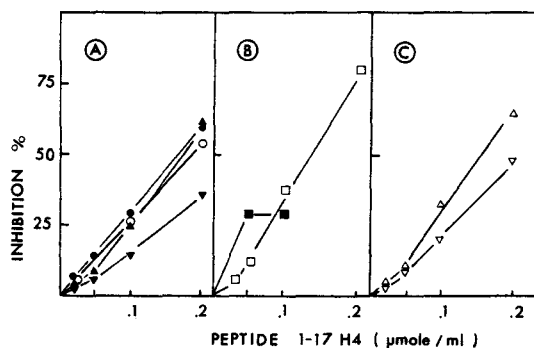


Fig. 5. Inhibition of the ELISA reaction between several mAbs and H4 (A) (H3H4)₂ tetramers (B) and a mixture of the four core histones (C) by increasing concns of peptide 1-17 of H4. The conditions were adjusted for each clone in order to obtain the highest inhibition effect. Antigen concns in the wells were 200 ng H4/ml, 100-200 ng (H3H4)₂ tetramer/ml expressed as H4, and 100 ng/ml (expressed as H4) of core histone mixture. Monoclonal antibodies were diluted 1/1000-1/20 000: 2F5 (▲), 33A6 (●), 2C6 (○), 33D3 (▼), 3C7 (□), 3B10 (■), 30D8 (△), 21C2 (▽). No effect was observed with peptide 1-17 of H4 and non-related ascites.

Antisera to triacetylated H4

Two rabbits were immunized with cuttle-fish triacetylated H4 in the form of histone-RNA complexes. After two injections the level of antibodies in successive bleedings was measured by ELISA using various populations of acetylated H4 as well as acetylated peptides 1-23. Only rabbit 1 gave a significant response after three injections while rabbit 2 failed to respond after six injections given over a period of 2.5 months.

Four bleedings of rabbit 1 were analysed and found to react strongly with triacetylated and diacetylated H4, more weakly with the monoacetylated form and barely or not at all with the nonacetylated form. The reactivity of serum from the third bleeding (after five injections) is shown in Fig. 6(A). None of the antisera from successive bleedings reacted with unconjugated fragments 1-23, 40-102 and 85-102 adsorbed directly to the plates nor with 1-8 BSA, 1-17 BSA and 69-84 BSA conjugates (data not shown). On the other hand, the antisera reacted strongly with the tetraacetylated peptide 1-23 [Fig. 6(B)] but not with the di, mono or nonacetylated

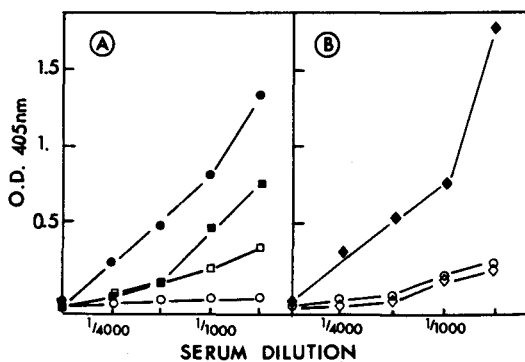


Fig. 6. Binding of polyclonal antibodies raised against triacetylated H4 from cuttle-fish testis to various populations of acetylated and nonacetylated H4 and to acetylated peptides 1-23 of H4 using ELISA procedure 2. In (A), 200 ng/ml triacetylated H4 (●), diacetylated H4 (■), monoacetylated H4 (□) and nonacetylated H4 (○) were used as antigens. In (B), the activity of polyclonal antibodies was measured using 1 μ M tetraacetylated peptide 1-23 (◆), diacetylated peptide 1-23 (◇) and nonacetylated peptide 1-23 (○).

peptides. The specificity of the reaction of these antibodies with triacetylated H4 was demonstrated, in control experiments, by the finding that they did not bind to diacetylated H3. These results suggest that the antibodies raised against triacetylated H4 recognize preferentially the N-terminal region of the acetylated histone since they do not bind the diacetylated peptide 1-23 in which lysines 5 and 8 are not acetylated.

The findings obtained with the rabbit antisera also indicate that although the tetraacetylated peptide 1-23 did not react with any of the 10 mAbs, it was satisfactorily attached to the microtiter plate.

DISCUSSION

In the present work, monoclonal antibodies were obtained by immunizing animals with triacetylated H4 from cuttle-fish, and they were characterized with various populations of acetylated and nonacetylated H4. None of the 10 mAbs that were obtained showed a detectable reaction with triacetylated H4, modified at residues 5, 12 and 16 while only 5 of them (2F5, 2D5, 2C6, 33A6 and 33D3) recognized diacetylated H4, modified at residues 5 and 12 (Table 1). It seems, therefore, that the additional acetylation of residue 16 abolishes the reactivity of the epitope recognized by these five mAbs. Since the three antibodies 2F5, 2D5 and 2C6 recognized the region 1-17 and 1-23 of H4 but not the N-terminal residues 1-8 (Table 1) they are probably specific for the region 9-23. The exact boundary of the epitope at the C-terminal end of the peptide is unclear, but some of the residues 18-23 clearly enhance its antigenic reactivity (Fig. 4). They also recognize this region when either lysine 12 or 16 is acetylated but not when both residues are acetylated (Table 2).

Antibodies 33A6 and 33D3 are also specific for the region 9-23 but do not bind to their epitope when both lysines 12 and 16 are acetylated. Since they do not react with unconjugated peptides adsorbed to the solid phase (Table 2) these antibodies probably recognize a particular conformation of the epitope which is induced in the conjugate by interaction with the carrier molecule and which is also present in the octamer and (H3H4)₂ tetramer (Table 1).

Antibody 2F9 was also specific for the region 9-23, but recognized its epitope only in conjugated peptides 1-17 and 1-23 and when H4 was present as histone octamer (Tables 1 and 2). It did not bind to acetylated or nonacetylated monomeric H4. This antibody appears to be specific for the quaternary structure resulting from histone-histone interactions and is similar to previously described antibodies that bind to epitopes present on octamers or nucleosomes but absent on the free histones (Rekvig and Hannestad, 1979; Feldman *et al.*, 1980; Laskov *et al.*, 1984). Results obtained in the tobacco mosaic virus system have shown that conformations specific for the quaternary structure of a protein can be induced in certain peptides although they are absent on the monomeric form of the protein (Milton and Van Regenmortel, 1979; Van Regenmortel *et al.*, 1983). The antigenic cross-reactivity between a peptide fragment and the corresponding polymerized protein may thus sometimes be greater than between the peptide and the monomeric protein (Bittle *et al.*, 1982).

Antibodies 3B10 and 3C7 also recognized the region 9-23 in the form of conjugated peptides 1-17 and 1-23 and free peptide 1-23. The required conformation for the respective epitopes recognized by these antibodies is present in (H3H4)₂ tetramers. Antibody 3B10 also recognized nonacetylated H4 and monoacetylated calf histone modified at residue 16 whereas antibody 3C7 did not bind to monomeric H4 (Table 1).

Antibody 21C2 was the only one that recognized the region 1-8 when presented as conjugated peptides 1-8, 1-17 and 1-23, although it did not bind to free peptides 1-23 adsorbed to plastic (Table 2). The conformation of this epitope recognized by the antibody appears to be induced in the conjugate and is also present in the mixture of the four core histones, although it is not present in monomeric H4.

Antibody 30D8 recognized the region 1-17 but only when presented as a free peptide in inhibition experiments (Fig. 5) or when H4 was mixed with the other core histones.

In summary, none of the 10 mAbs were completely specific for acetylated forms of H4, in spite of the fact that they were obtained from mice immunized with triacetylated H4.

In contrast, immunization of rabbits with triacetylated H4 led to production of antibodies that preferentially recognized the most highly acetylated forms of H4 (Fig. 6). This reaction was specific for acetylated epitopes in H4 since it did not occur with

diacetylated H3. Pfeffer *et al.* (1986) described the preparation of antibodies elicited in rabbits using the fully acetylated 1–37 peptide of H4 as immunogen. These antibodies reacted with nucleosomes containing hyperacetylated histones but not with non-acetylated nucleosomes. The difference in antibody specificity observed in the rabbit and in the mouse may possibly be linked to the higher relative doses of immunogen used for immunizing the mice.

In view of the possible functional significance of histone acetylation, there is considerable interest in the possibility of raising antibodies that would differentiate between acetylated and nonacetylated histones. Histones are subject to post-translational acetylation which modifies specific residues clustered in the amino terminal domains (for review, see Allfrey, 1980; Doenecke and Gallwitz, 1982; Matthews and Waterborg, 1985; Wu *et al.*, 1986). It has been suggested that histone acetylation may play a dynamic role in the modulation of chromatin structure, for instance by weakening histone–DNA contacts within the nucleosome or by affecting the interaction between nucleosomes thereby increasing the accessibility of certain regions of chromatin. Although there have been many attempts to correlate histone acetylation with processes such as DNA replication, active gene transcription, histone deposition, chromatin assembly and spermatogenesis, it has not yet been possible to establish a direct causal link between acetylation and any of these events.

In previous work (Muller *et al.*, 1982) we showed that antibodies specific for histones or for certain synthetic peptides of histones could detect a change in accessibility of certain histone regions resulting from H4 acetylation. It was found, for instance, that antibodies specific for histones H2A, H3 and for the hexapeptide 130–135 of H3 were much less reactive with core particles containing acetylated H4 than with control core particles. However, it would probably be easier to detect such changes if antibodies specific for the acetylated domains of histones were available. We are currently testing our antisera to establish their ability to discriminate between core particles and nucleosomes containing H4 acetylated to various degrees. These antisera should be of particular interest since they preferentially recognize the N-terminal region of H4 (even the large fragment 40–102 is not recognized) and are very sensitive to the presence of an acetyl group in position 5. Although monoclonal antibodies would, in principle, be ideal reagents for effecting such fine distinctions in chromatin, none of the 10 mAbs reacted with the triacetylated H4 that had been used as immunogen. It is possible that deacetylation of the immunogen (Waterborg and Matthews, 1982; Hay and Candido, 1983) occurred in the immunized mice and is responsible for the absence of a specific response to the acetylated forms of the molecule. However, this would imply that the same degree of deacetylation did not occur in the rabbit.

Alternatively, it is also possible that the selected antibodies possess some reactivity with both acetylated and nonacetylated H4 but that under the detection limits of the ELISA used, the former reactivity was lower than the latter. It has been shown that the presence of lysine residues in a peptide can lead to enhanced binding with specific antibodies (Leach, 1984). Since all mAbs were of the IgM type and thus presumably of low affinity, it is possible that unmodified lysine residues contributed in a nonspecific manner to the overall binding and that increasing degrees of acetylation brought the reaction below the threshold required for its visualization in a solid-phase immunoassay.

A somewhat similar finding has been reported 20 years ago in the case of an epitope of tobacco mosaic virus protein by Benjamini *et al.* (1968) who showed that the addition of hydrophobic groups to a short antigenic peptide enhanced its overall binding in a nonspecific manner.

It is noteworthy that the 10 mAbs as well as the antisera elicited by triacetylated H4 recognized exclusively the N-terminal region of H4. This finding using acetylated H4 may be linked to the previously established immunodominance of the N-terminal region in histone H4 (Muller *et al.*, 1983). Histone auto-antibodies have also been shown to recognize mainly epitopes located in the trypsin-sensitive N-terminal domains of core histones (Hardin and Thomas, 1983; Gohill *et al.*, 1985). This would seem to indicate that the histone regions most susceptible to chemical modification are also those preferentially recognized by the immune system.

Acknowledgement—The authors are grateful to Dr J. Van Rietschoten for amino acid analysis.

REFERENCES

- Allfrey V. G. (1980) In *Cell Biology* (Edited by Goldstein L. and Prescott D. M.), Vol. 3, pp. 347–437. Academic Press, New York.
- Al Moudallal Z., Altschuh D., Briand J. P. and Van Regenmortel M. H. V. (1984) Comparative sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. *J. Immun. Meth.* **68**, 35–43.
- Altschuh D. and Van Regenmortel M. H. V. (1982) Localization of antigenic determinants of a viral protein by inhibition of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with tryptic peptides. *J. Immun. Meth.* **50**, 99–108.
- Barany G. and Merrifield R. B. (1980) Solid-phase peptide synthesis. In *The Peptides* (Edited by Gross E. and Meienhofer J.), Vol. 2, pp. 1–284. Academic Press, New York.
- Benjamini E., Shimizu M., Young J. D. and Leung C. Y. (1968) Immunochemical studies on the tobacco mosaic virus protein. VII. The binding of octanoylated peptides of the tobacco mosaic virus protein with antibodies to the whole protein. *Biochemistry* **7**, 1261–1264.
- Bittle J. L., Houghten R. A., Alexander H., Shinnick T. M., Sutcliffe J. G., Lerner R. A., Rowlands D. J. and Brown F. (1982) Protection against foot and mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* **298**, 30–33.

- Briand J. P., Muller S. and Van Regenmortel M. H. V. (1985) Synthetic peptides as antigens: pitfalls of conjugation methods. *J. Immun. Meth.* **78**, 59–69.
- Bustin M. (1979) Immunological approaches to chromatin and chromosome structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **88**, 105–142.
- Bustin M. and Stollar B. D. (1973) Antigenic determinants in lysine-rich histones. *Biochemistry* **12**, 1124–1129.
- Cianfriglia M., Armellini D., Massone A. and Mariani M. (1983) Simple immunization protocol for high frequency production of soluble antigen-specific hybridomas. *Hybridoma* **2**, 451–457.
- Coupez M., Martin-Ponthieu A. and Sautière P. (1987) Histone H4 from cuttle-fish testis is sequentially acetylated. Comparison with acetylation of calf thymus histone H4. *J. biol. Chem.* (in press).
- Daban J. R. and Cantor C. R. (1982) Role of histone pairs H2A, H2B and H3, H4 in the self-assembly of nucleosome core particles. *J. molec. Biol.* **156**, 771–789.
- DeLange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L. and Bonner J. (1969) Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV; presence of *-N*-acetyllysine. *J. biol. Chem.* **244**, 319–334.
- Dierks S. E., Butler J. E. and Richerson H. B. (1986) Altered recognition of surface-adsorbed compared to antigen-bound antibodies in the ELISA. *Molec. Immun.* **23**, 403–411.
- Doenecke D. and Gallwitz D. (1982) Acetylation of histones in nucleosomes. *Molec. cell. Biochem.* **44**, 113–128.
- Feldman L., Beaudette N. V., Stollar B. D. and Fasman G. D. (1980) Conformational changes in the H3-H4 histone complex. *J. biol. Chem.* **255**, 7059–7062.
- Friguet B., Djavadi-Ohanian L. and Goldberg M. E. (1984) Some monoclonal antibodies raised with a native protein bind preferentially to the denatured antigen. *Molec. Immun.* **21**, 673–677.
- Gohill J., Cary P. D., Coupez M. and Fritzler M. J. (1985) Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxyl termini of histone. *J. Immun.* **135**, 3116–3121.
- Hardin J. A. and Thomas J. O. (1983) Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 7410–7414.
- Hay C. W. and Candido E. P. M. (1983) Histone deacetylase. Association with a nuclease resistant, high molecular weight fraction of HeLa cell chromatin. *J. biol. Chem.*, **258**, 3726–3734.
- Johns E. W. (1967) A method for the selective extraction of histone fractions f2(a)1 and f2(a)2 from calf thymus deoxyribonuclein at pH 7. *Biochem. J.* **105**, 611–614.
- Kennel S. J. (1982) Binding of monoclonal antibody to protein antigen in fluid phase or bound to solid supports. *J. Immun. Meth.* **55**, 1–12.
- Laskov R., Muller S., Hochberg M., Giloh H., Van Regenmortel M. H. V. and Eilat D. (1984) Monoclonal antibodies to histones from autoimmune NZB/NZW F1 mice. *Eur. J. Immun.* **14**, 74–81.
- Leach S. J. (1984) Antigenicity of proteins and peptides. *Annali Sclavo* **2**, 21–45.
- McCullough K. C., Crowther J. R. and Butcher R. N. (1985) Alteration in antibody reactivity with foot-and-mouth disease virus (FMDV) 146S antigen before and after binding to a solid phase or complexing with specific antibody. *J. Immun. Meth.* **82**, 91–100.
- Markose E. R. and Rao M. R. S. (1985) Testis-specific histone H1t is antigenically distinct among H1 subtypes. *J. biol. Chem.* **260**, 16263–16268.
- Matthews H. R. and Waterborg J. H. (1985) Reversible modifications of nuclear proteins and their significance. In *The Enzymology of Post-Translational Modification of Proteins*, Vol. 2, pp. 125–185. Academic Press, London.
- Mendelson E. and Bustin M. (1984) Monoclonal antibodies against distinct determinants of histone H5 bind to chromatin. *Biochemistry* **23**, 3459–3466.
- Michalski-Scrive C., Aubert J. P., Coupez M., Biserte G. and Loucheux-Lefebvre M. H. (1982) U.V. differential study of the histones H2A–H2B–H3–H4 octamer. *Biochimie* **64**, 347–355.
- Milton R. C. de L. and Van Regenmortel M. H. V. (1979) Immunochemical studies of tobacco mosaic virus—III. Demonstration of five antigenic regions in the protein subunit. *Molec. Immun.* **17**, 1205–1212.
- Muller S., Erard M., Burggraf E., Coupez M., Sautière P., Champagne M. and Van Regenmortel M. H. V. (1982) Immunochemical detection of changes in chromatin subunits induced by histone H4 acetylation. *EMBO J.* **1**, 939–944.
- Muller S., Soussanah A., Bouley J. P., Reinbolt J. and Van Regenmortel M. H. V. (1983) Localization of two antigenic determinations in histone H4. *Biochim. biophys. Acta* **747**, 100–106.
- Muller S., Coupez M., Briand J. P., Gordon J., Sautière P. and Van Regenmortel M. H. V. (1985a) Antigenic structure of histone H2B. *Biochim. biophys. Acta* **827**, 235–246.
- Muller S., Jockers-Wretou E., Sekeris C. E., Van Regenmortel M. H. V. and Bautz F. A. (1985b) Characterization of a monoclonal antibody reacting with histone H3. *FEBS Lett.* **182**, 459–464.
- Muller S., Plauze S., Coupez M. and Van Regenmortel M. H. V. (1986) Comparison of different methods for localizing antigenic regions in histone H2A. *Molec. Immun.* **23**, 593–601.
- Mura C. V., Mazen A., Neelin J. M., Briand G., Sautière P. and Champagne M. (1980) Distribution of antigenicity in chicken erythrocyte histone H5. *Eur. J. Biochem.* **108**, 613–620.
- Panyim S. and Chalkley R. (1969) High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. *Archs Biochem. Biophys.* **130**, 337–346.
- Pfeffer U., Ferrari N. and Vidali G. (1986) Availability of hyperacetylated H4 histone in intact nucleosomes to specific antibodies. *J. biol. Chem.* **261**, 2496–2498.
- Rekvig O. P. and Hannestad K. (1979) The specificity of human autoantibodies that react with both cell nuclei and plasma membranes: the nuclear antigen is present on core mononucleosomes. *J. Immun.* **123**, 2673–2681.
- Riordan J. F. and Vallee B. L. (1967) Acetylation. In *Methods in Enzymology* (Edited by Colowick S. P. and Kaplan N. O.), Vol. XI, pp. 565–570. Academic Press, New York.
- Rozalski M., Lafleur L. and Ruiz-Carrillo A. (1985) Monoclonal antibodies against histone H5. *J. biol. Chem.* **260**, 14379–14385.
- Sotirov N. and Johns E. W. (1972) Rabbit precipitin antibody to chicken erythrocyte histone F2C. *J. Immun.* **109**, 686–691.
- Srebrena L. and Zlatanova J. (1986) Specificity studies on anti-histone H1 antibodies obtained by different immunization methods. *FEBS Lett.* **200**, 123–127.
- Stocker J. W., Forster K. H., Miggiano V., Stahli C., Staiger G., Takacks B. and Staehelin T. (1982) Generation of 2 new mouse myeloma cell lines 'PAI' and 'PAI-O' for hybridoma production. *Res. Disclosure* **217**, 155–157.
- Stollar B. D. (1978) Serological analyses of histones. In *Methods in Cell Biology* (Edited by Stein G., Stein J. and Kleinsmith L. J.), Vol. 18, pp. 105–121. Academic Press.
- Stollar B. D. and Ward M. (1970) Rabbit antibodies to histone fractions as specific reagents for preparative and comparative studies. *J. biol. Chem.* **245**, 1261–1266.
- Turner B. M. (1982) Immunofluorescent staining of human metaphase chromosomes with monoclonal antibody to histone H2B. *Chromosoma* **87**, 345–357.
- Van Regenmortel M. H. V., Altschuh D. and Briand J. P. (1983) Role of conformation on the antigenic deter-

- minants of tobacco mosaic virus protein. In *Protein Conformation as an Immunological Signal* (Edited by Celada F., Schumaker V. N. and Sercarz E. E.), pp. 181-190. Plenum, New York.
- Waterborg J. H. and Matthews H. R. (1982) A more sensitive assay for histone deacetylase. *Analyt. Biochem.* **122**, 313-318.
- Whitfield W. G., Fellows G. and Turner B. M. (1986) Characterization of monoclonal antibodies to histone 2B. Localization of epitopes and analysis of binding to chromatin. *Eur. J. Biochem.* **157**, 513-521.
- Wouters-Tyrou D., Martin-Ponthieu A., Sautière P. and Biserte G. (1981) Acetylation of histone H4 in chicken erythrocyte and cuttle-fish testis chromatin. *FEBS Lett.* **128**, 195-200.
- Wu R. S., Panusz H. T., Match C. L. and Bonner W. M. (1986) Histones and their modifications. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **20**, 201-263.

VIII - 3. DISCUSSION

Influence de l'acétylation sur la structure de la "core particle"

Notre publication 7, sur la "core particle", fait état de changements assez minimes induits par l'acétylation. En aucun cas l'acétylation n'entraîne un remaniement général de la structure, ce qui est en accord avec la plupart des études, antérieures et ultérieures à la nôtre, effectuées dans les conditions qui stabilisent la structure de la chromatine (revues dans : OLIVA *et al.*, 1990 ; CSORDAS, 1990).

Lorsque la "core particle" est étudiée dans des conditions, de force ionique ou autres, qui tendent à la déstabiliser, des différences apparaissent entre "core particles" non acétylées et "core particles" acétylées, ces dernières tendant à s'ouvrir ou à s'allonger (OLIVA *et al.*, 1990).

Les conséquences les plus importantes de l'acétylation apparaissent dans les travaux qui ont été effectués avec des systèmes plus complexes que la "core particle". Ainsi une diminution du superenroulement normal induit par la formation de chaque "core particle", a été constatée à partir d'un ADN formé par la polymérisation d'une séquence de positionnement de nucléosome de 207 paires de bases (NORTON *et al.*, 1989, 1990). Ce résultat est séduisant. Une diminution de 10 à 15 % du nombre de supertours d'ADN (1,6 supertour au lieu de 1,8) pour la "core particle" acétylée représente une altération du site de fixation de l'histone H1 et explique l'action négative de l'acétylation sur l'aptitude de cette histone à induire la formation de la fibre de 30 nm (PERRY et ANNUNZIATO, 1991). L'action de l'acétylation des histones sur le superenroulement n'a pas été retrouvée à partir de l'ADN de SV 40 (LUTTER *et al.*, 1992). Les résultats de l'équipe de BRADBURY (NORTON *et al.*, 1989, 1990) peuvent être dus à l'ADN utilisé. Une autre explication évoquée par LUTTER *et al.* (1992) serait que la "core particle" formée à partir d'histones préacétylées ait une structure différente de la "core particle" formée à partir d'histones non acétylées puis acétylées par la suite. Les résultats pourraient alors dépendre aussi de la méthode de reconstitution utilisée.

Utilisation non quelconque des sites d'acétylation.

Les séquences N-terminales des histones sont toutes hydrolysées par les protéases. Toutefois quand les protéases sont immobilisées la séquence N-terminale de l'histone H4 résiste à la protéolyse (HACQUES *et al.*, 1990). Ceci indique une localisation plus interne de celle-ci et corrobore l'absence de mobilité de cette extrémité telle qu'elle a été déterminée par la RMN du ^{13}C (SMITH, R. M. et RILL, 1989). L'extrémité N-terminale de l'histone H4, contrairement aux extrémités des autres histones a une zone d'interaction située dans le segment d'ADN de 144 paires de bases de la "core particle". L'histidine 18 a pu être pontée avec l'ADN situé à 55 et 65 paires de bases de l'extrémité 5' sur un brin et à 88 paires de bases de l'extrémité 5' du brin complémentaire (EBRALIDSE *et al.*, 1988). Lorsque les histones sont acétylées, lors de l'hydrolyse par la DNase I, un site de coupure préférentiel situé à 60 paires de bases des extrémités de l'ADN de la "core particle" apparaît (SIMPSON, 1978b). Ce genre d'observations s'accorde avec l'idée que l'acétylation de chaque histone est assez spécifique d'un phénomène biologique (voir les revues de CSORDAS, 1990; PFEFFER et VIDALI, 1991).

Ces données s'expliquent par une interaction de la séquence très basique -Lys₁₆-Arg-His-Arg-Lys-Val-Leu-Arg₂₃- susceptible de nombreuses modifications postsynthétiques, de chacune des deux histones H4 que contient la "core particle", avec l'ADN situé à 1,5 tour de double hélice de part et d'autre de l'axe de dyade (site $\pm 1,5$; figures II. 1 et II. 2 chapitre II) (EBRALIDSE *et al.*, 1988). Ces résultats peuvent indiquer un rôle particulier pour l'acétylation de la lysine 16. La séquence située en amont de cette lysine et comportant les lysines acétylables 5, 8 et 12, séparées par une majorité d'acides aminés à chaîne courte, surtout des glycines, peut correspondre à une autre fonction biologique. L'utilisation non quelconque des sites d'acétylation (publication 9 ; TURNER *et al.*, 1992 ; et revues TURNER, 1991, 1993) est en faveur d'une spécificité de fonction de chaque lysine ou du moins de chaque groupe de lysines acétylables.

Les mutations obtenues chez la levure (JOHNSON *et al.*, 1990, 1992; voir aussi la revue de TURNER, 1991) indiquent une fonction particulière pour la lysine 16 dont le remplacement par une glycine ou une glutamine conduit à l'expression des loci HML α et HMR, normalement silencieux, ce qui entraîne une absence de conjugaison. La zone 16-29

de l'histone pourrait interagir avec un suppresseur codé par le gène SIR 3. Ceci est un des premiers résultats impliquant l'acétylation dans les interactions de type protéine-protéine.

L'acétylation transforme une chaîne latérale basique et hydrophile, candidate à une interaction de type ionique avec une fonction acide carboxylique (protéine) ou un groupement phosphate (surtout ADN) en une chaîne très longue, apte à établir des liaisons hydrophobes. L'existence de la leucine 10 est un argument en faveur d'interaction de ce type. Les protéines et/ou les structures impliquées dans ces liaisons restent à déterminer.

Nous n'avons discuté ci-dessus que de l'acétylation et pris pour exemple surtout l'histone H4, parce que, pour des raisons techniques, celle-ci a été la plus étudiée. Avec l'amélioration des méthodes et l'utilisation de nouvelles techniques (HPLC, anticorps spécifiques, spectrométrie de masse) des résultats significatifs concernant les autres modifications postsynthétiques et les autres histones devraient être obtenus dans les prochaines années.

Par RMN du ^{13}C (SMITH, R. M. et RILL, 1989) les résidus 1-20 de H3, 1-11 et 118-128 de H2A et peut-être les résidus 1-16 de H2B apparaissent mobiles dans la "core particle" comme dans les oligonucléosomes contenant H1. Ils doivent néanmoins participer d'une façon générale, non spécifique, à la neutralisation des charges négatives. Ceci peut correspondre à la fonction des extrémités assez variables des histones H2A et H2B, mais ne justifie pas l'absence de variations de la séquence entière de l'histone H3. La possibilité d'un rôle de l'acétylation des histones dans l'attachement de la chromatine à la matrice nucléaire a été évoqué. Une histone désacétylase a été trouvée au niveau de la matrice nucléaire. Il est concevable que l'histone désacétylase complexée à la chromatine engagée dans la transcription serve d'intermédiaire dans l'interaction des gènes actifs avec la matrice nucléaire (HENDZEL *et al*, 1991).

En résumé, l'acétylation semble intervenir dans différentes fonctions dont plusieurs dépassent largement le cadre de la "core particle".

L'immunologie de l'histone H4.

Lorsque nous avons entrepris ce travail il n'existait dans la littérature aucune donnée sur la possibilité de préparer des anticorps anti-lysines modifiées et à notre connaissance le sujet n'avait pas été évoqué. La façon la plus élégante et la plus rapide pour obtenir des

anticorps spécifiques d'une ou de deux lysines acétylées (compte tenu de la taille habituelle d'un épitope) nous a semblé être la voie des anticorps monoclonaux. Cette approche était justifiée par l'excellente maîtrise de ce genre de travail qu'avait M. H. V. VAN REGENMORTEL et son équipe (Strasbourg) dont Sylviane MULLER, plus spécialisée dans les histones. Ce travail a été un succès, dans le sens où il a permis la production d'anticorps anti-histones H4, ceci malgré l'identité entre H4 de souris et de veau ou de seiche. D'une façon surprenante les anticorps obtenus (publication 10) reconnaissaient beaucoup mieux l'histone H4 non acétylée que les espèces acétylées.

Plusieurs explications pourraient être données :

- désacétylation de l'immunogène après injection,
- mauvaise détection des clones réagissant contre les espèces acétylées.

En tout cas il ne s'agit pas d'une mauvaise manipulation, le résultat est lié à la technique des anticorps monoclonaux : ainsi, le laboratoire de B. TURNER (Birmingham, G.B) qui a préparé des anticorps monoclonaux anti-H2B, n'a pas, non plus, obtenu de monoclonaux anti-lysines acétylées.

Les anticorps polyclonaux anti-lysines acétylées que nous avons obtenus (publication 10) l'ont été, par injection de l'histone H4 triacétylée, à des lapins.

Le peptide 1-23 (H4) peracétylé avec l'anhydride acétique, peptide identique à l'extrémité N-terminale de l'histone naturellement tétraacétylée, utilisé comme témoin dans la publication 9, a été préparé, à l'origine, pour être utilisé comme immunogène dans le cas où l'histone H4 triacétylée n'aurait pas induit la production des anticorps souhaités. TURNER et collaborateurs (TURNER et FELLOWS, 1989; TURNER *et al.*, 1989) ont augmenté la précision de ce type d'immunisation en injectant à des lapins des peptides synthétiques de 11 à 13 résidus correspondant à des segments de l'extrémité N-terminale de l'histone H4 acétylés sur une lysine donnée. Des sérums spécifiques d'une lysine acétylée ont pu ainsi être produits. L'existence de ces anticorps, qui permettent, entre autres applications, la localisation dans la chromatine des zones acétylées, et même l'identification des lysines de l'histone H4 impliquées (revue dans TURNER, 1991), confirme le bien-fondé de l'utilisation de l'immunologie dans l'étude des modifications postsynthétiques des protéines.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Le travail présenté dans ce mémoire pourrait se résumer en l'isolement d'histones, en leur fractionnement selon le degré d'acétylation (le cas échéant) en la préparation de série de peptides et à l'utilisation de ce matériel pour toutes sortes d'études.

La préparation à grande échelle des histones pures a été rendue possible par deux innovations : la précipitation de l'histone H3 par l'acétone, la séparation des histones H2A et H2B l'une de l'autre par chromatographie sur colonne de SP-Sephadex. Tenter de séparer à pH 2,0 par chromatographie d'échange d'ions deux protéines dont les pHi sont voisins de 10-11 a été un défi lancé à la théorie. Le pH acide a empêché la formation du complexe H2A-H2B, les groupements guanidinium ont dû former des liaisons hydrogène avec les groupements acide sulfonique du gel, les deux histones se sont séparées.

L'addition d'urée à l'éluant a fourni un autre procédé de chromatographie, capable lui de traiter des composés peu solubles. Ce milieu ne sépare plus selon le contenu relatif en lysines et en arginines, mais selon le nombre de charges positives de la protéine (acides aminés basiques et extrémité N-terminale). Nous avons utilisé ce système pour fractionner les mélanges complexes de peptides fournis par les hydrolyses limitées et pour la séparation des histones selon l'acétylation.

A partir de ces histones, nous avons préparé des fragments recouvrant toute la molécule et conservant pour certains de l'hélicité. Ce matériel a été utilisé pour la production et la caractérisation d'anticorps anti-histones. Ces anticorps ont été et sont utilisés comme sondes moléculaires, leur utilisation en microscopie électronique pourrait permettre de mieux connaître l'orientation du nucléosome dans la fibre de 30 nm.

Ce matériel a permis de commencer la détermination de la spécificité des anticorps anti-histones dans le lupus érythémateux. Cette étude demande à être complétée : existe-t-il par exemple, des anticorps dirigés spécifiquement contre le complexe H2B-H4 ou contre les histones modifiées postsynthétiquement ?

Notre étude en infrarouge a attiré l'attention sur les zones en hélice dans les interactions histone-ADN. La topologie de la surface des histones, issue de la diffraction des rayons X par les cristaux d'octamères, plaide aussi en faveur d'un rôle particulier des hélices. La position de l'ADN par rapport à la surface protéique reste à établir de façon précise et sûre. Cette recherche pourrait être conduite à partir d'un modèle simple constitué d'un peptide structuré d'histone et d'un fragment d'ADN bien défini.

Nous avons fractionné l'histone H4 et dans une moindre mesure l'histone H3 selon le degré d'acétylation. L'acétylation de l'histone H4 a peu d'influence sur la structure de la "core particle". Le mode d'action de l'acétylation, même pour l'histone H4, est encore très mal connu. La recherche de protéines ou d'acides nucléiques, appartenant à la matrice nucléaire ou non, capables de se lier aux extrémités acétylées d'histones, serait une des voies d'investigation.

Dans ce mémoire il a été peu question de l'histone H3, de longs peptides de cette histone ont été obtenus, leur interaction avec l'ADN est en cours d'investigation. Cette histone (et ses peptides) avec ses cystéines (une ou deux, selon le variant) ses méthionines (une ou deux) et ses propriétés d'agrégation comparables à celles de l'histone H4, reste la plus difficile à manipuler. Les travaux concernant l'acétylation de l'histone H3 (et des histones H2A et H2B) sont en retard sur l'étude de l'acétylation de l'histone H4, aucun chercheur n'a, à notre connaissance, obtenu d'anticorps anti-histone H3 acétylée, alors qu'une demi-douzaine d'équipes ont maintenant préparé des anticorps anti-histone H4 acétylée. Pourtant l'extrémité N-terminale de l'histone H3 qui est très différente, beaucoup plus longue, justifierait une approche similaire. Le rôle et le mécanisme d'action de l'acétylation de cette histone peuvent être distincts de ceux de l'histone H4. La spécificité d'utilisation des sites d'acétylation dans l'histone H4 est en faveur de cette idée.

La phosphorylation n'a pas été abordée dans la partie "travaux", cependant la combinaison des deux systèmes utilisés pour la séparations des histones selon l'acétylation (pH 6,8 pour la résine Biorex 70 et pH 3,0 pour le SP-Sephadex) permet de séparer les formes acétylées des formes phosphorylées. La spectrométrie de masse peut fournir actuellement un contrôle rigoureux du matériel obtenu.

Les interactions histone-histone ont été évoquées dans l'introduction, mais n'ont pas été envisagées dans la partie "travaux" de ce mémoire, pourtant une grande partie de notre activité a consisté à faire interagir des peptides entre eux. La méthode des variations continues appliquée aux histones par D'ANNA et ISEBERG (1974c) s'est révélée applicable aux grands fragments d'histone. Nous avons fait interagir des fragments de l'histone H2A avec des fragments de l'histone H2B. Les zones d'interactions trouvées correspondent à ce qui est décrit dans la littérature. La méthode permet aussi d'étudier les interactions entre les peptides de toutes les histones. Dans une étude préliminaire nous avons mélangé des grands peptides de l'histone H2B avec l'histone H2A ou avec l'histone H4. A notre surprise les résultats sont similaires, ceci semble signifier qu'une même région de l'histone H2B peut interagir, soit avec l'histone H2A, soit avec l'histone H4. Il pourrait alors exister un deuxième système d'interactions, différent de celui qui a été trouvé dans les cristaux de "core particles" et d'octamères, un système qui serait transitoire et stable seulement dans des conditions bien particulières. Ceci justifierait la grande conservation des histones au cours de l'évolution, ceci est aussi en accord avec un nucléosome considéré comme un système dynamique.

La chromatine est loin d'être connue dans toute la plénitude de ses structures et de ses fonctions, par exemple la transition entre euchromatine et hétérochromatine commence seulement à être abordée, à cette occasion nous citerons ALBERTS et STERNGLANZ (1990) : "So far, the genetics and gene cloning are far ahead of the biochemistry in these systems. But researchers throughout the world are thawing out their old preparations of histones, and it seems that we are about to experience a major rebirth of interest in the structure of chromatin." (Jusqu'ici la génétique et le clonage des gènes étaient loin en tête de la biochimie dans ces systèmes. Mais partout dans le monde les chercheurs décongèlent leurs vieilles préparations d'histones et il semble que nous sommes sur le point de connaître une renaissance majeure de l'intérêt porté à la structure de la chromatine).

Références bibliographiques

- ADAMS, R. L. P. (1990)
DNA methylation.
Biochem. J. 265, 309-320
- AJIRO, K., BORUN, T. W. and COHEN, L. H. (1981)
Phosphorylation states of different histone H1 subtypes and their relationship to chromatin functions during the HeLa S-3 cell cycle.
Biochemistry 20, 1445-1454
- ALBERTS, B. and STERNGLANZ, R. (1990)
Chromatin contract to silence.
Nature 344, 193-194
- ALBRIGHT, S. C., WISEMAN, J. M., LANGE, R. A. and GARRARD, W. T. (1980)
Subunit structures of different electrophoretic forms of nucleosomes.
J. Biol. Chem. 255, 3673-3684
- ALLAN, J., HARTMAN, P. G., CRANE-ROBINSON, C. and AVILES, F. X. (1980)
The structure of histone H1 and its location in chromatin.
Nature 288, 675-679
- ALLAN, J., HARBORNE, N., RAU, D. C. and GOULD, H. (1982)
Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid.
J. Cell Biol. 93, 285-297
- ALLFREY, V. G., FAULKNER, R. M. and MIRSKY, A. E. (1964)
Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 786-794
- ALMAGOR, M. and COLE, D. (1987)
A high melting (105°) form of chromatin characterizes the potential of cells for mitosis.
J. Biol. Chem. 262, 15071-15075
- ALMAGOR, M. and COLE, D. (1989)
In physiological salt conditions the core proteins of the nucleosomes in large chromatin fragments denature at 73° and the DNA unstacks at 85 °C.
J. Biol. Chem. 264, 6515-6519
- ANNUNZIATO, A. T. and SEALE, R. L. (1982)
Maturation of nucleosomal and nonnucleosomal components of nascent chromatin : Differential requirements for concurrent protein synthesis.
Biochemistry 21, 5431-5438
- ANNUNZIATO, A. T. and SEALE, R. L. (1983)
Histone deacetylation is required for the maturation of newly replicated chromatin.
J. Biol. Chem. 258, 12675-12684
- ARENTS, G. and MOUDRIANAKIS, E.N. (1993)
Topography of the histone octamer surface : Repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10489-10493

- ARENTS, G., BURLINGAME, R. W., WANG, B.-C., LOVE, W.E. and MOUDRIANAKIS, E.N. (1991)
The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution : A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10148-10152
- ARFMANN, H.-A. and SHALTIEL, S. (1976)
Resolution and purification of histones on homologous series of hydrocarbon-coated agaroses.
Eur. J. Biochem. 70, 269-274
- ARNOTT, S. (1976)
In : Organization and expression of chromosomes (eds. ALLFREY, V. G., BAUTZ, E. K. F., McCARTHY, B. J., SCHIMKE, R. T. and TISSIERES, A.) 209-222 (Dahlem konferenzen, Berlin)
- ASHIKAWA, I., NISHIMURA, Y., TSUBOI, M., WATANABE, K. and ISO, K. (1982)
Lifetime of tyrosine fluorescence in nucleosome core particles.
J. Biochem. (Tokyo) 91, 2047-2055
- ATHEY, B. D., SMITH, M.F., RANKERT, D.A., WILLIAMS, S. P. and LANGMORE, J.P. (1990)
The diameters of frozen-hydrated chromatin fibers increase with DNA linker length : evidence in support of variable diameter models for chromatin.
J. Cell Biol. 111, 795-806
- AUSIO, J. (1992)
Structure and dynamics of transcriptionally active chromatin.
J. Cell Sci. 102, 1-5
- AVERY, O. T., MACLEOD, C. M. and McCARTY, M. C. (1944)
Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of the pneumococcal types.
J. Exp. Med. 79, 137-158
- BAER, B. W. and RHODES, D. (1983)
Eukaryotic RNA polymerase II binds to nucleosome cores from transcribed genes.
Nature 301, 482-488
- BALBI, C., ABELMOSCHI, M. L., GOGIOSO, L., PARODI, S., BARBORO, P., CAVAZZA, B. and PATRONE, E. (1989)
Structural domains and conformational changes in nuclear chromatin : A quantitative thermodynamic approach by differential scanning calorimetry.
Biochemistry 28, 3220-3227
- BANERJEE, S., BENNION, G. R., GOLDBERG, M. W. and ALLEN, T. D. (1991)
ATP dependent histone phosphorylation and nucleosome assembly in a human cell free extract.
Nucl. Acids Res. 19, 5999-6006

BAVYKIN, S. G., USACHENKO, S. I., LISHANSKAYA, A. I., SHICK, V. V., BELYAVSKY, A. V., UNDRITSOV, I. M., STROKOV, A. A., ZALENSKAYA, I. A. and MIRZABEKOV, A. D. (1985)

Primary organization of nucleosomal core particles is invariable in repressed and active nuclei from animal, plant and yeast cells.

Nucl. Acids Res. 13, 3439-3459

BEAUDETTE, N. V., FULMER, A. W., OKABAYASHI, H. and FASMAN, G. D. (1981)

Study of conformational states and reversibility of histone complexes.

Biochemistry 20, 6526-6535

BELYASKY, A. V., BAVYKIN, S. G., GOGUADZE, E. G. and MIRZABEKOV, A. D. (1980)

Primary organization of nucleosomes containing all five histones and DNA.

J. Mol. Biol. 139, 519-536

BENSCH, K. G., TANAKA, S., HU, S. Z., WANG, T. S.-F. and KORN, D. (1982)

Intracellular localization of human DNA polymerase α with monoclonal antibodies.

J. Biol. Chem. 257, 8391-8396

BEREZNEY, R. and BUCHHOLTZ, L. A. (1981)

Dynamic association of replicating DNA fragments with the nuclear matrix of regenerating liver.

Exp. Cell Res. 132, 1-13

BEREZNEY, R., NAKAYASU, H., HAKES, D. J. and BELGRADER, P. (1991)

Molecular cloning and characterization of the nuclear matrix.

J. Cell Biol. 115, 315a

BERRIOS, M., OSHEROFF, N. and FISHER, P. A. (1985)

In situ localization of DNA topoisomerase II, a major polypeptide component of the drosophila nuclear matrix fraction.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4142-4146

BERTRAND, E., ERARD, M., GOMEZ-LIRA, M. and BODE, J. (1984)

Influence of histone hyperacetylation on nucleosomal particles as visualized by electron microscopy.

Arch. Biochem. Biophys. 229, 395-398

BIANCHI, M.E., BELTRAME, M. and PAONESSA, G. (1989)

Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG 1.

Science 243, 1056-1059

BIDNEY, D. L. and REECK, G.R. (1977)

Association products and conformations of salt-dissociated and acid-extracted histones.

A two-phase procedure for isolating salt-dissociated histones.

Biochemistry 16, 1844-1849

BIRNSTIEL, M. L., BUSSLINGER, M. and STUB, K. (1985)

Transcription termination and 3' processing : The end is in site !

Cell 41, 349-359

- BODE, J., GOMEZ-LIRA, M. and SCHRÖTER, H. (1983)
Nucleosomal particles open as the histone core becomes hyperacetylated.
Eur. J. Biochem. 130, 437-445
- BODNAR, J. W. (1988)
A domain model for eukaryotic DNA organization : A molecular basis for cell differentiation and chromosome evolution.
J. Theor. Biol. 132, 479-507
- BOFFA, L. C., VIDALI, G., MANN, R. S. and ALLFREY, V. G. (1978)
Suppression of histone deacetylation *in vivo* and *in vitro* by sodium butyrate.
J. Biol. Chem. 253, 3364-3366
- BÖHM, L. and CRANE-ROBINSON, C. (1984)
Proteases as structural probes for chromatin : the domain structure of histones.
Bioscience Reports 4, 365-386
- BÖHM, E. L., STRICKLAND, W. N., STRICKLAND, M., THWAITES, B. H., VAN DER WESTHUIZEN, D. R. and VON HOLT, C. (1973)
Purification of the five main calf thymus histone fractions by gel exclusion chromatography.
FEBS Lett. 34, 217-221
- BONNE-ANDREA, C., WONG, M. L. and ALBERTS, B. M. (1990)
In vitro replication through nucleosomes without histone displacement.
Nature 343, 719-726
- BORZAKIAN, S. (1993)
La persistance virale : un agent étiologique possible pour les maladies auto-immunes.
Médecine / Sciences 9, 907-916
- BOULIKAS, T. (1990)
Poly (ADP-ribosylated) histones in chromatin replication.
J. Biol. Chem. 265, 14638-14647
- BOULIKAS, T. (1991)
Relation between carcinogenesis, chromatin structure and poly (ADP-ribosylation) (Review).
Anticancer Res. 11, 489-528
- BOULIKAS, T., WISEMAN, J. M. and GARRARD, W. T. (1980)
Points of contact between histone H1 and the histone octamer.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 127-131
- BOY DE LA TOUR, E. and LAEMMLI, U. K. (1988)
The metaphase scaffold is helically folded : Sister chromatids have predominantly opposite helical handedness.
Cell 55, 937-944

BRADBURY, E. M., (1975)

Histone nomenclature.

In : The structure and function of chromatin. Ciba Foundation Symposium N°28 (new series), 1. Associated Scientific Publ., Amsterdam

BRADBURY, E. M., (1983)

Flexibility in chromosomal proteins.

In : Mobility and recognition in cell biology. SUND and VEEGER. Editors. WALTER de GRUYTER and Co : Berlin-New York

BRADBURY, E. M., (1992)

Reversible histone modifications and the chromosome Cell Cycle.

BioEssays 14, 9-16

BRADDOCK, G. W., BALDWIN, J. P. BRADBURY, E. M. (1981)

Neutron-scattering studies of the structure of chromatin core particles in solution.

Biopolymers 20, 327-343

BURLINGAME, R. W., LOVE, W. E., WANG, B.-C., HAMLIN, R., XUONG, N.-H. and MOUDRIANAKIS, E. N. (1985)

Cristallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å.

Science 228, 546-553

BURZIO, L. O., RIQUELME, P. T. and KOIDE, S. S. (1979)

ADP-ribosylation of rat liver nucleosomal core histones.

J. Biol. Chem. 254, 3029-3037

BUSCH, H. (1984)

Ubiquitination of proteins.

Meth. Enzymol. 106, 238-262

BUSK, H., THOMSEN, B., BONVEN, B. J., KJELDSSEN, E., NIELSEN, O. F. and WESTERGAARD, O. (1987)

Preferential relaxation of supercoiled DNA containing a hexadecameric recognition sequence for topoisomerase I.

Nature 327, 638-640

BUSTIN, M., LEHN, D. A. and LANDSMAN, D. (1990)

Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes.

Biochim. Biophys. Acta 1049, 231-243

BUTLER, P. J. G. (1984)

A defined structure of the 30 nm chromatin fibre which accomodates different nucleosomal repeat lengths.

EMBO J. 3, 2599-2604

CANDIDO, E. P. M. and DIXON, G. H. (1972)

Acetylation of trout testis histones *in vivo*. Site of the modification in histone IIb₁.

J. Biol. Chem. 247, 3868-3873

- CARY, P. D., CRANE-ROBINSON, C., BRADBURY, M. and DIXON, G. (1982)
Effect of acetylation on the binding of N-terminal peptides of histone H4 to DNA.
Eur. J. Biochem. 127, 137-143
- CARY, P. D., TURNER, C. H., MAYES, E. and CRANE-ROBINSON, C. (1983)
Conformation and domain structure of the non-histone chromosomal proteins, HMG 1
and 2.
Eur. J. Biochem. 131, 367-374
- CAVAZZA, B., BRIZZOLARA, G., LAZZARINI, G. and PATRONE, E. (1991)
Thermodynamics of condensation of nuclear chromatin. A differential scanning calorimetry
study of the salt-dependent structural transitions.
Biochemistry 30, 9060-9072
- CHAI, L. S. and SANDBERG, A. A. (1988)
Chromosomes and their relationship to nuclear components during the cell cycle in chinese
hamster cells.
Cell Tissue Res. 251, 197-204
- CHELSKY, D., SOBOTKA, C. and O'NEILL, C. L. (1989)
Lamin B methylation and assembly into the nuclear envelope.
J. Biol. Chem. 264, 7637-7643
- CHEN, C. C., BRUEGGER, B. B., KERN, C. W., LIN, Y. C., HALPERN, R. M. and
SMITH, R. A. (1977)
Phosphorylation of nuclear proteins in rat regenerating liver.
Biochemistry 16, 4852-4855
- CHEN, Y. H., YANG, J.T. and CHAU, K. H. (1974)
Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism.
Biochemistry 13, 3350-3359
- CHICOINE, L. G., SHULMAN, I. G., RICHMAN, R., COOK, R. G. and ALLIS, C. D.
(1986)
Nonrandom utilization of acetylation sites in histones isolated from *Tetrahymena*. Evidence
for functionally distinct H4 acetylation sites.
J. Biol. Chem. 261, 1071-1076
- CHOU, P. Y. and FASMAN, G. D. (1978)
Empirical predictions of protein conformation.
Annu. Rev. Biochem. 47, 251-276
- CHRISTENSEN, M. E., RATTNER, J. B. and DIXON, G. H. (1984)
Hyperacetylation of histone H4 promotes chromatin decondensation prior to histone
replacement by protamines during spermatogenesis in rainbow trout.
Nucl. Acids Res. 12, 4575-4592
- CHUPRINA, U. P., HEINEMANN, U., NURISLAMOU, A. A., ZIELENKIEWICZ, P.,
DICKERSON, R. E. and SAENGER, W. (1991)
Molecular dynamics simulation of the hydration shell of a B-DNA decamer reveals two
main types of minor-groove hydration depending on groove width.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 593-597

- CIEJEK, E. M., TSAI, M.-J. and O'MALLEY, B. W. (1983)
Actively transcribed genes are associated with the nuclear matrix.
Nature 306, 607-609
- CLARK, E. and LEDBETTER, A. J. (1994)
How B and T cells talk to each other.
Nature 367, 425-428
- COCKERILL, P. N. and GARRARD, W. T. (1986)
Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites.
Cell 44, 273-282
- CONNER, B. N., TAKANO, T., TANAKA, S., ITAKURA, K. and DICKERSON, R. E. (1982)
The molecular structure of d(iCpCpGpG), a fragment of right-handed double helical A-DNA.
Nature 295, 294-299
- COOK, P. R. (1988)
The nucleoskeleton : Artefact, passive framework or active site ?
J. Cell Sci. 90, 1-6
- COOK, P. R. (1989)
The nucleoskeleton and the topology of transcription.
Eur. J. Biochem. 185, 487-501
- COOK, P. R. (1991)
The nucleoskeleton and the topology of replication.
Cell 66, 627-635
- COVAULT, J. and CHALKLEY, R. (1980)
Identification of distinct populations of acetylated histone.
J. Biol. Chem. 255, 9110-9116
- CSORDAS, A. (1990)
On the biological role of histone acetylation.
Biochem. J. 265, 23-38
- CUSICK, M.E., LEE, K.-S., DEPAMPHILIS, M. L. and WASSERMAN, P. M. (1983)
Structure of chromatin at deoxyribonucleic acid replication forks : Nuclease hypersensibility results from both prenucleosomal deoxyribonucleic acid and an immature chromatin structure.
Biochemistry 22, 3873-3884
- DALTON, S., ROBINS, A. J., HARVEY, R. P. and WELLS, J. R. E. (1989)
Transcription from the intron-containing chicken histone H2A.F gene is not S-phase regulated.
Nucl. Acids Res. 17, 1745-1756

- D'ANNA, J. A. and ISENBERG, I. (1972)
Fluorescence anisotropy and circular dichroism study of conformational changes in histone II b2.
Biochemistry 11, 4017-4025
- D'ANNA, J. A. and ISENBERG, I. (1974 a)
Conformational changes of histone LAK (f2a2).
Biochemistry 13, 2093-2097
- D'ANNA, J. A. and ISENBERG, I. (1974 b)
Conformational changes of histone ARE (F3, III).
Biochemistry 13, 4987-4992
- D'ANNA, J. A. and ISENBERG, I. (1974 c)
A histone cross-complexing pattern.
Biochemistry 13, 4992-4997
- D'ANNA, J. A. and PRENTICE, D. A. (1983)
Chromatin structural changes in synchronized cells blocked in early S phase by sequential use of isoleucine deprivation and hydroxyurea blockade.
Biochemistry 22, 5631-5640
- DAVIE, J. R. and CANDIDO, P. M. (1978)
Acetylated histone H4 is preferentially associated with template-active chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3574-3577
- DE BERNARDIN, W., KOLLER, T. and SAGO, J. M. (1986)
Structure of *in-vivo* transcribing chromatin as studied in simian virus 40 minichromosomes.
J. Mol. Biol. 191, 469-482
- DeLANGE, R. J., FAMBROUGH, D. M., SMITH, E. L. and BONNER, J. (1969)
Calf and pea histone IV. II. The complete amino-acid sequence of calf thymus histone IV : presence of ϵ -N-acetyllysine.
J. Biol. Chem. 244, 319-334
- DeLANGE, R. J., HOOPER, J. A. and SMITH, E. L. (1973)
Histone III. III - Sequence studies on the cyanogen bromide peptides ; complete amino-acid sequence of calf thymus histone III.
J. Biol. Chem. 248, 3261-3274
- DE MURCIA, G., HULETSKY, A. and POIRIER, G. G. (1988)
Review : Modulation of chromatin structure by poly (ADP-ribosyl)ation.
Biochem. Cell Biol. 66, 626-635
- DESROSIERS, R. and TANGUAY, R. M. (1988)
Methylation of *Drosophila* histones at proline, lysine, and arginine residues during heat shock.
J. Biol. Chem. 263, 4686-4692
- DIFFLEY, J. F. X. and STILLMAN, B. (1990)
The initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes.
Trends Genet. 6, 427-432

DIJKWEL, P. A. and HAMLIN, J. L. (1988)

Matrix attachment regions are positioned near replication initiation sites, genes, and an interamplicon junction in the amplified dihydrofolate reductase domain of Chinese hamster ovary cells.

Mol. Cell. Biol. 8, 5398-5409

DIMITROV, S., MAKAROV, V., APOSTOLOVA, T. and PASHEV, I. (1986)

Structure of hyperacetylated chromatin : light scattering and flow linear dichroism study.

FEBS Lett. 197, 217-220

DOENECKE, D. and GALLWITZ, D. (1982)

Acetylation of histones in nucleosomes.

Mol. Cell. Biochem. 44, 113-128

DOERFLER, W., TOTH, M., KOCHANEK, S., ACHTEN, S., FREISEM-RABIEN, U., BEHN-KRAPPA, A. and OREND, G. (1990)

Eukaryotic DNA methylation : facts and problems.

FEBS Lett. 268, 329-333

DRINKWATER, R. D., WILSON, P. J., SKINNER, J. D. and BURGOYNE, L. A. (1987)

Chromatin structures : Dissecting their mixed patterns in nuclease digests.

Nucl. Acids Res. 15, 8087-8103

EARNSHAW, W., HALLIGAN, B., COOKE, C., HECK, M. and LIU, L. (1985)

Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds.

J. Cell Biol. 100, 1706-1715

EBRALIDSE, K. K. and MIRZABEKOV, A. D. (1986)

One-domain interaction of histone H4 with nucleosomal core DNA is restricted to a narrow DNA segment.

FEBS Lett. 194, 69-72

EBRALIDSE, K. K., GRACHEV, S. A. and MIRZABEKOV, A. D. (1988)

A highly basic histone H4 domain bound to the sharply bent region of nucleosomal DNA.

Nature 331, 365-367

ECHOLS, H. (1990)

Nucleoprotein structures initiating DNA replication, transcription, and site-specific recombination.

J. Biol. Chem. 265, 14697-14700

EINCK, L. and BUSTIN, M. (1985)

The intracellular distribution and function of the high mobility group chromosomal proteins.

Exp. Cell Res. 156, 295-310

ELGIN, S. C. R. (1988)

The formation and function of DNase I hypersensitive sites in the process of gene activation.

J. Biol. Chem. 263, 19259-19262

- EMERSON, B. M. and FELSENFELD, G. (1984)
Specific factor conferring nuclease hypersensitivity at the 5' end of the chicken adult β globin gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 95-99
- FAIRMAN, R., SHOEMAKER, K. R., YORK, E. J., STEWART, J. M. and BALDWIN, R. L. (1989)
Further studies of the helix dipole model : effects of a free α -NH $_3^+$ or α -COO $^-$ group on helix stability.
Proteins 5, 1-7
- FASMAN, G. D., CHOU, P. Y. and ADLER, A. J. (1976)
Prediction of the conformation of the histones.
Biophys. J. 16, 1201-1238
- FELSENFELD, G. (1985)
L'ADN.
Pour la Science 98, 30-40
- FELSENFELD, G. (1992)
Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism.
Nature 355, 219-224
- FELSENFELD, G. and McGHEE, J. (1986)
Structure of the 30 nm chromatin fiber.
Cell 44, 375-377
- FERRANTI, P., MALORNI, A., MARINO, G., PUCCI, P., GOODWIN, G., MANFIOLETTI, G. and GIANCOTTI, V. (1992)
Mass spectrometric analysis of the HMG Y protein from Lewis lung carcinoma.
J. Biol. Chem. 267, 22486-22489
- FILIPSKI, J., LEBLANC, J., YOUNDALE, T., SIKORSKA, M. and WALKER, P. P. (1990)
Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures.
EMBO J. 9, 1319-1327
- FINLEY, D. and VARSHAVSKY, A. (1985)
The ubiquitin system : functions and mechanisms.
Trends Biochem. Sci. 10, 343-347
- FLAEGSTAD, T., FREDRIKSEN, K., DAHL, B., TRAAVIK, T. and REKVIG, O. P. (1988)
Inoculation with BK virus may break immunological tolerance to histone and DNA antigens.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8171-8175
- FLEISCHMANN, G., PFLUGFELDER, G., STEINER, E. K., JAVAHERIAN, K., HOWARD, G. C., WANG, J. C. and ELGIN, S. C. R. (1984)
Drosophila DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6958-6962
- GARCEA, R. L. and ALBERTS, B. M. (1980)

Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action.

J. Biol. Chem. 255, 11454-11463

GARNIER, J., OSGUTHORPE, D. J. and ROBSON, B. (1978)

Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins.

J. Mol. Biol. 120, 97-120

GASSER, S. M. and LAEMMLI, U. K. (1987)

A glimpse at chromosomal order.

Trends Genet. 16-22

GASSER, S. M., AMATI, B. B., CARDENAS, M. E. and HOFMANN, J.F.-X. (1989)

Studies on scaffold attachment sites and their relation to genome function.

Int. Rev. Cyt. 119, 57-96

GEORGIEV, G. P., VASSETZKY, Y. S., LUCHNIK, A. N., CHERNOKHVOSTOV, V.

V. and RAZIN, S. V. (1991)

Nuclear skeleton, DNA domains and control of replication and transcription.

Eur. J. Biochem. 200, 613-624

GERMOND, J. E., HIRT, B., OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P.

(1975)

Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1843-1847

GERSCHENSON, L. E. and ROTELLO, R. J. (1992)

Apoptosis : a different type of cell death.

FASEB. J. 6, 2450-2455

GHOSH, S. K., PAIK, W. K. and KIM, S. (1988)

Purification and molecular identification of two protein methylases I from calf brain.

J. Biol. Chem. 263, 19024-19033

GOLDKNOPF, I. L. and BUSCH, H. (1977)

Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 864-868

GONZALEZ, P. J. and PALACIAN, E. (1990)

Structural and transcriptional properties of different nucleosomal particles containing High Mobility Group proteins 14 and 17 (HMG 14/17)

J. Biol. Chem. 265, 8225-8229

GRIMES, S. R. (1986)

Nuclear proteins in spermatogenesis.

Comp. Biochem. Physiol. 83 B, 495-500

GROSS, D. S. and GARRARD, W. T. (1988)

Nuclease hypersensitive sites in chromatin.

Annu. Rev. Biochem. 57, 159-197

GROSS, E. and WITKOP, B. (1962)

Nonenzymatic cleavage of peptide bonds ; the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease.

J. Biol. Chem. 237, 1856-1860

GROSSCHEDL, R., GIESE, K. and PAGEL, J. (1994)

HMG domain proteins : architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures.

Trends Genet. 10, 94-100

GROVE, G. W. and ZWEIDLER, A. (1984)

Regulation of nucleosomal core histone variant levels in differentiating murine erythroleukemia cells.

Biochemistry 23, 4436-4443

GRUNSTEIN, M. (1990)

Histone function in transcription.

Annu. Rev. Cell Biol. 6, 643-678

GRUNSTEIN, M. (1992)

Les histones et la régulation des gènes.

Pour la Science 182, 48-56

GRUSS, C. and SOGO, J. M. (1992)

Chromatin replication.

BioEssays 14, 1-8

GRUSS, C., WU, J., KOLLER, T. and SOGO, J. M. (1993)

Disruption of the nucleosomes at the replication fork.

EMBO J. 12, 4533-4545

GURLEY, L. R., WALTERS, R. A. and TOBEY, R. A. (1975)

Sequential phosphorylation of histone subfractions in the Chinese Hamster cell cycle.

J. Biol. Chem. 250, 3936-3944

GURLEY, L. R., WALTERS, R. A., BARHAM, S. S. and DEAVEN, L. L. (1978)

Heterochromatin and histone phosphorylation.

Exp. Cell Res. 111, 373-383

HACQUES, M.-F., MULLER, S., DE MURCIA, G., VAN REGENMORTEL, M. H. V. and MARION, C. (1990)

Use of an immobilized enzyme and specific antibodies to analyse the accessibility and role of histone tails in chromatin structure.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 637-643

HANCOCK, R. (1982)

Topological organisation of interphase DNA : The nuclear matrix and other skeletal structures.

Biol. Cell. 46, 105-122

HARDIN, J. A. and THOMAS, J. O. (1983)

Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus : Localization of prominent autoantigens on histones H1 and H2B.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7410-7414

HARLAND, R. M., WEINTRAUB, H. and McKNIGHT, S. L. (1983)

Transcription of DNA injected into *Xenopus* oocytes is influenced by template topology.
Nature 302, 38-43

HARTMAN, P. G., CHAPMAN, G. E., MOSS, T. and BRADBURY, E. M. (1977)
Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H1 in eukaryote chromatin. The three structural regions of the histone H1 molecule.
Eur. J. Biochem. 77, 45-51

HATCH, C. L. and BONNER, W. M. (1988)
Sequence of cDNAs for mammalian H2A.Z, an evolutionarily diverged but highly conserved basal histone H2A isoprotein species.
Nucl. Acids Res. 16, 1113-1124

HATCH, C. L. and BONNER, W. M. (1990)
The human histone H2A.Z gene sequence and regulation.
J. Biol. Chem. 265, 15211-15218

HAYES, J. J., CLARK, D. J. and WOLFFE, A.P. (1991)
Histone contribution to the structure of DNA in the nucleosome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6829-6833

HE, D., NICKERSON, J. A. and PENMAN, S. (1990)
Core filament of the nuclear matrix.
J. Cell Biol. 110, 569-580

HEBBES, T. R., THORNE, A. W. and CRANE-ROBINSON, C. (1988)
A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin.
EMBO J. 7, 1395-1402

HEINTZ, N. (1991)
Transcription - A special issue.
Trends Biochem. Sci. 16, 393-445

HENDZEL, M. J. and DAVIE, J. R. (1989)
Distribution of methylated histones and histone methyltransferases in chicken erythrocyte chromatin.
J. Biol. Chem. 264, 19208-19214

HENDZEL, M. J., DELCUVE, G. P. and DAVIE, J. R. (1991)
Histone deacetylase is a component of the internal nuclear matrix.
J. Biol. Chem. 266, 21936-21942

HEWISH, D. R. and BURGOYNE, L. A. (1973)
Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regular spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 504-510

HILLIKER, A. J. and APPELS, R. (1989)
The arrangement of interphase chromosomes : structural and functional aspects.
Exp. Cell Res. 185, 297-318

- HJELM, R. P. and HUANG, R. C. (1974)
The role of histones in the conformation of DNA in chromatin as studied by circular dichroism.
Biochemistry 13, 5275-5283
- HJELM, R. P. and HUANG, R. C. (1975a)
The contribution of RNA and non-histone proteins to the circular dichroism spectrum of chromatin.
Biochemistry 14, 1682-1688
- HJELM, R. P. and HUANG, R. C. (1975b)
The conformation of proteins in chromatin. A circular dichroism study below 250 nm.
Biochemistry 14, 2766-2774
- HOL, W. G. J. (1985)
The role of the α -helix dipole in protein function and structure.
Prog. Biophys. Molec. Biol. 45, 149-195
- HOL, W. G. J., VAN DUIJNEN, P. T. and BERENDSEN, H. J. C. (1978)
The α -helix dipole and the properties of proteins.
Nature 273, 443-446
- HOUGH, C. J. and SMULSON, M. E. (1984)
Association of poly (adenosine diphosphate ribosylated) nucleosomes with transcriptionally active and inactive regions of chromatin.
Biochemistry 23, 5016-5023
- HOUARD, J. and DRAPEAU, G. R. (1972)
Staphylococcal protease : A proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3506-3509
- HOZÁK, P. and HASSAN, A. B. (1993)
Visualization of replication factories attached to a nucleoskeleton.
Cell 73, 361-373
- ICHIMURA, S., MITA, K. and ZAMA, M. (1982)
Essential role of arginine residues in the folding of deoxyribonucleic acid into nucleosome cores.
Biochemistry 21, 5329-5334
- IMAI, B. S., YAU, P., BALDWIN, J. P., IBEL, K., MAY, R. P. and BRADBURY, E. M. (1986)
Hyperacetylation of core histones does not cause infolding of nucleosomes. Neutron scatter data accords with disc shape of the nucleosome.
J. Biol. Chem. 261, 8784-8792
- INAGA, S., OSATAKE, H. and TANAKA, K. (1991)
SEM images of DNA double helix and nucleosomes observed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy.
J. Electron. Microsc. 40, 181-186

- ISHIKAWA, K. and IWAI, K. (1975)
Affinity chromatography of cysteine-containing histone.
J. Biochem. Japan 77, 391-398
- IWAI, K., ISHIKAWA, K. and HAYASHI, H. (1970)
Aminoacid sequence of slightly lysine-rich histone.
Nature 226, 1056-1058
- JACKSON, D. A. and COOK, P. R. (1988)
Visualisation of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat.
EMBO J. 7, 3667-3677
- JACKSON, D. A., McCREADY, S. J. and COOK, P. R. (1981)
RNA is synthesized at the nuclear cage.
Nature 292, 552-555
- JACKSON, D. A., McCREADY, S. J. and COOK, P. R. (1984)
Replication and transcription depend on attachment of DNA to the nuclear cage.
J. Cell. Sci. Sup. 1, 59-79
- JACKSON, V. (1987a)
Deposition of newly synthesized histones : New histones H2A and H2B do not deposit in the same nucleosome with new histones H3 and H4.
Biochemistry 26, 2315-2325
- JACKSON, V. (1987b)
Deposition of newly synthesized histones : Misinterpretations due to cross-linking density-labeled proteins with Lomant's reagent.
Biochemistry 26, 2325-2334
- JACKSON, V. (1990)
In vivo studies on the dynamics of histone-DNA interaction : Evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and a low level of dissolution independent of both.
Biochemistry 29, 719-731
- JACKSON, V., SHIRES, A., TANPHAICHITR, N. and CHALKLEY, R. (1976)
Modifications to histones immediately after synthesis.
J. Mol. Biol. 104, 471-483
- JOHNS, E. W. (1964)
Preparative methods for histone fractions from calf thymus.
Biochem. J. 92, 55-59
- JOHNS, E. W. (1967)
A method for the selective extraction of histone fractions F2a1 and F2a2 from calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7.
Biochem. J. 105, 611-614
- JOHNS, E. W. (1977)
The isolation and purification of histones.
Meth. Cell Biol. 16, 183-203

- JOHNS, E. W., PHILLIPS, D. M. P., SIMSON, P. and BUTLER, J. A. V. (1960)
Improved fractionations of arginine-rich histones from calf thymus.
Biochem. J. 77, 631-635
- JOHNSON, L. M., KAYNE, P. S., KAHN, E. S. and GRUNSTEIN, M. (1990)
Genetic evidence for an interaction between SIR3 and histone H4 in the repression of the silent mating loci in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6286-6290
- JOHNSON, L. M., FISHER-ADAMS, G. and GRUNSTEIN, M. (1992)
Identification of a non-basic domain in the histone H4 N-terminus required for repression of the yeast silent mating loci.
EMBO J. 11, 2201-2209
- KELLEY, R. I. (1973)
Isolation of a histone IIb1-IIb2 complex.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1588-1594
- KLUG, A., RHODES, D., SMITH, J., FINCH, J. T. and THOMAS, J. O. (1980)
A low resolution structure for the histone core of the nucleosome.
Nature 287, 509-516
- KLUG, A., FINCH, J. T. and RICHMOND, T. J. (1985)
Cristallographic structure of the octamer histone core of the nucleosome.
Science 229, 1109-1110
- KORNBERG, R. D. (1974)
Chromatin structure : a repeating unit of histone and DNA chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecules and about 200 DNA base pairs..
Science 184, 868-871
- KORNBERG, R. D. and THOMAS, J. O. (1974)
Chromatin structure : oligomers of the histones.
Science 184, 865-868
- KUMAR, S. and LEFFAK, M. (1986)
Assembly of active chromatin.
Biochemistry 25, 2055-2060
- LABHART, P. and KOLLER, T. (1982)
Structure of the active nucleolar chromatin of *Xenopus laevis* oocytes.
Cell 28, 279-292
- LAMB, M. M. and DANEHOLT, B. (1979)
Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans*.
Cell 17, 835-848
- LAMBERT, S. F. and THOMAS, J. O. (1986)
Lysine-containing DNA-binding regions on the surface of the histone octamer in the nucleosome core particle.
Eur. J. Biochem. 160, 191-201

- LAMBERT, S., MUYLDERMANS, S., BALDWIN, J., KILNER, J., IBEL, K. and WIJNS, L (1991)
Neutron scattering studies of chromatosomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 810-816
- LASSILA, O., VAINIO, O. and MATZINGER, P. (1988)
Can B cells turn on virgin T cells.
Nature 334, 253-255
- LAYBOURN, P. J. and KADONAGA, J. K. (1991)
Role of nucleosomal cores and histone H1 in regulation of transcription by RNA polymerase II.
Science 254, 238-245
- LEE, M.-S. and GARRARD, W. T. (1991)
Transcription-induced nucleosome "splitting" : An underlying structure for DNase I sensitive chromatin.
EMBO J. 10, 607-615
- LEFFAK, I. M., GRAINGER, R. and WEINTRAUB, H. (1977)
Conservative assembly and segregation of nucleosomal histones.
Cell 12, 837-845
- LEVIN, J. M. and GARNIER, J. (1988)
Improvements in a secondary structure prediction method based on a search for local sequence homologies and its use as a model building tool.
Biochim. Biophys. Acta 955, 283-295
- LEVY, A. and NOLL, M. (1981)
Chromatin fine structure of active and repressed genes.
Nature 289, 198-203
- LEVY-WILSON, B. and FORTIER, L. (1989)
The limits of the DNase I-sensitive domain of the human apolipoprotein B gene coincide with the locations of chromosomal anchorage loops and define the 5' and 3' boundaries of the gene.
J. Biol. Chem. 264, 21196-21204
- LEVY-WILSON, B., CONNOR, W. and DIXON, G. (1979a)
A subset of trout testis nucleosomes enriched in transcribed DNA sequences contains high mobility group proteins as major structural components.
J. Biol. Chem. 254, 609-620
- LEVY-WILSON, B., WATSON, D. C. and DIXON, G. H. (1979b)
Multiacetylated forms of H4 are found in a putative transcriptionally competent chromatin fraction from trout testis.
Nucl. Acids Res. 6, 259-274
- LEWIS, C. D. and LAEMMLI, U. K. (1982)
Higher order metaphase chromosome structure : evidence for metalloprotein interactions.
Cell 29, 171-181

LEWIS, C. D., LEBKOWSKI, J. S., DALY, A.K. and LAEMMLI, U. K. (1984)

Interphase nuclear matrix and metaphase scaffolding structures.

J. Cell Sci. Suppl. 1, 103-122

LICHTENSTEIN, A. V., ZABOIKIN, M. M., SJAKSTE, N. I. and ALECHINA, R. P. (1991)

Differential dissociation of chromatin digests : a novel approach revealing a hierarchy of DNA-protein interaction within chromatin domains.

J. Cell Sci. 99, 503-513

LICHTER, P., CREMER, T., BORDEN, J., MANUELIDIS, L. and WARD, D. C. (1988)

Delineation of individual chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries.

Hum. Genet. 80, 224-234

LILLEY, D. M. J. (1992)

HMG has DNA wrapped up.

Nature 357, 282

LIM, V.I. (1978)

Polypeptide chain folding through a highly helical intermediate as a general principle of globular protein structure formation.

FEBS Lett. 89, 10-14

LIQUIER, J. (1980)

Etude structurale par spectroscopie infrarouge en lumière polarisée des associations ADN-proteines chromosomiques.

Thèse de doctorat d'Etat ès-Sciences Physiques, Université de Paris XIII

LOCKHART, D. J. and KIM, P. S. (1992)

Internal Stark effect measurement of the electric field at the amino terminus of an α helix.

Science 257, 947-951

LOIDL, P. and GRÖBNER, P. (1987)

Postsynthetic acetylation of histones during the cell cycle : a general function for the displacement of histones during chromatin rearrangements.

Nucl. Acids Res. 15, 8351-8366

LORCH, Y., LaPOINTE, J. W. and KORNBERG, R. (1987)

Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones.

Cell 49, 203-210

LOSMAN, M. J., FASY, T.M., NOVICK, K. E. and MONESTIER, M. (1992)

Monoclonal autoantibodies to subnucleosomes from a MRL/Mp-+/+ mouse. Oligoclonality of the antibody response and recognition of a determinant composed of histones H2A, H2B, and DNA.

J. Immunol. 148, 1561-1569

LOUIE, J. A. and DIXON, G. H. (1972)

Synthesis, acetylation, and phosphorylation of histone IV and its binding to DNA during spermatogenesis in trout.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1975-1979

- LUCHNIK, A. N., BAKAYEV, V. V., ZBARSKY, I. B. and GEORGIEV, G. P. (1982)
Elastic torsional strain in DNA within a fraction of SV 40 minichromosomes : relation to transcriptionally active chromatin.
EMBO J. 1, 1353-1358
- LUCK, J. M., RASMUSSEN, P. S., SATAKE, K. and TSVETIKOV, A. N. (1958)
Further studies on the fractionation of calf-thymus histone.
J. Biol. Chem. 233, 1407-1414
- LUTTER, L. C., JUDIS, L. and PARETTI, R. F. (1992)
Effects of histone acetylation on chromatin topology in vivo.
Mol. Cell. Biol. 12, 5004-5014
- MAH, D. C. W., DIJKWEL, P. A., TODD, A., KLEIN, V., PRICE, G. B. and ZANNIS-HADJOPOULOS, M. (1993)
ors 12, a mammalian autonomously replicating DNA sequence, associates with the nuclear matrix in a cell cycle-dependent manner.
J. Cell Sci. 105, 807-818
- MAKAROV, V., DIMITROV, S., SMIRNOV, V. and PASHEV, I. (1985)
A triple helix model for the structure of chromatin fiber.
FEBS Lett. 181, 357-361
- MALIK, N. and SMULSON, M. (1984)
A relation between nuclear poly (adenosine diphosphate ribosylation) and acetylation posttranslational modifications. 1. Nucleosome studies.
Biochemistry 23, 3721-3725
- MANNIRONI, C., BONNER, W. M. and HATCH, C. L. (1989)
H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and poly A 3' processing signals.
Nucl. Acids Res. 17, 9113-9126
- MANUELIDIS, L. and BORDEN, J. (1988)
Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by *in situ* hybridization and three-dimensional reconstruction.
Chromosoma 96, 397-410
- MARDIAN, J. K. W., PATON, A. E., BUNICK, G. J. and OLINS, D. E. (1980)
Nucleosome cores have two specific binding sites for non-histone chromosomal proteins HMG 14 and HMG 17.
Science 209, 1534-1536
- MARKS, D. B., PAIK, W. K. and BORUN, T. W. (1973)
The relationship of histone phosphorylation to deoxyribonucleic acid replication and mitosis during the HeLa S-3 cell cycle.
J. Biol. Chem. 248, 5560-5567
- MARQUSEE, S. and BALDWIN, R. L. (1987)
Helix stabilisation by Glu⁻... Lys⁺ salt bridges in short peptides of de novo design.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8898-8902

MARRACK, P. and KAPPLER, J. (1987).

The T cell receptor.

Science 238, 1073-1079

MARTINAGE, A., MANGEAT, P., LAINE, B., COUPPEZ, M., SAUTIÈRE, 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

MARTINAGE, A., MANGEAT, P., SAUTIÈRE, P., COUPPEZ, M., MARCHIS-MOUREN, G. and BISERTE, G. (1981)

Study of *in vitro* phosphorylation of histones H3, H4 and of the non-acetylated and acetylated tetramers (H3-H4)₂.

FEBS Lett. 134, 107-110

MARVIN, J. W., YAU, P. and BRADBURY, M. (1990)

Isolation and characterization of acetylated histones H3 and H4 and their assembly into nucleosomes.

J. Biol. Chem. 265, 19839-19847

MARZLUFF, W. F. and McCARTY, K. S. (1972)

Structural studies of calf thymus F3 histone.

II. Occurrence of phosphoserine and ϵ -N-acetyllysine in thermolysin peptides.

Biochemistry 11, 2677-2681

MATTHEWS, H. R. and WATERBORG, J. H. (1985)

Reversible modifications of nuclear proteins and their significance.

The enzymology of post-translational modification of proteins. Vol. 2. Academic Press Inc. (London)

McCREADY, S. J., GODWIN, J., MASON, D. W., BRAZELL, I. A. and COOK, P. R. (1980)

DNA is replicated at the nuclear cage.

J. Cell Sci. 46, 365-386

McGHEE, J. D., NICKOL, J. M., FELSENFELD, G. and RAU, D. C. (1983a)

Higher order structure of chromatin : orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independant of species and spacer length.

Cell 33, 831-841

McGHEE, J. D., NICKOL, J. M., FELSENFELD, G. and RAU, D. C. (1983b)

Histone hyperacetylation has little effect on the higher order folding of chromatin.

Nucl. Acids Res. 11, 4065-4075

MEISTRICH, M. L., TROSTLE-WEIGE, P. K., LIN, R., BHATNAGAR, Y. M. and ALLIS, D. (1992)

Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids.

Mol. Reprod. Dev. 31, 170-181

MIRKOVITCH, J., GASSER, S. M. and LAEMMLI, U. K. (1988)

Scaffold attachment of DNA loops in metaphase chromosomes.

J. Mol. Biol. 200, 101-109

MIRZABEKOV, A. D., SAN'KO, D. F., KOLCHINSKY, A. M. and MELNIKOVA, A. F. (1977)

Protein arrangement in the DNA grooves in chromatin and nucleoprotamine *in vitro* and *in vivo* revealed by methylation.

Eur. J. Biochem. 75, 379-389

MIRZABEKOV, A. D., SHICK, V. V., BELYAVSKY, A. V. and BAVYKIN, S. G. (1978)

Primary organization of nucleosome core particle of chromatin : Sequence of histone arrangement along DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4184-4188

MORELAND, R. B., LANGEVIN, G. L., SINGER, R. H., GARCEA, R. L. and HEREFORD, L. M. (1987)

Amino acid sequence that determine the nuclear localization of yeast histone 2B.

Mol. Cell. Biol. 7, 4048-4057

MORENO, M. L., CHRYSOGELOS, S. A., STEIN, G. S. and STEIN, J. L. (1986)

Reversible changes in the nucleosomal organisation of a human H4 histone gene during the cell cycle.

Biochemistry 25, 5364-5370

MORSE, R. H. (1992)

Transcribed chromatin.

Trends Biochem. Sci. 17, 23-26

MOSS, T., CARY, P. D., ABERCROMBIE, B. D., CRANE-ROBINSON, C. and BRADBURY, E. M. (1976)

A pH-dependent interaction between histones H2A and H2B involving secondary and tertiary folding.

Eur. J. Biochem. 71, 337-350

MOUDRIANAKIS, E. N., LOVE, W. E., WANG, B. C., XUONG, N. G. and BURLINGAME, R. W. (1985)

Crystallographic structure of the octamer histone core of the nucleosome.

Science 229, 1110-1112

MOYER, R. A. and RAMSAY-SHAW, B. (1990)

Histone protection of the DNA minor groove in 5S RNA positioned nucleosomes : Selective alkylation by CC-1065.

J. Cell Biol. 111, 249a

MULLER, S. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1989)

Use of antihistone antibodies with nucleosomes.

Meth. Enzymol. 170, 251-263

MULLER, S., BONNIER, D., THIRY, M. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1989)

Reactivity of auto-antibodies in systemic lupus erythematosus with synthetic core histone peptides.

Int. Arch. Allergy Appl. Immun. 89, 288-296

- MULLER, S., CHAIX, M. L., BRIAND, J. P. and VAN REGENMORTEL, M. H. V. (1991)
Immunogenicity of free histones and of histones complexed with RNA.
Molec. Immunol. 28, 763-772
- MURRAY, A. and KIRSCHNER, M. (1991)
Le contrôle du cycle cellulaire.
Pour la Science 163, 60-67
- NACHEVA, G. A., GUSCHIN, D. Y., PREOBRAZHENSKAYA, O. V., KARPOV, V. L., EBRALIDSE, K. K. and MIRZABEKOV, A. D. (1989)
Change in the pattern of histone binding to DNA upon transcriptional activation.
Cell 58, 27-36
- NAKAYASU, H. and BEREZNEY, R. (1988)
Chromatrin : A 260 Kd core protein of the nuclear matrix which associates with chromosomes and the mitotic spindle apparatus during mitosis.
J. Cell. Biol. 107, 745a
- NELSON, D., COVAULT, J. and CHALKLEY, R. (1980)
Segregation of rapidly acetylated histones into a chromatin fraction released from intact nuclei by the action of micrococcal nuclease.
Nucl. Acids Res. 8, 1745-1763
- NESS, P. J., PARISH, R. W. and KOLLER, T. (1986)
Mapping of endogenous nuclease-sensitive regions and of putative topoisomerase sites of action along the chromatin of *Dictyostelium* ribosomal RNA genes.
J. Mol. Biol. 188, 287-300
- NEWPORT, J. W. and FORBES, D. J. (1987)
The nucleus : Structure, function, and dynamics.
Annu. Rev. Biochem. 56, 535-565
- NICKEL, B. E., ALLIS, C. D. and DAVIE, J. R. (1989)
Ubiquitinated histone H2B is preferentially located in transcriptionally active chromatin.
Biochemistry 28, 958-963
- NICKERSON, J. A., KROCHMALNIC, G., WAN, K. M. and PENMAN, S. (1989)
Chromatin architecture and nuclear RNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 177-181
- NOLL, M. (1974)
Internal structure of the chromatin subunit.
Nucl. Acids Res. 1, 1573-1578
- NOLL, M. and KORNBERG, R. D. (1977)
Action of micrococcal nuclease on chromatin and the location of histone H1.
J. Mol. Biol. 109, 393-404
- NORTON, V. G., IMAI, B. S., YAU, P. and BRADBURY, E. M. (1989)
Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change.
Cell 57, 449-457

- NORTON, V. G., MARVIN, K. W., YAU, P. and BRADBURY, E. M. (1990)
Nucleosome linking number change controlled by acetylation of histones H3 and H4.
J. Biol. Chem. 265, 19848-19852
- NURSE, P. (1990)
Universal control mechanism regulating onset of M-phase.
Nature 344, 503-508
- OGATA, N., UEDA, K. and HAYAISHI, O. (1980a)
ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the
modification site.
J. Biol. Chem. 255, 7610-7615
- OGATA, N., UEDA, K., KAGAMIYAMA, H. and HAYAISHI, O. (1980b)
ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic residues 2, 14 and the COOH-
terminal lysine residue as modification sites.
J. Biol. Chem. 255, 7616-7620
- OGAWA, Y., QUAGLIAROTTI, G., JORDAN, J., TAYLOR, C. W., STARBUCK, W.C.
and BUSCH, H. (1969)
Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone. III Sequence of the amino-
terminal half of the molecule containing the modified lysine residues and the total sequence.
J. Biol. Chem. 244, 4387-4392
- OHE, Y., HAYASHI, H. and IWAI, K. (1979)
Human spleen histone H2B. Isolation and amino acid sequence.
J. Biochem. (Tokyo) 85, 615-624
- OLINS, A. L. and OLINS, D. E. (1974)
Spheroid chromatin units (ν bodies).
Science 183, 330-332
- OLIVA, R. and MEZQUITA, C. (1982)
Histone H4 hyperacetylation and rapid turnover of its acetyl groups in transcriptionally
inactive rooster testis spermatids.
Nucl. Acids Res. 10, 8049-8059
- OLIVA, R. and MEZQUITA, C. (1986)
Marked differences in the ability of distinct protamines to disassemble nucleosomal core
particles *in vitro*.
Biochemistry 25, 6508-6511
- OLIVA, R., BAZETT-JONES, D., MEZQUITA, C. and DIXON, G. H. (1987)
Factors affecting nucleosome disassembly by protamines *in vitro*. Histone hyperacetylation
and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins.
J. Biol. Chem. 262, 17016-17025
- OLIVA, R., BAZETT-JONES, D. P., LOCKLEAR, L. and DIXON, G. H. (1990)
Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle.
Nucl. Acids Res. 18, 2739-2747

- OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1975)
Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit.
Cell 4, 281-300
- PAIK, W. K. and DiMARIA, P. (1984)
Enzymatic methylation and demethylation of protein-bound lysine residues.
Meth. Enzymol. 106, 274-287
- PALECEK, E. (1991)
Local supercoil-stabilized DNA structures.
Crit. Rev. Biochem. 26, 151-226
- PANYIM, S. and CHALKLEY, R. (1969)
High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.
Arch. Biochem. Biophys. 130, 337-346
- PARDON, J. F. and WILKINS, M. H. F. (1972)
A super coil model for nucleohistones.
J. Mol. Biol. 68, 115-124
- PARDON, J. F., WORCESTER, D. L., WOOLEY, J. C., TATCHALL, K., VAN HOLDE, K. E. and RICHARDS, B. M. (1975)
Low angle neutron scattering from chromatin subunit particles.
Nucl. Acids Res. 2, 2163-2176
- PATRIOTIS, C., ANDREEVA, M., PASCALEVA, M., IVANOV, V. and DJONDJUROV, L. (1990)
DNA-RNA complexes that might represent transient attachment sites of nuclear DNA to matrix.
J. Cell Sci. 95, 667-670
- PEHRSON, J. R. and FRIED, V.A. (1992)
Macro H2A, a core histone containing a large nonhistone region.
Science 257, 1398-1400
- PERRY, C. A. and ANNUNZIATO, A.T. (1989)
Influence of histone acetylation on the solubility, H1 content and DNase I sensitivity of newly assembled chromatin.
Nucl. Acids Res. 17, 4275-4291
- PERRY, C. A. and ANNUNZIATO, A.T. (1991)
Histone acetylation reduces H1-mediated nucleosome interactions during chromatin assembly.
Exp. Cell Res. 196, 337-345
- PERRY, C. A. and CHALKLEY, R. (1982)
Histone acetylation increases the solubility of chromatin and occurs sequentially over most of the chromatin. A novel model for the biological role of histone acetylation.
J. Biol. Chem. 257, 7336-7347
- PERUTZ, M. F. and FERMI, G. (1988)
Stereochemistry of salt-bridge formation in α -helices and β -strands.
Proteins 4, 294-295

- PESIS, K. H. and MATTHEWS, H. R. (1986)
Histone acetylation in replication and transcription : Turnover at specific acetylation sites in histone H4 from *Physarum polycephalum*.
Arch. Biochem. Biophys. 251, 665-673
- PFEFFER, U. and VIDALI, G. (1991)
Histone acetylation : recent approaches to a basic mechanism of genome organization.
Int. J. Biochem. 23, 277-285
- PFEFFER, U., FERRARI, N., TOSETTI, F. and VIDALI, G. (1988)
Histone hyperacetylation is induced in chick erythrocyte nuclei during reactivation in heterokaryons.
Exp. Cell Res. 178, 25-30
- PIENTA, K.J. and COFFEY, D. S. (1984)
A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome.
J. Cell Sci. Suppl. 1, 123-135
- POCCIA, D. (1986)
Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development.
Int. Rev. Cytol. 105, 1-65
- POMERAI, D. E., CHESTERTON, C. J. and BUTTERWORTH, H. W. (1974)
Preparation of chromatin. Variation in the template properties of chromatin dependent on the method of preparation.
Eur. J. Biochem. 46, 461-471
- PORTANOVA, J. P., ARNDT, R. E. and KOTZIN, B. L. (1988)
Selective production of autoantibodies in graft-vs-host-induced and spontaneous murine lupus.
J. Immunol. 140, 755-760
- POWELL, D., CRAN, D. G., JENNINGS, C. and JONES, R. (1990)
Spatial organization of repetitive DNA sequences in the bovine sperm nucleus.
J. Cell Sci. 97, 185-191
- PRIOR, C., CANTOR, C. R., JOHNSON, E. M., LITTAU, V. C. and ALLFREY, V. G. (1983)
Reversible changes in nucleosome structure and histone H3 accessibility in transcriptionally active and inactive states of rDNA chromatin.
Cell 34, 1033-1042
- PRUNELL, A., KORNBERG, R. D., LUTTER, L., KLUG, A., LEVITT, M. and CRICK, F. H. C. (1979)
Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin.
Science 204, 855-858
- PUIGDOMENECH, P., JOSE, M., RUIZ-CARRILLO, A. and CRANE-ROBINSON, C. (1983)
Isolation of a 167 base pair chromatosome containing a partially digested histone H5.
FEBS Lett. 154, 151-155

- RAZIN, S., KEKELIDZE, M. G., LUKANIDIN, E. M., SCHERRER, D. and GEORGIEV, G. P. (1986)
Replication origin are attached to the nuclear skeleton.
Nucl. Acids Res. 14, 8189-8207
- REALINI, C. A. and ALTHAUS, F. R. (1992)
Histone shuttling by poly (ADP-ribosylation).
J. Biol. Chem. 267, 18858-18865
- REEVES, R. (1984)
Transcriptionally active chromatin.
Biochim. Biophys. Acta 782, 343-393
- REEVES, R. and CHANG, D. (1983)
Investigations of the possible functions for glycosylation in the high mobility group proteins.
Evidence for a role in nuclear matrix association.
J. Biol. Chem. 258, 679-687
- REEVES, R., CHANG, D. and CHUNG, S.-C. (1981)
Carbohydrate modifications of the high mobility group proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6704-6708
- RENEKER, J. and BROTHERTON, T. W. (1991)
Postsynthetic methylation of core histones in K562 cells is associated with bulk acetylation
but not with transcriptional activity.
Biochemistry 30, 8402-8407
- RICHARDSON, J. P. (1975)
Initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase from supercoiled and non-
supercoiled bacteriophage PM2 DNA.
J. Mol. Biol. 91, 477-487
- RICHMOND, T. J., FINCH, J. T., RUSHTON, B., RHODES, D. and KLUG, A. (1984)
Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution.
Nature 311, 532-537
- RIDSDALE, J. A. and DAVIE, J. R. (1987)
Chicken erythrocyte polynucleosomes which are soluble at physiological ionic strength and
contain linker histones are highly enriched in β -globin gene sequences.
Nucl. Acids Res. 15, 1081-1096
- RIDSDALE, J. A., HENDZEL, M. J., DELCUVE, G. P. and DAVIE, J. R. (1990)
Histone acetylation alters the capacity of the H1 histones to condense transcriptionally
active / competent chromatin.
J. Biol. Chem. 265, 5150-5156
- RIGGS, M. G., WHETTAKER, R. G., NEUMANN, J. R. and INGRAM, V. M. (1977)
n-butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells.
Nature 268, 462-464
- ROARK, D. E., GEOGHEGAN, T. E. and KELLER, G. H. (1974)
A two-subunit histone complex from calf thymus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 542-547

- ROCA, J. and MEZQUITA, C. (1989)
DNA topoisomerase II activity in nonreplicating, transcriptionally inactive, chicken late spermatids.
EMBO J. 8, 1855-1860
- ROSE, K. M. (1988)
DNA topoisomerases as targets for chemotherapy.
FASEB J. 2, 2474-2478
- ROSE, S. M. and GARRARD, W. T. (1984)
Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes.
J. Biol. Chem. 259, 8534-8544
- RUBIN, R. L., BELL, S. A. and BURLINGAME, R. W. (1992)
Autoantibodies associated with lupus induced by diverse drugs target a similar epitope in the (H2A-H2B)-DNA complex.
J. Clin. Invest. 90, 165-173
- RUIZ-CARRILLO, A. and ALLFREY, V. G. (1973)
A method for the purification of histone fraction F₃ by affinity chromatography.
Arch. Biochem. Biophys. 154, 185-191
- RUIZ-CARRILLO, A., WANGH, L. J. and ALLFREY, V. G. (1975)
Processing of newly synthesized histone molecules. Nascent histone H4 chains are reversibly phosphorylated and acetylated.
Science 190, 117-128
- RUSSEV, G. and HANCOCK, R. (1982)
Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3143-3147
- RYOJI, M. and WORCEL, A. (1985)
Structure of the two distinct types of minichromosomes that are assembled on DNA injected in *Xenopus* oocytes.
Cell 40, 923-932
- SAITOH, Y. and LAEMMLI, U. (1994)
Metaphase chromosome structure : Bands arise from a differential folding path of the highly AT-rich scaffold.
Cell 76, 609-622
- SANDEEN, G., WOOD, W. I. and FELSENFELD, G. (1980)
The interaction of high mobility proteins HMG 14 and 17 with nucleosomes.
Nucl. Acids Res. 8, 3757-3778
- SANDERS, M. M. (1978)
Fractionation of nucleosomes by salt elution from micrococcal nuclease-digested nuclei.
J. Cell Biol. 79, 97-109

- SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., RUFFIN, P. and BISERTE, G. (1974)
Covalent structure of calf thymus ALK-histone.
Eur. J. Biochem. 41, 563-576
- SCHROEDER, W. A., SHELTON, J. R., SHELTON, J. B., CORMICK, J. and JONES, R. T. (1963)
The amino acid sequence of the γ chain of human foetal hemoglobin.
Biochemistry 2, 992-1008
- SCHROTH, G. P., CHOU, P.-J. and HO, P. S. (1992)
Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes.
J. Biol. Chem. 267, 11846-11855
- SCHUMPERLI, D. (1988)
Multilevel regulation of replication-dependent histone genes.
Trends Genet. 4, 187-191
- SCHUSTER, T., HAN, M. and GRUNSTEIN, M. (1986)
Yeast histone H2A and H2B amino termini have interchangeable functions.
Cell 45, 445-451
- SEIDMAN, M. M. and LEVINE, A. J. (1979)
The asymmetric segregation of parental nucleosomes during chromosome replication.
Cell 18, 439-449
- SELIGY, V. L. (1978)
Fractionation of avian erythrocyte histones by hydrophobic interaction chromatography.
Can. J. Biochem. 56, 880-884
- SELKER, E. U. (1990)
DNA methylation and chromatin structure : A view from below.
Trends Biochem. Sci. 15, 103-107
- SEN, E., MITRA, S. and CROTHERS, D. M. (1986)
Higher order structure of chromatin : evidence from photochemically detected linear dichroism.
Biochemistry 25, 3441-3447
- SENSHU, T. and IWAI, K. (1970)
Fractionation of calf thymus histone by a new method of CM-cellulose chromatography.
J. Biochem. Japan 67, 473-485
- SIMPSON, R. T. (1978a)
Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones.
Biochemistry 17, 5524-5531
- SIMPSON, R. T. (1978b)
Structure of chromatin containing extensively acetylated H3 and H4.
Cell 13, 691-699

- SKANDRANI, E., MIZON, J., SAUTIERE, P. and BISERTE, G. (1972)
Etude de la fraction F2b des histones de thymus de veau.
Biochimie 54, 1267-1272
- SMITH, F. F., TRES, L. L. and KIERSZENBAUM, A. L. (1992)
Expression of testis-specific histone genes during the development of rat spermatogenic cells *in vitro*.
Dev. Dynamics 193, 49-57
- SMITH, H. C., PUVION, E., BUCHHOLTZ, L. A. and BEREZNEY, R. (1984)
Spatial distribution of DNA loop attachment and replicational sites in the nuclear matrix.
J. Cell Biol. 99, 1794-1802
- SMITH, R. D., YU, J., ANNUNZIATO, A. and SEALE, R. (1984)
 β -Globin gene family in murine erythroleukemia cells resides within two chromatin domains differing in higher order structure.
Biochemistry 23, 2970-2976
- SMITH, R. M. and RILL, R. L. (1989)
Mobile histone tails in nucleosomes. Assignments of mobile segments and investigations of their role in chromatin folding.
J. Biol. Chem. 264, 10574-10581
- SO, A. G. and DOWNEY, K. M. (1992)
Eukaryotic DNA replication.
Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27, 129-155
- SPECTOR, D. L. (1990)
Higher order nuclear organization : Three-dimensional distribution of small nuclear ribonucleoprotein particles.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 147-151
- SPERLING, R. and BUSTIN, M. (1975)
Dynamic equilibrium in histone assembly : self-assembly of single histones and histone pairs.
Biochemistry 14, 3322-3331
- SREBREVA, L. and ZLATANOVA, J. (1986)
Specificity studies on anti-histone H1 antibodies obtained by different immunisation methods.
FEBS Lett. 200, 123-127
- STAYNOV, D. Z. (1983)
Possible nucleosome arrangements in the higher-order structure of chromatin.
Int. J. Biol. Macromol. 5, 3-9
- STAYNOV, D. Z. and CRANE-ROBINSON, C. (1988)
Footprinting of linker histones H5 and H1 on the nucleosome.
EMBO J. 7, 3685-3691
- STUURMAN, N., DE JONG, L., VAN RENSWOUDE, J., DE GRAAF, A., HUMBEL, B., VERKLEY, A. and VAN DRIEL, R. (1990a)
Biochemical and ultrastructural analysis of the internal nuclear matrix.
J. Cell Biol. 111, 117a

- STUURMAN, N., MEIJNE, A. M. L., VAN DER POL, A. J., DE JONG, L., VAN DRIEL, R. and VAN RENSWOUDE, J. (1990b)
The nuclear matrix from cells of different origin. Evidence for a common set of matrix proteins.
J. Biol. Chem. 265, 5460-5465
- SUBIRANA, J. A. (1992)
Hypothesis. Order and disorder in 30 nm chromatin fibers.
FEBS Lett. 302, 105-107
- SUBIRANA, J. A., MUNOZ-GUERRA, S., RADERMACHER, M. and FRANK, J. (1983)
Three dimensional reconstruction of chromatin fibers.
J. Biomol. Struct. Dynam. 1, 705-714
- SUNDARALINGAM, M., SEKHARUDU, Y. C., YATHINDRA, N. and RAVICHANDRAN, V. (1987).
Ion pairs in alpha helices.
Proteins 2, 64-71
- TAN, E. M. (1989)
Antinuclear antibodies : Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.
Adv. Immunol. 44, 93-151
- THEOFILOPOULOS, A. N., KOFLER, R., SINGER, P. A. and DIXON, F. J. (1989)
Molecular genetics of murine lupus models.
Adv. Immunol. 46, 61-109
- THOMA, F. (1991)
Structural changes in nucleosomes during transcription : strip, split or flip ?
Trends Genet. 7, 175-177
- THOMA, F., KOLLER, T. and KLUG, A. (1979)
Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin.
J. Cell Biol. 83, 403-427
- THOMAS, G., LANGE, H.-W. and HEMPEL, K. (1975)
Kinetics of histone methylation *in vivo* and its relation to the cell cycle in Ehrlich ascites tumor cells.
Eur. J. Biochem. 51, 609-615
- THOMAS, G. J., PRESCOTT, B. and OLINS, D. E. (1977)
Secondary structure of histones and DNA in chromatin.
Science 197, 385-388
- THOMAS, J. O. and KORNBERG, R. D. (1975)
An octamer of histones in chromatin and free in solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2626-2630

THOMAS, J. O. and WILSON, C. M. (1986)

Selective radiolabelling and identification of a strong nucleosome binding site on the globular domain of histone H5.

EMBO J. 5, 3531-3537

THOMAS, J. O., WILSON, C. M. and HARDIN, J. A. (1984)

The major core histone antigenic determinants in systemic lupus erythematosus are in the trypsin-sensitive regions.

FEBS Lett. 169, 90-96

THÖMMES, P. and HÜBSCHER, U. (1990)

Eukaryotic DNA replication. Enzymes and proteins acting at the fork.

Eur. J. Biochem. 194, 699-712

THORNE, A. W., SAUTIÈRE, P., BRIAND, G. and CRANE-ROBINSON, C. (1987)

The structure of ubiquitinated histone H2B.

EMBO J. 6, 1005-1010

TOUCHETTE, N. A. and COLE, D. (1985)

Differential scanning calorimetry of nuclei reveals the loss of major structural features in chromatin by brief nuclease treatment.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2642-2646

TRAVERS, A. A. (1987)

DNA bending and nucleosome positioning.

Trends Biochem. Sci. 12, 108-112

TSURIMOTO, T. and STILLMAN, B. (1989)

Multiple replication factors augment DNA synthesis by the two eukaryotic DNA polymerases, α and β .

EMBO J. 8, 3883-3889

TURNELL, W. G., SATCHWELL, S. C. and TRAVERS, A. A. (1988)

Hypothesis. A decapeptide motif for binding to the minor groove of DNA. A proposal.

FEBS Lett. 232, 263-268

TURNER, B. M. (1991)

Histone acetylation and control of gene expression.

J. Cell Sci 99, 13-20

TURNER, B. M. (1993)

Decoding the nucleosome.

Cell 75, 5-8

TURNER, B. M. and FELLOWS, G. (1989)

Specific antibodies reveal ordered and cell-cycle-related use of histone-H4 acetylation sites in mammalian cells.

Eur. J. Biochem. 179, 131-139

TURNER, B. M., O'NEILL, L. P. and ALLAN, I. M. (1989)

Histone H4 acetylation in human cells. Frequency of acetylation at different sites defined by immunolabeling with site-specific antibodies.

FEBS Lett. 253, 141-145

- TURNER, B. M., FRANCHI, L. and WALLACE, H. (1990)
Islands of acetylated histone H4 in polytene chromosomes and their relationship to chromatin packaging and transcriptional activity.
J. Cell Science 96, 335-346
- TURNER, B. M., BIRLEY, A. J. and LAVENDER, J. (1992)
Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in drosophila polytene nuclei.
Cell 69, 375-384
- VAN DER WESTHUYZEN, D. R. and VON HOLT, C. (1971)
A new procedure for the isolation and fractionation of histones.
FEBS Lett. 14, 333-337
- VAN HOLDE, K. E., LOHR, D. E. and ROBERT, C. (1992)
What happens to nucleosomes during transcription ?
J. Biol. Chem. 267, 2837-2840
- VAVRA, K. J., ALLIS, C. D. and GOROVSKY, M. A. (1982)
Regulation of histone acetylation in *Tetrahymena* macro- and micronuclei.
J. Biol. Chem. 257, 2591-2598
- VERHEIJEN, R., VAN VENROOIJ, W. and RAMAEKERS, F. (1988)
The nuclear matrix : Structure and composition.
J. Cell Sci. 90, 11-36
- VIDALI, G., BOFFA, L. C., BRADBURY, E. M. and ALLFREY, V. G. (1978)
Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histone H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2239-2243
- VOGELSTEIN, B., PARDOLL, D. M. and COFFEY, D. S. (1980)
Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication.
Cell 22, 79-85
- VON HOLT, C., STRICKLAND, W. N., BRANDT, W. F. and STRICKLAND, M. (1979)
More histone structures.
FEBS Lett. 100, 201-218
- VON KRIES, J. P., BUHRMESTER, H. and STRATLING, W. H. (1991)
A matrix/scaffold attachment region binding protein : Identification, purification and mode of binding.
Cell 64, 123-135
- WACHTEL, E. J. and SPERLING, R. (1983)
X-ray diffraction study of histone H4 with duplex DNA.
Biopolymers 22, 333-339
- WAKIM, B. T., PICKENS, M. M. and DELANGE, R. J. (1990)
Identification and partial purification of a chromatin bound calmodulin activated histone H3 kinase from calf thymus.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 84-90

- WALKER, J. M., HASTINGS, J. R. B. and JOHNS, E. W. (1977)
The primary structure of a non-histone chromosomal protein.
Eur. J. Biochem. 76, 461-468
- WALKER, J. M., GOODWIN, G. H. and JOHNS, E. W. (1979)
The primary structure of the nucleosome-associated chromosomal protein HMG 14.
FEBS Lett. 100, 394-398
- 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.
FEBS Lett. 122, 264-270
- WALLIS, J. W., RYKOWSKI, M. and GRUNSTEIN, M. (1983)
Yeast histone H2B containing large amino terminus deletions can function *in vivo*.
Cell 35, 711-719
- WANG, J. C. (1979)
Helical repeat of DNA in solution.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 200-203
- WANG, A. H.-J., QUIGLEY, G. J., KOLPAK, F. J., CRAWFORD, J. L., VAN BOOM, J. H., VAN DER MAREL, G. and RICH, A. (1979)
Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution.
Nature 282, 680-686
- WASSARMAN, P. M. and KORNBERG, R. D. (1989)
Nucleosomes.
Meth. Enzymol. 170, 1-663
- WATSON, J. D. and CRICK, F. H. D. (1953)
A structure for deoxyribose nucleic acid.
Nature 171, 737-738
- WEISBROD, S. (1982)
Review article : Active chromatin.
Nature 297, 289-295
- WEISBROD, S. and WEINTRAUB, H. (1979)
Isolation of a subclass of nuclear proteins responsible for conferring a DNase I-sensitive structure on globin chromatin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 630-634
- WEISBROD, S., GROUDINE, M. and WEINTRAUB, H. (1980)
Interaction of HMG 14 and 17 with actively transcribed genes.
Cell 19, 289-301
- WELLS, R. D. (1988)
Unusual DNA structures.
J. Biol. Chem. 263, 1095-1098

- WELLS, D. and BROWN, D. (1991)
Histone and histone gene compilation and alignment update.
Nucl. Acids Res. 19, Sup. 2173-2188
- WELLS, D. and KEDES, L. (1985)
Structure of a human histone cDNA : Evidence that basally expressed histone genes have intervening sequences and encode polyadenylated mRNAs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2834-2838
- WELLS, D. and McBRIDE, C. (1989)
A comprehensive compilation and alignment of histones and histones genes.
Nucl. Acids Res. 17, Sup. r311-r346
- WEST, M. H. P. and BONNER, W. M. (1980)
Histone 2B can be modified by the attachment of ubiquitin.
Nucl. Acids Res. 8, 4671-4680
- WICKETT, R. R., LI, H. J. and ISENBERG, I. (1972)
Salt effects on histone IV conformation.
Biochemistry 11, 2952-2957
- WIDOM, J. and KLUG, A. (1985)
Structure of the 300 Å chromatin filament : X-ray diffraction from oriented samples.
Cell 43, 207-213
- WILHELM, X. et CHAMPAGNE, M. (1969)
Dissociation de la nucléoprotéine d'érythrocytes de poulets par les sels.
Eur. J. Biochem. 10, 102-109
- WILLIAMS, S. P., ATHEY, B. D., MUGLIA, L. J., SCHAPPE, R. S., GOUGH, A. H. and LANGMORE, J. P. (1986)
Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length.
Biophys. J. 49, 233-248
- WING, R., DREW, H., TAKANO, T., BROKA, C., TANAKA, S., ITAKURA, K. and DICKERSON, R. E. (1980)
Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA.
Nature 287, 755-758
- WITTIG, G., DORBIC, T. and RICH, A. (1989)
The level of Z-DNA in metabolically active, permeabilized mammalian cell nuclei is regulated by torsional strain.
J. Cell Biol. 108, 755-764
- WOODCOCK, C. L. F. (1973)
Ultrastructure of inactive chromatin.
J. Cell Biol. 59, 368a
- WOODCOCK, C. L. F., FRADO, L.-L. Y. and RATTNER, J. B. (1984)
The higher-order structure of chromatin : Evidence for a helical ribbon arrangement.
J. Cell Biol. 99, 45-52

- WOODCOCK, C. L., McEWEN, B. F. and FRANK, J. (1991a)
Ultrastructure of chromatin. II Three-dimensional reconstruction of isolated fibers.
J. Cell Sci. 99, 107-114
- WOODCOCK, C. L., WOODCOCK, H. and HOROWITZ, R. A. (1991b)
Ultrastructure of chromatin. I. Negative staining of isolated fibers.
J. Cell Sci. 99, 99-106
- WOODCOCK, C. L., GRIGORYEV, S. A., HOROWITZ, R. A. and WHITAKER, N. (1993)
A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9021-9025
- WORCEL, A., HAN, S. and WONG, M. L. (1978)
Assembly of newly replicated chromatin.
Cell 15, 969-977
- WORCEL, A., STROGATZ, S. and RILEY, D. (1981)
Structure of chromatin and the linking number of DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1461-1465
- WU, R. S., PANUSZ, H. T., HATCH, C. L. and BONNER, W. M. (1986)
Histones and their modifications.
CRC. Critical Reviews in Biochemistry 20, 201-263
- WU, S.-C., GYORGYEY, J. and DUDITS, D. (1989)
Polyadenylated H3 histone transcripts and H3 histone variants in alfalfa.
Nucl. Acids Res. 17, 3057-3063
- YAMASU, K. and SENSHU, T. (1990)
Conservative segregation of tetrameric units of H3 and H4 histones during nucleosome replication.
J. Biochem. 107, 15-20
- YANG, S. F. (1970)
Sulfoxide formation from methionine or its sulfide analogs during aerobic oxidation of sulfite.
Biochemistry 9, 5008-5014
- YEOMAN, L. C., OLSON, M. O. J., SUGANO, N., JORDAN, J. J., TAYLOR, C. W., STARBUCK, W. and BUSCH, H. (1972)
Amino acid sequence of the center of the arginine-lysine-rich histone from calf thymus. The total sequence.
J. Biol. Chem. 247, 6018-6023
- ZENTGRAF, H. and FRANKE, W. W. (1984)
Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin : cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes
J. Cell Biol. 99, 272-286

ZLATANOVA, J. and VAN HOLDE, K. (1992)
Histone H1 and transcription : still an enigma ?
J. Cell Sci. 103, 889-895

ZWEIDLER, A. (1978)
Resolution of histones by polyacrylamide gel electrophoresis in presence of nonionic detergents. Chromatin and chromosomal protein research II.
Meth. Cell Biol. 17, 223-232

ZWEIDLER, A. (1992)
Role of individual histone tyrosines in the formation of the nucleosome complex.
Biochemistry 31, 9205-9211

