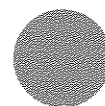


EDSON ROSA PIMENTEL



**FRAÇÃO HISTÔNICA NUCLEAR RICA EM HISTONA H₅: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO,
ORIENTAÇÃO MACROMOLECULAR E INTERAÇÃO COM DNA**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da UNICAMP para
obtenção do título de Doutor em
Ciências na área de Biologia Celular
e Molecular.

Orientador : Prof. Dr. BENEDICTO DE CAMPOS VIDAL

CAMPINAS - S.P.

1988

Aos meus pais, por terem dado tudo de si para minha formação;

Ao meu tio Carlos, pelo exemplo, confiança e apoio que a mim sempre dispensou;

À Shirlei, esposa e companheira, por te querer muito bem.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, deixo aqui minha gratidão, pela presença constante que ponteu cada momento deste trabalho, pela dedicação e orientação segura, e sobretudo por ter emprestado muito de sua experiência para a minha formação científica. Por tudo isto e pela amizade com que me tem distinguido, sou muito grato.

Aos Profs. Drs. Maria Luiza Silveira Mello, Luis Carlos Gomes Simões, William José da Silva, Ladaslav Sodek e Roy Edward Bruns, pela atenção que dispensaram à leitura do manuscrito desta tese, bem como pelas sugestões apresentadas.

Ao Prof. Dr. Avelino Rodrigues de Oliveira, por ter permitido o uso da ultracentrífuga e também pelas manifestações de apoio e incentivo à realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, que gentilmente permitiu o uso de um espectrofotômetro de fluorescência, para fluorimetria de histonas em solução.

Ao Frigorífico Avícola Paulínia Ltda., por ter permitido a coleta de material em suas dependências.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Celular e em especial aos técnicos Mário Bianchi e Creuza Aparecida Dias, pela ajuda dispensada durante o desenvolvimento deste trabalho.

À técnica Maria Tereza de Paula, pela disposição e carinho com que se dedicou a ampliação das fotos desta tese.

À Sra. Anna Gagliardi, bibliotecária chefe neste Instituto, pela dedicação e valiosa colaboração prestada na revisão das referências bibliográficas.

Aos professores e colegas do Departamento de Biologia Celular, pela amizade e colaboração, em especial à Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, pelas correções do manuscrito do resumo em inglês.

À minha esposa Shirlei, pelo apoio, incentivo e paciência em todas as horas, e também pelo trabalho de datilografia.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho pôde ser realizado graças à doação de equipamentos pela FAPESP, Conselho Nacional de Pesquisas e Fundação Alexander von Humboldt ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da UNICAMP na pessoa dos Profs. Drs. Benedicto de Campos Vidal e Maria Luiza Silveira Mello.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS	16
1. Coleta de material	16
2. Preparação dos núcleos de eritrócitos	16
3. Extração de histonas	16
4. A eletroforese de histonas	19
5. Curvas espectrais de absorção	21
6. Estudos fluorométricos	21
7. Complexos histonas-DNA	22
8. Microscopia de polarização	22
9. Microscopia eletrônica	24
III. RESULTADOS	25
1. Extractibilidade de histonas H ₅ e H ₁ frente a diferentes métodos de extração	25
2. Curvas espectrais de FRH ₅ e H ₁ de timo	25
3. Fluorescência de FRH ₅ e H ₁ de timo	32
3.1. Fluorescência de FRH ₅ e H ₁ de timo em solução	32
3.2. Fluorescência de precipitados	32
4. Ordem molecular do gel de cromatina de nú- cleos tratados com NaCl 0,7M	36
5. Anisotropias de complexos DNA-FRH ₅ e DNA-HT ...	40
6. Anisotropias de núcleos totais	45
7. Capacidade de histonas em ligarem molécu- las de corante	45

8. Visualização de complexos DNA-FRH ₅ ao microscópio eletrônico	50
9. Visualização ao microscópio eletrônico de núcleos tratados com NaCl 0,7M	54
IV. DISCUSSÃO	65
V. CONCLUSÕES	79
VI. RESUMO	80
VII. ABSTRACT	82
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ABREVIATURAS

ANS - 8-anilino naphtaleno-1-sulfonato
A-T - Adenina-timina
A.T. - Azul de toluidina
AU - Acetato de uranila
BSA- Soro albumina bovina
CBB - Coomassie brilliant blue
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNase - Desoxirribonuclease
DNP - Desoxirribonucleoproteína
DSC - Cloreto de sódio 0,015M e citrato de sódio 0,0015M
EPTA - Etanol-ácido fosfotúngstico
FRH₅ - Fração rica em H₅
HT - Histonas totais
NMR - Ressonância magnética nuclear
N.Y. - Naphthol yellow S
PCA - Ácido perclórico
Phe - fenilalanina
PMSF - Fluoreto de fenil-metil-sulfonil
ppt - precipitado
PTA - Ácido fosfotúngstico
RNA - Ácido ribonucleico
SCP - Salina-citrato-PMSF
SN - Sobrenadante
S.R.F3B - Sirius red F3B
TCA - Ácido tricloroacético
TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletileno-diamina
Tyr- Tirosina

I. INTRODUÇÃO

A produção de conhecimento sobre os mecanismos pelos quais o material genético transcreve suas informações têm sido o principal motivo para pesquisas na área de estrutura cromatínica.

Os primeiros estudos sobre a estrutura da cromatina começaram com as observações de RIS (1956), que foi o primeiro a descrever que núcleos de células de eucariotos apresentavam fibras de DNP que mediam cerca de 200 a 250Å de diâmetro. Seguiram-se algumas idéias com o objetivo de interpretar a ultraestrutura daquelas fibras de DNP (GALL, 1963; RIS & CHANDLER, 1963; DuPRAW, 1965a,b,c; BARNICOT, 1967), ficando esclarecido que a cada fibra de DNP correspondia uma única dupla hélice de DNA, associada com proteínas (DuPRAW, 1965c; RIS, 1966; ABUELO & MORE, 1969).

Experimentos utilizando tripsina (DuPRAW, 1965 a,b), mostraram que a fibra cromatínica exibe regiões mais espessas (fibra B) unidas por regiões mais finas (fibra A), dando idéia de que fibras mais espessas poderiam se descompactar originando fibras mais finas e vice-versa. Estas observações sugeriram a existência de diferentes ordens de compactação de estrutura nucleoproteica (DuPRAW, 1970a,b; RIS & KUBAI, 1970).

Os estudos sobre a ultraestrutura da fibra cromatínica, tiveram continuidade com os trabalhos de OLINS &

OLINS (1974). Estes autores visualizaram ao microscópio eletrônico, que núcleos de várias origens, quando suspensos em KCl 0,2M e a seguir rompidos em água, mostravam uma distribuição linear de unidades esféricas, "v bodies", medindo aproximadamente 70Å de diâmetro, e entre estas unidades foram notados fios conectantes medindo 15Å de diâmetro. Também KORNBERG (1974) e KORNBERG & THOMAS (1974), propuseram que a cromatina consistia de unidades repetitivas formadas de duas moléculas de cada um dos tipos de histonas H_{2a} , H_{2b} , H_3 e H_4 e cerca de 200 pares de bases de DNA. Uma quinta histona, H_1 , se localiza superficialmente a esta unidade (KORNBERG, 1974).

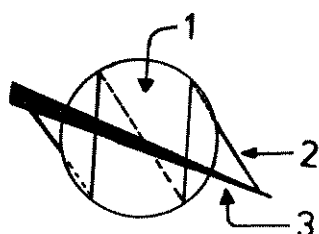
OUDET e colaboradores (1975) observando cromatina destituída de H_1 , observou que esta era constituída de uma cadeia flexível de partículas esféricas, as quais denominou de nucleossomos. Este mesmo autor observando cromatina em que H_1 não havia sido removida, verificou que os nucleossomos estavam fortemente compactados, sugerindo então que H_1 estivesse envolvido na compactação da fibra cromatínica.

Atualmente o termo nucleossomo é empregado para designar unidades constituídas de histonas H_{2a} , H_{2b} , H_3 e H_4 (duas de cada), 200 pares de bases de DNA e uma molécula de H_1 . O termo "core" nucleossômico é atribuído a um octâmero de histonas H_{2a} , H_{2b} , H_3 e H_4 , associado a 146 pares de bases de DNA. Estas definições foram possíveis a partir de resultados de digestão da fibra cromatínica com DNase I (McGHEE & FELSENFELD, 1980; KORNBERG & KLUG, 1981).

A localização do segmento de DNA sobre a superfície do octâmero de histonas, perfazendo 1 volta e $\frac{3}{4}$ em torno deste octâmero foi possível a partir de experimentos com DNase

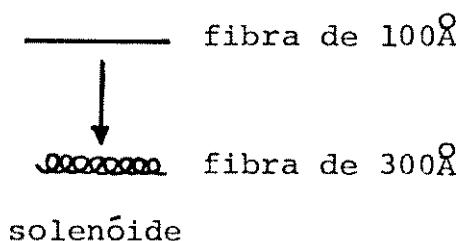
I (NOLL, 1974, 1977) e difração de neutrons (PARDON et alii, 1975; HJELM et alii, 1977).

Esquemáticamente, poderíamos representar o nucleossomo, do seguinte modo:



1. octâmero de histonas
2. segmento de DNA
3. molécula de H_1

A descrição apresentada até agora sobre a ultraestrutura da cromatina, se refere ao material cromatínico em núcleo interfásico, que exhibe níveis hierárquicos de compactação. As fibras destes núcleos apresentam um diâmetro aproximado de $300\text{\AA}$, o que é próprio de um nível de compactação conhecido como tendo uma conformação em solenóide (BRADBURY et al, 1974; OUDET et al, 1975; WORCEL, 1977; THOMA & KOLLER, 1977; MÜLLER et alii, 1978; THOMA et al, 1979), como se pode verificar no seguinte esquema:



No entanto, esta fibra de $300\text{\AA}$, pode assumir níveis mais altos de compactação, como se observa em cromossomos mitóticos, e neste caso H_1 teria um desempenho predominante (LITTAU et alii, 1965; BRADBURY et al, 1973; BILLET & BARRY, 1974).

A ação de nucleases como DNase I (SIMPSON & WHITLOCK, 1976; LUTTER, 1977; NOLL, 1974, 1977) e DNase II (LUTTER, 1981) sobre a cromatina, revelou a existência de pontos bem determinados, sensíveis à ação destas enzimas; esta periodicidade em relação a estes sítios sugere uma distribuição simétrica dos pontos de contato entre DNA e o octâmero de histonas (FELSENFELD, 1978). A localização precisa dos sítios de ação no "core" nucleossômico, revelou que estes sítios estão espaçados em número múltiplo de 10,4 bases (LUTTER, 1979) e não 10 como se pensava anteriormente (NOLL, 1974). Essas diferenças foram atribuídas a diferentes tipos de bloqueio estérico efetuado pelas histonas em vários locais da molécula de DNA, afetando desse modo, a porção de DNA disponível à ação de DNase I (LUTTER, 1979).

A conformação e posição de histonas no "core" nucleossômico tem sido melhor conhecida a partir dos seguintes experimentos: 1. sequenciamento de aminoácidos das histonas (Von HOLT et alii, 1979; ISENBERG, 1979); 2. complexações entre histonas, avaliadas por mudanças no espectro de NMR (MOSS et alii, 1976; BÖHM et alii, 1977; BRADBURY et alii, 1977); 3. interações entre histonas, utilizando luz ultravioleta (De LANGE et al, 1979) e agentes formadores de ligações cruzadas (MARTINSON et alii, 1979); 4. interações entre DNA e histonas do "core", também com auxílio de ligações cruzadas (MIRZABEKOV et alii, 1977, 1978; SIMPSON, 1978; SHICK et alii, 1980).

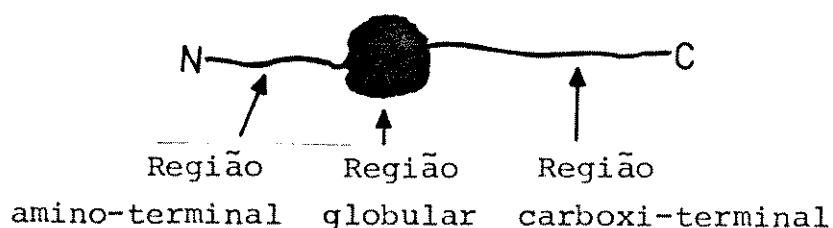
Por outro lado, análises de difração de raios X e microscopia eletrônica, permitiram a apresentação de um modelo (FINCH et alii, 1977) em que a partícula "core" apre-

senta-se como um cilindro achatado, medindo $110\text{\AA}$ de diâmetro e $57\text{\AA}$ em altura, dimensões estas, compatíveis com os resultados obtidos através de espalhamento de neutrons (PARDON et alii, 1977; SUAU et alii, 1977). Observações de cristais de "core" nucleossômico ao microscópio eletrônico e análise de difração de raios X, mostraram que o DNA circunda o octâmero de histonas apresentando uma periodicidade de $28\text{\AA}$, que provavelmente corresponda ao passo da superfície de DNA em torno do octâmero de histonas (FINCH et alii, 1977) e estudos exclusivamente teóricos, sugerem uma suave inclinação da molécula de DNA em torno do "core" nucleossômico (LEVITT, 1978; SUSSMAN & TRIFONOV, 1978).

As proteínas histônicas podem ser definidas como proteínas básicas que, associadas a segmentos da molécula de DNA, dão origem às unidades cromatínicas chamadas nucleossomos. Os primeiros estudos sobre estas proteínas se referiram à sua ação na atividade de transcrição de DNA, mostrando que estas proteínas eram capazes de inibir a síntese de RNA a partir de DNA (ALLFREY et al, 1963). Paralelamente surgiram trabalhos que paulatinamente foram demonstrando o papel estrutural das histonas na arquitetura cromatínica (KORNBERG, 1974; KORNBERG & THOMAS, 1974; OLINS et alii, 1976).

As histonas se caracterizam por apresentarem riqueza em aminoácidos arginina e lisina, e por ausência completa do aminoácido triptofano. As histonas são classificadas com relação ao teor de lisina e arginina, em: 1. histonas ricas em lisina (H_1); 2. histonas moderadamente ricas em lisina (H_{2a} e H_{2b}); 3. histonas ricas em arginina (H_3 e H_4).

A histona H_1 , do ponto de vista evolutivo é considerada a mais variável em termos de estrutura primária (ISENBERG, 1978; Von HOLT et alii, 1979). Apresenta em sua molécula três regiões bem definidas: uma região amino-terminal com 40 resíduos; uma região central e hidrofóbica, com aproximadamente 80 resíduos; e uma carboxi-terminal com 108 resíduos (HARTMAN et alii, 1977; ISENBERG, 1979; ALLAN et alii, 1980). A região globular ou central apresenta algumas características que diferem bastante das regiões N- e C-terminais, por ser altamente conservada evolutivamente e também por exibir caráter hidrofóbico (ALLAN et alii, 1980). A molécula de H_1 poderia ser representada de forma esquemática assim:



Para H_1 são reservadas funções na supercompactação e na organização de solenóides de fibras nucleoproteicas (BRADBURY et al, 1974; OUDET et al, 1975; WORCEL, 1977; RENZ et al, 1977; THOMA & KOLLER, 1977; MÜLLER et alii, 1978; THOMA et al, 1979).

As histonas H_{2a} , H_{2b} , H_3 e H_4 apresentam no geral duas regiões de domínio: uma região amino-terminal onde se encontra maior quantidade de aminoácidos básicos, e uma região carboxi-terminal, rica em aminoácidos hidrofóbicos, o que confere um aspecto globular a esta região (DeLANGE & SMITH, 1971; ISENBERG, 1979; SPERLING & WACHTEL, 1981). Um resumo com algumas características destas proteínas é apresentado a seguir:

Caracterização de histonas de timo de bezerro (Delange e Smith, 1971; Elgin & Weintraub, 1975)

Classe	Fração	Número de subfrações	Razão lisina/arginina	Total de amino-ácidos	Peso molecular
Rica em lisina	H ₁ (I, f1, KAP)	3-4	22.0	~ 215	~ 21.500
Levemente rica em lisina	H ₂ a (IIb1, f2a2, ALG) H ₂ b (IIb2, f2b, KSA)	? 2	1.17 2.50	129 125	14.004 13.774
Rica em arginina	H ₃ (III, f3, ARE) H ₄ (IV, f2a1, GRK)	3 2-3	0,72 0,79	135 102	15.324 11.282

As frações assinaladas entre parênteses correspondem à nomenclatura mais antiga.

A interação do complexo de DNP com H_1 , é sugerida que seja mais devida à união DNA- H_1 , do que de H_1 com outras histonas. Tal conclusão é amparada pelos experimentos de complexação DNA- H_1 e de DNP, estudados por ressonância nuclear magnética (NMR) (BRADBURY et alii, 1975). Este mesmo autor sugeriu que a região globular de H_1 tem pouca importância na interação DNA- H_1 , mas outros trabalhos tem reservado uma participação mais ativa para esta região, uma vez que foi constatada ser a única capaz de distinguir entre DNA circular em conformação de superhélise e DNA circular em conformação "relaxada" (BINA-STEIN et alii, 1976; VOGEL & SINGER, 1976; SINGER & SINGER, 1976). Alguns autores têm mostrado que na interação DNA- H_1 , H_1 tem ligação preferencial e cooperativa com DNA rico em A-T (SPONAR & SORMOVÁ, 1972; MAREKOV et al, 1978) e DNA satélite (CHAPMAN et alii, 1976).

A idéia de que a interação H_1 -cromatina se dá principalmente pela região C-terminal dos braços de H_1 , e não pela região central hidrofóbica desta histona, vem de experimentos, em que ao se desnaturar a região globular, não se observou nenhuma alteração na interação H_1 -cromatina, no que se refere ao espectro de NMR (BRADBURY et alii, 1975). Por outro lado, o papel de H_1 como único agente capaz de levar a cromatina a outros níveis de compactação, independentemente de outras histonas, foi fortalecido pela habilidade demonstrada de H_1 contrair DNA livre de histonas (BRADBURY et alii, 1975).

A participação efetiva de H_1 na compactação cromatínica é comprovada por vários autores, que demonstram uma transição estrutural da fibra cromatínica, quando H_1 é removida, transformando a fibra de 250Å em um filamento com a

aparência de contas de colar (OLINS & OLINS, 1974; FINCH et al, 1975; GRIFFITH, 1975; OUDET et al, 1975; FINCH & KLUG, 1976).

Acredita-se que a interação H_1 -DNA possa ser modulada pela força iônica (RENZ et al, 1977), pelo fato de que uma fibra nucleossômica com $200\text{\AA}$ de diâmetro ao ser submetida a força iônica muito baixa ($\text{NaCl} \approx 20\text{mM}$), passou a ter um aspecto descompactado, e apareceram as cadeias familiares de nucleossomos com $85\text{\AA}$ de diâmetro. Este mesmo autor admite que a descompactação da fibra cromossômica quando a concentração de NaCl passa de $0,15\text{M}$ para $0,02\text{M}$ possa ser consequência de mudanças na interação H_1 -DNA, passando de uma ligação do tipo cooperativa, como ocorre em complexos H_1 -DNA apenas (RENZ & DAY, 1976), para uma do tipo não cooperativo, com as moléculas de H_1 se redistribuindo totalmente ao acaso ao longo da fibra cromatínica. Mais uma evidência da importância de H_1 na estabilização do estado compactado da cromatina foi encontrado em complexos de nucleoproteína de Simian Virus 40, que tiveram suas moléculas de H_1 removidas com $\text{NaCl } 0,6\text{M}$, passando então de uma forma compactada, para uma forma distendida (MÜLLER et alii, 1978).

A necessidade da presença de H_1 para formação da fibra com $300\text{\AA}$ de diâmetro e a sua manutenção no interior do núcleo (FINCH & KLUG, 1976; RENZ et al, 1977), tem levado alguns autores a admitirem a interação entre moléculas de H_1 (THOMA et al, 1979; WORCEL, 1977), o que levaria à formação de solenóides.

No modelo proposto por WORCEL (1977), as moléculas de H_1 estão colocadas com sua polaridade alternada ao longo da fibra de $100\text{\AA}$. A molécula de H_1 se situa no nucleosso

mo de tal forma que as regiões terminais da histona se situem sobre o segmento de DNA que emerge do "core" nucleossômico. Esta ligação de H_1 , à cromatina destituída de H_1 induziria a fibra de DNP com $100\text{\AA}$ de diâmetro, a assumir uma compactação inicial, e a localização da molécula de H_1 , permitiria que a região N-terminal de uma molécula ficasse próxima à região C-terminal de uma outra molécula de H_1 , situada na volta adjacente da hélice do filamento de DNP, de modo que interações H_1 - H_1 poderiam estabilizar a fibra cromatínica de $300\text{\AA}$.

Embora seja sugestivo imaginar, com base na própria composição de aminoácidos, que na interação entre as extremidades terminais de H_1 , estejam envolvidas ligações do tipo eletrostática, CRUICKSHANK e WALKER (1981) têm afirmado que para manter a estrutura supercondensada da cromatina, ou mesmo a própria fibra de $300\text{\AA}$, não devem estar envolvidas interações eletrostáticas entre as moléculas de H_1 . Acreditam estes autores que as cadeias laterais básicas de H_1 , criam um microambiente local, que aumenta a força iônica próxima aos fosfatos na molécula de DNA, permitindo à cadeia nucleossômica assumir estruturas de ordem superior, não envolvendo ligações eletrostáticas entre moléculas de H_1 . Estas conclusões foram baseadas em comparações de parâmetros termodinâmicos, medidos em cromatina nos estados condensado e não condensado. Ainda segundo este autor, as funções das ligações eletrostáticas de H_1 são completamente satisfeitas dentro do próprio nucleossomo.

Uma outra histona, H_5 , com características muito semelhantes a H_1 , é encontrada em núcleos de eritrócitos de aves, répteis, anfíbios e peixes (EDWARD & HNILICA, 1968; NEELIN, 1968; MIKI & NEELIN, 1975). Durante o processo de eritro-

poiêse a histona H_1 é gradualmente substituída por H_5 (SINCLAIR & BRASCH, 1975), simultaneamente, a síntese de RNA e proteína vai gradualmente diminuindo, chegando a grau zero, nos eritrócitos maduros (WILLIAMS, 1971). Os estudos de histona H_5 se prendem à relação existente entre o aparecimento de H_5 e alterações na estrutura cromatínica acompanhadas de diminuição da atividade transcritiva.

Certa homologia estrutural constatada entre a subfração H_{10} e H_5 (SMITH et al, 1980), associada ao aspecto altamente compactado da cromatina nuclear de eritrócito de ave, sugere que H_5 possa ter uma função primária de reprimir síntese de DNA (SMITH et al, 1980), fenômeno que é sabido ocorrer durante a maturação de eritrócitos (SINCLAIR & BRASCH, 1975); H_{10} , uma subfração de H_1 , descrita por PANYIM & CHALCKLEY (1969b), se caracteriza por estar presente em níveis que são inversamente proporcionais às taxas de divisão celular (PEHRSON & COLE, 1980).

A estrutura primária de H_5 de eritrócito de ave, mostra altas quantidades de lisina, arginina, serina e alanina (GREENAWAY, 1971), e análise cromatográfica tem revelado presença de subfrações de H_5 (GREENAWAY & MURRAY, 1971).

Estudos comparativos de sequências de aminoácidos da região N-terminal de H_5 em diferentes espécies de aves, têm mostrado considerável variabilidade (SELIGY et alii, 1976), ao contrário do que ocorre com H_{2a} , H_{2b} , H_3 e H_4 .

As histonas H_1 e H_5 apresentam um peso molecular semelhante, possuindo 217 e 185 resíduos respectivamente (AVILES et alii, 1978), além de exibirem uma conformação estrutural semelhante. A principal distinção entre H_1 e H_5 consiste

em que H_5 contém muito mais resíduos arginina e serina do que H_1 (AVILES et alii, 1978).

Digestão triptica de H_5 em alta força iônica, resultou na formação de um produtos resistente, que representa a região globular da molécula, com 79 resíduos. De informações obtidas a partir de dicróismo circular, velocidade de sedimentação, espalhamento de neutrons e produtos de digestão por tripsina, mostrou-se que a molécula de H_5 é constituída de três regiões: N-terminal, globular e C-terminal (AVILES et alii, 1978).

Como se pode observar, o esquema estrutural da molécula de H_5 é muito semelhante ao de H_1 , merecendo contudo algumas observações que ressaltam diferenças existentes entre estas duas histonas. A começar pela região C-terminal, H_5 apresenta um teor de aminoácidos básicos entre lisina e arginina, superior à mesma região de H_1 (YAGUCHI et alii, 1977); isto implicaria em uma maior afinidade desta região pelo DNA, para ligações tipo salina. Outra diferença está na região N-terminal de H_5 que se apresenta mais curta e tem carga positiva total inferior à região correspondente em H_1 (AVILES et alii, 1978). Uma outra característica de H_5 , está na sua região globular, que em NaCl 0,15M, apresenta-se fortemente ligada ao DNA (AVILES et alii, 1979), e ao contrário do que ocorre com H_1 , há indicações de que a interação de H_5 com DNA é mediada pelas suas três regiões (AVILES et alii, 1979).

A remoção de H_1 e H_5 , da cromatina de eritrócitos maduros permitem o aumento da atividade gênica (SELIGY & NEELIN, 1970; GASARYAN & ANDREEVA, 1972; BOLUND & JOHNS, 1973; SELIGY & MIYAGI, 1974), e este fato é atribuído à mudanças na

conformação e disponibilidade de fosfatos de DNA e sequências de base (WILLIAMS et al, 1972; BRASCH et al, 1972; SELIGY & LURQUIN, 1973; SELIGY & MIYAGI, 1974). Para explicar a presença de uma histona (H_5) relacionada com condensação cromatínica e restrição de atividade gênica, em células metabolicamente ativas, alguns autores têm admitido modificações enzimáticas de H_5 , que poderiam mediar alterações na ligação ao DNA ou às demais histonas (SELIGY & NEELIN, 1971, 1973; WILLIAMS & SELIGY, 1973).

Experimentos levados a efeito por ALLAN e colaboradores (1981), mostraram que a reassociação envolvendo H_1 e H_5 de eritrócito e H_1 de timo, com cromatina destituída destas histonas, induzia à formação de estrutura de ordem superior própria da cromatina nativa. Comparando-se o efeito protetor de H_5 e H_1 de eritrócito e H_1 de timo, sobre DNA de cromatina, tem sido revelado que H_5 exerce maior proteção do que H_1 de timo e maior ainda do que H_1 de eritrócito (ALLAN et alii, 1981). Este resultado é compatível com a ação de H_5 na compactação da cromatina de núcleo de eritrócito, e justifica em parte, a substituição de H_1 por H_5 que ocorre durante a maturação de eritrócitos de aves.

No presente trabalho nos propomos a contribuir para o estudo dos aspectos estruturais de H_5 , bem como da participação desta histona na estrutura cromatínica.

Constituem-se pois em objetivos desta tese os seguintes tópicos:

1. Testar e avaliar a homogeneidade dos processos extrativos da fração de histonas rica em H_5 (FRH₅), usando ácido perclórico 5%, NaCl 0,7M e NaCl 0,15M-HCl a pH 1,85, procedi-

mentos estes, usados por diversos autores (JOHNS, 1964; OHLENBUSCH, 1967; GREENAWAY, 1971; BRASCH, 1976; SELIGY et alii, 1976).

2. Detectar diferenças entre conformação molecular da FRH₅ com parada a H₁. Para tal vamos utilizar a análise de espectros de absorção e de fluorescência, além da fluorescência natural de histona, embora tenha sido já constatada (BONNER et alii, 1968), nunca foi utilizada para estudos de conformação de proteínas, a fim de detectar diferenças entre histonas. A fluorescência de complexos histona-ANS, tinha sido observada por LAURENCE (1966), trabalhando com histonas em solução e neste caso obteve muito fraca fluorescência para H₁-ANS.
3. Conhecer a participação de FRH₅ na estrutura e ordem molecular da cromatina. Para tal serão estudados complexos de DNA com FRH₅ e de DNA com histonas totais, através de análise de birrefringência* de material corado com azul de toluidina e de dicroísmo* daquele corado com sirius red F3B, bem como microscopia eletrônica. A birrefringência no caso, dever-se-á às moléculas de azul de toluidina presas aos radi-

* A birrefringência poder ser definida como um tipo de anisotropia, encontrada em estruturas que apresentam mais de um índice de refração para diferentes direções de propagação de luz plano polarizada, enquanto dicroísmo é um fenômeno encontrado em estruturas capazes de absorver diferentemente a luz em diferentes planos de propagação da luz plano polarizada. Somente as estruturas biológicas com macromoléculas ordenadas, permitem distribuição ordenada de corantes dicroicos, no caso o sirius red.

cais fosfato de DNA. As propriedades anisotrópicas deste corante quando ligado ao DNA são amplamente conhecidas (ROMHANYI, 1967; VIDAL, 1972; MELLO & VIDAL, 1977; VIDAL, 1979). A detecção de dicroísmo será possível com o uso do corante sirius red que se prende aos radicais $-NH_3^+$ de proteínas. Este corante é altamente indicado por ser uma molécula que apresenta quatro grupos cromofóricos $-N=N-$ (CONN, 1969), por exibir anisotropia óptica (MISSMAHL, 1966) com possibilidades amplas para medidas e interpretações acuradas sobre ordem molecular (VIDAL et al, 1982).

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Coleta de material

Sangue foi obtido de frangos adultos, de raça Leghorn. O sangue coletado era imediatamente colocado em solução de citrato de sódio 10%, na proporção de 9:1, com a temperatura mantida em torno de 4°C (GREENAWAY & MURRAY, 1971; MURRAY et al, 1968). O uso de heparina foi evitado, uma vez que esta substância causa entumescimento nuclear (DAVIES & SPENCER, 1962) e redistribuição de proteínas cromossômicas (TAYLOR & COOK, 1977).

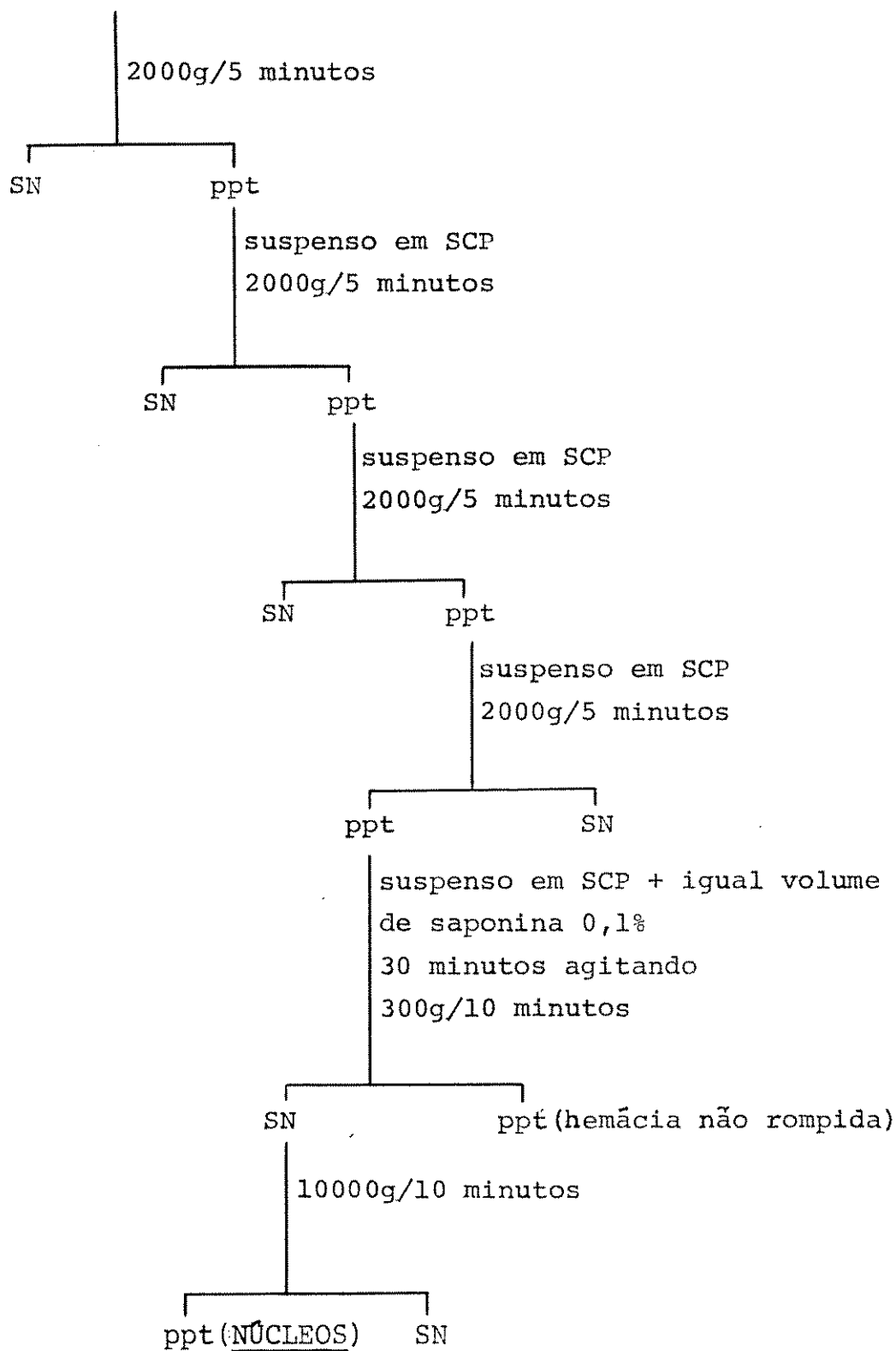
II.2. Preparação dos núcleos de eritrócitos

A preparação dos núcleos seguiu o esquema mostrado na página 17. Os eritrócitos inicialmente suspensos em solução de citrato de sódio 10% foram centrifugados e os precipitados foram suspensos e lavados três vezes em solução contendo NaCl 0,15M, citrato de sódio 0,01M e PMSF 0,1mM (SCP), lavados três vezes nesta solução. PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil) (Sigma) esteve presente durante toda a preparação para diminuir os riscos de proteólise.

II.3. Extração de histonas

Para extração de histonas totais, foi utilizado H_2SO_4 2N. Os núcleos já limpos foram suspendidos em NaCl

Sangue em citrato de
sódio 10%



0,15M-PMSF 0,1mM (SP), e sob constante agitação foi adicionado 1/4 do volume de H_2SO_4 2N e deixado agitando por 30 minutos (BONNER et alii, 1968; PANYIM et al, 1971). A suspensão dos núcleos foi centrifugada a 10000g por 10 minutos. Os núcleos precipitados foram desprezados e ao sobrenadante foram acrescentados quatro volumes de etanol absoluto e deixados a $-10^{\circ}C$ durante 24 horas (BONNER et alii, 1968). Após este tempo, uma nuvem branca se depositou no fundo do recipiente e foi facilmente precipitada por centrifugação a 2000g por 20 minutos. O precipitado branco foi ressuspendido em etanol absoluto e centrifugado a 10000g por 15 minutos. Esta etapa foi repetida três vezes e o precipitado foi secado sob vácuo (BONNER et alii, 1968). Este representa a fração nuclear histônica.

A extração de histonas H_5 e H_1 foi realizada usando NaCl 0,7M, ácido perclórico (PCA) 5% e NaCl 0,15M - HCl a pH 1,85.

No primeiro processo, cerca de 5 ml de precipitado nuclear foram suspensos em 2-3 volumes de tampão fosfato 15mM a pH 8,0 contendo NaCl 0,7M, e deixado sob agitação durante 30 minutos a $4^{\circ}C$. As proteínas dissolvidas foram separadas dos núcleos por centrifugação a 40000g por 1 hora. O extrato salino teve seu pH ajustado para pH 2,0 com HCl 1N e armazenado a $-14^{\circ}C$ por 24 horas. Para eletroforese, o material foi dializado durante 24 horas contra NaCl 0,15M (pH 2,4) e qualquer precipitado foi isolado por centrifugação.

A extração por ácido perclórico (PCA), seguiu JOHNS (1964), com ligeira modificação. Material nuclear foi suspenso em PCA 5% e homogeneizado suavemente por um minuto em um homogeneizador B.Braun, tipo 853203.

Após centrifugação a 5000g por 20 minutos (TOBIN & SELIGY, 1975), o precipitado foi novamente submetido ao mesmo tratamento com PCA 5% e novamente centrifugado. Os sobrenadantes das primeira e segunda extrações foram reunidos e a eles adicionados 3,5 volumes de acetona acidificada (0,1 ml de HCl concentrado para cada 200 ml de acetona) (JOHNS, 1964). Após 24 horas a 4°C, as histonas foram precipitadas e lavadas três vezes em acetona e secadas à vácuo.

A extração de histonas em NaCl 0,15M-HCl a pH 1,85, foi levada a efeito, suspendendo-se os núcleos em NaCl 0,15M e o pH 1,85 acertado com a adição de HCl 1N (GREENAWAY, 1971; GREENAWAY & MURRAY, 1971; TOBIN & SELIGY, 1975). O acerto do pH foi realizado à temperatura ambiente, e logo após, o material foi deixado sob agitação durante 1 hora à temperatura de 4°C. O isolamento das histonas extraídas, do material nuclear restante, foi possível após centrifugação a 10000 g por 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 9 volumes de acetona acidificada (JOHNS, 1964) a fim de precipitar as histonas. Após 24 horas a -10°C, as histonas foram lavadas três vezes em acetona pura e secadas sob vácuo. A fração obtida foi denominada Fração rica em H₅ (FRH₅). Durante todos os procedimentos extrativos, a temperatura foi mantida entre 0 (zero) e 4°C. As centrifugas utilizadas foram: centrífuga Sorval RC-2B com rotores GSA e SS-34 e ultracentrífuga Beckman-Spinco L5-65B com rotor SW-65.

II.4. A eletroforese de histonas

A eletroforese das histonas extraídas de eritrócitos de frango e da fração rica em lisina de timo de bezer

ro (Sigma), foi levada a efeito em gel de poliacrilamida a 15% seguindo o método de PANYIM & CHALKLEY (1969a). Acrilamida, N,N'-bisacrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletileno-diamina (TEMED) e persulfato de amônio utilizados na elaboração do gel foram de marca Bio-Rad. Para obtenção do gel contendo 15% de acrilamida em uréia 6,25M a pH 3,2, partimos das seguintes soluções: solução A: acrilamida 60% e N-N'-bisacrilamida 0,4% em água; solução B: ácido acético glacial 43,2% (v/v) e TEMED 4% (v/v) em água; solução C: persulfato de amônio 0,2% em uréia 10M. As soluções foram misturadas nas seguintes proporções: uma parte de B, duas partes de A, cinco partes de C. A eletroforese foi levada a efeito à temperatura ambiente, em sistema vertical de gel, usando-se tubos com diâmetro interno de 0,5 cm e comprimento de 7,5 cm. A solução utilizada nas cubas foi ácido acético 0,9N. A fonte utilizada foi de marca Permatron, modelo F250. Todos os géis foram submetidos à pré-eletroforese, em condições de baixa amperagem durante aproximadamente 12 horas, para que íons TEMED e persulfato fossem eliminados.

Cerca de 20-40 µg de histonas dissolvidas em ácido acético 0,9N contendo 15% de sacarose foram aplicados sobre o gel. O tempo da corrida foi de mais ou menos três horas e a corrente se manteve em torno de 1,75mA por 7,0 cm de gel e a voltagem entre 100 e 110 volts. O corante marcador foi azul de toluidina (Merck) 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0.

Terminada a corrida, os géis foram colocados em tubos de ensaio contendo ácido tricloroacético (TCA) 12,5%, e sobre eles adicionadas algumas gotas de solução de coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad) 0,3% e assim deixados durante

12 horas. Este procedimento permitiu acompanhar a evolução do processo de coloração. A descoloração foi feita em solução contendo metanol 14% e ácido acético 7%.

Histonas fixadas no gel de poliacrilamida foram também coradas com sirius red F3B (S.R.F3B) (GURR) 0,1% e naphthol yellow (N.Y.) (HARLECO) 0,1%, ambas as soluções foram preparadas em ácido acético 2% a pH 2,7. Nestes dois casos os géis foram deixados na solução de corante durante 1 hora, e a descoloração foi feita em solução de ácido acético 2%.

II.5. Curvas espectrais de absorção

As curvas espectrais foram determinadas para as seguintes proteínas: FRH₅, H₁ de timo de bezerro (Sigma), ambas dissolvidas em tampão borato 3mM a pH 9,0 e HCl 0,01N, sorro albumina bovina (BSA) dissolvida em HCl 0,01N e colágeno (cedido e preparado por Dr. B. C. Vidal) dissolvido em ácido acético 2%. O processo de desnaturação se deu por aquecimento em banho-maria a 96°C por 10 minutos. O espectrofotômetro utilizado foi marca Zeiss tipo PMQ-3, e cubetas mediam 1 cm de caminho óptico.

II.6. Estudos fluorométricos

A fluorescência natural de FRH₅ e H₁ de timo de bezerro em concentração de 0,5 mg por ml em diferentes soluções de HCl 0,1N e NaCl 0,15M, foi levada a efeito em um espectrofotômetro de fluorescência marca Perkin-Elmer MPF-4HB. O comprimento de onda de excitação foi $\lambda = 283$ nm. As condições gerais do aparelho foram: "signal gain" = 1,0 e "response" = 0,3.

Diferentes quantidades de FRH₅, H₁ de timo de bezerro e histonas totais de eritrócitos de frango foram deixadas precipitar, secar sobre lâminas e em seguida foram coradas com ácido 8-anilino naphthaleno-1-sulfônico (ANS) 0,1% - butanol, durante 30 minutos, lavadas em butanol, imersas em xilol e montadas em nujol ($n_D = 1,497$). Alguns preparados, após estarem precipitados sobre lâmina, foram fixados em formol 4% em tampão fosfato a pH 7,3 contendo sacarose 0,2M. Observações foram efetuadas em microespectrofotômetro Zeiss, equipado para microfluorometria com condensador III RS.

II.7. Complexos histona-DNA

A associação FRH₅ e histonas totais (HT) com DNA, foi levada a efeito através de diálises em diferentes concentrações de NaCl. Inicialmente, DNA (1 mg por ml) em DSC (NaCl 0,015M, citrato de sódio 0,0015M) (BONNER et alii, 1968) foi adicionado a igual volume de solução de histonas (1,25 mg por ml) em NaCl 4M - tampão cacodilato 0,05M a pH 7,0. As diálises seguiram-se contra tampão cacodilato 0,001M a pH 7,0 contendo sucessivamente NaCl 1M, 0,75M, 0,5M, 0,25M, 0,1M e 0,05M. O tempo de duração de diálise para cada concentração de NaCl foi de 4 horas. Nos intervalos de troca de tampões, eram tiradas amostras para microscopia óptica e eletrônica.

II.8. Microscopia de polarização

As amostras coletadas após diálise (10-20 μ l) foram colocadas sobre lâmina, fixadas em álcool etílico 70%, lavadas em água e depois de secas foram coradas com azul de

toluidina (A.T.) (Merck) 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4,0 durante 15 minutos. Após a coloração, o material foi lavado em água destilada, secado ao ar e montado em nujol.

Tratamento semelhante foi dado ao material gelatinoso que saiu de núcleos tratados com NaCl 0,7M. Neste caso a fixação foi feita com formol 4%-sacarose 0,2M-tampão fosfato a pH 7,3. Os corantes usados foram A.T. a pH 4,0 e sirius red F3B (S.R.F3B) (GURR) 0,1% em tampão fosfato 0,015M a pH 8,2. Para coloração com S.R.F3B a pH 8,2, o material foi deixado durante 30 minutos em presença do corante, em seguida lavado em água, secado ao ar e montado em nujol.

Todas as observações de fenômenos anisotrópicos foram feitas com o auxílio de um Pol-fotomicroscópio Zeiss. Para apreciação de fenômenos dicroicos, os filamentos de DNP foram orientados paralelamente e perpendicularmente ao plano de luz polarizada. As condições operacionais foram as seguintes: objetiva Pol-neofluar 63/0,90, optovar 2,0, diafragma fotométrico de 0,16mm, diafragma de campo de 0,3mm e uma objetiva 10/0,22 como condensador.

As observações de birrefringência foram feitas com os filamentos de DNP orientados de modo a formar um ângulo de 45° com os azimutes de polarização do analisador e polarizador. Para estas observações foram utilizados um compensador $\lambda/4$, uma objetiva Plan 40/0,65, optovar 2,0 e uma fonte de luz ultravioleta.

II.9. Microscopia eletrônica

Amostras de complexos FRH₅-DNA obtidos após diálise e material nuclear de núcleos tratados com NaCl 0,7M, foram aplicados sobre telinhas para microscopia eletrônica, recobertas com película de carbono. Em alguns casos, com o material gelatinoso, obtido após tratamento de núcleos com NaCl 0,7M, foi feito "spreading" sobre telinha contendo uma gota de água destilada. As amostras obtidas das diálises foram coradas com ácido fosfotungstico (PTA) 2% ajustado a pH 7,0 com NaOH (WOODCOCK & FRADO, 1977). O material submetido a a NaCl 0,7M, foi corado com etanol-ácido fosfotúngstico (EPTA) 2% e acetato de uranila (AU) 2% em água. Após um minuto de coloração, o excesso de corante foi removido com papel de filtro. As observações foram feitas com um microscópio eletrônico Zeiss 9-S.

III. RESULTADOS

III.1. Extractibilidade de histonas H₅ e H₁ frente a diferentes métodos de extração.

A extração de histonas H₅ e H₁ usando PCA 5%, NaCl 0,7M e salina-HCl a pH 1,85, mostrou resultados bem diferentes. A eletroforese das histonas obtidas em cada um destes métodos revelou o seguinte:

a. Extração por PCA 5% - As histonas H₅ e H₁ foram extraídas juntamente com H₃, H_{2b} e traços de H_{2a} e H₄ (figura 1b).

b. Extração por NaCl 0,7M - O preparado apresentava contaminação de outras histonas além de H₅ e H₁, mostrando inclusive presença muito discreta de alguma banda que não corresponde às de histonas (figura 1c).

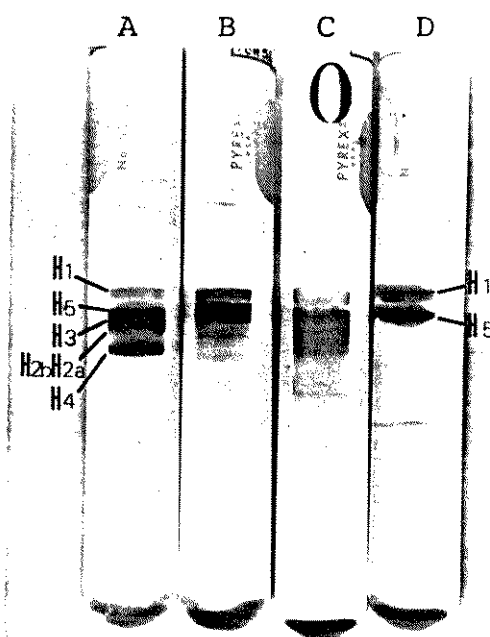
c. Extração por salina-HCl a pH 1,85 - Apenas H₅ e H₁ foram detectadas (figura 1d).

A identificação das histonas extraídas em cada procedimento foi possível, comparando-se os padrões eletroforéticos obtidos em cada caso, com os padrões eletroforéticos de histonas totais extraídas com H₂SO₄ 0,4N (figura 1a).

III.2. Curvas espectrais de FRH₅ e H₁ de timo.

Resultados diferentes foram obtidos para curvas espectrais de FRH₅ e H₁ de timo. O espectro de FRH₅ mos-

FIGURA 1. Eletroforese de histonas de núcleos de eritrócitos de frango, extraídas por H_2SO_4 0,4N (gel A), PCA 5% (gel B), NaCl 0,7M (gel C) e salina-HCl pH 1,85 (gel D). Notar a presença de H_5 e H_1 na fração obtida por tratamento com salina-HCl pH 1,85. Condições de eletroforese: 1,7mA/gel; 15V / cm de gel.



trou pico de absorção máxima em $\lambda=276\text{nm}$ e ombro em $\lambda=282\text{nm}$ (figura 2, tabela I), além de uma curva descendente na faixa entre $\lambda=246-254\text{nm}$, isto é, situada no âmbito dos λ baixos da curva. Nenhuma diferença no perfil da curva e nem mesmo deslocamento de pico foram observados na curva espectral de FRH₅ após aquecimento a 96°C por 10 minutos, porém os valores absorciométricos para FRH₅ desnaturado foram mais altos do que os de FRH₅ em estado nativo (hipercromasia).

Com respeito a H₁, não se configurou nitidamente um pico de máxima absorção, merecendo contudo destaque a presença de um ombro em $\lambda=268\text{nm}$ (figura 2, tabela I), sendo sugestivo que se considere este ombro como um "pico" devido a conformação da curva nesta região. A curva espectral de H₁ desnaturado, não mostrou qualquer diferença a não ser os valores absorciométricos que foram mais elevados para H₁ desnaturado. A comparação das curvas de FRH₅ e H₁ mostra que na faixa de $\lambda = 276$ a $\lambda=282\text{nm}$, os valores absorciométricos são muito próximos havendo no caso de FRH₅ e H₁ nativos, quase uma superposição das duas curvas. Ainda nesta mesma faixa de λ , merece atenção o fato de H₅ apresentar valores mais altos de absorção em relação a H₁, quando ambas são desnaturadas.

Curvas espectrais de FRH₅ e H₁ de timo em HCl 0,01N, mostraram que para ambas proteínas, a desnaturação causa diminuição nos valores absorciométricos (figura 3, tabela I) justamente o contrário ao que ocorre com BSA (figura 3). As diferenças entre absorbâncias de histonas nativas e desnaturadas, mostradas na figura 4, revelam o comportamento diferente de H₅ e H₁ em HCl 0,01N e tampão borato a pH 9,0.

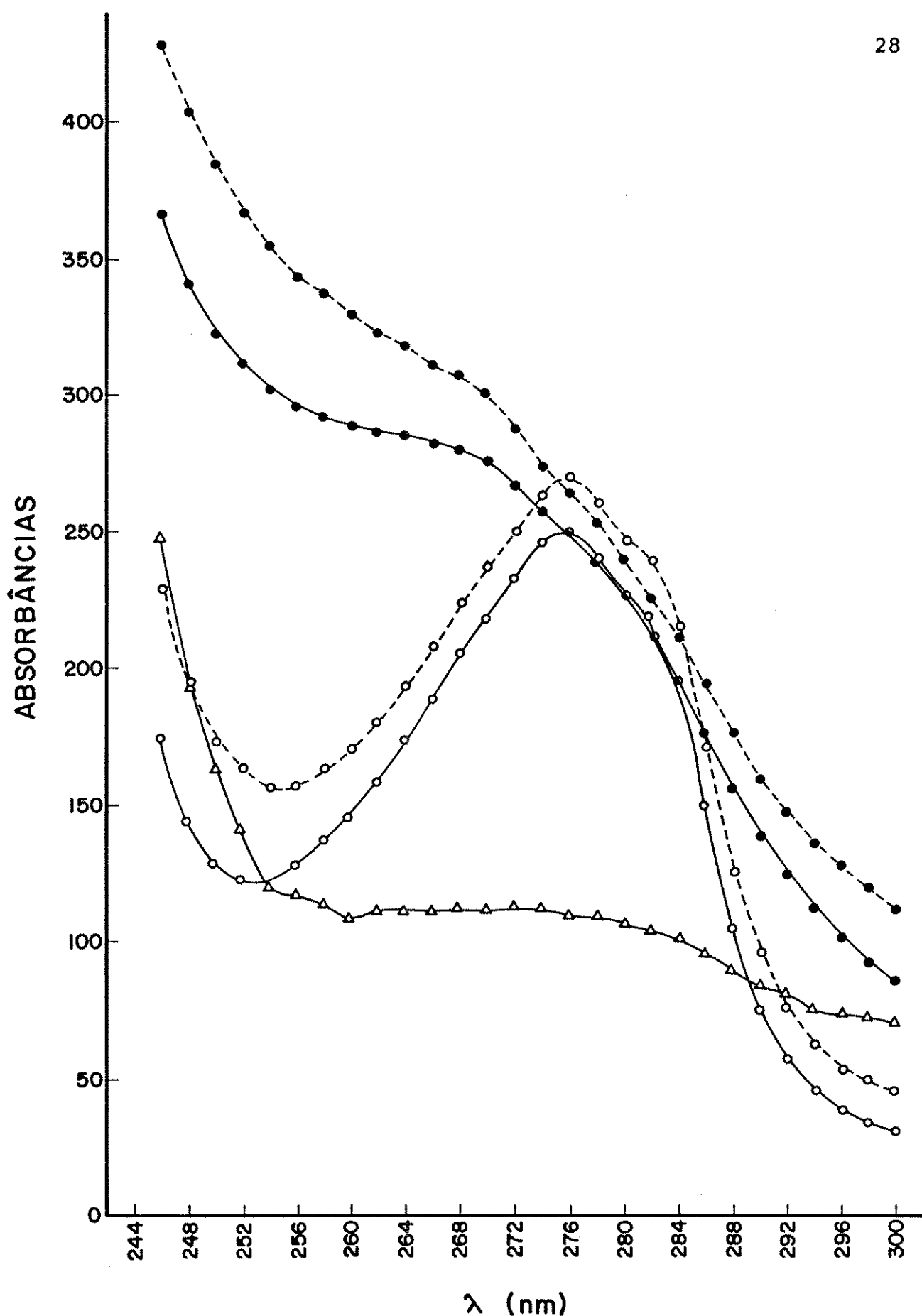


FIGURA 2. Curvas espectrais de absorção de FRH₅ de eritrócitos de frango (o) e de H₁ de timo de bezerro (●), dissolvidas em tampão borato 3mM pH 9,0, em estado nativo (—) e em estado desnaturado (---). A concentração de FRH₅ e de H₁ foi de 1,5mg/ml. Para fins de comparação é mostrado curva espectral de colágeno (1,5 mg/ml em ácido acético 2%) (Δ).

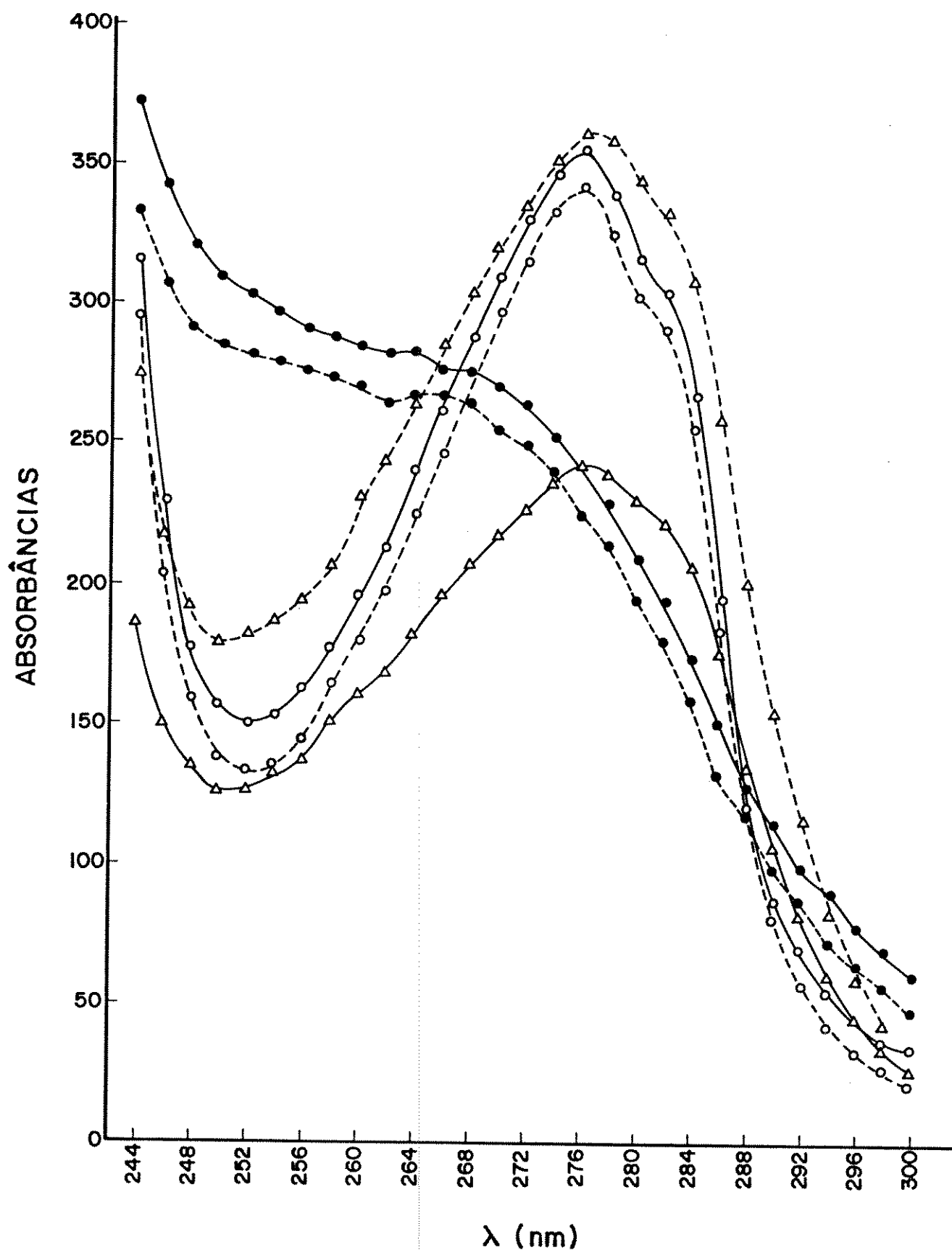


FIGURA 3. Curvas espectrais de absorção de FRH₅ de eritrócitos de frango (o) e de H₁ de timo de bezerro (●) dissolvidas em HCl 0,01N, em estado nativos (—) e desnaturado (----). A concentração de FRH₅ e de H₁ foi de 1,5mg/ml. Para fins de comparação é mostrado a curva espectral de soro albumina bovina (0,5mg/ml em HCl 0,01N) (Δ) em estado nativo (—) e desnaturado (----).

Tabela I. Localização espectral (comprimento de onda em nm) dos picos de absorbância e dos ombros, e comparação dos valores máximos de absorbância de FRH₅ e H₁ de timo de bezerro, em estados nativo e desnaturado. Todas as medidas foram feitas em tampão borato a pH 9.0 e HCl 0.01N.

Amostras	λ do Pico (em nm)		λ do ombro (em nm)		Valores máximos de absorbância	
	Tampão Borato pH 9.0	HCl 0.01N	Tampão Borato pH 9.0	HCl 0,01N	Tampão Borato pH 9.0	HCl 0.01N
FRH ₅	276	276	282	282	250	355
FRH ₅ desnaturado	276	276	282	282	270	342
H ₁ de timo	-	-	268	268	230 (λ = 268nm)	92 (λ = 268nm)
H ₁ de timo desnaturado	-	-	268	268	308 (λ = 268nm)	88 (λ = 268nm)

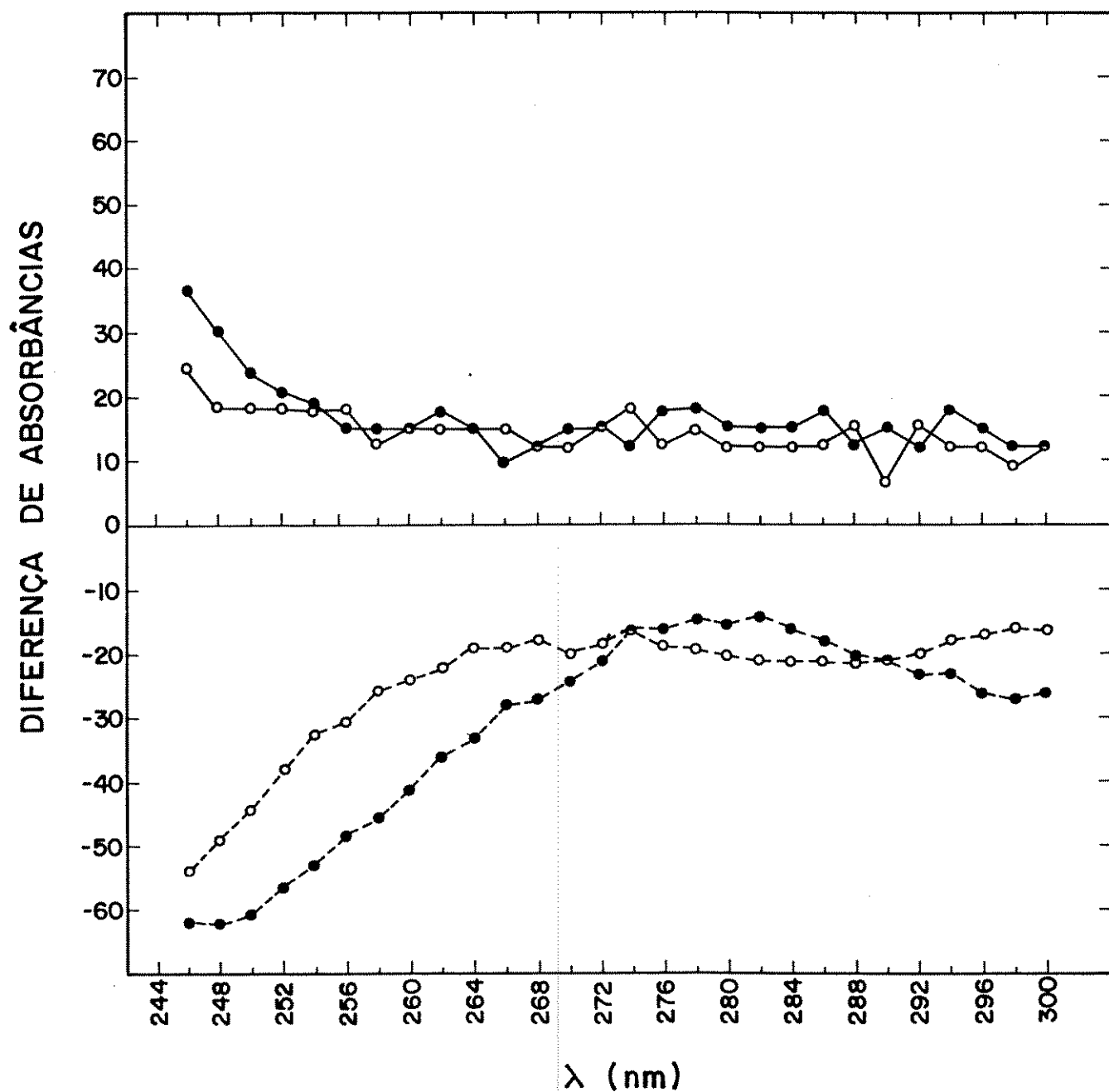


FIGURA 4. Gráfico mostrando as diferenças das medidas espectrais de absorção em estados nativo e desnaturado, de FRH₅ de eritrócito de frango (o) e de H₁ de timo de bezerro (●), dissolvidas em HCl 0,01N (—) e em tampão borato 3mM pH 9,0 (----).

III.3. Fluorescência de FRH₅ e H₁ de timo

III.3.1. Fluorescência de FRH₅ e H₁ de timo em solução

As curvas espectrais de emissão de fluorescência de FRH₅ e H₁ de timo são mostradas na figura 5. Inicialmente com relação a FRH₅ pôde-se notar que quando esta fração era dissolvida em HCl 0,1N, a fluorescência era mais intensa do que quando dissolvida em NaCl 0,15M. A desnaturação de FRH₅ (em NaCl 0,15M) resultou em sensível diminuição na fluorescência (figura 5; tabela II).

Observações com H₁ de timo nas mesmas condições em que foram feitas para FRH₅, mostraram que H₁ em HCl 0,1N ou NaCl 0,15M exibiram fraquíssima fluorescência (figura 5; tabela II), mas mesmo assim foi encontrada fluorescência mais intensa para H₁ em NaCl 0,15M do que em HCl 0,1N, contrariamente ao que se observou para FRH₅. Nenhuma diferença foi detectada entre as curvas fluorométricas para H₁ (em NaCl 0,15M) desnaturada e nativa.

III.3.2. Fluorescência em precipitados

Precipitados de FRH₅, H₁ de timo e de histonas totais (HT) de eritrócitos de frango, foram corados com ANS-butanol e a fluorescência observada. Em alguns preparados os materiais foram fixados em formol 4% a pH 7,0, anteriormente à coloração com ANS.

Observações de FRH₅ não fixado (figura 6), revelaram emissão significativa de fluorescência, chamando à a-

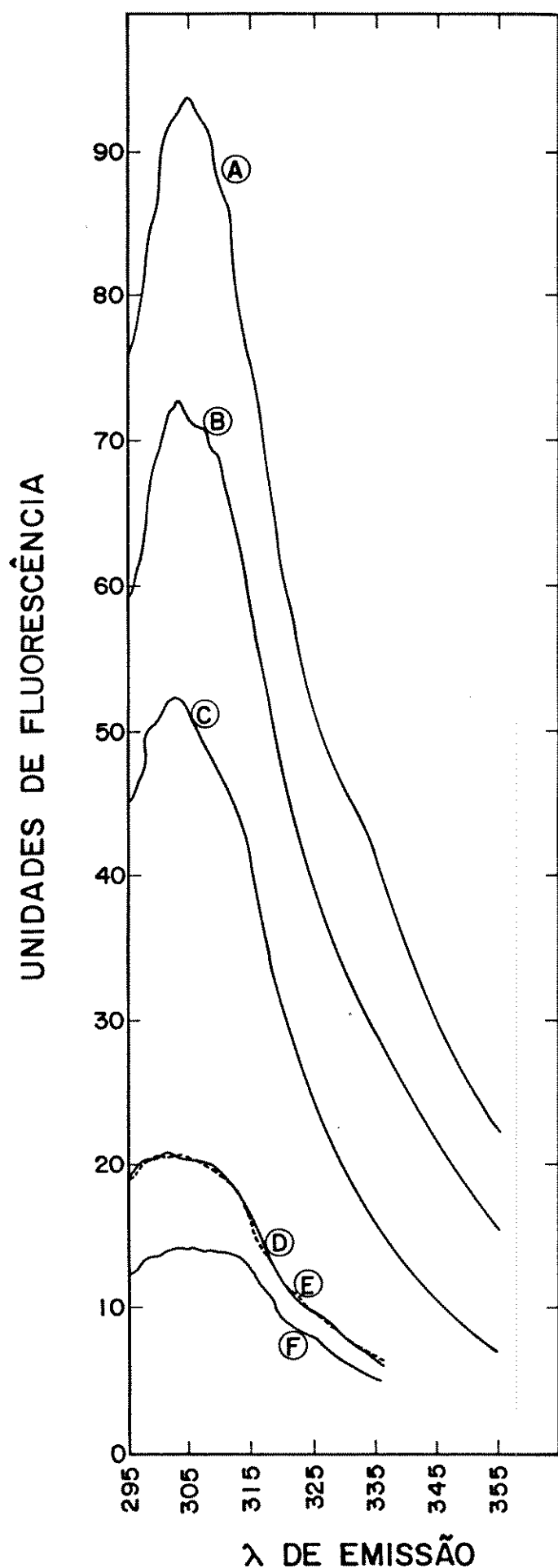


FIGURA 5. Curvas espectrais de fluorescência natural de FRH₅ de eritrócito de frango e H₁ de timo de bezerro. A concentração das amostras foi 0,5mg/ml. λ de excitação = 283nm.

- Curva A - FRH₅ em HCl 0,1N;
 Curva B - FRH₅ em NaCl 0,15M;
 Curva C - FRH₅ em NaCl 0,15M-desnaturado;
 Curva D - H₁ de timo em NaCl 0,15M;
 Curva E - H₁ de timo em NaCl 0,15M-desnaturado;
 Curva F - H₁ de timo em HCl 0,1N.

Tabela II. Fluorescência natural de soluções de FRH₅ e H₁ de timo de bezerro, em HCl 0,1N e NaCl 0,15M. A desnaturação foi feita com as histonas em NaCl 0,15M

Amostras	HCl 0,1N (U.F.)	NaCl 0,15M (U.F.)	Desnaturação (U.F.)
FRH ₅	94,5	73,5	53,5
H ₁ de timo	15,0	22,0	22,0

U.F. = Unidades de fluorescência



FIGURA 6. Fluorescência de precipitado de FRH₅ de núcleo de eritrócito de frango complexada com ANS-butanol. Destaca-se a presença de "trincas" em suas bordas (seta 1) e de grumos fluorescentes no perímetro mais interno (seta 2) do precipitado. Aumento : 70x.

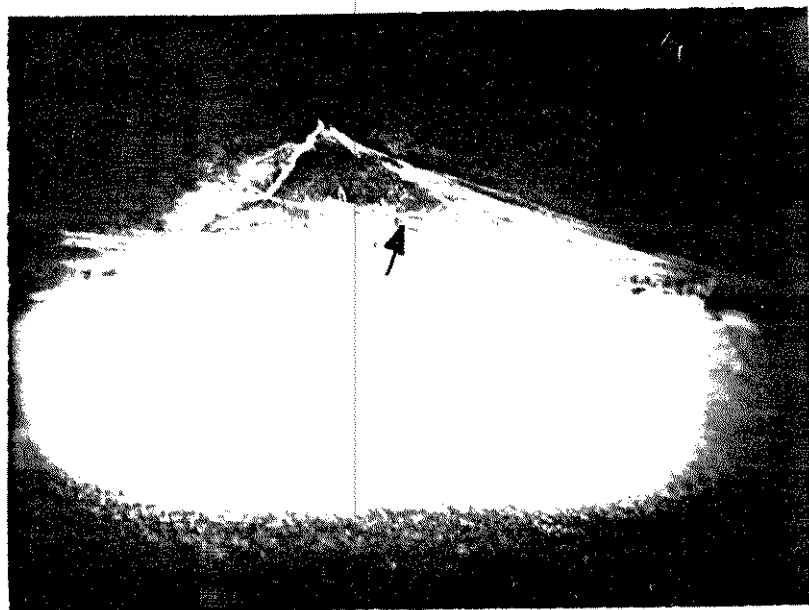


FIGURA 7. Fluorescência de precipitado de FRH₅ de núcleo de eritrócito de frango complexada com ANS-butanol, após fixação em formol 4% pH 7,0. Notar formação de fibrilas na região periférica do precipitado (seta). Aumento : 70x.

tenção a presença de "trincas" nas bordas do precipitado; também ficou evidente a presença de grumos fluorescentes no perímetro mais interno do precipitado. No caso de FRH₅ previamente fixada em formol, ficou evidenciado um aumento na intensidade de fluorescência (figura 7), além do que ocorreram formações de fibrilas na borda do precipitado.

Com relação a H₁ de timo, esta apresentou alta fluorescência (figura 8), muito mais intensa do que a exibida por FRH₅. Nos precipitados de H₁ não foram encontradas as trincas descritas para FRH₅ (figura 6). No caso de pré-fixação em formol a pH 7,0, a fluorescência se mostrou sensivelmente aumentada (figura 9).

Precipitados de histonas totais (HT), corados com ANS, exibiram fraquíssima fluorescência (figura 10), merecendo contudo, destaque a presença de "trincas" nas bordas da gota. Em alguns preparados foram encontradas certas precipitações semelhantes a rãfides (figura 11), com ligeira fluorescência, e observação desses precipitados à luz polarizada, mostrou que são birrefringentes (figura 11). Histonas totais (HT) exibiram fluorescência bastante intensa quando pré-fixadas em formol, da mesma forma que ocorreu com FRH₅ e H₁ de timo (figura 12). Na tabela III estão sumarizados os resultados de fluorescência desses preparados.

III.4. Ordem molecular do gel de cromatina de núcleos tratados com NaCl 0,7M.

Após os vários tratamentos empregados na purificação de núcleos de eritrócitos, obtivemos núcleos com morfo

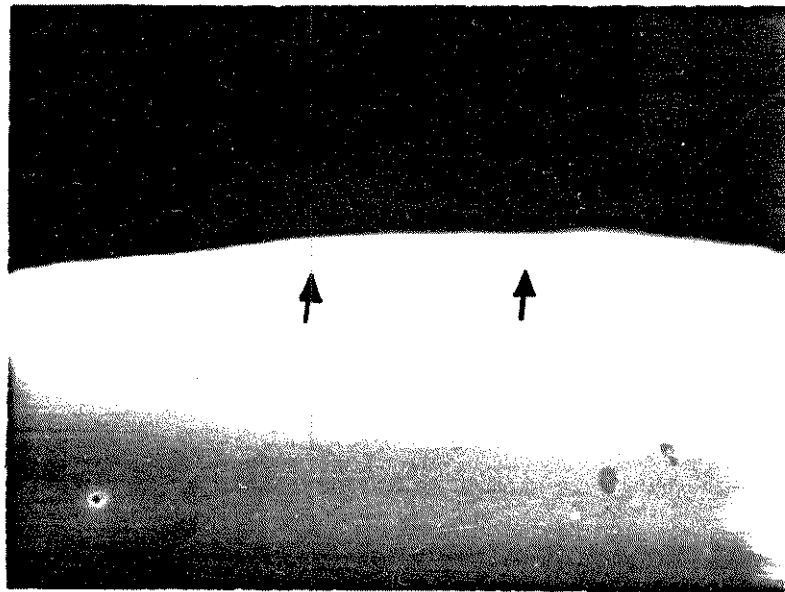


FIGURA 8. Fluorescência de precipitado de H_1 de tamo de bezerro, complexada com ANS-butanol. Intensa fluorescência pode ser notada na região mais periférica (seta) do material. Aumento : 70x.

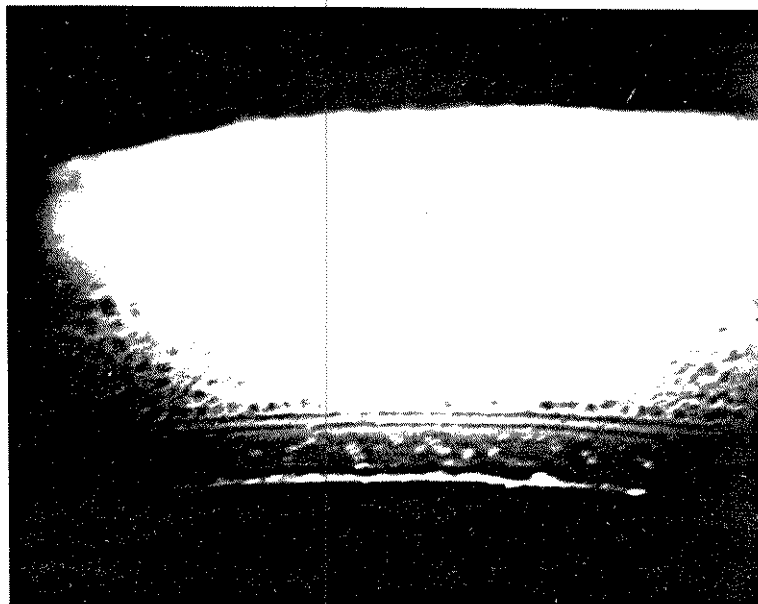


FIGURA 9. Fluorescência de precipitado de H_1 de tamo de bezerro, complexada com ANS-butanol após fixação em formol 4% pH 7,0. O brilho da fluorescência pode ser notado em quase toda a extensão do preci

pitado. Aumento : 70x.

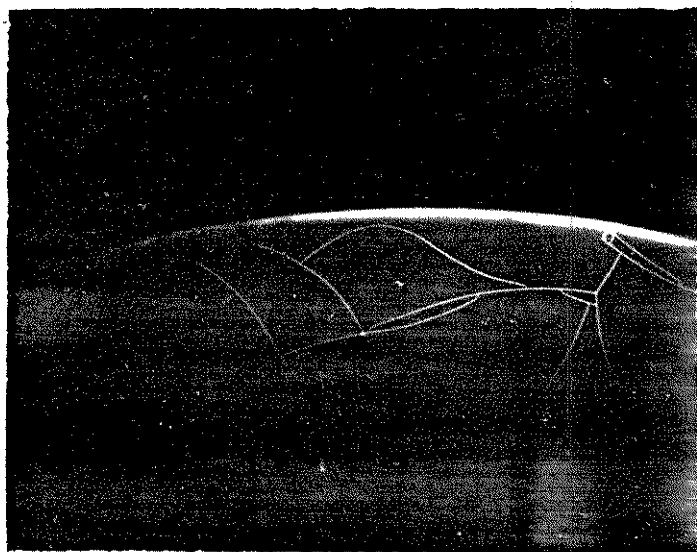


FIGURA 10. Fluorescência de precipitado de histonas totais complexadas com ANS-butanol. Notar a fraquíssima fluorescência e presença de "trincas" nas bordas do precipitado. Aumento : 70x.



FIGURA 11. Fluorescência de histonas totais em forma de rãfides, complexadas com ANS-butanol, observada com luz polarizada. Notar o caráter birrefringente dos precipitados (seta 1) e a fraca fluorescência exibida (seta 2). Aumento : 70x.



FIGURA 12. Fluorescência de precipitado de histonas totais corado com ANS-butanol após fixação em formol 4% pH 7,0. Intenso brilho de fluorescência pode ser observado em grande extensão do precipitado. Aumento: 70x.

Tabela III. Fluorescência de precipitados de FRH₅, H₁ de timo de bezerro e histonas totais de eritrócitos de frango, com e sem fixação, seguido por coloração com ANS-butanol.

Tratamento	A m o s t r a s		
	FRH ₅	H ₁ de timo	Histonas Totais (HT)
Não fixado	++	+++	+
Fixado em formol 4%	++++	++++	++++

Os sinais indicam fluorescência:

++++ muito forte

+++ forte

++ média

+ fraca

logia ligeiramente alterada (figura 13). O tratamento desses núcleos com NaCl 0,7M usado por alguns autores para extrair H₅ e H₁ (OHLENBUSCH et alii, 1967; BRASCH, 1976), resultou na formação de um gel altamente elástico e viscoso constituído de muitos filamentos, no meio extranuclear (figuras 14 e 15).

Esse gel corado com azul de toluidina a pH 4,0, ficou fortemente corado e exibiu acentuada birrefringência negativa (figura 14). Na figura 15 pode-se observar imagens de birrefringência parcialmente compensadas dos filamentos de DNP emergentes desses núcleos. Quando se corou o gel com sirius red a pH 8,2, forte coloração foi registrada nos núcleos e também no material extranuclear, e a observação desse material ao microscópio de polarização mostrou um discreto dicroísmo (figura 16).

O caráter gelatinoso destes preparados, desapareceu quando foram submetidos à diálise contra NaCl 0,15M.

III.5. Anisotropias de complexos DNA-FRH₅ e DNA-HT.

Associações de DNA com FRH₅ e HT em diferentes concentrações de NaCl foram observadas ao microscópio de polarização após coloração com azul de toluidina a pH 4,0. Complexos DNA-FRH₅ formados durante extensiva diálise em NaCl 1M, 0,75M e 0,1M, resultaram diferentes tanto nos padrões de birrefringência como na formação de agregados de DNP (figura 17). Pudemos verificar que, em NaCl 0,1M, ocorreu uma maior associação de fios de DNP, apresentando também um brilho de birrefringência mais intenso. Em NaCl 0,7M a formação de grumos foi bem

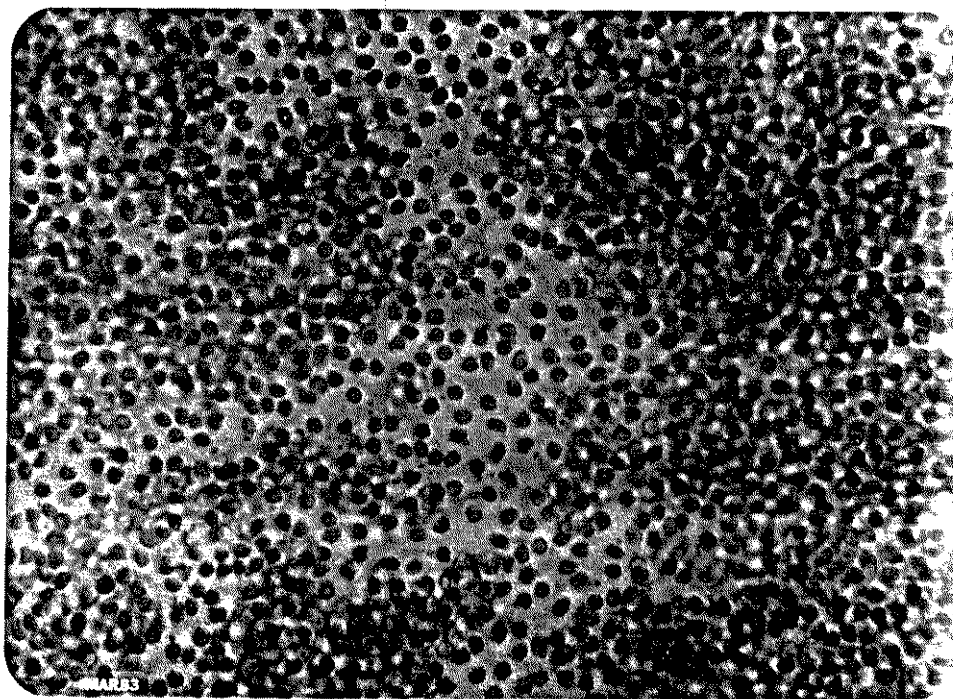
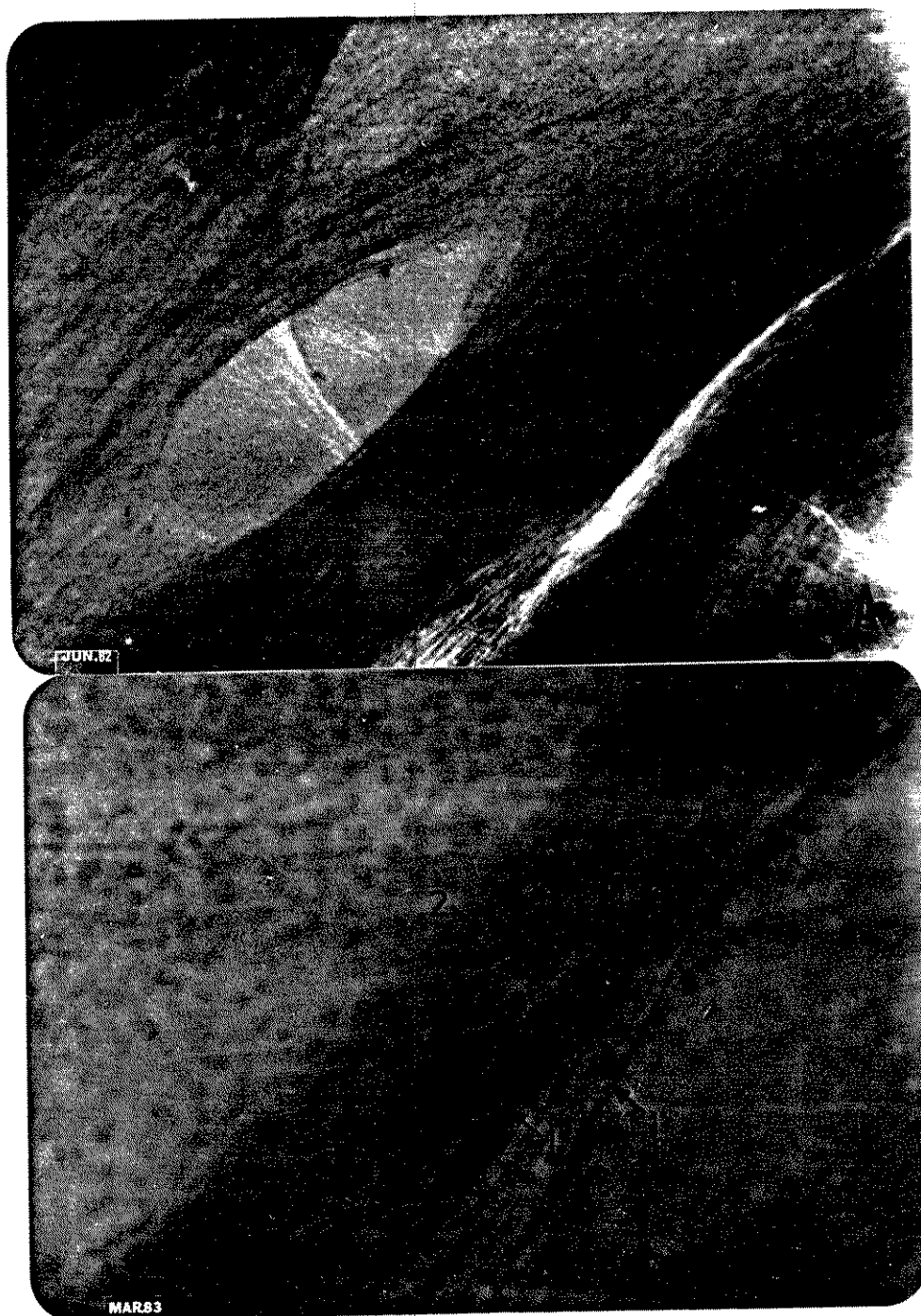


FIGURA 13. Núcleos de eritrócitos de frango corados com A.T. pH 4,0. Notar que a forma dos núcleos não é uniforme. Aumento : 665x.



FIGURA 14. Imagem de birrefringência de filamentos de DNP (seta) emergentes de núcleos de eritrócitos tratados com NaCl 0,7M, corados com A.T. pH 4,0. Microscopia de polarização. Aumento : 105x.



FIGURAS 15 A e B. Imagens de birrefringência negativa, parcialmente compensadas, de filamentos de DNP em NaCl 0,7M, corados com A.T. pH 4,0. As cores de birrefringência encontradas, se devem às diferenças na espessura do material, implicando em diferentes retardos ópticos. Microscopia de polarização. Em A, é vista a imagem compensada do material mostrado na figura 14. Aumento: 105x. Em B, são observados os filamentos de DNP compensados (seta 1) e núcleos de eritrócitos de frango (seta 2) corados com A.T. pH 4,0. Aumento: 665x.

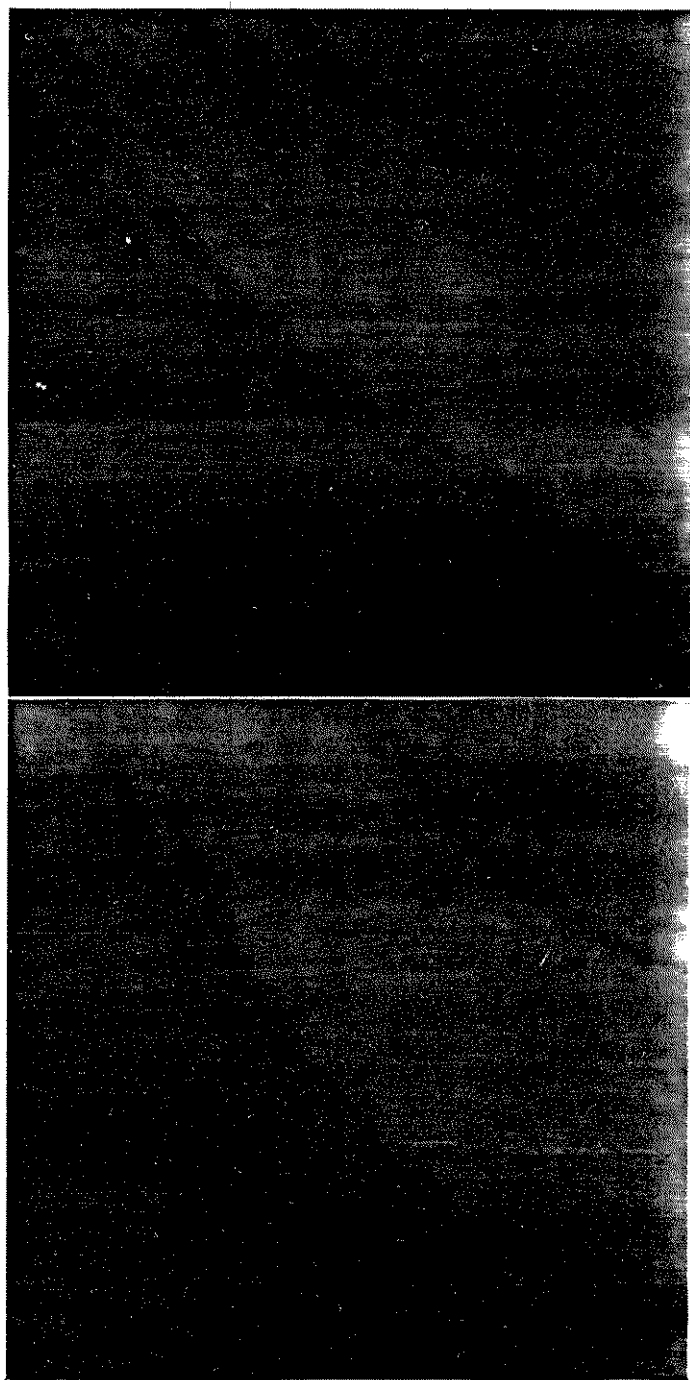


FIGURA 16. Dicroísmo exibido pelos filamentos de DNP corados com S.R. F3B pH 8,2. Discretas diferenças de absorção de luz são notadas (seta) quando se compara o material disposto paralelamente ($A_{//}$) e perpendicularmente ($A_{\perp}$) ao plano de luz polarizada (PLP). Microscopia de polarização. Aumento : 340x.

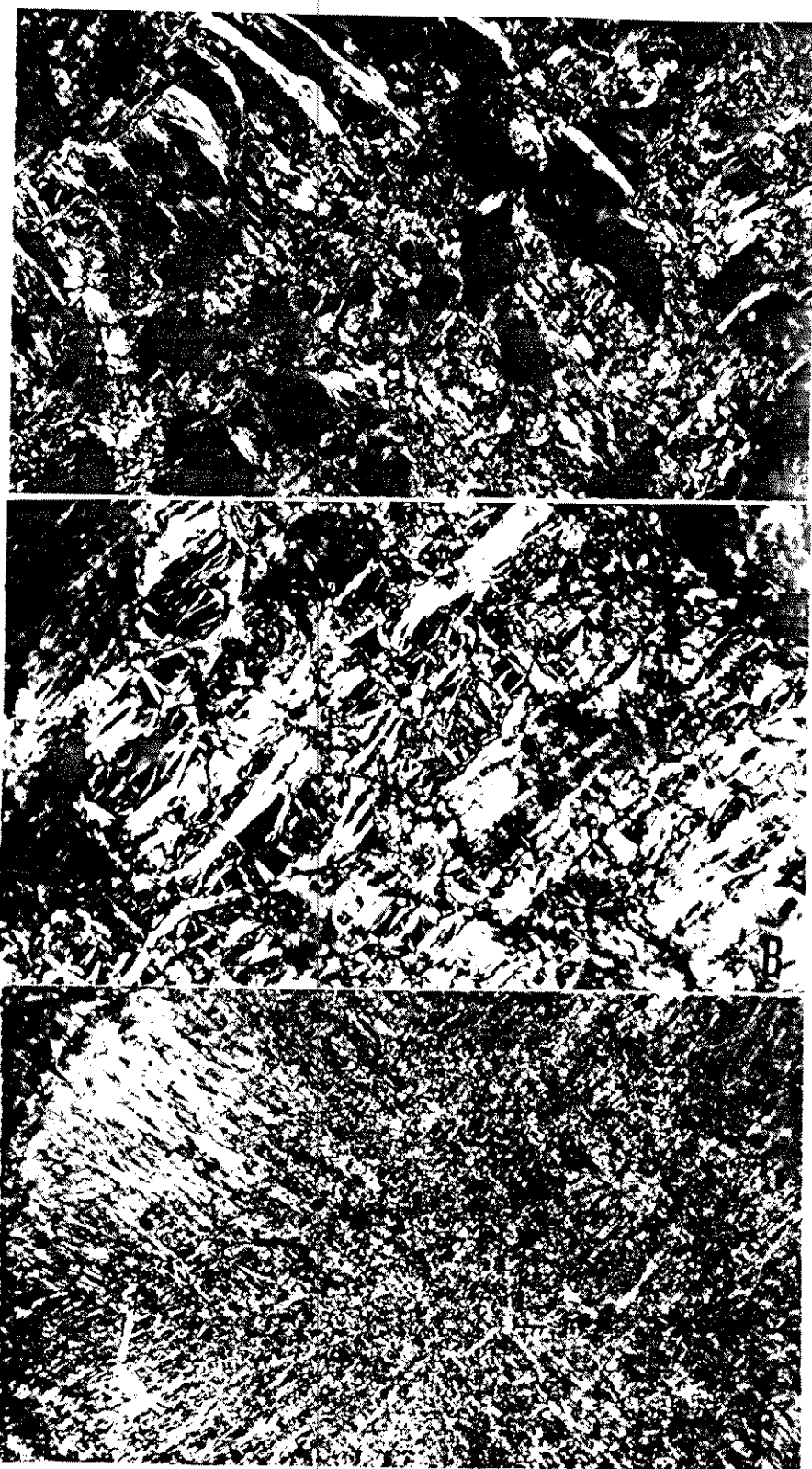


FIGURA 17. Imagens de birrefringência de complexos DNA-FRH₅, corados com A.T. pH 4,0. Estes complexos foram obtidos após diálise contra NaCl 1M (A), NaCl 0,7M (B) e NaCl 0,1M (C). Aumento : 80x..

mais fraca,,diminuindo ainda mais no caso de NaCl 1M. Na concentração de NaCl 0,1M, pôde ainda ser constatado que os agregados de fios de DNP apresentavam dicroísmo linear (figura 18).

Com respeito à associação de DNA com histonas totais, também através de diálise contra diferentes concentrações de NaCl, não foi constatada diferença nos padrões de birrefringência quando se comparou o material resultante dos dois extremos da diálise, ou seja 0,1M e 1M de NaCl (figura 19),nem mesmo com respeito ao dicroísmo (figura 20).

Dentro dos resultados encontrados para DNA-FRH₅ (figura 17c) e DNA-HT (figura 19b) em NaCl 0,1M, é importante relatar o fato de que da interação DNA-HT ocorreu a formação de pequenos aglomerados birrefringentes (figura 19b) enquanto que em DNA-FRH₅ ocorreu a formação de filamentos de DNP, que se mantiveram alinhados, obedecendo uma certa orientação (figura 17c).

III.6. Anisotropia em núcleos totais.

Nenhuma birrefringência foi notada em núcleos intactos corados com azul de toluidina a pH 4,0, porém em núcleos previamente tratados com salina-HCl a pH 1,85 para extração de FRH₅, foi detectada discreta birrefringência (negativa), própria do DNA (figura 21).

III.7. Capacidade de histonas em ligarem moléculas de corante.

Histonas foram coradas com sirius red,naphthol yellow e coomassie brilliant blue (CBB), sendo que os dois úl-

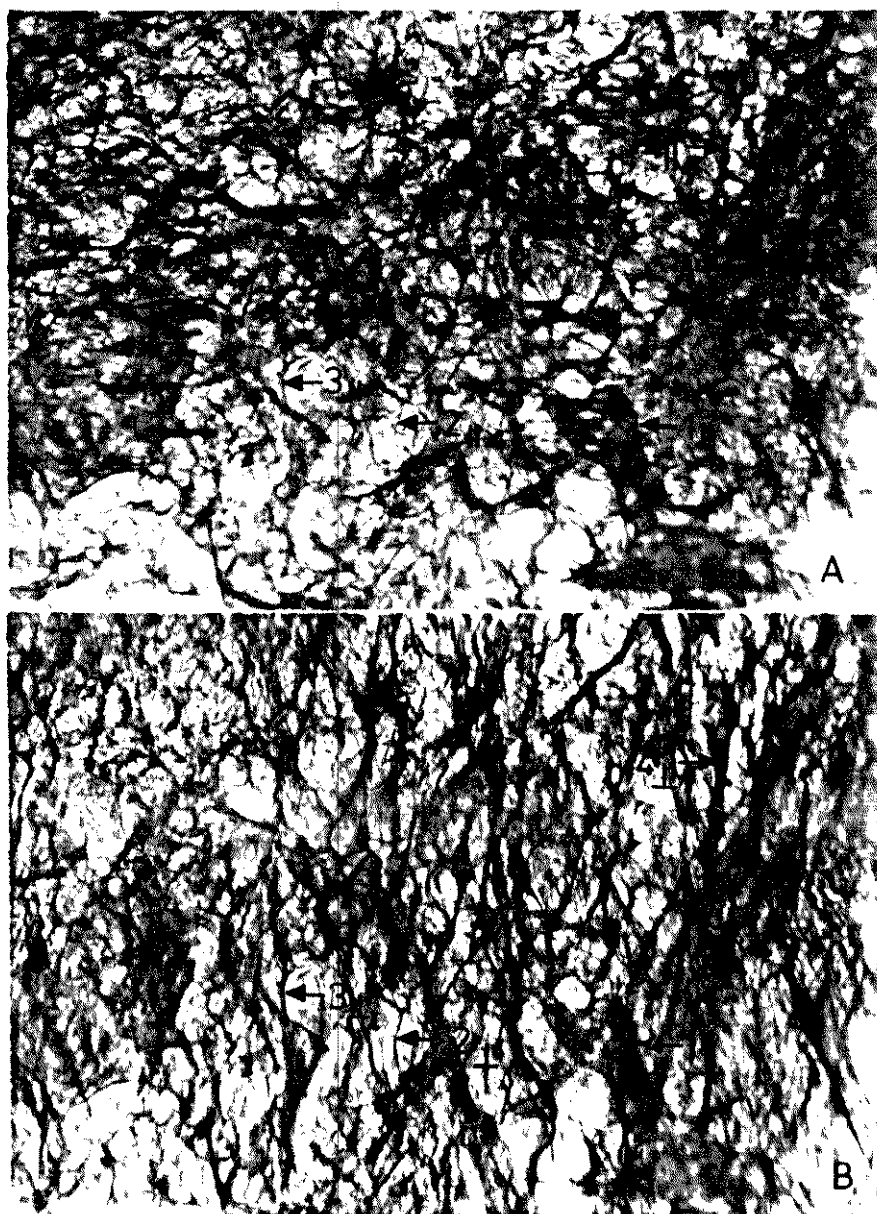


FIGURA 18. Dicroísmo de complexos DNA-FRH₅ após diálise contra NaCl 0,1M corado com A.T. pH 4,0. As setas numeradas indicam regiões correspondentes em A e B, com a respectiva posição em relação ao plano de luz polarizada. Notar que maior absorbância de luz ocorre em fibrilas que estão perpendiculares ao plano de luz polarizada ($I_{\perp} > I_{\parallel}$, $2_{\perp} > 2_{\parallel}$, $3_{\perp} > 3_{\parallel}$, $4_{\perp} > 4_{\parallel}$). Aumento : 512x.

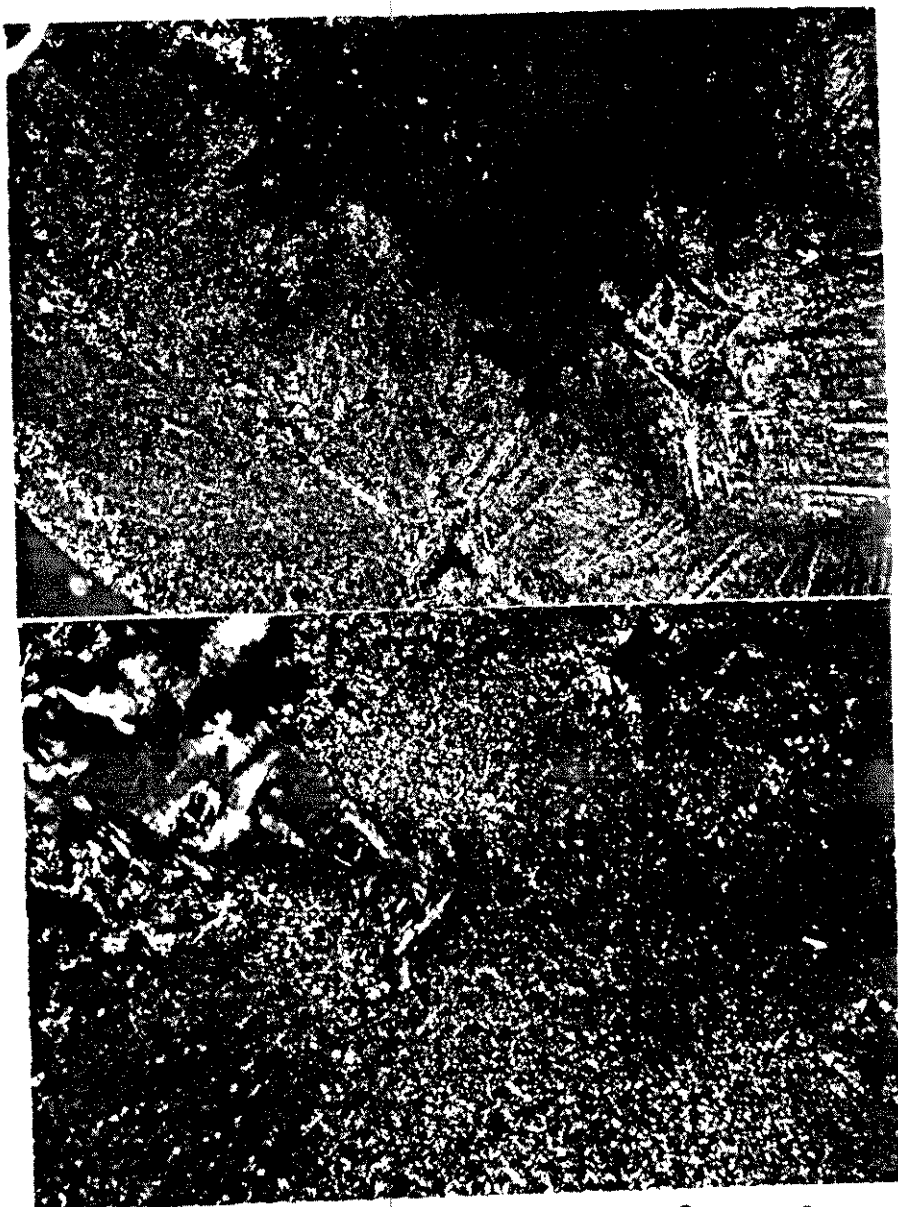


FIGURA 19. Imagens de birrefringência de complexos DNA-HT corado com A.T. pH 4,0, após diálise contra NaCl 1M (A) e NaCl 0,1M (B). Aumento : 32x.

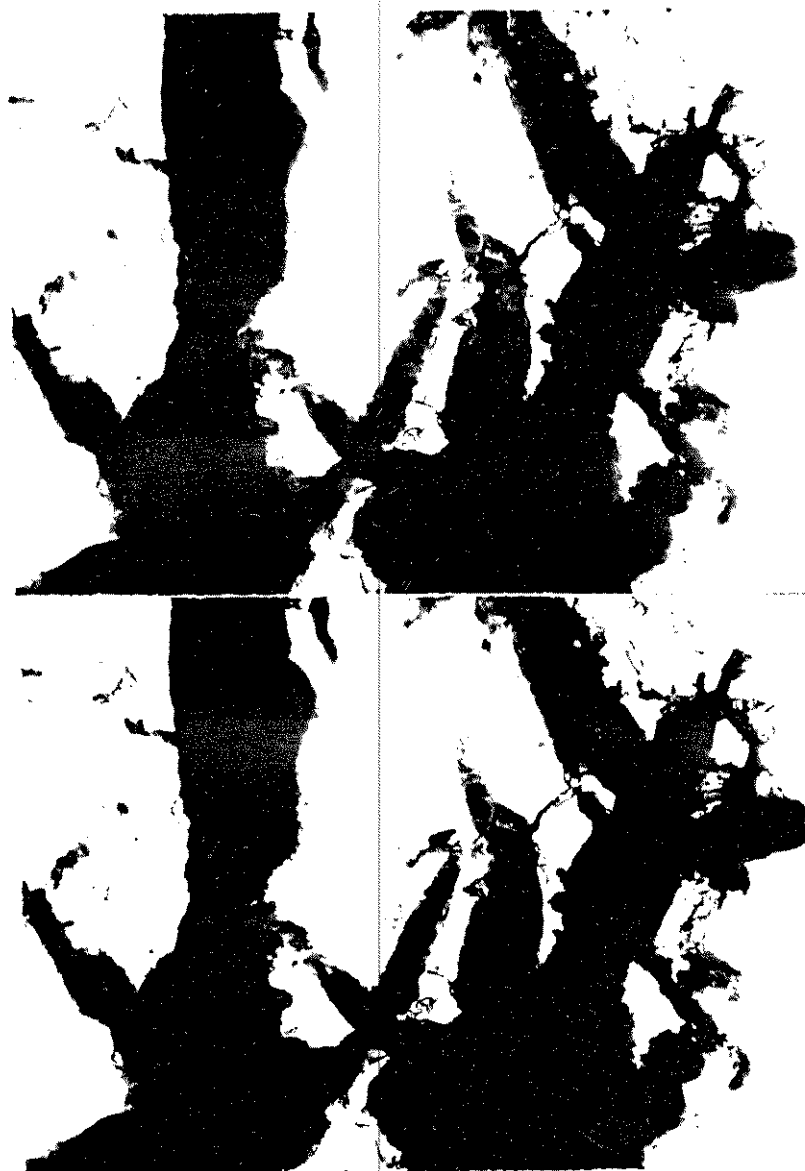


FIGURA 20. Ausência de dicroísmo em complexos DNA-HT após diálise contra NaCl 0,1M. Coloração com A.T. pH 4,0. Aumento : 80x.



FIGURA 21. Imagem de birrefringência de núcleos de eritrócito após extração de FRH₅ com NaCl 0,15M-HCl pH 1,85. Coloração com A.T. pH 4,0. Aumento : 80x.

timos foram usados só para corar proteínas fixadas em gel de poliacrilamida, e o sirius red utilizado tanto para proteínas em gel de poliacrilamida como em material nuclear fixado em lâminas (figura 16). Como se vê na figura 22, gel A, histonas totais imobilizadas em gel de poliacrilamida, prendem indistintamente as moléculas de sirius red. Resultado diferente ocorreu com naphthol yellow, que se ligou preferentemente a H_1 e H_{2a}/H_{2b} (figura 22, gel B). Nenhuma banda foi encontrada na região correspondente à posição de H_5 .

Com respeito ao coomassie brilliant blue, ficou evidenciado que quando ligado a H_1 exibia metacromasia cor violeta róseo, o mesmo não ocorrendo com H_5 e as outras histonas (figura 23).

III.8. Visualização de complexos DNA-FRH₅ ao microscópio eletrônico.

A associação de FRH₅ com DNA durante diálise contra várias concentrações de NaCl, foi observada ao microscópio eletrônico. Após diálise contra NaCl 0,7M ficou evidenciado a formação de fibras que pareciam ser resultado de um alinhamento de grânulos (figura 24). A espessura destas fibras mostrou-se bem variável, sendo detectados filamentos em torno de 132Å de diâmetro, e em menor quantidade, filamentos mais finos com 70Å de espessura. Outro fato observado nesta concentração de NaCl, foi a formação de verdadeiros agregados de material DNP (figura 24). No caso de NaCl 0,25M, o aspecto morfológico foi bem diferente (figura 25), destacando-se grupos de DNP mais ou menos espaçados, interconectados por fibrilas que pareciam emergir desses grupos. As fibrilas mediram

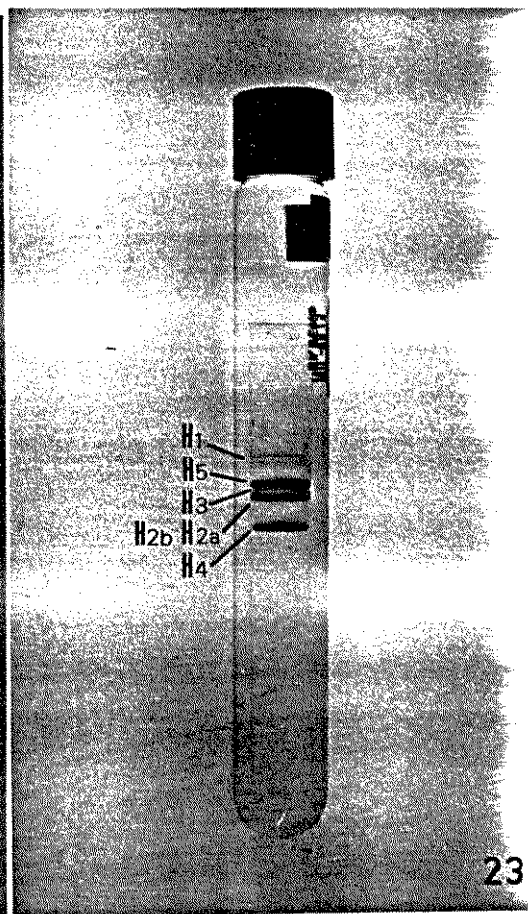
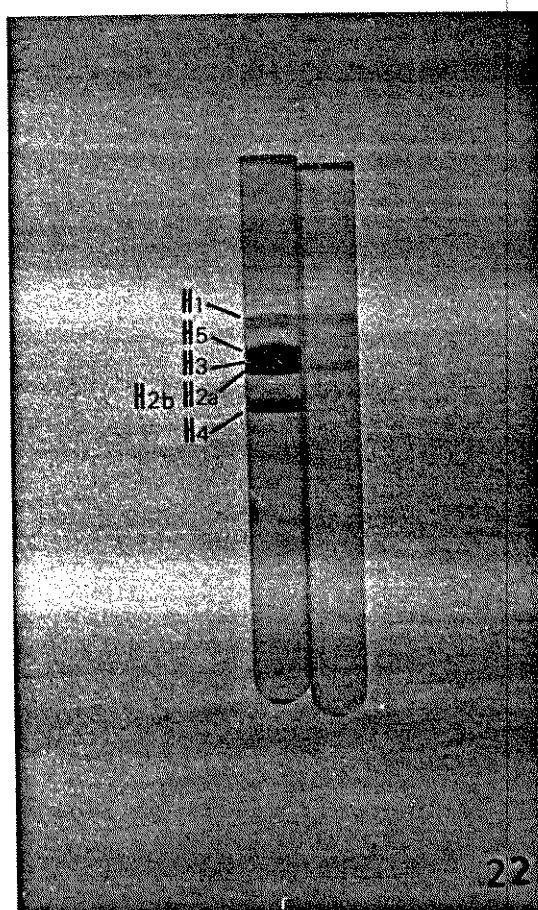


FIGURA 22. Eletroforese de histonas totais de eritrócitos de frango, extraídas com H_2SO_4 0,4N. Os geles foram corados com S.R. F3B 0,1% pH 2,7 (gel A) e N.Y. 0,1% pH 2,7 (gel B), Notar a preferência de N.Y. por H_1 e $\text{H}_{2b}/\text{H}_{2a}$. Condições de eletroforese : 1,8mA/gel; 15V/cm de gel.

FIGURA 23. Eletroforese de histonas totais extraídas com H_2SO_4 0,4N. Os geles foram corados com C.B.B.. Notar a cor metacromática violeta róseo exibida pelo corante ligado à histona H_1 . Condições de eletroforese : 1,8 mA/gel; 15V/cm de gel.

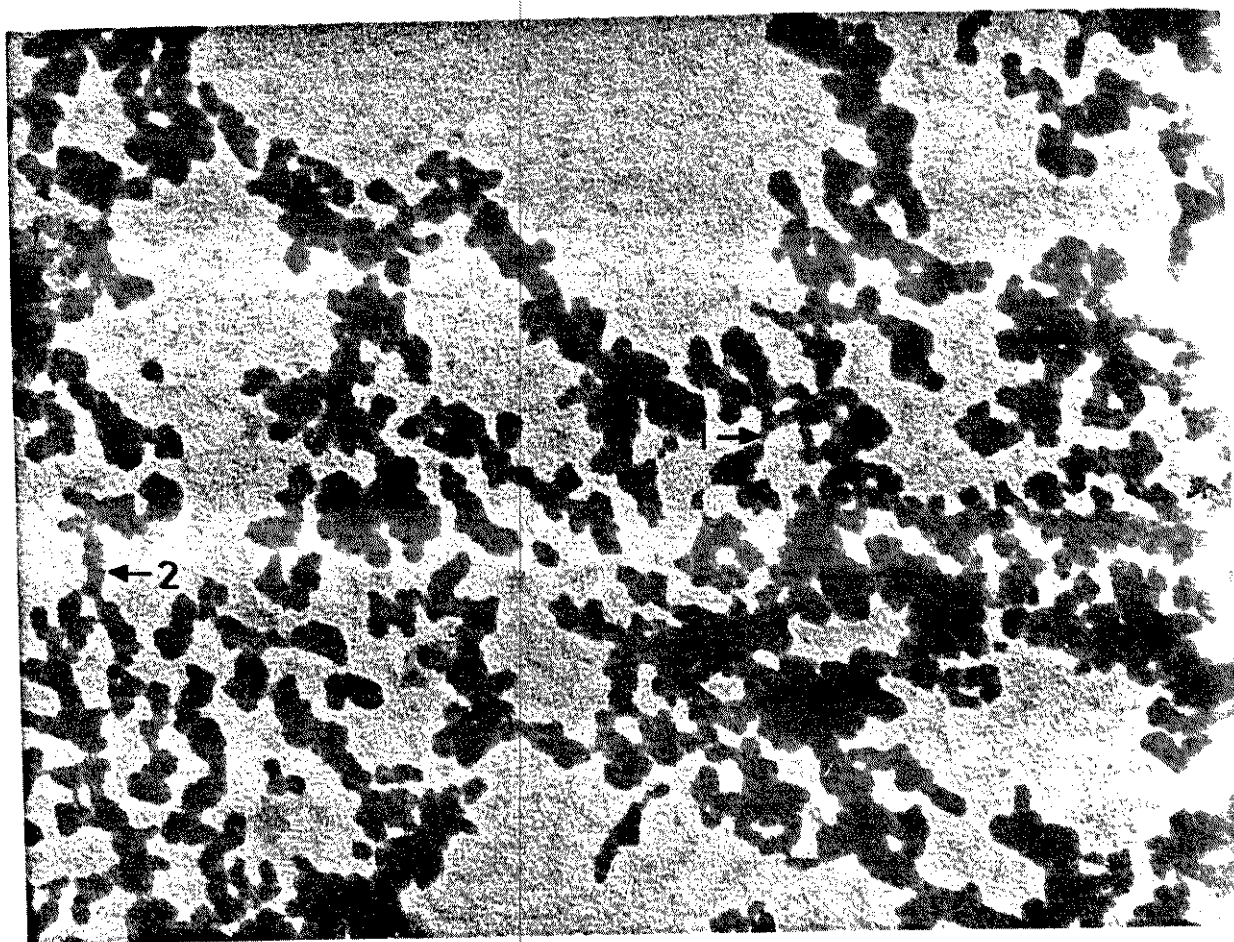


FIGURA 24. Micrografia eletrônica de complexos DNA-FRH₅ após diálise contra NaCl 0,75M. Notar heterogeneidade na espessura das fibrilas. As setas indicam fibras com 70Å (1) e 132Å (2) de diâmetro. Coloração : PTA 2%. Aumento : 154000x.

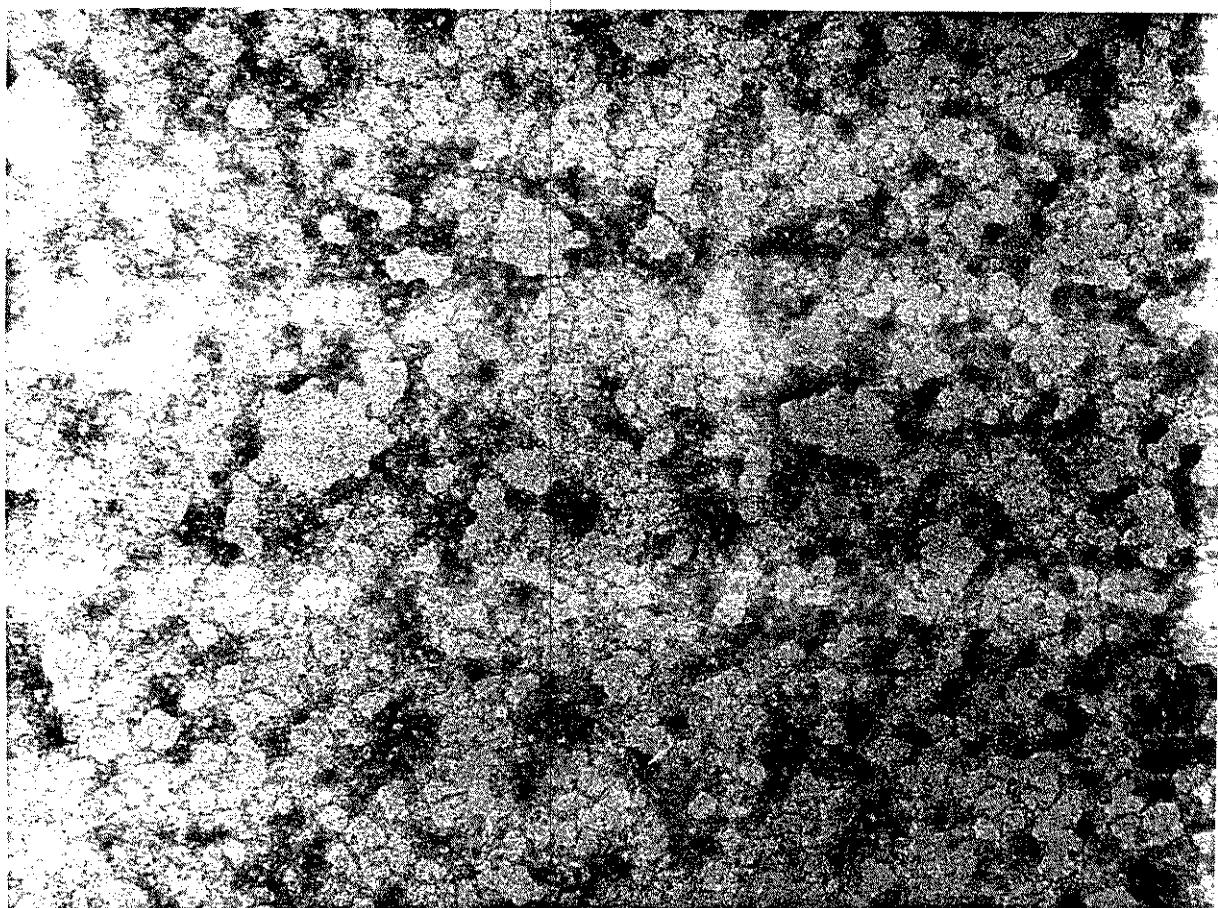


FIGURA 25. Micrografia eletrônica de complexos DNA-FRH₅ após diálise contra NaCl 0,25M. Observar que grumos de DNP parecem interligados entre si por meio de fibrilas. Coloração com PTA 2%. Aumento : 148500x.

aproximadamente $14\text{\AA}$ de espessura. Na sequência da diálise, com NaCl 0,1M (figura 26), o aspecto fibrilar estava bastante modificado em relação aos anteriores, as fibras apresentavam um caráter mais homogêneo, com uma espessura em torno de $145\text{\AA}$. Formações de material mais concentrado foram encontradas em algumas regiões ao longo da fibra.

III.9. Visualização ao microscópio eletrônico de núcleos tratados com NaCl 0,7M.

Núcleos em NaCl 0,7M, observados ao microscópio eletrônico, mostraram um material cromatínico bastante heterogêneo, com fibras mais ou menos bem espaçadas e regiões com conteúdo cromatínico altamente compactado (figuras 27 e 28).

Durante o tratamento com NaCl 0,7M, ocorreu saída de filamentos de DNP para fora do núcleo (figuras 29 a 31), tendo sido notado que a saída desses filamentos se deu preferencialmente em determinadas regiões do envelope nuclear (figura 31).

No meio extranuclear, estes filamentos apresentaram-se distendidos em sua maior parte, mas quase todos estavam associados, contribuindo para a formação de fibras mais espessas (figura 30). A presença de fibrilas medindo cerca de $17\text{\AA}$ de diâmetro foi encontrada em observações com maior aumento (figura 32), além do que essas fibrilas pareciam ser constituídas de pequenas unidades granulares, que mediam também $17\text{\AA}$. Em algumas regiões ficou claro que fibrilas se associam para formar fibras mais espessas (figura 32, seta 2). O caráter não

uniforme do material de DNP que saiu do núcleo, pôde ser constatado pela presença de fibras com diâmetro médio de $120\text{\AA}$, e formações de grumos de DNP com diferentes graus de compactação (figura 33).

Com o material espalhado sobre uma gotícula de água, foi possível uma melhor individualização das fibras de DNP no meio extranuclear (figuras 31 a 34). O diâmetro médio dessas fibras ficou em torno de $100\text{\AA}$. Grumos de DNP se mantiveram presentes. Fibrilas medindo de 14 a $28\text{\AA}$ foram encontradas próximo e mesmo no interior de material mais condensado (figuras 35 e 36).

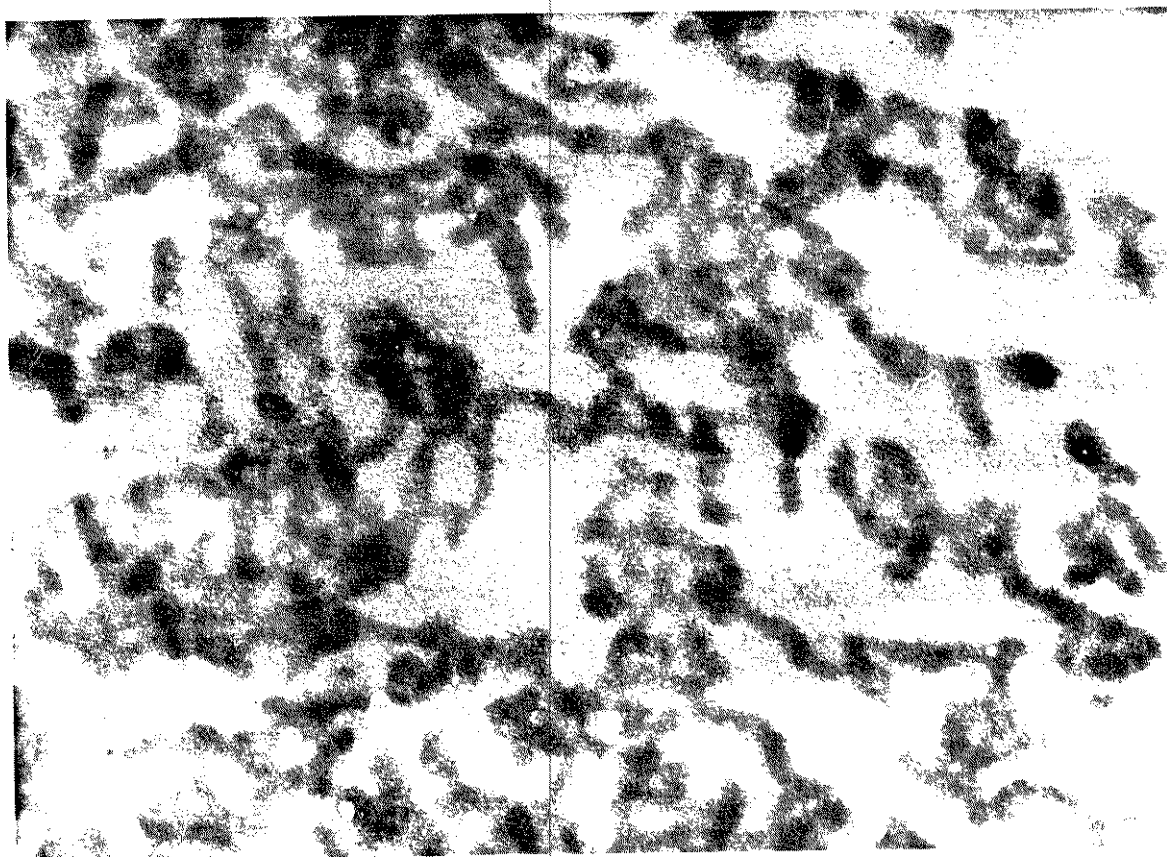
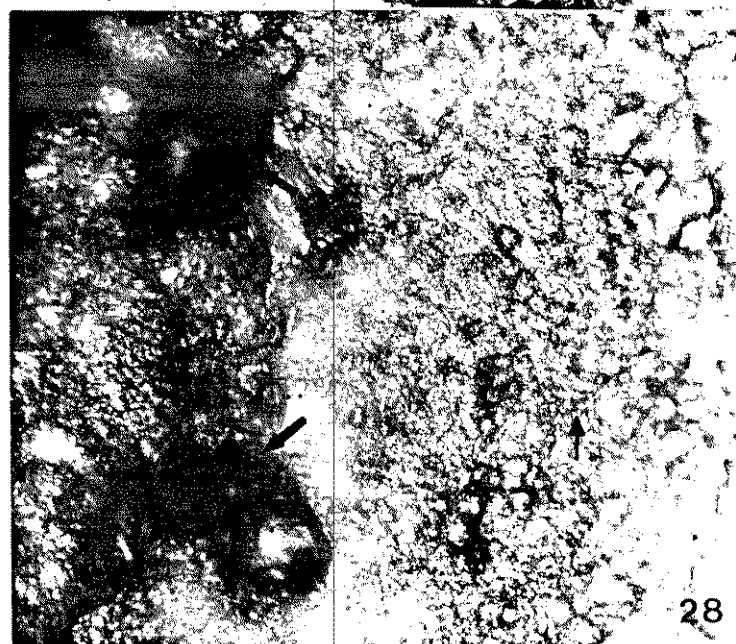
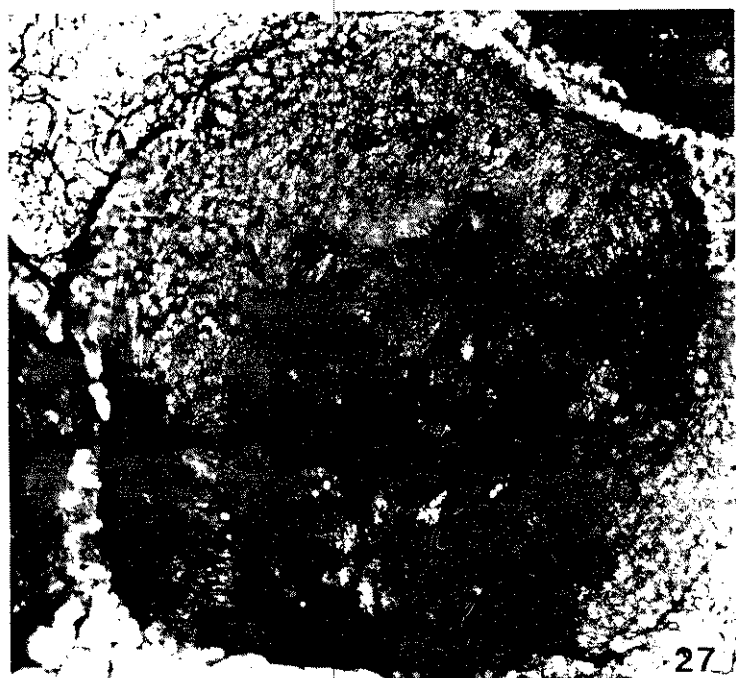
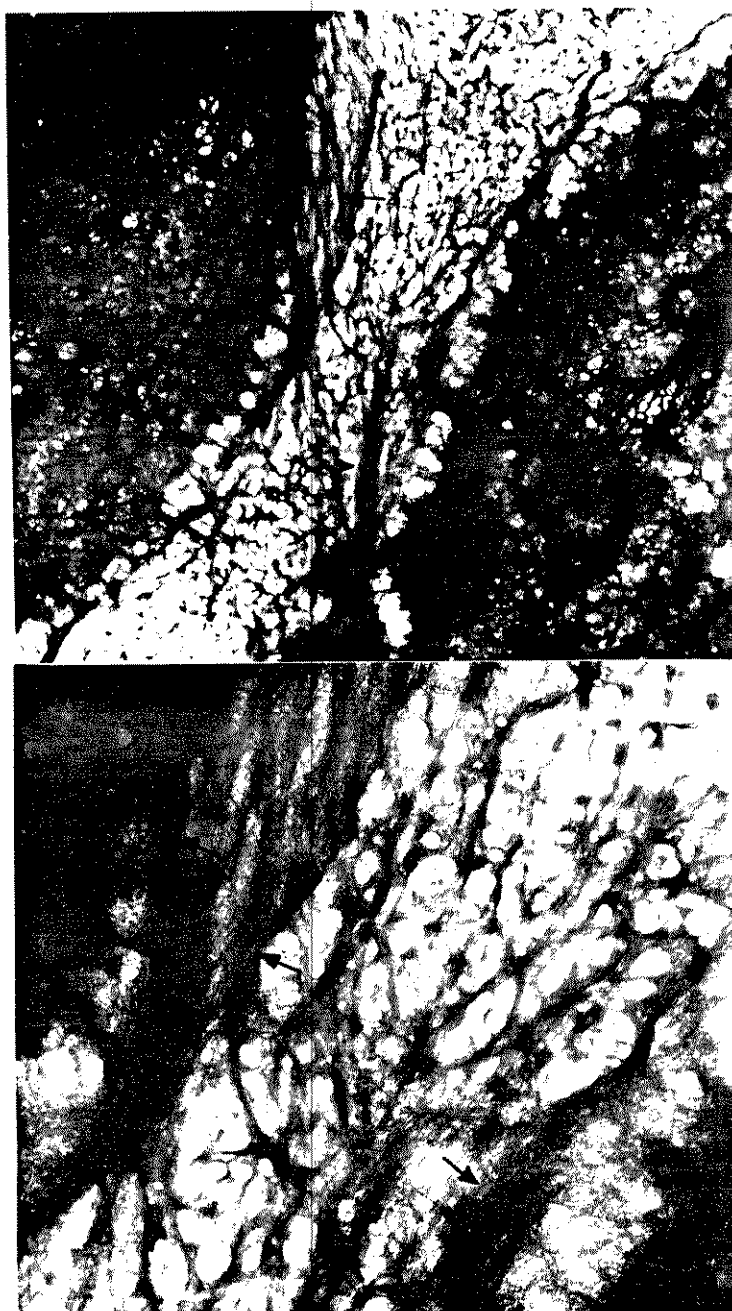


FIGURA 26. Micrografia eletrônica de complexos DNA-FRH₅ após diálise contra NaCl 0,1M. Notar o aspecto fibrilar mais homogêneo, com espessura média em torno de 145Å. Colocação com PTA 2%. Aumento : 132300x.



FIGURAS 27 e 28. Micrografias eletrônicas de núcleo de eritrócito de frango, em NaCl 0,7M. Notar a presença de fibras bem espaçadas (seta estreita) e de conteúdo cromatínico bem compactado (seta larga). Coloração com EPTA 2% pH 7,4. Aumentos: 16700 e 51300 respectivamente.



FIGURAS 29 e 30. Idem figuras 27 e 28. Notar os filamentos de DNP (seta) emergindo do núcleo (N). O aspecto pouco uniforme desses filamentos também é visualizado. Coloração com EPTA 2% pH 7,4. Aumento : 16700x e 51300x respectivamente.



FIGURA 31. Micrografia eletrônica de fibras de DNP (seta 1) emergindo do núcleo (N). O material foi tratado com NaCl 0,7M e espalhados sobre água. Nota-se a formação de aglomerados de DNP (seta 2) no meio extranuclear. Coloração com acetato de uranila 2%. Aumentos : 18500x (A) e 51300 (B).

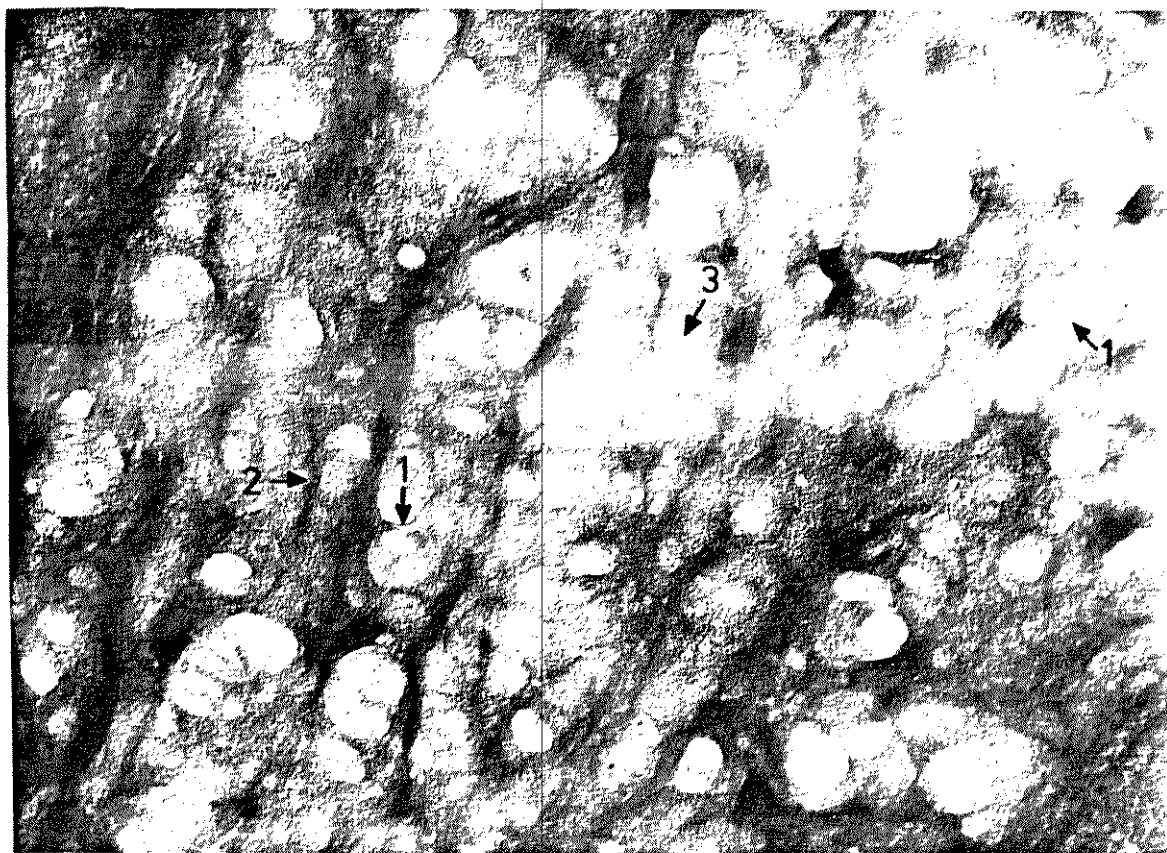


FIGURA 32. Micrografia eletrônica de gel de DNP extranuclear, de núcleos tratados com NaCl 0,7M. Notar presença de fibrilas com cerca de $170\text{\AA}$ de diâmetro (seta 1), feixe de fibrilas (seta 2) e possível composição granular das fibrilas (seta 3). Coloração com EPTA 2% pH 7,4. Aumento : 143100x.

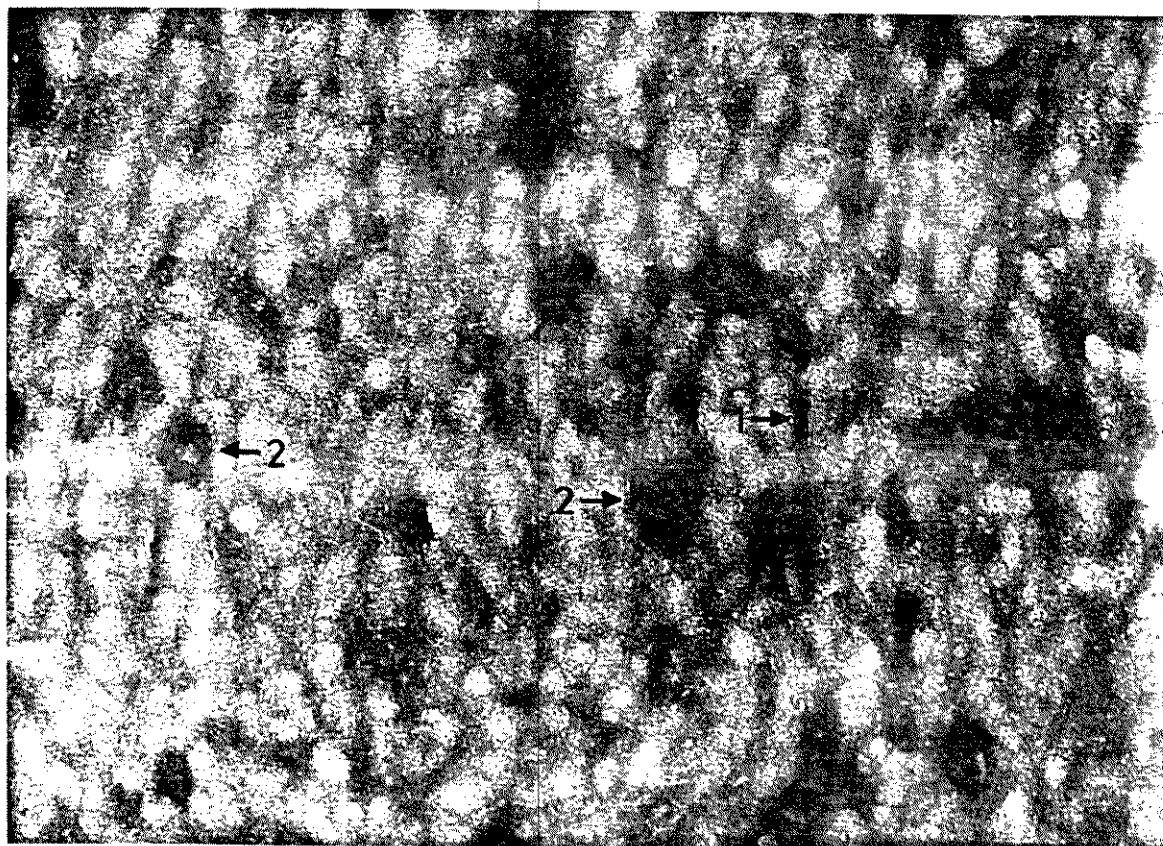


FIGURA 33. Idem anterior. Notar presença de fibras com diâmetro aproximado de $120\text{\AA}$ (seta 1) e grumos de DNP (seta 2) com diferentes graus de compactação. Coloração com EPTA 2% pH 7,4. Aumento : 132300x.

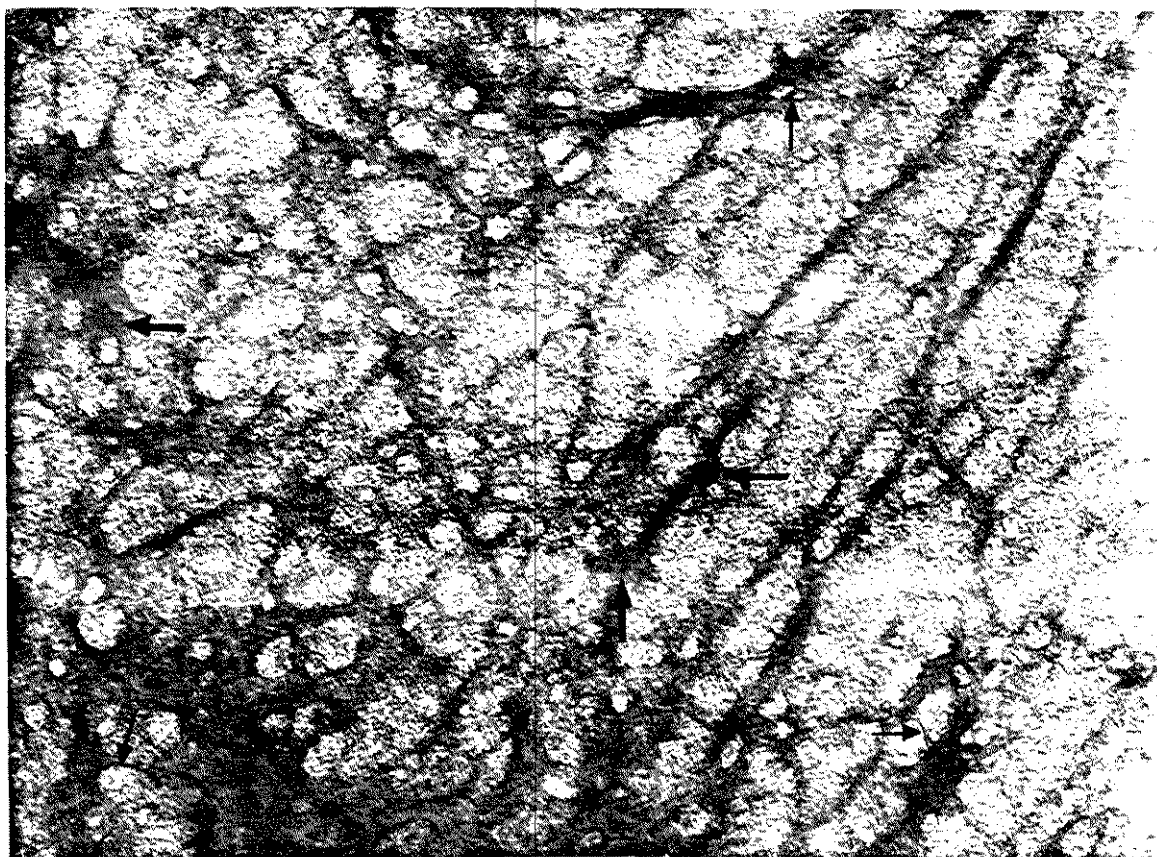


FIGURA 34. Idem figura anterior, mostrando agregados de DNP (seta larga) e fibrilas interconectantes com medidas que variam entre 14 e $32\text{\AA}$ (seta estreita). Coloração com acetato de uranila 2%. Aumento 143100x.

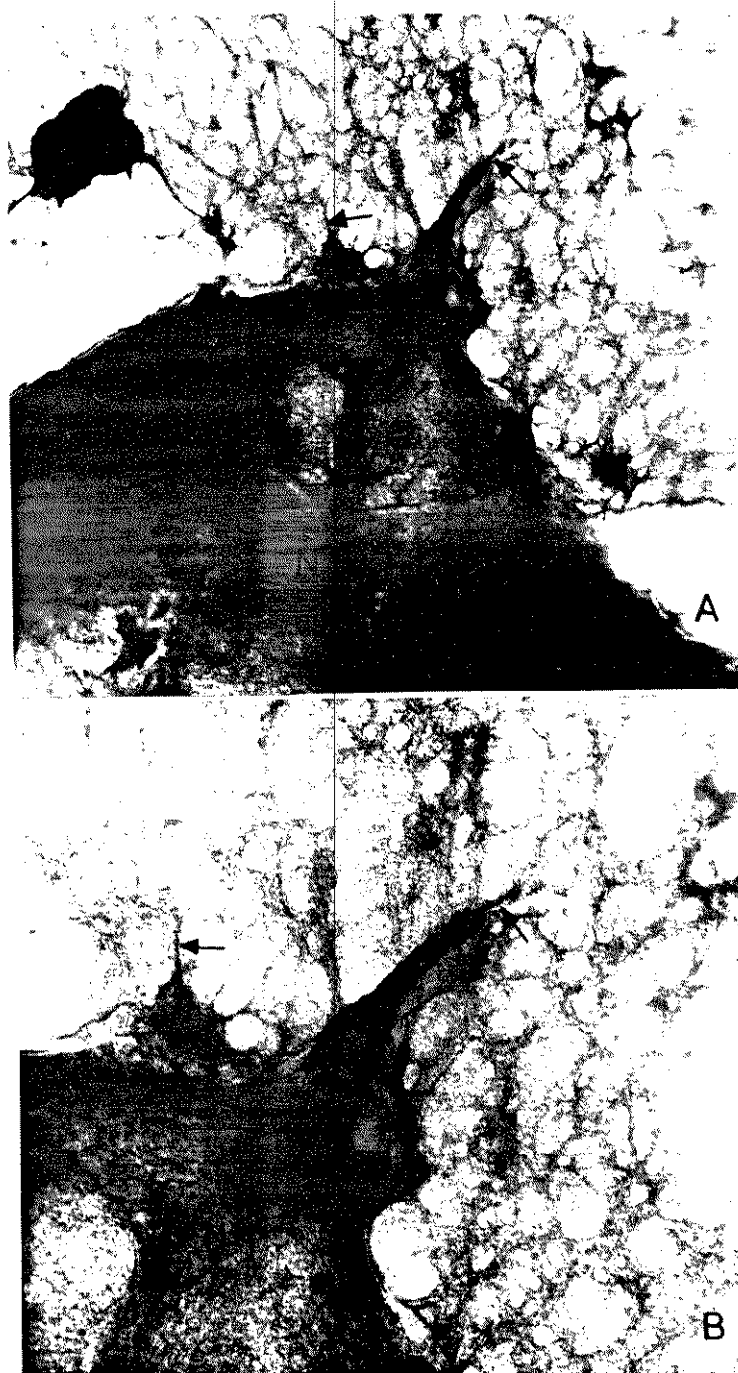


FIGURA 35. Fibras de DNP (seta) emergindo do núcleo (N) em NaCl 0,7M, e espalhada sobre água. Coloração em acetato de uranila 2%. Aumentos : 56700x (A) e 100200x (B).

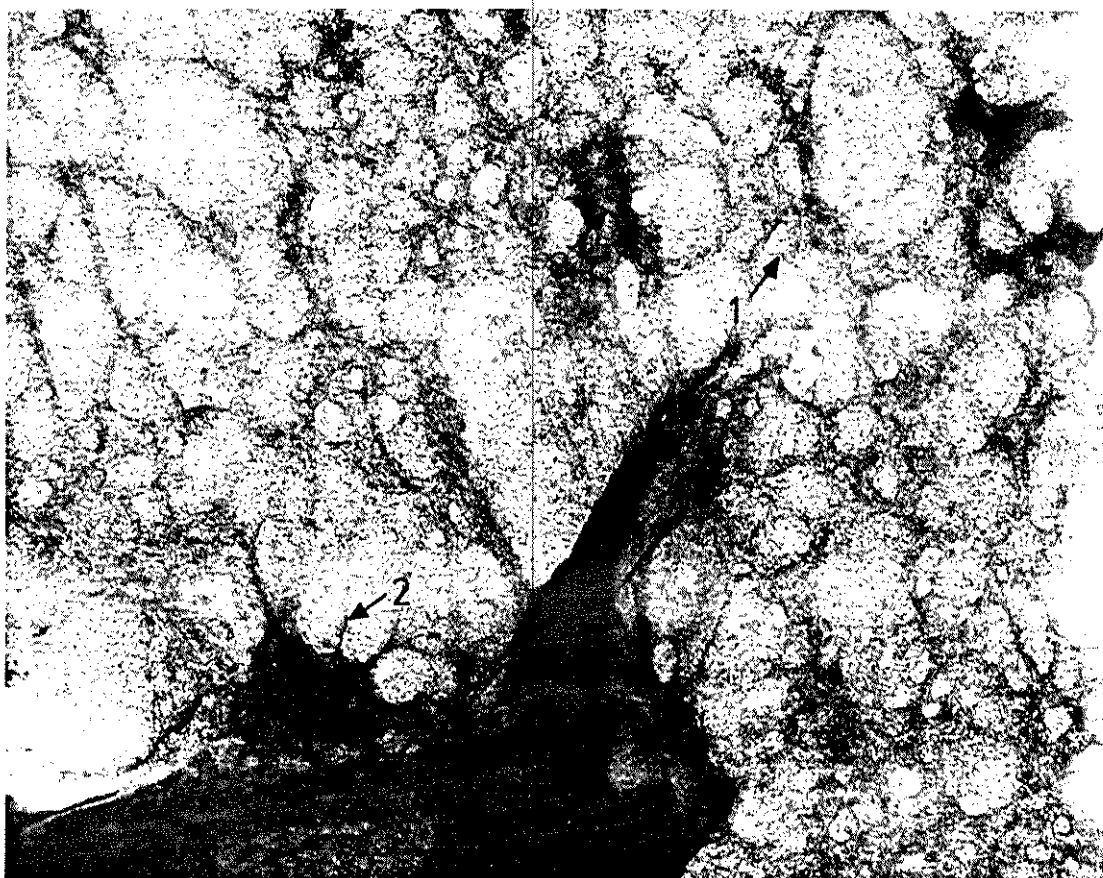


FIGURA 36. Idem figura anterior, mostrando fibrilas muito finas medindo $14\text{\AA}$ (1), $21\text{\AA}$ (2) e $28\text{\AA}$ (3). Aumento: 156600x.

IV. DISCUSSÃO

Apesar dos muitos estudos feitos com respeito aos processos extrativos de histonas ricas em lisina, usando PCA (JOHNS, 1964; WEISCHET et al, 1979), NaCl 0,7M (OHLENBUSCH et alii, 1967; BRASCH; 1976) e NaCl 0,15M-HCl pH 1,85 (SELIGY, 1971; GREENAWAY, 1971; GREENAWAY & MURRAY, 1971; TOBIN & SELIGY, 1975; SELIGY et alii, 1976), ainda se desconhece um processo que possa ser eleito como o melhor, e os nossos dados realmente mostram uma grande variabilidade no resultado de extração por PCA 5%, NaCl 0,7M e NaCl 0,15M-HCl pH 1,85.

O fato de se encontrar uma boa reprodutibilidade quanto aos padrões eletroforéticos, apenas quando a extração é feita com NaCl 0,15M-HCl pH 1,85, permite deduzir-se que para NaCl 0,7M e PCA 5% não se tem uma boa seletividade para remoção de H_5 e H_1 .

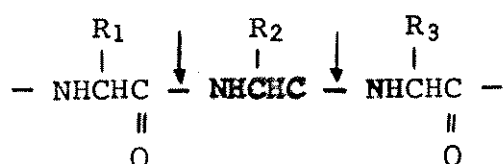
Considerando-se que a cromatina de eritrócitos nucleados de aves, atravessa transições estruturais e fisiológicas durante o processo de maturação destas células e que no sangue total existem eritroblastos policromáticos e mais jovens (BRASCH et al, 1974), poder-se-ia pensar na possibilidade de que os representantes mais imaturos de eritrócitos tenham uma maior facilidade em perder outras histonas além de H_5 e H_1 pelo tratamento com NaCl 0,7M e PCA 5%, o mesmo não acontecendo com NaCl 0,15M-HCl pH 1,85. Os mesmos dados, baseados no me

canismo extrativo pelo NaCl, também permitiriam a interpretação da presença de uma competitividade eletrostática através da qual o $\text{Na}^+ \text{Cl}^-$ deslocaria as histonas. Assim NaCl 0,7M descomplexaria mais histonas do que NaCl 0,15M-HCl. Em termos práticos, para extrações citoquímicas "in situ" recomendar-se-ia o uso de NaCl 0,15M-HCl pH 1,85.

As diferenças encontradas nas curvas espectrais de FRH₅ e de H₁ de timo são reflexos diretos das diferentes composições em dois aminoácidos: Tyr e Phe. Enquanto H₅ apresenta três resíduos Tyr e um Phe (SAUTIÈRE et alii, 1976), H₁ de timo apresenta um Tyr e um Phe (ISENBERG, 1979). A curva espectral de FRH₅ em razão do seu teor de Tyr, é muito semelhante à curva de Tyr isoladamente. Já com H₁ não existe uma absorção seletiva na faixa 250-300 nm, a exemplo do que ocorre com o colágeno, proteína esta usada para comparação, pela ausência de aminoácidos aromáticos em sua molécula. A curva ascendente em $\lambda < 250 \text{ nm}$ se deve à absorção própria das ligações peptídicas que sabidamente ocorrem com maior intensidade entre $\lambda = 185\text{nm}-240\text{nm}$.

Nestes experimentos chamou a atenção o fato das curvas espectrais destas duas frações de histonas, FRH₅ e H₁ desnaturadas, se comportarem diferentemente em tampão borato pH 9,0 e HCl 0,01N. Normalmente é esperado um aumento nos valores absorciométricos de proteínas desnaturadas, em razão de uma maior exposição de seus grupos cromofóricos, à interação com a luz, v.g. BSA (figura 3); no entanto para FRH₅ e H₁ de timo em HCl 0,01N, não ocorreu o fenômeno esperado (figura 4). Este resultado sugere que o aquecimento a 96°C por 10 minutos seja acompanhado de mudança conformacional, que ao contrá-

rio de expor grupos cromofóricos, os subtrai da incidência fotônica. Merece atenção o fato de FRH₅ e H₁ de tимо apresentarem um comportamento semelhante neste aspecto. Considere-se mais ainda que, para FRH₅ nativa e desnaturada, as diferenças na faixa de λ_{246} a λ_{262} são relativamente grandes. Uma vez que estes λ são os λ próximos da absorbância máxima das ligações



pode-se deduzir que H₁ sofra uma maior distensão em soluções alcalinas a pH 9,0 comparativamente a H₅.

As observações de fluorescência de FRH₅ e H₁ em NaCl 0,15M, mostraram uma mais alta intensidade de fluorescência para H₅ do que para H₁, e isto é esperado pela própria composição de resíduos Tyr e Phe entre estes tipos de histonas, o que está de acordo com os dados fluorométricos. Com relação a H₁ de tимо, a presença de apenas um resíduo Phe, não permitiu detectar diferenças entre H₁ nativo e desnaturado.

A fluorescência mais alta encontrada para FRH₅ em HCl 0,1N deve-se à alta solubilidade desta fração nesta solução, que é a recomendada para fins de dosagem quantitativa de histonas usando fluorometria (BONNER et alii, 1968). Quanto a este método cabe aqui uma crítica, pelo simples fato de que cada histona apresenta um comportamento diferente de fluorescência, e em razão disto podemos ter para cada procedimento extrativo um valor diferente de intensidade de fluorescência que no entanto pode significar uma mesma quantidade de histonas. O uso de NaCl 0,15M é conveniente por estar próximo às condi-

ções fisiológicas, e sabe-se que nesta concentração se tem presentes, nas moléculas de H_5 e H_1 , a região globular e as sequências adjacentes a esta região (AVILES et alii, 1978).

Os nossos dados com relação a histonas-ANS, mostraram que a intensidade de fluorescência segue a seguinte ordem: $H_1 > FRH_5 > HT$, sendo que a fluorescência de HT é mínima. No caso destes experimentos é preciso considerar que durante a evaporação de água, as moléculas de histonas foram submetidas a forças de tensão que conduziram a um estiramento em suas moléculas com prováveis mudanças em suas regiões globulares. No caso de H_1 -ANS e FRH_5 -ANS a fluorescência foi intensa apesar das forças de tensão, mostrando que estas histonas oferecem uma boa estabilidade à alteração conformacional pelo menos em sua região globular. A composição de aminoácidos da região mediana de H_1 de timo de bezerro, ainda não é completamente conhecida, mas é de se supor que esta região tenha o mesmo número de aminoácidos apolares que esta mesma região em H_1 de timo de coelho e de truta (ISENBERG, 1979), com 29 resíduos apolares. Neste aspecto não há diferença entre as regiões globulares de H_1 e H_5 que também têm 29 aminoácidos apolares. Apesar desta semelhança entre H_5 e H_1 , as fluorescências exibidas por ANS- FRH_5 e ANS- H_1 , refletem que H_5 e H_1 exibem regiões hidrofóbicas com extensões diferentes. A maior fluorescência exibida por ANS- H_1 demonstra que esta apresenta uma maior extensão de região hidrofóbica.

O nosso resultado de fluorescência de ANS- H_1 , discorda do resultado de LAURENCE (1966), que encontrou fluorescência muito fraca para H_1 ; esta divergência explica-se pe-

lo fato de que em nosso preparado a molécula de H_1 estava imobilizada sobre a lâmina e também cercada por nujol, consequentemente a flexibilidade da molécula de ANS está diminuída, o que faz aumentar o rendimento quântico da fluorescência (PENZER, 1972).

O aumento da fluorescência tanto de FRH_5 como de H_1 , quando se procedeu a fixação com formaldeído, era esperado, uma vez que ligações cruzadas com formações de pontes - CH_2 - após fixação, manteriam as moléculas de histonas em uma conformação mais rígida, tornando-as mais resistentes às tensões que poderiam sofrer durante a evaporação do solvente.

MICROSCOPIAS DE POLARIZAÇÃO E ELETRÔNICA

Núcleos de eritrócito de ave, em presença de NaCl 0,15M, como era de se esperar, mostraram um conteúdo cromatínico bem compactado sem nenhum sinal de descondensação (figura 13). No entanto este quadro morfológico mudou quando estes núcleos foram submetidos a tratamento com NaCl 0,7M ocasionando descompactação do material nuclear. É preciso estar atento para o fato de que a descompactação da cromatina não é resultado direto da concentração 0,7M de NaCl, mas se dá devido à extração de H_5 e H_1 (ALLAN et alii, 1981). Esta descompactação levou à saída de um complexo DNP para fora do núcleo, que ao ser corado com azul de toluidina a pH 4,0 exibiu uma intensa birrefringência negativa demonstrando presença de DNA, isto revela que inclusive saíram H_3 e outras histonas, o que decomporia o nucleossomo. A birrefringência observada se deve as moléculas coplanares de azul de toluidina que se prendem aos gru

pos fosfatos livres do DNA. Esta mesma disposição das moléculas de azul de toluidina ocasionou discreta metacromasia observada em núcleos intactos. Como se sabe, metacromasia resulta do empilhamento das moléculas de azul de toluidina ligadas aos fosfatos do DNA (DAVIDSON & BUTLER, 1956; MIURA & OHBA, 1967). No caso do gel mostrado nas figuras 14 e 15, não pode ser desprezada a possibilidade de que moléculas de azul de toluidina se intercalem entre as bases de DNA (MIURA & OHBA, 1967).

O dicroísmo encontrado no gel corado com sirius red F3B é devido as moléculas do corante presas às histonas, estarem alinhadas junto aos filamentos de DNP. Interpreta-se com base no significado físico de dicroísmo, que as histonas que conferem este caráter dicroico, especialmente no modelo em estudo (eritrócito) é H_5 e talvez H_1 , pelo fato dessas duas histonas terem uma longa extensão de região não globular (HARTMAN et alli, 1977; AVILES et alli, 1978), o que permitiria uma distribuição alongada entre os fios de DNP. Este fato compreendendo dissociação de H_5 e H_1 da fibra cromatínica, com uma distribuição orientada ao longo das fibras de DNP, sugere que em condições fisiológicas, durante a atividade gênica, ocorre descomplexação de H_5 (e H_1) dos fios de DNP, ficando as moléculas de H_5 e H_1 com um arranjo que facilite a reassociação destas histonas ao filamento remanescente de DNP.

O retorno do material nuclear para o interior do núcleo quando se reduz a suspensão nuclear, de NaCl 0,7M para NaCl 0,15M (através de diálise) dá idéia do aspecto dinâmico do material cromatínico, que é fundamental na compreensão das transformações estruturais (supersolenóide $\rightarrow$ solenóide $\rightarrow$ fi-

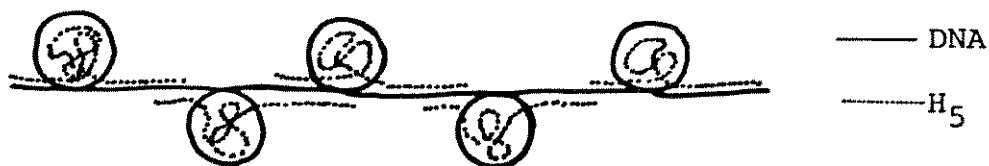
lamento nucleossomal) entre as formas condensadas e descondensadas de fibra de DNP. A interpretação exata de como se dá esta retroação, não se arvora apresentar aqui, mas é sugestivo que, com a diminuição da concentração de NaCl, a competitividade das histonas associadas, pelos radicais fosfato da molécula de DNA, seja favorecida no sentido do restabelecimento da estrutura nucleossômica nativa, possibilitando inclusive a supercompactação dos filamentos de DNP. A continuidade entre os fios de DNP que estão dentro e fora do núcleo (figura 36) corroboram esta idéia.

A birrefringência encontrada em complexos DNA-FRH₅ obtidos por reassociação, corados com azul de toluidina a pH 4,0, mostrou-se mais intensa no caso de NaCl 0,1M do que em NaCl 0,7M e 1M (figura 17). Deve-se o evento, a que em concentração de NaCl mais baixa é permitida uma interação eletrostática de FRH₅ com o DNA, de tal sorte que, estatisticamente, no complexo DNA-FRH₅, os "duplex" deste ácido nucleico estejam agregados em ordem, paralelamente, à guiza do que ocorre em espermatozóides em geral e na interação de protamina (clupeína) com DNA (VIDAL, 1979). As estruturas primária e secundária de H₅ favorecem a conformação do complexo DNA-FRH₅. Assim é preciso considerar que além das regiões terminais de FRH₅, também a região mediana globular interage com DNA (AVILES et alii, 1978, 1979; ALLAN et alii, 1980), tendo sido inclusive já demonstrado que apenas a região globular é suficiente para conferir discreto segmento chamado cromatossomo (ALLAN et alii, 1980) contendo 165 pares de base de DNA.

A ligação das regiões terminais de H_5 com segmentos de DNA, é prontamente aceitável, sabendo-se da presença de 3 lisinas em N-terminal e 46 resíduos entre arginina e lisina na região C-terminal (AVILES et alii, 1978).

Os dados de AVILES e colaboradores (1979), sobre interação H_5 -DNA, sugeriram que a associação de H_5 com DNA pode originar uma estrutura orientada, e esta possibilidade pode ser reforçada pelos nossos resultados de dicroísmo (figura 18). O dicroísmo encontrado ($A_{\parallel} < A_{\perp}$) permite supor uma estrutura em que a orientação média dos grupos cromofóricos do azul de toluidina a ela ligados, é mais perpendicular do que paralelo à direção do maior eixo da estrutura de DNP. Considerando-se que a molécula de azul de toluidina se prende aos radicais fosfato da molécula de DNA, é sugestivo imaginar que a molécula de DNA sofre alterações na estrutura "quintenária", induzidas por H_5 e H_1 .

Repetindo de outra forma a mesma idéia, o fato da região globular de H_5 apresentar 22% de seus resíduos carregados, confere uma alta densidade de carga superficial a esta região (AVILES et alii, 1978), o que facilitaria um certo dobramento da molécula de DNA em torno de H_5 com regiões lineares, que esquematicamente poderíamos representar assim:



Ao contrário do que foi constatado para resultado da associação de H_5 com DNA (figura 17), com HT-DNA a birrefringência foi bem pouco expressiva, e este fato pode ser explicado se considerarmos que neste caso temos um alto grau de compactação e como consequência, superposição de fios de DNP que levam à compensação parcial e total da birrefringência em muitas regiões, imitando o que ocorre em núcleos intactos, onde a birrefringência é mínima quando corados com azul de toluidina a pH 4,0.

O domínio C-terminal da molécula H_1 é indicada como uma região essencial para a condensação do nucleofilamento (FINCH et al, 1975). Esta mesma região em H_5 pelo menos, deve ter sido responsável pela orientação dos fios de DNA mostrados na figura 17.

A coloração de HT por sirius red em gel de poli-acrilamida, mostrou que este corante não exibe nenhuma seletividade quanto ao tipo de histona, o mesmo não acontecendo com o naphthol yellow (figura 22), um nitro-corante que se ligou a H_5 e $H_{2a}H_{2b}$ e não se prendeu a H_1 . O naphthol yellow S, introduzido na citoquímica como um corante quantitativo (DEITCH, 1955), a exemplo do que ocorre com fast green (ALFERT & GESCHWIND, 1953), liga-se eletrostaticamente a grupos básicos livres de proteínas nucleares; no entanto é preciso estar atento para o fato de que a interação corante-proteína, não se restringe apenas ao envolvimento da ligação química em si, mas também depende da configuração da molécula de proteína, que pode motivar o impedimento para a ligação do corante. O nosso resultado sugere que H_1 apresenta um estereorranjamento diferente de H_5 , o que impede a interação daquela histona com o naphthol yellow. Pode-

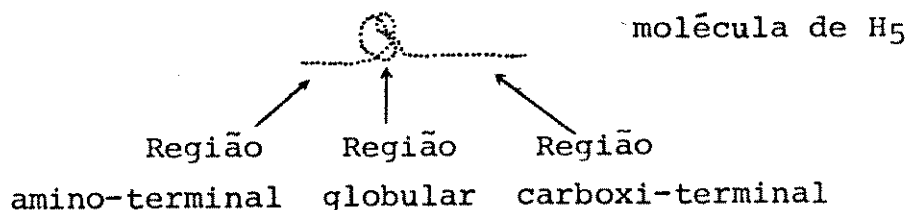
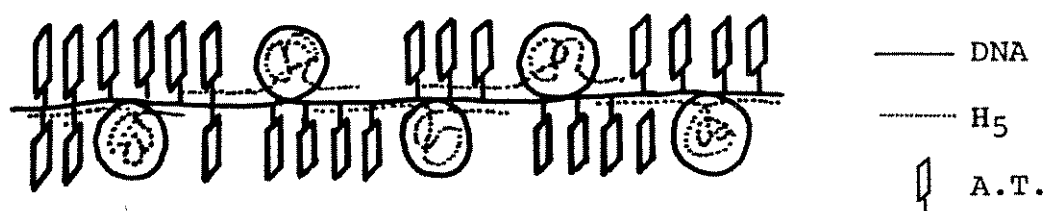
se também deduzir que H₅ teria mais grupos positivamente carregados para se combinar ordenadamente com DNA, o que já foi comentado.

Uma particularidade de H₁ é constatada quando histonas totais em gel de poliacrilamida são coradas com coomassie brilliant blue (CBB). Neste caso, H₁ de eritrócito apresentou características metacromáticas, fato já conhecido para H₁ de timo (DUHAMEL et al, 1980) e colágeno (Mc CORMICK et al, 1979). É preciso considerar também que em H₁, presença de prolina conferiria uma certa rigidez à molécula, por inibição da rotação de N-C^α, o que poderia favorecer um certo estaqueamento das moléculas de CBB (DUHAMEL et al, 1980) e aparecimento do fenômeno de metacromasia.

Apesar das semelhanças já conhecidas para H₅ e H₁ (BRASCH, 1976; SELIGY et alii, 1976; YAGUCHI et al, 1977), H₅ se comportou diferentemente, ao exibir coloração ortocromática quando corada por CBB. A explicação para isto pode ser encontrada na própria diferença de composição de prolina, entre H₅ e H₁. Para fins comparativos tomemos o exemplo de H₁ de timo de coelho que apresenta 17,5% de prolina na região N-terminal e 15,7% na região C-terminal, enquanto H₅ de frango apresenta 14,8% de prolina na região N-terminal e 11,1% na região C-terminal (YAGUCHI et al, 1977). Comparando-se estes dados, pode-se pensar em uma maior flexibilidade na molécula de H₅, o que dificultaria um estaqueamento das moléculas de CBB, flexibilidade esta, que facilitaria uma interação ordenada de moléculas de H₅ com DNA. É importante salientar que o CBB utilizado foi o R-250 e não o G-250, cujo efeito metacromático é geral para todas as proteínas (BRADFORD, 1976).

As nossas observações ao microscópio de polarização, de complexos de FRH₅-DNA em diferentes concentrações de NaCl, mostraram que há formação de FRH₅-DNA em NaCl 0,7M, concentração em que normalmente ocorre dissociação de H₅H₁ da cromatina (WILHELM et alii, 1970; BRASCH, 1976). Acreditamos que quando se trata de complexação de FRH₅ com DNA puro, tem-se uma interação mais forte, devido haver uma maior extensão da molécula de DNA com seus fosfatos livres para se ligar aos grupos NH₃⁺ de H₅ e H₁. No prosseguimento da diálise contra menores concentrações de NaCl, ficou claro que as fibras de DNP passam por uma conformação intermediária, apresentando morfologia pouco definida, em NaCl 0,25M, voltando a assumir um aspecto condensado em NaCl 0,1M, com suas fibras exibindo um diâmetro levemente superior (145Å) ao encontrado em NaCl 0,7M (130Å). As fibras de 130Å e 145Å indicam que o complexo FRH₅-DNA, assume níveis mais altos de compactação em NaCl 0,1M.

Na tentativa de entender a participação de H₅ em sua interação com DNA, apresentamos um modelo semelhante ao de BAZETT-JONES & OTTENSMEYER (1979), em que DNA está superespiralizado em torno da molécula de protamina. Nossa proposição é que FRH₅ serviria de um suporte para o DNA e orientaria uma superespiralização deste DNA em torno da molécula de H₅ (e H₁). Esta idéia está de acordo com nossos dados de dicroísmo (figura 12), que pressupõem uma distribuição das moléculas de azul de toluidina predominantemente na direção perpendicular ao eixo mais longo da fibra, o que é possível se considerarmos uma formação do complexo FRH₅-DNA da seguinte forma:



O argumento de que H₅ e H₁ são os únicos agentes capazes de promover a compactação da cromatina, é fortalecido pela capacidade que estas histonas têm, em contrair a molécula de DNA na ausência das demais histonas.

Não podemos afirmar que o que acontece nestes experimentos, ocorra da mesma forma em cromatina nativa, mas o estado compactado da fibra reconstituída de FRH₅-DNA dá idéia do papel destas histonas, principalmente H₅, em promover a compactação cromatínica e consequente inativação gênica, em eritrócitos maduros de aves. Acreditamos que as histonas H₅ (e H₁) devem interagir entre si, a fim de permitir a estabilização de uma estrutura compactada nos complexos FRH₅-DNA. No entanto é prematuro indicar o tipo desta interação; pode-se contudo, adiantar que é pouco provável que interações do tipo hidrofóbicas sejam essenciais para isto, com base no trabalho de BRADBURY e colaboradores (1975), em que desnaturação da região globular de H₁ não mostrou diferenças tanto nos espectros de NMR como também no estado de contração da cromatina.

O exame ao microscópio eletrônico de núcleos tratados com NaCl 0,7M, permitiu visualizar o que foi mostrado através de dicroísmo e birrefringência. Os fios de DNP se estendendo para fora do núcleo dão uma demonstração clara de que com a saída de H_5 (e H_1) ocorreu uma descompactação da cromatina, que revelou fios de aproximadamente $17\text{\AA}$, fibras com $120\text{\AA}$ e agregados de DNP fortemente eletrodensos. Este quadro mostra o caráter heterogêneo do material cromatínico, indicando que em algumas regiões é provável que a extração de histonas H_5 e H_1 seja mais difícil. Pode-se supor que esta maior resistência à extração de H_5 e H_1 , seja devido à estas moléculas estarem fosforiladas em seus resíduos serina, a exemplo do que ocorre em H_1 no momento próximo à divisão celular (BRADBURY et al, 1974). Segundo este autor, a fosforilação de H_1 permitiria a interação entre as várias moléculas de H_1 , condensando os fios de cromatina.

Ao lado destas observações que mostram material muito condensado em determinadas regiões, é atraente o fato de fios de DNP, visivelmente distintos em algumas regiões, estarem fortemente associados formando fibras com diâmetros variáveis acima de $100\text{\AA}$. Este fato já observado por BRASCH (1976), é atribuído por este às interações entre radicais livres das histonas remanescentes. Esta possibilidade também pode ser considerada aqui, mas também é válido que se considere a possível interação entre as próprias moléculas de H_5 (e H_1), que estão alinhadas ao longo dos fios de DNP.

Muitas moléculas de H_5 (e H_1) poderiam ainda estar de algum modo ligadas parcialmente ao DNA ou outras histonas, o que facilitaria a aproximação de fibrilas.

As interações entre moléculas de H_5 poderiam ocorrer através de suas regiões globulares de forma semelhante ao que ocorre entre moléculas de H_1 (BRADBURY et al, 1974) ou por interações entre regiões de extremidade C-terminal de uma molécula de H_5 com regiões de extremidade N-terminal de outra molécula. Esta última hipótese é discutida por WORCELL (1977) para explicar a participação de H_1 na formação de fibras de 200-300Å. A ausência de estrutura nucleossômica nestes preparados tem dupla justificativa: 1. a extração de H_5 e H_1 por NaCl 0,7M é acompanhada de um enfraquecimento nas ligações eletrostáticas entre as outras histonas e DNA (BARTLEY & CHALKLEY, 1973), o que desestabilizaria a estrutura nucleossômica; 2. o tratamento com NaCl 0,7M extrai outras histonas além de H_5 e H_1 .

V. CONCLUSÕES

1. Existe uma grande variabilidade nos resultados de extração da fração rica em histona H_5 , com os métodos empregados nesta pesquisa. O processo que permite uma repetitividade com resultado uniforme e com mínimo de histonas contaminantes é o que usa NaCl 0,15M-HCl pH 1,85.
2. O comportamento do material cromatínico de núcleos tratados com NaCl 0,7M e trazidos a NaCl 0,1M por diálise, sugere que o material cromatínico possa sofrer uma extrusão para fora do núcleo e retornar para o seu interior, o que estaria de acordo com um caráter estrutural dinâmico da cromatina.
3. As diferentes interações entre as moléculas de H_5 de eritrócito e H_1 de timo, com naphthol yellow e coomassie brilliant blue, bem como os dados de absorciometria e fluorescência sugerem um estereorranjamento diferente para estas duas histonas.
4. As moléculas de H_5 (e H_1) apresentam um aspecto alongado e se dispõem de maneira orientada em relação aos filamentos de desoxirribonucleoproteína.
5. A fração rica em histona H_5 apresenta alta capacidade de agregar ordenadamente as moléculas de DNA.

VI. RESUMO

Neste trabalho foram considerados alguns aspectos estruturais da fração rica em histona H₅ (FRH₅) bem como a sua participação na estrutura da cromatina. Para isto foram empregados núcleos de eritrócitos de frango, dos quais se extraiu FRH₅. Os métodos, tais como os processos extrativos, espectrofotometria de absorção, fluorometria, complexação com corantes, estudos de anisotropia e eletroforese, permitiram determinar algumas características intrínsecas da FRH₅, bem como diferenças em relação a histona H₁ de timo de bezerro. Com a mesma finalidade, foram feitas observações ao microscópio de polarização do material nuclear tratado com NaCl 0,7M, e corado com azul de toluidina e sirius red. Ao microscópio eletrônico foram observados tanto complexos FRH₅-DNA como material nuclear em NaCl 0,7M.

As extrações levadas a efeito usando ácido perclórico 5%, NaCl 0,7M e NaCl 0,15M-HCl pH 1,85, mostraram que este último apresenta uma maior preferência para extrair FRH₅ do que os demais. As curvas espectrais de absorção de FRH₅ e de H₁ de timo em meios ácido e alcalino, não mostraram diferenças nos seus perfis. No entanto, foi relevante o fato de que estas histonas quando desnaturadas em meio básico apresentaram hipercromasia em relação às nativas, ocorrendo o inverso quando em meio ácido. As curvas espectrais de fluorescência de soluções de FRH₅ e H₁ de timo mostraram que a fluorescência de FRH₅ é

mais intensa do que a de H_1 e que a de FRH_5 quando desnaturada é sensivelmente diminuída em relação àquela exibida no estado nativo. Nenhuma diferença relevante foi observada nos perfis destas curvas.

As fluorescências exibidas por FRH_5 -ANS e H_1 (timo)-ANS demonstraram que a região hidrofóbica em H_5 pode ser menor do que a correspondente em H_1 e que ambas, pelo menos em suas regiões globulares, apresentam-se estáveis quando submetidas à forças de tensão.

As observações ao microscópio de polarização, de cromatina de núcleos tratados com NaCl 0,7M, dão idéia da orientação das moléculas de H_5 (e H_1) em relação aos filamentos de DNP, e sugerem um caráter dinâmico para dissociação e reassociação da molécula de H_5 (e H_1) em cromatina nativa. Estes mesmos dados sugerem um aspecto alongado para moléculas de H_5 . O estereoarranjamento de H_5 e H_1 é discutido com base no comportamento diferente destas proteínas quando coradas por naphthol yellow e coomassie brilliant blue, concluindo-se por diferenças significativas entre estereoarranjamento de H_5 e H_1 .

O resultado da reassociação de FRH_5 com DNA, observado ao microscópio eletrônico, revelou a alta capacidade que FRH_5 tem em agregar as moléculas de DNA.

O tratamento de núcleos de eritrócitos com NaCl 0,7M, ocasionou descompactação da cromatina, que no entanto não se deu de maneira uniforme, sugerindo presença de regiões menos sensíveis à extração, provavelmente devido algumas moléculas de H_5 (e H_1) estarem fosforiladas.

VII. ABSTRACT

This thesis deals with structural aspects of an H₅ histone rich fraction (H₅RF), as well as its importance in the chromatin structure. H₅RF was extracted from chicken erythrocyte nuclei. Some intrinsic characteristics of H₅RF a few differentiating qualities in relation to the H₁ histone of the calf thymus were determined by the following methods: an extractive process; absorption espectrophotometry; fluorometry; dye binding as measured by anisotropy and electrophoresis. These were complemented by observations, carried out with the polarization microscope, of chromatin treated with 0,7 NaCl, and stained with toluidine blue or sirius red. H₅RF-DNA complexes and nuclear material in 0,7M NaCl were studied with the electron microscope.

Extraction were made using 5% perchloric acid, 0,7M NaCl and 0,15M NaCl at pH 1,85. This last solution was shown to extract H₅RF preferencially. No differences were detected in the spectral absorption profiles of H₅RF and calf thymus H₁ in acid or in alkaline medium. Its is remarkable, however, that the histones, when denatured in a basic medium, were hyperchromic in relation to these some proteins in their native state. In acid medium, the opposite occurred.

Fluorescence spectral curves of H₅RF and calf thymus H₁ solutions indicated a more intense fluorescence for H₅RF than for H₁. The fluorescence of denatured H₅RF was

markedly diminished in relation to that in the native condition. No important difference was noted in their spectral absorption profiles.

The fluorescence encountered for H₅RF-ANS and thymus H₁-ANS suggested that the hydrophobic region of H₅ may be smaller than the corresponding region in H₁, and both are stable, at least in their globular region, when placed under tension.

Polarization microscopy of the chromatin of nuclei treated with 0,7M NaCl indicated the orientation of the molecules of H₅ (and H₁) in relation to DNP filaments, and suggested a dynamic dissociation and re-association of the molecule of H₅ (and H₁) in native chromatin. This method also permitted the supposition of an elongated structure for the H₅ molecules.

The divergent behaviour of H₅ and H₁, when stained with naphthol yellow and coomassie brilliant blue, revealed significant differences in the stereo-arrangement of these two histones.

The result of the reassociation of H₅RF with DNA, observed with the electron microscope, demonstrated the extraordinary capacity of H₅RF to aggregate molecules of DNA.

Treatment of erythrocyte nuclei with 0,7M NaCl caused a loosening of the compact chromatin. However, this effect did not occur uniformly, which may indicate a region less sensitive to extraction, possibly due to the phosphorylation of some molecules of H₅ (and H₁).

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUELO, J. G. & MOORE, D. E. The human chromosome. Electron microscopic observations on chromatin fiber organization. J. Cell Biol., 41: 73-90, 1969.
- ALFERT, M. & GESCHWIND, J. A selective staining method for the basic proteins of cell nuclei. Proc. natn. Acad. Sci., 39 (10): 991-9, 1953.
- ALLFREY, V. G.; LITTAU, V. C. & MIRSKY, A. E. On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. Proc. natn. Acad. Sci., 49 (3): 414-21, 1963.
- ALLAN, J.; HARTMAN, P. G.; CRANE-ROBINSON, C. & AVILES, F. X.. The structure of histone H₁ and its location in chromatin. Nature, 288: 675:9, 1980.
- _____ ; COWLING, G. J.; HARBORNE, N.; CATTINI, P.; CRAIGIE, R. & GOULD, H. Regulation of the higher-order structure of chromatin by histones H₁ and H₅. J. Cell Biol., 90: 279-88, 1981.
- AVILES, F. J.; CHAPMAN, G. E.; KNEALE, G. G.; CRANE-ROBINSON, C. & BRADBURY, E. M. The conformation of histone H₅. Isolation and characterisation of the globular segment. Eur. J. Biochem., 88: 363-71, 1978.

- _____; DANBY, S. E.; CHAPMAN, G. E.; CRANE-ROBINSON, C. & BRADBURY, E. M. The conformation of histone H₅ bound to DNA. Maintenance of the globular structure after binding. Biochim. biophys. Acta, 578: 290-6, 1979.
- BARNICOT, N. A. A study of newt mitotic chromosomes by negative staining. J. Cell Biol., 32: 585-603, 1967.
- BARTLEY, J. & CHALKLEY, R. An approach to the structures of native nucleohistone. Biochemistry, 12 (3): 468-74, 1973.
- BAZETT-JONES, D. P. & OTTENSMEYER, F. P. A model for the structure of nucleoprotamine. J. Ultrastruct. Res., 67: 255-66, 1979.
- BILLET, M. A. & BARRY, J. M. Role of histones in chromatin condensation. Eur. J. Biochem., 49: 477-84, 1974.
- BINA-STEIN, M.; VOGEL, T.; SINGER, D. S. & SINGER, M. F. H₅ histone and DNA - relaxing enzyme of chicken erythrocytes. Interaction with superhelical DNA. J. biol. Chem., 251 (23): 7363-66, 1976.
- BÖHM, L.; HAYASHI, H. ; CARY, P. D.; MOSS, T.; CRANE-ROBINSON, C. & BRADBURY, E. M. Sites of histone/histone interaction in the H₃.H₄ complex. Eur. J. Biochem., 77: 487-93, 1977.
- BOLUND, L. & JOHNS, E. W. Chick-erythrocyte chromatin as a template for RNA synthesis in vitro. Eur. J. Biochem., 40: 591-98, 1973.

- BONNER, J.; CHALKLEY, R.; DAHMUS, M.; FAMBROUGH, D.; FUJIMURA, F.; HUANG, R. C.; HUBERMAN, J.; JENSEN, R.; MARUSHIGE, K., OHLENBUSCH, H., OLIVERA, B. & WIDHOLM, J. Isolation and characterization of chromosomal nucleoproteins. Meth. Enzym., 12B: 3-97, 1968.
- BRADBURY, E. M.; CARPENTER, B. G. & RATTLE, H. W. E. Magnetic resonance studies of deoxyribonucleoprotein. Nature, 241: 123-6, 1973.
- _____; INGLIS, R. J. & MATHEWS, H. R. Control of cell division by very-lysine-rich histone (F₁) phosphorylation. Nature, 247: 257-61, 1974.
- _____; DANBY, S. E.; RATTLE, H. W. & GIANCOTTI, V. Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H₁ (F₁) in eukaryote chromatin. Histone H₁ in chromatin and in H₁-DNA complexes. Eur. J. Biochem., 57: 97-105, 1975.
- _____; MOSS, T.; HAYASHI, H.; HJELM, R. P., SUAUA, P.; STEPHENS, R. M.; BALDWIN, J. & CRANE-ROBINSON, C. Histone interactions and the role of histones H₃ and H₄. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 277-86, 1977.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., 72: 248-54, 1976.

- BRASCH, K.; SETTERFIELD, G. & NEELIN, J. M. Effects of sequential extraction of histone proteins on structural organization of avian erythrocyte and liver nuclei. Expl Cell Res., 74: 27-41, 1972.
- _____; ADAMS, G. H. M. & NEELIN, J. M. Evidence for erythrocyte-specific histone modification and structural changes in chromatin during goose erythrocyte maturation. J. Cell Sci., 15: 659-77, 1974.
- _____. Studies on the role of histones H₁ (f₁) and H₅(f_{2c}) in chromatin structure. Expl Cell Res., 101: 369-410, 1976.
- CHAPMAN, G. E.; HARTMAN, P. G. & BRADBURY, E. M. Studies on the role and mode of operation of the very-rich histone H₁ in eukaryote chromatin. The isolation of the globular and non-globular regions of the histone H₁ molecule. Eur. J. Biochem., 61: 69-75, 1976.
- CONN, H. J. Biological Stains; a handbook of the nature and uses of the dyes employed in the biological laboratory. Baltimore, Williams & Wilkins, 1969, p. 498.
- CRUICKSHANK, H. M. & WALKER, I. O. Cell-cycle-dependent dissociation of histone H₁ from chromatin in nuclei of P. Polycephalum. Nucleic Acids Res., 9 (15): 3873-85, 1981.
- DAVIDSON, P. F. & BUTLER, J. A. The chemical composition of calf thymus nucleoprotein. Biochim. biophys. Acta, 21: 568-73, 1956.

DAVIES, H. G. & SPENCER, M. The variation in the structure of erythrocyte nuclei with fixation. J. Cell Biol., 14: 445-58, 1962.

DEITCH, A. D. Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye, naphthol yellow S, by tissue sections and by purified proteins. Lab. Invest., 4 (5): 324-51, 1955.

DeLANGE, R. J. & SMITH, E. L. Histones: structure and function. A. Rev. Biochem., 40: 279-314, 1971.

_____; WILLIAMS, L. C. & MARTINSON, H. G. Identification of interacting aminoacids of the histone 2A-2B binding site. Biochemistry, 18: 1942-6, 1979.

DUHAMEL, R. C.; MEEZAN, E. & BRENDDEL, K. Metachromatic staining with coomassie brilliant blue R-250 of the proline-rich, calf thymus histone H₁. Biochim. biophys. Acta, 626: 432-42, 1980.

DUPRAW, E. J. The organization of nuclei and chromosomes in honeybee embryonic cells. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 53: 161-8, 1955a.

_____. The organization of honey bee embryonic cells. I. Microtubules and amoeboid activity. Develop. Biol., 12: 53-71, 1965b.

_____. Macromolecular organization of nuclei and chromosomes: a folded fibre model based on whole-mount electron microscopy. Nature, 206: 338-343, 1965c.

_____. Organization of genetic material in eukaryotic chromosomes. In: _____. Cell and Molecular Biology. New York, Academic, 1970a, p. 514-589.

- _____. Ultrastructure of interphase nuclei. In: DNA and chromosomes. New York, Holt, Rinehart and Winston, 1970b, p. 172-185.
- EDWARD, L. J. & HNILICA, L. S. The specificity of histones in nucleated erythrocytes. Experientia, 24: 228-9, 1968.
- ELGIN, S. C. R. & WEINTRAUB, H. Chromosomal proteins and chromatin structure. A. Rev. Biochem., 44: 725-74, 1975.
- FELSENFELD, G. Chromatin. Nature, 271: 115-22, 1978.
- FINCH, J. T.; NOLL, M. & KORNBERG, R. D. Electron microscopy of defined lengths of chromatin. Proc. natn. Acad. Sci. U. S.A., 72 (9): 3320-2, 1975.
- _____. & KLUG, A. Solenoid model for superstructure in chromatin. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 73: 1897-901, 1976.
- _____; LUTTER, I. C.; RHODES, D.; BROWN, R. S.; RUSHTON, B.; LEVITT, M. & KLUG, A. Structure of nucleosome core particles of chromatin. Nature, 269: 29-36, 1977.
- GALL, J. G. Chromosome fibers from an interphase nucleus. Science, 139: 120-1, 1963.
- GASARYAN, K. G. & ANDREEVA, N. B. Changes in the template activity of chromatin from pigeon erythrocytes and erythroblasts induced by partial salt deproteinization. FEBS Lett., 27: 263-6, 1972.
- GREENAWAY, P. J. Studies on the primary structure of chicken erythrocyte histone fraction V. Biochem. J., 124: 319-25, 1971.

- _____. & MURRAY, K. Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte histone fraction V. Nature new biol., 229: 233-8, 1971.
- GRIFFITH, J. D. Chromatin structure: deduced from a minichromosome. Science, 187: 1202-3, 1975.
- HARTMAN, P. G.; CHAPMAN, G. E.; MOST, T. & BRADBURY, E. M. 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, 1977.
- HJELM, R. P.; KNEALE, G. G.; SUAUE, P.; BALDWIN, J. P. & BRADBURY, E. M. Small angle neutron scattering studies of chromatin subunits in solution. Cell, 10: 139-51, 1977.
- ISENBERG, I. Protein-protein interactions of histones. In: BUSCH, H., ed. The cell nucleus. New York, Academic, 1978, v. 4, p. 135-154.
- _____. Histones. A. Rev. Biochem., 48: 159-91, 1979.
- JOHNS, E. W. Studies on histones. 7. Preparative methods for histone fractions from calf thymus. Biochem. J., 92: 55-9, 1964.
- KORNBERG, R. D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science, 184: 868-71, 1974.
- _____. & THOMAS, J. O. Chromatin structure: oligomers of the histones. Science, 184: 865-8, 1974.

- _____. & KLUG, A. The nucleosome. Scient. Am., 244 (2): 52-79, 1981.
- LAURENCE, D. J. R. Interactions of calf-thymus histone fractions in aqueous solution with 8-anilinonaphtalene-1-sulfonic acid. Biochem. J., 99: 419-26, 1966.
- LEVITT, M. How many base pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin? Some theoretical calculations. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 75 (2): 640-4, 1978.
- LITTAU, V. C.; BURDICK, C. J.; ALLFREY, V. G. & MIRSKEY, A. E. The role of histones in the maintenance of chromatin structure. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 54: 1024-12, 1965.
- LUTTER, L. C. Characterization of DNase-I cleavage sites in the nucleosome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 137-47, 1977.
- _____. Precise location of DNase I cutting sites in the nucleosome core determined by high resolution gel electrophoresis. Nucleic Acids Res., 6 (1): 41-56, 1979.
- _____. DNase II digestion of the nucleosome core: precise locations and relative exposures of sites. Nucleic Acids Res., 9 (17): 4251-65, 1981.
- MAREKOV, L. N.; ANGELOV, G. & BELTCHEV, B. Studies on the preferential binding of histone H₁ to AT-rich DNA. Biochimie, 60: 1347-9, 1978.

MARTINSON, H. G.; TRUE, R.; LAU, C. K. & MEHRABIAN, M. Histone-histone interactions within chromatin. Preliminary location of multiple contact sites between histones 2A, 2B and 4. Biochemistry, 18: 1075-82, 1979.

MCCORMICK, P. J.; CHANDRASEKHAR, S. & MILLIS, A. J. T. Direct visualization of collagen and procollagen in polyacrylamide gels. Analyt. Biochem., 97: 359-66, 1979.

MCGHEE, J. D. & FELSENFELD, G. Nucleosome structure. A. Rev. Biochem., 49: 1115-56, 1980.

MELLO, M. L.S. & VIDAL, B. C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, *Staurorhectus longicornis* Giglio-Toss. Adv. Invertebr. Reprod., 1: 75-83, 1977.

MIKI, B. L. A. & NEELIN, J. M. The histones of rainbow trout erythrocytes include an erythrocyte-specific histone. Can. J. Biochem., 53: 1158-69, 1975.

MIRZABEKOV, A. D.; SHICK, V. V.; BELYAVSKY, A. V.; KARPOV, V. L. & BAVYKIN, S. G. The structure of nucleosomes: the arrangement of histones in the DNA grooves and along the DNA chain. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 149-55, 1977.

_____; SHICK, V. V.; BELEJAVSKY, A. & BAVYKIN, S. G. Primary organization of nucleosome core particle of chromatin: sequence of histone arrangement along DNA. Proc. natn.Acad. Sci. U.S.A., 75: 4184-8, 1978.

- MISSMAHL, H. P. Birefringence and dichroism of dyes and their significance in the detection of oriented structures. In: WIED G. L. ed. Introduction to quantitative cytochemistry. New York, Academic, 1966, p. 539-547.
- MIURA, A. & OHBA, Y. Structure of nucleohistone. III. Interaction with toluidine blue. Biochim. biophys. Acta, 145: 436-45, 1967.
- MOSS, T., CARY, P. D.; ABERCROMBIE, B. D.; CRANE-ROBINSON, C. & BRADBURY, E. M. A pH-dependent interaction between histone H_{2a} and H_{2b} involving secondary and tertiary folding. Eur. J. Biochem., 71: 337-50, 1976.
- MÜLLER, U.; ZENTGRAF, H.; EICKEN, I. & KELLER, W. Higher order structure of simian virus chromatin. Science, 201: 406-15, 1978.
- MURRAY, K.; VIDALI, G. & NEELIN, J. M. The stepwise removal of histones from chicken erythrocyte nucleoprotein. Biochem. J., 107: 207-15, 1968.
- NEELIN, J. M. Variability in cell-specific and common histones of avian erythrocytes. Can.J. Biochem., 46: 241-7, 1968.
- NOLL, M. Internal structure of the chromatin subunit. Nucleic Acids Res., 1 (11): 1573-8, 1974.
- _____. DNA folding in the nucleosome. J. molec. Biol., 116: 49-71, 1977.

OHLENBUSCH, H. H.; OLIVERA, B. M.; TUAN, D. & DAVIDSON, N. Selective dissociation of histones from calf thymus nucleoprotein. J. molec. Biol., 25: 299-315, 1967.

OLINS, A. L. & OLINS, D. E. Spheroid chromatin units (v bodies). Science, 183: 330-1, 1974.

_____; CARLSON, R. D.; WRIGHT, E. B. & OLINS, D. E. Chromatin v bodies: isolation, subfraction and physical characterization. Nucleic Acids Res., 3 (12): 3271-91, 1976.

OUDET, P.; GROSS-BELLARD, M. & CHAMBON, P. Electron microscopy and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit. Cell, 4: 281-300, 1975.

PANYIM, S. & CHALKLEY, R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones. Archs Biochem. biophys., 130: 337-46, 1969a.

_____ & _____. A new histone found only in mammalian tissues with little cell division. Biochem. biophys. Res. Commun., 37: 1042-9, 1969b.

_____; BILEK, D. & CHALKLEY, R. An eletrophoretic comparison of vertebrate histones. J. biol. Chem., 246 (13): 4206-15, 1971.

PARDON, J. F.; WORCESTER, D. L.; WOOLEY, J. C.; TATCHELL, K., Van HOLDE, K. E. & RICHARDS, B. M. Low angle neutron scattering from chromatin subunit particles. Nucleic Acids Res., 2: 2163-76, 1975.

- _____ ; _____ ; _____ ; COTTER, R. I.; LILLEY, D. M. J. & RICHARDS, B. M. The structure of the chromatin core particle in solution. Nucleic Acids Res., 4: 3199-214, 1977.
- PEHRSON, J. & COLE, R. D. Histone H₁0 accumulates in growth-inhibited cultured cells. Nature, 285: 43-4, 1980.
- PENZER, G. R. 1-anilinonaphtalene-8-sulfonate. The dependence of emission spectra on molecular conformation studied by fluorescence and proton-magnetic resonance. Eur. J. Biochem., 25: 218-28, 1972.
- RENZ, M. & DAY, L. Transition from noncooperative to cooperative and selective binding of histone H₁ to DNA. Biochemistry, 15 (15): 3220-8, 1976.
- _____ ; NEHLS, P. & HOZIER, J. Involvement of histone H₁ in the organization of the chromosome fiber. Proc natn. Acad. Sci. U.S.A., 74 (5): 1879-83, 1977.
- RIS, H. A study of chromosomes with the electron microscope. J. biophys. biochem. Cytol., 2 (4). 385-92, 1956.
- _____ & CHANDLER, B. L. The ultrastructure of genetic systems in prokaryotes and eukaryotes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 18: 1-8, 1963.
- _____. Chromosomes and genes. Fine structure of chromosomes. Proc. R. Soc., B164: 246-57, 1966.
- ROMHANYI, G. Submicroscopic structure of interphase nuclei as revealed by topo-optical staining reactions. Acta morph. hung., 15: 131-45, 1967.

SAUTIERE, P.; BRIAND, G.; KMIÉCIK, D.; LOY, O. & BISERTE, G.

Chicken erythrocyte histone H₅. III. Sequence of the amino-terminal half of the molecule (III residues). FEBS Lett., 63 (1): 164-6, 1976.

SELIGY, V. L. & NEELIN, J. M. Transcription properties of step wise acid-extracted chicken erythrocyte chromatin. Biochim. biophys. Acta, 213: 380-90, 1970.

_____ & _____. Phosphorylation of histones in normal goose erythrocytes. Can. J. Biochem., 49 (6): 1062-70, 1971.

_____ & _____. Phosphorylation of histones in avian erythroblasts. Can. J. Biochem., 51: 1316-24, 1973.

_____ & LURQUIN, P. F. Relationship between dye binding and template activity of isolated avian chromatin. Nature, new biol., 243 (122): 20-1, 1973.

_____ & MIYAGI, M. Comparison of template-property changes after salt extraction of avian erythrocyte and liver chromatin. Eur. J. Biochem., 46: 259-69, 1974.

_____; ROY, C.; DOVE, M. & YAGUCHI, M. Species variability of N-terminal sequence of avian erythrocyte-specific histone H₅. Biochem. biophys. Res. Commun., 71 (1): 196-202, 1976.

SHICK, V. V.; BELYAVSKY, A. V.; BAVYKIN, S. G. & MIRZABEKOV, A. D. Primary organization of the nucleosome core particles. Sequential arrangement of histones along DNA. J. mol. Biol., 139: 491-517, 1980.

SIMPSON, R. T. & WHITLOCK, J. P. Mapping DNase I-susceptible sites in nucleosomes labeled at the 5' ends. Cell, 9: 347-53, 1976.

_____. Protein kinase in HeLa nucleosomes: a reevaluation of the interaction of histones with the ends of core particles DNA. Nucleic Acids Res., 5: 1109-19, 1978.

SINCLAIR, G. D. & BRASCH, K. The nucleated erythrocyte: a model of cell differentiation. Rev. Can. Biol., 34 (4): 287-303, 1975.

SINGER, D. S. & SINGER, M. F. Studies on the interaction of H₁ histone with superhelical DNA: Characterization of the recognition and binding regions of H₁ histone. Nucleic Acids Res., 3 (10): 2531-47, 1976.

SMITH, B. J.; WALKER, J. M. & JOHNS, E. W. Structural homology between mammalian H₁₀ subfraction and avian erythrocyte-specific histone H₅. FEBS Lett., 112 (1): 42 - 4, 1980.

SPERLING, R. & WACHTEL, E. J. The histones. Adv. Protein Chem., 34: 1-60, 1981.

SPONAR, J. & SORMOVÁ, Z. Complexes of histone F₁ with DNA in 0,15M NaCl. Eur. J. Biochem., 29: 99-103, 1972.

STEIN, G. S.; STEIN, J. S. & KLEINSMITH, L. J. Chromosomal proteins and gene regulation. Scient. Am., 232 (2): 47-57, 1975.

- SUAU, P.; KNEALE, G. G.; BRADDOCK, G. W.; BADWIN, J. P. & BRAD
BURY, E. M. A low resolution model for the chromatin core
particle by neutron scattering. Nucleic Acids Res., 4:
3769- 86, 1977.
- SUSSMAN, J. L. & TRIFONOV, E. N. Possibility of nonkinked
packing of DNA in chromatin. Proc. natn. Acad. Sci.U.S.A.,
75: 103-7, 1978.
- TAYLOR, S. R. & COOK, R. T. Heparin causes a redistribution
of chromosomal proteins. FEBS Lett., 78 (2): 321-5 ,
1977.
- THOMA, F. & KOLLER, Th. Influence of histone H₁ on chromatin
structure. Cell, 12: 101-7, 1977.
- _____; _____ & KLUG, A. Involvement of histone H₁ in the
organization of the nucleosome and of the salt dependent su-
perstructures of chromatin. J. Cell Biol., 83: 403-27, 1979.
- TOBIN, R. S. & SELIGY, V. L. Characterization of chromatin-
bound erythrocyte histone V (f_{2c}). J. biol. Chem., 250 (2):
358-64, 1975.
- VIDAL, B. C. Anormal dispersion of birefringence linear di-
chroism and relationships with ORD (Extrinsic Cotton Effect).
Histochemie, 30: 102-7, 1972.
- _____. The effect of clupein on anisotropy and basophilia
of polytene chromosomes. Histochemistry, 60: 309-16, 1979.

- _____ ; MELLO, M. L. S. & PIMENTEL, E. R. Polarization microscopy and microspectrophotometry of sirius red, picrosirius and chlorantine fast red aggregates and of their complexes with collagen. Histochem. J., 14; 857-78, 1982.
- VOGEL, T. & SINGER, M. F. The effect of superhelicity on the interaction of histone f_1 with closed circular duplex DNA. J. biol. Chem., 251 (8): 2334-8, 1976.
- Von HOLT, C.; STRICKLAND, W. N.; BRANDT, W. F. & STRICKLAND, M. S. More histone structures. FEBS Lett., 100: 201-18, 1979.
- WEISCHET, W. O.; ALLEN, J. R.; RIEDEL, G. & Van HOLDE, K. E. The effects of salt concentration and H_1 -depletion on the digestion of calf thymus chromatin by microccal nuclease. Nucleic Acids Res., 6 (5): 1843-62, 1979.
- WILHELM, F. X.; CHAMPAGNE, M. H. & DAUNE, M. P. Conformation du DNA dans la nucleoprotéine. Eur. J. Biochem., 15: 321-30, 1970.
- WILLIAMS, A. F. DNA synthesis in purified populations of avian erythroid cells. J. Cell Sci., 10: 27-46, 1971.
- WILLIAMS, R. E.; LURQUIN, P. F. & SELIGY, V. L. Circular dichroism of avian-erythrocyte chromatin and ethidium bromide bound to chromatin. Eur. J. Biochem., 29: 426-32, 1972.
- _____ & SELIGY, V. L. Avian erythrocyte histones: salt induced conformational changes in the erythrocyte-specific histone V (f_{2c}). FEBS Lett., 33 (2): 197-200, 1973.

WOODCOCK, C. L. F. & FRADO, L. L. Y. Ultrastructure of chromatin subunits during unfolding, histone depletion and reconstitution. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 43-56, 1977.

WORCEL, K. Molecular architecture of the chromatin fiber. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 42: 313-23, 1977.

YAGUCHI, M.; ROY, C.; DOUE, M. & SELIGY, V. Aminoacid sequence homologies between H₁ and H₅ histones. Biochem. biophys. Res. Commun., 76 (1): 100-6, 1977.