مجلهٔ علوم دانشگاه تهران جلد ۱۷ شماره های ۱ و ۲ سال ۱۳۶۷ از صفحهٔ ۳۱ تا ۳۷

میان کنش پروتئین‌های غیر هیستونی HMG با یکدیگر و با هیستونها

دکتر عذرا ربانی چادگانی

مرکز تحقیقات بیوشیمی-بیوفیزیک دانشگاه تهران

صندوق پستی ۱۳۸۴ــ۱۳۱۴۵

چکیده

اتصال احتمالی پروتئین های غیر هیستونی کروماتین از نوع HMG به یکدیگر و به هیستونها بااستفاده از ترکیباتی که دوگروه فعال دارند مانند دی متیل سوبریمیدیت در کروماتین و در سلول مطالعه شده است. الکتروفورز نمونه های میان کنش کرده و شاهد برروی ژل اسید- اوره و SDS طرح پیچیده‌ای را نشان میدهد که آنالیز آنها بسیار مشکل است. بمنظور ساده نمودن آزمایش ابتدا پروتئین های HMG بوسیله سولفات آمونیم رسوب داده شدند سپس عمل میان کنش بر روی آن انجام شد. نتایج نشان میدهد که این پروتئین ها توانائی ایجاد تجمع خودبخودی را مانند آنچه که در هیستونها مشاهده شده است ندارند ولیکن قادرند به‌سایر پروتئین های کروماتین (هیستونها) متصل شوند. مطالعه میان کنش این پروتئین ها با - هیستونها درمحلول دلالت براین دارد که HMG1 و HMG2 با هیستون H1 و HMG2 بادایمر H2A - H2B کمپلکس تشکیل داده و ترکیباتی باوزن ملکولی بالا (D ۶۰۰۰۰) را میدهند HMG17 با هیچیک از پروتئین های هیستونی میان کنش نشان نمیدهد. نتایج حاصل نقش احتمالی و محل اتصال پروتئین های HMG خصوصاً HMG2 را در کروماتین مشخص میسازد .

J. of Science, Univ. of Tehran (1988) **17**, 31-37,

Cross linking of HMG nonhistone Proteins with each other and with histones

Dr. A. Rabbani Ch.

Institute of Biochmistry - Biophysics, University of Tehran

P. O. Box 13145-1384, Tehran - Iran

Abstract

The Possible association of High - Mobility - Group nonhistone chromosomal proteins with each other and with histones was studied in chromatin and in solution using bifunctional cross - linking reagent, dimethylsubrimidate (DMS). Electrophoretic analysis of cross - linked products on both acid - urea and SDS polyacrylamide gels showed a very complex pattern which was difficult to interpret. The experiment was simplified by fraction - ating the 0.35M NaCl extracted proteins by ammonium sulfate, then carring out the chemical crosslinking on these groups. The results showed that HMG proteins are not self aggregating proteins like, histones, but interact with other chromosomal proteins (histones). Cross-linkng of HMG proteins with histones in solution indicated that MHGl and 2 bind to histone

Hl and HMG2 interacts with dimer of H2A - H2B complex giving a high molecular weight bands (60, 000D), HMG17 failed to demonstrate any interaction with these proteins The results imply the possible role and binding site of HMG proteins in chromtin

مقدمه

کروماتین ترکیبی است نوکلئوپروتئینی که‌علاوه بر DNA[1] و پروتئین‌های قلیائی یا هیستون‌ها از یک سری پروتئین‌های غیر هیستونی نیز تشکیل شده است. تاکنون ۵ نوع هیستون از سلولها وبافتهای مختلف جدا سازی و مطالعه شده‌اند که شامل H2A, H1 H4, H3, H2B, میباشند (Johns, et al., 1975). پروتئین‌های هیستونی بسیار قلیائی بوده وبوسیله بارهای مثبت خود به بارهای منفی DNA[1] متصل‌میشوند(Bradbury, et al., 1981). از بین پروتئین‌های غیر هیستونی دسته‌ای که دقیقاً ازنظر ساختمانی مطالعه شده‌اند میتوان پروتئین‌های HMG[2] را نام برد. این پروتئین‌ها علاوه بر اسیدهای آمینه قلیائی غنی از اسیدهای آمینه اسیدی‌نیز میباشند این‌گروه به چهار پروتئین HMG1, HMG2, HMG14, HMG 17 جدا سازی و از نظر ساختمانی بدقت مطالعه شده‌اند . (Goodwin, 1983).

ترکیبات دو فعالیتی[3] (با دو گروه فعال) که بطور کووالان پروتئین‌ها را بهم متصل مینمایند برای مطالعه ترتیب و وضعیت قرارگرفتن پروتئین‌ها در ریبوزوم‌ها وآنزیم‌های الیگومری بطوروسیع استفاده شده‌اند (Carpenter & Harington, 1972 Sun, et al, 1974) از بین این ترکیبات دی متیل سوبریمیدیت DMS[4] که بطور اختصاصی باگروه‌های آمینوپروتئین‌ها واکنش کرده ومحصولات باثباتی را میدهد بیش ازهمه مورد توجه محققین قرار گرفته است (Davies & Stark, 1970). این ترکیب هیچگونه تغییری در ساختمانهای سوم و چهارم پروتئین ایجاد نمی‌نماید (Carpenter & Harington, 1972) . اولین بار DMS برای‌مطالعه موقعیت‌هیستون‌ها در ساختمان کروماتین بکاربرده شد (berg, 1975 (Kornberg, 1974; Thomas & Korn وبرمبنای آن مدلی برای کروماتین پیشنهاد گردید . در این مدل دو هیستون H4, H3 که غنی به اسید آمینه آرژنین میباشند بصورت تترامرو H2A, H2B که غنی از لیزین هستندبصورت دایمر بهم متصل شده ویک‌هسته مرکزی را میسازند. ملکول DMA ۲-۰ر۱ دور حول هسته مرکزی دور زده وساختمان خاصی بنام نوکلئوزوم[5] را میسازند که واحدهای ساختمانی کروماتین‌سلولی تشکیل‌میدهند (Koch, 1988; Kornberg, 1977). هیستون H1 دراین ساختمان نقشی ندارد لیکن در فشرده شدن کروماتین وایجاد ساختمانهائی درسطوح بالاتر شرکت مینماید (Bradbury, et al, 1981) با وجودیکه نقش هیستونهادر کروماتین بدقت‌مطالعه وجایگاه آنها مشخص شده است در مورد نقش احتمالی پروتئین های HMG اطلاعات بسیار ناقص است .

دراین مقاله‌میان کنش پروتئین های HMG بایکدیگر درمحلول ودرکروماتین وهم چنین اثرات متقابل این پروتئین‌ها باهیستونها بااستفاده از DMS مطالعه‌شده‌است. نتایج حاصل اطلاعاتی درمورد پروتئین‌ها خصوصاً پروتئین HMG2 درکروماتین بدست میدهد .

مواد و روش

مراحل تهیه پروتئین های هیستونی و غیر هیستونی و تهیه کروماتین در ۴°C انجام شد.

۱- تهیه‌کروماتین: هسته سلول با استفاده از روش هوئیش و بوگوین (Hewish β Burgoyne, 1973) از تیموس خرگوش تهیه شد. بافت تیموس درمحلول M ۰ر۳۴ سوکروز دربافر A برای مدت ۲ دقیقه هموژن گردید. بافرشامل ۱۵mM کلرورسدیم ۱۵mM ر۰. اسپرمین ۰ر۵ mM. اسپرمیدین ۶۰ mM کلرور پتاسیم ۱ر۰ mM. بافرتریس ۷ر۴=ph, ۲mM EDTA[6], ۵ر۰ mM EGTA[7] بود. هموژنا پس‌از صاف شدن از بین دولایه صافی‌بمدت ۲ دقیقه‌در ۱۲۰۰ g سانتریفوژ گردید(۴°C) رسوب حاصل در ۴ر۰M سوکروزدربافرA هموژن وبمدت ۴۵ دقیقه‌در ۷۵۰۰ g سانتریفوژ شد. رسوب‌نهائی در زیرمیکروسکوپ نوری با استفاده از رنگ متیلین‌بلو مطالعه ومشخص گردید که هسته‌ها کاملا سالم وخالص میباشند. رسوب هسته‌ها را دوبار با بافرA شسته ودر محلول M ۰ر۳۴ سوکروز در بافر A بحالت‌سوسپانسیون درآورده شد. به نمونه ۱mM کلرورکلیسم و سپس ۱۵ Unit/ml. آنزیم میکروکوکال نوکلئاز اضافه‌گردید. هضم آنزیمی بمدت ۳۰ ثانیه در ۳۷°C انجام شد. واکنش باوارد کردن‌ظرف نمونه‌در یخ واضافه کردن ۲mM EDTA متوقف‌گردید نمونه‌بمدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ g سانتریفوژ ورسوب‌حاصل در ۲mM ر۰. EDTAشسته‌شد. رسوب‌نهائی

1 - Deoxyribonucleic acid. 2 - High - Mobility - Group. 3 - Bifunctional

4 - Dimethylsubrimidate. 5 - Nucleosome. 6 - Ethylenediaminotetra acetic acid.

7 - Ethyleneglycol - bis, NN tetra acetic acid.

در بافر فسفات ۰٫۷ mM، pH=۸٫۵ یا بافرتری اتانول آمین بحالت سوسپانسیون درآورده شد. ۱۰۰ µl از نمونه برای اندازه‌گیری DNA برداشته شد وبقیه بدو قسمت کاملا مساوی تقسیم گردید.

۲- میان کنش پروتئین های HMG در کروماتین: DMS در غلظت ۲٫۰ mg/ml در بافرتری‌اتانول آمین یا بافرفسفات pH = ۸٫۵ همزمان با آزمایش تهیه‌شد. محلول حاصل درغلظت‌نهائی 1mg/ml به‌یکی از نمونه‌های کروماتین تهیه شده درفوق‌اضافه ونمونه دیگر بعنوان شاهد انتخاب‌گردید. واکنش در ۳۷°C یا ۲۳°C بمدت ۳ ساعت انجام شد. طی واکنش نمونه کاملا و بآرامی بهم زده میشد تا مخلوط گردد. پس از خاتمه واکنش کروماتین در ۲۰۰۰ g بمدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شد.

۳- استخراج پروتئین های HMG: پروتئین های HMG ازنمونه کروماتین با DMS وشاهد بوسیله ۰٫۳۵ M کلرورسدیم pH = ۷ استخراج شدند.

ناخالصی‌ها بوسیله ۲درصد اسیدتری کلرواستیک (TCA) رسوب داده شد وپروتئین های HMG با استن رسوب داده شدند. درمرحله دیگر محلول استخراج شده در ۰٫۳۵M کلرورسدیم با استفاده از سولفات آمونیوم بترتیب در غلظت‌های ۷۰٪، ۸۰٪ و ۹۰٪ جزء به جزء گردید. رسوبهای حاصل ومحلول سوپرنا تانت حاصل از رسوب دادن با ۹۰٪ سولفات آمونیوم در مقابل بافر فسفات pH=۸٫۵ دیالیز شده وسپس میان کنش با DMS انجام گردید.

۴- میان کنش پروتئین های HMG با هیستونها درمحلول: بدین منظور پروتئین های HMG با استفاده از روش Goodwin و همکارانش (Goodwin, et al, 1975) وهیستونها باروش Johns, ((Johns 1967) جدا سازی و خالص گردیدند. واکنش پروتئین های HMG با هیستونهادر نسبت‌های 3mg/ml٫ در بافر فسفات تهیه وDMSدر غلظت 1mg/ml به محلول ۳ اضافه گردید شرایط واکنش عینا مانند آنچه در مورد کروماتین ذکرگردید بود.

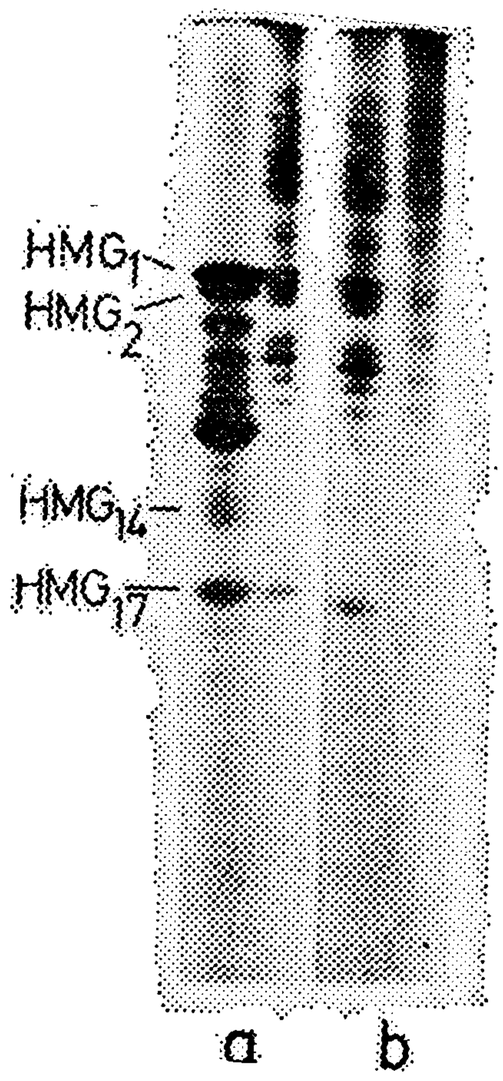
۵- ژل الکتروفوز: نمونه‌های حاصل از میان کنش پروتئین ها در کروماتین یا محلول و نمونه‌های شاهد بر روی ژل آکریلا مید ۱۵-۲۰ درصد اسیداوره (Johns, 1969) و ژلSDS (سدیم‌دودزیل سولفات) ۱۵ درصد (Lammeli, 1970) مطالعه شدند.

۶- سنجش پروتئین: میزان پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش Hatley, 1970 انجام شد.

۷- مقداد DNAنمونه‌ها بااستفاده از روش اسپکتروفتومتری‌با خواندن جذب نمونه‌ها در ۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

بررسی پروتئین های HMGحاصل از میان کنش این پروتئین ها در کروماتین برروی ژل آکریلامید از نوع اسید- اوره در شکل ۱ نشان داده شده است. مقدار پروتئین های حاصل از نمونه شاهد و میان کنش داده شده بترتیب ۰٫۸mg. و۰٫۱mg. بود. در شکل ۱ ستون 1a مقایسه کل پروتئین HMG استاندارد (استخراج شده از تیموس در سمت چپ) و نمونه شاهد (سمت راست) را نشان میدهد وستون 1bمقایسه‌نمونه میان کنش‌داده شده با DMS(سمت راست) در مقابل شاهد است بطوریکه‌مشاهده میشود پروتئین های HMG با استفاده از ماده DMS میان کنش نموده و آزاد برای استخراج با ۰٫۳۵M کلرورسدیم بحالت عادی‌نیستند. با استخراج پروتئین های HMG بوسیله اسیدپرکلریک نیزنتایج مشابه بدست آورده شد.



شکل ۱- الکتروفورز پروتئین های استخراج شده با ۰٫۳۵ M کلرور سدیم از کروماتین‌شاهد و میان کنش داده شده با DMS بر روی ژل اسید- اوره a) مقایسه پروتئین های شاهد(سمت چپ) وپروتئین های HMG استاندارد (تیموس) (سمت راست) b) مقایسه پروتئین های کروماتین شاهد (سمت راست) و میان کنش شده (سمت چپ).

لذا در این حالت دو موضوع مطرح میگردد:

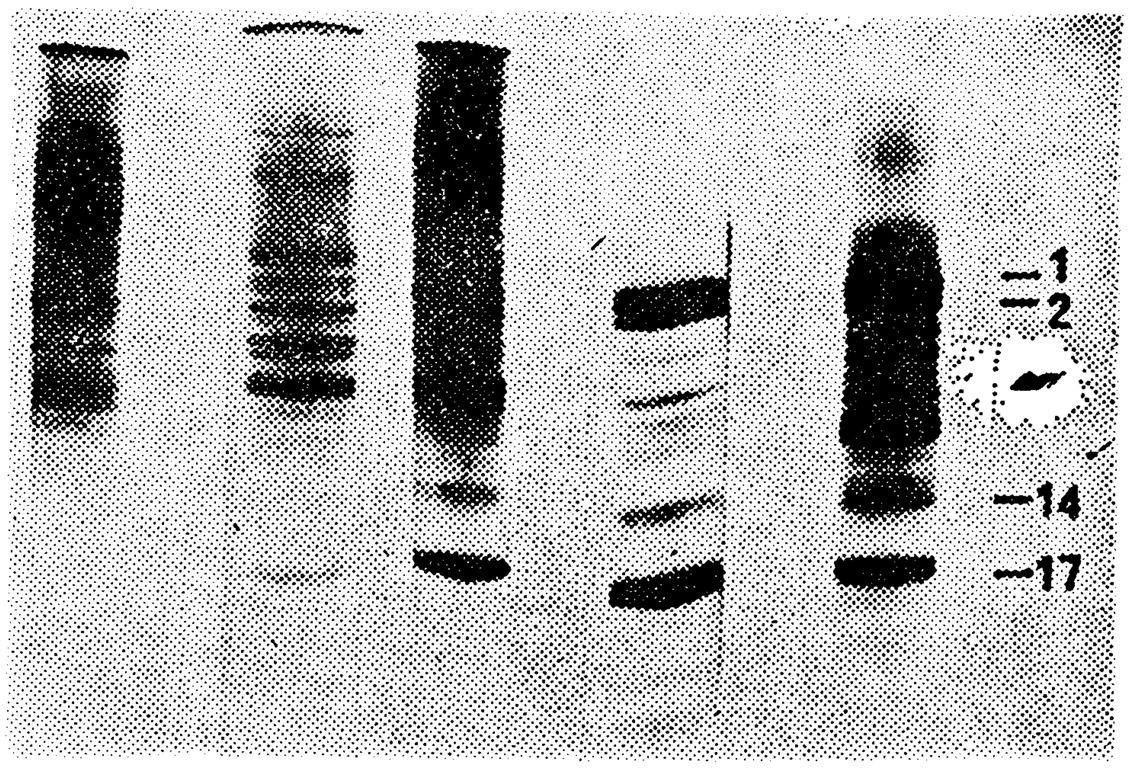
الف: پروتئین های HMG مانند هیستونهاتوانائی میان کنش بایکدیگر را داشته واحتمالا در مناطق فعال کروماتین دانه‌ها را تشکیل دهند.

ب: پروتئین های HMG ممکن است با هیستونها ویاسایر پروتئین های غیر هیستونی کروماتین میان کنش نموده باشند.

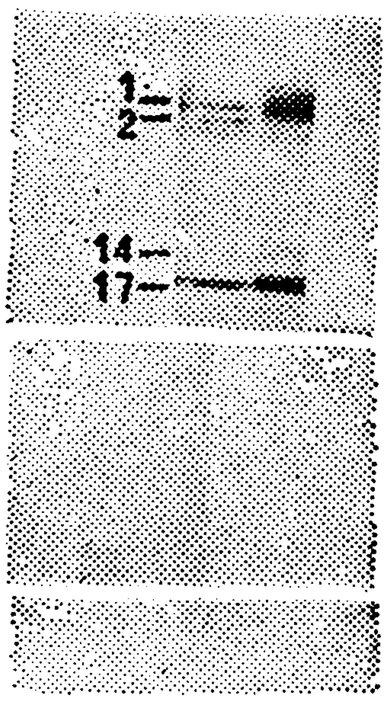
برای اثبات موضوع فوق‌چند آزمایش زیر انجام شد:

برای اثبات حالت اول‌میبایست‌پروتئین های HMG را در شرایطی

که کاملا حالت طبیعی خودرا حفظ مینمایند ودناتوره نشدند تهیه نموده ومیان کنش را روی‌آنها انجام داد. بدین منظور پس ازتهیه کروماتین ، نمونه ابتدا در شرایط بسیار ملایم ۳۰ر. M کلرور سدیم استخراج گردید سپس برای برداشت گروهی از پروتئین های نمونه که‌ازنوع LMG[1] میباشند محلول‌استخراج‌شده با نمک‌سولفات آمونیوم جزء به جزءگردید . در این حالت‌از رسوب دادن مرحله سولفات آمونیوم ۷۰٪ ، ۸۰٪ و ۹۰٪ استفاده شد. سنجش پروتئین نمونه‌های رسوب ومحلول نهائی‌نشان داد که علاوه بر رسوب‌ها محلول حاصل از سولفات آمونیوم ۹۰٪ پس از دیالیز در مقابل بافر نیز حاوی مقدار زیادی پروتئین‌است. آنالیز نمونه‌ها بر روی ژل اسید-اوره در شکل ۲ نشان داده شده است‌بطوریکه مشاهده میشود باوجودیکه مقدار بسیار کمی‌از پروتئین های HMG رسوب ۹۰٪ نمک دیده میشود قسمت‌اعظم‌پروتئین های HMG در محلول روئی باقیمانده است وآلودگی با پروتئین های دیگررا نشان نمیدهد (۲d). بدین ترتیب محلول روئی ابتدا درمقابل بافر فسفات دیالیز شد و مقدار پروتئین در غلظت mg/ml ۱ر. تنظیم‌گردید. پس از میان کنش در حضور DMS در غلظت 1mg/ml نمونه‌ها برروی ژل SDS آنالیزگردیدند (شکل۳) نمونه‌ای که DMSدر آن وارد شده بود هر چهار پروتئین HMG رابخوبی‌نشان میدهد. پهن‌شدن بندها ناشی از اتصال DMS به پروتئین است. درنتیجه مشخص میگردد که پروتئین های HMG توانائی میان کنش بایکدیگر را ندارند بلکه باحتمال زیاد با سایر پروتئین های کروماتین اتصال برقرار نموده‌اند.



شکل ۲- الکتروفوز نمونه های جزء به جزء شده بوسیله سولفات آمونیوم برروی‌ژل‌آکریلامیداسید-اوره a - c; پروتئین-های رسوب داده شده با بترتیب ۷۰٪ ۸۰٪ و ۹۰٪ سولفات آمونیوم
d ; پروتئین های‌محلول در ۹۰٪سولفات‌آمونیوم پس‌ازدیالیز
e ; پروتئین های HMG تیموس بعنوان استاندارد.

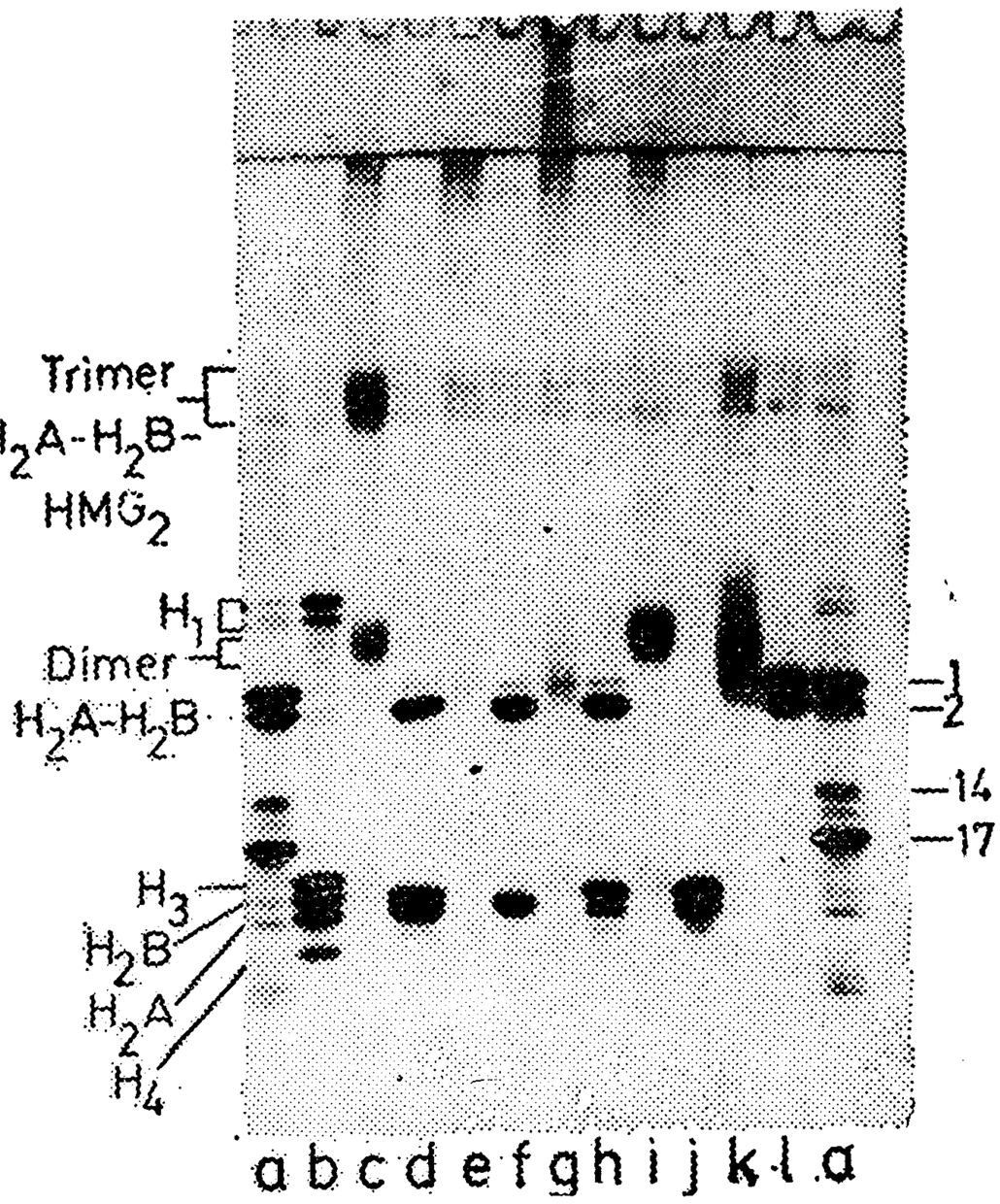


شکل۳- الکتروفورز نمونه های سری شاهد و میان کنش شده پروتئین های محلول در ۹۰٪ سولفات آمونیوم با DMS برروی ژل a SDS; HMG استاندارد.
b ; نمونه میان کنش شده.

برای نشان دادن اثرات‌متقابل پروتئین های‌HMGباهیستونها مطالعاتی برروی کروماتین انجام شده لیکن بعلت‌پیچیدگی بندهای حاصل در روی ژل تفسیر آنها بسیار مشکل است در نتیجه بنظر رسید عمل میان کنش در محلول با استفاده از اجزاء خالص‌شده انجام‌گیرد. پروتئین ها در غلظت mg/ml ۳ر. و DMS در غلظت 1 mg/ml در بافر فسفات pH=۸ر۵ میان کنش انجام شده وبرای هر آزمایش شاهد مربوطه که نمونه فاقد DMS است‌گذاشته شد. الکتروفورز نمونه های کنترل ومیان کنش شده برروی ژل SDS در شکل های (٤و٥) نشان‌داده شده است. نمونه های(K)HMG1, 2 میان کنشی بین خود نشان نمیدهند لیکن هردوپروتئین میتوانند با هیستون HIمیان کنش کرده وبندهائی با وزن ملکول‌بالا را نشان دهند(f - a ٥) که‌الیگومرهای حاصل ازاین اتصالات است. این نتایج‌بانتایج حاصل‌ازمیان‌کنش HMG1 با H1 درمحلول که سایر محققین‌نشان داده‌اند مطابقت‌دارد (Yu, Spring, 1977) بامطالعه بندهای‌روی ژل بنظر میرسد اتصال HMG1باH1قویتر از HMG2 است HMG17 میان کنشی‌باهیستون H1 نشان‌نمیدهند(p ,o ٥).

میان کنش هیستونهای H2A H2B بـا DMS بطوریکه توماس وکورنبرگ گزارش نموده‌انـد دایمر H2A - H2B را میسازند که‌بندی درحدود وزن‌ملکولی ٤٥۰۰۰D را نشان میدهد. (Thomas & Komberg, 1975)میان کنش HMG2 باهریک از دو هیستون طرح خاصی را نشان نمیدهد لیکن هنگامیکه HMG2 با دایمر H2A - H2B میان کنش داده میشودعلاوه بربنداختصاصی کمپلکسH2A - H2B بندی باوزن ملکولی ٦۰۰۰۰D نیزایجاد میشود که اتصال HMG2به کمپلکس رانشان‌میدهد. این‌مشاهدات بامطالعاتی که‌اخیراً برروی‌میان کنش پروتئین HMG1 باهیستونها

1 - Low - Mobility - Group.

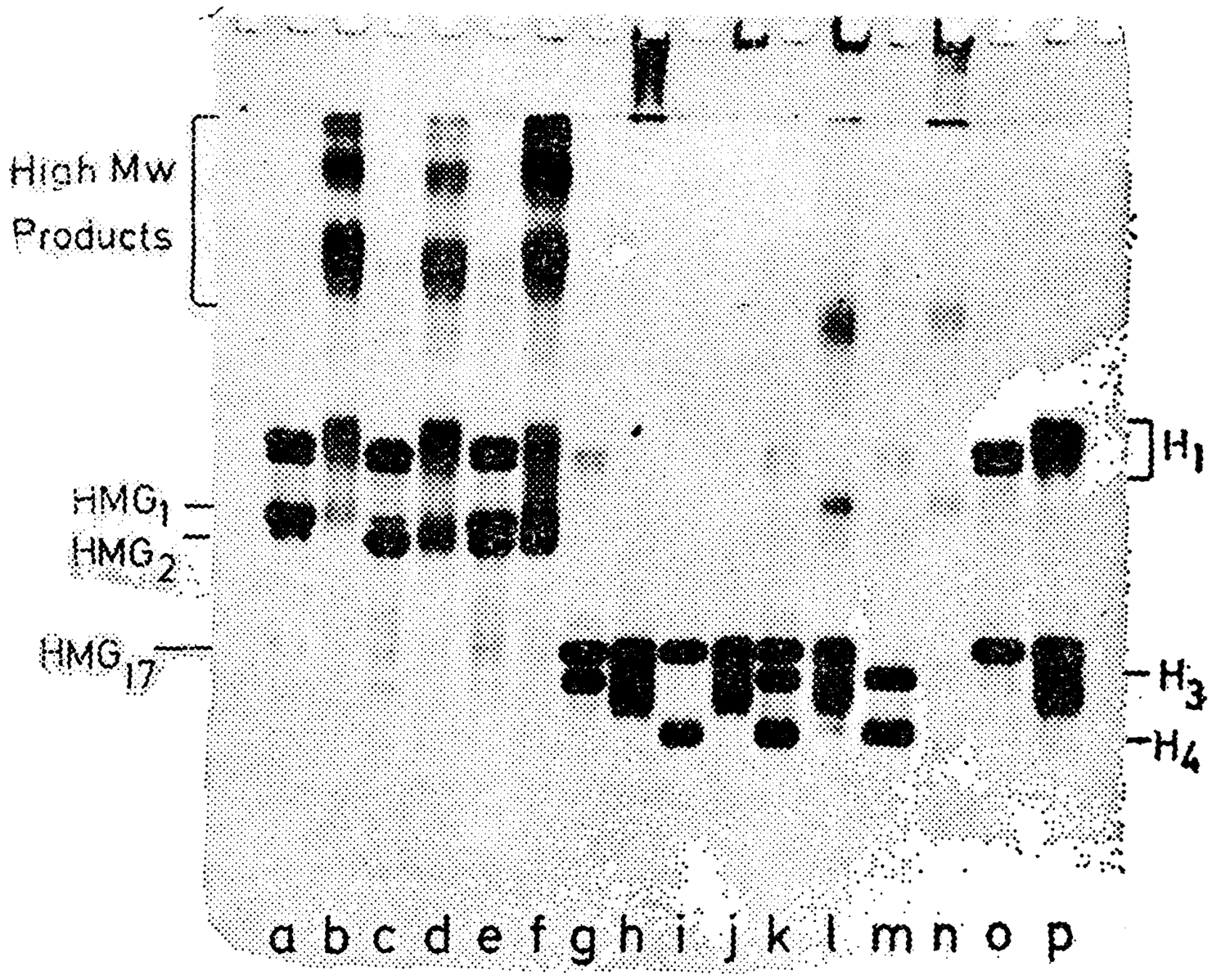


شکل ٤- الکتروفورز نمونه های شاهد ومیان کنش داده شده پروتئین های HMG بایکدیگروباهیستونها درمحلول بوسیلهDMS برروی ژل SDS a - HMG استاندارد.

b - کل هیستونها
c- محصولات کنش داده شده HMG2 باهیستونهای H2A-H2b
d- نمونه شاهد c .
e - محصولات میان کنش داده شده HMG2 باهیستون H2A
f- شاهد e .
g - محصولات میان کنش داده شده HMG2 باهیستون H2B
h- شاهد g .
i - محصولات میان کنش داده شده هیستونهای H2B و H2A
j - شاهد i .
k - میان کنش HMG2 HMG1 l- شاهد k HMG - m استاندارد .

درکروماتین انجام شده است مشابه است.

Bakayev وهمکارانش در سال ۱۹۷۷ گزارش نمودندکه هضم آنزیمی کروماتین با میکروکوکال نوکلئازجزئی از نوکلئو زوم‌ها را بصورت محلول درمیآوردکه آنرا SN1 - 8 نامگذاری نمودند. بین این اجزاء جزء SN3 حاوی پروتئینی است که رفتار آن روی ژل SDS مشابه HMG17 بوده و به ۲۷ جفت باز DNA متصل میشود و این بخش غنی به هیستونهای H3 - H4 است (Bakayev, et al. 1977). دراین‌صورت بنظرمیرسدشاید HMG17 نیز میان‌کنشی با H3 - H4 داشته باشد بررسی میان کنش این



شکل ٥- الکتروفورز نمونه‌های شاهد و میان کنش داده شده پروتئین های HMG با هیستونها درمحلول :

a- شاهد برای b b- محصولات حاصل ازمیان کنش H1, HMG1
c- شاهد برای d d- محصولات حاصل ازمیان کنش H1, HMG2
e- شاهد برای f f- محصولات حاصل ازمیان کنش H1,HMG1و2
g- شاهدبرای h h- محصولات حاصل ازمیان کنش H3, HMG17
i- شاهد برای j j - محصولات حاصل ازمیان کنش H4, HMG17
k- شاهد برای l l- محصولات حاصل ازمیان کنش H3,H4,HMG17
m- شاهد برای n n- محصولات حاصل از میان کنش H3, H4
o- شاهد برای p p- محصولات حاصل ازمیان کنش H1, HMG17

پروتئین ها شکل (n - og) نشان میدهد که باوجودیکه‌میان کنش این پروتئین ها بایکدیگر ترکیباتی باوزن‌ملکولی‌بالارا نشان میدهد لیکن بندهای‌باوزن ملکولی بالامربوط به‌میان کنش خود هیستون های H3 - H4 است و در نتیجه بنظر نمی‌رسد بین H4, H3, HMG17 میان کنش اتفاق افتد .

بطورکلی مطالعه‌میان کنش پروتئین های HMG باخود وباپروتئین های‌هیستونی‌بااستفاده ازDMS نشان‌میدهد که‌پروتئین های HMG خودگردهم‌آئی ندارند بلکه درکروماتین به هیستونها وشاید به سایر پروتئین‌های غیر هیستونی متصل میشوند. در سالهای اخیر میان‌کنش پروتئین HMG1 با هیستون H2A - H2B مطالعه‌شده است (Bernues, et al. 1983, Stroc, 1986) نتایج‌حاصل درفوق نیزنشان‌میدهد که HMG2 نیزمانند HMG1 بادایمرH2A - H2B میان‌کنش قوی ایجاد مینماید لیکن با تک تک آنها واکنشی نشان نمیدهد. بدین ترتیب بنظرمیرسد که‌پروتئین های HMG1,2 ملکول‌های شبیه بهم بوده وشاید نقش یکسانی را درکروماتین ایفاد نمایند. اتصال HMG1, 2 به هیستونH1 این‌موضوع رامطرح میسازدکه شاید وضعیت اتصال بنحوی است‌که ازیک طرف به دایمر H2A - H2B واز طرف‌دیگر به‌هیستون H1 متصل‌شوند. در مورد HMG17 میتوان نتیجه‌گرفت که‌این پروتئین احتمالا به DNA متصل میشود وبدین ترتیب توانائی‌ایجاد میان کنش باهیستون‌ها وغیر هیستون‌ها را ندارد .

References

Bakayev. V. V. Bakayeva, T. G. & Varshavsky, A. J. (1977) Nuclesomes and Subnucleosomes. Heter - ogeneity and Composition *Cell*, **11(3)**, 619 - 629.

Bernues, J. Querol, E., Martinez, P., Barris, A. and Espel, E. (1983) Detection by chemical cross - linking of interaction between HMG protein 1 and histone oligomers in free solutions, *J. Biol. Chem.* **258(18)**, 11020 - 11024.

Bradbury, E. M., Maclean. N., & Matthews, H. (1981) *in DNA Chromatin and Chromosomes*, Blackwell Sci pub. London .

Carpenter, F. H. and Harrington, K. T. (1972) Interm - olecular cross Linking of monomeric proteins and cross - linking of... -. *J. Biol. Chem.*, **247 (17)**, 5580 - 5586 .

Davies, G. E. & Stark, G. R. (1970) Use of DMS à - cross - linking reagent in studing the subunit structure of oligomeric proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **66 (3)**, 651 - 657.

Goodwin, G. H., (1982) in the *HMG Chromosomal Proteins* (Johns, E. W. ed.) Academic Press London .

Goodwin, G. H., Nicolas, R. H. & Johns, E. W. (1975) An improved large scale fractionation of HMG nonhistone proteins, *Biochem. Biophys. Acta.* **405**, 280 - 291

Hartley, B. S. (1970) Strategy and tactics in protein chemistry, *Biochem. J.* **119**, 805 - 822.

Hewish, D. and Burgoyne, L. (1973) Chromatin subst - ructure, *Biochem. Biophys Res.* Comm. **52**, 504-510.

Johns, E. W., Goodwin, G. H., Walker, J. M. & Sanders C. (1975) HMG nonhistone chromosomal pro - teins *CIBA Foundation.* **28**, 95 .

Johns, E. W. (1964) Studies on Histones, *Biochem. J.* **92**, 55 - 59 .

Johns, E. W., (1967) The electrophoresis of histones in PAGE, *Biochem. J.*, **104**, 78

Kornberg, R. D. (1977) Chromatin Structure, *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 931 - 954 .

Kornberg, R. D. (1974) Chromatin Structure : A - repeating unit of histones and DNA, *Science* **184**, 868 - 871 .

Koch. M. H. J., Sayer, Z., Michon, A. M. Marquet, R. Houssier, C., Willfuhr, J. (1988) The Supp - erstructure of chromatin and condensation mec - hanism, *Eur Biophys J.* **16**, 177 - 185 .

Lammeli, V. K. (1970) Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T, *Nature* **227**, 680 - 685 .

Stroc, M. (1987) Binding of nonhistone chromosomal protein HMG1 to histone H3 in nucleosomes detected by photochemical cross - linking, *Biochem.*

Biophysic Res. Comm. **147**, 301 - 308 .

Sun, T. T., Bollen, A., Kahan, L. & Traut, R. R. (1974) Topography of ribosomal proteins of the E. Coli : 30S subunit as studied with the reversible cross - linking reagent, *Biochemistry.* **13 (11)**, 2334-2340.

Thomas, J. D. & Kornberg, r. d. (1975) An octamer of histones in chromatin and free in solution, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 2626 - 2630 .

Yu, S.H. and Spring, T. G. (1977) The interaction of nonhistone chromosomal proteins HMG1 and HMG2 with subfractions of H1 immobilized on Agarose, *Biochem. Biophys.* Acta **492**, 20 - 28 .