

ЭКСТРАКЦИЯ ГИСТОНА Н1 И ДЕКОНДЕНСАЦИЯ ЯДЕРНОГО ХРОМАТИНА С РАЗНЫМИ Mg-ЗАВИСИМЫМИ УРОВНЯМИ ОРГАНИЗАЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ПОЛИГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ДИСТАМИЦИНА

© 2015 А.Н. Прусов*, Т.А. Смирнова, Г.Я. Коломийцева

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва;
факс: +7(495)939-3181, электронная почта: prusov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 27.09.14

После доработки 21.10.14

В условиях низкой ионной силы (20–25 мМ) и концентрации Mg^{2+} от 2 до 5 мМ хроматин в ядрах печени крысы имеет конденсированную структуру (глобулы 100–200 нм) и дает одинаковый сигнал КД (320–340 нм) при взаимодействии с антибиотиком дистамицином А (ДМ). Снижение концентрации Mg^{2+} до 1 мМ приводит к деконденсации хроматина до структур 30 нм и увеличению сигнала КД. Поли-(L)-глутаминовая кислота (ПГ) при ПГ/ДНК = 6 в присутствии 5 мМ Mg^{2+} экстрагирует только восьмую часть ядерного гистона Н1, оставляя структуру хроматина конденсированной. Удаление одной четверти Н1 при 3 мМ Mg^{2+} приводит к деконденсации хроматина до фибрилл 30 нм. Экстракция около половины гистона Н1 в среде с $[Mg^{2+}] \leq 2$ мМ разворачивает хроматин до нуклеосомного уровня. Деконденсация под действием ПГ приводит к значительному увеличению сигнала КД. Основная экстракция Н1 происходит за 1–2 мин, но при всех концентрациях Mg^{2+} выявляется более медленно экстрагируемая с помощью ПГ фракция Н1, составляющая 5–7% ядерного Н1. Из оставшегося в ядре гистона Н1 около 25% может быть экстрагировано ПГ в присутствии насыщающей концентрации ДМ (ДМ/ДНК = 0,1). Выход Н1 существенно зависит от концентрации ПГ. Однако даже при высоких соотношениях ПГ/ДНК = 30 и ДМ/ДНК = 0,1 из ядра не удается удалить 5–10% гистона Н1. Деконденсация хроматина в ядре не всегда пропорциональна экстракции гистона Н1 и ослабляется в присутствии положительно заряженного ДМ или больших концентраций ПГ. Наши результаты показывают, что взаимодействие ДМ с хроматином зависит, прежде всего, от уровня его упаковки, а действие ПГ – от концентрации Mg^{2+} , поддерживающего данный уровень.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: клеточные ядра, хроматин, уровни структурной организации, дистамицин, полиглутаминовая кислота, гистон Н1, спектры КД.

Понимание механизмов процессов транскрипции, репликации, репарации требует знания структурной организации *in vivo* их физиологического субстрата – ядерного хроматина, упакованного в ядре. Данные, положенные в основу современных, зачастую противоположных [1–3], представлений о принципах организации хроматина и многочисленных моделей, были получены в основном на выделенных или реконструированных препаратах хроматина в растворе [4], а также на модельных олигонуклеосомах [5].

Принятые сокращения: ПГ – поли-(L)-глутаминовая кислота, Н1 – гистон Н1, ДМ – антибиотик дистамицин А, КД – круговой дихроизм, ЭМ – электронная микроскопия.

* Адресат для корреспонденции.

В настоящее время имеется весьма ограниченная информация о структуре хроматина на уровне ядра [6]. Ядро является сложной структурой, образованной множественными компартментами с различным микроокружением. Длинный полимер – хроматин – заполняет ядерный объем в концентрации до 20–40 мг/мл [7]. Столь высокие концентрации ДНК, РНК и белковых молекул в ядре обуславливают так называемый «crowding»-эффект [8]. Необходимо учитывать также взаимодействие хроматина с другими компартментами ядра и динамическое поведение макромолекул, в частности гистона Н1 [9, 10]. Очевидно, что условия существования и функционирования хроматина в ядре существенно отличаются от таковых в растворе.

Известно, что хроматин в клеточном ядре может находиться в нескольких структурных состояниях, различающихся плотностью упаковки ДНК: нуклеосомные фибриллы диаметром 10 нм, обеспечивающие 6–7-кратную упаковку ДНК – первичный уровень, фибриллы диаметром 30 и 100–200 нм – вторичный и третичный уровни соответственно [11]. Детально изучен пока лишь первичный, нуклеосомный уровень. Организация более высоких уровней остается дискуссионной и мало доступной экспериментальной проверке [12, 13]. Полагают, что в их формировании могут участвовать в т.ч. гистон H1 и ионы магния.

В настоящей работе с помощью электронной микроскопии (ЭМ), спектроскопии кругового дихроизма (КД) и экстракционных методов мы изучили *in vitro* влияние высокомолекулярного полианиона – поли-(L)-глутаминовой кислоты (ПГ), экстрагирующей из ядерного хроматина гистон H1, и противоопухолевого антибиотика дистамицина А (ДМ) на структуру хроматина с разными уровнями организации, моделируемые концентрации ионов магния.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ядра клеток печени крысы выделяли, как описано ранее [14]. Печень гомогенизировали в буфере 20 мМ ТЭА-НСI (рН 7,5), 30 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂ в присутствии ингибиторов эндонуклеазной и протеазной активности N-этилmaleимида («Sigma», США, до 3 мМ) и фенолметилсульфонилфторида («Serva», США, до 0,1 мМ) соответственно. Гомогенат смешивали с раствором 2,5 М сахарозы в том же буфере, но содержащем 5 мМ MgCl₂, до конечной концентрации сахарозы 2,1 М и центрифугировали при 50 000 г в течение 45 мин. Ядерный осадок дважды отмывали от сахарозы в буфере 20 мМ ТЭА-НСI (рН, 7,5) с 5 мМ MgCl₂, осаждая 5 мин при 1500 г. Осадок ресуспендировали в том же буфере, разделяли на аликвоты и центрифугировали 5 мин при 1500 г. Полученные аликвоты ядер ресуспендировали в буфере 20 мМ ТЭА-НСI (рН 7,5), содержащем MgCl₂ в разных концентрациях.

Обработку ДМ и ПГ проводили, как описано ранее [15]. К аликвотам суспензии ядер добавляли раствор антибиотика ДМ («Sigma», США, 5 мг/мл в этаноле) в нужном молярном соотношении с ДНК ядер и инкубировали 15 мин. ПГ («Sigma», США) добавляли к суспензии ядер (концентрация ДНК в суспензии – 70 мкг/мл), предварительно обработанных или необработанных ДМ, в равном объеме того же буфера до

нужного весового соотношения ПГ/ДНК и инкубировали в течение 15 мин.

Гистон H1 экстрагировали из ядер, суспендированных в 20 мМ ТЭА-буфера (рН 7,5), содержащего 0–5 мМ MgCl₂, при помощи ПГ. Использовались растворы ПГ молекулярной массы 14,5, 45,0 и 95,0 кДа, приготовленные в буферах с соответствующей концентрацией Mg²⁺. Время экстракции и величину весового соотношения ПГ/ДНК варьировали. Суспензию центрифугировали 10 мин при 10 000 г. К супернатанту добавляли ТХУ до 20%, инкубировали 1 ч при –20° и центрифугировали 10 мин при 10 000 г. Осадки ядер и супернатанта промывали ацетоном, высушивали и растворяли в буфере для электрофореза.

Концентрацию ДНК и РНК в ядрах определяли после гидролиза аликвоты в 5%-ной HClO₄ [16].

Измерения КД и УФ-поглощения были выполнены на КД-спектрометре Chirascan Plus («Applied Photophysics», Великобритания) при 18° в диапазоне 240–420 нм в односантиметровой кварцевой кювете в положении, близком к фотоумножителю. Концентрация ДНК в суспензии ядер составляла 35 мкг/мл.

Электрофорез белков в присутствии Ds-Na проводили по Лэммли [17] в 15%-ном разделяющем геле. Количество белка в полосах определяли с помощью компьютерной программы GelPro Analyser 3.1 с использованием калибровочной кривой, построенной по суммарному H1 клеток печени крысы. Выход гистона H1 оценивали в % от суммы H1 в супернатанте и осадке.

Для **электронной микроскопии** образцы фиксировали 1%-ным глутаровым альдегидом (нейтрализованным до рН 7,0 добавлением NaOH) при 4° в течение 1,5 ч, а затем 1%-ным OsO₄ в течение 1 ч, дегидратировали и заключали в Эпон по стандартной методике. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III («LKB», Швеция), контрастировали цитратом свинца и просматривали в электронный микроскоп Hitachi-700 («Hitachi», Япония) или JEM-1400 («JEOL», Япония) при ускоряющем напряжении ~75 кВ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ядра клеток печени крысы, полученные в присутствии 5 мМ Mg²⁺, переводили в буферы с понижающейся концентрацией Mg²⁺. На рис. 1 приведена ЭМ-картина участков ядер. Перевод ядер в буферы с концентрацией Mg²⁺ от 5 до 2 мМ практически не изменял морфологию хроматина в сравнении с исходным ядром: ядерный хроматин был представлен конденсированными глобулами и фибриллами диамет-

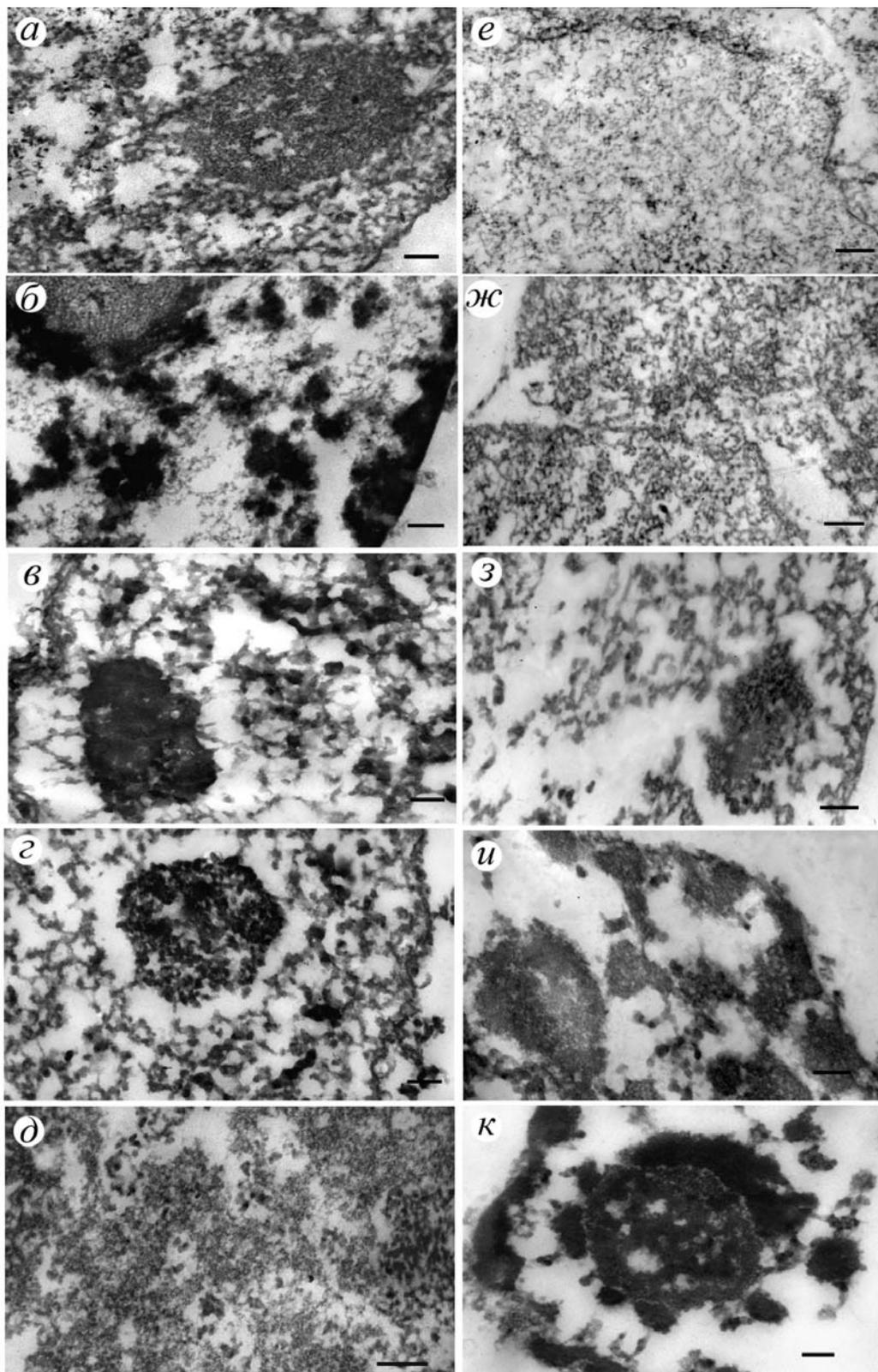


Рис. 1. Электронограммы ультратонких срезов изолированных ядер печени крысы в буфере 20 мМ ТЭА-НСl (рН 7,5). Ядра в буфере, содержащем 1 (а) или 2 (б) мМ Mg^{2+} ; в – ядро в буфере с 2 мМ Mg^{2+} , обработанное ДМ (ДМ/ДНК = 0,1) и ПГ (ПГ/ДНК = 6); г, д – ядра в буфере с 5 мМ Mg^{2+} , обработанные ПГ при ПГ/ДНК = 20 (г) или ПГ/ДНК = 30 (д); ядра, обработанные ПГ при ПГ/ДНК = 6 в присутствии 1 (е), 2 (ж), 3 (з), 4 (и) или 5 (к) мМ Mg^{2+} . Масштабный отрезок – 0,2 мкм

ром $\sim 100\text{--}200$ нм (рис. 1, б). При снижении концентрации Mg^{2+} до 1 мМ картина меняется. Хроматин в ядрах выглядит как фибриллы и гранулы диаметром ~ 30 нм, более-менее равномерно заполняющие внутреннее пространство ядра (рис 1, а). Таким образом, в интервале концентраций Mg^{2+} от 2 до 1 мМ в среде низкой ионной силы в выделенных ядрах *in vitro* происходит структурный переход хроматина из фибрилл 100–200 нм в фибриллы 30 нм.

УФ-спектры препаратов ядер при $[\text{Mg}^{2+}] = 1\text{--}5$ мМ показаны на рис. 2, а. Спектры снимались в условиях, минимизирующих вклад светорассеяния, а именно при положении кюветы вплотную к детектору [18]. Как видно, УФ-спектр ядер имеет плоский максимум в диапазоне 260–280 нм и характеризуется относительно высоким поглощением при $\lambda \geq 300$ нм. Эти свойства примерно одинаковы для ядер в интервале $[\text{Mg}^{2+}] = 2\text{--}5$ мМ. В буфере с $[\text{Mg}^{2+}] = 1$ мМ поглощение в максимуме слегка возрастает, пик становится более острым, а поглощение при $\lambda > 300$ нм существенно снижается (рис. 2, а, 1 мМ Mg^{2+}). Описанные нами оптические свойства ядер согласуются с данными авторов Олинс Д.Е. и Олинс А.Л. [18], которые определяют ядра при $[\text{Mg}^{2+}] = 5$ мМ как «гранулированные», а при $[\text{Mg}^{2+}] = 1$ мМ – как «гомогенные».

Спектр КД выделенных ядер (рис. 2, б) похож на спектр выделенного хроматина [19]. Ядра в буфере с $[\text{Mg}^{2+}] = 2\text{--}5$ мМ («гранулированные ядра» с фибриллами 100–200 нм) проявляют сглаженный дихроизм с максимумом (иногда двугорбым) в области 260–280 нм и точкой кроссовера при 254–258 нм. Спектр КД ядер в буфере с $[\text{Mg}^{2+}] = 1$ мМ («гомогенные ядра» с фибриллами 30 нм) близок к описанному выше, хотя бимодальный максимум при 260–280 нм и минимум при 295 нм выражены четче.

Известно, что спектры КД мутных суспензий склонны к большому числу оптических артефактов, вызванных светорассеянием, поляризацией светорассеяния, эффектом «сита», которые затрудняют их интерпретацию. О преодолении эффекта светорассеяния мы уже писали выше. Известно также, что эффект «сита» наиболее выражен при $\lambda \leq 240$ нм [18], и в интересующей нас области волн большей длины им можно пренебречь. Имея в виду сложности интерпретации КД мутных суспензий и то, что различия спектров КД «гранулированных» и «гомогенных» ядер невелики, мы попытались использовать для характеристики ядер их КД-спектры, снятые после инкубации с антибиотиком ДМ [15]. При этом мы основывались на выводах работы Сен и Крозерс [20], в которой изучали линейный дихроизм комплексов ДНК с лекарства-

ми, и было показано, что величины измеряемых параметров при 260 нм и в полосах поглощения лекарств коррелируют.

Антибиотик ДМ взаимодействует с ДНК, образуя комплексы, за которыми легко следить методом КД в максимуме поглощения при $\lambda = 320\text{--}340$ нм [21]. Мы изучили взаимодействие ДМ с хроматином ядер в буфере с различным содержанием Mg^{2+} . Рис. 2, в показывает, что полученные спектры КД ядер, обработанных ДМ, сходны со спектрами комплексов ДМ–ДНК [15]. Число мест связывания ДМ, определенное по методу Мир с соавт. [22] из кривых титрования разных препаратов ядер, отличающихся по содержанию Mg^{2+} , оказалось близким для всех ядер и несущественно отличалось от параметров для выделенной ДНК в тех же условиях. Максимальное значение $\Delta A_{320\text{--}340}$ для всех препаратов ядер достигалось при соотношении ДМ/ДНК = 0,1 ($\Delta A_{320\text{--}340 \text{ max}}$), но эта величина оказалась существенно (примерно в 4 раза) ниже, чем для выделенной ДНК [15]. Это позволило нам ввести понятия «продуктивного» и «непродуктивного» связывания ДМ, обусловленных существованием специфической упаковки ДНК в хроматине. Ядра в буфере с концентрацией Mg^{2+} от 5 до 2 мМ (структуры 100–200 нм) имели одинаково низкие значения $\Delta A_{320\text{--}340 \text{ max}}$. Однако при переводе ядер в буфер с $[\text{Mg}^{2+}] = 1$ мМ наблюдается заметный (в $\sim 1,5$ раза) рост величины $\Delta A_{320\text{--}340 \text{ max}}$ (рис. 3). Это предполагает, что «гранулированные» структуры хроматина при связывании ДМ слабее индуцируют в молекуле ДМ круговой дихроизм. Поскольку понижение концентрации Mg^{2+} до 1 мМ сопровождается переходом «гранулированных» структур в «гомогенные», в основном состоящие из фибрилл 30 нм (рис. 1, а), можно заключить, что в этом состоянии хроматин способен более «продуктивно» связывать ДМ. Дополнительные эксперименты по удалению избытка ДМ осаждением с последующей обработкой ядер 2 М NaCl выявили существенный рост $\Delta A_{320\text{--}340 \text{ max}}$ (данные не приведены), что подтвердило наше предположение о существовании «непродуктивно» связанного ДМ.

ПГ преимущественно экстрагирует гистон Н1 из ядер [15]. При этом свыше 90% полимерной ДНК сохраняется в составе обработанного ядра. В настоящей работе мы обнаружили, что экстракция Н1 посредством ПГ зависит также от концентрации Mg^{2+} . На рис. 4 показана зависимость экстракции Н1 от концентрации Mg^{2+} , выполненная при весовом соотношении ПГ/ДНК = 6, использованном ранее [15, 23]. Видно, что эта зависимость нелинейна, имеет S-образный характер в диапазоне 0–5 мМ Mg^{2+} с точкой перехода примерно в 2,5 мМ Mg^{2+} . Дальнейший рост

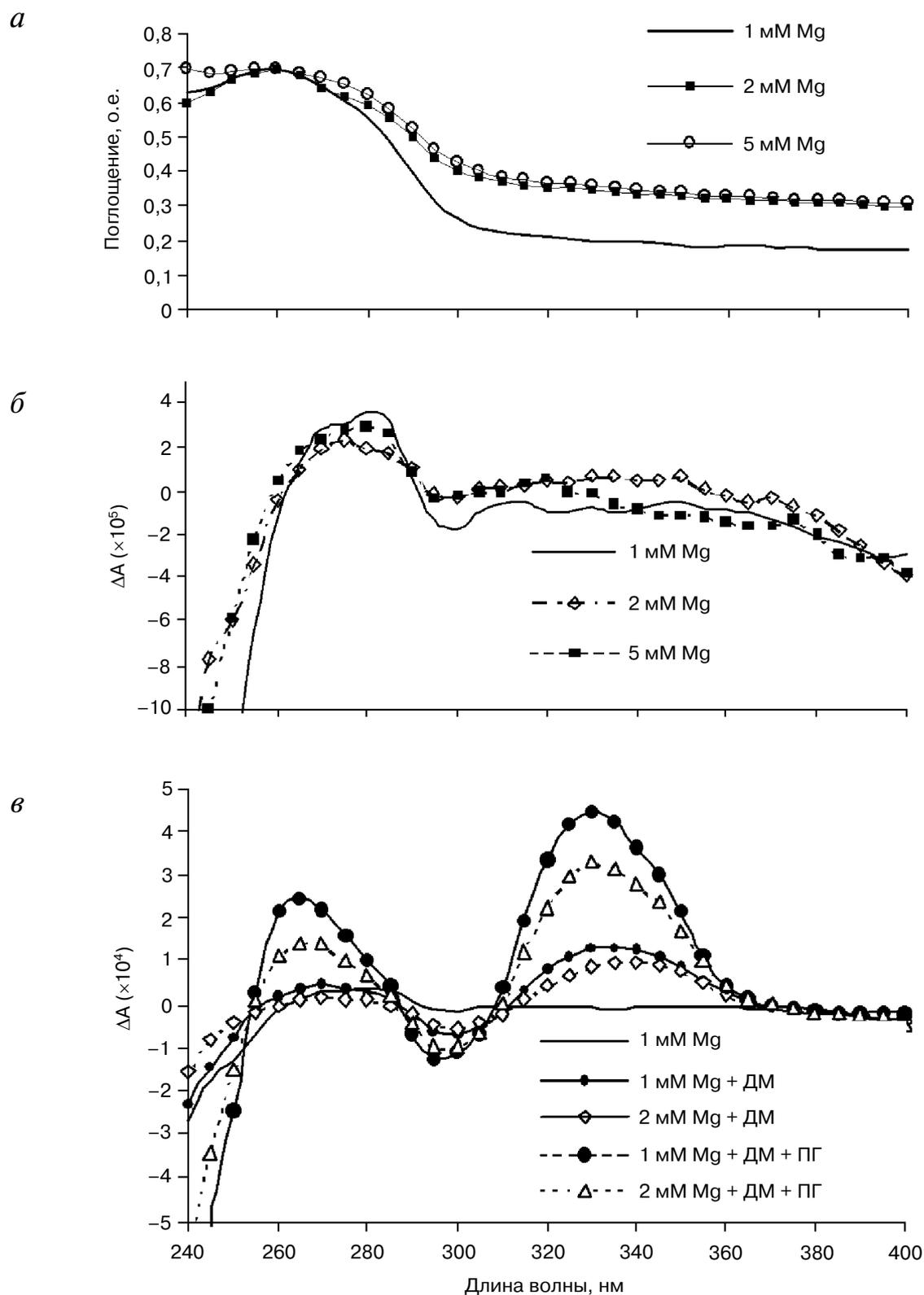


Рис. 2. УФ- (а) и КД- (б) спектры изолированных ядер печени крысы в присутствии разных концентраций Mg^{2+} ; в – КД-спектры ядер, обработанных дистамицином при ДМ/ДНК = 0,1 (ДМ) и ДМ с последующей обработкой ПГ при ПГ/ДНК = 6 (ДМ + ПГ) в присутствии разных концентраций Mg^{2+} . Сканирование спектров проводилось при концентрации ДНК 35 мкг/мл

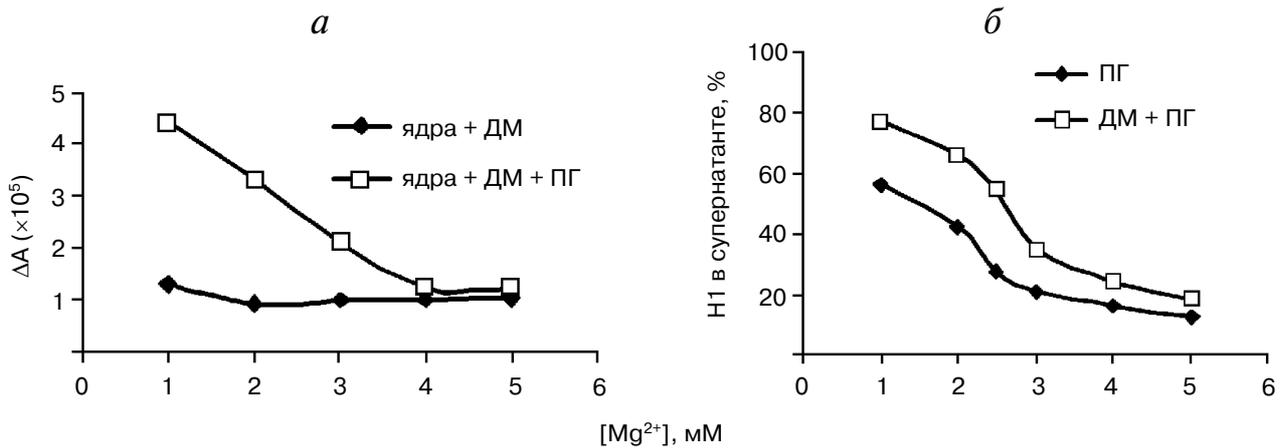


Рис. 3. Зависимость $\Delta A_{320-340}$ (а) и выхода гистона Н1 (б) от концентрации Mg^{2+} . Соотношение ПГ/ДНК = 6 и ДМ/ДНК = 0,1. На этом и последующих рисунках приведены средние значения из 2–3 экспериментов, отличающиеся не более чем на 15%

концентрации Mg^{2+} почти не сказывается на экстракции Н1. Экстракция зависит от молекулярной массы ПГ: ПГ с высокой молекулярной массой (95,0 кДа) была более эффективна, особенно при высокой концентрации Mg^{2+} , чем ПГ со средней (45,0 кДа) и низкой молекулярной массой (14,5 кДа). В дальнейшем мы использовали ПГ 14,5 кДа, т.к. на фоне более слабого действия ПГ лучше выявляется стимулирующее экстракцию Н1 действие ДМ [15].

Зависимость экстракции гистона Н1 от концентрации ПГ при разных концентрациях Mg^{2+} показана на рис. 5. Видно, что выход гистона Н1 увеличивается с ростом весового соотношения ПГ/ДНК по-разному в зависимости от концентрации Mg^{2+} . Экстракция как без Mg^{2+} , так и при низкой его концентрации (0–1 мМ) резко возрастает уже при увеличении отношения ПГ/ДНК до 10, достигая 75–80% от общего содержания Н1 в ядре. Повышение ПГ/ДНК до 30 меньше сказывается на выходе Н1, добавляя еще примерно 10% (кривые 1 мМ ЭДТА и 1 мМ Mg). С увеличением концентрации Mg^{2+} (3 мМ) влияние на экстракцию небольших концентраций ПГ снижается. При высокой концентрации Mg^{2+} (5 мМ) экстракция медленно возрастает вплоть до ПГ/ДНК = 10–15, но заметно увеличивается при дальнейшем росте ПГ/ДНК до 30, достигая 75% (кривая 5 мМ Mg). При более детальном анализе на кривой 5 мМ Mg можно наблюдать плато в районе 50%-ной экстракции Н1 при отношении ПГ/ДНК = 20–25. Заметим, что при одинаковом уровне упаковки хроматина (фибриллы 30 нм) при низкой ионной силе (~20 мМ) с 1 мМ Mg^{2+} (кривая 1 мМ Mg) и физиологической ионной силе без Mg^{2+} (кривая 140 мМ NaCl)

выход Н1 при физиологической ионной силе на ~20% ниже. Эти результаты указывают, что кроме концентрации Mg^{2+} на выход Н1 под действием ПГ влияет ионная сила среды.

Инкубация ядер с ПГ сопровождалась морфологическими изменениями, выраженность которых также сильно зависела от концентрации Mg^{2+} . Рис. 1 (е–к) демонстрирует ЭМ-картины ядер, обработанных ПГ/ДНК = 6 в течение 15 мин. Из сравнения их с контрольными ядрами с конденсированным хроматином (рис. 1, б) видно, что при 5 мМ Mg^{2+} (рис. 1, к) крупные глобулы остаются плотными, как в контроле. При 4 мМ Mg^{2+} наблюдается небольшое набухание глобул, выявляющее их сетчатую внутреннюю струк-

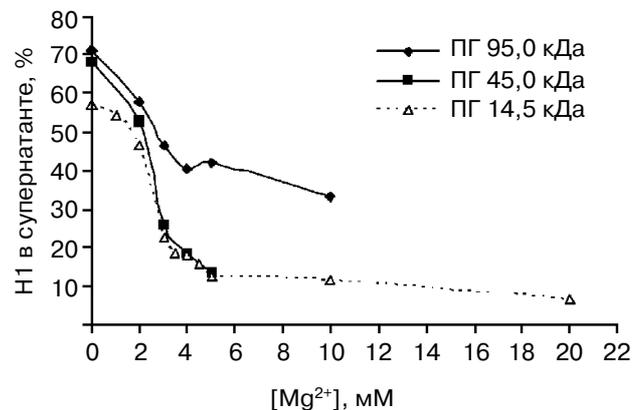


Рис. 4. Зависимость экстракции ядерного гистона Н1 с помощью ПГ разной молекулярной массы (весовое соотношение ПГ/ДНК = 6) от концентрации Mg^{2+}

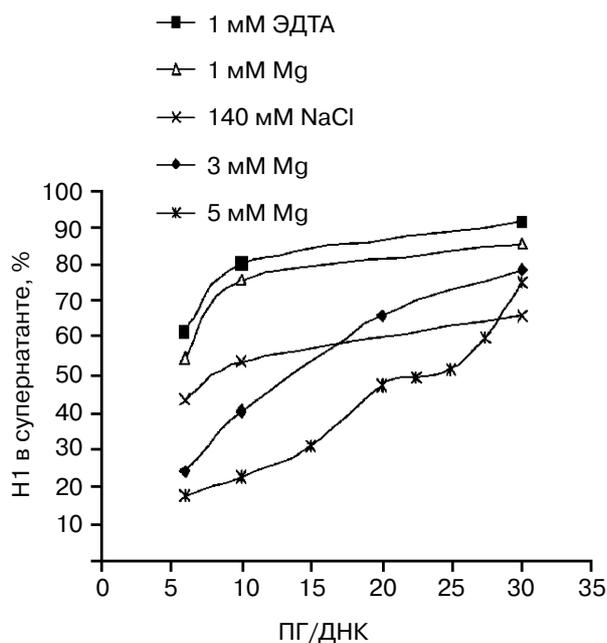


Рис. 5. Зависимость экстракции ядерного Н1 от концентрации ПГ при низкой ионной силе (20 мМ ТЭА-НСl, рН 7,5) и разных концентраций Mg^{2+} или ЭДТА или физиологической ионной силе NaCl

туру (рис. 1, и). В 3 мМ Mg^{2+} хроматин уже разворачивается до фибрилл 30 нм (рис. 1, з). В 1 и 2 мМ Mg^{2+} ядерный хроматин представлен нуклеосомными фибриллами 10 нм, скрученными в многочисленными кольцами, хотя при 2 мМ Mg^{2+} эти фибриллы более плотно упакованы, чем при 1 мМ Mg^{2+} (рис. 1, е, ж). Из рис. 1 (з, д) видно, что компактный хроматин в ядрах при 5 мМ Mg^{2+} может быть переведен в фибриллы 30 или 10 нм обработкой ядер ПГ с более высокими весовыми соотношениями ПГ/ДНК, равными 20 и 30 соответственно. Заметим, что несмотря на значительный уровень экстракции гистона Н1 (~50%) при отношении ПГ/ДНК ~20 хроматин все еще не разворачивается ниже уровня фибрилл 30 нм (рис. 1, з). В то же время экстракция более 75% Н1 приводит к такому разворачиванию, но участки хроматина наблюдаются как облака плотно упакованных друг с другом нуклеосомных фибрилл (рис. 1, д).

Зависимости выхода Н1 от времени инкубации ядер с ПГ при разной концентрации Mg^{2+} представлены на рис. 6. Анализ их позволяет считать процесс экстракции по меньшей мере двухстадийным. Первая стадия включает выделение основной части Н1 за период в 2 мин (минимальное время эксперимента). Затем следует дальнейший постепенный выход Н1 из ядер (~15–20 мин).

При этом количество Н1 возрастает почти при всех изученных концентрациях Mg^{2+} примерно одинаково на 5–8%. Последующая инкубация (до 2 ч и более) не приводила к заметному росту содержания Н1 в экстракте. Таким образом, 15–20 мин инкубации с ПГ достаточно для достижения основного уровня экстракции. Отметим, что наибольшая разница в экстракции Н1 в интервале от 2 мин до 2 ч наблюдается при промежуточной концентрации Mg^{2+} , равной 2 мМ.

Экстракция гистона Н1 с помощью ПГ возрастает при предобработке ядер ДМ [15]. На рис. 7 представлены зависимости ПГ-экстракции (ПГ/ДНК = 6) ядерного Н1 от концентрации ДМ. Видно, что при 5 мМ Mg^{2+} экстракция Н1 практически не зависит от ДМ вплоть до молярного соотношения ДМ/ДНК = 0,03, и лишь затем наблюдается небольшое возрастание. Для ядер в присутствии 1 и 2,5 мМ Mg^{2+} повышение экстракции отмечается уже при соотношении ДМ/ДНК = 0,01, уровень которой не меняется до 0,02. Дальнейший рост выхода Н1 наблюдает-

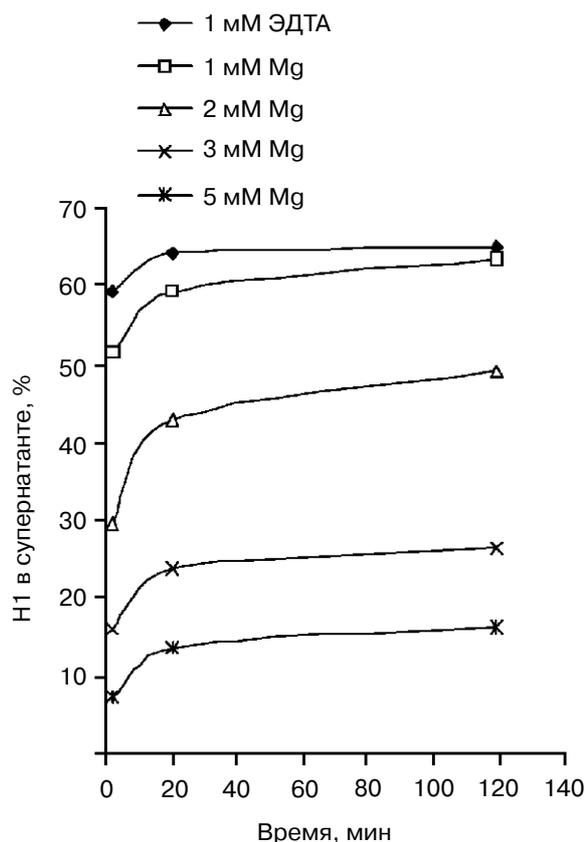


Рис. 6. Зависимость экстракции ядерного гистона Н1 в присутствии разных концентраций Mg^{2+} или ЭДТА от времени инкубации с ПГ (ПГ/ДНК = 6)

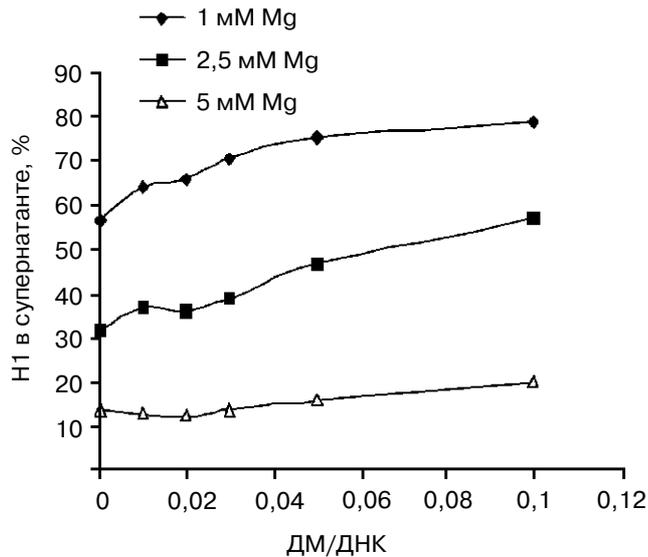


Рис. 7. Зависимость выхода Н1 из ядер (весовое ПГ/ДНК = 6) от молярного соотношения ДМ/ДНК в присутствии разных концентраций Mg²⁺

ся с увеличением соотношения ДМ/ДНК выше 0,03. Максимальный прирост выхода Н1 (на 25% выше по сравнению с контролем) достигается при молярном соотношении ДМ/ДНК = 0,1, которое является уровнем насыщения и для свободной от белков ДНК [15, 23]. Увеличение молярного соотношения ДМ/ДНК до 1 приводило к снижению экстракции Н1 (не иллюстрировано).

Действие ПГ на ядра с различным содержанием Mg²⁺, предварительно обработанные ДМ (ДМ/ДНК = 0,1), сказывалось не только на выходе гистона Н1, но и на $\Delta A_{320-340 \max}$ в спектрах КД. Полученные результаты представлены на рис. 3, а и б. Амплитуда КД была практически одинаковой для ядер при 4–5 мМ Mg²⁺ и всего на 20% превышала контрольное значение (в отсутствие ПГ). По мере дальнейшего понижения концентрации Mg²⁺ $\Delta A_{320-340 \max}$ возрастало и достигало 4-кратного увеличения в буфере с 1 мМ Mg²⁺. При сравнении с рис. 3, б видно, что этот рост амплитуды КД $\Delta A_{320-340}$ соответствует возрастающему выходу гистона Н1 из комплекса ядро–ДМ (кривая ДМ + ПГ). Кроме того, обращают на себя внимание постоянные, независимые от концентрации Mg²⁺ значения амплитуды КД в условиях существования конденсированных третичных структур как в исходных ядрах (2–5 мМ Mg²⁺), так и при действии ПГ (4–5 мМ Mg²⁺). При переходе от третичной к более развернутым структурам хроматина наблюдается рост значений $\Delta A_{320-340}$, количественно различа-

ющийся в зависимости от степени деконденсации или депротенизации в присутствии ПГ.

ЭМ-контроль показал, что обработка ядер ДМ снижает способность хроматина к декомпактизации под действием ПГ. В частности, при 2 мМ Mg²⁺ в присутствии ДМ (рис. 1, в) хроматин 100–200 нм не разворачивается до нуклеосомного уровня, как это происходит без ДМ (рис. 1, ж), а остается на уровне фибрилл 30 нм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно современным представлениям, растянутая хроматиновая фибрилла – «бусы на нитке» (первичный уровень структуры хроматина) – может сворачиваться в более компактную вторичную структуру через межнуклеосомные взаимодействия. *In vitro* этот процесс требует присутствия катионов и N-концов кор-гистонов [24, 25]. Предполагается, что вторичная структура стабилизируется линкерными гистонами [26, 27]. Третичная структура включает как локальные, так и дистальные межнуклеосомные взаимодействия. Третичную структуру хроматина, о которой мало что известно *in vivo*, обычно моделируют *in vitro* путем самоассоциации (олигомеризации) хроматиновых фибрилл, что ранее называлось агрегацией или осаждением хроматина [24]. Мы изучали структурные переходы, имеющие место при декомпактизации хроматина в ядре. Предполагают, что *in vivo* эти процессы реализуются при активации транскрипции.

Как следует из данных ЭМ, в ядрах печени крысы в 20 мМ ТЭА-буфере (рН 7,5) с 1 мМ Mg²⁺ и в диапазоне 2–5 мМ Mg²⁺ представлены соответственно вторичный (30 нм) и третичный (100–200 нм) уровни упаковки хроматина. Ядра в этих условиях были использованы нами для изучения структурных переходов хроматина. Положительно заряженный антибиотик ДМ, который взаимодействует с АТ-богатыми областями ДНК в хроматине в ее малой бороздке [21, 28], позволил следить за этими переходами методом КД. Известно, что ДМ не вносит (в отличие от интеркалирующих красителей) существенных искажений в структуру ДНК [20] и не меняет ЭМ-картину хроматина в ядрах. Однако характерный для комплекса ДМ–ДНК спектр КД в случае ядер имеет свои особенности. Несмотря на то, что во всех ядрах реализуется посадка молекул ДМ на все возможные места связывания, уровень сигнала КД оказывается намного ниже, чем для чистой ДНК. Тот факт, что этот уровень меняется при структурных переходах хроматина, позволил нам считать ДМ удобным маркером изменения структуры хроматина в ядре.

Из данных КД следует, что при $[Mg^{2+}] = 2-5$ мМ ядра имеют одинаковый уровень сигнала $\Delta A_{320-340}$ при насыщающей концентрации ДМ (ДМ/ДНК = 0,1). Отсутствие изменений в КД в этом диапазоне концентраций Mg^{2+} указывает на то, что взаимодействие ДМ с хроматином не зависит от концентрации Mg^{2+} , а определяется структурой хроматина. ЭМ-наблюдения показали, что при снижении концентрации Mg^{2+} от 2 до 1 мМ, когда происходит разворачивание хроматина до фибрилл 30 нм, наблюдается достоверное возрастание $\Delta A_{320-340}$. Возможной причиной возрастания КД может явиться выпрямление линкерной ДНК, приводящее к усилению продуктивности связывания ДМ [28]. Это предположение согласуется также с обсуждаемой сейчас моделью гетероморфной структуры фибриллы хроматина 30 нм [29, 30], в которой чередуются соленоидальные изогнутые линкеры и двустартовые выпрямленные линкеры, изменением соотношения которых при деконденсации хроматина может объясняться увеличение поглощения КД при $A_{320-340}$.

В экспериментах *in vitro* на выделенном хроматине было установлено, что ПГ способна связываться с N-концами гистонов, нарушая ДНК-гистоновые взаимодействия и приводя к компактизации хроматина. Известно, что среди гистонов ПГ преимущественно экстрагирует из хроматина гистон Н1 [31]. Ранее мы показали, что она также преимущественно экстрагирует Н1 из интерфазных ядер [15]. Полимерность полианиона может ограничивать его доступ в плотно упакованные структуры ядерного хроматина. Поэтому можно представить, что экстракция с помощью ПГ гистона Н1 из хроматина происходит прежде всего с его поверхности, которая в разных его структурах различается. В то же время с помощью ЭМ мы наблюдаем в присутствии ПГ деконденсацию хроматина до различных уровней. Поэтому суммарный выход Н1, вероятно, является результатом по крайней мере двух процессов: первичной экстракции Н1 из исходной структуры хроматина и последующей экстракции вновь доступного Н1 в результате разворачивания хроматина.

Подтверждением этому служат данные по временной зависимости выхода Н1 из ядер при разных концентрациях Mg^{2+} . Уже за 1–2 мин для одной и той же исходной конденсированной структуры хроматина при 2–5 мМ Mg^{2+} выход Н1 различается в несколько раз. Это означает, что не только первичная экстракция Н1 с поверхности хроматина, но и разворачивание структуры с дальнейшей экстракцией вновь доступного Н1 укладываются в интервал 1–2 мин. В течение последующих 15–20 мин перед выходом

кривых на плато при всех концентрациях Mg^{2+} дополнительно выделяется около 5–8% Н1. Мы полагаем, что на поверхности всех структур существует одна и та же доступная для ПГ, но относительно более прочно связанная и медленнее экстрагируемая ПГ фракция Н1. Только при 2 мМ Mg^{2+} количество экстрагированного Н1 за 2–20 мин, как и общее время достижения равновесия, несколько увеличены. Возможно, потому, что только при этой концентрации Mg^{2+} разворачивание хроматина проходит в два этапа (от глобул 100–200 нм до фибрилл 30 нм и далее до нуклеосомных цепочек) и требует больше времени.

Сравнение полученных результатов по выходу Н1 с данными ЭМ показывает, что каждая стадия деконденсации хроматина, наблюдаемая ЭМ, коррелирует с экстракцией определенного количества гистона Н1. Так, удаление примерно 1/8 тотального Н1 из ядер в 5 мМ Mg^{2+} (глобулы 100–200 нм) практически не выявляет изменений хроматиновой структуры. Конденсированная структура сохраняется при экстракции до ~20% тотального гистона Н1. В то же время экстракция около или больше 1/4 от суммарного Н1 из ядер в 3 мМ Mg^{2+} (также глобулы 100–200 нм) разворачивает хроматин до 30 нм, что проявляется и в увеличении амплитуды КД. При действии ПГ на ядра в 2 мМ Mg^{2+} (также глобулы 100–200 нм), когда выход гистона Н1 возрастает до 45–50%, хроматин уже деконденсируется до нуклеосомного состояния, хотя фибриллы 10 нм еще плотно упакованы друг с другом. Дальнейшее расхождение нуклеосомных фибрилл происходит при удалении 55–60% Н1 из ядер в 1 мМ Mg^{2+} или без Mg^{2+} . Таким образом, удаление одних фракций Н1 может не влиять на структуру хроматина, тогда как экстракция других фракций приводит к ее изменению. Можно предположить, что различные по прочности связи фракции гистона Н1 могут участвовать в поддержке (стабилизации) определенных уровней упаковки хроматина.

Интересно, что даже при полной доступности Н1 для ПГ в ядрах с нуклеосомной структурой хроматина, полученной обработкой ЭДТА, присутствует значительный (больше 30% Н1) неэкстрагируемый ПГ (ПГ/ДНК = 6) пул Н1. По-видимому, он связан с ДНК хроматина более прочно и, возможно, находится на специфических последовательностях ДНК. Основная часть этого пула (до 25% тотального Н1) может быть экстрагирована ПГ в присутствии ДМ (ДМ/ДНК = 0,1). Тем не менее остаются неэкстрагированными еще 5–10% Н1, которые, возможно, связаны с GC-богатыми нуклеосомными линкерами ДНК. Следует заметить, что в ра-

ботах Кас с соавт. [23] и Гассер с соавт. [32] сообщалось, что из метафазных хромосом клеток HeLa в сходных с нашими условиях ПГ экстрагировала Н1 до 90%, а в присутствии ДМ — практически до 100%. По-видимому, конденсированный хроматин в интерфазном ядре может отличаться от метафазной хромосомы по ряду свойств и способу упаковки.

Присутствие ДМ, который, как и Н1, предпочтительнее связывается с АТ-областями ядерного хроматина, приводит к возрастанию выхода Н1 при действии ПГ. При насыщающей концентрации ДМ (ДМ/ДНК = 0,1) мы наблюдали резкий, коррелирующий с выходом Н1, подъем $\Delta A_{320-340 \text{ max}}$ при переходе от 4 к 1 мМ Mg^{2+} . Мы полагаем, что причиной этого эффекта является превращение «непродуктивно» связанного в ядрах ДМ в «продуктивное» состояние из-за появившейся возможности ДМ взаимодействовать с ДНК большим количеством пиррольных колец и, соответственно, образовывать большее число водородных связей в минорной бороздке ДНК. В работе Крылова с соавт. [33] было показано, что аналоги ДМ с уменьшенным количеством пиррольных колец проявляют пониженные оптические свойства, что, по-нашему, и определяет «непродуктивность» его взаимодействия с ДНК.

Нужно отметить заметную разницу в чувствительности к ДМ и ПГ экстракции Н1 в присутствии Mg^{2+} или полиаминов. При одной и той же низкой ионной силе раствора и одинаковой исходной структуре хроматина (30 нм) в нашей предыдущей работе [15] в случае полиаминов наблюдался более высокий эффект ДМ, но более слабое действие ПГ. Можно предположить, что полиамины сильнее, чем Mg^{2+} , удерживают глобулярный домен Н1, а Mg^{2+} , возможно, сильнее, чем полиамины, конкурирует с ДМ за минорную бороздку ДНК. Разность в конденсации хроматина ионами магния и полиаминами отмечалась ранее [34].

В настоящее время нет единого мнения о роли гистона Н1 в ядре [10]. Полагают, что этот наиболее представленный в ядре белок либо непосредственно участвует в образовании наднуклеосомной структуры хроматина *in vivo*, либо, по крайней мере, стабилизирует ее. Известно также, что *in vivo* гистон Н1 в ядре проявляет высокодинамичное поведение [9, 10] и подвергается посттрансляционным ковалентным модификациям [35]. Кроме того, показано, что Н1 способен взаимодействовать более чем со 100 различными белками ядра [36]. Все эти данные позволяют предполагать, что гистон Н1 может служить основой для образования сложной и динамичной сети взаимодействий, приводящих

к локальным или глобальным изменениям структуры хроматина.

Из результатов данной работы следует, что деконденсация хроматина не всегда коррелирует с экстракцией Н1. Так, например, при 2 мМ Mg^{2+} увеличение экстракции Н1 на 20–25% в присутствии ДМ при ПГ/ДНК = 6 не ведет к увеличению разворачиваемости хроматина (рис. 1, в), как это происходит в отсутствие ДМ (рис. 1, ж), а, наоборот, уменьшает ее. Нужно отметить, что гистону Н1, локализованному на АТ-богатых последовательностях, некоторые авторы приписывают особую роль в организации структуры хроматина, предполагая там образование «центров нуклеации» из кооперативно связанных молекул Н1, разрушение которых приводит к деконденсации и соседних областей хроматина [23]. Согласно нашим результатам, удаление Н1 с ДМ-чувствительных АТ-богатых участков хроматина не приводит к деконденсации хроматина до нуклеосомного уровня, по-видимому, из-за экранирования положительно заряженными молекулами ДМ появившихся отрицательных зарядов на хроматине. Точно так же обработка ядер ПГ в соотношении ПГ/ДНК = 20 при 5 мМ Mg^{2+} , когда экстрагируется 50% Н1, не приводит к деконденсации до нуклеосомных фибрилл, хотя при таком же уровне экстракции, но 1–2 мМ Mg^{2+} и ПГ/ДНК = 6 хроматин полностью разворачивается. В данном случае более высокая концентрация Mg^{2+} , а также «crowding»-эффект повышенной концентрации ПГ препятствуют разворачиванию хроматина. Удаление более 75% Н1 при дальнейшем увеличении концентрации ПГ все же приводит к разворачиванию хроматина, хотя нуклеосомные фибриллы остаются в плотном контакте друг с другом, по-видимому, из-за того же «crowding»-эффекта среды. По нашему мнению эти результаты подтверждают данные последних лет о том, что гистон Н1 не играет основную роль в компактизации хроматина, а только способствует организации хроматина и поддержке его в компактном состоянии. Основную же роль в конденсации хроматина в ядре играют концы кор-гистонов.

Полученные результаты показывают также, что фракции или пулы гистона Н1 обладают широким диапазоном прочности связывания в ядре. По нашим данным это не подтипы гистона Н1, имеющие, как известно, разную силу взаимодействия с ДНК, но фракции (пулы), включающие разные подтипы [15]. Их существование может быть связано с регулярным расположением в хроматине и определять разный уровень упаковки. Последние представления о структуре высших уровней компактизации хроматина, полученные с помощью компьютерных

построений, а также представления об отсутствии дискретных уровней упаковки [2–4] предполагают скорее одинаковую локализацию молекул гистона H1, которые в таком случае не должны иметь различий в прочности связывания. Это относится как к одностартовой, так и двустартовой моделям хроматина с расположением гистона H1 внутри фибриллы. Трудно представить, что в этом случае молекулы H1 могут обладать таким широким диапазоном прочности взаимодействия, а также, находясь внутри фибриллы, иметь такое множество взаимодействий с различными

белками [36]. Таким образом, наши результаты свидетельствуют скорее о существовании дискретно-петлевых уровней упаковки хроматина, для организации каждого из них необходимо расположение отдельных пулов гистона H1 в определенных периодически повторяющихся местах фибриллы хроматина и иметь при этом не только внутрифибрилярное расположение, но и располагаться снаружи хроматина.

Авторы выражают благодарность А.М. Арутюняну за помощь в измерении КД.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Поляков В.Ю., Зацепина О.В., Киреев И.И., Прусов А.Н., Файс Д., Шеваль Е.В., Коблякова Ю.В., Голышев С.А., Ченцов Ю.С. (2006) Структурно-функциональная модель митотической хромосомы, *Биохимия*, **71**, 6–16.
- Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S., and Nozaki, T. (2014) Chromatin as dynamic 10-nm fibers, *Chromosoma*, **123**, 225–237.
- Hansen, J.C. (2012) Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre, *EMBO J.*, **31**, 1621–1623.
- Grigoryev, S.A., and Woodcock, C.L. (2012) Chromatin organization – the 30 nm fiber, *Exp. Cell Res.*, **318**, 1448–1455.
- Simpson, R.T., Thoma, F., and Brubaker, J.M. (2006) Chromatin reconstituted from tandemly repeated cloned DNA fragments and core histones: a model system for study of higher order structure, *Cell*, **42**, 799–808.
- Илатовский А.В., Лебедев Д.В., Филатов М.В., Петухов М.Г., Исаев-Иванов В.В. (2012) Современные представления о структурной организации хроматина, *Цитология*, **54**, 298–305.
- Евдокимов Ю.М., Сялянов В.И., Скуридин С.Г. (2007) Жидкокристаллические формы ДНК. Часть I. Конденсированное состояние ДНК *in vivo* и *in vitro*, *Технологии живых систем*, **4**, 3–30.
- Schnell, S., and Hancock, R. (2008) The intranuclear environment, *Methods Mol. Biol.*, **463**, 3–19.
- Th'ng, J.P., Sung, R.Ye.M., and Hendzel, M.J. (2005) H1 family histones in the nucleus. Control of binding and localization by the C-terminal domain, *J. Biol. Chem.*, **280**, 27809–27814.
- Harshman, W., Young, N.L., Parthun, M.R., and Freitas, M.A. (2013) H1 histones: current perspectives and challenges, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 9593–9609.
- Luger, K., and Hansen, J.C. (2005) Nucleosome and chromatin fiber dynamics, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 188–196.
- Maeshima, K., Hihara, S., and Eltsov, M. (2010) Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist *in vivo*, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 291–297.
- Kiryakov, G.I., Manamshjan, T.A., Polyakov, V.Yu., Fais, D., and Chentsov, Yu.S. (1976) Levels of granular organization of chromatin fibres, *FEBS Lett.*, **67**, 323–327.
- Прусов А.Н., Смирнова Т.А., Коломийцева Г.Я. (2013) Влияние структуры хроматина, антибиотиков и эндогенного метилирования гистонов на фосфорилирование гистонов H1 и H3 в присутствии протеинкиназы А в ядрах печени крысы *in vitro*, *Биохимия*, **78**, 243–253.
- Прусов А.Н., Смирнова Т.А., Коломийцева Г.Я. (2010) Влияние дистамицина, хромомицина и УФ-света на экстракцию полиглутаминовой кислотой гистона H1 из ядер печени крысы, *Биохимия*, **75**, 1508–1521.
- Спирин А.С. (1976) Спектрофотометрическое определение суммарных нуклеиновых кислот, *Биохимия*, **23**, 656–661.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680–685.
- Olins, D.E., and Olins, A.L. (1972) Physical studies of isolated eucariotic nuclei, *J. Cell Biol.*, **58**, 715–736.
- Wagner, T., and Spelsberg, T.C. (1971) Aspects of chromosomal structure. I. Circular dichroism studies, *Biochemistry*, **10**, 2599–2605.
- Sen, D., and Crothers, D.M. (1986) Condensation of chromatin: role of multivalent cations, *Biochemistry*, **25**, 1503–1509.
- Abu-Daya, A., Brown, P.M., and Fox, K.R. (1995) DNA sequence preferences of several AT-selective minor groove binding ligands, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3385–3392.
- Mir, M.A., Majee, S., Das, S., and Dasgupta, D. (2003) Association of chromatin with anticancer antibiotics, mithramycin and chromomycin A₃, *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 2791–2801.
- Kas, E., Poljak, L., Adachi, Y., and Laemmli, U. (1993) A model for chromatin opening: stimulation of topoisomerase II and restriction enzyme cleavage of chromatin by distamycin, *EMBO J.*, **12**, 115–126.
- Lu, X., Klonovsky, J.M., Resch, M.G., and Hansen, J.C. (2006) *In vitro* chromatin self-association and its relevance to genome architecture, *Biochem. Cell Biol.*, **84**, 411–417.
- Zheng, C., and Hayes, J.J. (2003) Intra- and inter-nucleosomal protein-DNA interactions of the core histone tail domains in a model system, *J. Biol. Chem.*, **278**, 24217–24224.
- Yao, J., Lowery, P.T., and Widom, J. (1991) Linker DNA bending induced by the core histones of chromatin, *Biochemistry*, **30**, 8404–8414.
- Collepardo, R., and Schlick, T. (2012) Crucial role of dynamic linker histone binding and divalent ions for DNA accessibility and gene regulation revealed by mesoscale modeling of oligonucleosomes, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8803–8817.
- Melnikova, A.F., Zasedatelev, A.S., Kolchinsky, A.M., Gursky, G.V., Zhuze, A.L., Grochovsky, S.L., and

- Mirzabekov, A.D. (1975) Accessibility of the minor groove of DNA in chromatin to the binding of antibiotics netropsin and distamycin A, *Mol. Biol. Rep.*, **2**, 135–142.
29. Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J. (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 436–447.
30. Robinson, P.J.J., Fairall, L., Huynh, V.A.T., and Rhodes, D. (2006) EM measurements define the dimensions of the «30-nm» chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 6506–6511.
31. Villeponteau, B. (1992) Heparin increases chromatin accessibility by binding the trypsin-sensitive basic residues in histones, *Biochem. J.*, **288**, 953–958.
32. Gasser, S.M., Laroche, T., Falquet, J., Boy de la Tour, E., and Laemmli, U.K. (1986) Methaphase chromosome structure. Involvement of topoisomerase II, *J. Mol. Biol.*, **188**, 613–629.
33. Krylov, A.S., Grokhovsky, S.L., Zasedatelev, A.S., Zhuze, A.L., Gursky, G.V., and Gottikh, B.P. (1979) Quantitative estimation of the contribution of pyrrolcarboxamide groups of the antibiotic distamycin A into specificity of its binding to DNA AT pairs, *Nucleic Acids Res.*, **6**, 289–304.
34. Frutos, M., Paspaud, E., Leforestier, A., and Livolant, F. (2001) Aggregation of nucleosomes by divalent cations, *Biophys. J.*, **81**, 1127–1132.
35. Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function, *Cell*, **23**, 693–705.
36. Kalashnikova, A.A., Winkler, D.D., McBryant, S.J., Henderson, R.K., Herman, J.A., DeLuca, J.G., Luger, K., Prenni, J.E., and Hansen, J.C. (2013) Linker histone H1.0 interacts with an extensive network of proteins found in the nucleolus, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4026–4035.

EXTRACTION OF HISTONE H1 AND DECONDENSATION OF NUCLEAR CHROMATIN WITH DIFFERENT Mg-DEPENDENT ORGANIZATION LEVELS UNDER TREATMENT WITH POLYGLUTAMIC ACID AND DISTAMYCIN

A. N. Prusov*, T. A. Smirnova, G. Ya. Kolomijtseva

*M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky
Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991,
Russia; fax: +7(495)939-3181, E-mail: prusov@belozersky.msu.ru*

Received September 27, 2014
Revision received October 21, 2014

Chromatin in rat liver nuclei under conditions of low ionic strength (20–25 mM) and $[Mg^{2+}]$ from 2 to 5 mM has a condensed structure (100–200 nm globules) and gives the same CD signal (320–340 nm) of its complex with the antibiotic distamycin A (DM). Reducing $[Mg^{2+}]$ to 1 mM leads to chromatin decondensation to 30 nm structures and increases the CD signal. At 5 mM Mg^{2+} , poly-L-glutamic acid (PG) at weight ratio PG/DNA = 6 extracted ~1/8 of nuclear histone H1, preserving the condensed chromatin structure. Removal of ~1/4 H1 at 3 mM Mg^{2+} leads to chromatin decondensation to 30 nm fibrils. Extraction of about half of histone H1 at $[Mg^{2+}] = 2$ mM results in chromatin refolding to nucleosome fibrils. PG-decondensation leads to a significant increase in the CD signal. The main H1 extraction occurs in 1–2 min, but at all Mg^{2+} concentrations, a more slowly PG-extracted fraction is found comprising 5–7% of nuclear H1. About 25% of leaving nuclear H1 can be extracted by PG in the presence of saturating DM concentration (molar DM/DNA = 0.1). Extraction of H1 from all nuclei depends on PG concentration. However, even at high weight ratio PG/DNA = 30 and DM/DNA = 0.1, about 5–10% of histone H1 remained in the nuclei. Decondensation of chromatin in the nucleus is not always proportional to the yield of extracted histone H1 and is attenuated in the presence of positively charged DM or high concentrations of PG. Our results indicate that the interaction of DM with chromatin depends on chromatin packaging, while the PG extraction depends on $[Mg^{2+}]$ supporting this packaging.

Key words: cell nuclei, chromatin, levels of structural organization, distamycin, polyglutamic acid, histone H1, circular dichroism