

УДК 577.323

КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ ПРОФЛАВИНА С ДНК ИЗ МОЛОК ЛОСОСЯ**А.С. Хребтова¹, Е.В. Духопельников¹, Е.Г. Березняк¹, Н.А. Гладковская¹,
А.В. Зинченко²**¹*Институт радиопластики и электроники НАН Украины, ул.Ак.Проскуры, 12, г.Харьков, 61085*²*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул.Переяславская, 23, г.Харьков, 61015*
berez@ire.kharkov.ua

Поступила в редакцию 28 октября 2010 г.

Принята 8 ноября 2010 г.

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и спектрофотометрии исследовано взаимодействие профлавиона с ДНК из молок лосося в растворах с ионной силой $I=0,02$ М и $I=0,1$ М. Анализ экспериментальных спектров поглощения проведен с помощью изотерм связывания в координатах Скэтчарда. Методом ДСК получены параметры плавления ДНК в составе комплексов с профлавином. Показано, что профлавион образует с ДНК два типа комплексов. Термодинамическое состояние ДНК в составе этих комплексов отличается. Получено полное термодинамическое описание связывания профлавиона с ДНК по типу интеркаляции. Величины констант связывания, рассчитанные из данных калориметрии, согласуются со спектрофотометрическими результатами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: калориметрия, спектрофотометрия, ДНК, профлавион, комплексообразование.

КАЛОРИМЕТРИЧНЕ ТА СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ПРОФЛАВІНУ З ДНК ІЗ МОЛОК ЛОСОСЯ**Г.С. Хребтова¹, Е.В.Духопельников¹, К.Г. Березняк¹, Н.О. Гладковська¹, О.В. Зінченко².**¹*Інститут радіофізики та електроніки НАН України, вул.Ак.Проскури, 12, м.Харків, 61085*²*Інститут проблем криобіології та криомедицини НАН України, вул.Переяславська, 23, м.Харків, 61015*

Методами диференційної скануючої калориметрії (ДСК) і спектрофотометрії досліджено взаємодію профлавіну з ДНК із молок лосося в розчинах з іонною силою $I=0,02$ М та $I=0,1$ М. Аналіз експериментальних спектрів поглинання проводився за допомогою ізотерм зв'язування в координатах Скетчарда. Методом ДСК отримані термодинамічні параметри плавлення ДНК у складі комплексів. Показано, що профлавін утворює на ДНК два типи комплексів. ДНК у складі цих комплексів знаходиться у різному термодинамічному стані. Отримано повний термодинамічний опис для зв'язування профлавіну з ДНК за інтеркаляційним типом. Параметри комплексоутворення, що розраховано з калориметричних даних, співпадають із спектрофотометричними результатами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: калориметрія, спектрофотометрія, ДНК, профлавін, комплексоутворення.

CALORIMETRIC AND SPECTROSCOPIC INVESTIGATION OF PROFLAVINE - SALMON TESTES DNA BINDING**A.S. Khrebtova¹, Ye.V. Dukhopelnykov¹, E.G. Bereznyak¹, N.A. Gladkovskaya¹, A.V. Zinchenko²**¹*Institute of Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine, 12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine*²*Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya st., Kharkov, 61015*

The interaction of proflavine with salmon testes DNA is investigated by differential scanning calorimetry (DSC) and spectrophotometry in solutions with ionic strength $I=0,02$ M and $I=0,1$ M. We have applied the Scatchard formalism to analyze the spectrophotometric data. The thermodynamic melting parameters of DNA in the complexes with proflavine are obtained from DSC data. It is shown that proflavine forms two different types of complexes on DNA. The thermodynamic properties of double helix in these complexes are different. The complete thermodynamic profile for proflavine intercalation is obtained. Binding parameters for intercalation determined from calorimetric and spectrophotometric data are in a good agreement.

KEY WORDS: calorimetry, spectrophotometry, proflavine, DNA, complexation.

Для понимания терапевтического действия уже существующих и создания новых лекарственных препаратов необходимо исследование структуры и стабильности их комплексов с биомолекулами-мишенями. Акридин и многие его производные, в том

числе профлавинов (Pf), при связывании с ДНК проявляют мутагенные и бактериостатические свойства [1]. Взаимодействие профлавина с ДНК изучалось с помощью различных физических и биохимических методов [2-11]. Было показано, что в зависимости от ионной силы и соотношения концентраций ДНК и Pf (P/D), могут образовываться два различных типа комплексов [7]. В частности, при низких значениях P/D формируется внешний тип комплексов, а при высоких - комплексы по типу интеркаляции [8,9].

Хорошо известно, что интеркаляционный тип взаимодействия существенно влияет на структуру ДНК. Например, связывание Pf по типу интеркаляции вызывает раскручивание В-формы ДНК приблизительно на 17° и удлинение дуплекса двойной спирали [10,11]. Такие изменения в структуре ДНК приводят к тому, что термодинамические характеристики и параметры перехода спираль-клубок при плавлении свободной ДНК и ДНК в комплексе с лигандом могут различаться. Однако, влияние Pf на термодинамическое состояние ДНК изучено недостаточно.

Прямым методом измерения энергетических характеристик плавления ДНК является калориметрия. В данной работе комплексообразование Pf с ДНК из молок лосося в широком интервале соотношения концентраций исследовано с помощью метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Стехиометрия комплексообразования в системе определялась методом спектрофотометрии в видимой области спектра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы коммерческая ДНК из молок лосося фирмы "Sigma" (содержание GC-пар 42%) и профлавинов (Pf) фирмы "Sigma" без дополнительной очистки. Структурная формула Pf приведена на рис. 1. Все исследования смесей Pf – ДНК проведены в фосфатных буферных растворах ($2,5 \times 10^{-3}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-3}$ М Na_2HPO_4 , pH=6,86) с добавлением NaCl (ионная сила I=0,02 М и I=0,1 М).

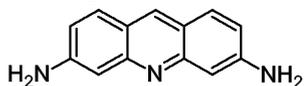


Рис. 1. Структурная формула профлавина.

Измерения спектров поглощения смесей Pf – ДНК при разных значениях P/D проведены на спектрофотометре "Specord M40" (Германия) в видимой области спектра. При определении концентрации профлавина (D) и ДНК из молок лосося в молях нуклеотидов (P) использованы значения молярных коэффициентов экстинкции $\epsilon_{444}=4,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [12] и $\epsilon_{260}=6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [13], соответственно.

Измерения теплопоглощения свободной ДНК и ДНК в комплексах с Pf проведены на дифференциальном сканирующем микрокалориметре DASM-4 с объемом измерительной ячейки 0,4553 мл при скорости прогрева растворов 1 град/мин. Концентрация ДНК в исследуемых растворах составляла $P=3 \times 10^{-3}$ М. Изменения энтальпии (ΔH), энтропии (ΔS) и свободной энергии Гиббса (ΔG) для процесса тепловой денатурации ДНК рассчитаны на моль нуклеотидов по уравнениям (1-3):

$$\Delta H = \int \delta C_p dT \quad (1), \quad \Delta S = \int \frac{\delta C_p}{T} dT \quad (2), \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3).$$

Температура плавления T_m представляет собой температуру, при которой степень спиральности ДНК (α) равна 1/2. Степень спиральности α из данных ДСК определяется как

$$\alpha(T) = \frac{\int_{T_1}^T \delta C_p dT}{\int_{T_1}^{T_2} \delta C_p dT} \quad (4)$$

где T_1 и T_2 – температуры начала и конца перехода, соответственно.

Ширина интервала плавления ΔT была получена по формуле:

$$\Delta T = -\frac{1}{\left(\frac{d\alpha}{dT}\right)_{T=T_m}} \quad (5)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2,а,б приведены спектры поглощения смесей Pf–ДНК в растворах с ионной силой $I=0,02$ М и $I=0,1$ М. Анализ экспериментальных спектров поглощения проводился с помощью изотерм связывания в координатах Скэтчарда – r/C_f от r , где r – количество связанного лиганда на одну мономерную единицу макромолекулы, а C_f – равновесная концентрация свободного лиганда (рис.3,а,б).

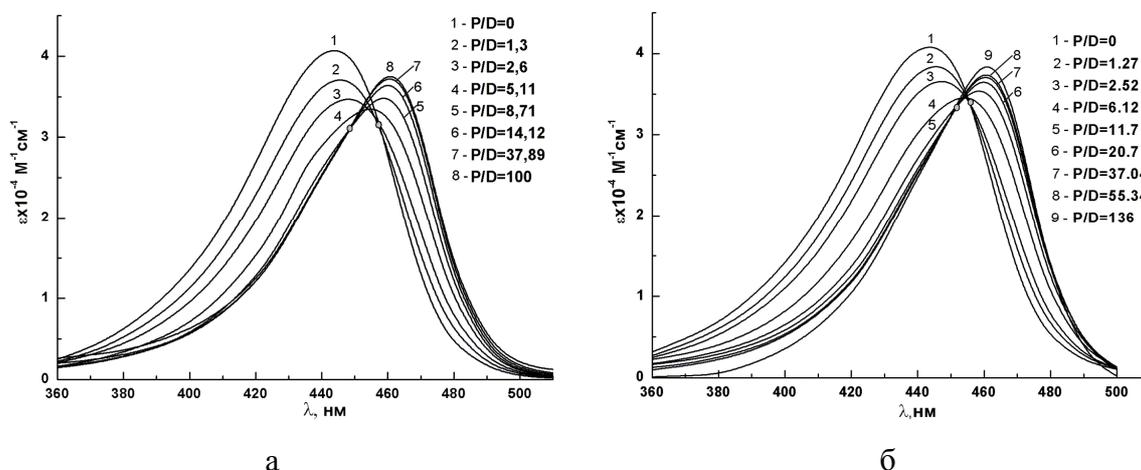


Рис. 2. Спектры поглощения смесей Pf–ДНК при различных концентрациях ДНК в растворах с ионной силой $I=0,02$ М при $D=3,2 \times 10^{-5}$ М (а) и $I=0,1$ М при $D=2,06 \times 10^{-5}$ М (б).

Видно, что в системе Pf–ДНК присутствуют более чем два по-разному поглощающих компонента как в растворе с низкой, так и с высокой ионной силой (рис.2,а,б). Это следует из того, что изобестическая точка, появляющаяся в области низких значений P/D ($\lambda=457$ нм, $\epsilon_{457}=3,14 \times 10^4$ М⁻¹см⁻¹ для $I=0,02$ М и $\lambda=456$ нм, $\epsilon_{456}=3,4 \times 10^4$ М⁻¹см⁻¹ для $I=0,1$ М), исчезает с ростом концентрации ДНК. При дальнейшем увеличении P/D происходит рост поглощения и смещение полосы в длинноволновую область ($\lambda_{\max}=460$ нм), и появляется новая изобестическая точка ($\lambda=449$ нм, $\epsilon_{449}=3,11 \times 10^4$ М⁻¹см⁻¹ для $I=0,02$ М и $\lambda=452$ нм, $\epsilon_{452}=3,33 \times 10^4$ М⁻¹см⁻¹ для $I=0,1$ М).

Полученные нами изотермы Скэтчарда имеют несимметричную колоколообразную форму (рис.3,а,б). При низких значениях r ($r < 0,07$) наклон изотерм положителен, что объясняется кооперативностью связывания [14,15]. При более высоких значениях r ($r > 0,07$) изотермы имеют отрицательный наклон, и связывание происходит некооперативно. Форма этого участка изотерм может быть описана с помощью простой модели исключенного соседа, предложенной МакГи и фонХиппелом [16]. Такой анализ системы Pf - фаговая ДНК был проведен для определения параметров связывания в узком интервале соотношения концентраций в работе [17]. В случае, когда изотермы Скэтчарда имеют несимметричную колоколообразную форму как на рис.3,а,б или в работах [14,15], и требуется рассмотреть взаимодействие в широком интервале P/D , то одного уравнения связывания недостаточно. Было показано, что в таком случае комплексообразование может быть корректно описано в рамках аллостерической модели, предложенной Крозерсом [18], или с помощью двух независимых уравнений МакГи для

кооперативного и некооперативного связывания. Подобный подход применялся для расчета констант (K) и величин мест связывания (n) в работах [14,15] для взаимодействия с ДНК митоксантрона, актиномицина D, m-AMSA и др. лигандов.

Однако, использование двух уравнений МакГи для аппроксимации изотермы связывания приводит к появлению большого количества варьируемых параметров и неоднозначности их определения. Поэтому для анализа небольшого участка изотермы нами было использовано уравнение МакГи для кооперативного связывания [16]. Получены следующие параметры комплексообразования Pf с ДНК: $n=7\pm 0,5$ нуклеотидов, $K\omega=(1,2\pm 0,5)\times 10^5 \text{ M}^{-1}$ при $I=0,02 \text{ M}$ и $n=7\pm 0,5$ нуклеотидов, $K\omega=(5,7\pm 0,5)\times 10^5 \text{ M}^{-1}$ при $I=0,1 \text{ M}$ (ω -фактор кооперативности). Величины констант и мест связывания характерны для интеркаляционного типа взаимодействия и согласуются с данными работ [2-8].

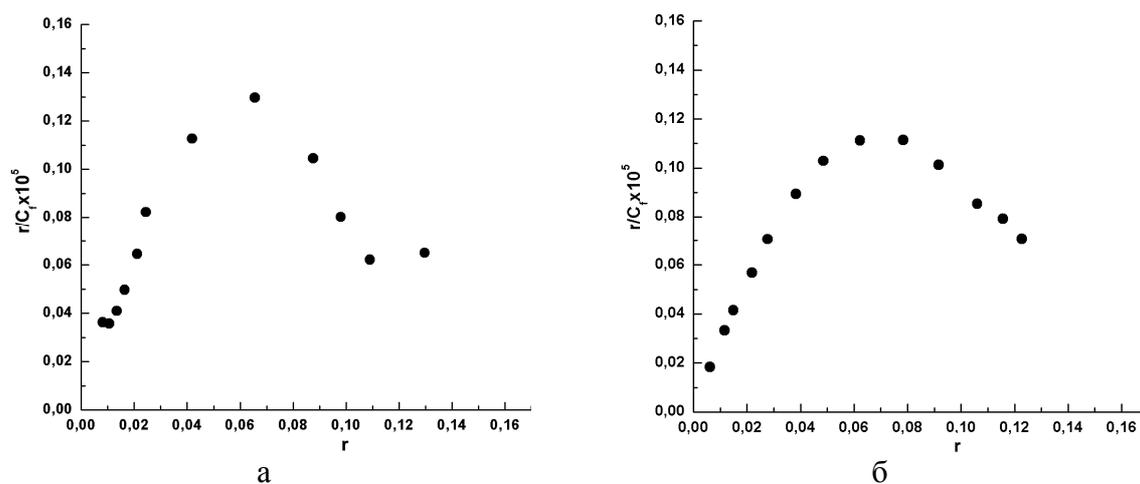


Рис.3. Изотермы Скэтчарда ($\lambda=445 \text{ nm}$) для смесей Pf–ДНК в растворах с ионной силой $I=0,02 \text{ M}$ (а) и $I=0,1 \text{ M}$ (б).

На рис.4,а,б представлены результаты микрокалориметрической регистрации процесса теплопоглощения свободной ДНК и ДНК в составе комплексов с профлавином в растворах с ионной силой $I=0,02 \text{ M}$ и $I=0,1 \text{ M}$, соответственно. Видно, что при добавлении профлавина кривая теплопоглощения становится двухфазной и смещается в область более высоких температур. При этом интенсивность высокотемпературного пика, соответствующего плавлению ДНК в составе комплекса с Pf, возрастает. При полном насыщении матрицы лигандом кривая теплопоглощения вновь становится однофазной.

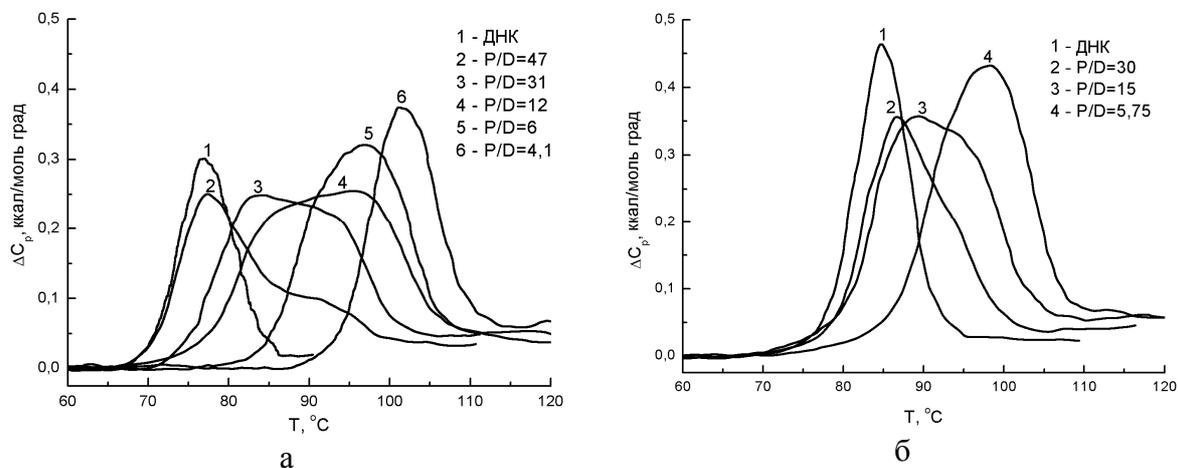


Рис. 4. Дифференциальные кривые теплопоглощения свободной ДНК и ДНК в составе комплексов с Pf при различных значениях P/D ($P\approx 3\times 10^{-3} \text{ M}$) в растворах с ионной силой $I=0,02 \text{ M}$ (а) и $I=0,1 \text{ M}$ (б).

Термодинамические параметры плавления ДНК в составе комплексов с профлавином получены из кривых теплопоглощения по уравнениям (1–3). Значения $T\Delta S$ и ΔG рассчитаны при 25°C . Зависимости ΔH , $T\Delta S$ и ΔG от относительной концентрации Pf (D/P) представлены на рис. 5, а, б.

Для выяснения влияния Pf на состояние полинуклеотидной матрицы нами также проведена оценка размера кооперативной единицы m . Величина m показывает среднее количество нуклеотидов, плавление которых можно описать по модели двух состояний [20]. Значение m определяется как отношение энтальпии Вант Гоффа к энтальпии, полученной из калориметрических данных по уравнению (2). ΔH_{vH} рассчитана из кривых теплопоглощения по формуле:

$$\Delta H_{vH} = -6R \left[\frac{\partial \alpha}{\partial (1/T)} \right]_{T=T_m} \quad (6)$$

где α – степень спиральности ДНК, полученная по уравнению (4). Зависимость m от D/P показана на рис. 5, в.

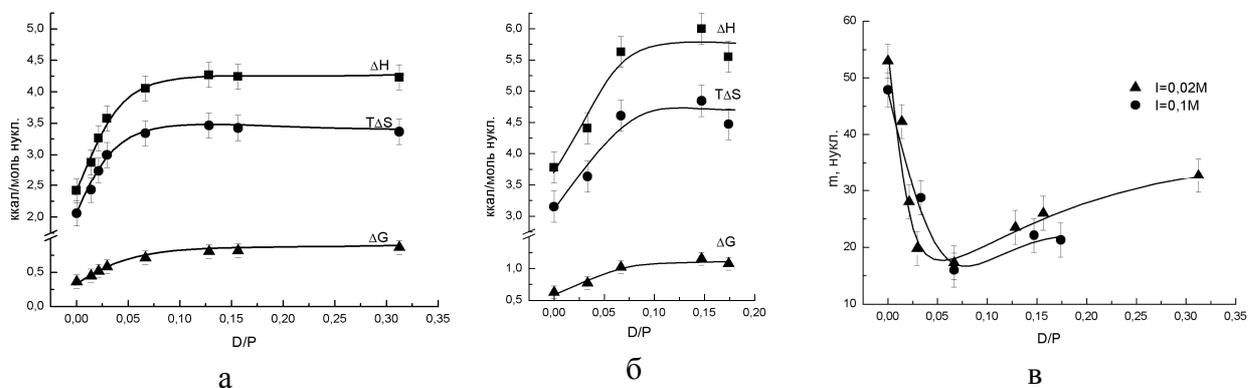


Рис. 5. Зависимость термодинамических параметров плавления ДНК ΔH , $T\Delta S$ ΔG в растворах с ионной силой $I=0,02\text{M}$ (а) и $I=0,1\text{M}$ (б) и размера кооперативной единицы m (в) в составе комплексов Pf - ДНК от относительной концентрации лиганда (D/P).

На рис.6 представлены зависимости температуры плавления T_m (а) и ширины интервала плавления ΔT (б) ДНК в комплексах с Pf от D/P.

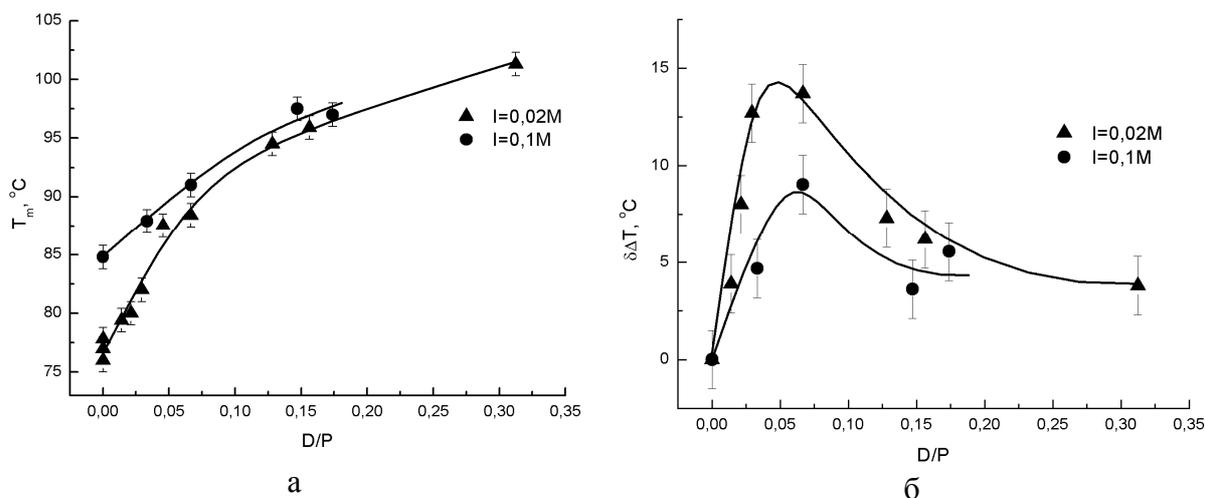


Рис.6. Зависимости температуры плавления T_m (а) и ширины интервала плавления ΔT (б) ДНК в составе комплексов с Pf от D/P.

Из зависимостей, представленных на рис.5 и рис.6,б, видно, что как при низкой, так и

при высокой ионной силе термодинамические параметры плавления ДНК в интервалах $D/P < 0,07$ и $D/P > 0,07$ изменяются по-разному. Следует отметить, что перегиб на изотермах Скэтчарда (рис.3,а,б) также наблюдается при $D/P = 0,07$.

При $D/P < 0,07$ увеличение концентрации лиганда приводит к росту значений ΔH , $T\Delta S$ и ΔG , а также T_m и ΔT . Такие изменения термодинамических параметров плавления ДНК характерны для связывания по типу интеркаляции. При образовании интеркаляционной полости, необходимой для встраивания лиганда, ДНК переходит в энтропийно менее выгодную конформацию. Проигрыш в энтропии компенсируется энтальпийным вкладом, который возникает при образовании водородных связей между профлавином и ДНК [21], а также за счет стэкинг-взаимодействий между парами оснований и хромофором лиганда [22]. Наблюдаемое при низких значениях D/P резкое уменьшение размера кооперативной единицы m (рис.5,в) можно объяснить в рамках аллостерической модели связывания, согласно которой при взаимодействии с одной молекулой лиганда изменяется конформация протяженного участка ДНК [14,18].

В интервале $D/P > 0,07$ добавление лиганда не приводит к заметным изменениям величин ΔH , $T\Delta S$ и ΔG . В тоже время, при увеличении концентрации профлавина температура плавления ДНК растет, размер кооперативной единицы незначительно увеличивается, а интервал плавления резко уменьшается. Такие изменения параметров плавления ДНК можно объяснить образованием энергетически слабого комплекса по типу внешнего электростатического связывания с равномерным распределением лиганда при полном заполнении матрицы.

Из рис.5 и рис.6 видно, что увеличение ионной силы раствора изменяет параметры плавления свободной ДНК. При $I = 0,1$ М за счет экранирования отрицательно заряженных фосфатных групп ионами Na^+ температура плавления свободной ДНК на 9 градусов выше, чем при $I = 0,02$ М. Энтальпия и энтропия плавления ДНК также значительно увеличиваются. При добавлении Рf изменения энтальпии и энтропии плавления не зависят от ионной силы. Вероятно, это связано с тем, что ионы Na^+ не являются конкурентами профлавины при его взаимодействии с ДНК по типу интеркаляции. Существенное влияние ионная сила раствора оказывает на зависимости температуры и интервала плавления ДНК от D/P (рис.6,а,б). Это можно объяснить тем, что при низкой ионной силе связывание по внешнему электростатическому типу, зависящее от концентрации противоионов и приводящее к увеличению температуры плавления ДНК [23], происходит и при малых значениях D/P . При высокой ионной силе ионы Na^+ затрудняют образование комплекса по внешнему типу связывания.

Зависимость $\delta\Delta T$ (рис.6,б) также позволяет оценить специфичность связывания лигандов с ДНК [24,25]. Преимущественное связывание с АТ-богатыми последовательностями проявляется в наличии зоны с отрицательными значениями $\delta\Delta T$. Для комплексов Рf–ДНК величина $\delta\Delta T$ во всем диапазоне исследованных нами концентраций положительна. Это согласуется с результатами исследования взаимодействия Рf с ДНК из тимуса телят о преимущественном связывании профлавина с GC-обогащенными последовательностями [26].

При низких значениях P/D (полное заполнение матрицы лигандом) из данных ДСК можно получить параметры связывания Рf с ДНК. Константа связывания (K) рассчитывалась по уравнению МакГи [27]. Для определения энтальпии связывания $\Delta H_{св}$ использовался подход, согласно которому изменение энтальпии плавления ДНК в комплексе по сравнению с энтальпией плавления свободной ДНК вызвано только взаимодействием лиганда с двуспиральной ДНК [20,26]. Зная величины K и $\Delta H_{св}$, можно рассчитать свободную энергию Гиббса $\Delta G = -RT \ln K$, энтропию $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ и, таким образом, получить полное термодинамическое описание взаимодействия лиганда с ДНК. Рассчитанные параметры связывания приведены в таблице 1.

Таблица 1

Параметры связывания Pf с ДНК из молок лосося при полном заполнении матрицы лигандом в растворах с низкой и высокой ионной силой.

	P/D=4,1, I=0,02 М	P/D=5,8, I=0,1 М
n, нукл.	7±0,5	7±0,5
$\Delta H_{св}$, ккал/ M _{Pf}	-10,6±0,8	-13,9±0,8
$\Delta S_{св}$, кал/град·M _{Pf}	-11,1±0,8	-18,2±0,8
$\Delta G_{св}$, ккал/ M _{Pf}	-7,3±1,0	-8,5±1,0
K_{298} , M ⁻¹	(2,3±0,5)×10 ⁵	(1,7±0,5)×10 ⁶

Видно, что независимо от ионной силы связывание профлавина с ДНК происходит благодаря энтальпийной стабилизации комплекса, несмотря на невыгодную энтропию взаимодействия. Эти результаты согласуются с данными, полученными для других интеркаляторов [22,27]. При I=0,02 М энтальпия связывания (по абсолютному значению) и константа связывания оказались ниже, чем при I=0,1 М. Это связано с тем, что при низкой ионной силе полученные параметры являются усредненными для двух типов связывания.

При D/P>0,07 связывание по внешнему типу не влияет на энтальпию плавления ДНК, поэтому при I=0,1 М значение $\Delta H_{св}$, полученное для комплексов Pf - ДНК с высоким содержанием лиганда (D/P=0,17) относится, тем не менее, к интеркаляционному типу взаимодействия.

Полученные в работе экспериментальные данные подтверждают, что в системе ДНК-профлавин образуется два типа комплексов. Показано, что:

- Термодинамическое состояние ДНК в составе этих комплексов существенно различается.
- Интеркаляционное взаимодействие приводит к увеличению энтальпии и энтропии плавления ДНК, а также уменьшению размера кооперативной единицы плавления. При внешнем связывании происходит увеличение температуры и уменьшение интервала плавления.
- Ионная сила влияет, в основном, на образование комплексов по внешнему электростатическому типу связывания.
- Величины констант связывания, рассчитанные из данных калориметрии, согласуются со спектрофотометрическими результатами.

Из данных ДСК получено полное термодинамическое описание связывания профлавина с ДНК по типу интеркаляции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghosh R., Bhowmik S., Bagchi A., Das D., Ghosh S. Eur Biophys J. 2010. V.39. P.1243–1249.
2. Graves D.E., Velea L. M. Curr. Org. Chem. 2000. V. 4. P. 915 - 929.
3. Li H.J., Crothers F.M. J. Mol. Biol. 1969. V39. N.3. P.461-477.
4. Ramstein J., Ehrenberg M., Riegler R. Biochemistry. 1980. V.19. P.3938-3948.
5. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodriguez E., Manzano J.L. Anal Biochem. 2006. V.15. P.157-164.
6. Aslanoglu M. Anal. Sci. 2006. V.22. N.3. P.439-443.
7. Ruiz R., Garcia B., Ruisi G., Silvestri A., Barone G. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. 2009. N.915. P.86–92.
8. Kamiya M. Biochim. Biophys. Acta. 1979. V.562. N.1. P.70-79.
9. Ramstein J., Leng M., Kallenbach N.R. Biophys. Chem. 1976. V.5. P.319-326.
10. Waring M. J Mol Biol. 1970. V.54. N.2. P.247-279.
11. Neidle S., Abraham Z. CRC Crit. Rev. Biochem. 1984. V.17. P. 73-121.
12. Dourlent M., Helene C. Eur. J. Biochem. 1971, V.23. P.86.

13. Barcelo F., Capo D., Portugal J. *Nucleic Acids Researches*. 2002. V. 30. N.20. P.4567-4573.
14. Elmore R.H., Wadkins R.M., Graves D.E. *Nucleic Acids Res.* 1988. V.16. N.20. P.9707-9719.
15. Winkle S.A., Rosenberg L.S., Krugh T.R. *Nucleic Acids Res.* 1982. V.10. N.24. P.8211-8223.
16. McGhee J.D., von Hippel P.H. *J. Mol. Biol.* 1974. V. 86. P.469-489.
17. McCall P.J., Bloomfield V.A. *Biopolymers*. 1976. V.15. N.1. P.97-111.
18. Dattagupta N., Hogan M., Crothers D.M. *Biochemistry*. 1980. V.19. N.26. P.5998-6005.
19. Rosenberg L.S., Carvlin M.J., Krugh T.R. *Biochemistry*. 1986. V.25. N.5. P.1002-1008.
20. Marky L.A., Blumenfeld K.S., Breslauer K.J. *Nucleic Acids Research*. 1983. V.11. N.9. P.2857-2870.
21. Westhof E, Sundaralingam M. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980. V.77. N.4. P.1852-1856.
22. Chaires J.B. *Annu Rev Biophys*. 2008. V.37. P.135-151.
23. Dourlent M., Hogrel J.F. *Biopolymers*. 1976. V.15. N.1. P.29-41.
24. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova, O.F., Frank-Kamenetskii M.D. 1996. V.14. N.2. P.275-283.
25. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2008. V.25. N.6. P.641-646.
26. Bereznyak E.G., Gladkovskaya N.A., Khrebtova A.S., Dukhopelnykov Ye.V., Zinchenko A.V. *Biofizika*. 2009. V.54. N 5. P. 805-812.
27. Waring M.J. *Sequence-specific DNA binding agents*. Royal Society of Chemistry, 2006. 258 p.