

УДК 577.323

ВЛИЯНИЕ ДВУХ ТИПОВ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК НА ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕХОДА СПИРАЛЬ – КЛУБОК В ПОЛИНУКЛЕОТИДАХ**А.С. Хребтова, Н.А. Гладковская, Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников, А.В. Фомин, А.В. Зинченко****Институт радиофизики и электроники им. А.Я. Усикова НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085, Украина***Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, 61015, Украина
e-mail: k_berez@mail.ru*

Поступила в редакцию 20 октября 2015 года

Принята 15 декабря 2015 года

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии и спектрофотометрии проведено исследование взаимодействия производных актиноцина Act II и Act III с ДНК. С помощью спектрофотометрического титрования определены равновесные концентрации комплексов интеркаляционного и внешнего типов в системах Act – ДНК в зависимости от относительной концентрации ДНК. Рассчитаны параметры связывания для каждого типа комплексов лигандов актиноцинового ряда с ДНК. Получены кривые теплопоглощения комплексов Act – ДНК при различных соотношениях концентраций ДНК и лиганда. Калориметрические исследования показали, что интеркаляционное взаимодействие приводит к росту энтальпии, энтропии и температуры плавления ДНК, тогда как внешний тип связывания повышает только термостабильность матрицы. Проведено сравнение параметров перехода спираль – клубок в ДНК, которая связана с лигандами актиноцинового ряда и профлавином. Степень влияния лигандов на термодинамические параметры плавления ДНК коррелирует со значениями констант связывания, полученными методом спектрофотометрии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК, производные актиноцина, интеркаляция, внешнее связывание, параметры плавления, калориметрия, спектрофотометрия.

ВПЛИВ ДВОХ ТИПІВ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛІГАНДІВ З ДНК НА ПАРАМЕТРИ ПЕРЕХОДУ СПИРАЛЬ – КЛУБОК У ПОЛІНУКЛЕОТИДАХ**Г.С. Хребтова, Н.О. Гладковська, К.Г. Березняк, Є.В. Духопельников, О.В. Фомін, О.В. Зінченко****Институт радіофізики та електроніки ім. О.Я.Усикова НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, м. Харків, 61085, Україна***Институт проблем криобіології та криомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015, Україна*

Методами диференційної скануючої калориметрії та спектрофотометрії проведено дослідження взаємодії похідних актиноцину Act II і Act III з ДНК. За допомогою спектрофотометричного титрування розраховано рівноважні концентрації комплексів інтеркаляційного та зовнішнього типів в системах Act – ДНК в залежності від відносної концентрації ДНК. Наведено параметри зв'язування для кожного типу комплексів лігандів актиноцинового ряду з ДНК. Отримано криві теплопоглинання комплексів Act – ДНК при різних співвідношеннях концентрацій ДНК та ліганду. Калориметричні дослідження виявили, що інтеркаляційна взаємодія призводить до збільшення ентальпії, ентропії та температури плавлення ДНК, тоді як зовнішній тип зв'язування підвищує тільки термостабільність матриці. Проведено порівняння параметрів переходу спираль – клубок у ДНК, що зв'язана з лігандами актиноцинового ряду та профлавіном. Ступінь впливу лігандів на термодинамічні параметри плавлення ДНК корелює з величинами констант зв'язування, що отримані методом спектрофотометрії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ДНК, похідні актиноцину, інтеркаляція, зовнішнє зв'язування, параметри плавлення, калориметрія, спектрофотометрія.

**THE EFFECT OF TWO BINDING TYPES ON PARAMETERS OF
HELIX – COIL TRANSITION IN POLYNUCLEOTIDES****A.S. Khrebtova, N.A. Gladkovskaya, E.G. Bereznyak, E.V. Dukhopelnikov,
A.V. Fomin, A.V. Zinchenko****O.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics, National Academy of Sciences of Ukraine,
12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine,
23 Pereyaslavskaya Str., Kharkov, 61015, Ukraine*

An interaction of actinocin derivatives Act II and Act III with DNA is studied by differential scanning calorimetry and spectrophotometry. The equilibrium concentrations of intercalational and external types of complexes in Act – DNA systems at different relative DNA concentration are calculated from spectrophotometric titration data. The binding parameters for each type of actinocin derivatives – DNA complexes are obtained. The heat capacity curves of Act – DNA complexes were obtained at different relative ligand concentrations. Calorimetric study achieved that intercalation binding type leads to increase of enthalpy, entropy and melting temperature of DNA, while the external type induces the rise of the helix thermal stability only. The comparison of helix – coil transition parameters of DNA in the complexes with actinocin derivatives and proflavine is performed. The effect of ligands on DNA melting parameters correlates to binding constants obtained by spectrophotometry.

KEY WORDS: DNA, actinocin derivatives, intercalation, external binding, melting parameters, calorimetry, spectrophotometry.

Термическая денатурация является широко используемым инструментом для исследования комплексообразования нуклеиновых кислот с малыми молекулами. Это обусловлено кооперативным характером плавления полинуклеотидов, которое сопровождается резким изменением многих физических свойств макромолекул. Прямым методом определения тепловых эффектов при конформационных переходах биологических макромолекул и их комплексов является дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК). Этот метод позволяет получить такие термодинамические характеристики как температура, энтальпия, энтропия, свободная энергия и изменение теплоемкости при плавлении. Возможности метода ДСК в области изучения конформационных превращений биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и т.д.) хорошо известны и общепризнаны [1-3].

Взаимодействие с лигандами может существенно изменять термодинамическое состояние полинуклеотидной матрицы [4-6]. Комплексообразование приводит, в частности, к сдвигу температуры плавления ДНК, а также влияет на энтальпию плавления [7-9]. Сравнение параметров плавления ДНК в комплексе с лигандами и «свободного» полимера позволяет получить значения фундаментальных термодинамических характеристик в системах ДНК – лиганд.

Образование нековалентных комплексов лигандов с ДНК происходит за счет «сильного» или «слабого» типов связывания, которые по-разному влияют на параметры перехода спираль – клубок в ДНК [10-12]. К «сильным» типам относят интеркаляцию лигандов в двойную спираль ДНК, а также связывание лигандов в малом желобке ДНК. «Слабый» тип предполагает электростатические взаимодействия положительно заряженных катионов лиганда с отрицательно заряженными группами на полимерной матрице. Многие лиганды взаимодействуют с матрицей ДНК одновременно несколькими способами, т.е. проявляют мультимодальность [11, 13-15].

Ранее нами были проанализированы параметры перехода спираль – клубок в ДНК в присутствии известного мутагена акридинового ряда – профлавина (Pf), который образует интеркаляционный и внешний типы комплексов [16]. Было показано, что влияние каждого из типов связывания на параметры плавления ДНК можно определить с помощью анализа данных ДСК, полученных в широком интервале соотношения концентраций ДНК и лиганда (P/D). Концентрационные диапазоны, в которых

преобладает тот или иной тип связывания, были определены методом спектрофотометрии (СФ) в видимой области [14, 16, 19].

В данной работе методами ДСК и СФ проведено исследование плавления комплексов ДНК с производными актиноцина Act II и Act III (аналоги известного антибиотика актиномицина D [17]). Природу их биологической активности связывают с интеркаляционным типом взаимодействия с ДНК [18]. Кроме того, Act II и Act III являются заряженными молекулами, что предопределяет появление внешних электростатических комплексов.

Цель данной работы – определить влияние интеркаляционного и внешнего типов связывания мультимодальных лигандов с ДНК на переход спираль – клубок в биополимере.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Измерения теплотогощения свободной ДНК и ее комплексов с лигандами проводили на дифференциальном сканирующем микрокалориметре ДАСМ-4 в рабочем диапазоне температур 20÷130 °С и объемом измерительной ячейки 0,4553 мл. Для предотвращения кипения раствора вплоть до 130 °С в измерительной камере создавалось избыточное давление 2,5 атм. Скорость прогрева растворов образцов составляла 1 град / мин. Зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры получены с учетом базовой линии, проведенной между точками, соответствующими температурам начала и конца перехода.

Изменения энтальпии (ΔH_{melt}), энтропии (ΔS_{melt}) и свободной энергии Гиббса (ΔG_{melt}) для процесса тепловой денатурации ДНК рассчитывались из кривой теплотогощения по уравнениям:

$$\Delta H_{melt} = \int \delta C_p dT, \quad (1)$$

$$\Delta S_{melt} = \int \frac{\delta C_p}{T} dT, \quad (2)$$

$$\Delta G_{melt} = \Delta H_{melt} - T \Delta S_{melt}. \quad (3)$$

Температура плавления T_{melt} представляет собой температуру, при которой степень спиральности ДНК 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 получена по формуле:

$$\Delta T = -\frac{1}{(d\alpha/dT)_{T=T_{melt}}}. \quad (5)$$

Ошибка определения термодинамических параметров плавления (ΔH_{melt} , ΔS_{melt} и ΔG_{melt}) из ДСК эксперимента составляла (5 ÷ 7)%, а температуры плавления – 1 °С.

Исследования спектров поглощения смесей лиганд – ДНК при различных

значениях P/D проведены на спектрофотометре "Specord M40" (Германия). Ошибка измерения составляла 0,005 единиц оптической плотности.

Расчет констант (K), величин мест связывания (n), а также равновесного состава раствора из данных спектрофотометрии проводился с помощью программы оптимизации DALSMOD [19].

В работе использовались следующие препараты: ДНК из молок лосося (stДНК) фирмы "Sigma" (содержание GC-пар 42%); лиганды актиноцинового ряда актиноцил-бис(3-диметиламиноэтил) амин (Act II) и актиноцил-бис(3-диметиламинопропил) амин (Act III), синтезированные профессором Е.Н. Глибиным (Санкт-Петербургский технический университет, Россия).

Структурные формулы исследованных лигандов приведены на рис. 1.

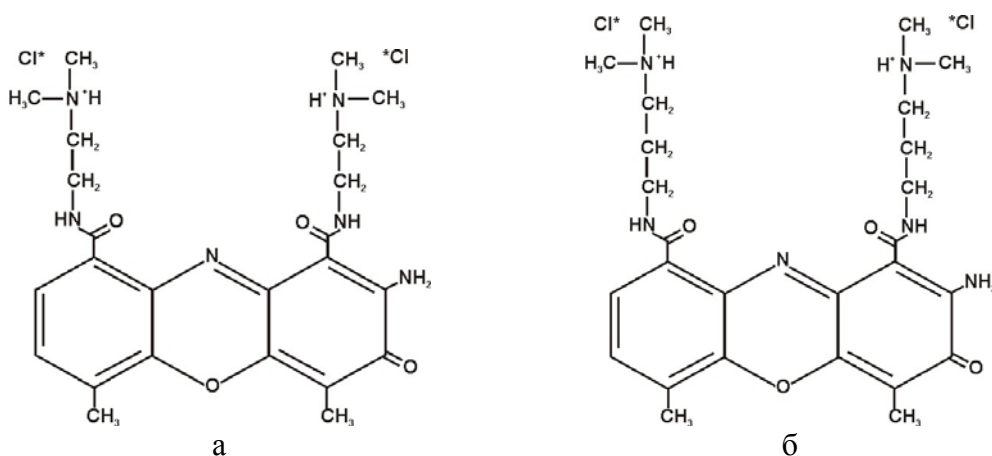


Рис. 1. Структурные формулы производных актиноцина Act II (а) и Act III (б).

Исследования взаимодействия в системах ДНК – лиганд проведены в фосфатных буферных растворах (2.5×10^{-3} М KH_2PO_4 , 2.5×10^{-3} М Na_2HPO_4 , $\text{pH} = 6,86$) с добавлением раствора NaCl до значения ионной силы $I = 0,02$ М. При определении концентрации исследуемых веществ использованы следующие значения молярных коэффициентов экстинкции: для stДНК $\varepsilon_{260} = 6,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [11]; для Act II и Act III в изобестической точке мономер – димерного равновесия $\varepsilon_{400} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [20].

Концентрация ДНК в растворах, исследуемых методом калориметрии, для всех исследуемых образцов составляла $C_{DNA} \sim 3 \times 10^{-3}$ М. Спектрофотометрические кривые титрования для растворов ДНК – лиганд были получены при постоянной концентрации лиганда и изменяющейся концентрации ДНК в интервале P/D от 0 до ~ 120 .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 приведены спектры поглощения смесей Act II – ДНК и Act III – ДНК в растворах с ионной силой $I = 0,02$ М при разных значениях P/D и постоянных концентрациях лиганда. Из рис. 2 видно, что в исследуемых системах присутствуют три по-разному поглощающих компонента (свободный лиганд и 2 типа комплексов). Об этом свидетельствует наличие двух изобестических точек на спектрофотометрических кривых титрования: $\lambda = 470$ нм и $\lambda = 427$ нм для Act II – ДНК; $\lambda = 466$ нм и $\lambda = 423$ нм для Act III – ДНК. При образовании комплексов по внешнему типу связывания в области низких значений P/D (комплекс 1) наблюдается падение поглощения. Дальнейшее увеличение концентрации ДНК сопровождается батохромным сдвигом спектров и ростом поглощения в длинноволновом максимуме, что свидетельствует об образовании второго типа комплексов (комплекс 2). Этот комплекс соответствует связыванию по типу интеркаляции [19].

Расчет констант и величин мест связывания из данных СФ был проведен по модели, согласно которой связывание лиганда с ДНК происходит с образованием двух типов комплексов [19, 21]. Для комплекса 1 в модели учитывается кооперативное взаимодействие лиганда с матрицей ДНК и конкуренция за места связывания с ионами Na^+ . Образование комплекса 2 происходит не кооперативно.

Полученные величины констант и мест связывания для комплекса 1 (k_{bind1} , n_1) и комплекса 2 (k_{bind2} , n_2) в системах производные актиноцина – ДНК представлены в таблице 1. Также в таблице 1 приведены параметры связывания профлавина с ДНК, рассчитанные по этой модели из экспериментальных спектров поглощения, полученных нами ранее [16].

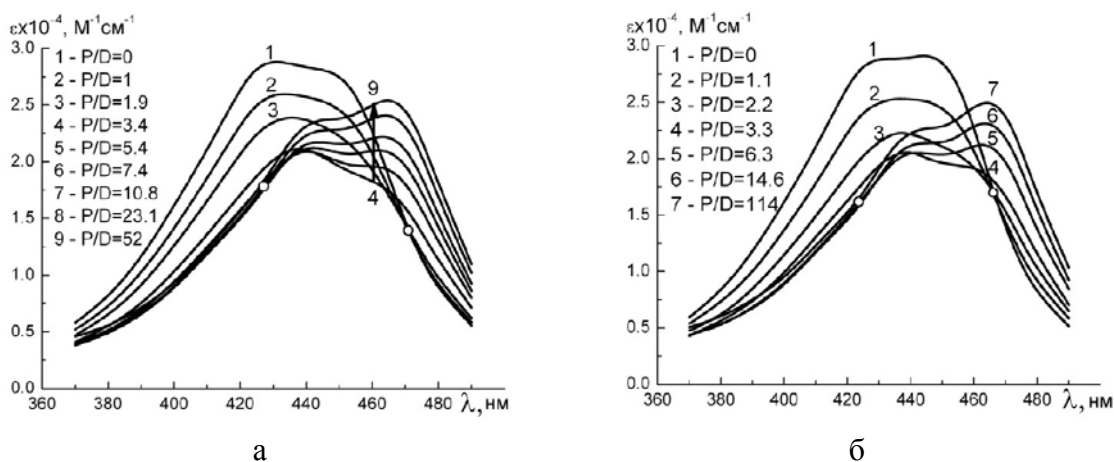


Рис. 2. Спектры поглощения смесей ДНК – лиганд при разных значениях P/D и постоянной концентрации лиганда C_L в растворах с ионной силой $I = 0,02$ М: Act II – ДНК при $C_L = 3,0 \times 10^{-5}$ М (а) и Act III – ДНК при $C_L = 1,42 \times 10^{-5}$ М (б).

Таблица 1
Параметры связывания в системах Act II – ДНК, Act III – ДНК и Pf – ДНК при $I = 0,02$ М, полученные из спектрофотометрических концентрационных зависимостей с помощью программы оптимизации DALSMOD.

система	n_1	k_{bind1}	n_2	k_{bind2}
Act II – ДНК	$3,0 \pm 0,2$	$(1,2 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	$6,0 \pm 0,2$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$
Act III – ДНК	$3,0 \pm 0,2$	$(1,9 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$	$6,0 \pm 0,2$	$(1,4 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$
Pf – ДНК	$2,0 \pm 0,2$	$(1,1 \pm 0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	$4,0 \pm 0,2$	$(5,2 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$

Величины констант и мест связывания (таблица 1) позволяют для любых общих концентраций ДНК (C_{DNA}) и лиганда (C_L) рассчитать равновесный состав раствора. На рис. 3 показано, как изменяются равновесные концентрации разных типов комплексов (C_k) в зависимости от P/D при постоянной концентрации лигандов Act II, Act III и Pf.

Видно, что при низких значениях P/D во всех исследуемых смесях лиганд – ДНК преобладает комплекс 1. С ростом концентрации ДНК количество комплекса 1 уменьшается, а относительное содержание комплекса 2 увеличивается.

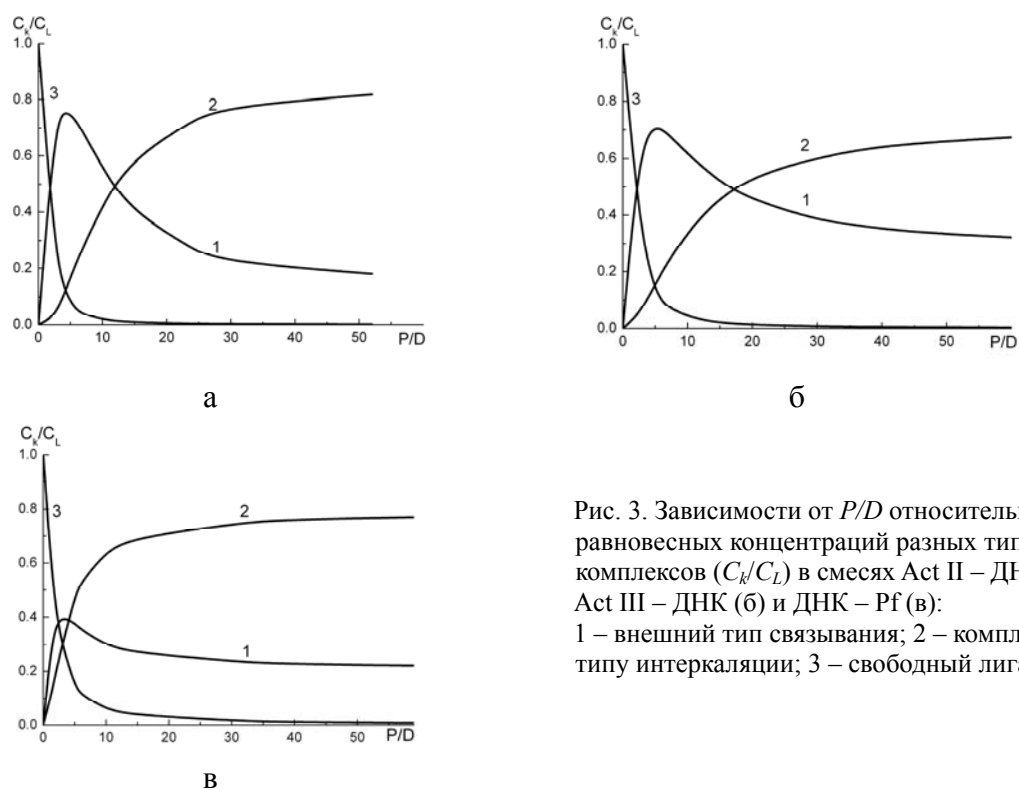


Рис. 3. Зависимости от P/D относительных равновесных концентраций разных типов комплексов (C_i/C_L) в смесях Act II – ДНК (а), Act III – ДНК (б) и ДНК – Pf (в): 1 – внешний тип связывания; 2 – комплекс по типу интеркаляции; 3 – свободный лиганд.

На рис. 4 представлены результаты микрокалориметрической регистрации процесса теплопоглощения свободной ДНК и комплексов ДНК – Act II, ДНК – Act III, а также ДНК – Pf [16] при различных значениях P/D .

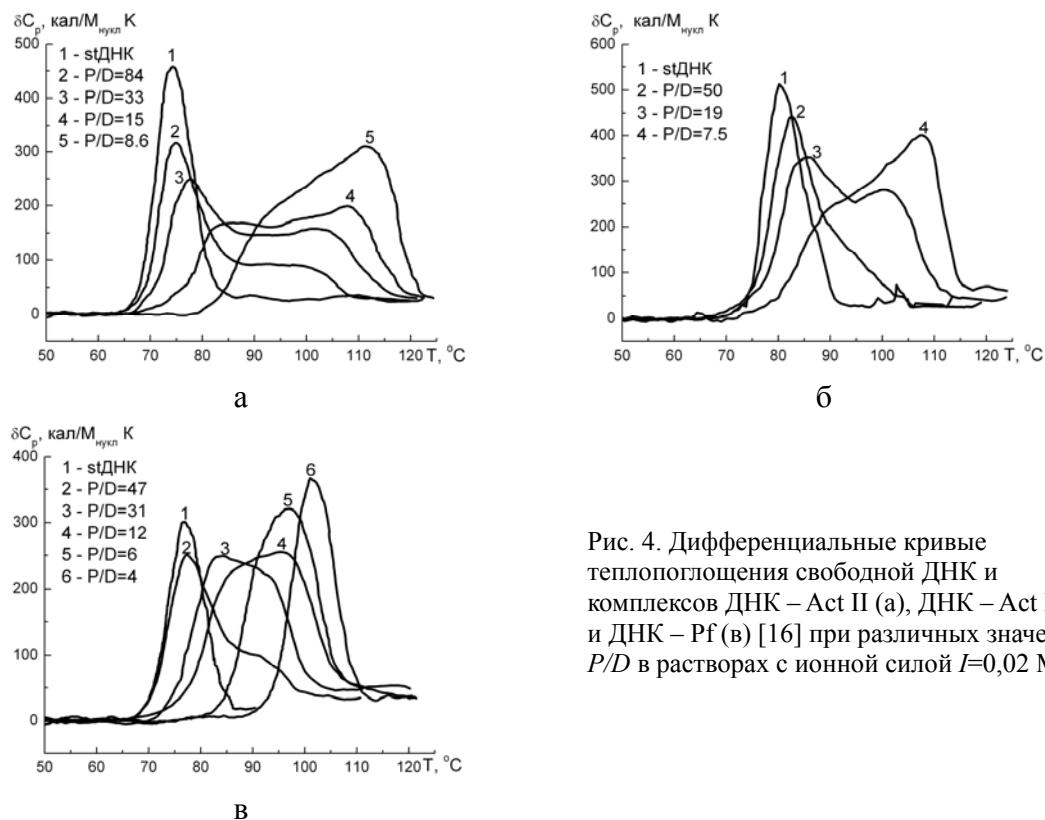


Рис. 4. Дифференциальные кривые теплопоглощения свободной ДНК и комплексов ДНК – Act II (а), ДНК – Act III (б) и ДНК – Pf (в) [16] при различных значениях P/D в растворах с ионной силой $I=0,02$ М.

При добавлении лиганда кривая теплотогощения становится двухфазной. Первый пик (низкотемпературный) соответствует плавлению свободных от лиганда участков ДНК и участков ДНК с низкой степенью насыщения матрицы лигандом, а второй (высокотемпературный) – к плавлению участков ДНК с высокой степенью насыщения лигандом [7, 22]. При увеличении относительной концентрации лиганда кривая теплотогощения смещается в область более высоких температур, интенсивность второго пика возрастает. Более отчетливо двухфазный характер плавления проявляется для систем Act II – ДНК и Act III – ДНК. Это связано с тем, что смещение второго пика напрямую зависит от величины константы связывания [23], а сродство производных актиноина к ДНК выше, чем профлавина (таблица 1). При высокой степени заполнения матрицы лигандом ($P/D = 4,1$) в системе Pf – ДНК первый пик исчезает и кривая теплотогощения становится однофазной (рис. 4 в). В случае связывания производных актиноина с ДНК седиментация комплексов при $P/D < 7$ не позволила получить однофазную ДСК кривую (рис. 4 а, б).

Термодинамические параметры плавления ДНК в составе комплексов с исследуемыми лигандами получены по уравнениям (1 - 5). На рис. 5 и рис. 6 представлены зависимости от относительной концентрации лиганда (D/P) приращения параметров плавления комплексов по сравнению с соответствующими значениями для свободной ДНК. Видно, что для всех лигандов увеличение их относительной концентрации приводит к нелинейным изменениям $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$, $\delta\Delta G_{melt}$, δT_{melt} и $\delta\Delta T_{melt}$. При низких значениях D/P увеличение концентрации лиганда приводит к росту $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$ и $\delta\Delta G_{melt}$, а также δT_{melt} и $\delta\Delta T_{melt}$. При таких соотношениях концентраций ДНК и лиганда по данным СФ преобладают комплексы по типу интеркаляции (рис. 3).

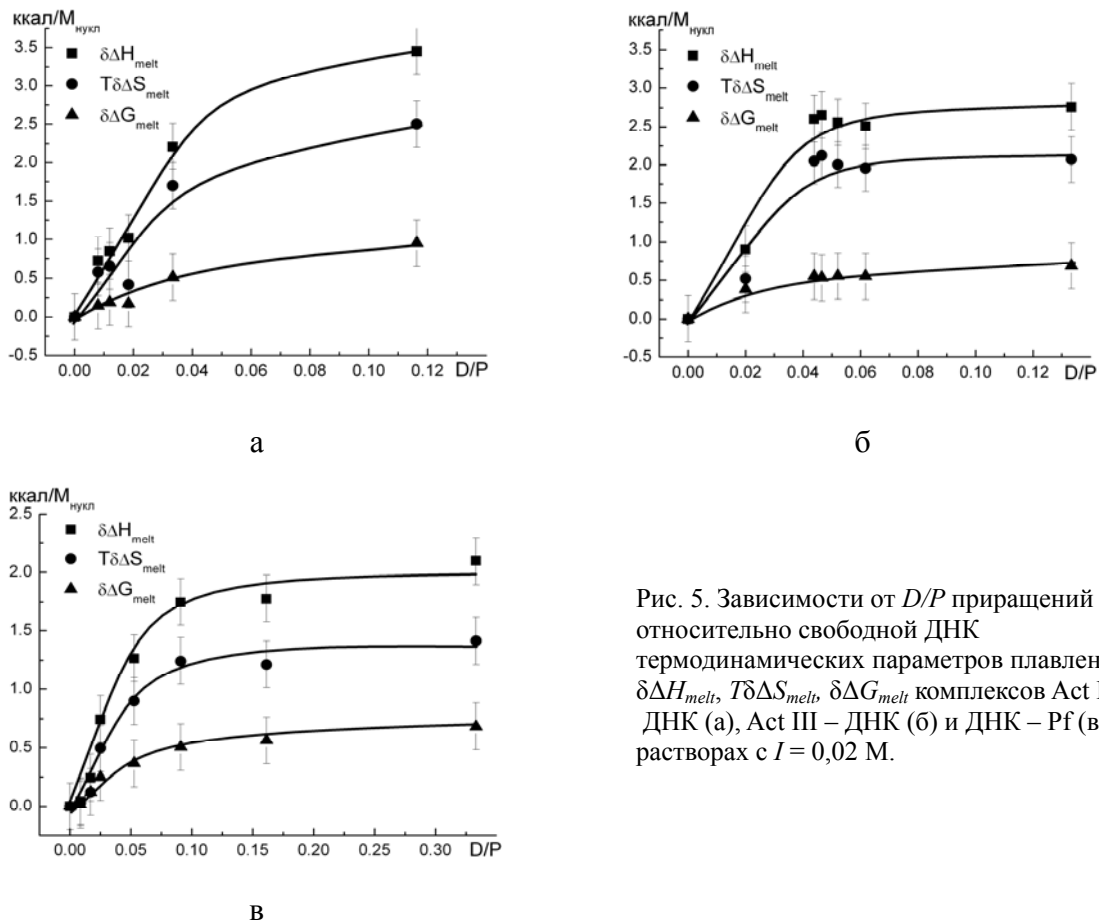


Рис. 5. Зависимости от D/P приращений относительно свободной ДНК термодинамических параметров плавления $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$, $\delta\Delta G_{melt}$ комплексов Act II – ДНК (а), Act III – ДНК (б) и ДНК – Pf (в) в растворах с $I = 0,02$ М.

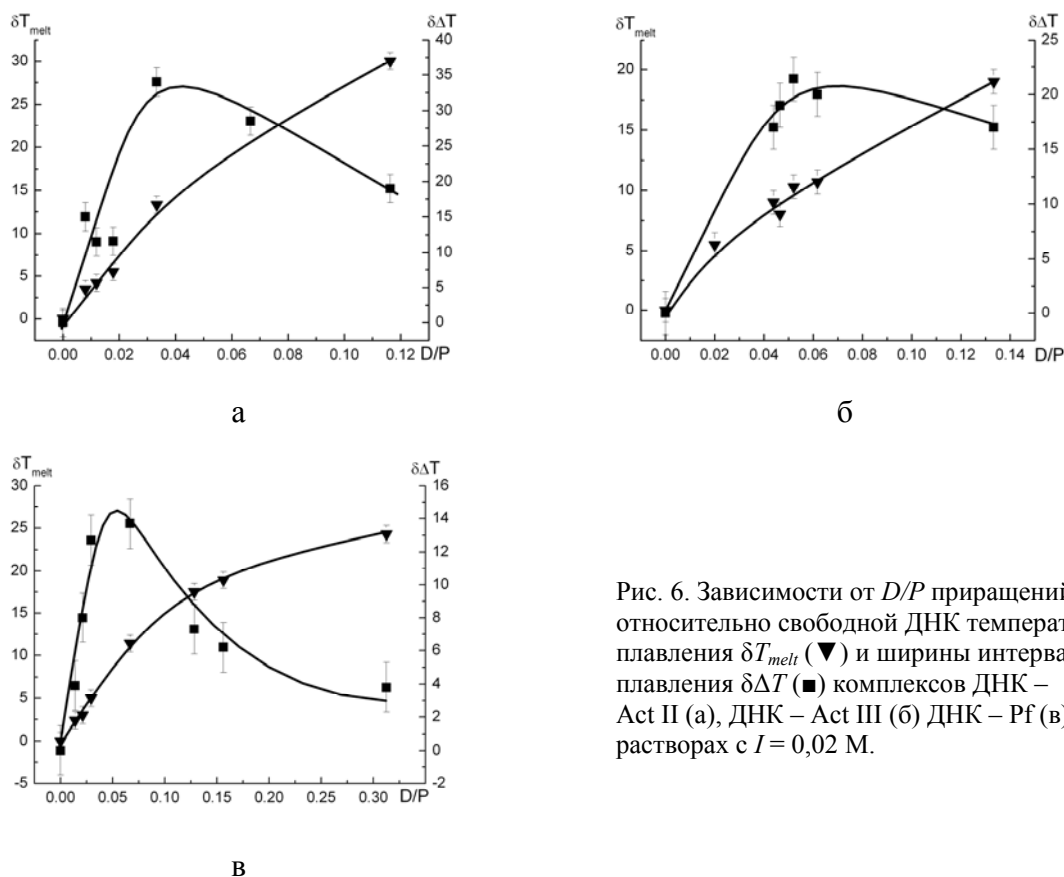


Рис. 6. Зависимости от D/P приращений относительно свободной ДНК температуры плавления δT_{melt} (\blacktriangledown) и ширины интервала плавления $\delta \Delta T$ (\blacksquare) комплексов ДНК – Act II (а), ДНК – Act III (б) ДНК – Pf (в), в растворах с $I = 0,02$ М.

Наблюдаемые изменения термодинамических параметров можно объяснить тем, что при образовании интеркаляционной полости, необходимой для встраивания лиганда, ДНК переходит в энтропийно менее выгодную конформацию. Проигрыш в энтропии компенсируется энтальпийным вкладом, который возникает за счет водородных связей между лигандом и ДНК [24], а также стэкинг-взаимодействий между парами оснований и хромофором лиганда [25].

Отличия в величинах $\delta \Delta H_{melt}$ и δT_{melt} при взаимодействии ДНК с профлавином и производными актиноцина связаны с тем, что комплексы этих лигандов с ДНК стабилизируются разным количеством водородных связей. Так, в комплексе Pf – ДНК в зависимости от нуклеотидной последовательности, в которую встраивается лиганд, наблюдается 2 или 3 водородные связи [26]. Для производных актиноцина по данным молекулярного докинга между хромофором и ДНК образуется 5-6 водородных связей [27]. Кроме того, комплексы ДНК с Act II и Act III характеризуются «глубоким» встраиванием плоских феноксазоновых колец этих лигандов в интеркаляционную полость, что дает значительный вклад энергии стэкинг-взаимодействия в стабилизацию комплексов [28].

Причиной более высокой энтальпии плавления и термостабильности комплекса Act II – ДНК по сравнению с Act III – ДНК может быть образование дополнительных водородных связей между метиленовыми цепочками боковых заместителей интеркалированного Act II и сахарофосфатным остовом ДНК [28]. Степень влияния лиганда на термодинамические параметры плавления ДНК согласуется со значениями констант связывания, полученными методом СФ (таблица 1).

При высокой относительной концентрации лиганда по данным спектрофотометрии преобладают комплексы по внешнему типу связывания (рис. 3). Это связано с тем, что при образовании интеркаляционных комплексов с большой величиной места связывания ($n \approx 6$

нуклеотидов) за счет случайного распределения лиганда вдоль матрицы ДНК возникают участки свободной ДНК, размер которых недостаточен для дальнейшего встраивания лиганда. Поэтому, несмотря на меньшее по сравнению с интеркаляцией значение константы связывания, на этих участках размещаются комплексы по внешнему типу связывания, которые характеризуется малым значением $n = 2 - 3$ нуклеотида.

Образование этого типа комплексов сопровождается небольшими энергетическими затратами [11, 14, 29], поэтому при высоких значениях D/P ($D/P > 0,1$ для профлавина и $D/P > 0,05$ для производных актиноцина) добавление лиганда не приводит к заметным изменениям величин $\delta\Delta H_{melt}$, $T\delta\Delta S_{melt}$ и $\delta\Delta G_{melt}$ (рис. 5). В тоже время, плотное заполнение матрицы ДНК лигандом в этом интервале D/P вызывает увеличение термостабильности ДНК и уменьшение интервала плавления (рис. 6).

ВЫВОДЫ

Исследование влияния лигандов, проявляющих мультимодальность при связывании, на переход спираль-клубок в ДНК показало, что интеркаляционный тип взаимодействия приводит к росту энтальпии, энтропии и температуры плавления ДНК. Степень влияния лигандов на термодинамические параметры плавления ДНК коррелирует со значениями констант связывания, полученными методом СФ. Внешний тип связывания имеет энтропийную природу и увеличивает только термостабильность матрицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Helix-coil transition of plasmid DNA by adiabatic differential scanning microcalorimetry / Y. Maeda, K. Takahashi, H. Yamaki, E. Ohtsubo // *Biopolymers*. – 1988. – V. 27 (12). – P. 1917–1925.
2. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterisation by calorimetric and volumetric techniques / T.V. Chalikian, T. Volker, G.E. Plum, K.J. Breslauer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – V. 96. – P. 7853–7858.
3. Esposito D. A thermodynamic study of herring protamine–DNA complex by differential scanning calorimetry / D. Esposito, P. Del Vecchio, G. Barone // *Phys Chem Chem Phys*. – 2001. – V. 3. – P. 5320–5325.
4. Lane A.N. Thermodynamics of nucleic acids and their interactions with ligands / A.N. Lane, T.S. Jenkins // *Quart. Rev. Biophys.* – 2000. – V. 33 (3). – P. 255–306.
5. Chaires J.B. A thermodynamic signature for drug – DNA binding mode / J.B. Chaires // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2006. – V. 453. – P. 24–29.
6. Breslauer K.J. Calorimetry: a tool for DNA and ligand – DNA studies / K.J. Breslauer, E. Freire, M. Straume // *Methods Enzymol.* – 1992. – V. 211. – P. 533–567.
7. Patel D.J. Mutagen – nucleic acid complexes at the polynucleotide duplex level in solution: Intercalation of proflavine into poly(dA–dT) and the melting transition of the complex / D.J. Patel // *Biopolymers*. – 1977. – V. 16 (12). – P. 2739–2754.
8. Bjordnal M.T. DNA melting in the presence of fluorescent intercalating oxazole yellow dyes measured with a gel-based assay / M.T. Bjordnal, D.K. Fygenon // *Biopolymers*. – 2002. – V. 65. – P. 40–44.
9. Theory of helix-coil transition on DNA-ligand complexes: the effect to two types of interaction of ligand on the parameters of transition / A.T. Karapetian, P.O. Vardevanian, G.A. Tarzikian, M.D. Frank-Kamenetskii // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1990. – V. 8 (1). – P. 123–30.
10. Haq I. Thermodynamics of drug–DNA interactions / I. Haq // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2002. – V. 403. – P. 1–15.
11. Barcelo F. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA / F. Barcelo, D. Capó, J. Portugal // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30 (20). – P. 4567–4573.
12. Kumar C.V. Groove binding of a styryl cyanine dye to the DNA double helix: the salt effect / C.V. Kumar, R.S. Turner, E.H. Asuncion // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1993. – V. 74 (2–3). – P. 231–238.
13. Barcelo F. Heterogenous DNA binding modes of berenil / F. Barcelo, M. Ortiz-Lombardia, J. Portugal // *Bioch. Biophys. Acta*. – 2001. – V. 1519. – P. 175–184.
14. Sovenyazy K. Spectroscopic studies of the multiple binding modes of trimetine-bridged cyanine dye with DNA / K. Sovenyazy, J. Bolderon, J. Petty // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31 (10). – P. 2561–2569.

15. Stokke T. Multiple binding modes for Hoechst 33248 to DNA / T. Stokke, H.B. Steen // *J. Histochem. Cytochem.* – 1985. – V. 33 (4). – P. 333–338.
16. Калориметрическое и спектрофотометрическое исследование связывания ДНК из молок лосося с профлавином // Е.Г. Березняк, Е.В. Духопельников, Н.А. Гладковская, А.С. Хребтова, А.В. Зинченко / *Біофізичний вісник.* – 2010. – Т. 25 (2). – С. 23–29. / *Kalorimetriceskoye i spektrofotometriceskoye issledovaniye svyazyvaniya DNK iz molok lososya s proflavinom* // Ye.G. Berezhnyak, Ye.V. Dukhopel'nikov, N.A. Gladkovskaya, A.S. Khrebtova, A.V. Zinchenko / *Біофізичний вісник.* – 2010. – Т. 25 (2). – С. 23–29.
17. Veselkov A.N. Anti-cancer drug design: biological and biophysical aspects of synthetic phenoxazone derivatives / A.N. Veselkov, D.B. Davies. – Sevastopol: SevNTU Press, 2002. – 259 p.
18. Structure–activity relation for synthetic phenoxazone drugs. Evidence for a direct correlation between DNA binding and pro-apoptotic activity / A.N. Veselkov, V.Ya Maleev, E.N. Glibin et al. // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – V. 270. – P. 4200–4207.
19. Круглова Е.Б. Использование метода спектрофотометрического анализа для вычисления термодинамических параметров связывания в системах актиноциновые производные – ДНК / Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская, В.Я. Малеев // *Биофизика.* – 2005. – Т. 50 (2). – С. 253–264. / *Kruglova Ye.B. Ispol'zovaniye metoda spektrofotometriceskogo analiza dlya vychisleniya termodinamicheskikh parametrov svyazyvaniya v sistemakh aktinotsinovyye proizvodnyye – DNK* / Ye.B. Kruglova, N.A. Gladkovskaya, V.Ya. Maleyev // *Биофизика.* – 2005. – Т. 50 (2). – С. 253–264.
20. Спектрофотометрический анализ димеризации производных актиноцина с разной длиной боковых цепей / Е.Б. Круглова, В.Я. Малеев, Е.Н. Глибин, А.Н. Веселков // *Біофізичний вісник.* – 2002. – В. 1 (10). – С. 12–20. / *Spektrofotometriceskiy analiz dimerizatsii proizvodnykh aktinomitsina s raznoy dlinoy bokovykh tsepey* / Ye.B. Kruglova, V.Ya. Maleyev, Ye.N. Glibin, A.N. Veselkov // *Біофізичний вісник.* – 2002. – В. 1 (10). – С. 12–20.
21. Круглова Е.Б. Моделирование процессов связывания актиноциновых антибиотиков с ДНК при разных ионных силах и температурах / Круглова Е.Б. Гладковская Н.А. Малеев В.Я. // *Біофізичний вісник.* – 2003. – В. 1 (12). – С. 53–63. / *Modelirovaniye protsessov svyazyvaniya aktinotsinovyykh antibiotikov s DNK pri raznykh ionnykh silakh i temperaturakh* / Kruglova Ye.B. Gladkovskaya N.A. Maleyev V.YA. // *Біофізичний вісник.* – 2003. – В. 1 (12). – С. 53–63.
22. Marky L.A. Calorimetric and spectroscopic investigation of drug – DNA interactions. I. The binding of netropsin to poly d(AT) / L. A. Marky, K. S. Blumenfeld, K. J. Breslauer // *Nucleic Acids Res.* – 1983. – V. 11 (9). – P. 2857–2870.
23. McGhee J.D. Theoretical calculations of the helix-coil transition of DNA in the presence of large cooperatively binding ligands / J.D. McGhee // *Biopolymers.* – 1976. – V. 15 (7). – P. 1345–1375.
24. Westhof E. X-ray-structure of a cytidylyl-3',5'-adenosine-proflavine complex: a self-paired parallel-chain double helical dimer with an intercalated acridine dye / E. Westhof, M. Sundaralingam // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – V. 77 (4). – P. 1852–1856.
25. Chaires J. B. Calorimetry and thermodynamics in drug design / J. B. Chaires // *Annu. Rev. Biophys.* – 2008. – V. 37. – P. 135–151.
26. Computational study of the interaction of proflavine with d(ATATATATAT)2 and d(GCGCGCGCGC)2 / R. Ruiz, B. Garcia, G. Ruisi, et al. // *J. Mol. Struct.: Theochem.* – 2009. – V. 915 (1–3). – P. 86–92.
27. Miroshnychenko K.V. Flexible docking of DNA fragments and actinocin derivatives / K.V. Miroshnychenko, A.V. Shestopalova // *Molecular Simulation.* – 2005. – V. 31 (8). – P. 567–574.
28. Исследование влияния воды на взаимодействие ДНК и производных актиноцина с различной длиной аминокильных цепочек методами ИК-спектроскопии и компьютерного моделирования / Е.Г. Березняк, М.А. Семенов, Т.В. Больбух и др. // *Биофизика.* – 2002. – Т. 47 (6). – С. 1005–1015. / *Issledovaniye vliyaniya vody na vzaimodeystviye DNK i proizvodnykh aktinotsina s razlichnoy dlinoy aminoalkil'nykh tsepochek metodami IK-spektroskopii i komp'yuternogo modelirovaniya* / Ye.G. Berezhnyak, M.A. Semenov, T.V. Bol'bukh i dr. // *Биофизика.* – 2002. – Т. 47 (6). – С. 1005–1015.
29. Thermodynamics of interactions of water-soluble porphyrins with RNA duplexes / A.A. Ghazaryan, Y.B. Dalyan, S.G. Haroutiunian, et al // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – V. 128. – P. 1914–1921.