

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.113.4

ПАРАМЕТРЫ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МОНОМЕРНОГО И ДИМЕРНОГО БИСБЕНЗИМИДАЗОЛОВ С АТ-СОДЕРЖАЩИМ ПОЛИНУКЛЕОТИДОМ

© 2012 г. Е. С. Лисицына^{1,*}, Н. А. Дурандин¹, А. А. Иванов², С. А. Стрельцов³,
О. Ю. Сусова², А. А. Штиль², А. Л. Жузе³, В. А. Кузьмин¹

¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, 119334

²Научно-исследовательский институт канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

Поступила в редакцию 02.07.2012 г.

Принята к печати 24.07.2012 г.

Двухцепочечная ДНК – одна из важнейших внутриклеточных мишеней противоопухолевых препаратов. Нарушение ее функций или структуры в целом или отдельных участков ведет к серьезным нарушениям таких процессов, как транскрипция и/или трансляция, приводя к гибели опухолевых клеток. В настоящей работе изучены параметры комплексообразования с дуплексом poly(dA-dT) соединения DB(7) – представителя нового класса ДНК-специфичных лигандов на основе димерных бисбензимидазолов в сравнении с мономерным бисбензимидазолом MB(Ac). Методом флуоресцентной спектроскопии с использованием отложения Скетчарда установлена величина константы комплексообразования DB(7), которая составляла $1.18 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, что почти на два порядка выше соответствующей константы MB(Ac) ($2.06 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о том, что наличие в молекуле лиганда двух бисбензимидазольных фрагментов ведет к значительному увеличению его аффинности к полинуклеотиду, что дает экспериментальную основу для целенаправленного синтеза нового класса потенциальных противоопухолевых препаратов на основе димерных бисбензимидазолов.

Ключевые слова: димерный и мономерный бисбензимидазолы, ДНК-комплексообразование, флуоресцентная спектроскопия.

CHARACTERISTICS OF COMPLEX FORMATION BETWEEN MONOMERIC AND DIMERIC BISBENZIMIDAZOLES AND AT-CONTAINING POLYNUCLEOTIDE by E. S. Lisitsyna^{1,*}, N. A. Durandin¹, A. A. Ivanov², S. A. Streltsov³, O. Yu. Susova², A. A. Shtil², A. L. Zhuze³, V. A. Kuzmin¹ (¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow 119334, Russia, *e-mail: lisitsyna.ekaterina@gmail.com; ²Institute of Carcinogenesis, Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow 115478, Russia; ³Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia). Double-stranded DNA is a one of the most important intracellular anticancer agent targets. Disturbance of DNA functions as well as DNA structure lead to disorder of such processes as transcription and/or translation thus inducing tumor cells death. Complex formation between novel dimeric bisbenzimidazole DB(7) and poly(dA-dT) duplex in comparison with known monomeric bisbenzimidazole MB(Ac) was investigated in this study. DB(7)-poly(dA-dT) binding constant was determined by fluorescence spectroscopy using Scatchard plot and it values $1.18 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ that is two orders of magnitude larger than MB(Ac) one ($2.06 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Thus, from findings mentioned above it could be concluded that the presence of two bisbenzimidazole moieties in the ligand structure significantly increases its affinity to the polynucleotide which motivates the synthesis of new potential anticancer drugs based on dimeric bisbenzimidazoles.

Keywords: dimeric and monomeric bisbenzimidazoles, DNA complex formation, fluorescence spectroscopy.

ДНК-специфичные лиганды на основе производных бисбензимидазола используются в клеточной биологии как флуорохромы, которые накапливаются

в ядрах клеток и позволяют выявлять детали структуры хроматина и хромосом [1–4]. Производные бисбензимидазола образуют ком-

Принятые сокращения: ДМСО – диметилсульфоксид.

* Эл. почта: lisitsyna.ekaterina@gmail.com

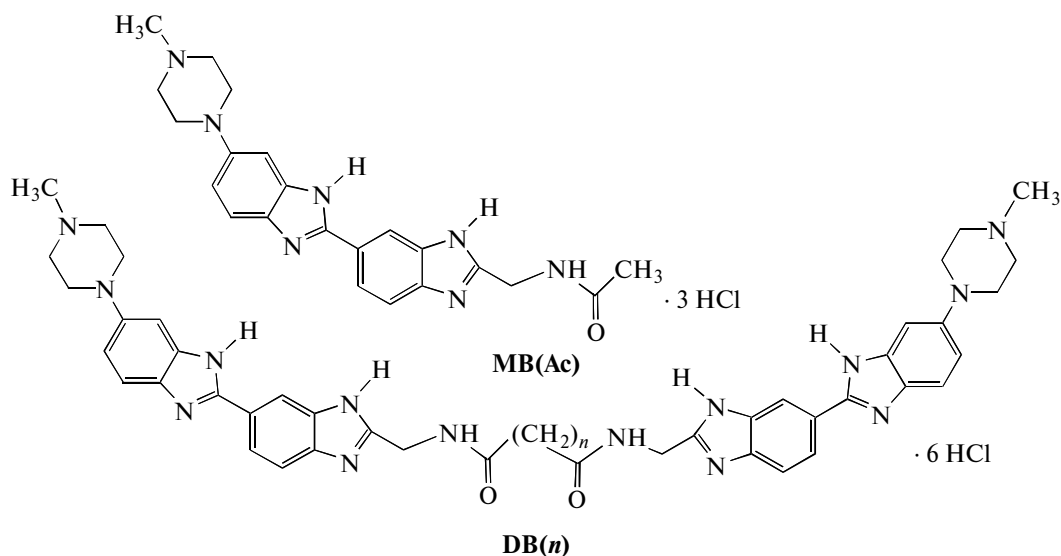


Рис. 1. Структурные формулы бисбензимидазолов: **MB(Ac)** – мономерный; **DB(n)** – димерный, где $n = 4, 5, 7, 11$.

плексы с АТ-богатыми участками в узкой бороздке двухцепочечной ДНК (далее ДНК) [3, 5]. При комплексообразовании с ДНК лиганд может конкурировать за сайт связывания с ДНК-зависимым ферментом и/или вызывать изменение конформации дуплекса, препятствуя тем самым связыванию с ним фермента. Действительно, производные димерных бисбензимидазолов **DB(n)** с различным числом метиленовых остатков в линкере, соединяющем два бисбензимидазольных фрагмента, $n = 4, 5, 7, 11$ – **DB(4)**, **DB(5)**, **DB(7)** и **DB(11)** соответственно (рис. 1), ингибируют ДНК-метилтрансферазу и топоизомеразу I [6, 7]. Правомерно предположить, что способность ингибировать функции ДНК-зависимых ферментов зависит, в частности, от аффинности лигандов к ДНК: более выраженной фермент-ингибирующей активностью будет обладать лиганд с большим сродством к ДНК. Повысить аффинность к ДНК можно за счет создания молекул, представляющих собой олигомеры лиганда, поскольку в таких структурах количество атомов, способных образовывать АТ-специфичные водородные связи должно увеличиться.

Поскольку производные бисбензимидазолов проявляют сродство к АТ-богатым участкам ДНК, в настоящей работе исследованы количественные параметры (константа связывания, количество пар нуклеотидов, накрываемых лигандом, и квантовый выход) при комплексообразовании с полинуклеотидом poly(dA-dT) poly(dA-dT)) мономерного бисбензимидазола **MB(Ac)** и симметричного димерного бисбензимидазола **DB(n)**, где $n = 7$ (рис. 1) [8]. Эти параметры можно рассматривать

как критерии, определяющие биологическую активность двух данных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мономерный и димерный бисбензимидазолы синтезированы в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта [8]. Использован коммерчески доступный препарат poly(dA-dT) (“Sigma”, США). Исходные растворы исследуемых соединений в диметилсульфоксиде (ДМСО) приготовлены в концентрации 1 мМ. Поскольку в экспериментах использовали буферные растворы **MB(Ac)** и **DB(7)**, то для улучшения растворения их выдерживали трое суток при комнатной температуре. Затем равные объемы растворов **MB(Ac)** и **DB(7)** и poly(dA-dT) смешивали и оставляли на три дня при 4°C для получения термодинамически равновесных систем комплексов соединений с poly(dA-dT). Выдерживание растворов в течение трех суток обеспечивает образование комплекса **DB(7)** в неассоциированной форме с poly(dA-dT) и исключает образование ассоциатов и других типов комплексов лиганда с полинуклеотидом, которые описаны ранее в литературе [9]. Растворы соединений с poly(dA-dT) при 22°C готовили разбавлением исходных 1 мМ какодилатным буфером, pH ~ 6.8. Концентрацию poly(dA-dT) в растворах определяли спектрофотометрически, пользуясь известным значением молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{260} = 1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (в расчете на 1 п.н.).

Спектры поглощения получены на приборе Shimadzu UVVIS3101PC (Япония) в кварцевых кюветах (0.4 см × 1.0 см), оптический путь состав-

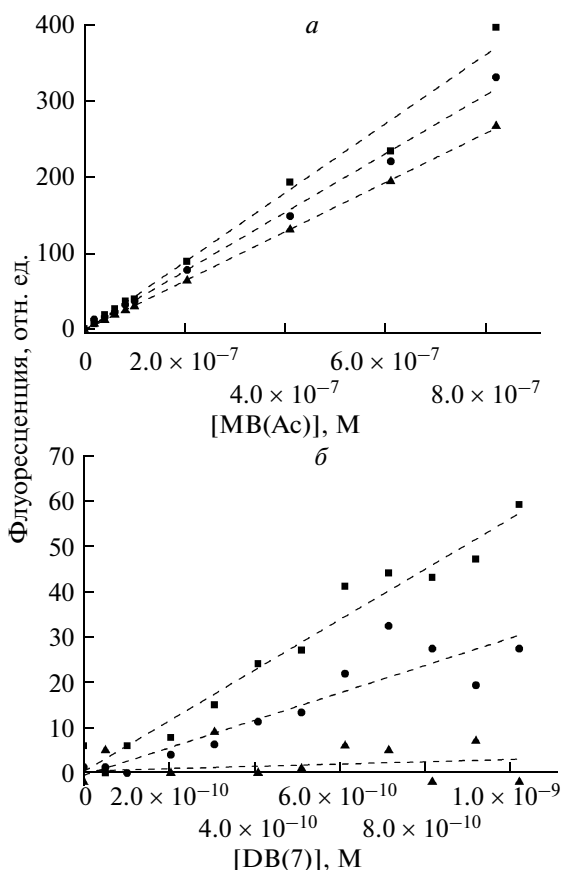


Рис. 2. Кривые титрования: (а) **MB(Ac)** и (б) **DB(7)** при различных концентрациях poly(dA-dT) (в отсутствие полинуклеотида (▲), 1×10^{-6} М п.н. (●), 3×10^{-5} М п.н. (■) и в отсутствие полинуклеотида (▲), 1×10^{-5} М п.н. (●), 1×10^{-8} М п.н. (■) соответственно)

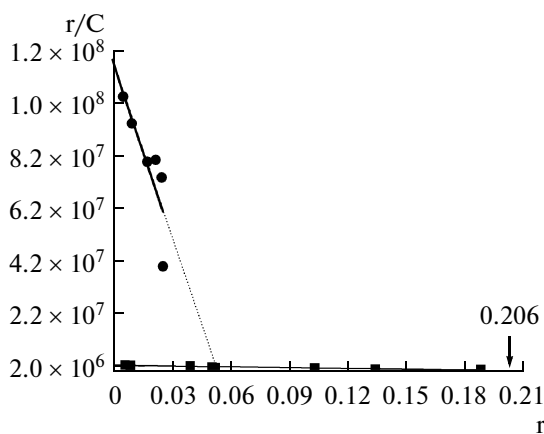


Рис. 3. Отложение Скэтчарда для зависимостей интенсивности флуоресценции красителя, где r — отношение концентрации связанного лиганда к концентрации полимера, C — концентрация свободного лиганда в растворе в молях/л. Черными линиями обозначены линии тренда, которые лучше всего описывают полученные экспериментальные точки, соответственно для **DB(7)** (●) и **MB(Ac)** (■). Черной пунктирной линией показана экстраполяция полученной регрессии для **DB(7)** до пересечения с осью абсцисс для дальнейшего расчета параметра L .

лял 1 см, спектральная ширина щели — 1 нм. Спектры флуоресценции регистрировали на приборе Shimadzu RF5301PC (Япония) в кварцевой кювете ($0.4 \text{ см} \times 1.0 \text{ см}$), при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}} = 350 \text{ нм}$, оптический путь возбуждающего света составлял 0.4 см.

По зависимостям флуоресцентного титрования лигандами (**MB(Ac)** и **DB(7)**) постоянных концентраций полинуклеотида (рис. 2) определены концентрации связанного и свободного лигандов, а по методу Скэтчарда [10] — константы связывания K_{bind} и количество пар нуклеотидов, приходящееся на одну связанную молекулу лиганда L . Согласно общепринятым моделям [11, 12], касательная к такой изотерме в начальной части пересекает ось ординат в точке, значение которой равно K_{bind} , а ось абсцисс — в точке, значение которой соответствует $1/(2L-1)$. По отложениям Скэтчарда для комплексов **MB(Ac)** и **DB(7)** с poly(dA-dT) также рассчитан параметр L — количество пар нуклеотидов, занимаемых одной молекулой связанного лиганда на poly(dA-dT) (рис. 3). Значения параметров K_{bind} и L представлены в табл. 1. Титрование для каждого лиганда воспроизводили трижды, что уменьшило ошибку метода Скэтчарда при малых и высоких уровнях насыщения в диапазонах от 0 до 0.1 и от 0.9 до 1, где ошибка метода максимальна [13, 14].

Квантовые выходы флуоресценции исследуемых соединений в ДМСО, буфере и в комплексе с poly(dA-dT) определяли относительно сульфата хирина в растворе 0.1 М серной кислоты с известным квантовым выходом 0.546 [15]. Чтобы определить квантовые выходы флуоресценции лигандов и комплексов лигандов с полинуклеотидом, измеряли интенсивность флуоресценции при оптической плотности < 0.1 и длине волны возбуждения $\lambda_{\text{возб.}} = 350 \text{ нм}$. Квантовые выходы флуоресценции лигандов в комплексах с poly(dA-dT) ($\Phi_{\text{ком}}$) определяли при относительно высоких концентрациях poly(dA-dT), когда в буферных растворах лиганды присутствовали только в комплексах с poly(dA-dT).

Времена жизни флуоресценции **MB(Ac)** или **DB(7)** в ДМСО, буферном растворе и в комплексе с poly(dA-dT) рассчитаны при помощи моноэкспоненциальной модели по кинетическим кривым затухания флуоресценции, полученным на приборе EasyLife VTM (ОВВ Corp., США) в кварцевой кювете ($0.4 \text{ см} \times 1.0 \text{ см}$) при $\lambda_{\text{возб.}} = 305 \text{ нм}$. Флуоресценцию детектировали с использованием оптического фильтра с пропусканием $\lambda > 400 \text{ нм}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексообразование **MB(Ac)** и **DB(7)** с poly(dA-dT) исследовано по изменениям спек-

тров поглощения и флуоресценции в какодилатном буферном растворе (рис. 4). Об образовании комплекса лигандов с poly(dA-dT) свидетельствовало изменение в спектрах поглощения при добавлении полинуклеотида к исследуемым соединениям в буферном растворе: значительное уширение спектров поглощения и уменьшение интенсивности поглощения, а также смещение максимумов поглощения в длинноволновую область (**MB(Ac)** – $\lambda_{\text{макс.}} = 326$ нм и **DB(7)** – $\lambda_{\text{макс.}} = 328$ нм) по сравнению со спектрами свободных лигандов (**MB(Ac)** – $\lambda_{\text{макс.}} = 323$ нм и **DB(7)** – $\lambda_{\text{макс.}} = 325$ нм). Комплексообразование **MB(Ac)** и **DB(7)** с poly(dA-dT) протекало с увеличением интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции (табл. 2), а также с батохромным сдвигом максимума флуоресценции относительно свободного лиганда в буфере ($\lambda_{\text{макс. MB(Ac)буф}} = 463$ нм, $\lambda_{\text{макс. DB(7)буф}} = 455$ нм, $\lambda_{\text{макс. (MB(Ac)-poly(dA-dT))}} = 470$ нм, $\lambda_{\text{макс. (DB(7)-poly(dA-dT))}} = 470$ нм).

Установлено, что квантовый выход флуоресценции **DB(7)** зависит от окружения гораздо сильнее, чем в случае **MB(Ac)**. Димерный бисбензимидазол **DB(7)** практически не флуоресцирует в буферном растворе ($\Phi_{\text{буф}} = 1\%$), тогда как в комплексе с poly(dA-dT) квантовый выход лиганда резко возрастает ($\Phi_{\text{ком}} = 29\%$) и сопоставим с квантовым выходом **DB(7)** в органическом растворителе ДМСО ($\Phi_{\text{ДМСО}} = 22\%$). Данные, представленные в табл. 2, позволяют утверждать, что **DB(7)** флуоресцирует только в гидрофобной среде в мономерной форме; в водном буферном растворе это соединение, по-видимому, образует термодинамически более выгодные нефлуоресцирующие димеры или агрегаты. Схожие свойства показаны для нефлуоресцирующей внутримолекулярной “шпильки” димерного бисбензимидазола [9]. Так как кинетические кривые в буфере и ДМСО показали моноэкспоненциальный характер затухания и приблизительно одинаковые времена жизни флуоресценции для **MB(Ac)** или **DB(7)**, можно полагать, что в растворах флуоресцирует только один тип молекул – неагрегированные мономеры (табл. 2). В апротонном органическом растворителе ДМСО молекулы **DB(7)** существуют в гидрофобной среде; схожие условия и в комплексе димерного бисбензимидазола с poly(dA-dT), где молекулы **DB(7)** защищены от водной среды и не имеют возможности образовывать нефлуоресцирующие структуры. Однако квантовый выход флуоресценции возрастает при переходе от мономерной формы **DB(7)** в ДМСО к комплексу мономера **DB(7)** с полинуклеотидом. Это можно объяснить влиянием гидрофобного окружения в комплексе с poly(dA-dT), а также увеличением жесткости лиганда в комплексе с биомакромолекулой и уменьшением эффектив-

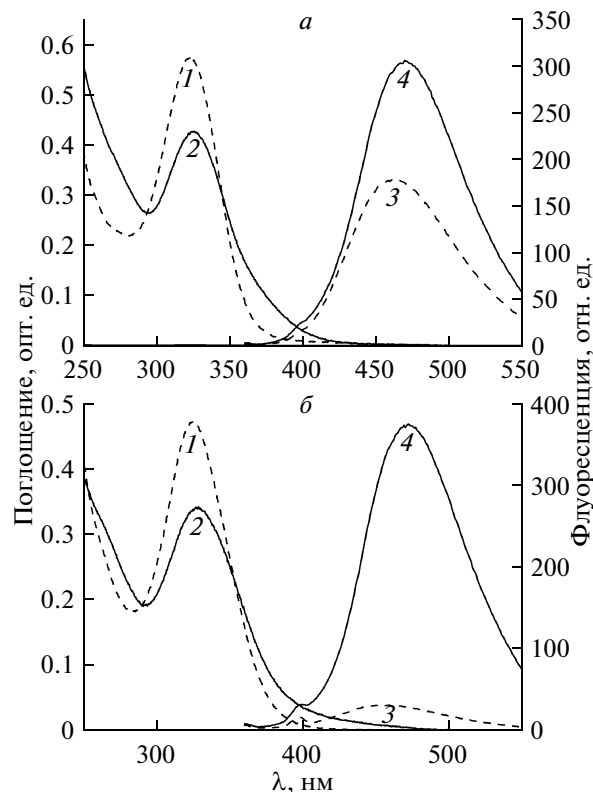


Рис. 4. *a* – Спектры поглощения **MB(Ac)** (2.1×10^{-5} М) в 1 мМ какодилатном буферном растворе в присутствии различных концентраций poly(dA-dT): 0 (1) и 3×10^{-5} М (2); спектры флуоресценции красителя **MB(Ac)** (4.6×10^{-6} М) в 1 мМ какодилатном буферном растворе в присутствии различных концентраций poly(dA-dT): 0 (3) и 3×10^{-5} М (4). *б* – Спектры поглощения красителя **DB(7)** (1×10^{-5} М) в 1 мМ какодилатном буферном растворе в присутствии poly(dA-dT): 0 (1) и 1×10^{-5} М (2); спектры флуоресценции красителя **DB(7)** (1×10^{-7} М) в 1 мМ какодилатном буферном растворе в присутствии различных концентраций poly(dA-dT): 0 (3) и 1×10^{-5} М (4).

ности безызлучательной диссипации энергии при колебаниях и вращениях отдельных фрагментов молекулы [16]. Важно отметить, что при комплексообразовании с poly(dA-dT) растет и время жизни флуоресценции, что служит аргументом в пользу стабилизации лиганда при взаимодействии с полинуклеотидом. У мономерного бисбензимидазола **MB(Ac)** квантовые выходы флуо-

Таблица 1. Параметры комплексообразования исследуемых соединений с poly(dA-dT)

Соединение	Константа связывания, M^{-1}	Длина сайта связывания, п.н.
MB(Ac)	2.06×10^6	3
DB(7)	1.18×10^8	9

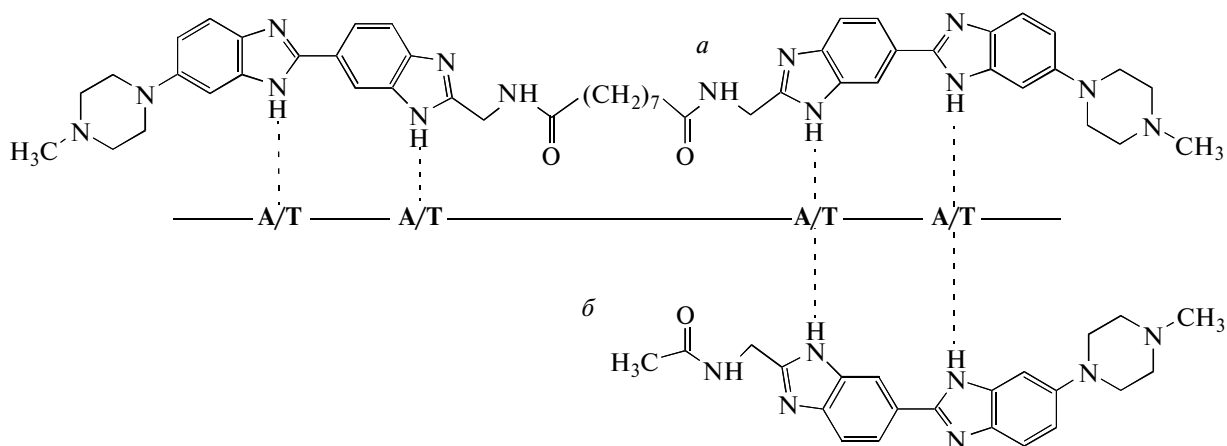


Рис. 5. Схематическое изображение комплексов **DB(7)** (а) и **MB(Ac)** (б) с сайтами, состоящими из двух подряд расположенных АТ-пар. Пунктирные линии – водородные связи. Толстой линией изображена ДНК.

ресценции в ДМСО и в буферном растворе одинаковы ($\Phi_{\text{ДМСО}} = \Phi_{\text{буф}} = 70\%$), т.е. это соединение находится в виде мономеров в полярном и неполярном растворителях. При комплексообразовании с poly(dA-dT) квантовый выход **MB(Ac)** возрастает ($\Phi_{\text{ком}} = 88\%$), что можно объяснить увеличением жесткости структуры молекулы мономерного лиганда в комплексе с полинуклеотидом, как и в случае с димерным соединением **DB(7)**.

Гипотеза о том, что АТ-специфичный лиганд **DB(7)** с двумя бисбензимидазольными фрагментами, связанными гептаметиленовым линкером, образует гораздо более прочный комплекс с полинуклеотидом poly(dA-dT), чем мономерный бисбензимидазол **MB(Ac)** подтверждают полученные значения констант связывания и параметров L (табл. 1). Концентрации связанного и свободного лигандов, константы связывания K_{bind} и количество п.н., приходящееся на одну связанную молекулу лиганда, (L) определяли из зависимостей флуоресцентного титрования лигандами

Таблица 2. Времена жизни и квантовые выходы флуоресценции исследуемых соединений в различных растворителях и их комплексов с poly(dA-dT)

Условия	Времена жизни флуоресценции, нс		Значения квантовых выходов, %	
	MB(Ac)	DB(7)	MB(Ac)	DB(7)
ДМСО	4.1	3.9	70	22
Буфер	4.2	4.0	70	1
Буфер + poly(dA-dT)	5.1	4.5	88	29

(**MB(Ac)** и **DB(7)**) постоянных концентраций полинуклеотида (рис. 2) по методу Скетчарда [10].

Константа связывания для **DB(7)** с poly(dA-dT) почти на два порядка превышает константу для **MB(Ac)**. Высокое значение константы связывания димерного бисбензимидазола с полинуклеотидом ($K_{\text{bind}} = 1.18 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) по сравнению с мономерным ($K_{\text{bind}} = 2.06 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) можно объяснить, по-видимому, тем, что каждая молекула **DB(7)** имеет возможность взаимодействовать одновременно с двумя сайтами в молекуле poly(dA-dT), состоящими из двух подряд расположенных АТ-пар ([5, 17, 18]), а, следовательно, комплекс стабилизирован образованием четырех водородных связей между атомами азота четырех бензимидазольных фрагментов (доноры водородной связи), и гетероциклическими основаниями в полинуклеотиде (акцепторы водородной связи) (рис. 5). Гибкость линкера, соединяющего две мономерные части **DB(7)**, позволяет молекуле лиганда принимать форму, изоспиральную узкой бороздке полинуклеотида, и способствует образованию более прочного комплекса. В случае мономерного бисбензимидазола **MB(Ac)** АТ-специфичность обеспечена за счет образования только двух водородных связей между атомами N1 бензимидазольных гетероциклов и атомами O2 тимина и/или N3 аденина в poly(dA-dT), как и в случае мономерного бисбензимидазола Hoechst 33258 [19]. Рассчитанные параметры L для комплексов **MB(Ac)** и **DB(7)** с poly(dA-dT) также соответствуют предложенной гипотезе и составляют 3 и 9 п.н. (табл. 1).

Таким образом, полученные в настоящее время данные по оценке комплексообразования с poly(dA-dT) мономерного (**MB(Ac)**) и димерного бисбензимидазолов (**DB(7)**) могут быть экспери-

ментальной основой для дальнейшего целенаправленного синтеза новых противоопухолевых соединений на основе димерных бисбензимидазолов.

Авторы выражают благодарность Д.Н. Калужному (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук) за помощь в проведении экспериментов по время-разрешенной спектроскопии и обсуждении полученных результатов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (11-04-00589), программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007–2013 годы”, Госконтракт № 16.512.11.2259 и благотворительного фонда “ПРОТЕК”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов К.В., Егорова Е.И., Иванов А.А., Громько А.В., Жузе А.Л., Болшева Н.Л., Юркевич О.Ю., Муравенко О.В., Зеленин А.В. 2008. Димерные бисбензимидазольные красители на основе Hoechst 33258 – новые ДНК-специфичные флуорохромы для цитогенетики человека и растений. *Биологические мембраны*. **25**, 173–180.
2. Latt S.A., Wohlleb J.C. 1975. Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin, and metaphase chromosomes. *Chromosoma*. **52**, 297–316.
3. Latt S.A., Stetten G. 1976. Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.* **24**, 24–33.
4. Weisblum B., Haenssler E. 1974. Fluorometric properties of the bibenzimidazole derivative Hoechst 33258, a fluorescent probe specific for AT concentration in chromosomal DNA. *Chromosoma*. **46**, 255–260.
5. Haq I., Ladbury J.E., Chowdhry B.Z., Jenkins T.C., Chaires J.B. 1997. Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAATTGCG)₂ duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* **271**, 244–257.
6. Cherepanova N.A., Ivanov A.A., Maltseva D.V., Minero A.S., Gromyko A.V., Streltsov S.A., Zhuze A.L., Gromova E.S. 2011. Dimeric bisbenzimidazoles inhibit the DNA methylation catalyzed by the murine Dnmt3a catalytic domain. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26**, 295–300.
7. Сусова О.Ю., Иванов А.А., Morales Ruiz S.S., Лесовая Е.А., Громько А.В., Стрельцов С.А., Жузе А.Л. 2010. Узкобороздочные димерные бисбензимидазола ингибируют *in vitro* связывание с ДНК эукариотической ДНК-топоизомеразы I. *Биохимия*. **75**, 781–788.
8. Иванов А.А., Саянов В.И., Стрельцов С.А., Черепанова Н.А., Громова Е.С., Жузе А.Л. 2011. Лиганды, специфичные к определенным последовательностям пар оснований ДНК. XIV. Синтез флуоресцентных биологически активных димерных бисбензимидазолов – DB(3, 4, 5, 7, 11). *Биоорганическая химия*. **37**, 530–541.
9. Streltsov S.A., Zhuze A.L. 2008. Hoechst 33258-poly(dG-dC).poly(dG-dC) complexes of three types. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **26**, 99–114.
10. Scatchard G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **51**, 660–672.
11. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. 1971. Теория одномерной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере. *Молекулярная биология*. **5**, 194–198.
12. McGhee J.D., von Hippel P.H. 1974. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.* **86**, 469–489.
13. Correia J.J., Chaires J.B. 1994. Analysis of drug-DNA binding isotherms: a Monte Carlo approach. *Methods Enzymol.* **240**, 593–614.
14. Garbett N.C., Chaires J.B. 2008. Binding: a polemic and rough guide. *Methods Cell Biol.* **84**, 3–23.
15. Fletcher A.N. 1969. Quinine sulfate as a fluorescence quantum yield standard. *Photochem Photobiol.* **9**, 439–444.
16. Андреева Е.В., Виноградов А.М., Тевяшова А.Н., и др. 2010. Исследование комплексообразования оливомицина А и его производных с ДНК. *ДАН Биохим. биофиз.* **435**, 826–830.
17. Loontjens F.G., Regenfuss P., Zechel A., Dumortier L., Clegg R.M. 1990. Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry*. **29**, 9029–9039.
18. Breusegem S.Y., Clegg R.M., Loontjens F.G. 2002. Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)₄ DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. *J. Mol. Biol.* **315**, 1049–1061.
19. Fede A., Billeter M., Leupin W., Wüthrich K. 1993. Determination of the NMR solution structure of the Hoechst 33258-d(GTGGAAATCCAC)₂ complex and comparison with the X-ray crystal structure. *Structure*. **1**, 177–186.