

УДК 577.3

## ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОНФОРМАЦИОННЫХ ПЕРЕХОДОВ В ДВОЙНЫХ И ТРОЙНЫХ СПИРАЛЯХ, ОБРАЗОВАННЫХ МОЛЕКУЛАМИ ПОЛИ dA и ПОЛИ dT В РАСТВОРАХ С ИОНАМИ Na<sup>+</sup> и Mg<sup>2+</sup>

Ю.П. Благой, В.Н. Зозуля, С.А. Егупов, В.В. Онищенко

Физико-технический институт низких температур им. Б.П. Веркина НАН Украины,  
61103, Харьков, пр. Ленина, 47, [blagoi@iti.kharkov.ua](mailto:blagoi@iti.kharkov.ua)

Поступила в редакцию 25 марта 2005 г.

Изучена возможность применения теории "застежка-молния" (ЗМ) для описания фазовых равновесий в системах, образованных синтетическими олиго- и полинуклеотидами: (dA)<sub>n</sub> и (dT)<sub>n</sub> в растворах с ионами Mg<sup>2+</sup>. В рамках модели ЗМ получены формулы для описания переходов триплекс-дуплекс (3→2), дуплекс-однонитевые клубки (2→1). С использованием экспериментальных данных для температуры T<sub>m</sub> и энтальпии ΔH для этих переходов рассчитаны значения энтропии и параметров, характеризующих зависимость свободной энергии Гиббса от концентрации ионов. Определены зависимости T<sub>m</sub> и ширины интервалов переходов ΔT от длины полимеров, их концентрации в растворе и от содержания ионов Mg<sup>2+</sup>. Полученные расчетные значения хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными.

**Ключевые слова:** полинуклеотиды, триплексы, дуплексы, конформационные переходы, ионы Mg<sup>2+</sup>.

### ВВЕДЕНИЕ

Интерес к изучению комплексов олигонуклеотидов, образующих как дуплексные, так и триплексные структуры, обусловлен их биологической ролью и возможным применением в биотехнологических процессах и фармакологии [1, 2]. В связи с этим в последние годы выполнено много экспериментальных исследований структурных переходов в этих молекулах с различным нуклеотидным составом и разной концентрацией ионов, стабилизирующих их дуплексную и триплексную структуры [3 - 6]. Удобными модельными системами для изучения термодинамики и кинетики конформационных переходов являются гомонуклеотиды олиго (rA)<sub>n</sub> олиго (rU)<sub>n</sub> [(rA)<sub>n</sub>·(rU)<sub>n</sub>] и олиго (dA)<sub>n</sub> олиго (dT)<sub>n</sub> [(dA)<sub>n</sub>·(dT)<sub>n</sub>].

Наиболее полно изучена система (rA)<sub>n</sub>·(rU)<sub>n</sub> [7, 8]. При различных концентрациях Na<sup>+</sup> для этой системы получены данные о фазовой диаграмме, изучена кинетика перехода спираль-клубок и выполнен термодинамический анализ результатов с применением различных модельных теорий. Достаточно подробно с использованием ряда методов изучены переходы в системе dA<sub>19</sub> - dT<sub>19</sub> [9, 10].

Для анализа экспериментальных результатов в большинстве случаев использовалась простая модель "двух состояний" ("все или ничего"), с помощью которой можно определять константы связывания олигонуклеотидов в комплексах и значения термодинамических потенциалов (ΔH, ΔS, ΔG).

Несмотря на кажущуюся простоту таких систем, термодинамика конформационных переходов в них осложняется несколькими обстоятельствами: 1) возможностью "проскальзывания" (сдвига) нитей относительно друг друга; 2) частичным упорядочением пуринового олигонуклеотида после разделения нитей; 3) разупорядочением концевых участков молекул (так называемым "растрепыванием концов").

В связи с этим для детального описания переходов в комплексах олигонуклеотидов необходимо использовать более совершенные теоретические подходы. Таким требованиям удовлетворяет, в частности, теория "застежка-молния" (ЗМ), разработанная Applequist и Damle [11, 12] с использованием модели Изинга, предложенной для нуклеиновых кислот Зиммом [13]. Эта теория использована в работах ряда авторов для термодинамических расчетов переходов спираль-клубок в дуплексах [3, 8].

Настоящая работа посвящена расчетам переходов спираль-клубок в системах, образованных dA<sub>n</sub> и dT<sub>n</sub> в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>, с применением данной теории. Рассмотрены переходы 2→1 и 3→2 при различных концентрациях Mg<sup>2+</sup> и длинах молекул при [Na<sup>+</sup>]=0.1, pH 6.5-7.0. В наших предыдущих работах [14 - 16] теория ЗМ была применена для описания переходов спираль-клубок в дуплексах, образованных олигонуклеотидами разной длины, изучена возможность описания перехода 3→2 в триплексной системе и рассмотрено укрепление дуплексов и триплексов с помощью ковалентно присоединенных красителей. Во всех рассмотренных случаях переходы были исследованы в растворах с Na<sup>+</sup>. Однако в последнее время выполнен ряд экспериментальных работ по изучению влияния ионов Mg<sup>2+</sup> на конформационные переходы в олигонуклеотидах различного состава [17 - 19].



## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ И МЕТОДЫ РАСЧЕТОВ

В системе взаимодействующих комплементарных олигонуклеотидов равной длины  $N$  и при возможности сдвига (скольжения) нитей относительно друг друга константа связывания определяется согласно выражению

$$K_{12} = \beta_{12} \sum_{n=1}^N (N-n+1)^2 s_{12}^n \equiv \beta_{12} L(s_{12}), \quad (1)$$

где  $\beta_{12}$  - так называемая "константа ассоциации (нуклеации)",  $n$  - число спариваемых нуклеотидов,  $s_{12}$  - константа присоединения новой пары к упорядоченной части дуплекса (константа роста цепи):

$$s_{12} = \exp(-\Delta G_{12} / RT), \quad (2)$$

где  $\Delta G_{12}$  - разность свободных энергий упорядоченной и разупорядоченной пар.

В случае олигомеров разного типа (реакция  $A + B \rightleftharpoons AB$ ) доля спаренных нуклеотидов  $\theta$  определяется выражением

$$\theta = [1 + 4\gamma_{12}L(s_{12}) - (1 + 8\gamma_{12}L(s_{12}))^{1/2}]s_{12}L'(s_{12}) / (4N_1 \gamma_{12}L(s_{12})^2), \quad (3)$$

где  $\gamma_{12} = \beta_{12}C_1$  и  $C_1$  - общая концентрация олигомеров.

В случае частичного упорядочения одной из нитей (олиго  $dA_n$ ) разность свободной энергии  $\Delta G_{12}$  в формуле (2) с учетом изменения концентрации ионов имеет вид

$$\Delta G_{12} = \Delta H_{12} - T_{12}\Delta S_{12} + RT_{12} \ln(1 + e^{-\Delta G_A / RT_{12}}) + RT_{12}(C_1 - C_2 \lg J), \quad (4)$$

где  $\Delta H_{12}$  и  $\Delta S_{12}$  - изменения энтальпии и энтропии для гипотетической реакции между олигонуклеотидами в отсутствие упорядочения одиночных нитей и электростатического взаимодействия;  $\Delta G_A = \Delta H_A - T_{12} \cdot \Delta S_A$ , где  $\Delta H_A$  и  $\Delta S_A$  - изменения энтальпии и энтропии для реакции упорядочения адениловых нитей из клубковой формы;  $C_1$  и  $C_2$  - эмпирические константы,  $J = [Mg^{2+}]$ .

Процесс формирования триплекса можно рассматривать как присоединение третьей нити (олиго  $dT_n$ ) к уже образованному дуплексу  $dA_n \cdot dT_n$  (реакция  $dA_n \cdot dT_n + dT_n \rightleftharpoons dA_n \cdot 2dT_n$ ). В этом случае процесс является бимолекулярной реакцией и в приближении данной модели может быть описан уравнениями (1)-(3) с заменой индексов 12 на 23. Расчет изменения свободной энергии  $\Delta G_{23}$  в этом случае выполняется по уравнению

$$\Delta G_{23} = \Delta H_{23} - T_{23}(\Delta S_{13} - RC'_1) + T_{23}(\Delta S_{23} - RC_1) + RT_{23} \cdot \lg J \cdot (C_2 - C'_1), \quad (5)$$

где  $\Delta H_{23} = \Delta H_{13} - \Delta H_{12}$ , а  $C'_1$ ,  $C'_2$ ,  $C_1$ ,  $C_2$  - эмпирические константы, характеризующие зависимости температуры переходов от концентрации ионов. Величина этих констант может быть определена по фазовым диаграммам. При расчетах по формулам (1) - (5) были использованы полученные ранее [8, 14, 15] значения параметров или определенные экспериментально термодинамические величины  $\Delta H_A$ ,  $\Delta S_A$  и другие (таблица 1).

Таблица 1. Параметры переходов, использованные при расчетах

Неизменные параметры:  $\Delta H_A = -7900$ ,  $\Delta S_A = -25$ ,  $\Delta H_{12} = -10900$ ,  $\Delta H_{13} = -15400$ ,  $\gamma_{21} = -2,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $\gamma_{32} = -10^{-7}$ .

Исходные данные, полученные по фазовой диаграмме [20].			Результаты расчетов	
$\lg J_1$	-3	-3	$\Delta S_{12} - RC_1 = -29,77$	(-30,7)*
$\lg J_2$	-2	-2,4	$C_2 = 0,187$	(0,69)
$T_{12}(1)$	346,5	346,5	$\Delta S_{13} - RC'_1 = -40,28$	(-45,5)
$T_{12}(2)$	352,0	349,5	$C'_2 = 0,781$	(1,59)
$T_{23}(1)$	320,5	320,5		
$T_{23}(2)$	347,0	337,5		

\*) В скобках приведены значения параметров для поли А-поли У при  $[Na^+] = 0,1M$  [8].

Значения энтальпии даны в кал/моль, энтропия - в кал/моль-град.  $J = [Mg^{2+}]$ .

Эмпирические константы  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C'_1$ ,  $C'_2$ , определяющие зависимость температуры переходов от концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , были определены методом совместного решения линейных уравнений  $\Delta G_{12} = 0$  и  $\Delta G_{23} = 0$  с использованием фазовой диаграммы, полученной ранее [20].

В таблице 1 приведены исходные данные для расчетов и полученные результаты. Параметры  $\gamma_{12}$  и  $\gamma_{13}$  заимствованы также из предыдущих наших работ [15, 16].



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки возможностей теории ЗМ были рассчитаны кривые переходов  $3 \rightarrow 2$  и  $2 \rightarrow 1$  в широком диапазоне длин молекул от 10 до 500 мономерных единиц при концентрациях  $Mg^{2+}$ , используемых обычно в экспериментальных исследованиях:  $(10^{-3} \div 10^{-1})M$ . С целью определения влияния концентрации олигонуклеотидов в растворе расчеты выполнены при нескольких значениях параметра  $\gamma$ , пропорционального концентрации полимера. На рис. 1 представлены наиболее типичные рассчитанные кривые переходов  $2 \rightarrow 1$  и  $3 \rightarrow 1$ . В ряду рассчитанных кривых с ростом  $N$  возрастает температура перехода и резко увеличивается наклон кривых (т.е. убывает ширина интервала перехода  $\Delta T$ ).

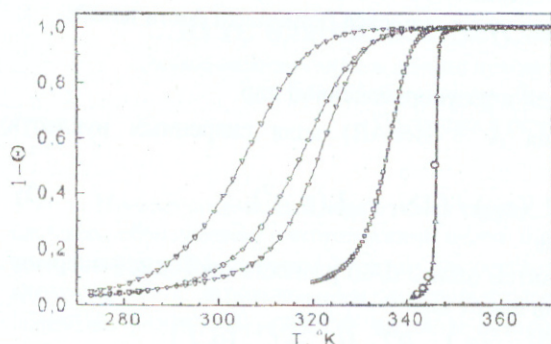


Рис. 1. Кривые перехода  $dA_N/dT_N$   $3 \rightarrow 2$ :  $\nabla$  -  $N=10$ ,  $lgJ=-1$ ,  $\gamma=10^{-7}$ ;  $\diamond$  -  $N=12$ ,  $lgJ=-1$ ,  $\gamma=10^{-7}$ ;  $\blacktriangledown$  -  $N=20$ ,  $lgJ=-2$ ,  $\gamma=10^{-6}$ ;  $dA_N/dT_N$   $2 \rightarrow 1$   $\circ$  - экспериментальные значения [20],  $\Delta$  -  $N=500$ ,  $lgJ=-2$ ,  $\gamma=2,5 \cdot 10^{-8}$ ;  $\blacksquare$  -  $N=20$ ,  $lgJ=-2$ ,  $\gamma=10^{-7}$ ;  $J=[Mg^{2+}]$ .

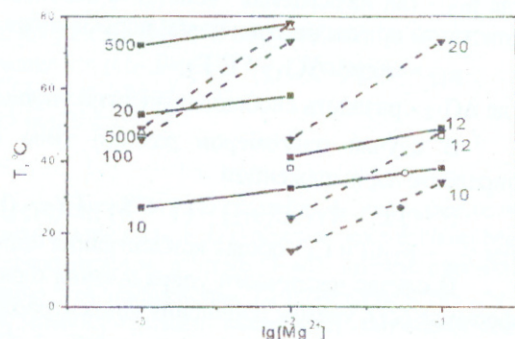


Рис. 2. Зависимость температуры переходов  $2 \rightarrow 1$  (d) и  $3 \rightarrow 2$  (tr) от концентрации  $Mg^{2+}$ .  $\blacksquare$  — дуплексы,  $\blacktriangledown$  — триплексы. Эксп. значения:  $N=10$  -  $\circ$  - d,  $\bullet$  - tr [17],  $\square$  -  $N=12$  [19],  $\Delta$  -  $N=500$  [20].  $\gamma(d) = 2,5 \cdot 10^{-8}$ ,  $\gamma(tr) = 10^{-7}$ .

Характерной особенностью кривых является также некоторая асимметрия. Кривые более растянуты в низкотемпературной области. Как было показано ранее [15, 16], этот эффект может быть обусловлен разупорядочением концевых участков молекул (так называемым "растрепыванием концов"). Асимметрия кривых плавления для олигонуклеотидов отмечена также в ряде экспериментальных работ, например, в [9]. На рис. 1 этот эффект показан для кривой при  $N=500$ , полученной в наших исследованиях [20]. С помощью общепринятого метода по касательным в середине кривой перехода были определены значения ширины кривых переходов  $\Delta T$  (таблица 2).

Таблица 2. Зависимость ширины интервала перехода от длины молекул.

N	Триплексы, переход $3 \rightarrow 2$						Дуплексы, переход $2 \rightarrow 1$		
	$\gamma = 10^{-7}$			$\gamma = 10^{-6}$			$\gamma = 10^{-6}$		
	$lgJ=-3$	$lgJ=-2$	$lgJ=-1$	$lgJ=-3$	$lgJ=-2$	$lgJ=-1$	$lgJ=-3$	$lgJ=-2$	$lgJ=-1$
	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$	$\Delta T$
10	-	26	28	-	30	32	-	-	23
12	-	25	26	-	26	27	20	22	18
20	-	19	24	-	21	25	12	10,5	18
100	10	7	9	11	6,5	10	3	3	3,5
500	2,0	2,5	3,2	2,2	2,7	3,3	1,1	1	3

Для дуплексов коротких олигонуклеотидов (10-20 пар оснований) расчетная величина  $\Delta T \approx 10 - 25^\circ$ , а для триплексов -  $\Delta T \approx 20 - 37^\circ$ . Эти значения удовлетворительно согласуются с экспериментальными данными [17]. Величина  $\Delta T$  резко уменьшается до  $1-3^\circ$  при  $N \approx 100-500$  пар оснований, что характерно для высокополимерных молекул гомополинуклеотидов.

На рис. 2 показаны результаты расчетов зависимостей температуры переходов обоих типов от концентрации ионов  $Mg^{2+}$  для олигонуклеотидов различной длины  $N$ . Обращает на себя внимание почти линейная зависимость расчетных значений  $T_m$  от  $lg[Mg^{2+}]$ , которая наблюдается также и в эксперименте [20]. Наклон этих зависимостей для дуплексов и триплексов слабо изменяется с ростом  $N$ . Для  $N=10$  и 12 результаты расчетов, приведенные на рисунке, сопоставляются с имеющимися экспериментальными данными. Для  $N=10$  значения, полученные в работе [17] при  $[Mg^{2+}]=50$  мМ как для дуплексной, так и



триплексной систем, хорошо согласуются с расчетными величинами. А в случае с дуплексами при  $N=12$  [18, 19] согласие экспериментальных и расчетных значений несколько хуже, хотя, возможно, находится в пределах экспериментальных ошибок.

Представляет интерес рассмотрение зависимостей  $T_m$  от значений параметра  $\gamma$ , который при  $\beta = \text{const}$  пропорционален концентрации полимерных молекул в растворе. Для комплексов обоих типов зависимость  $T_m$  от  $\gamma$  (то есть от  $C_i$ ) уменьшается с ростом  $N$  (рис. 3). Уже при  $N=100$  как для дуплексов, так и триплексов величина  $T_m$  почти не зависит от концентрации полимера в растворе. Это свидетельствует о том, что плавление олигомеров такой длины идет по типу реакции первого порядка, что характерно для бесконечно длинного полимера. Этот вывод следует также из анализа зависимости ширины интервала перехода от длины молекул (таблица 2).

Рассмотренные результаты позволяют также оценить зависимость температурной стабильности дуплексов и триплексов от длины олигонуклеотидов. Как видно из рис. 2-4, при малых значениях  $N$  величина  $T_m$  резко возрастает, а при  $N \geq 500$  стремится к постоянному значению. Такой эффект также типичен для длинных полимерных молекул ДНК.

Представленные в данной работе результаты получены при ряде допущений. Так, например, не учитывалась зависимость параметра нуклеации  $\beta$  от температуры, при расчетах триплексов предполагалось полное разупорядочение дуплексных структур, то есть не учитывалось возможное пересечение переходов  $2 \rightarrow 1$  и  $3 \rightarrow 1$ , некоторые использованные термодинамические величины заимствованы из данных для РНК (поли гА · поли гУ) [7, 8]. Несмотря на это, расчетные данные удовлетворительно согласуются с имеющимися экспериментальными результатами. В связи с этим можно предположить, что теоретическая модель ЗМ позволяет достаточно надежно анализировать результаты экспериментов и предсказывать значения температур плавления обсуждаемых систем в присутствии ионов металлов. Надо, однако, иметь в виду, что расчеты выполнены для растворов с концентрацией  $\text{Na}^+ = 0.1\text{M}$  и  $\text{pH} = 7.0$ . Изменения ионных условий могут в свою очередь повлиять на результаты расчетов.

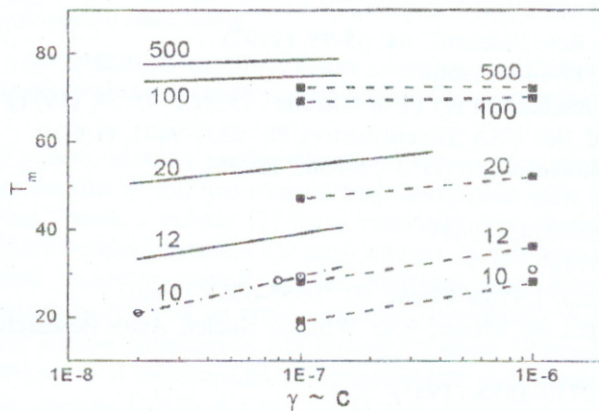


Рис. 3. Зависимости температуры переходов от концентрации олигонуклеотидов (от параметра  $\gamma$ ).  $\lg J = -2$ .  
○ – экспериментальные значения [17], ● – расчетные значения.  
— - переходы  $2 \rightarrow 1$ , - - - переходы  $3 \rightarrow 2$ .

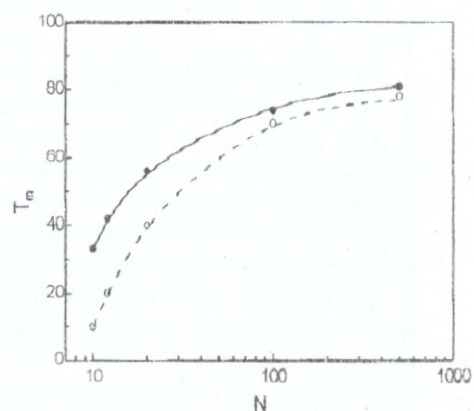


Рис. 4. Зависимости температуры переходов от длины олигонуклеотидов:  $2 \rightarrow 1$ ,  $\gamma = 10^{-7}$ ,  $\lg J = -2$  - (●),  $3 \rightarrow 2$   $\lg J = -2$  - (○)

Особо следует обсудить использованные при расчетах значения энтальпии переходов  $\Delta H_{12}$ ,  $\Delta H_{13}$ ,  $\Delta H_{23} = \Delta H_{13} - \Delta H_{12}$ . Их величина для рассматриваемых гомополинуклеотидов существенно превышает данные калориметрических измерений. Это обусловлено тем, что в полипурин-полипиримидиновых системах после перехода спираль-клубок пуриновая нить остается в частично упорядоченном состоянии, уменьшая измеряемые величины  $\Delta H$ . Тщательный учет этого эффекта [7] позволил получить значения  $\Delta H_{12}$  и  $\Delta H_{13}$ , использованные в настоящих расчетах. Для  $\Delta H_{23}$ , не зависящего от эффекта частичного упорядочения, наблюдается, к сожалению, большой разброс экспериментальных результатов [6, 21-23]. Наиболее надежные данные, полученные методом изотермической титровальной калориметрии (ИТС), находятся в области (4.1 - 4.6) ккал/моль [22 - 24], что соответствует значению, использованному в настоящей работе (4.5 ккал/моль).

Сопоставление рассчитанных значений с экспериментальными данными позволяет оценить величину важного в теоретическом отношении параметра нуклеации  $\beta$ . Как видно из приведенных



данных, хорошее согласие с опытом [8] в случае дуплексов получено при использовании параметра  $\gamma = 2.5 \cdot 10^{-8}$  при концентрации  $C_1 \approx 3 \cdot 10^{-5}$  моль/литр, что дает значение  $\beta \approx 10^{-3}$  литр/моль. Эта величина согласуется с оценками  $\beta$ , выполненными ранее [3 - 8]. Для перехода 3→2 в триплексах лучшие значения получены при  $\gamma = 10^{-7}$ , что соответствует параметру  $\beta \approx 10^{-2}$  литр/моль. Более высокое значение параметра нуклеации в этом случае может быть обусловлено тем, что одна из нитей, участвующих в связывании, является жестким дуплексом, который находится в упорядоченном состоянии. В связи с этим реализуется меньшее значение изменения энтропии при образовании зародыша новой фазы [25].

В заключение следует, однако, заметить, что полученные значения  $\beta$  являются приближенными. Реальные величины этого параметра зависят от многих факторов: экранирования отрицательных зарядов на фосфатах, длины молекул, температуры и др. Лучшее согласие расчетных данных с экспериментом может быть получено при учете влияния этих факторов на величину константы нуклеации.

### ВЫВОДЫ

1. Модельная теория «ЗМ» может быть успешно применена при анализе экспериментальных данных для дуплексных и триплексных структур олигонуклеотидов различной длины.
2. Показано, что при возрастании длины молекул меняется характер их конформационных переходов. При длине  $N \approx 10 - 20$  мономерных единиц температура и ширина перехода зависят от длины олигонуклеотидов и их концентрации в растворе, а при  $N \geq 100$  эти величины почти постоянны.
3. Рассмотренная модельная теория позволяет определять условия стабильности олигонуклеотидных комплексов и рассчитывать  $T_m$ ,  $\Delta T$  и форму кривых перехода.

Исследование, описанное в этой публикации, стало возможным частично благодаря гранту № UB2-2442-КН-02 Фонда Гражданских Исследований и Развития США для Независимых Государств бывшего Советского Союза (CRDF).

### ЛИТЕРАТУРА

1. M.D. Frank-Kamenetskii, S.M. Mirkin// *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 65-95, (1997)
2. S.T. Crooke// *Medical Research Reviews.*, 16: 319-344, (1966)
3. J.G. Hoggett, G. Maass// *Berichte der Bunsen Gesellschaft für Phys. Chemie.*, 75, N 1: 45-54, (1971)
4. R.W. Roberts, D.M. Crothers// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Biochemistry)*, 88: 9397-9401, (1991)
5. Santa Lucia, J.Jr., T.A. Hatim, P.S. Ananda// *Biochemistry*, 35: 3555-3562, (1996)
6. G.E. Plum// *Biopolymers*, 44: 241-256, (1998)
7. C.L. Stevens, G. Felsenfeld// *Biopolymers*, 2: 293-314, (1964)
8. D. Pörschke// *Biopolymers*, 10: 1989-2013, (1971)
9. H.P. Hopkins, D.D. Hamilton, D. Wilson, G. Zon// *J. Phys. Chem.*, 97: 6555-6563, (1993)
10. L. Kibler-Herzog, B. Kell, G. Zon, K. Shinozuka, Sh. Mizan, W.D. Wilson// *Nucleic Acids Research*, 16, N 12: 3545, (1990)
11. J. Applequist, V. Damle// *J. Chem. Phys.*, 39: 2719-3555, (1963)
12. J. Applequist, V. Damle// *J. Amer. Chem. Soc.*, 87, N. 7: 1450-1458, (1965)
13. V.H. Zimm// *J. Chem. Phys.*, 33: 1349- (1960)
14. Ю.П. Благой, В.Н. Зозуля, А.С. Щербаклова// *Біофізичний вісник*. Выпуск 1, 1998, с. 21-32
15. Yu.P. Blagoi, V.N. Zozulya, S.A. Egupov, O.A. Ryazanova, A.S. Shcherbakova// *Biophysical Bulletin*, 2, N. 9: 10-16, (2001)
16. Yu.P. Blagoi, V.N. Zozulya, S.A. Egupov, O.A. Ryazanova, A.S. Shcherbakova// *Biophysical Bulletin*, 1, N. 10: 2-11 (2002)
17. D.S. Pilch, R. Brousseau, R., R.H. Shafer// *Nucleic Acids Res.*, 18, N.19: 5743-5750, (1990)
18. Wing Lok Abe Kurtz Chiu, Chun Ngai Sze, Lai Nang Jp, Sze Ki Chan, Steve Chil Fun Au-Yeung// *Nucleic Acids Res.*, 29, N. 1: 230-233, (2001)
19. F. Seela, P. Leonard// *Helvetica Chimica Acta*, 80, N. 4: 1301-1318, (1997)
20. V.N. Zozulya, A.B. Nesterov, O.A. Ryazanova, Yu.P. Blagoi// *Int. J. Biol. Macromol.*, 33: 183-191, (2003)
21. N. Sugimoto, S. Nakani, M. Yoneyama M., K. Honda// *Nucleic Acids Res.*, 24, N. 22: 4501-4505, (1996)
22. M. Kamiya, H. Torigoe, H. Shindo, A. Sarai// *J. Amer. Chem.*, 118: 4532-4538, (1966)
23. R.W. Roberts, D.M. Crothers// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biochemistry*, 93: 4320-4325, (1996)
24. D.S. Pilch, M.A. Kitolos, K.J. Breslauer// *Biochemistry*, 34, N. 49: 16107-16123, (1995)
25. C. Delisi, D.M. Crothers// *Biopolymers*, 10: 1809-1827, (1971)