

УДК 577.113

УЧЕТ ВЛИЯНИЯ ТЕПЛОЕМКОСТИ ПРИ АНАЛИЗЕ ТЕРМОДИНАМИКИ ОБРАЗОВАНИЯ ДУПЛЕКСОВ САМОКОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ДЕЗОКСИОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, А. Эрнандес Сантьяго*, С.Г. Осетров**,
Ю.В. Мухина, А.Н. Веселков

*Кафедра физики, Севастопольский национальный технический университет, Бухта Стрелецкая, 4, Севастополь
99053, Крым, Украина; e-mail: veselkov@sevgtu.sebastopol.ua*

**Департамент физики и математики, Автономный университет г.Пуэбла, 72570, Мексика*

*** Кафедра физики, Севастопольский Военно-морской институт им. П.С. Нахимова, ул. Дыбенко 1-а,
Севастополь, 99035, Крым, Украина*

Поступила в редакцию 10 октября 2003 г.

Исследована термодинамика образования дуплексов самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидов 5'-d(TrGpCpA), 5'-d(ApGpCpT), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpGpCpG), 5'-d(CpGpTrApCpG) и 5'-d(GpCpArTrGpC) в водном растворе методом ¹H ЯМР спектроскопии (500 МГц). Термодинамические параметры определены по температурным зависимостям протонных химических сдвигов олигомеров с использованием модели, учитывающей конечную величину изменения теплоемкости и температурную зависимость энтальпии образования дуплекса. Среднее значение изменения теплоемкости при образовании дуплексов исследованных дезоксиолигонуклеотидных последовательностей $\langle \Delta C_p \rangle = - (86 \pm 32)$ кал/(моль пар оснований · К) находится в хорошем согласии с данными, полученными калориметрическими методами для более длинных дезоксиолигонуклеотидов и полинуклеотидных последовательностей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Олигонуклеотид, нуклеиновая кислота, ДНК, самоассоциация, химический сдвиг, теплоемкость, энтальпия, ЯМР - спектроскопия

Одной из основных задач биофизики нуклеиновых кислот (НК) является установление связи между структурными особенностями и динамикой НК и их термодинамической стабильностью и функциональными свойствами — взаимодействием с белками и биологически активными веществами. Термодинамическая стабильность нуклеиновых кислот (НК) может быть оценена путем сравнения значений свободной энергии исходных и конечных конформационных состояний олигонуклеотидных цепей [1]. В общем случае переход из компактного, термодинамически жесткого состояния в менее упорядоченное (более гибкое) состояние сопровождается увеличением, как энтропии, так и теплоемкости молекулярной системы. Это позволяет предположить, что двухспиральное (*ds*) состояние ДНК, в отличие от одноцепочечных (*ss*) нуклеотидных последовательностей, характеризуется большей величиной отрицательной свободной энергии, поскольку в *ds* – состоянии ДНК атом атомные взаимодействия отвечают более глубокому минимуму потенциальной энергии при образовании молекулярных структур. В силу высокой степени гидратации нуклеиновых кислот [2], существенную роль в изменении свободной энергии ДНК в *ds* и *ss* – состояниях играет различный характер взаимодействий между молекулами воды и растворенных образцов. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что эффект сольватации оказывает значительное влияние на величины физико-химических параметров молекулы ДНК в различных конформационных состояниях [1,2]. Это, в свою очередь, предполагает, что изменение теплоемкости ΔC_p можно рассматривать в качестве фундаментальной характеристики при анализе факторов стабилизации структур молекул НК в водном растворе, а также при взаимодействии НК с биологически активными молекулами [1].

До недавнего времени предполагали, что изменение теплоемкости ΔC_p ничтожно мало при плавлении ДНК, т.е. при ее переходе “дуплекс – клубок” [1,3,4]. Однако такое предположение далеко не очевидно и требует экспериментального подтверждения. Проведенные в последнее время исследования с использованием дифференциальных сканирующих микрокалориметров нового поколения показали, что при разделении нитей дуплекса ДНК величина ΔC_p может быть достаточно большой, порядка 60÷200 кал/(моль пар оснований·К) [1,5,6]. Таким образом, на каждые 10 °С увеличения температуры должно наблюдаться систематическое изменение энтальпии (ΔH) плавления дуплекса (на 0,6±2 ккал/моль пар

оснований), и, следовательно, графики, построенные в координатах Вант - Гоффа для таких молекулярных систем окажутся нелинейными в обычно используемом экспериментальном температурном интервале ($\sim 40^\circ\text{C}$). При этом знак и величина ΔC_p могут дать дополнительную информацию относительно природы физических взаимодействий при интерпретации энергетических характеристик формирования дуплекса на молекулярном уровне. Достаточно большая положительная величина изменения теплоемкости ΔC_p при плавлении двойной спирали предполагает существование определенной температуры, соответствующей максимальной величине стабильности дуплексной формы ДНК в водном растворе [1].

В случае коротких дезоксиолигонуклеотидных дуплексов, в отличие от полимерной ДНК, аппроксимация процесса плавления с использованием модели двух состояний может носить лишь приближенный характер. Это связано, прежде всего, с влиянием на термодинамику образования дуплекса эффекта "раскрытия" терминальных нуклеотидных пар, а также с возможностью "скольжения" нитей олигомера друг относительно друга [1,7-10]. Вклад этих процессов в термодинамические параметры образования дуплексов олигомеров существенно уменьшается с увеличением длины олигонуклеотидной цепи [9-11].

В настоящей работе исследована термодинамика образования дуплексов самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидов: тетрамеров 5'-d(TrGpCpA), 5'-d(ApGpCpT), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(GpCpGpC) и гексамеров 5'-d(CpGpCpGpCpG), 5'-d(CpGpTrApCpG), 5'-d(GpCpApTrGpC) в водном растворе методом ^1H ЯМР спектроскопии (500 МГц). Термодинамические параметры определяли по температурным зависимостям протонных химических сдвигов олигомеров с использованием модели, учитывающей конечную величину изменения теплоемкости и, соответственно, температурную зависимость энтальпии образования дуплекса в водном растворе [1,12]. Полученные результаты сравниваются с усредненными значениями ΔH образования дуплексов, не зависящими от температуры, определенными ранее [7-10] для исследованных дезоксиолигонуклеотидов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дезоксиолигонуклеозидфосфаты 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(TrGpCpA), 5'-d(ApGpCpT), 5'-d(CpGpCpGpCpG), 5'-d(CpGpTrApCpG) и 5'-d(GpCpApTrGpC) синтезированы компанией "Oswel DNA Service" (Великобритания). Образцы лиофилизировали из D_2O и растворяли в дейтерированном 0.1 М фосфатном буфере. Протонные спектры ЯМР измерены на импульсных спектрометрах "JEOL GSX 500" и "Bruker DRX" с резонансной частотой 500 МГц. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Химический сдвиг определяли относительно ДСС (2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоуксусной кислоты), в качестве внутреннего стандарта использовали ТМА (бромид тетраметиламмония). Измерения выполняли в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора - 0,5 мл. Отнесение сигналов в спектрах ПМР растворов дезокситетрануклеотидов выполнено ранее с использованием 2M - COSY(ТОСЫ) и 2M - NOESY спектроскопии [7,9,10]. Условия проведения одномерных и двумерных ЯМР экспериментов приведены в работах [7,11]. Стабилизацию температуры в процессе измерений осуществляли с точностью ± 0.2 К.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения термодинамических параметров реакций самоассоциации дезоксиолигонуклеотидов проведены исследования температурных зависимостей протонных химических сдвигов. В качестве примера, на рис. 1 представлены зависимости $\delta(T)$ некоторых необменивающихся протонов 5'-d(CpGpTrApCpG) в водном растворе.

Наибольшие изменения испытывают химические сдвиги протонов внутренних нуклеозидов: H2(A4), H5(C5), H6(C5) и H3(T3), которые носят выраженный S - образный характер.

Для описания зависимости наблюдаемого химического сдвига i -го протона от температуры использована следующая модель [8]:

$$\delta_i(T) = f_m(T)\delta_{mi}(T) + f_d(T)\delta_{di}, \quad (1)$$

где $\delta_{mi}(T)$, δ_{di} и $f_m(T)$, $f_d(T)$ - протонные химические сдвиги и равновесные мольные доли олигомера при температуре T в мономерной и дуплексной формах соответственно ($f_m + f_d = 1$). Предполагается, что δ_m и мольные доли f_m , f_d являются функцией температуры. В свою очередь f_m , f_d однозначно связаны с равновесной константой самоассоциации K молекул при данной тем-

пературе, что позволяет определить температурную зависимость $K(T)$ и термодинамические параметры ΔH и ΔC_p реакции образования дуплекса олигонуклеотида в водном растворе.

Расчетная методика предусматривает применение двух типов регрессионных уравнений для описания зависимости мольных долей от температуры. В случае коротких тетра- и пентануклеотидных последовательностей для описания $f_d(T)$ использовано уравнение второго порядка относительно температуры [11]:

$$f_d(T_j) = 1 - f_{m1} - a(T_0 - T_j)(T_1 - T_j) \frac{1}{T_1^2} - \frac{(f_{m0} - f_{m1})(T_j - T_1)T_j}{(T_0 - T_1)T_0}, \quad (2)$$

Уравнение (2) записано с учетом известных мольных долей f_{m0} и f_{m1} мономеров в растворе при заданных температурах T_0 и T_1 . Мольная доля f_{m1}

определялась по расчетному значению константы K , найденному из концентрационных зависимостей химических сдвигов протонов δ при $T = 298\text{K}$ [7,13]. Величина f_{m0} полагалась равной единице при $T_0 = 353\text{K}$ (в этом случае можно считать, что произошло полное расхождение нитей полинуклеотида), a – параметр регрессионной модели. При проведении расчетов использована линейная аппроксимация $\delta_m(T)$ по известным значениям δ_m при двух температурах T_j и T_0 [14].

В случае более длинных гексануклеотидных последовательностей, для которых температурные зависимости протонных химических сдвигов носят выраженный кооперативный характер (рис.1), расчет термодинамических параметров самоассоциации проводился с использованием следующего соотношения для $f_d(T)$ [9]:

$$f_d(T_j) = f_d(T_1) \cdot [1 + S(T_1)] / [1 + S(T_j)], \quad (3)$$

где $S(T_j) = (T_j / \Theta)^b$; Θ и b – параметры регрессионного уравнения. Аппроксимирующая зависимость (3) представлена в форме, обычно используемой для описания кооперативных переходов типа "спираль-клубок". В уравнении величина $f_d(T_1)$ представляет собой значение мольной доли при T_1 . Параметр Θ при такой записи регрессионного уравнения имеет определенный физический смысл – величина Θ соответствует температуре плавления дуплекса (T_m), т.е. температуре, при которой мольная доля дуплекса уменьшается в 2 раза по сравнению с его содержанием при низких температурах. Регрессионные параметры

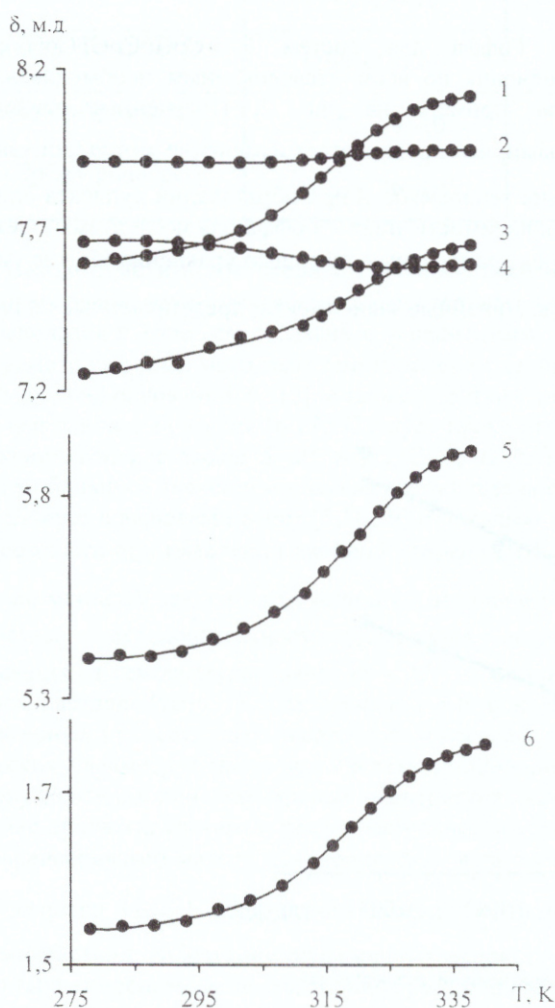


Рис.1. Температурные зависимости химических сдвигов ароматических протонов дезоксигексануклеотида d(CpCpTpApCpG) при $C_0 = 2.95\text{ mM}$: 1 - H2(A4), 2 - H8(G6), 3 - H6(C5), 4 - H6(C1), 5 - H5(C5), 6 - CH3(T3)

определяли из условий минимизации квадратичной функции невязки [15] экспериментальных и рассчитанных значений химического сдвига при различных температурах. Численная процедура минимизации функции невязки выполнялась комплексным методом Бокса [16]. Равновесные константы K при различных температурах определяли по значениям мольных долей $f_m(T)$ [8]:

$$K(T_j) = \frac{1 - f_m(T_j)}{2f_m^2(T_j)C}, \quad (4)$$

где C – концентрация олигомера в растворе.

Значения констант равновесия при различных температурах позволяют вычислить термодинамические характеристики реакций самоассоциации – энтальпию ΔH_0 и теплоемкость ΔC_p , используя следующее термодинамическое соотношение [12]:

$$\ln \frac{K(T_j)}{K_0} = \frac{-\Delta H_0 + \Delta C_p T_0}{R} \left(\frac{1}{T_j} - \frac{1}{T_0} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \ln \frac{T_j}{T_0}. \quad (5)$$

Экспериментальные зависимости Вант – Гоффа для систем 5'-d(CpGpCpGpCpG) и 5'-d(CpGpTpApCpG), полученные в результате усреднения по всем исследованным необменивающимся протонам тетрамеров, представлены в качестве примера на рис. 2. Полученные зависимости $\ln K = f\left(\frac{1}{T}\right)$, строго говоря, не являются линейными, что предполагает изменение энтальпии как функции температуры или конечную величину изменения теплоемкости при образовании дуплекса олигонуклеотидов в водном растворе. Экспериментальные зависимости Вант – Гоффа для исследуемых дезоксиолигонуклеотидных последовательностей были аппроксимированы с помощью уравнения (5), где ΔC_p и $\Delta H_0(T_0)$ выступали в качестве искоемых параметров. Линейные зависимости, представленные на рис. 2,

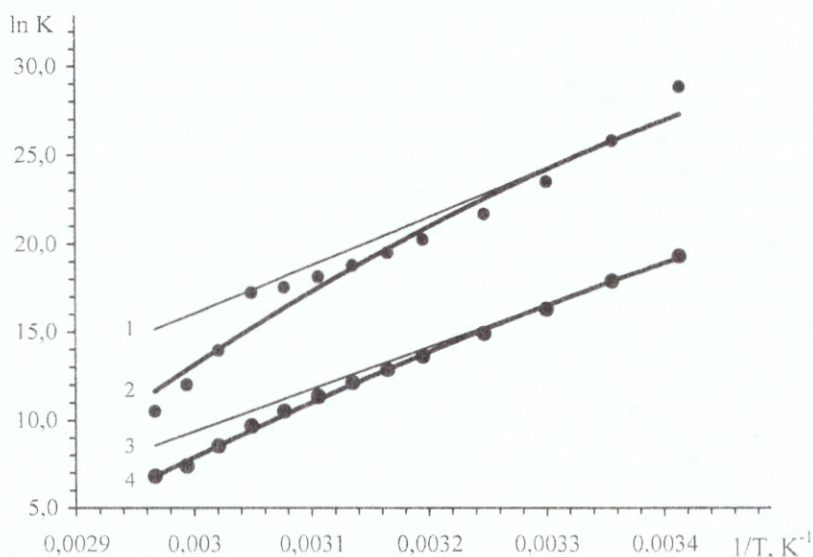


Рис.2. Зависимость $\ln K$ от $1/T$ реакций самоассоциации дезоксиолигонуклеотидов:

5'- d(CpGpCpGpCpG): 1 - $\Delta C_p = 0$; 2 - $\Delta C_p = -19,6$ КДж/(моль нитей * К);

5'- d(CpGpTpApCpG): 3 - $\Delta C_p = 0$; 4 - $\Delta C_p = -10,1$ КДж/(моль нитей * К)

соответствуют условию $\Delta C_p = 0$ и значению энтальпии ΔH^0 при стандартных условиях ($T = T_0$). Численные значения ΔC_p и ΔH^0 , при $T = T_0$ для всех исследуемых дезоксиолигонуклеотидов представлены в табл. 1. Здесь же приведены усредненные значения $\langle \Delta H^0 \rangle$ образования дуплексов дезоксирибонуклеотидов, полученные ранее [7-10] при аппроксимации экспериментальных кривых Вант - Гоффа линейными зависимостями в предположении, что энтальпия процесса является постоянной величиной в исследуемом температурном диапазоне.

Таблица 1

Параметры самоассоциации дезоксиолигонуклеотидов в водном растворе
(0.1 моль/л фосфатный буфер, рD = 7.1, T = 298 K)

Олигонуклеотид	$-\Delta H^0$, Дж/моль нитей	$-\Delta C_p$, Дж/(моль нитей·K)	$-\langle \Delta H^0 \rangle$, Дж/моль нитей [7-10]
d(TpGpCpA)	$(50 \pm 13) \cdot 10^3$	$(4,3 \pm 1,4) \cdot 10^2$	$(64 \pm 11) \cdot 10^3$
d(ApGpCpT)	$(51 \pm 5) \cdot 10^3$	$(6,0 \pm 2,5) \cdot 10^2$	$(67 \pm 9) \cdot 10^3$
d(CpGpCpG)	$(80 \pm 8) \cdot 10^3$	$(6,2 \pm 3,1) \cdot 10^2$	$(87 \pm 12) \cdot 10^3$
d(GpCpGpC)	$(57 \pm 13) \cdot 10^3$	$(6,5 \pm 3,8) \cdot 10^2$	$(63 \pm 8) \cdot 10^3$
d(CpGpTpApCpG)	$(198 \pm 14) \cdot 10^3$	$(10,1 \pm 3,4) \cdot 10^2$	$(198 \pm 14) \cdot 10^3$
d(GpCpApTpGpC)	$(172 \pm 19) \cdot 10^3$	$(11,8 \pm 4,3) \cdot 10^2$	$(173 \pm 8) \cdot 10^3$
d(CpGpCpGpCpG)	$(226 \pm 26) \cdot 10^3$	$(19,6 \pm 8,2) \cdot 10^2$	$(248 \pm 26) \cdot 10^3$

Важно отметить, что среднее значение изменения теплоемкости при образовании дуплексов исследованных дезоксиолигонуклеотидных последовательностей $\langle \Delta C_p \rangle = - (86 \pm 32)$ кал/(моль пар оснований · K) находится в хорошем согласии с усредненными величинами инкремента теплоемкости, полученных калориметрическими методами, при плавлении двойных спиралей полинуклеотидов $\langle \Delta C_p \rangle = - (65 \pm 21)$ кал/(моль пар оснований · K) [5], а также коротких дезоксиолигонуклеотидных дуплексов, содержащих 10 ÷ 16 пар оснований в цепи [6,17]. Следует также отметить, что образование дуплексов GC - содержащих дезоксиолигонуклеотидов 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG) и 5'-d(CpGpCpGpCpG), характеризуется несколько большим значением инкремента теплоемкости, чем A – T содержащих гексамеров (табл. 1), что коррелирует с выводами работ [5,18,19] о большем вкладе гидратации C – G пар оснований в изменение теплоемкости при плавлении двойной спирали ДНК. Учет изменения теплоемкости ΔC_p приводит к несколько меньшей зависимости величины энтальпии перехода ΔH^0 при стандартной температуре $T = T_0$ от состава и последовательности нуклеотидов в исследованных олигомерах в отличие от усредненных, не зависящих от температуры значений $\langle \Delta H^0 \rangle$ при образовании дезоксиолигонуклеотидных дуплексов в водном растворе (табл. 1). Аналогичная картина наблюдается и при анализе термодинамики образования полимерных нуклеотидных последовательностей в водном растворе. Сравнительный анализ термодинамических параметров позволяет сделать заключение [5], что энтальпия перехода “спираль – клубок” в полинуклеотидах при стандартной температуре значительно меньше зависит от конформационного состояния дуплекса, состава и последовательности оснований в цепи, чем предполагалось ранее при условии пренебрежимо малого изменения ΔC_p в таких процессах. Считается, что основной вклад в свободную энергию (ΔG^0) образования олигонуклеотидных дуплексов дают изменения электростатических взаимодействий, гидратации олигомерных цепей, полиэлектролитные эффекты, связанные с изменением характера конденсации ионов, и конформационные различия между двухспиральной и одноцепочечной состояниями фрагментов ДНК [1]. Стэкинг взаимодействие оснований – энергетически выгодный процесс, как с точки зрения изменения энтальпии, так и энтропии, что связано с высвобождением молекул воды при образовании стопочных ассоциатов. Вместе с тем, конденсация ионов на молекуле ДНК представляет собой энтропийно невыгодный процесс. При анализе термодинамических параметров следует также учитывать конформационную энтропию, связанную с различными величинами жесткости дуплексных и одноцепочечных последовательностей. Как правило, “вымораживание” внутренних вращательных степеней свободы молекулы связано с отрицательным изменением теплоемкости ΔC_p [1].

В заключение следует отметить, что последовательные исследования термодинамики температурного перехода “спираль – клубок” в олигонуклеотидных дуплексах различного нуклеотидного состава и длины позволили определить термодинамические параметры взаимодействия соседних пар оснований -

“ближайших соседей” ($\Delta G^0, \Delta H^0, \Delta S^0$) для возможного предсказания стабильности дуплексных структур в зависимости от состава и последовательности нуклеотидов в цепи [4 и ссылки в ней]. При этом наблюдалось достаточно хорошее согласие экспериментальных и расчетных результатов, полученных различными авторами, по плавлению коротких олигомеров ДНК, а также синтетических полимерных молекул ДНК с повторяющимися нуклеотидными последовательностями. Однако, поскольку в приведенном анализе [4] использовано предположение о $\Delta C_p = 0$ и довольно широкий диапазон изменения расчетных значений температур плавления двухспиральных фрагментов ДНК, величины ΔH^0 и ΔS^0 для каждой пары ближайших соседей в олигонуклеотидном дуплексе, с учетом выводов настоящей работы и результатов недавних калориметрических исследований [1,5,6], по видимому, потребуют существенной корректировки. Вместе с тем, для коротких дезоксиолигонуклеотидов, в частности для исследованных тетра - и гексамеров, вклад ΔC_p в термодинамику формирования двойной спирали не столь существенен и фактически находится в пределах погрешности экспериментального определения ΔH образования дуплексов [7-10].

ВЫВОДЫ

Учет влияния теплоемкости при анализе термодинамики образования дуплексов самокомплементарных дезоксиолигонуклеотидов: тетрамеров $5'$ -d(TrGpCpA), $5'$ -d(ApGpCpT), $5'$ -d(CpGpCpG), $5'$ -d(GpCpGpC) и гексамеров $5'$ -d(CpGpCpGpCpG), $5'$ -d(CpGpTrApCpG), $5'$ -d(GpCpApTrGpC) в водном растворе приводит к следующим результатам:

(i) Среднее значение изменения теплоемкости при образовании дуплексов исследованных дезоксиолигонуклеотидных последовательностей $\langle \Delta C_p \rangle = -(86 \pm 32)$ кал/(моль пар оснований · К) находится в хорошем согласии с усредненными величинами инкремента теплоемкости, полученных калориметрическими методами, при плавлении двойных спиралей полинуклеотидов $\langle \Delta C_p \rangle = -(65 \pm 21)$ кал/(моль пар оснований · К) [5], а также коротких дезоксиолигонуклеотидных дуплексов, содержащих 10 ± 16 пар оснований в цепи [6,17];

(ii) Энтальпия перехода “спираль – клубок” в полинуклеотидах при стандартной температуре существенно меньше зависит от конформационного состояния дуплекса, состава и последовательности оснований в цепи, чем считалось ранее в предположении о пренебрежимо малом изменении ΔC_p в таких процессах;

(iii) Основной вклад в свободную энергию (ΔG^0) образования олигонуклеотидных дуплексов дают изменения электростатических взаимодействий, гидратации олигомерных цепей, полиэлектролитные эффекты, связанные с изменением характера конденсации ионов, и конформационные различия между двухспиральной и одноцепочечной состояниями фрагментов ДНК [1];

(iv) Величины ΔH^0 и ΔS^0 для соседних пар оснований в олигонуклеотидном дуплексе, использованные в модели ближайшего соседа [4], с учетом результатов настоящей работы и выводов недавних калориметрических исследований [1,5,6] требуют довольно серьезной корректировки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lane A.N., Jenkins T.S. // Quart. Rev. Biophys. 2000. V.33. P.255-306.
2. Veselkov A.N., Davies D.B. Anti-Cancer Drug Design: Biological and Biophysical Aspects of Synthetic Phenoxazine Derivatives: SevNTU Press, 2002. - 259p.
3. Plum G.E., Breslauer K.J. // J. Molec. Biol. 1995. V.248. P.679-695.
4. SantaLucia J. // Proc. Nath. Acad. Sci. USA. 1998. V.95. P. 1460-1465.
5. Chalikian T.V., Volker T., Plum G.E., Breslauer K.J. // Proc. Nath. Acad. Sci. USA. 1999. V.96. P.7853-7858.
6. Jelesarov I., Grane -Robinson C., Privalov P.L. // J. Molec. Biol. 1999. V.294. P.981-995.
7. Веселков А.Н., Дэвис Д., Дымант Л.Н., Паркес Х., Шипп Д. // Биополимеры и клетка. 1991. Т.7. №5. С.15-22.
8. Веселков А.Н., Дымант Л.Н., Козинцев В.В., Лисютин В.А., Паркес Х., Дэвис Д. // Биофизика. 1995. Т.40. С.283-292.
9. Веселков А.Н., Пахомов В.И., Итон Р. Дж., Дэвис Д.Б. // Биофизика. 2000. Т.45, №1. С.20-26.
10. Веселков А.Н., Пахомов В.И., Рогова О.В., Волынкин В.С., Дымант Л.Н., Итон Р. Дж., Дэвис Д.Б. // Биофизика (в печати).
11. Веселков А.Н., Пахомов В.И., Итон Р. Дж., Дэвис Д.Б. // Доклады НАН Украины. 2001, №5. С.95-101.
12. Hopkins H.P., Fumero Jr. J., Wilson W.D. // Biopolym. 1990. V.29. P.449-459.
13. Веселков А.Н., Дэвис Д., Дымант Л.Н., Паркес Х. // Биофизика. 1993. Т.38. С.627- 635.

14. Albergo D. P., Turner D. H., Marky L. A., Breslauer K. J. // *Biochemistry*. 1981. V.20, N6. P.1409 - 1413.
15. Veselkov A.N., Djimant L.N., Karawajew L.S., Kulikov E.L. // *Studia Biophysica*. 1985. V.120. P. 171-180.
16. Гуснин С.Ю., Омелянов Г.А., Резников Г.В., Сироткин В.С. Минимизация в инженерных расчетах на ЭВМ. Библиотека программ. М.: Машиностроение, 1981. 120 с.
17. Holbrock J.A., Carr M.W., Saecker R.M., Record M.T.Jr. // *Biochemistry*. 1999. V.38.P. 8409 – 8422.
18. Вирник К.М., Гасан А.И., Шестопалова А.В., Малеев В.Я. // *Вісн. Харк. держ. ун-ту. Біофіз. вісн.* 1998. №410. Вып.1. С. 41-49.
19. Chalikian T.V., Sarvazian A.P., Plum E., Breslauer K. // *Biochemistry*. 1994. V.33. P. 2394 – 2401.