



# Структура и функция биополимеров

УДК 577.113

А. Н. Веселков, Д. Дэвис, Л. Н. Дымант, Х. Паркес, Д. Шипп

## 1М- и 2М-<sup>1</sup>H-ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЕ САМОАССОЦИИЦИИ ДЕЗОКСИТЕТРАРИБОНУКЛЕОЗИДТРИФОСФАТОВ РАЗЛИЧНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОСНОВАНИЙ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

*Методом ЯМР-спектроскопии (500 МГц) изучено равновесие самокомплементарных дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатов 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApGpCpT) и 5'-d(ApCpGpT) в водном растворе. Произведено полное отнесение сигналов протонов тетрауклеотидов по измеренным 2М-COSY- и 2М-NOESY-спектрам. Исследованы концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов, на основании которых по предложенным моделям рассчитаны равновесные константы и термодинамические параметры самоассоциации молекул.*

**Введение.** Известно, что многие биологически активные ароматические соединения при взаимодействии с ДНК преимущественно связываются с определенными последовательностями оснований в цепи. Однако сложность строения и конформационная изменчивость полимерных молекул нуклеиновых кислот ограничивают возможности детального анализа роли тех или иных физических взаимодействий в стабилизации молекулярных структур в растворе. Вместе с тем экспериментально установлено, что специфичность связывания ароматических лигандов проявляется уже на коротких нуклеотидных последовательностях, включающих в себя соответствующий сайт. Так, антибиотик актиномицин D преимущественно взаимодействует с GC-сайтом, в то время как бромистый этидий и профлавин — с пиримидин-пуриновой последовательностью оснований [1—4]. Следовательно, важные энергетические и структурные характеристики комплекса лигандов с нативной ДНК могут быть выявлены путем изучения их взаимодействия с малыми фрагментами нуклеиновых кислот — самокомплементарными олигонуклеотидами заданной последовательности оснований. При интерпретации экспериментальных результатов следует учитывать, что в растворе, особенно в случае коротких олигонуклеотидов, имеет место сложное равновесие взаимодействующих молекул, включающее в себя и различные конформационные состояния олигонуклеотидных цепей. В связи с этим важным представляется непосредственное исследование поведения в растворе самокомплементарных олигонуклеотидов с различными последовательностями оснований в цепи, нахождение структурных и энергетических характеристик их самоассоциации.

Наиболее эффективным экспериментальным методом исследования конформации олигонуклеотидов в растворе является ЯМР-спектроскопия. Развитие в последнее время методик двухмерного (2М) ЯМР открыло новые возможности для изучения в растворе молекулярных структур олигонуклеотидов как в дуплексной, так и мономерной фор-

© А. Н. ВЕСЕЛКОВ, Д. ДЭВИС, Л. Н. ДЫМАНТ, Х. ПАРКЕС, Д. ШИПП, 1991

мах [5—7]. Следует отметить, что количественная интерпретация структурных характеристик олигомеров по данным 2М-ЯМР связана с проблемой конформационной чистоты в растворе. Обычно в работах предполагается, что олигонуклеотид существует в растворе только в дуплексной форме в виде единственного конформера. Однако это далеко не очевидно, особенно для рассматриваемых коротких нуклеотидных последовательностей.

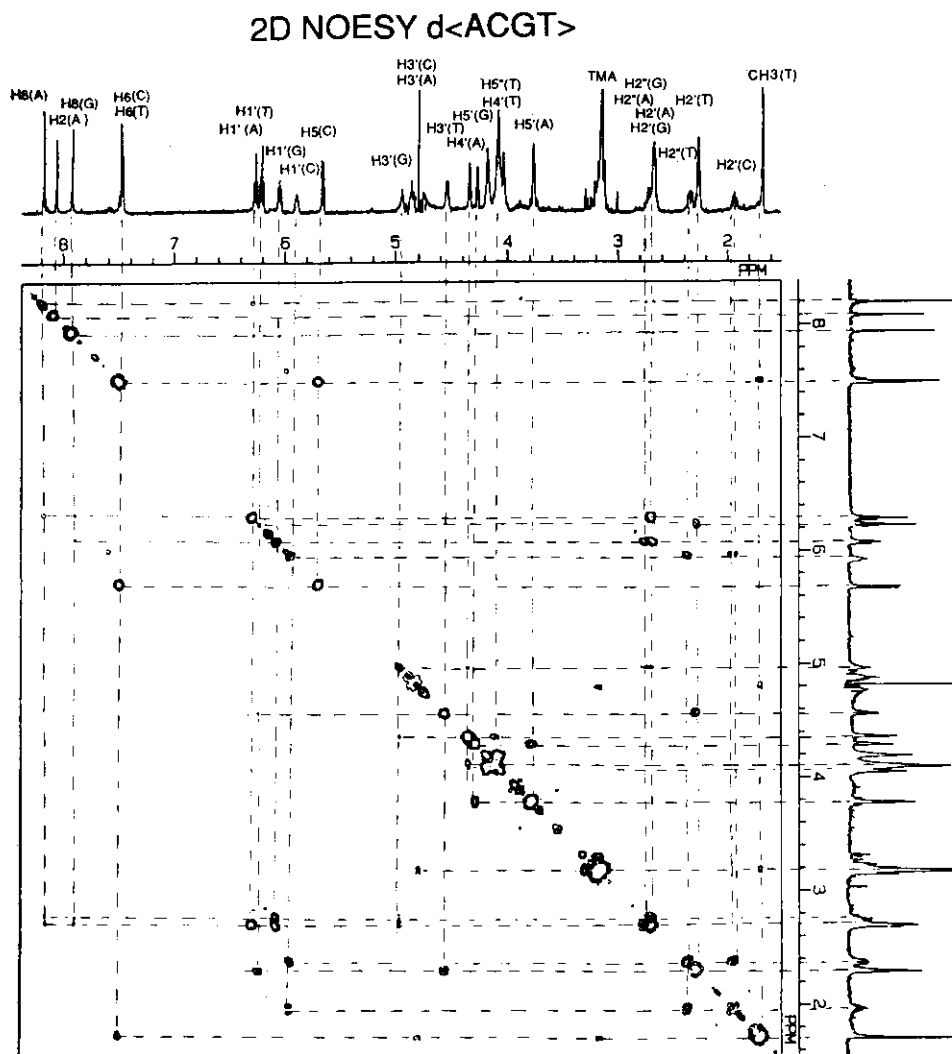


Рис. 1

В настоящей работе проведено исследование самоассоциации в водном растворе дезокситетрануклеотидов d(GpCpGpC), d(CpGpCpG), d(ApGpCpT) и d(ApCpGpT), имеющих различную локализацию GC- и CG-сайтов в цепи. Изучены концентрационные и температурные зависимости протонных химических сдвигов дезокситетрануклеотидов для определения равновесных констант и термодинамических параметров самоассоциации молекул в водном растворе. Данные гомоядерной корреляционной двухмерной ЯМР-спектроскопии (2М-COSY и 2М-NOESY) использованы для полного отнесения сигналов в спектре <sup>1</sup>H-ЯМР олигонуклеотидов.

**Материалы и методы.** Дезокситетрарибонуклеозидтрифосфаты d(GpCpGpC), d(CpGpCpG), d(ApGpCpT), d(ApCpGpT) синтезированы компанией «OSWEL DNA SERVICE» (Великобритания). Образцы

использовали без дополнительной очистки, трижды лиофилизировали из  $D_2O$  с изотопной чистотой 99,95 % и растворяли в 0,1 М фосфатном буфере в  $D_2O$  (pD 6,6). Спектры  $^1H$ -ЯМР измерены на импульсном спектрометре JEOL GSX-500 с резонансной частотой 500 МГц в магнитном поле сверхпроводящего соленоида 11,7 Тл с применением фурье-преобразования. Остаточный сигнал HOD насыщался в период детектирования. Химический сдвиг определяли относительно внутреннего стандарта DSS. Для контроля использовали также сигнал ТМА (бромидтетраметил аммония), так как он меньше других стандартов зависит от  $t$  и pH в водных растворах нуклеотидов. Измерения вели в стандартных ампулах с внешним диаметром 5 мм, минимальный объем раствора 0,5 мл. Образцы предварительно дегазировали продувкой азотом (20—30 мин). Отнесение сигналов в спектрах  $^1H$ -ЯМР, отождествление химических и пространственных связей проводили с помощью двухмерных 2М-COSY-спектроскопии корреляции химических сдвигов через гомоядерное скалярное спин-спиновое взаимодействие и 2М-NOESY-спектроскопии корреляции химических сдвигов через гомоядерную кросс-релаксацию соответственно. Спектры 2М-NOESY регистрировали с использованием стандартной последовательности импульсов при ширине спектра  $SW=10\ 000$  Гц, 2048 точек в период детектирования ( $t_2$ ), 512 приращений времени эволюции ( $t_1$ ) и при фиксированном времени смешивания  $\tau_m=300$  мс. Спектры 2М-COSY измеряли, используя 2048 точек в  $t_2$  и 256 приращений в  $t_1$ . Период восстановления составлял 1 с для 2М-COSY и 3 с для 2М-NOESY-спектроскопии. Для увеличения чувствительности импульсную последовательность при каждом значении повторяли 16 и 32 раза для 2М-COSY и 2М-NOESY экспериментов соответственно. Температуру образцов поддерживали с помощью JEOL NM-GVT3-терморегулятора.

**Результаты и обсуждение.** Отнесение сигналов в спектре ПМР тетра-нуклеотидов проведено на основании двухмерных гомоядерных COSY- и NOESY-экспериментов. На рис. 1 представлен полученный нами 2М-NOESY-спектр для АрСрГрТ последовательности (0,1 М фосфатный буфер в  $D_2O$  при  $T=293$  К). Спектры 2М-COSY использовали для выявления протонов, связанных  $J$ -взаимодействием и принадлежащих отдельному дезоксирибозному кольцу, а также для идентификации необменивающихся протонов по  $J(H_5, H_6)$ - и  $J(CH_2, H_6)$ -корреляциям в основаниях цитозина и тимина. Известно, что 2М-COSY не позволяет определить, какие сигналы протонов сахарного кольца и нуклеотидного основания относятся к отдельному нуклеозиду и в каком порядке углеводные остатки связаны в олигомерную цепь. Такая информация получена из анализа 2М-NOESY-спектров путем рассмотрения кросс-пиков между ароматическими протонами оснований и сигналами H1', H2' и H2'' дезоксирибозы. Связи между различными протонами показаны на рис. 1 и 2 пунктирными линиями. Отнесение протонов H2' и H2'' сделано из NOESY-спектров на основании того факта, что интенсивность H1' — H2'' кросс-пиков выше, чем интенсивность соответствующих H1' — H2' пиков [8]. В табл. 1 представлены полученные в результате отнесения сигналов значения химических сдвигов для всех необменивающихся протонов анализируемых тетра-нуклеотидов. В работе [4] имеются данные по химическим сдвигам ароматических протонов последовательности d(АрГрСрТ), в [9] сделано отнесение сигналов необменивающихся протонов в октамере 5'-d(АрСрГрСрГрСрГрТ), в котором первые три нуклеотида соответствуют рассматриваемому тетрамеру 5'-d(АрСрГрТ), а концевой тимидин примыкает, так же как и в тетрамере, к гуанозину. Сравнение значений протонных химических сдвигов, приведенных в табл. 1, с данными работ [4] и [9] показывает их хорошее соответствие. Величины химических сдвигов протонов тетрамера 5'-d(ГрСрГрС) согласуются с опубликованными ранее результатами для соответствующих протонов гексамера d(ГрСрАрТрГрС) [10], в котором внешние гуанозин и цитозин находятся в аналогичных условиях с рассматриваемым тет-



которых повышается вероятность агрегации молекул в растворе. Поскольку агрегация усложняет интерпретацию ЯМР-спектра, целесообразно проводить эксперимент при условиях, когда она оказывает пренебрежимо малое влияние на значения химических сдвигов протонов. Известно, что вероятность агрегации зависит от ионной силы, температуры раствора, концентрации и молекулярной массы олигомера. Исследования, проведенные в [12], дают основание считать, что при использованных в настоящей работе концентрациях тетрауклеотидов и ионной силе 0,1 М Na<sup>+</sup> агрегация незначительна. Таким образом, взаимодействие молекул тетрауклеотидов можно рассматривать в соответствии с моделью двух состояний:



В таком случае зависимость наблюдаемого химического сдвига протонов тетрауклеотидов от концентрации  $C$  представляется в форме:

$$\delta = \delta_a + (\delta_a - \delta_m) \{1 + (8K_A C + 1)^{1/2}\} / 4K_A C, \quad (2)$$

где  $\delta_a$ ,  $\delta_m$  — протонные химические сдвиги в дуплексе и мономерной форме соответственно. Величины  $\delta_a$ ,  $\delta_m$ ,  $K_A$ , неизвестные *a priori*, могут быть найдены как параметры модели [2] по экспериментальным концентрационным зависимостям наблюдаемых химических сдвигов протонов из условия минимизации взвешенной суммы квадратов невязок  $\delta_{a_i}$  и  $\delta_{i_i}$ , где  $\delta_{a_i}$  — экспериментальные,  $\delta_{i_i}$  — рассчитанные по [2] значения химических сдвигов при  $i$ -й концентрации соответствующего тетрауклеотида [13, 14]. Подобные расчеты выполнены для всех необмениваемых протонов оснований и протонов Н1' дезоксирибозных колец тетрауклеотидов.

Согласно модели реакции (1), параметр  $K_A$  является равновесной константой образования дуплекса и должен быть одинаковым для всех протонов каждого тетрауклеотида. Усредненные значения этого параметра для исследованных тетрауклеотидов приведены в табл. 2. Полученные значения констант реакции для 5'-d(GpCpGpC) и 5'-d(CpGpCpG) примерно на два порядка превышают величины  $K_A$  самоассоциации динуклеотидов 5'-GC и 5'-CG [15]. Для тетрауклеотидов, имеющих менее стабильные концевые пары (A—T), константа самоассоциации значительно ниже, чем  $K_A$  для тетрамеров, имеющих в последовательности только G—C-пары. Оценки показывают, что при таких значениях  $K_A$  и концентрациях тетрауклеотидов  $\sim 10^{-3}$  моль/л доля молекул в растворе в дуплексной форме составляет  $\sim 50\%$  для первых двух тетрамеров и  $\sim 20\%$  для A—T-содержащих тетрауклеотидов (см. табл. 2).

Для определения термодинамических параметров реакций самоассоциации тетрауклеотидов проведены исследования зависимостей протонных химических сдвигов от температуры. На рис. 4 приведены температурные зависимости химических сдвигов 5'-d(CpGpCpG) при  $C = 1,93 \cdot 10^{-3}$  моль нитей/л для различных протонов (1 — H6 (C3); 2 — H6 (C1); 3 — H1' (C3); 4 — H1' (C1); 5 — H1' (G2); 6 — H5 (C3)). В расчетной схеме зависимость наблюдаемого химического сдвига  $\delta$

Таблица 2

Значения равновесных констант  $K_A$  и термодинамических параметров  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  и  $\Delta S$  реакции самоассоциации тетрауклеотидов при температуре  $T = 293$  К

Нуклеозид	$K_A$ , л/моль дуплекса	$\Delta G$ , ккал/моль дуплекса	$\Delta H$ , ккал/моль дуплекса	$\Delta S$ , ккал/(К·моль дуплекса)
d (GpCpGpC)	1150 ± 120	-4,10	-30,0	-88
d (CpGpCpG)	1300 ± 160	-4,17	-41,4	-127
d (ApGpCpT)	160 ± 30	-2,95	-31,7	-98

от температуры  $T$  была представлена в виде

$$\delta(T_j) = \delta_m(T_j) \cdot f_m(T_j) + \delta_a f_a(T_j), \quad (3)$$

где  $f_m(T_j)$  и  $f_a(T_j)$  — равновесные молярные доли тетрауклеотида при температуре  $T_j$  в мономерной и дуплексной формах ( $f_m + f_a = 1$ ).

В соотношении (3) предполагается, что  $\delta_m$  является функцией температуры. Действительно, расчеты по концентрационным зависимостям химических сдвигов протонов тетрауклеотида 5'-d(GpCpGpC), измеренным при температурах 278 и 298 К, показали заметное изменение величин  $\delta_m$  при вариации температуры. Это подтверждается также

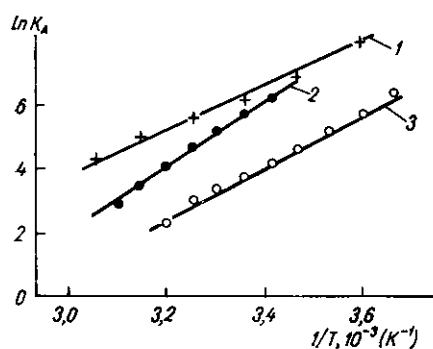


Рис. 4

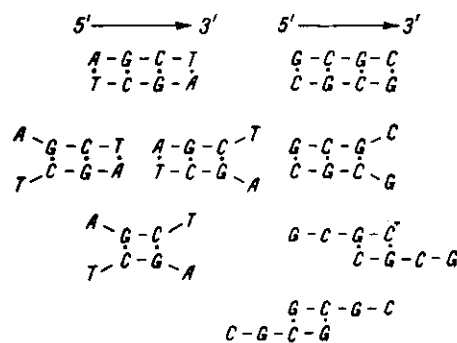


Рис. 5

сравнением расчетных значений  $\delta_m$  с экспериментальными значениями протонного химического сдвига при высокой температуре ( $T = 353 \div 358$  К), когда можно считать, что все молекулы в растворе находятся в мономерной форме. Такая зависимость  $\delta_m$  от температуры свидетельствует о конформационных изменениях молекул тетрауклеотидов в мономерной форме, связанных, в частности, с изменением внутримолекулярного стэкинга. Следует отметить, что температурная зависимость  $\delta_m$  наблюдалась и для динуклеотидных последовательностей 5'-GC и 5'-CG [16]. Что касается химического сдвига  $\delta_a$ , то эта величина, как показали расчеты, практически неизменна в исследованном диапазоне температур.

Для описания температурной зависимости  $f_m(T)$  использовано регрессионное уравнение второго порядка относительно температуры [16]

$$f_m(T) = f_m^1 + a(T_0 - T)(T_1 - T) + \frac{f_m^0 - f_m^1}{T_0 - T_1} (T - T_1) \frac{T}{T_0}, \quad (4)$$

в котором  $f_m^0$  и  $f_m^1$  — известные значения молярных долей мономера в растворе при заданных температурах  $T_0$  и  $T_1$ . Молярную долю  $f_m^1$  определяли по расчетному значению  $K_A$ , найденному из концентрационных зависимостей при  $T_1 = 293$  К,  $f_m^0$  полагалась равной 1 при  $T_0 = 353$  К, когда можно считать, что произошло полное расхождение нитей тетрауклеотидов. Параметр  $a$  находили из условия минимизации функции невязки экспериментальных и рассчитанных значений химического сдвига при различных температурах. При проведении расчетов использована линейная аппроксимация  $\delta_m(T)$  по известным значениям  $\delta_m$  при двух температурах, как это обычно делается в подобных случаях [8, 16, 17]. Численную процедуру минимизации функции невязки выполняли с помощью симплексного метода Нелдера — Мида [18]. Равновесные константы  $K_A$  при различных температурах определяли по значениям молярных долей  $f_m(T_j)$ :

$$K_A(T_j) = \frac{1 - f_m(T_j)}{2f_m^2(T_j) \cdot C}. \quad (5)$$

На рис. 5 приведены зависимости Вант — Гоффа  $\ln K_A = \psi(1/T)$ , использованные для оценки энтальпии  $\Delta H$  и энтропии  $\Delta S$  реакций образования дуплексов тетрануклеотидов (1 — 5'-d(GpCpGpC); 2 — 5'-d(CpGpCpG); 3 — 5'-d(ApGpCpT)). Данные достаточно хорошо аппроксимируются прямыми линиями, что свидетельствует о пренебрежимо малом изменении теплоемкости в рассмотренном температурном интервале. Энтальпии реакций рассчитывали по величине тангенсов углов наклонов аппроксимирующих прямых в соответствии с соотношением Вант — Гоффа

$$\frac{d(\ln K_A)}{d(1/T)} = - \frac{\Delta H}{R}. \quad (6)$$

Изменение энтропии  $\Delta S$  находили из свободной энергии Гиббса  $\Delta G = -RT \ln K_A$  и найденного значения  $\Delta H$ :

$$\Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T. \quad (7)$$

Определенные таким образом значения термодинамических параметров  $\Delta H$ ,  $\Delta G$ ,  $\Delta S$  см. в табл. 2. Сравнение результатов подтверждает роль состава и последовательности оснований в олигонуклеотидной цепи в стабилизации спиральных структур. Наиболее стабильным дуплексом среди исследованных тетрануклеотидных последовательностей является 5'-d(CpGpCpG)<sub>2</sub>. Если использовать калориметрические данные по термической стабильности пар — известные значения  $\Delta H_{AT}$  и  $\Delta H_{GC}$  с учетом зависимости  $\Delta H$  от ионной силы раствора [19, 20], то для тетрануклеотидов d(GpCpGpC) и d(ApGpCpT) изменения энтальпии при реакции самоассоциации и участия всех пар в образовании дуплекса («идеальный» дуплекс) должны быть по абсолютной величине несколько выше найденных в настоящей работе значений  $\Delta H$ . Одна из причин такого расхождения между экспериментально найденными значениями  $\Delta H$  и соответствующими расчетными значениями для «идеального» дуплекса может быть связана с плавлением концевых пар в столь коротком дуплексе, а также со «скольжением» комплементарных нитей относительно друг друга, так что в растворе в равновесном состоянии находятся различные спиральные структуры (рис. 6: вероятные спиральные структуры в растворе для тетрануклеотидов 5'-d(ApGpCpT) и 5'-d(GpCpGpC): «—» — сахарофосфатные цепи, «·» — водородные связи между парами оснований). Для тетрануклеотида 5'-d(CpGpCpG) ввиду его большей стабильности образование подобных структур менее вероятно, о чем свидетельствуют и высокие абсолютные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$ .

Полученные нами ранее [15] значения  $\Delta H$  для самоассоциации 5'-GC и 5'-CG динуклеотидов составили  $\simeq -14$  ккал/моль. При самоассоциации тетрануклеотидов величины  $\Delta H$  изменяются более чем в два раза по сравнению с динуклеотидами, что свидетельствует о появлении дополнительных факторов, в частности, стэкинг-взаимодействия и конформационных изменений.

## Резюме

Методом ПМР-спектроскопії (500 МГц) вивчено рівноважне поведіння самокомплементарних дезокситетрарибонуклеозидтрифосфатів 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApGpCpT) та 5'-d(ApCpGpT) у водному розчині. Здійснено повне віднесення сигналів протонів тетрануклеотидів по вимірних 2M-COSY- та 2M-NOESY-спектрах. Досліджені концентраційні та температурні залежності протонних хімічних зсувів дезокситетрануклеотидів. Розраховані рівноважні константи самоасоціації та значення протонних зсувів в мономерній і дуплексній формах тетрамерів з використанням моделі двох станів. Запропоновано методику розрахунку та визначено термодинамічні параметри реакції самоасоціації молекул. Проведено порівняльний аналіз розрахованих характеристик для самоасоціації тетрануклеотидів різної послідовності.

## Summary

Equilibrium behaviour of self-complementary deoxytetranucleoside triphosphates 5'-d(GpCpGpC), 5'-d(CpGpCpG), 5'-d(ApGpCpT) and 5'-d(ApCpGpT) in aqueous solution have been studied by the method of PMR spectroscopy (500 MHz). Assignments of the tetranucleotides protons have been obtained from both two-dimensional homonuclear COSY and NOESY experiments. Concentration and temperature dependences of proton chemical shifts have been investigated. Equilibrium association constants and thermodynamical parameters of molecules self-association have been calculated using theoretical models and regression equations based on experimental results.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Krugh T. R., Reinhardt C. G.* Evidence for sequence preferences in the intercalative binding of ethidium bromide to dinucleoside monophosphates // *J. Mol. Biol.*—1975.—**97**, N 1.—P. 133—162.
2. *Patel D. J., Canuel L. L.* Sequence specificity of mutagen-nucleic acid complexes in solution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1977.—**74**.—P. 2624—2628.
3.  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR investigations of actinomycin D binding selectivity with oligodeoxyribonucleotides containing multiple adjacent d(GC) sites / E. V. Scott, R. L. Jones, D. L. Banville et al. // *Biochemistry.*—1988.—**27**, N 3.—P. 915—923.
4. *Reid D. G., Salisburg S. A., Williams D. H.* Proton nuclear Overhauser effect study of the structure of an actinomycin D complex with a self-complementary tetranucleoside triphosphate // *Ibid.*—1983.—**22**, N 6.—P. 1377—1385.
5. *Clore G. M., Gronenborn A. M.* Internal mobility in a double-stranded B DNA hexamer and undecamer // *FEBS Lett.*—1984.—**172**, N 2.—P. 219—225.
6. *Sequence-dependent* structural variation in single-helical DNA proton NMR studies of d-(T-A-T-A) and d-(A-T-A-T) in aqueous solution / M. R. Mellema, J. M. L. Pieters, G. A. van der Marel et al. // *Eur. J. Biochem.*—1984.—**143**—P. 285—301.
7. *Conformational studies of d-(m<sup>5</sup>CpGpm<sup>5</sup>CpG) and d-(CpGpCpG)  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR / M. Delepierre, B. L. Destaintot, J. Igolen, B. P. Roques // *Ibid.*—1986.—**161**.—P. 571—577.*
8. *Petersheim M., Turner D. H.* Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability; thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp // *Biochemistry.*—1983.—**22**, N 2.—P. 256—263.
9. *Gronenborn A. M., Clore G. M., Kimber B. J.* An investigation into the solution structures of two self-complementary DNA oligomers, 5'-d(C-G-T-A-C-G) and 5'-d(A-C-G-C-G-C-G-T), by means of nuclear-Overhauser-enhancement measurements // *Biochem. J.*—1984.—**221**.—P. 723—736.
10. *Refinement of the solution structure of the DNA hexamer 5'-d(GCATGC)<sub>2</sub>: combined use of nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics / M. Milges, G. M. Clore, A. M. Gronenborn et al. // Biochemistry.*—1987.—**26**, N 12.—P. 3718—3733.
11. *Reassessment of structural characteristics of the d(CGCG)<sub>2</sub>: Actinomycin D complex from complete  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR / M. Delepierre, C. V. Heijenoort, J. Igolen et al. // *Biomol. Struct. and Dyn.*—1989.—**7**, N 3.—P. 557—589.*
12. *Freier S. M., Albergo D. D., Turner D. H.* Solvent effects on the dynamics of (dG-dC)<sub>3</sub> // *J. Biopolymers.*—1983.—**22**, N 5.—P. 1107—1131.
13. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Куликов Э. Л.* Применение вариационных методов обработки экспериментальных данных при исследовании агрегации молекул акридиновых красителей методом ЯМР высокого разрешения // *Хим. физика.*—1984.—**3**, № 8.—С. 1101—1108.
14. *Investigation of the aggregation of acridine dyes in aqueous solution by proton NMR / A. N. Veselkov, L. N. Djimant, L. S. Karawajew, E. L. Kulikov // Stud. biophys.*—1985.—**106**, N 3.—P. 171—180.
15. *Дымант Л. Н., Веселков А. Н.* Межмолекулярные взаимодействия в комплексах ароматических лигандов с динуклеотидами в растворе и кристалле // *Биофизика.*—1988.—**33**, № 4.—С. 728.
16. *Веселков А. Н., Дымант Л. Н., Барановский С. Ф.* Определение термодинамических параметров взаимодействия профлавина с рибонуклеозидмонофосфатами CpG и GpC в водном растворе по данным протонного магнитного резонанса // *Молекуляр. биология.*—1987.—**21**, № 4.—С. 1110—1116.
17. *Thermodynamics of (dG-dC)<sub>3</sub> double-helix formation in water and deuterium oxide / D. D. Albergo, L. A. Marky, K. J. Breslauer, D. H. Turner // Biochemistry.*—1981.—**20**, N 6.—P. 1409—1413.
18. *Минимизация в инженерных расчетах на ЭВМ / С. Ю. Гуснин, Г. А. Омелянов, Г. В. Резников, В. С. Скряткин // Б-ка программ.*—М., 1981.—120 с.
19. *Marky L. A., Breslauer K. J.* Calorimetric determination of base-stacking enthalpies in double-helical DNA molecules // *Biopolymers.*—1982.—**21**, N 10.—P. 2185—2194.
20. *Wada A., Yabuki S., Husimi Y.* Fine structure in the thermal denaturation of DNA: high temperature-resolution spectrophotometric studies // *CRC Crit. Revs. Biochem.*—1980.—**9**, N 2.—P. 87—144.

Севастоп. приборостроит. ин-т.  
Лондон. ун-т, Беркбек колледж

Получено 08.02.91