ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ ԶԱՐԵՀ ԱՐՏԱՇԵՍԻ

ԴՈՒՊԼԵՔՍԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ն ՃԿՈՒՆՇՂԹԱ ՊՈԼԻՄԵՐԻ ՀԱԼՈՒՅԹՈՒՄ ՈՐՊԵՍ ԲՅՈՒՐԵՂԱՅՄԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆ

Գ.00.02-«Կենսաֆիզիկա» մասնագիտությամբ
ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների դոկտորի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ-2016

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ГРИГОРЯН ЗАРЕ АРТАШЕСОВИЧ

ДУПЛЕКСНАЯ ДНК КАК ЦЕНТР КРИСТАЛЛИЗАЦИИ В РАСПЛАВЕ ГИБКОЦЕПНОГО ПОЛИМЕРА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук по специальности
03.00.02-«Биофизика»

ЕРЕВАН-2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական խորհրդատու՝ ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ա.Թ.Կարապետյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ե.Բ.Դալյան
ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ջ.Ռ.Մոնասելիձե
քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Կ.Ռ.Գրիգորյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. հուլիսի 8-ին ժամը 14^{00}-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՀ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 Մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրը առաքված է 2016թ.հունիսի 7-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար, կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный консультант: доктор физ.-мат. наук, профессор А.Т.Карапетян

Официальные оппоненты: доктор физ.-мат. наук, профессор Е.Б.Далян
доктор физ.-мат. наук профессор Дж.Р.Монаселидзе
доктор хим.наук, профессор К.Р.Григорян

Ведущая организация: Международный научно-образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 8-го июля 2016г. в 14^{00} часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 7-го июня 2016г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051, кандидат биол. наук, доцент М.А. Парсаданян

1. Общая характеристика работы

Актуальность работы. Создание полимерных композитных материалов остается одной из актуальных проблем современности. Основной проблемой при создании такого рода материалов является контроль за свойствами синтезируемого материала. С этой точки зрения, формирование регулярной структуры полимеров позволяет значительно улучшить комплекс физико-механических и эксплуатационных свойств (теплостойкость, электроизоляционные свойства), сохранить их при повышенных и пониженных температурах, а также расширить области применения нанокомпозитов на основе органических и элементоорганических полимеров. В настоящее время, одним из перспективных направлений по контролю за синтезом и свойствами нанокомпозитных материалов является использование биологических молекул и, в частности, ДНК (Seeman, 1982; LaBean and Li, 2007). Как известно, биологические макромолекулы во многих случаях образуют комплексы с различными надмолекулярными структурами, используя механизмы молекулярного узнавания. Так, например, молекулы ДНК и РНК вирусов и бактериофагов как правило плотно упаковываются в капсиде, оболочке образуемой молекулами белка. Кроме того, молекулы ДНК в состоянии узнавать специфические участки в белковых молекул, что используется при построении белок - содержащих наноструктур (Yan, et al., 2003). В настоящее время, молекулы ДНК также используются при покрытии золотых наночастиц, углеродных нанотрубок и т. п. Взаимодействие ДНК с различными высоко- и низкомолекулярными соединениями является ключевым элементом при создании различных наноматериалов. Все это приводит к тому, что изучения влияния ДНК на образование упорядоченных структур в различных и в том числе, полимерных материалах представляет собой весьма актуальную задачу.

Целью работы является:

1. Изучение эффекта фрагментов дуплексной ДНК растворенной в расплаве гибкоцепного полимера на термодинамику кристаллизации.
2. Исследование упорядоченных структур, образующихся из фрагментов дуплексной ДНК, в смеси с гибкоцепным полимером.
3. Теоретическое изучение влияния переходов спираль — клубок, а также влияние стабильности двойной спирали ДНК в смеси с гибкоцепным полимером на возникновение ориентационного порядка и термодинамику кристаллизации.
4. Исследование неравновесных свойств двойной спирали ДНК в смеси с гибкоцепным полимером и их влияния на процессы кристаллизации.

Научная новизна заключена в представленных в работе следующих актуальных результатах. Прежде всего, показано, что двойная спираль ДНК в смеси с гибкоцепным полимером ведет себя как центр нуклеации кристалла и повышает

температуру кристаллизации системы. В работе также исследованы условия возникновения ориентационного порядка и фазового расслоение фрагментов двойной спирали ДНК в смеси с гибкоцепным полимером. Получены фазовые диаграммы смеси ДНК с гибкоцепным полимером, а также оценена температура перехода фрагментов ДНК из изотропной фазы в нематическую, в зависимости от объемной доли молекул ДНК в смеси.

Установлена также связь между термодинамикой плавления двунитиевой ДНК и ее нематическим упорядочением в смеси с гибкоцепным полимером. В частности, получена зависимость параметр порядка Майера - Заупе от параметра роста спирали. Проведено теоретическое исследование влияния низкомолекулярных соединений (лигандов) на возникновение ориентационного порядка ДНК и кристаллизацию гибкоцепного полимера в смеси. При этом, проанализировано совместное влияние температуры системы и концентрации лигандов.

Наряду с термодинамическими эффектами, в работе изучено влияние различных характерных времен релаксации третичной и вторичной структуры нуклеиновых кислот на их структуру и термодинамические свойства. Предложен общий формализм, позволяющий описывать стационарное неравновесное состояние таких систем.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Жесткоцепные фрагменты двойной спирали ДНК при определенных условиях служат точками нуклеации для кристаллизации гибкоцепного полимера в смеси ДНК - полимер. Наличие таких фрагментов повышает температуру плавления и, как следствие верхнюю границу температуры кристаллизации. Сдвиг температуры плавления и кристаллизации идеального полимерного кристалла зависит от объемной доли гибкоцепного полимера.
2. При определенной температуре двунитиевая ДНК в смеси с гибкоцепным полимером может переходить из изотропной фазы в жидкокристаллическую нематическую фазу. При этом, температура перехода определяется объемной долей гибкоцепного полимера.
3. При определенных условиях возникает трехфазное равновесие, при котором две изотропные фазы и одна нематическая способны к сосуществованию. При понижении температуры имеет место фазовое расслоение между двумя изотропными фазами. С последующим понижением температуры возникает расслоение между нематической и изотропной фазами при температурах ниже тройной точки. При температурах выше тройной точки появляются две нематические фазы и узкая изотропно - нематическая двухфазная зона.
4. Связывание дуплексной ДНК с лигандами приводит к изменению ее конформации, что позволяет контролировать кристаллизацию гибкоцепного полимера в смеси и ориентационный порядок фрагментов ДНК.
5. При понижении температуры имеет место стабилизация двойной спирали ДНК,

которая сопровождается образованием различных элементов вторичной структуры, таких как петли, вспучивания, спиральные участки и т.д. Этот процесс характеризуется двумя характерными временами релаксации, а ландшафт свобоной энергии такой системы является типичным для стекольной фазы.

Научная и практическая ценность работы обусловлена существенным значением, которое играют термодинамические и кинетические эффекты в образовании упорядоченных структур в синтетических и биологических полимерах. В этой связи, теоретическое исследование кристаллизации и других форм образования упорядоченной фазы в смесях ДНК с синтетическими полимерами имеет важное значение для интерпретации экспериментальных результатов и их предсказания.

В частности теоретически установлен тот факт, что фрагменты ДНК в смеси с гибкоцепным полимером действуют как центры нуклеации кристаллитов, что позволяет предложить новые эксперименты по кристаллизации полимеров. Кроме того, выявлены факторы, позволяющие эффективно влиять на образование упорядоченных фаз в смесях гибкоцепных полимеров с ДНК. Этот теоретический результат может служить основанием новых физических механизмов, ответственных за образование упорядоченных структур в полимерных композитных материалах.

Предлагается новый подход в изучении механизма контроля за кристаллизацией гибкоцепных полимеров в смеси с фрагментами дуплексной ДНК. В частности показано, что за счет взаимодействия ДНК с низкомолекулярными соединениями (лигандами) можно влиять не только на нематический порядок дуплексной ДНК в смеси с гибкоцепным полимером, но и на стабильность двойной спирали ДНК в смеси.

Установлены некоторые закономерности взаимного влияния вторичной и третичной структуры нуклеиновых кислот, образуюшихся в процессе отжига полимерного матрикса. В частности, большое значение может играть возможность фазовых превращений в процессе релкаксации системы к состоянию термодинамического равновесия.

Понимание основных принципов, лежащих в основе самоорганизации и конформационных перестроек в биологических макромолекулах имеет большое практическое значение как для решения проблем биологии и медицины, так и при создании новых материалов, содержащих биологически активные молекулы. В частности, практическая ценность работы определяется тем, что многие низкомолекулярные соединения, взаимодействующие с ДНК, не только являются биологически активными веществами и в некоторых случаях обладают фармакологическими свойствами, но также могут быть использованы при создании композитных материалов.

Полученные в работе результаты нашли широкое применение как в научно - исследовательских институтах Армении, так и за рубежом (Ереванский Государственный Университет, State University at Albany (USA) и др.). Результаты

работы используются на кафедре физики ЕАСГУ, а также на кафедре молекулярной физики ЕГУ. Полученные результаты также могут быть использованы в работах по разработке биологических сенсоров, проводимых в Национальном Институте Ядерной Физики (INFN, Italy).

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались на семинарах кафедры молекулярной физики ЕГУ, на совместных семинарах кафедры физики ГУАС и ЕПИ, а также на семинаре Института Физики АН Грузии, (Тбилиси). Материалы диссертации были представлены на международных научных конференциях: Межд. конференция, посвященная 40-летию основания АрГУ; International Conference "Physical Concepts of Nucleic-Acid Structure and Behavior", Yerevan, 2013; The 18^{th} and 19^{th} Conversation, Albany (USA) 2013, 2015; международной научно-практической конференции "Строительство – 2013", Ростов на Дону.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 31научная публикация, из коих 24 статьи и 7 тезисов конференций.

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора и пяти глав. Каждая глава начинается с краткой аннотации и завершается сводкой основных результатов. Диссертация содержит 67 рисунков и список литературы из 202 наименования. Во введении сформулированы цель работы, показана научная новизна и практическая значимость результатов и перечисляются основные положения, выносимые на защиту. Первая глава посвящена использованию двунитиевых ДНК, как центров кристаллизации. Вторая глава посвящена возникновению нематического порядка молекул дуплексной ДНК в смеси с гибкоцепным полимером. В третьей главе представлена теория, описывающая влияние взаимодействий ДНК - лиганд на термодинамику нематического порядка ДНК и кристаллизацию гибкоцепоного полимера. В четвертой главе рассмотрена связь между одноосной кристаллизацией и нематическим порядком молекул ДНК как центров кристаллизации. И наконец, в пятой главе представлена теория, описывающая влияние процессов отжига полимерного матрикса на конформационные перестройки нуклеиновых кислот. Работа завершается заключением, выводами и списком работ, опубликованных по теме диссертации.

2. Основное содержание работы

Гл. 1. Биологические макромолекулы как центры кристаллизации полимера в расплаве

Полимеры подобно низкомолекулярным веществам могут кристаллизоваться при охлаждении расплава ниже определенной температуры – температуры стеклования. Этот процесс находит свое отражение в изменении свойств полимеров: увеличивается его плотность, растет модуль упругости, изменяются и другие характеристики. В полимерах образуются молекулярные кристаллы, т.е. макромолекулы в кристалле связанные силами Ван-дер-Ваальса. В отличие от кристаллизации низкомолекулярных веществ, кристаллическая область в полимерах возникает вследствие упорядочения участков макромолекул, а не всех макромолекул в целом, поскольку при наличии множества длинных полимерных цепей неизбежно возникают конформации с большим количеством перепутанных цепей, что, в свою очередь приводит к невозможности полной кристаллизации при сколь угодно медленной, но конечной скорости охлаждения. Это предопределяет неизбежное присутствие в кристаллизующихся полимерах аморфных областей даже при полном завершении процесса кристаллизации. При этом одна и та же макромолекула может находиться и в аморфной, и в кристаллической (упорядоченной) областях полимера. Аморфно-кристаллические полимерные материалы характеризуются надмолекулярной кристаллической структурой, особенности которой определяют их механические свойства. То есть, надмолекулярная кристаллическая структура оказывает непосредственное влияние на деформационные свойства полимера.

В первой главе рассматриваются:

- основные закономерности возникновения надмолекулярной структуры на примере кристаллизации полиэтилена высокой плотности (ПЭВП);
- плавление полимера и зависимость степени кристалличности от характеристик полимера
- влияние коротких фрагментов ДНК на образование кристаллической фазы в расплаве гибкоцепного полимера.

Рассмотрены тепловые эффекты, проявляющиеся в процессе кристаллизации ПЭВП. На рис. 1 представлена кривая плавления ПЭВП, на которой наблюдается два максимума, один из которых соответствует температуре плавления кристаллических образований, выращенных при изотермической кристаллизации, а другой, для кристаллических образований выращенных в неизотермических условиях.

Результаты, приведенные на рис. 1 показывают, что температура плавления более совершенных кристаллов развивающихся в процессе изотермической кристаллизации (402.5 К) на несколько градусов превышает температуру плавления кристаллов, которые возникли в процессе неизотермической кристаллизации (397.8 К). Это объясняется тем, что кристаллы, развивающиеся в неизотермических условиях имеют более дефектную структуру.

Теоретическое рассмотрение связи между температурами плавления, кристаллизации и повышением степени кристалличности полимера, а также сопоставление полученных теоретических и экспериментальных результатов приведены на рис. 2.

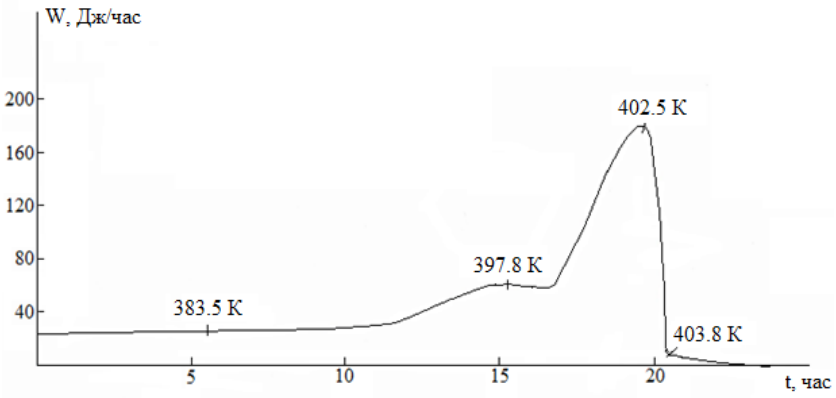


Рис. 1. Термокинетическая кривая ПЭВП для изотермической и неизотермической кристаллизации. t – время кристаллизации, W – количество теплоты, передаваемой образцу в единицу времени.

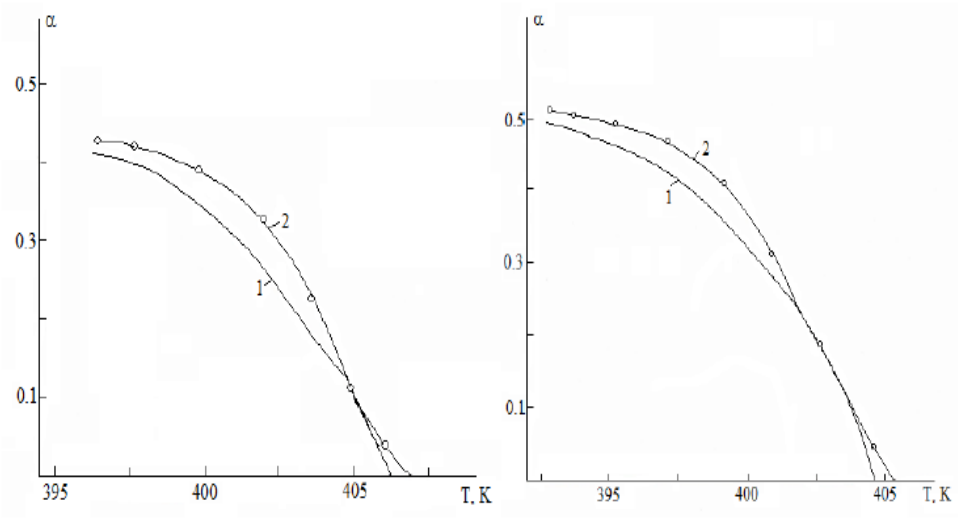
Аналитическая оценка конечной степени кристалличности в зависимости от температуры системы и параметров кристализации дает уравнение

(1),

$$\frac{1}{(1-\alpha)^2} = \frac{1}{T}\frac{1-\dfrac{1}{(1-\alpha_{cr})^2}}{\dfrac{1}{T_m}-\dfrac{1}{T_{cr}}} - \frac{1}{T_m}\frac{\dfrac{T_m}{T_{cr}}-\dfrac{1}{(1-\alpha_{cr})^2}}{\dfrac{1}{T_m}-\dfrac{1}{T_{cr}}}$$

где α-, α_{cr} - конечная равновесная степень кристалличности при температуре кристаллизации T_{cr}. Температура плавления T_m соответствует нулевой степени кристалличности. Результаты, приведенные на рис. 2а и 2б показывают, что температурная зависимость степени кристалличности, полученная с использованием уравнения (1) удовлетворительно согласуется с экспериментальными данными.

В той же главе рассматривается влияние коротких фрагментов, смешанных с расплавом гибкоцепнного полимера на термодинамику кристаллизации гибкоцепного полимера. Если расплав гибкоцепного полимера содержит короткие фрагменты двунитиевой ДНК, то свободная энергия кристаллита изменится при перенесении молекулы ДНК из аморфной части расплава внутрь кристаллита.



а б

Рис. 2. Температурная зависимость степени кристалличности ПЭВП при изотермической кристаллизации при температурах *T=395.6 K* (рис. 2а) и *T=393.6 K* (рис. 2б). Теоретические данные (1), экспериментальные (2).

Свободная энергия двойной спирали ДНК в расплаве полимера в основном определяется работой, которую надо совершить против осмотического давления полимерного расплава (или раствора), чтобы вытеснить сегменты гибкоцепного полимера из объема, занимаемого жесткоцепной ДНК. В этом случае, оценка свободной энергии жесткого фрагмента ДНК (f_{DNA}) в полимерном расплаве

$$f_{DNA} \cong aL_r\pi$$

где π -осмотическое давление расплава гибкоцепного полимера, a – площадь поперечного сечения дуплексной ДНК, а L_r – контурная длина фрагмента двунитиевой ДНК. При низкой концентрации ДНК, когда объемная доля гибкоцепного полимера оценивается как $\phi_p \approx 1$, осмотическиое давление в расплаве ведет себя как

$$\pi \cong \frac{k_B T}{d^3} \ln\left(\frac{1}{1-\phi_p}\right)$$

где d – линейный размер сегмента в гибкоцепном полимере, T – температура системы и k_B – постоянная Больцмана. Приведенный разультат показывает, что жесткий фрагмент ДНК в расплаве гибкоцепного полимера обладает достаточно высокой свободной энергией и его нахождение в расплаве термодинамически невыгодно. В то же время, свободная энергия фрагмента ДНК в составе кристаллита в основном определяется взаимодействияи между жестким фрагментом ДНК и цепями гибкоцепного полимера в вытянутой конформации. Если свободная энергия фрагмента ДНК в кристаллите имеет тот же порядок величины, что и субцепь гибкоцепного полимера в вытянутой конформации, то перенос жесткого фрагмента ДНК из расплава гибкоцепного полимера в кристаллит является термодинамически выгодным. Следовательно, образование кристаллита в смеси гибкоцепного полимера с жесткими фрагментами ДНК также более выгодно именно вокруг жесткого фрагмента двунитиевой ДНК. Т.о. фрагменты двойной спирали ДНК, смешанные с гибкоцепным полимером, действуют как центр кристаллизации гибкоцепного полимера.

Теоретически показано, что наличие жестких фрагментов ДНК в расплаве проводит к образованию кристаллитных структур с повышенной температурой кристаллизации T_m. При этом, сдвиг обратной температуры плавления идеального полимерного кристалла оценивается как

$$\delta\left(\frac{1}{T_m}\right) = \frac{k_B}{\Theta d^3 \Delta h}\ln\left(1-\phi_p\right) \qquad (2),$$

где Φ_p - объемная доля гибкоцепного полимера, Δh – энтальпия кристаллизации из расчета на единицу объема, Θ - число макромолекул в поперечном сечении кристаллита. Зависимость сдвига обратной температуры плавления от числа макромолекул в поперечном сечении кристаллита приведена на рис. 3.

Результаты, приведенные на рис. 3 показывают, что сдвиг обратной температуры плавления кристаллита уменьшается с ростом его поперечной площади. В то же время, длина кристаллита в основном определяется длиной фрагмента ДНК, служащего его центром кристаллизации.

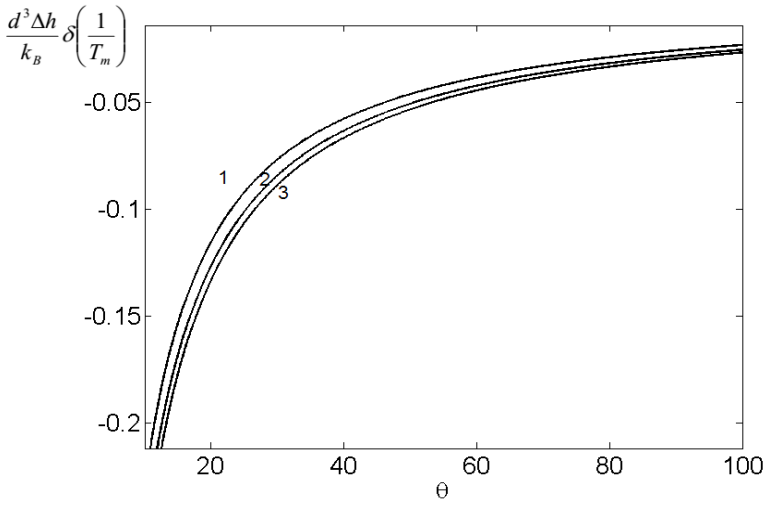


Рис. 3. Зависимость сдвига обратной температуры от числа макромолекул в поперечном сечении кристаллита. (1) $\phi_p = 0.9$, (2) $\phi_p = 0.92$, (3) $\phi_p = 0.95$.

Гл. 2. Нематический порядок фрагментов двунитиевой ДНК в смеси с гибкоцепным полимером

Дуплексная ДНК, подобно всем жесткоцепным полимерам имеет тенденцию к образованию жидко – кристаллического упорядочения.

Во второй главе представлена теория, описывающая

- образование ориентационного порядка фрагментов двойной спирали ДНК в смеси с расплавом гибкоцепного полимера;
- условия возникновения фазового расслоения в смеси гибкоцепного полимера с жесткоцепной ДНК.

Жесткость двойной спирали ДНК описывается персистентной длиной цепи, которая оценивается примерно в 150 пар оснований (около 50нм). Предполагается, что контурная длина цепи существенно меньше персистентной и цепь ДНК может быть аппроксимирована жестким стержнем. Для описания смеси гибкоцепного полимера с ДНК используется теория, основанная на приближении Онсагера и Флори – Хаггинса. Свободная энергия смешения гибкоцепного полимера с ДНК оценивается как

$$\frac{\Delta F_{mix}}{Nk_BT} = \frac{\phi_p}{n_p}\ln\phi_p + \frac{\phi_r}{n_r}\ln\phi_r + \chi\phi_p\phi_r + \frac{1}{2}(\chi_a + 5/4)\phi_r^2 S^2 - \frac{\phi_r}{n_r}\ln\frac{I_0(\Gamma_0\phi_r S)}{2}, \quad (3),$$

где Φ_p - объемная доля полимера, Φ_r - объемная доля дуплексной ДНК, S - параметр порядка Майера – Заупе, χ - ориентационно – зависимый параметр притяжения между молекулами ДНК, χ_a - параметр Флори – Хаггинса, $n_r = \frac{L_r}{d}$, n_p – число мономеров в гибкоцепном полимере, $\Gamma_0 = \frac{L_r}{d}(\chi_a + 5/4)$ и

$$I_m(Q) \equiv \int_{-1}^{1}\left[\frac{3}{2}\left(x^2 - \frac{1}{3}\right)\right]^m \exp\left[\frac{3}{2}Q\left(x^2 - \frac{1}{3}\right)\right]dx \quad (4).$$

Параметр порядка Майера – Заупе S, характеризующий образование жидко - кристаллической фазы записывается как

$$S = \int P_2(\cos\theta) f(\theta) d\Omega$$

где P_2 — полином Лежандра второго порядка, а $f(\theta)$ - распределение молекул ДНК по ориентациям. При этом, параметр порядка S определяется самосогласованным уравнением

$$S = I_1(\Gamma_0\phi_r S)/I_0(\Gamma_0\phi_r S),$$

Притяжение, описываемое параметром χ_a, обычно обусловлено дисперсионными взаимодействиями между молекулами нематогена. Однако, в случае коротких фрагментов ДНК, растворенных в полимерном расплаве притяжение может быть обусловлено осмотическим давлением нейтрального гибкоцепного полимера, как это происходит при образовании конденсированной (гексагонально упакованной) фазы двунитиевой ДНК. Т. о., даже в отсутствие притягивающих ориентационно – зависимых ДНК – ДНК взаимодействий возможно эффективное притяжение за счет осмотического давления полимерного раствора. Кроме того, протиоионы, растворенные в полимерной матрице, будут вносить свой вклад в значения параметров взаимодействия. В этом случае, химический потенциал в нематической фазе

записывается как

$$\frac{\Delta\mu_p(\phi_p,S)}{k_BT}=\frac{\mu_p-\mu_p^0}{k_BT}=\frac{\partial\Delta F_{mix}}{k_BT\partial N_p} \qquad \frac{\Delta\mu_r(\phi_p,S)}{k_BT}=\frac{\mu_r-\mu_r^0}{k_BT}=\frac{\partial\Delta F_{mix}}{k_BT\partial N_r}$$

для гибкоцепного полимера и жесткоцепной ДНК, соответственно. Фазовый переход из изотропной в нематическую фазу, характеризуется равенством химических потенциалов

$$\Delta\mu_p(\phi_p,0)=\Delta\mu_p(\phi_p,S) \qquad \Delta\mu_r(\phi_p,0)=\Delta\mu_r(\phi_p,S)$$

в изотропной и нематической фазах. Переход из изотропной в нематическую фазу описывается фазовой диаграммой, представленной на Рис. 4.

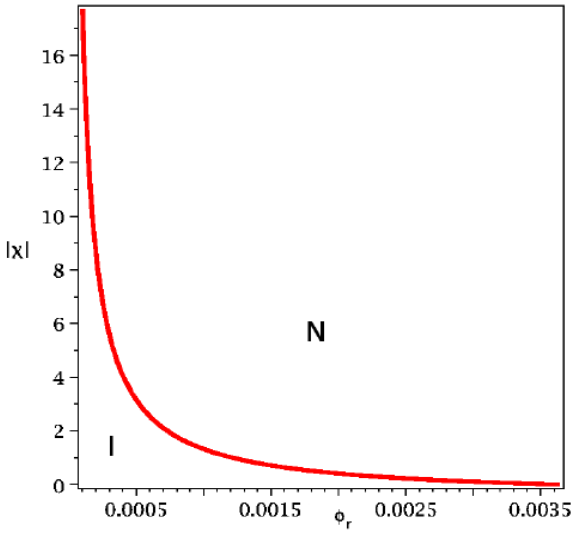


Рис. 4. Фазовая диаграмма ДНК, растворенной в матрице гибкоцепного полимера для $n_r=10^3$. I – изотропная и N – нематическая фазы.

Результат приведенный на рис. 4 показывает, что в зависимости от концентрации дуплексной ДНК и параметров взаимодействия с системе имеет место нематический порядок жестких фрагментов ДНК. Переход из изотропной фазы в

нематическую является фазовым переходом 1-го рода.

Гл. 3. Влияние концентрации лигандов на стабильность двунитиевой ДНК и нематический порядок в смеси с гибкоцепным полимером

Важной особенностью композитных материалов является возможность изменения их свойств под влиянием внешних факторов. Использование биологических молекул для решения этой задачи представляется перспективным, поскольку структурная организация ДНК, РНК и белков весьма чувствительна к внешним условиям, а механизмы межмолекулярного узнавания позволяют тонко контролировать меж- и внутримолекулярные взаимодействия такого рода молекул.

В третьей главе предложена теория, описывающая

- возможность регуляции свойств аморфно – кристаллического полимера за счет изменения конформации дуплексной ДНК
- влияние низкомолекулярных соединений (лигандов) на вторичную структуру ДНК, смешанной с гибкоцепным полимером

Стабильность двойной спирали ДНК определяется температурой и такими свойствами окружающей среды, как концентрация лигандов, pH среды и т. д. Переход из спиральной конформации в клубкообразную является кооперативным и для смеси коротких фрагментов ДНК может быть описан с использованием т.н. модели “застежка – молния”. Тогда, свободная энергия коротких фрагментов оценивается как

$$f=\frac{F_{nem}+F_{helix}}{Nk_BT} \qquad (5),$$

где свободная энергия нематического порядка была оценена в Гл. 2 как

$$\frac{F_{nem}}{Nk_BT}=\frac{1}{2}\left(\chi_a+5/4\right)\phi_r^2S^2-\frac{\phi_r}{n_r}\ln I_o\left(\Gamma S\right)$$

а свободная энергия ДНК в области перехода спираль – клубок в приближении “застежка – молния” как

$$\frac{F_{helix}}{Nk_BT}=-\frac{\phi_r}{n_r}\ln Z_{zipp}\left(n_r,s,\sigma\right) \qquad (7)$$

Здесь Z_{zipp} - статистическая сумма для модели “застежка – молния”, поведение которой определяется параметром роста спирали s, параметром кооперативности σ и числом пар оснований ДНК, n_r

$$Z_{zipp}(n_r, s, \sigma) = 1 + \frac{\sigma s^2}{(s-1)^2}\left[s^{n_r} - 1 + n_r\left(\frac{1}{s} - 1\right)\right]$$

В приближении среднего поля ориентационно – зависимое взаимодействие между жесткоцепными молекулами ДНК приводит к переопределению параметра роста спирали

$$\tilde{s} = s\int \frac{d\Omega}{4\pi} f(\hat{u})$$

где $f(\hat{u}) \propto \exp\left(\frac{\Gamma}{n_r} S P_2(\cos\vartheta)\right)$ - функция распределения сегментов ДНК по ориентациям, а интегрирование производится по полному телесному углу. Фактически, ориентационный порядок вводит дополнительное молекулярное поле $-k_B T \Gamma S P_2(\cos\vartheta)$, действующее на каждую пару оснований, находящуюся в нематической фазе.

Минимизация нематической свободной энергии (5) по параметру ориентационного порядка S показывает, что при некотором значении параметра роста спирали $s = s^*$ происходит фазовый переход первого рода, сопровождаемый скачком ориентационного параметра порядка S. и приводит к возникновению нематического порядка в системе при достаточно высокой степени спиральности двунитиевой ДНК, как это показано на Рис. 5.

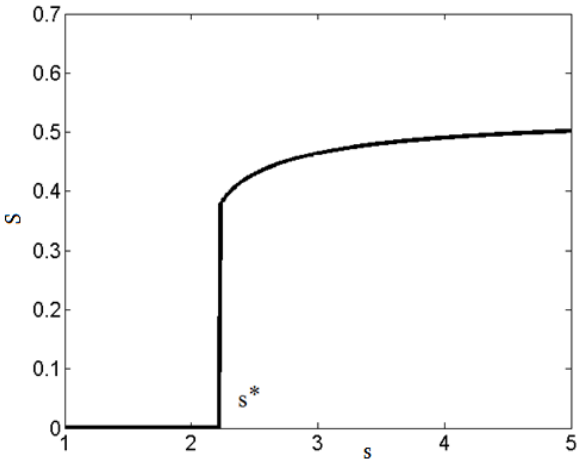


Рис. 5. Зависимость ориентационного параметра порядка Майера - Заупе S от параметра роста спирали s.

Параметр роста спирали может зависеть как от температуры, так и от взаимодействий

ДНК – лиганд. В третьей главе рассматривается случай, когда ДНК образует комплексы с двумя типами лигандов, которые используют различные механизмы при связывании с нативной и денатурированной ДНК.
Чтобы оценить эффект ДНК - лиганд взаимодействия на стабильность двойной спирали ДНК была использована стандартная модель плавления системы ДНК – лиганд.

Молекула состоит из N пар оснований. В области перехода спираль-клубок каждая пара оснований может принять одно из двух состояний: спиральное или клубкообразное. Макромолекула делится на области, состоящие из n областей, содержащих N_1 клубкообразных и N_2 спиральных пар оснований. Общее количество пар оснований остается постоянным в процессе плавления

$$N_1+N_2=N$$

Предполагается, что мы имеем лиганды, связывающиеся с одноцепочечными участками с константами связывания K_1'' и K_1'' и с двухцепочечными участками с константами связывания K_2' и K_2''. Общее количество лигандов равно k, число молекул, связанных с одноцепочечными областей по первому механизму равно k_1', а по второму механизму – k_1'', число молекул, связанных с двухцепочечными областями по первому механизм равно k_2', по второму механизму – k_2''. Пусть F_1 и F_2 - это свободные энергии пары оснований в клубкообразном и спиральном состояниях, соответственно, а F_0 - свободная энергия инициализации спирали. Пусть Ψ_i^{α} - это свободная энергия связывания (i=1,2 и α=',''), а W - число микросостояний макромолекулы, соответствующих данной энергии.
Тогда, свободная энергия комплекса оценивается как

$$F = F_1N_1 + F_2N_2 + nF_0 + \sum_{i=1,2}\sum_{\alpha=I,II} k_i^{\alpha}\Psi_i^{\alpha} - T\ln W$$

Методом наиболее вероятного распределения, для концентраций лигандов $c_i^{\alpha} = \frac{k_i^{\alpha}}{N_i}$ в главе третьей была получена система уравнений

$$\frac{c_1' r_1' / 2}{1 - c_1' r_1' / 2} = \frac{PK_1'}{2}\left[\frac{2D}{P} - 2(1-\vartheta)c_1' - 2(1-\vartheta)c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2''\right]$$
$$\frac{c_1'' r_1'' / 2}{1 - c_1'' r_1'' / 2} = \frac{PK_1''}{2}\left[\frac{2D}{P} - 2(1-\vartheta)c_1' - 2(1-\vartheta)c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2''\right]$$
$$\frac{c_2' r_2'}{1 - c_2' r_2'} = \frac{PK_2'}{2}\left[\frac{2D}{P} - 2(1-\vartheta)c_1' - 2(1-\vartheta)c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2''\right]$$
$$\frac{c_2'' r_2''}{1 - c_2'' r_2''} = \frac{PK_2''}{2}\left[\frac{2D}{P} - 2(1-\vartheta)c_1' - 2(1-\vartheta)c_1'' - \vartheta c_2' - \vartheta c_2''\right]$$

Здесь D - полная концентрация лигандов, r_i^{α} - число центров связывания из расчета на лиганд, P - полная концентрация фосфатных групп и υ-степень спиральности. При этом, уравнение для эффективного параметра роста спирали имеет вид

$$S* = S\frac{\left(1 - c_1' r_1'/2\right)^{\frac{2}{r_1'}}\left(1 - c_1'' r_1''2\right)^{\frac{2}{r_1''}}}{\left(1 - c_2' r_2'\right)^{\frac{1}{r_2'}}\left(1 - c_2'' r_2''\right)^{\frac{1}{r_2''}}},$$

где s - параметр роста спирали для чистой ДНК.

В зависимости от параметров взаимодействия ДНК – лиганд и концентрации лигандов возможны различные сценарии, включая возможность как тепловой, так и холодовой денатурации, как это показано на Рис. 6.

Случай, приведенный на Рис. 6 соответствует ситуации, когда общая концентрация лигандов в растворе сопоставима с таковой для фосфатных групп $\frac{2D}{P} \sim 1$ а $PK_1' >> 1,\ PK_2' >> 1,\ PK_2'' >> 1,\ PK_2' >> 1$. При этом, комплексы ДНК - лиганд демонстрируют как высоко - так и низкотемпературную денатурацию с широким "окном" стабильности двойной спирали в области перехода спираль-клубок чистой ДНК (Рис. 6, кривая 1). В этом случае ключевым моментом является более высокое сродство лигандов к нативной ДНК по-сравнению с денатурированной. Высокотемпературная денатурации комплекса ДНК-лиганд существенно смещается в область высоких температур по-сравнению с чистым ДНК. В то же время, в высоко - температурной области, где чистая ДНК остается денатурированной, комплексы ДНК-лиганд находятся в нативном состоянии. С понижением температуры комплексы ДНК-лиганд претерпевают т.н. "холодовую" денатурацию, в то время как чистая ДНК становится спиральной (Рис. 6, кривая 3).

Т.о., за счет взаимодействия ДНК – лиганд возможно регулировать степень спиральности двунитиевой ДНК, а значит и степень нематического упорядочения, описанную на Рис. 5. Этот механизм может быть особенно важен для контроля за кристаллизацией полимерных нанокомпозитов, когда необходимо охлаждение

образца, при сохранении молекул ДНК в спиральном состоянии как центров кристаллизации.

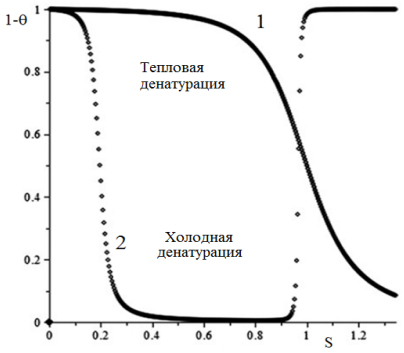


Рис. 6. Зависимость степени денатурации *1–θ* от параметра роста спирали *s*. Кривая денатурации для чистой ДНК (1). Кривая денатурации для значений параметров: r_1'=2, r_1''=2, r_2'=4, r_2''=4, K_1'=2.9·10^4 M^{-1}, K_1''=10^2 M^{-1}, K_2'=9.6·10^5 M^{-1}, K_2''=10^7 M^{-1}. (2)

В то же время, если общая концентрация лигандов в растворе очень низкая, *2D/P<<1*, то для некоторых значений констант связывания K_i^{α} получаются кривые плавления типа представленной на Рис. 7, где сравниваются кривые денатурации для чистой ДНК (кривая 1) с теми, что получаются для комплексов ДНК-лиганд (кривая 2). Из-за более высокой аффинности лигандов к спиральным участкам ДНК, кривая денатурации смещается в область низких значенияй параметра s, т.е. к более высоким температурам. Таким образом, низкие концентрации лигандов приводят к стабилизации спиральной ДНК.

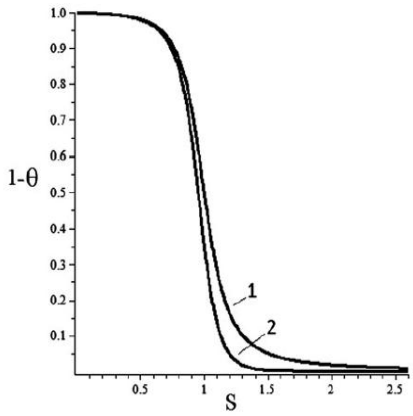


Рис. 7. Зависимость степени денатурации *1–θ* от параметра роста спирали *S*. Кривая денатурации (1) соответствует чистой ДНК, а кривая (2) - денатурации комплекса ДНК - лиганд для значений параметров: $\frac{2D}{P} = 1.4 \cdot 10^{-2}, r_1' = 2, r_1'' = 2, r_2' = 4, r_2'' = 4, K_1' = 2.9 \cdot 10^4\ M^{-1}, K_1'' = 10^2\ M^{-1}, K_2' = 9.6 \cdot 10^5\ M^{-1}, K_2'' = 10^7\ M^{-1}$

Результаты указывают на то, что изменяя концентрацию лиганда можно контролировать область температур плавления и тем самым, выбрать оптимальную температуру кристаллизации.

Гл. 4. Нематический порядок двунитиевой ДНК и одноосная кристаллизация гибкоцепного полимера в смеси

Кристаллизация аморфного полимера при наличии ориентации макромолекул, которая создаётся одноосной деформацией, происходит с большой скоростью. При этом обеспечивается образование надмолекулярной кристаллической структуры ориентированной относительно направления растягивающей силы. При значительных степенях деформации аморфного полимера в нём развивается фибриллярная структура, ориентированная в направлении ориентации макромолекул.

В четвертой главе рассмотрены

- влияние ориентационного порядка на характер изменения надмолекулярной кристаллической структуры и эксплуатационные свойства плёнок полипропилена (ПП);
- эффект ориентационного порядка ДНК в смеси с гибкоцепным полимером на одноосную кристаллизацию;
- связь надмолекулярной структуры и прочности аморфно - кристаллических полимеров.

Одноосное растяжение аморфно-кристаллического полимера приводит к деформации сферолитов. Причём степень деформации сферолита непосредственно определяется величиной удлинения плёнки полимера. В процессе одноосной ориентации аморфно-кристаллической плёнки полимера её степень кристалличности меняется т.о., что большим степеням удлинения плёнки полимера соответствует значительно большая степень кристалличности, чем при исходной сферолитной структуре (см. Рис. 8). Отличию степени кристалличности при малых и больших степенях одноосной деформации соответствует изменения разности плотностей $\Delta\varrho$ (Рис. 9) кристаллической и аморфной фазы. Эту разность плотностей $\Delta\varrho$ кристаллической и аморфной фазы полимера определяли методом относительных интенсивностей. Такое уменьшение разности плотностей соответствует росту степени кристалличности (Рис. 8).

Прочность и другие механические характеристики аморфно-кристаллического ориентированного полимера в значительной степени определяются структурой аморфных областей. Выше отмечалось, что при ориентационной вытяжке аморфно-кристаллических гибкоцепных полимеров аморфная часть меж-кристаллитных областей отличается от таковой для аморфно - кристаллических

полимеров, полученных без ориентационной вытяжки. Следует отметить, что именно способы увеличения числа проходных цепей аморфной фазы межфибриллярных областей и выравнивание их по длине приводят к росту прочностных характеристик полимерных плёнок. Исследование влияния исходной надмолекулярной кристаллической структуры на механические свойства при одноосной ориентации плёнок полипропилена (ПП) показали, что прочность плёнок ПП, полученных с предварительной ориентацией полимерного расплава, увеличивается.

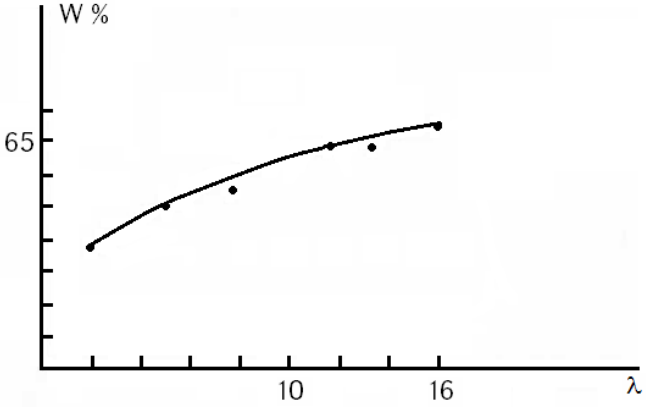


Рис. 8. Зависимость степени кристалличности W от степени удлинения λ.

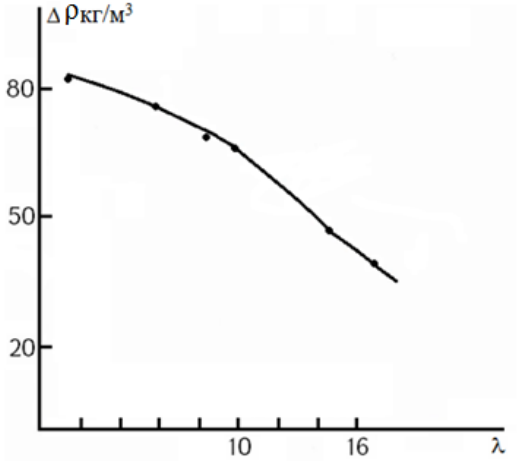


Рис. 9. Зависимость разности плотностей кристаллической и аморфной фазы $\Delta\varrho$ до степени удлинения λ.

Как было показано в Гл. 1, фрагменты дуплексной ДНК могут служить центрами кристаллизации в расплаве гибкоцепного полимера. При этом, преимущественная ориентация кристаллизующихся цепей совпадает с ориентаций жесткоцепного фрагмента ДНК как центра кристаллизации. Т.о., имея в образце полимерного расплава достаточно большое количество жесткоцепных фрагментов ДНК с длиной порядка персистентной, получаем множественные центры кристаллизации. При неупорядоченном распределении по ориентациям жесткоцепных фрагментов ДНК, цепи закристаллизованные в различных кристаллитах будут также распределяться неупорядоченно. Подобное ориентационно - неупорядоченное состояние фрагментов ДНК характеризуется нулевым значением параметра Майера - Заупе (2.6) $S=0$. В то же время, как было показано в Гл. 2, при температурах ниже T_{IN} имеет место переход дуплексов ДНК в нематическую фазу, что в свою очередь приведет к частичной упорядоченности кристаллитов, возникающих вокруг множественных центров кристаллизации. При этом, параметр Майера - Заупе ($S\neq 0$) для фрагментов ДНК в смеси фактически будет служить мерой упорядоченности кристаллитов в аморфно - кристаллическом полимере. Приведенные выше экспериментальные данные показывают, что частичная ориентация кристаллитов способствует увеличению числа проходных цепей и в конечном счёте, к росту разрывной прочности высокоориентированных полимерных плёнок.

Вместе с тем, согласно результатам, полученным в Гл. 1, равновесная степень кристалличности зависит от температуры кристаллизации, структуры полимерного расплава в момент зародышеобразования (L), морфологии зародышеобразования (ε) и термодинамических параметров кристалла (T_m^0 и a). При этом, так же было показано, что при кристаллизации вокруг фрагментов ДНК имеет место сдвиг температуры плавления, определяемая выражением (2).

Температура плавления при бесконечно медленном охлаждении совпадает с температурой кристаллизации. Т.о., в присутствие фрагментов ДНК, служащих центрами кристаллизации равновесная степень кристалличности оценивается как

$$\frac{1}{(1-\alpha)^2} = \frac{2aL\Delta h^0}{3k_B\varepsilon}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)$$

Как известно, температура плавления при бесконечно медленном охлаждении совпадает с температурой кристаллизации. Поскольку, по-сравнению с изотропным случаем температура плавления T_m для системы содержащей фрагменты дуплексной ДНК повышается (см. (2)), то это, в свою очередь приводит к росту равновесной степени кристалличности при заданной температуре T. Фактически, фрагменты дуплексной ДНК, служащие центрами кристаллизации приводят к эффектам, аналогичным ориентационной кристаллизации.

Гл. 5. Отжиг аморфно - кристаллического полимера в смеси и изменение структуры нуклеиновых кислот

Как известно, отжиг – это последовательный нагрев материала (в данном случае, полимерного), выдержка его при определенной температуре и последующее охлаждение для придания материалу необходимых свойств. Отжиг аморфно-кристаллических полимеров приводит к увеличению содержания кристаллической фазы полимера. Как правило, при температуре отжига происходит поверхностное плавление кристаллитов на границе раздела кристаллита и межкристаллитной области и затем наблюдается дополнительная кристаллизация. При этом способ кристаллизации сводится к развитию кристаллической структуры в межкристаллитной области.

В пятой главе представлены

- сравнительное исследование дополнительной кристаллизации при отжиге аморфно-кристаллических хлоропреновых каучуков и разветвлённого ПЭВП;
- конформационные изменения нуклеиновых кислот в смеси с гибкоцепным полимером, обусловленные процессами отжига.

В частности, при исследовании кристаллизации в процессе отжига аморфно-кристаллических хлоропреновых каучуков и ПЭВП здесь рассматривается экзотермический тепловой эффект. Т.е., при отжиге этих гибкоцепных полимеров была изучена кинетика выделения тепловой энергии, обусловленная дополнительной кристаллизацией. Особенности кинетических зависимостей кристаллизации при отжиге аморфно-кристаллически ПХП и ПЭНП в интервале температур кристаллизации и в интервале температур плавления позволили предположить возможность использования для интерпретации результатов исследования уравнения Аврами, применяемого ранее при значительно больших изменениях степени кристалличности. Анализ изотерм кристаллизации полимеров на основе уравнения Аврами проведён с целью определения формы растущих кристаллических образований. Относительное изменение степени кристалличности в зависимости от времени при различных температурах изотермической кристаллизации для ПХП приведено на Рис. 10.

При отжиге гибкоцепного полимера в смеси с молекулами ДНК, инициализация дополнительных кристаллов в межкристаллитном пространстве более вероятна вокруг фрагментов дуплексной ДНК (см. Гл. 1). Очевидно, что образование кристаллитов будет происходить на этапе охлаждения материала, которое производится после его предварительного нагрева. Эти процессы нагревания - охлаждения будут приводить к существенным перестройкам во вторичной и пространственной структурах ДНК, смешанной с гибкоцепным полимером. При этом, конечные скорости нагревания - охлаждения делают особо важными кинетические эффекты, связанные с подобными трансформациями структуры нуклеиновых кислот.

Как было показано выше, двойная спираль ДНК, или РНК может служить в

качестве центра кристаллизации полимерного расплава. Однако, стабильность дуплекса нуклеиновых кислот зависит от температуры, *pH* среды, концентрации лигандов и т.д. Так, при нагревании, двойная спираль плавится в результате чего образуются две цепи. При обратном процессе охлаждения за конечное время наблюдения восстановить двойную спираль невозможно из-за крайне медленной кинетики гибридизации.

В процессе гибридизации однонитиевой нуклеиновой кислоты (ДНК, или РНК) образуется сложная структура, типичной пример которой представлен на Рис. 11.

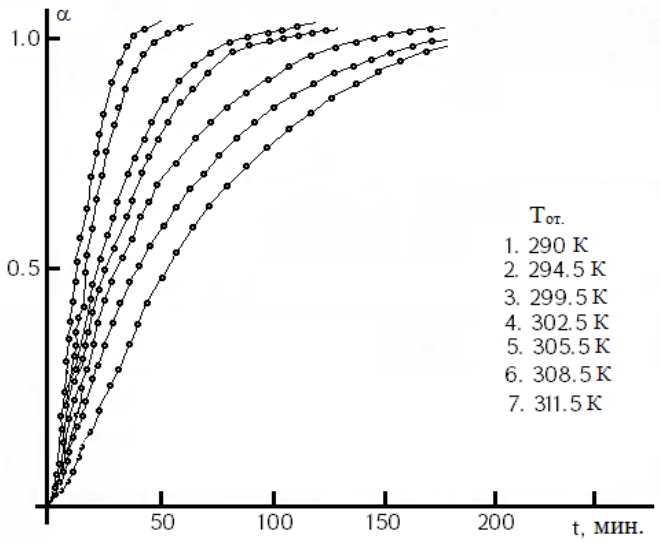


Рис. 10. Изотермы кристаллизации при отжиге ПХП предварительно закристаллизованного при 283К.

Силы, которые стабилизируют вторичную структуру нуклеиновых кислот (НК), сильнее взаимодействий, ответственных за образование третичной структуры и, следовательно, эти две структуры характеризуются двумя разными энергетическими масштабами. Согласно одной из принятых в настоящее время концепций самоорганизации НК, а именно, при понижении температуры сначала образуются элементы вторичной структуры, такие как спирали, петли, шпильки и т.д., которые затем укладываются в трехмерную третичную структуру, что соответствует так называемому иерархическому механизму сворачивания НК.

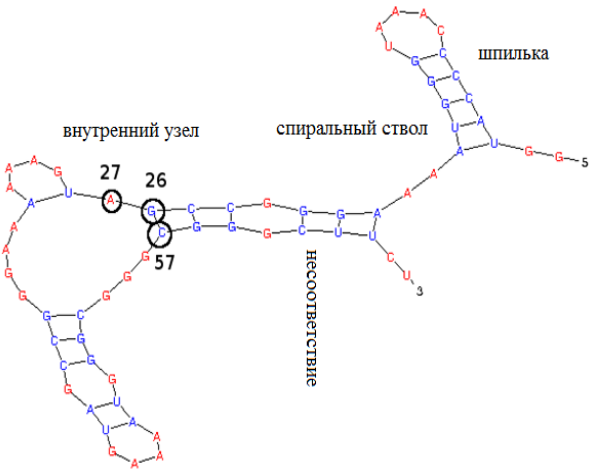


Рис. 11. Фрагмент цепи РНК с типичными элементами вторичной структуры.

Тем не менее, некоторые эксперименты показывают, что скорость складывания длинных НК ниже, чем это предсказывает иерархической механизм. Это может означать, что два последовательных шага сворачивания не являются полностью независимыми. Ландшафт свободной энергии длинной молекулы НК чрезвычайно неровный и содержит несколько глубоких минимумов, которые действуют как кинетические ловушки на путях сворачивания.

При образовании структуры длинных НК возможны два типа конформационных переходов: перестройка вторичной структуры с характерным масштабом времени τ_2 и флуктуации третичной структуры с характерным масштабом времени τ_3. Существует заметная разница между масштабами времени τ_2 и τ_3. Как известно, коллапс цепи РНК длиной в 400 нуклеотидов занимает около 3–4 мс, в то время как намного более короткая цепь РНК длиной в 21 нуклеотид сворачивается в шпильку примерно за 10 мс. Поэтому, в теоретических расчетах, представленных в пятой главе предполагается, что $\tau_3 \ll \tau_2$. Причиной этого является не только большая стабильность пар оснований по - сравнению с третичными контактами. Кинетические факторы играют также важную роль. Образование пар оснований требует закручивания двух субцепей в двойную спираль, которую кинетически трудно (медленно) раскрутить.

В главе пять показано также, что на масштабах времени, лежащих между τ_2 и τ_3 нуклеиновые кислоты претерпевают неравновесный фазовый переход второго рода между двумя режимами, характеризуемые различными ландшафтами свободной энергии, показанными на Рис. 12. Неравновесное состояние характеризуется

эффективными температурами T и T'третичной и вторичной структур, соответственно. Так, далеко от состояния равновесия система находится стекольном состоянии (см. Рис. 12а), где для каждой вторичной структуры имеется несколько третичных структур, соответствующих долинам на ландшафте свободной энергии. Вместе с этим, при приближении к состоянию равновесия, для каждой вторичной структуры имеет место только одно основное состояние (см. рис. 12б). Т.о, усиление гибридизации в процессе релаксации к состоянию термодинамического равновесия сопровождается настройкой третичной структуры, соответствующей установившейся вторичной структуре.

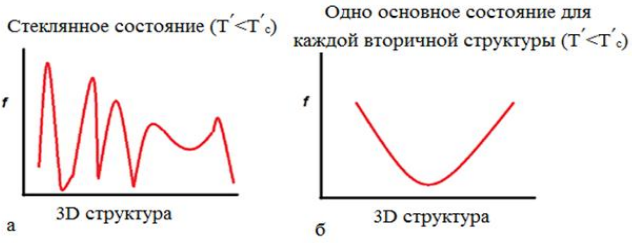


Рис. 12. Схематическое изображение ландшафта свободной энергии.

Ландшафт свободной энергии был оценен с помощью Больцмановских весов долин свободной энергии $\{p_a\}$. Эти веса должны удовлетворять условию

$$\sum_a p_a^2 \approx 0.4.$$

В этой сумме могут доминировать несколько состояний, что приводит к стеклообразному ландшафту свободной энергии, показанному на рис. 12а. Чтобы описать статистические свойства перекрывания между двумя долинами свободной энергии, вводится следующая функция распределения вида

$$P(Q) = \sum_{a,b} p_a p_b \delta(Q_{ab} - Q),$$

где Q_{ab} – параметр перекрывания между a-й и b-й долинами свободной энергии, p_a - это Больцмановский вес a-й долины на ландшафте свободной энергии, который в данном случае ведет себя как

$$P(Q) \sim Q^{\frac{4-5d}{4d}}$$

при $Q < Q(1)$. Поведение функции $P(Q)$ показано на рис. 13, указывая на то, что возможно найти (с достаточно высокой вероятностью) низко - энергетические долины с некоторым структурным сходством ($P(Q)$ имеет ненулевое значение при $Q/Q(1) \sim 1$). Кроме того, непрерывность функции $Q(u)$ показывает, что конфигурационное пространство системы является ультраметрическим.

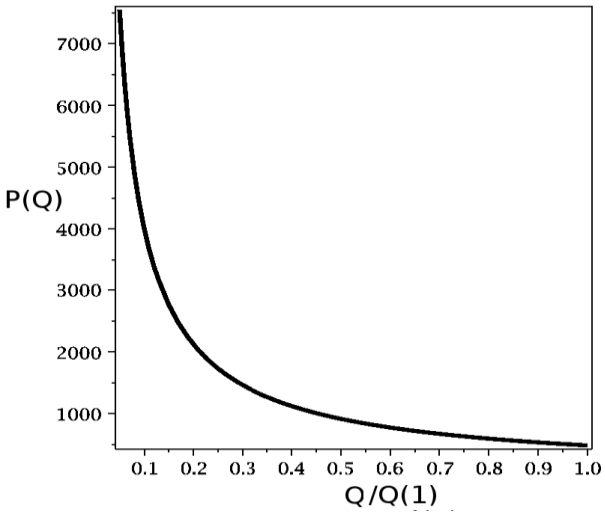


Рис. 13. Поведение функции $P(Q)$ для $d = 3$ и $n = 0.25$.

В стекольной фазе охлаждение вторичной структуры сопровождается понижением условной энтропии S системы, в то время как энтропия вторичной структуры S_{II} повышается. Фактически, в стекольной фазе вторичная структура работает как холодильник, забирая тепло $\delta Q \leq TdS < 0$ от пространственных степеней свободы, используя сценарий "забирать больше при меньшем нажиме" (см. Рис. 14).

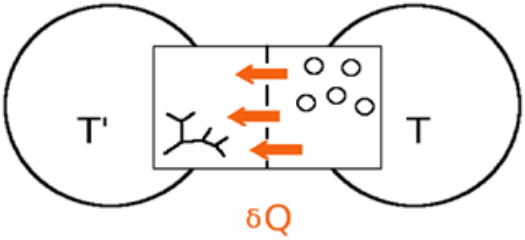


Рис. 14. Вторичная структура работает как холодильник. Стрелками указан поток тепла от пространственных степеней свободы к степеням свободы вторичной структуры, характеризуемых температурами T и T', соответственно.

Забирая тепло от быстрых (пространственных) степеней свободы, мы возможно понижаем число долин на ландшафте свободной энергии (Рис. 12а), индуцируя переход к ландшафту показанному на Рис. 12б.

Заключение

В данной диссертационной работе были рассмотрены эффекты, связанные со структурой и свойствами молекул дуплексной ДНК, растворенных в расплаве гибкоцепного полимера. В частности, были теоретически изучены возможности использования макромолекул ДНК в качестве центров нуклеации кристаллитов и их влияние на стабильность кристаллической структуры и равновесную степень кристалличности. В частности, было показано, что свободная энергия двойной спирали ДНК в кристаллите ниже таковой в расплаве гибкоцепного полимера. Т.о., образование кристаллита является термодинамически более выгодным вокруг фрагментов дуплексной ДНК.

Кроме того, были рассмотрены вопросы возникновения ориентационного порядка в жесткоцепных молекулах ДНК и фазового расслоения в смеси с гибкоцепным полимером. Была изучена связь между ориентационным порядком жесткоцепной ДНК, степенью кристалличности полимера и его эксплуатационными свойствами. Для этого, были проведены экспериментальные исследования одноосной ориентационной кристаллизации в полимерных пленках и проведено сопоставление свойств аморфно - кристаллических полимеров, полученных при одноосной кристаллизации и в присутствие макромолекул дуплексной ДНК.

Значительное место в работе занимает влияние лигандов, связывающихся с двойной спиралью ДНК, а также вопросы их использования для контроля за нематических порядком в смеси и кристаллизацией гибкоцепного полимера. Для этого, в частности было изучено влияние лигандов, связывающихся с использованием двух механизмов как с нативной, так и с денатурированной формами ДНК. Было изучено влияние подобных лигандов стабильность двойной спирали ДНК, а также возможный эффект раскручивания двойной спирали для возникновения и поддержания ориентационного порядка молекул ДНК в смеси. В частности, было показано, что в зависимости от концентации лигандов и параметров связывания возможны различные сценарии денатурации. Так, если при низкой концентрации лигандов наблюдается только тепловая денатурация, то увеличение концетрации лигандов может приводить к появлению как тепловой, так и холодовой денатурации.
Помимо влияние ДНК на процессы кристаллизации в смеси в работе также изучены вопросы влияния процессов, связанных с кристаллизацией на структуру двойной спирали ДНК. Для этого выполнены эксперименты по отжигу аморфно - кристаллического полимера и представлены теоретические результаты, описывающие свойства двойной спирали нуклиеновых кислот в результате нагревания - охлаждение системы. В частности, показано, что по мере приближения молекул НК к состоянию равновесия имеет место неравновесный фазовый переход второго перехода, при котором система переходит из стекольного в состояние реплично – симметричного.

Выводы

1. Основной вклад в свободную энергию фрагмента ДНК в полимерном расплаве вносит работа, совершаемая против осмотического давления гибкоцепного полимера. Имеет место понижение свободной энергии переноса фрагмента дуплексной ДНК из расплава гибкоцепного полимера в кристаллит, что обеспечивает выполнение роли центров кристаллизации фрагментами двойной спирали ДНК при кристаллизации гибкоцепного полимера в смеси ДНК – полимер.

2. Температура плавления полимерных кристаллов развивающихся в процессе изотермической кристаллизации на несколько градусов превышает температуру плавления полимерных кристаллов, возникающих в процессе неизотермической кристаллизации, поскольку полимерные кристаллы, развивающиеся в неизотермических условиях имеют более дефектную структуру нежели полученные при изотермической кристаллизации.

3. Фрагменты дуплексной ДНК в смеси с гибкоцепным полимером приводят к появлению выделенного направления и, как следствие, анизотропиии системы подобно тому, как это имеет место при ориентационной одноосной кристаллизации. Аналогично тому, как это имеет место при ориентационной кристаллизации, наличие фрагментов дуплексной ДНК повышает температуру плавления, верхнюю границу температуры кристаллизации гибкоцепного полимера и равновесную степень кристалличности.

4. Сдвиг температуры плавления и верхней границы температуры кристаллизации идеального полимерного кристалла, образующегося вокруг дуплексной ДНК зависит от объемной доли гибкоцепного полимера таким образом, что при заданных размерах кристаллита температура плавления растет с повышением объемной доли гибкоцепного полимера. В то же время, при заданной объемной доле гибкоцепного полимера рост площади поперечного сечения кристаллита приводит к уменьшению сдвига температуры плавления.

5. Двунитиевая ДНК в смеси с гибкоцепным полимером может переходить из изотропной фазы в жидкокристаллическую нематическую фазу. При этом, температура перехода определяется объемной долей гибкоцепного полимера и параметрами ориентационно – зависимого взаимодействия ДНК–ДНК. Данное взаимодействие, в частности может контролироваться противоинами, растворенными в полимерном матриксе,

которые вызывают эффективное притяжение между фрагментами ДНК.

6. В зависимости от параметров взаимодействия ДНК – полимер и полимер – полимер и объемной доли дуплексной ДНК возникает трехфазное равновесие, при котором две изотропные и одна нематическая фазы способны к сосуществованию. При понижении температуры имеет место фазовое расслоение между двумя изотропными фазами. С последующим понижением температуры возникает расслоение между нематической и изотропной фазами при температурах ниже тройной точки. При температурах выше тройной точки появляются две нематические фазы и узкая изотропно - нематическая двухфазная зона.

7. Связывание дуплексной ДНК с лигандами, связывающимися с нативной и денатурированной участками ДНК по двум различным механизмам, приводит к двум возможным сценариям изменения конформации ДНК: тепловая денатурация; тепловая и холодовая денатурация. При этом, за счет денатурации имеет место эффективное уменьшение длины жесткоцепной ДНК, что позволяет контролировать ориентационный порядок фрагментов ДНК и кристаллизацию гибкоцепного полимера в смеси.

8. При отжиге аморфно – кристаллического полимера в смеси с фрагментами ДНК имеет место нагрев и последующее понижении температуры системы, которая сопровождается образованием различных элементов вторичной структуры. Этот процесс характеризуется двумя характерными временами релаксации, что приводит к возникновению стационарного неравновесного состояния. При этом имеет место неравновесный фазовый переход второго рода.

9. Релаксация частично расплавленной молекулы ДНК при охлаждении к состоянию термодинамического равновесия происходит аналогично тому, как это имеет место для однонитиевой ДНК. Вдали от состояния термодинамического равновесия ландшафт свободной энергии такой системы является типичным для стекольной фазы, когда каждой реализации вторичной структуры соответствует несколько метастабильных состояний, отвечающих различным вариантам пространственной структуры ДНК. При приближении к состоянию термодинамического равновесия, ландшафт свободной энергии ДНК меняется таким образом, что каждой реализации вторичной структуры соответствует один минимум свободной энергии.

Основное содержание диссертации отражено в следуюших публикациях:

1. Григорян З.А., Машурян А.М., Ованесов Г.Т., Гаспарян К.А. Расчет зависимости интервала плавления гибкоцепных полимеров от температуры кристаллизации, Известия НАН Армении, Физика, 1997, т.32, N6, с. 316-319.
2. Григорян З.А., Ованесов Г.Т., Машурян А.М. Анализ механизма кристаллизации при отжиге аморфно-кристаллического полихлоропрена и его двух равновесных температур плавления. АрмНИИНТИ, 1997, N61-Ар97.
3. Григорян З.А., Машурян А.М., Ованесов Г.Т., Петросян П.Г. Особенности изменения надмолекулярной структуры закристаллизованного полиэтилена при кратковременном ожиге. Ученые записи ЕГУ, Физика, 1998, N2, с. 52-56.
4. Григорян З.А. Влияние предварительной ориентационной кристаллизации на одноосную деформацию аморфно-кристаллического полимера. АрмНИИНТИ, 1999, N26-Ар99.
5. Григорян З.А. Исследование предварительной ориентационной кристаллизации полипропиленовых пленок. Годичная научная конференция государственного инженерного университета Армении, сборник материалов, Ереван, 2000, с. 31-33.
6. Григорян З.А. Особенности кристаллизации полипропилена. Годичная научная конференция государственного инженерного универ. Армении, Сборник Мат., т. 1, Ереван, 2001, с. 42-43.
7. Григорян З.А. Влияние предварительной ориентационной кристаллизации на одноосную деформацию аморфно-кристаллического полипропилена. Известия НАН Армении, Физика, 2002, т.37, N3, с. 191-194.
8. Григорян З.А. Надмолекулярная структура кристаллизующихся полимеров. Информационные технологии и управление, сборник статей, 1, 2003, с.67-71.
9. Григорян З.А., Машурян А.М. Особенности роста дополнительных кристаллитов при отжиге полихлоропрена. Известия НАН Армении, Физика, 2003, т.38, N4, с. 261-264.
10. Григорян З.А. Спектр релаксационных процессов полихлоропрена. Информационные технологии и управление, сборник статей, 3, 2006, с.162-166:
11. Ованесов Г.Т., Григорян З.А. Расчет количества тяжей, образующихся при макроразрушении полимерных пленок. Известия НАН Армении, Физика, 2007, т.42, N2, с. 123-126.
12. Бабаян Ю.С., Ованесов Г.Т., Григорян З.А. Спектр релаксационных процессов полибромопрена. Ученые записи ЕГУ, 2008, N2, с. 70-73.
13. Григорян З.А., Ованесов Г.Т. Особенности шейкообразования аморфно-кристаллического полимера. Информационные технологии и управление, сборник статей 2009, 2,с. 11-13.
14. Григорян З.А., Ованесов Г.Т. Диэлектрическая релаксация серосодержащего полихлоропрена Информационные технологии и управление, сборник статей, 2009, 2, с. 8-10:

15. Григорян З.А. Особенности механических характеристик полипропиленовых мембран. Мат. Междунар. Конф. посвящ. 40-летию основания АрГУ, ч. 2, 2009, с. 46-47.
16. Ованесов Г.Т., Григорян З.А. Особенности релаксации полибромолена. Международный научный альманах, Российский государственный социальный университет, 7, 2010, с. 296-299.
17. Ованесов Г.Т., Григорян З.А. Влияние кристаллизации полихлоропрена на параметры диэлектрической релаксации. Вестник инженерной академии Армении (ВИАА), 2010, т. 7, №2, с. 369-371.
18. Grigoryan Z.A., Mamasakhlisov Y.S., Karapetyan A.T. Orientational ordering of short DNA fragments in the polymer matrix. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, Book of Abstrasts. Albany 2013: The 18th Converasation, p. 60.
19. Григорян З.А. Ориентационный порядок в полимерных материалах, содержащих нанонаполнители: влияние осмотического давления. Мат. межд. научно-практ. конф. "Строительство – 2013", Ростов на Дону, 2013, с. 131-132.
20. Grigoryan Z.A. Liquid crystalline phase of the double-strand DNA in the polymer matrix. Proceedings of the Yerevan State University, Physical and Mathematical Sciences, 2014, 1, p. 57-60.
21. Карапетян А.Т., Мамасахлисов Е.Ш., Григорян З.А. Ориентационный порядок в полимерных композитах, содержащих нано-наполнители: Эффект плавления. Доклады НАН РА, 2014, т.114, 2, с. 123-130.
22. Григорян З.А. Ориентационный порядок в полимерных композитах, содержащих нано-наполнители: Эффект осмотического давления. Известия НАН Армении, Физика, 2014, т. 49, N5, с. 366-370.
23. Григорян З.А., Карапетян А.Т. Кристаллизация в расплаве гипкоцепного полимера в присутствии двухнитевой ДНК. Известия НАН Армении, Физика, 2014, т. 49, N6, с. 434-439.
24. Grigoryan Z.A., Karapetian A.T. Short double stranded DNA alignment in the melt of flexible polymers. Biophysical Reviews and Letters, 2015, v. 10, N01, p. 59-68.
25. Karapetian A.T., Grigoryan Z.A., Mamasakhlisov Y.S., Minasyants M.V., Vardevanyan P.O. Theoretical treatment of helix-coil transition of complexes DNA with two different ligands having different binding parameters. J. Biomol. Struct. Dyn., 2015, p. 1-5, **DOI:** 10.1080/07391102.2015.1010584.
26. Karapetian A.T., Grigoryan Z.A. The globular state of the single-stranded RNA: Effect of the secondary structure rearrangements. J. of Nucleic Acids, 2015, p. 1-6, http://dx.doi.org/10.1155/2015/295264.
27. Karapetian A.T., Grigoryan Z.A. The cold melting effect of complexes DNA with two different ligands using different binding mechanisms. J. of Biomol. Struct. Dyn., Albany 2015, The 19th conversation, June 9-13, 2015, Book of Abstracts, p. 93.

28. Tonoyan S.A., Asatryan A.V., Mamasakhlisov Y.S., Grigoryan Z.A. Helix-coil transition in macromolecules with sequence heterogeneity. J. of Biol. Phys. and Chem., 2015, v. 15, p. 195-199.
29. Grigoryan Z.A. Collapse of the branched polymer on the example of RNA molecule. Proc. of the YSU, Phys. and Math. Sciences, 2015, 2, p. 56-61.
30. Mamasakhlisov Y.S., Grigoryan Z.A., Bellucci S., Hayryan S., Caturyan H., Chin-Kun Hu Collapse and hybridization of RNA: view from replica technique approach. The European physics journal E, 2015. v. 38, http://dx.doi.org/10.1140/epje/i2015-15100-x.
31. Grigoryan Z.Z. DNA - ligand complexes melting: the effect of multiple binding mechanisms. Proc. of the YSU, Phys. and Math. Sciences, 2016, 1, p. 52-57.

Գրիգորյան Զարեհ Արտաշեսի

Դուպլեքսային ԴՆԹ-ն ճկունշղթա պոլիմերի հալույթում որպես բյուրեղացման կենտրոն

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր: Ճկունշղթա պոլիմերային խառնուրդ, ԴՆԹ, բյուրեղացում, իզոտրոպ փուլ, նեմատիկ փուլ, ամորֆ-բյուրեղային պոլիմերի թրծաթողում

Աշխատանքում տեսականորեն և փորձարարականորեն ուսումնասիրվել է երկշղթա ԴՆԹ-ի կոշտ շղթայական ֆրագմենտներով ճկունշղթա պոլիմերի խառնուրդի վարքը՝ ճկունշղթա պոլիմերի բյուրեղացումն ապահովող պայմաններում:

Փորձարարականորեն ցույց է տրվել, որ ճկունշղթա պոլիմերի իզոթերմ բյուրեղացումը հանգեցնում է բյուրեղների ավելի քիչ արատների, քան ոչ իզոթերմ բյուրեղացումը, ինչպես նաև բարձրացնում է համակարգի հալման ջերմաստիճանը: Տեսականորեն ցույց է տրվել, որ բյուրեղիկում ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի ֆրագմենտի ազատ էներգիան էականորեն ավելի փոքր է ճկունշղթա պոլիմերի հալույթում նույն մեծության համեմատ, ինչը որոշակի պայմաններում ճկունշղթա պոլիմերի բյուրեղացման դեպքում թույլ է տալիս դրանք օգտագործել որպես նուկլեացիայի կենտրոններ: Դրանց առկայությունը բարձրացնում է հալման ջերմաստիճանը և, որպես հետևանք, բյուրեղացման ջերմաստիճանի վերին սահմանը: Իդեալական պոլիմերային բյուրեղի հալման և բյուրեղացման ջերմաստիճանի տեղաշարժը կախված է ճկունշղթա պոլիմերի ծավալային մասնաբաժնից, ինչպես նաև բյուրեղիկի լայնակի կտրվածքի մակերեսից: Բացի այդ, ճկունշղթա պոլիմերով խառնուրդում երկշղթա ԴՆԹ-ն կարող է իզոտրոպ փուլից անցնել հեղուկ-բյուրեղային նեմատիկ փուլի, ինչպես նաև ցուցաբերում է փուլային շերտավորման տարբեր տիպեր և եռափուլ հավասարակշռության առկայություն՝ կախված ճկունշղթա պոլիմերի ծավալային մասնաբաժնից, ջերմաստիճանից և ԴՆԹ-ԴՆԹ ու ԴՆԹ-ճկունշղթա պոլիմեր փոխազդեցության պարամետրերից:

Տեսականորեն ցույց է տրվել, որ ԴՆԹ-լիգանդ փոխազդեցությունը թույլ է տալիս կարգավորել նուկլեացիայի կենտրոնների նեմատիկ կարգը և, որպես հետևանք, պոլիմերի բյուրեղացումը: Ընդ որում, վերլուծվել է այն լիգանդների ազդեցությունը, որոնք ցուցաբերում են կապման մի քանի մեխանիզմներ ԴՆԹ-ի նատիվ և դենատուրացված ձևերի հետ: Մասնավորապես, ցույց է տրվել ԴՆԹ-լիգանդ կոմպլեքսների ինչպես ջերմային, այնպես էլ սառը բնափոխման հնարավորությունը՝ կախված ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման հաստատունների արժեքներից, ինչպես նաև լիգանդների և ԴՆԹ-ի կոնցենտրացիայից:

Փորձարարականորեն ցույց է տրվել, որ միառանցքային կողմնորոշիչ բյուրեղացումը հանգեցնում է բյուրեղացման աստիճանի մեծացմանը և պոլիմերային

նյութի կիրառական հատկությունների բարելավմանը՝ համեմատած սովորական իզոթերմ և ոչ իզոթերմ բյուրեղացումների հետ: Ցույց է տրվել, որ ճկունշղթա պոլիմերի բյուրեղացումը ԴՆԹ-ի նեմատիկորեն կարգավորված ֆրագմենտների առկայությամբ հանգեցնում է նյութի հատկությունների բարելավմանը համանման ձևով, ինչ դա տեղի էր ունենում միառանցքային կողմնորոշիչ բյուրեղացման դեպքում:

Փորձարարականորեն ուսումնասիրվել է ամորֆ-բյուրեղային պոլիմերի թրծաթողման պրոցեսի ազդեցությունը վերջինիս հատկությունների վրա: Մասնավորապես, ցույց է տրվել, որ թրծաթողումը ոչ միայն բարձրացնում է պոլիմերի բյուրեղացման աստիճանը, այլև բարելավում է պոլիմերային նյութի ամրության բնութագրիչները: Ընդ որում, տեսականորեն ուսումնասիրվել է տաքացման-սառեցման պրոցեսների ազդեցությունը պոլիմերային մատրիքսում նուկլեինաթթուների ռելաքսացիայի կինետիկայի վրա: Մասնավորապես, ցույց է տրվել, որ ջերմաստիճանի իջեցման դեպքում տեղի է ունենում ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի կայունացում, ինչն ուղեկցվում է երկրորդային կառուցվածքի տարբեր տարրերի առաջացմամբ: Այս պրոցեսը բնութագրվում է ռելաքսացիայի երկու բնութագրական ժամանակներով: Ընդ որում, ռելաքսացիայի այս երկու բնութագրական ժամանակների միջև միջանկյալ ժամանակային մասշտաբների վրա համակարգում ի հայտ է գալիս ոչ հավասարակշռական ստացիոնար վիճակ: Թերմոդինամիկական հավասարակշռությունից հեռու վիճակում այսպիսի համակարգի ազատ էներգիայի լանդշաֆտը տիպական է ապակե փուլի համար: Թերմոդինամիկական հավասարակշռության վիճակին համակարգի մոտենալու դեպքում տեղի է ունենում երկրորդ կարգի ոչ հավասարակշռական փուլային անցում:

Grigoryan Zareh

Duplex DNA in melt of the flexible-chain polymer as a crystallization center

Summary

Keywords: Flexible-chain polymer mixture, DNA, crystallization, isotropic phase, nematic phase, annealing of amorphous-crystallic polymer

In this work behavior of the flexible-chain polymer mixture with rigid-chain double-stranded DNA fragments in conditions providing the crystallization of the flexible-chain polymer has been theoretically and experimentally studied.

It was experimentally shown that an isotherm crystallization of the flexible-chain polymer leads to less defectiveness of crystals than non-isotherm one, as well as raises the system melting temperature. It was theoretically shown that free energy of double-stranded DNA fragment in the crystal is significantly less than that in the flexible-chain polymer melt, which in the certain conditions permits them being used as nucleation centers at the flexible-chain polymer crystallization. Their presence enhances the melting temperature and, as a consequence, superior boundary of crystallization temperature. Shift of melting and crystallization temperatures of an ideal polymer crystal depends on both volume portion of the flexible-chain polymer and crystal cross section area. Besides, double-stranded DNA in the mixture with the flexible-chain polymer can transmit from isotropic phase to liquid-crystal nematic phase, as well as demonstrates different types of phase layering, presence of three-phase equilibrium depending on the flexible-chain volume portion, temperature and DNA-DNA and DNA-flexible-chain polymer interaction parameters.

It was theoretically shown that DNA-ligand interaction allows to control nematic order of the nucleation centers and, as a consequence, polymer crystallization. Moreover, the effect of ligands demonstrating several mechanisms of binding to native and denatured forms of DNA was analyzed. Particularly, the possibility of both thermal and cold denaturation of DNA-ligand complexes depending on binding constant values of ligands to DNA and concentration of ligands and DNA was shown.

It was experimentally shown that one-axis orientational crystallization results in increasing of crystallization degree and improving of expluatation properties of polymer material as compared to those for usual and isotherm and non-isotherm crystallization. It was shown that the flexible-chain polymer crystallization in the presence of nematically ordered fragments of DNA results in improving of the material properties analogous to as it occurs at one-axis orientational crystallization.

The effect of the annealing process of amorphous-crystallic polymer on its properties was experimentally studied. Particularly, it was shown that the annealing not only raises the polymer crystallization degree, but also improves mechanical characteristics

of the polymer material. Moreover, the effect of heating-cooling processes on relaxation kinetics of nucleic acids in the polymer matrix was theoretically studied at the annealing. Particularly, it was shown that at the temperature decreasing double-stranded DNA stabilization occurs, which is accompanied by formation of different elements of secondary structure. This process is characterized by two character relaxation times. Though, on the intermediate time scale between these two characteristic times of relaxation non-equilibrium stationary state emerges in the system. Far from thermodynamic equilibrium state the free enrgy landscape of such system is typical for glassy phase. At approaching of the system to thermodynamic equilibrium state, the non-equilibrium phase transition of secondary order takes place.