

Received: 2011.02.07
Accepted: 2011.05.11
Published: 2011.06.17

Inżynierowany jedwab pajęczy: inteligentny biomateriał przyszłości. Część II

Engineered spider silk: the intelligent biomaterial of the future. Part II

Katarzyna Kaźmierska^{1,2*}, Anna Florczak^{1,2}, Konrad Piekoś²,
Andrzej Mackiewicz^{2,3}, Hanna Dams-Kozłowska^{2,3}

¹ Międzyuczelniane Centrum NanoBioMedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

² Katedra Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu

³ Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu

Streszczenie

Opracowanie i rozwój technologii produkcji inżynierowanego jedwabiu stworzyły realne możliwości jego praktycznych zastosowań. Rekombinowany inżynierowany pajęczy jedwab (IPJ) stanowi substrat do produkcji różnych biomateriałów, takich jak: filmy, hydrożele, włókna, rusztowania, mikrokapsułki, mikro- i nanosfery. Wytwarzanie *in vitro* włókien odbywa się w sposób naśladujący warunki naturalnie panujące w gruczole przędnym pająka: w obecności jonów fosforanowych oraz sił ciągnących. Filmy otrzymywane są przez odparowanie rozpuszczalnika z roztworu jedwabiu, natomiast rezultatem odparowywania rozpuszczalnika w obecności porogenu są jedwabne rusztowania. Hydrożele powstają w wyniku polimeryzacji cząstek jedwabiu w roztworach o niskim pH. Polimer jedwabiu powstający na granicy niemieszających się faz wykorzystywany jest do otrzymywania mikrokapsulek. Najmniejsze z opisywanych form – jedwabne sfery powstają przez wysolenie białek jedwabiu jonami fosforanowymi. Cechami wspólnymi jedwabnych biomateriałów są biokompatybilność oraz biodegradowalność pozwalające na wykorzystanie ich w medycynie i farmacji, a strategia konstrukcji białek hybrydowych polegająca na nadaniu metodami inżynierii genetycznej pożądanej funkcji dalej rozszerza możliwości ich wykorzystania.

Słowa kluczowe:

jedwab pajęczy • inżynierowany jedwab pajęczy • biomateriał • włókna • film • hydrożel • rusztowania • mikrokapsułki • mikro-, nanosfery

Summary

The development and progress in engineered spider silk manufacturing has enabled its practical application. Recombinant spider silk can assemble in several morphological forms such as films, hydrogels, fibers, scaffolds, microcapsules, and micro- and nanospheres. The *in vitro* fiber formation takes place by mimicking the natural spinning process in the spider spinning gland: in the presence of phosphate ions and dragging forces. Films are obtained by evaporation of solvent from the silk solution, while the result of evaporation of the solvent in the presence of porogens is a silk scaffold. Hydrogels are formed by spontaneous polymerization of silk particles in solutions at low pH. The silk film assembled at the interface of two immiscible phases forms microcapsules. The smallest of the described forms – silk spheres – are obtained by salting out

* Wkład pracy pierwszych trzech autorów był równorzędny.

the silk protein solution after addition of the phosphate ions. Common properties of the silk biomaterials are biocompatibility and biodegradability, which make them suitable for a number of applications in medicine and pharmacy. Moreover, the strategy of hybrid proteins which provides the desired function to biomaterial will further expand their potential use.

Key words: spider silk • engineered proteins • biomaterial • film • hydrogel • fiber • scaffold • microcapsules • micro- and nanospheres

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=948968>

Word count: 3273

Tables: 1

Figures: 1

References: 45

Adres autorki: dr n. biol. Hanna Dams-Kozłowska, Zakład Diagnostyki i Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań; hanna.dams-kozłowska@wco.pl

WPROWADZENIE

Nadzwyczajne właściwości mechaniczne nici pajęczych, takie jak wytrzymałość, rozciągliwość, odporność na pękanie, a przy tym biokompatybilność i biodegradowalność czynią jedwab biomateriałem o licznych potencjalnych zastosowaniach w medycynie i farmacji. Jednak przez wiele lat postęp badań był ograniczony dostępnością materiału. Poznanie sekwencji genów kodujących białkowy budulec jedwabnych nici (tzw. spidroin) otworzyło drogę do konstruowania syntetycznych genów, kodujących tzw. inżynierowany pajęczy jedwab (IPJ). Strategia ta polega na syntezie krótkiej nici DNA kodującej sekwencję konsensusową danej spidroiny, tzw. modułu DNA. Konstrukcja modułów DNA zakłada optymalizację kodonów odpowiednio do danego systemu ekspresyjnego. Zapewnia to wysoki poziom ekspresji, co wiąże się ze zwiększeniem ilości jedwabnego materiału. Ponadto dodatkowe polipeptydy tworzące funkcjonalne domeny dodane do IPJ metodami inżynierii genetycznej nadają IPJ dodatkowe funkcje, np. enzymatyczne, rozpoznające receptory komórkowe, wiążące metale, cukry, adhezji, przechodzenia przez błony komórkowe i inne. Te syntetyczne, funkcjonalne białka jedwabiu stanowią nową klasę spidroin [33]. Zagadnienie konstrukcji IPJ i ich funkcjonalizacji zostało opisane w części I dotyczącej inżynierowanego jedwabiu pajęczego.

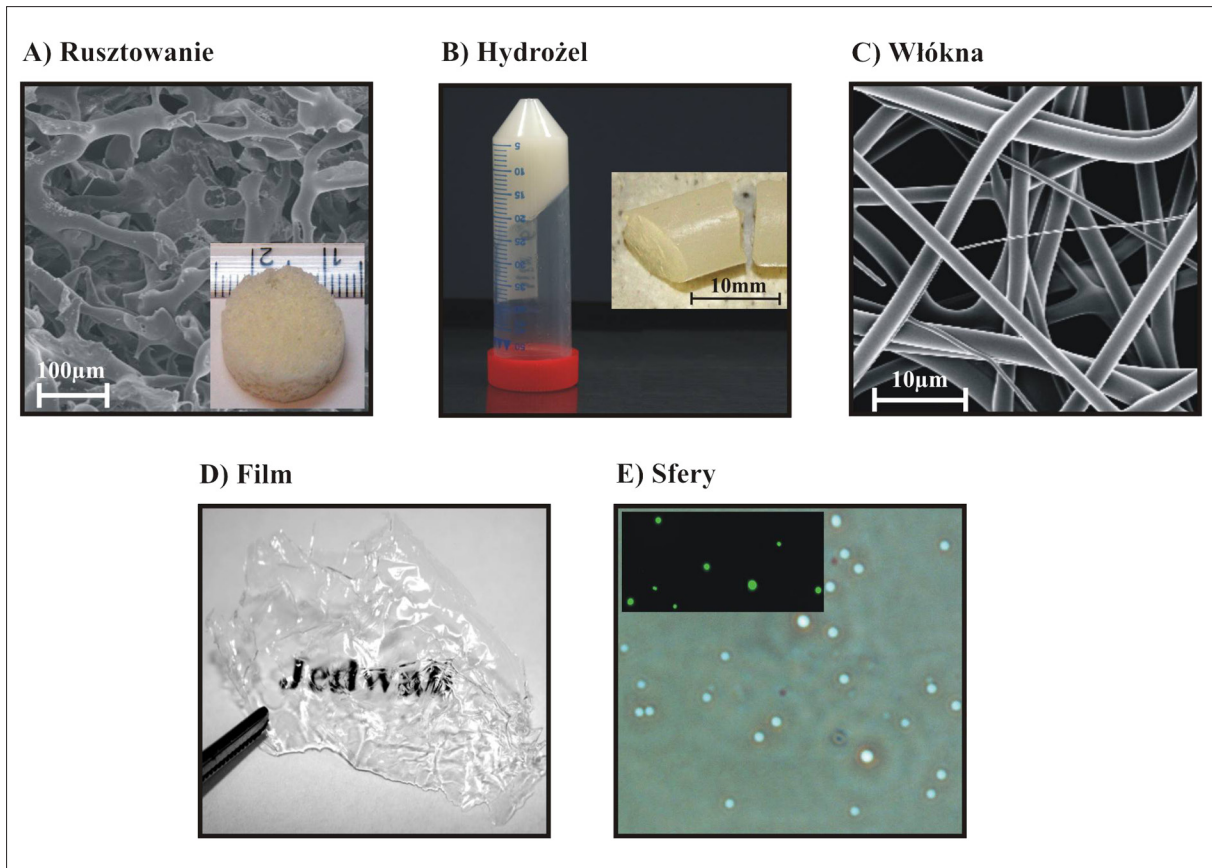
Zwiększenie dostępności białek jedwabiu stało się punktem przełomowym w badaniach prowadzących do praktycznych zastosowań biomateriałów opartych na IPJ. Jedwab naturalny, wytwarzany przez larwy jedwabnika morwowego, od lat wykorzystywany jest do produkowania różnych morfologicznych biomateriałów [2]. Opracowywane techniki pozyskiwania struktur, takich jak: włókna, maty, żele, filmy/błony, porowate rusztowania, kapsułki czy sfery stanowią obecnie punkt wyjścia do badań nad możliwościami wytwarzania różnych form morfologicznych również z jedwabiu pajęczego (ryc. 1). Intensywne badania prowadzące do poznania procesów zachodzących w gruczołach przednich pająka przyczyniają się również do zrozumienia, a zatem kontroli procesów wytwarzania jedwabnych biomateriałów. Białka jedwabiu zmagazynowane w worku gruczołu przedniego występują w postaci rozpuszczalnej

i mają strukturę nieuporządkowanego zwoju (kłęбка statystycznego). Muszą one zostać poddane składaniu tak, aby ostatecznie otrzymać nierozpuszczalne włókna o dominującej strukturze drugorzędowej typu połałdowana kartka β [8]. Analiza procesu przechodzenia białek jedwabiu z roztworu do fazy stałej zachodzącego w gruczołach przednich pająka wykazała ważne znaczenie czynników, takich jak: stężenie soli, pH, zawartość wody, stężenie białka oraz działanie sił mechanicznych [8]. Naśladując naturę w warunkach sztucznych naukowcy pracują nad kontrolowanym przejściem białek jedwabiu z fazy ciekłej do stałej przy jednoczesnym nadawaniu pożądanego kształtu tworzonemu biomateriałowi [13]. Poniżej przedstawiono dotychczasowe osiągnięcia w dziedzinie pozyskiwania biomateriałów opartych na IPJ.

WŁÓKNA I MATY

Większość metod eksperymentalnych użytych dotychczas w próbach uzyskania włókien z rekombinowanych białek bazowała na wytlaczaniu rozpuszczalnika zwanym inaczej mokrym przędzeniem, elektroprzędzeniu oraz na metodach związanych z mikroprzepływami [8]. Metodą produkcji włókien *in vitro* najbardziej zbliżoną do naturalnego procesu jest metoda oparta na mikroprzepływach [30]. Warunki przepływu laminarnego zapewniają precyzyjną kontrolę nad stężeniem jonów, wartością pH wzdłuż kanału, szybkością przepływu oraz działaniem sił ciągnących [32]. Ważną rolę w formowaniu ostatecznego kształtu i właściwości włókien jest mechaniczne wyciąganie imitujące siły ciągnące występujące w naturze. Wyciąganie prowadzi do powstania dłuższych oraz cieńszych włókien. Włókno poddane wyciąganiu ma większą zawartość struktury β -kartki, a co za tym idzie zwiększoną wytrzymałość [15]. Włókno, które przeciągnięte zostanie przez wodny roztwór nabiera większej odporności na odkształcanie i zerwanie, jest jednak mniej rozciągliwe [36]. Na mechaniczną wytrzymałość oraz strukturę włókna znaczący wpływ ma wielkość białka użytego do jego produkcji oraz obecność końcowych niepowtarzających się domen. Wykazano, iż białko oparte na sekwencji MaSp1 złożone z 96-krotnie powtórzonych domen alaninowych i glicynowych (czyli wielkością zbliżoną do naturalnego) formuje wytrzymałe włókna





Ryc. 1. Formy morfologiczne (strukturalne) uzyskiwane z jedwabiu naturalnego i inżynierowanego jedwabiu pajęczego; (A) obraz SEM rusztowania, widoczna porowata struktura rusztowania, wstawka: makroskopowy obraz rusztowania, (B) makroskopowy obraz hydrożelu w próbownicy, wstawka: krążki hydrożelu, (C) obraz SEM włókien uzyskanych metodą elektroprzędzenia, (D) makroskopowy obraz filmu, (E) obraz z mikroskopu świetlnego sfer uzyskanych z IPJ (powiększenie 400×), wstawka: obraz z mikroskopu fluorescencyjnego sfer znakowanych FITC (powiększenie 200×)

o regularnej strukturze. Krótsze, 32-16-merowe białka tworzą wadliwie włókna o niewielkiej wytrzymałości na rozciąganie [45]. Oznacza to, iż chcąc uzyskać *in vitro* włókno o właściwościach zbliżonych do pajęczęj nici należy uzyskać ekspresję jak najdłuższego białka. Końcowe, niepowtarzające się domeny białka jedwabiu odgrywają ważną rolę w procesie formowania się włókien, zapobiegając niepożądaną agregacji białek oraz promując agregację białek w sposób równoległy do długiej osi włókna. IPJ pozbawione końcowych domen niepowtarzających się poddane sile ścinającej nie wykazują zmian lepkości, tworzą niewielkie, nieprawidłowe, nieuporządkowane agregaty zawierające przypadkowo sparowane struktury β -kardki. W tych samych warunkach białka mające C-kończącą domenę formują fibrylarne agregaty bogate w struktury β -kardki układające się wzdłuż osi włókna [7]. IPJ oparte na sekwencji ADF-3 (eADF3) tworzyły włókna uzyskane techniką mikroprzepływów po zastosowaniu sił ciągnących i obniżeniu pH z 8 do 6. Włókna te miały średnicę 10–40 μm . Charakteryzowały się znacznie mniejszą odpornością na rozerwanie niż naturalne nici pajęczę. Na przykładzie tych włókien zaobserwowano, iż proces wyciągania ma znaczący wpływ na wytrzymałość i rozciągliwość włókna [19]. Tą samą techniką uzyskano również włókna z mieszaniny inżynierowanych białek eADF3 i eADF4. Białko eADF4 nie tworzy włókien, polimeryzuje jedynie w sfery o dużej zawartości β -kardki. Mieszanina obu białek składa się w odpowiednich warunkach z włókna o właściwościach

zbliżonych do włókien zbudowanych tylko z białka eADF3 [32]. Włókna z rekombinowanego IPJ produkowane metodą elektroprzędzenia można układać w porowate maty doskonale imitujące topograficzne właściwości przestrzeni międzykomórkowej [41]. Obecnie podejmowane są próby tworzenia mat powstałych z IPJ jako alternatywy dla naturalnych włókien stosowanych jako podłoże do hodowli komórek. Przykładowo, rozwór hybrydowego IPJ opartego na sekwencji MaSp1 połączonego z sekwencją trójpeptydu RGD (wspomagającą adhezję komórek) poddano elektroprzędzeniu, uzyskując maty zbudowane z włókien o średnicy około 100 nm [4].

FILMY

Cienkie błony złożone z cząstek rekombinowanego IPJ stanowią podstawę stabilnego, biokompatybilnego polimeru o obiecujących właściwościach i potencjale do zastosowań biomedycznych. Jedwabny film może być uzyskany przez całkowite odparowanie rozpuszczalnika z roztworu IPJ. Przezroczyste filmy o grubości 0,5–1,5 μm otrzymano z użyciem rozpuszczalnika HFIP – heksafluoroizopropanolu zawierającego roztwór białka IPJ opartego na sekwencjach pajęczęcych: ADF-3 i ADF-4 [12]. Roztworem tym pokrywano płytki krzemowe i odparowywano rozpuszczalnik. Uzyskane w ten sposób filmy miały wewnętrzną strukturę zbudowaną z motywów β -kardki, β -zwołów, α -helis oraz nieuporządkowanych fragmentów. Aby wzbogacić

zawartość struktury β -kardki, a przez to zwiększyć mechaniczną wytrzymałość filmu, inkubowano go z roztworem metanolu [12]. Film potraktowany metanolem składał się głównie z krystalicznych struktur β -kardki stworzonych przez motywy polialaninowe [21]. Otrzymane filmy były stabilne w warunkach denaturujących, takich jak wysokie stężenia mocznika i chlorowodoru guanidyny, dorównując właściwościom naturalnego jedwabiu pajęczego [37]. Powierzchnia filmu doskonale nadaje się do hodowli komórek tkanki łącznej, gdyż pobudza nie tylko ich wzrost, ale także wytwarzanie substancji międzykomórkowej, co wykazano na przykładzie fibroblastów deponujących na jedwabnej matrycy kolagen typu I [44]. Właściwość tę wykorzystano do projektowania opatrunków wspomagających regenerację skóry po oparzeniach. Zastosowanie membrany z rekombinowanych IPJ na poparzone miejsce znacznie przyspieszało gojenie się rany oraz wzmagало ekspresję czynnika wzrostu fibroblastów, przewyższając działanie standardowo stosowanego kolagenu [3]. Jednak do wielu zastosowań niezbędne jest nadanie IPJ nowej funkcji poprzez modyfikacje chemiczne gotowego filmu, bądź genetyczne modyfikacje białka użytego do produkcji filmu. Zmodyfikowane filmy mogą się stać narzędziami do kontrolowanego uwalniania leków lub innych substancji aktywnych, działać jako biosensory lub stanowić rusztowania do wzrostu komórek w inżynierii tkankowej. Przykładem może być wprowadzenie cysteiny do sekwencji IPJ bazującego na sekwencji ADF-4. Modyfikacja skutkująca pojawieniem się grupy tiolowej na powierzchni filmu pozwoliła na zakotwiczenie na błonie takich cząstek jak nanocząstki złota, barwniki, biotyna, β -galaktozydaza oraz inne enzymy [40]. Innym przykładem są białka fuzyjne jedwabiu inżynierowanego z sekwencjami konsensusowymi lub fragmentami innych białek. Fuzja IPJ z 10-krotnie powtórzoną pentapeptydem sekwencji konsensusowej elastyny i wykorzystanie go jako podłoże (film) do hodowli ludzkich chondrocytów poprawiło warunki wzrostu komórek w porównaniu z hodowlą na płytkach polistyrenowych. Uzyskano podobne rezultaty jak w hodowli na płytkach pokrytych kolagenem bądź fibronektyną [35]. Jednak ze względu na brak porównania białka fuzyjnego z białkami składowymi, nie można jednoznacznie stwierdzić, czy o skuteczności decyduje składowa elastyna, sekwencja IPJ czy też obie [35]. Z rekombinowanego 15-merowego IPJ z peptydem RGD utworzono filmy, które stanowiły matrycę do wzrostu komórek macierzystych szpiku kostnego [4]. Hormonalna indukcja ich różnicowania w kierunku komórek kości prowadziła do wzrostu osteocytów i do wzmożonego odkładania soli wapnia w porównaniu ze standardowymi warunkami hodowli. Bardziej intensywne odkładanie soli wapniowych zaobserwowano jednakże w kontroli z hodowlą komórek na rekombinowanym 15-merowym białku pozbawionym sekwencji RGD. Wynik ten może sugerować, iż wzrost tych komórek jest promowany przez samą strukturę filmu z rekombinowanego białka [4]. Ponadto wykazano, że zawartość struktury kardki β , odpowiedzialnej za sztywność materiału, w drugorzędowej strukturze filmu będącego mieszaniną rekombinowanego IPJ bez oraz z motywem RGD była skorelowana z zawartością motywów RGD [23]. Zaobserwowano zwiększoną ilość struktury kardki β w przypadku rekombinowanego IPJ z RGD. Co więcej, wykazano, że niezależnie od stosunku obu składników mieszaniny, peptyd RGD był zawsze eksponowany na powierzchni filmu [23]. Inne

doniesienia opisują fuzję IPJ z peptydami powodującymi odkładanie się substancji nieorganicznych na powierzchni biopolimeru. W przypadku dołączania sekwencji konsensusowej pochodzącej z białka silafiny (sekwencja R5), na powierzchni filmu odkładała się krzemionka. Uzyskane filmy oraz porowate struktury trójwymiarowe zbudowane z IPJ zostały wzmocnione cząsteczkami krzemionki tworząc stabilne rusztowanie do wzrostu komórek. Struktura ta może być potencjalnie zastosowana w regeneracji tkanek kostnych, co potwierdza adhezja ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hMCS). Komórki te, hodowane na podłożu filmu z IPJ-R5 rozmnażały się oraz różnicowały w kierunku komórek kościotwórczych [22]. Obecność komponentu krzemionkowego w filmach wpływała na ekspresję genów związanych z osteogenezą. W komórkach rosnących na filmach pokrytych krzemionką zaobserwowano wzrost ekspresji genów markerowych komórek kościotwórczych o prawie 5% w porównaniu z komórkami hodowanymi na jedwabnych filmach pozbawionych komponentu krzemionkowego [21]. Kolejny przykład to połączenie IPJ z C-końcową domeną białka dentyny I (CDMP1) [11]. Domena ta jest odpowiedzialna za wiązanie jonów wapnia. Białko fuzyjne wykazywało zdolność do samoistnej agregacji i tworzenia filmu, który po inkubacji z metanolem miał dużą zawartość struktury β -kardki. Dodana domena dentyny zapewniała białku zdolność wiązania i gromadzenia cząsteczek hydroksyapatytu. Filmy uzyskane z tego białka podlegały mineralizacji podczas inkubacji z roztworami imitującymi płyny organizmu ludzkiego [11].

HYDROŻELE

Hydrożele to trójwymiarowe sieci polimerowe mogące chłonać wodne roztwory bez rozpuszczania się w nich. Żel powstaje z roztworu białek jedwabiu, gdy jego stężenie jest dostatecznie duże, aby mogła utworzyć się ciągła sieć polimeru, w której uwięziona zostaje faza ciekła. Żelowanie promowane jest przez niskie pH oraz obecność jonów Ca^{2+} . Warunki te powodują spontaniczne składanie się białek jedwabiu w nanofibryle o średnicy około 3 nm i długości prawie 1 μ m podobne do tych utworzonych przez białka jedwabiu w przewodzie wyprowadzającym gruczołów przednich pająka. Po kilku dniach inkubacji nanofibryle asocjują w sieć tworząc hydrożel [14]. Tak powstałe hydrożele są lepkimi elastycznymi materiałami o dużej kruchości. Dotychczas większość badań nad konstrukcją i zastosowaniami hydrożeli przeprowadzono z użyciem jedwabiu naturalnego pozyskanego z kokonów jedwabników. Wykorzystywane są one przede wszystkim w inżynierii tkankowej do formowania podłoża do wzrostu komórek. W celu polepszenia ich właściwości stosuje się także mieszanki protein jedwabiu z glikolem bądź żelatyną. Wykazano, iż na hydrożelowych jedwabnych podłożach możliwa jest hodowla i różnicowanie komórek kostnych, które efektywnie regenerują defekty tkanki u zwierząt doświadczalnych [24]. Bada się również ich zastosowanie jako systemy kontrolowanego, powolnego uwalniania substancji aktywnych np. cytokin [42]. Hydrożele powstałe z IPJ będącego 16-merem sekwencji opartej na ADF-4 zbudowane były z nanofibryli o średnicy około 3 nm i długości nie więcej niż 1 μ m. Nanofibryle o podobnej długości tworzyły wewnątrz hydrożelu półelastyczną sieć. Formy te makroskopowo były przezroczyste, kleiste oraz lepko



sprężyste, podobnie jak hydrożele uzyskane z jedwabiu naturalnego. Ze względu na swoją elastyczność oraz dużą stabilność pozwalającą na przechowywanie przez kilka tygodni, w przyszłości hydrożele z rekombinowanego jedwabiu mogą być wykorzystane jako dępot, czyli systemy powolnego uwalniania leku lub podłoże do przestrzennej hodowli komórek [31].

RUSZTOWANIA

Jeśli do roztworu białek jedwabiu doda się substancję będącą porogensem, w wyniku odparowania rozpuszczalnika powstaną porowate rusztowania. Substancjami powodującymi powstanie porów może być np. chlorek sodu lub glukoza [25]. Stężenie i rodzaj porogenu warunkuje rozmiar porów, który może wynosić 100–1100 μm . Stanowią one doskonałe rusztowanie do adhezji i wzrostu, różnicowania się komórek, tworzenia połączeń między nimi, a w konsekwencji budowy tkanki. Przestrzenna hodowla komórek zapewnia również idealne warunki przepływu substancji odżywczych oraz usuwania produktów przemiany materii [15]. Obecnie porowate rusztowania do trójwymiarowej hodowli komórek z powodzeniem uzyskuje się z jedwabiu naturalnego pochodzącego od jedwabników [42]. Podjęte zostały również próby produkcji tych struktur z jedwabiu pozyskanego z otoczek jaj pajęczych, czyli naturalnego jedwabiu pajęczego. Rusztowania zbudowane z tego materiału, podobnie jak te z jedwabiu jedwabników podtrzymywały wzrost chondrocytów i produkcję chrząstki stawowej [6]. Niedostateczna ilość materiału stanowi jednak poważne ograniczenie tej metody. Istnieją również doniesienia o zakończonym sukcesem wytworzeniu trójwymiarowych rusztowań z IPJ opartego na sekwencji MaSp1 pająka z gatunku *Nephila clavipes*. Porowate struktury uzyskano przez dodanie do roztworu IPJ kryształków NaCl o średnicach 50–100 i 200–400 μm . Po odparowaniu rozpuszczalnika i potraktowaniu etanolem otrzymano jedwabne rusztowania w postaci dysków o wymiarach 10 mm na 1 mm, w których wielkość porów odpowiadała wielkości dodanych zastosowanych kryształków chloru sodu. Rusztowania te wspomagały adhezję i wzrost fibroblastów 3T3 [1].

MIKROKAPSUŁKI

Kolejnym wykorzystaniem właściwości jedwabiu pajęczego jest tworzenie mikrokapsulek. System taki może dostarczać substancje aktywne przez zamknięcie w bańce polimeru leków, czynników diagnostycznych czy np. substancji odpowiadających za smak. Mikrokapsułkowanie zapewnia przede wszystkim kontrolę nad wchłanianiem i uwalnianiem składników aktywnych, obniża ich immunogenność, a także chroni je przed zbyt wczesną degradacją, np. przez enzymy trawienne. Mikrokapsułki z IPJ bazującego na sekwencji spidroiny ADF-4 otrzymano poprzez kontrolowane spontaniczne składanie polimeru na styku fazy olej-woda [10]. Białka jedwabiu adsorbowały się na granicy faz formując film i natychmiastowo zmieniając swoją konformację na strukturę β -karkty. Kropelki fazy wodnej, które przechodziły przez granicę faz były otaczane przez film i w ten sposób kapsułkowane płaszczem polimeru. Struktury te to cienkie powłoki polimeru o grubości ściany 3–80 nm i średnicy 1–30 μm . Ich rozmiar zależał od wielkości kropelek emulsji powstałej podczas emulsyfikacji

[10]. W płaszczu polimerowym występują otwory, które stanowią wybiórczy filtr umożliwiający kontrolę procesu dyfuzji. W kapsułce zamknięte mogą być związki o dużej masie cząsteczkowej, podczas gdy mniejsze cząsteczki mogą swobodnie dyfundować. Zmierzony eksperymentalnie średni punkt odcięcia dla cząsteczek mogących przechodzić przez powłokę mikrokapsułki to 27 kDa. Wielkość ta świadczy o dobrej ochronie zawartości kapsułki przed układem immunologicznym, stanowi też dobry system kontrolowanego transportowania i uwalniania enzymów oraz innych bioaktywnych makrocząsteczek [9]. Nano- i mikrokapsułki mogą być zniszczone, a ich składniki uwolnione *in vivo* chemicznie, fizycznie (np. przez siły rozrywające) lub biologicznie (przez trawienie proteolityczne). Istnieje wiele możliwych zastosowań przedstawionych torebek/balonów z pajęczego jedwabiu, poczynając od żywności, do zastosowań kosmetycznych i farmaceutycznych. W zastosowaniach farmaceutycznych bariera dyfuzyjna otoczki białkowej pozwala na powolny (kontrolowany) proces uwalniania zakapsułkowanego materiału. Dalsze zaprojektowanie otoczki białkowej może dać opakowanie o zdefiniowanych parametrach uwalniania, które uwalnia zawartość jedynie po aktywacji z zastosowaniem określonych proteaz lub innych czynników uruchamiających proces uwalniania [33].

MIKRO- I NANOSFERY

Agregacja białek jedwabiu i tworzenie nano- i mikrosfer przebiega spontanicznie, podobnie jak tworzenie nanofibryli. Forma utworzonej struktury zależy przede wszystkim od obecności i stężenia jonów fosforanowych. Niskie stężenie fosforanów promuje tworzenie się nanofibryli, stężenie między 300 a 400 mM promuje stan przejściowy, natomiast pod wpływem wyższego niż 500 mM stężenia fosforanów IPJ eADF4 składają się w struktury sferyczne [38]. Dodanie jonów fosforanowych prowadzi do enukleacji, czyli wyodrębnienia się z roztworu rozproszonych kropelek fazy bogatej w białko. Zagęszczone cząsteczki zaczynają ze sobą oddziaływać, co powoduje przekształcenia konformacyjne. Interakcje te skutkują przekształceniem się kropelek roztworu bogatego w białko w stabilne mikrosfery [18,38]. Jedwabne sfery wykazują niezwykłą odporność chemiczną na czynniki denaturujące, takie jak mocznik czy chlorowodorek guanidyny, co porównywalne jest ze stabilnością chemiczną naturalnych nici pajęczych. Obie struktury zawdzięczają tę właściwość bogatej zawartości regionów β -karkty zbudowanej z motywów polialaninowych [20]. Mikrosfery i nanosfery uzyskać można w bardzo prostym procesie mieszania roztworu białka przy odpowiedniej zawartości jonów fosforanowych. Badano trzy metody mieszania: poprzez dializę, proste mieszanie za pomocą pipety oraz z użyciem pomp zapewniających szybki przepływ i mieszanie o określonej prędkości. Wykazano, iż wraz ze wzrostem intensywności mieszania maleje średnica otrzymywanych sfer. Na rozmiar uzyskiwanych struktur wpływa również stężenie białka jedwabiu: przy większej jego koncentracji otrzymujemy sfery o większej średnicy. Opracowane metody mieszania pozwalają na uzyskanie stabilnych sfer o zróżnicowanych wielkościach. Sfery powstałe podczas dializy mają wielkość 2–1 μm . Mieszanie pipetą formuje sfery o średnicy 350 i 510 nm, odpowiednio przy stężeniu białka jedwabiu 0,5 i 1 mg/ml. Najmniejsze cząsteczki otrzymać można

Tabela 1. Formy morfologiczne (strukturalne) wykonane z rekombinowanego jedwabiu pajęczego i ich potencjalne zastosowania

Forma morfologiczna	Metoda pozyskania	Genetyczne modyfikacje	Potencjalne zastosowanie	Piśmiennictwo
Włókna	wytlaczanie rozpuszczalnika elektroprądzenie mikroprzepływy		tekstyli nici chirurgiczne maty do hodowli komórek	[19,32,45]
Filmy	kontrolowane odparowywanie rozpuszczalnika	RGD peptyd pochodzący z elastyny peptyd pochodzący z silafiny fragment dentyny 1 cysteina	system opóźnionego uwalniania leków matryce do wzrostu i różnicowania się komórek opatrunki biosensory np. wykrywające poziom glukozy	[3,4,11,12,22,35, 40,44]
Hydrożele	żelowanie roztworu białek jedwabiu w niskim pH		kontrolowane uwalnianie leków opatrunki podłoże do hodowli osteoblastów, tkanki łącznej	[5,24,31]
Rusztowania	dehydratacja żeli metanolem dodatek porogénów (NaCl, glukoza) porowanie gazem liofilizacja		system opóźnionego uwalniania leków trójwymiarowe rusztowanie do hodowli komórek, regeneracja tkanki kostnej, tkanki chrzęstnej, skóry właściwej i naskórka opatrunki	[1,6,25]
Mikrokapsułki	powstawanie polimeru na powierzchni styku faz olej/woda		system dostarczania i kontrolowanego uwalniania wielkocząsteczkowych kosmetyków, substancji odżywczych, leków, odczynników, znaczników fluorescencyjnych	[9,10,34]
Mikro- i nanosfery	mieszanie w obecności jonów fosforanowych		system dostarczania i kontrolowanego uwalniania niskocząsteczkowych leków, kosmetyków, substancji odżywczych	[17,38,39]
Kompleksy	mieszanie z plazmidowym DNA	RGD peptyd polilizynowy peptyd destabilizujący błony	transfekcja komórek	[26,28,29]

Przedstawione metody pozyskiwania oraz potencjalne zastosowania biomateriałów bazują na danych dotyczących zarówno jedwabiu pajęczego, jak i jedwabiu naturalnego pochodzącego od jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*).

dzięki zautomatyzowanej metodzie mieszania pozwalającej osiągnąć prędkość przepływu 50 ml/min. Średnia wielkość średnicy sfer otrzymanych w ten sposób wynosi 250 nm dla białka o stężeniu 0,5 mg/ml i 320 nm dla białka o stężeniu 1 mg/ml [17].

Mikro- i nanosfery jako system dostarczania substancji czynnych umożliwiają precyzyjną przestrzenną oraz czasową kontrolę uwalniania leku, zapewniając pożądany efekt terapeutyczny. Sfery używane jako rezerwuar substancji aktywnej powinny być zdolne do przenoszenia leku bez zmiany jego aktywności, powinny mieć także zdolność uwalniania leku oraz nie wykazywać toksyczności i immunogenności [43]. Szczegółowa analiza procesu ładowania 12 przykładowych leków do mikrosfer wykazała, iż cząsteczki te wnikają do wnętrza sfery według następującego mechanizmu. Cząsteczki leku są przyciągane do powierzchni

jedwabnej sfery przez siły elektrostatyczne. Następnie, po wysyceniu powierzchni sfery, niskocząsteczkowe leki wnikają do wnętrza sfery. We wnętrzu cząsteczki leku wiążą się z biopolimerem przez oddziaływania hydrofobowe bądź elektrostatyczne. Uwalnianie leków z powierzchni zachodzi spontanicznie wraz z upływem czasu. Szybsze uwalnianie może być indukowane obniżeniem poziomu pH [39]. Co najważniejsze, substancja aktywna nie upośledza składowania cząstek jedwabiu, białko natomiast nie zaburza aktywności dostarczanego leku [27]. Ponadto uzyskany w ten sposób system dępot jest całkowicie biodegradowalny. Proteazy serynowe, obecne w organizmie mają zdolność do całkowitej degradacji jedwabnej sfery, a co ważniejsze degradacja proteolityczna odbywa się powoli, bez zaburzania wewnętrznej struktury sfery. Badania wykazały, że inkubacja sfer niosących lek z proteazami serynowymi powoduje stopniowy i powolny proces uwalniania leku w ciągu



7 dni [16]. Inne badania donoszą, iż wyprodukowane inżynierowane białko bazujące na sekwencji spidroiny ADF-4 użyte zostało do stworzenia modelowego systemu dostarczania leku o właściwościach hydrofobowych. Betakaroten, będący substancją słabo rozpuszczalną w wodzie, zyskuje możliwość rozproszenia się w roztworze wodnym dzięki uwięzieniu go w strukturze jedwabiu. Uwolnienie takiego składnika może się odbywać poprzez proteolityczny rozkład sfery przez enzymy obecne w komórkach lub w surowicy. System ten może być wykorzystany do dostarczania substancji nierozpuszczalnych w wodzie w farmacji, czy też w kosmetyce i odżywianiu [20].

KOMPLEKSY BIAŁKA JEDWABIU-DNA

Nośnik DNA do transfekcji komórek to kolejne zastosowanie nadzwyczajnego biomateriału jakim jest jedwab pajęczy. Wykazano, iż białko fuzyjne składające się z części opartej na sekwencji IPJ, łańcucha polilizynowego oraz powtórzonych motywów RGD po zmieszaniu z plazmidowym DNA tworzy stabilne kompleksy [26]. Białka fuzyjne zachowywały właściwości samoskładania w roztworze charakterystyczne dla IPJ oraz wiązały plazmidowy DNA w wyniku oddziaływań jonowych. Najbardziej trwale okazały się kompleksy, w których stosunek liczby aminokwasów w białkowej części kompleksu do liczby reszt fosforanowych w DNA wynosił 2. Kompleksy te wykorzystano jako efektywny czynnik transfekcyjny komórek zawierających integryny wiążące peptyd RGD. Domena RGD warunkowała proces transfekcji. Kompleksy bez motywu RGD nie wprowadzały DNA do komórek, a im więcej domen RGD, tym wyższy był stopień transfekcji [26]. Analogicznie zastosowano IPJ połączone z oddziałującą z DNA domeną polilizynową oraz domeną destabilizującą błony [28]. Fuzja prowadziła do ułatwienia penetracji kompleksu jedwabiu z DNA do wnętrza komórki. Uzyskane kompleksy zapobiegały enzymatycznej degradacji DNA przez DNazę, a stopień uwalniania DNA z kompleksu poprzez enzymatyczną degradację białkowego komponentu był regulowany zawartością struktur β -kartki. W przypadku fuzyjnego IPJ i dimerycznej domeny destabilizującej

błonę uzyskano dużą wydajność transfekcji, porównywalną ze standardowo stosowanym czynnikiem transfekcyjnym Lipofektaminą 2000 [28].

PODSUMOWANIE

Biokompatybilność, biodegradowalność oraz zdolność samoskładania białek jedwabiu czyni z nich podstawę do wytwarzania biomateriałów o korzystnych z punktu widzenia medycyny właściwościach, a ostatnie osiągnięcia w dziedzinie optymalizacji metod produkcji i oczyszczania sztucznych spidroin stwarzają realne możliwości wprowadzenia jedwabnych biomateriałów na rynek. Polimery uzyskiwane z IPJ można formować w zależności od zastosowanych warunków w struktury nici (włókien), filmów, hydrożeli, rusztowań, mikrokapsulek, mikro- i nanosfer oraz kompleksów jedwab/DNA. Ponadto strategia białek hybrydowych umożliwia nadanie funkcji biomateriałom. Można zbudować materiał spełniający określoną rolę nadaną mu poprzez dołączoną metodami inżynierii genetycznej domenę funkcyjną. W zależności od formy morfologicznej oraz zastosowanej modyfikacji jedwabne biopolimery mogą mieć wiele zastosowań (tabela 1). Potencjał biomateriałów uzyskanych z IPJ może zostać wykorzystany w medycynie regeneracyjnej, np. rusztowanie do odbudowy tkanki. Hydrożele oraz filmy znaleźć mogą zastosowanie w produkcji opatrunków oraz projektowaniu systemów kontrolowanego, opóźnionego uwalniania leku. Podobnie mikrosfery i kapsułki poddane stosownym modyfikacjom mogą łączyć cechy systemu *dépot* oraz celowanego dostarczania leków do wybranych komórek organizmu. Biomateriały oparte na inżynierowanym jedwabiu pajęczym stwarzają ogromne możliwości zachęcające do dalszych badań nad eksploatacją ich możliwych zastosowań *in vivo*.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują prof. Davidowi Kaplanowi, Department of Biomedical Engineering, Department of Chemical and Biological Engineering Tufts University, Medford, USA za udostępnienie obrazu SEM.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Agapov I.I., Pustovalova O.L., Moiseovich M.M., Bogush V.G., Sokolova O.S., Sevastyanov V.I., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P.: Three-dimensional scaffold made from recombinant spider silk protein for tissue engineering. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2009; 426: 127–130
- [2] Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D.L.: Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 2003; 24: 401–416
- [3] Baoyong L., Jian Z., Denglong C., Min L.: Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns*, 2010; 36: 891–896
- [4] Bini E., Foo C.W., Huang J., Karageorgiou V., Kitchel B., Kaplan D.L.: RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules*, 2006; 7: 3139–3145
- [5] Fang J.Y., Chen J.P., Leu Y.L., Wang H.Y.: Characterization and evaluation of silk protein hydrogels for drug delivery. *Chem. Pharm. Bull.*, 2006; 54: 156–162
- [6] Gellynck K., Verdonk P., Almqvist K.F., Van Nimmen E., Gheysens T., Mertens J., Van Langenhove L.: Chondrocyte growth in porous spider silk 3D-scaffolds. *Eur. Cells Materials*, 2005; 10 (Suppl.2): 45
- [7] Hagn F., Eisoldt L., Hardy J.G., Vendrely C., Coles M., Scheibel T., Kessler H.: A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature*, 2010; 465: 239–242
- [8] Heim M., Keerl D., Scheibel T.: Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009; 48: 3584–3596
- [9] Hermanson K.D., Harasim M.B., Scheibel T., Bausch A.R.: Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007; 9: 6442–6446
- [10] Hermanson K.D., Huemmerich D., Scheibel T., Bausch A.R.: Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Adv. Materials*, 2007; 19: 1810–1815
- [11] Huang J., Wong C., George A., Kaplan D.L.: The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials*, 2007; 28: 2358–2367
- [12] Huemmerich D., Slotta U., Scheibel T.: Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Appl. Phys. A*, 2006; 82: 219–222
- [13] Humenik M., Smith A.M., Scheibel T.: Recombinant spider silks-biopolymers with potential for future applications. *Polymers*, 2011; 3: 640–661
- [14] Kim U.J., Park J., Li C., Jin H.J., Valluzzi R., Kaplan D.L.: Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, 2004; 5: 786–792
- [15] Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G., Kaplan D.L.: Spider silks and their applications. *Trends Biotechnol.*, 2008; 26: 244–251

- [16] Lammel A., Schwab M., Hofer M., Winter G., Scheibel T.: Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 2011; 32: 2233–2240
- [17] Lammel A., Schwab M., Slotta U., Winter G., Scheibel T.: Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem*, 2008; 1: 413–416
- [18] Lammel A.S., Hu X., Park S.H., Kaplan D.L., Scheibel T.R.: Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials*, 2010; 31: 4583–4591
- [19] Lazaris A., Arcidiacono S., Huang Y., Zhou J.F., Duguay F., Chretien N., Welsh E.A., Soares J.W., Karatzas C.N.: Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*, 2002; 295: 472–476
- [20] Liebmann B., Hümmerrich D., Scheibel T., Fehr M.: Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein. *Colloids Surfaces A*, 2008; 331: 126–132
- [21] Metwalli E., Slotta U., Darko C., Roth S.V., Scheibel T., Papadakis C.M.: Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post treatment. *Appl. Phys. A*, 2007; 89: 655–661
- [22] Mieszawska A.J., Nadkarni L.D., Perry C.C., Kaplan D.L.: Nanoscale control of silica particle formation via silk-silica fusion proteins for bone regeneration. *Chem. Mater.*, 2010; 22: 5780–5785
- [23] Morgan A.W., Roskov K.E., Lin-Gibson S., Kaplan D.L., Becker M.L., Simon C.G.Jr.: Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 2008; 29: 2556–2563
- [24] Motta A., Migliaresi C., Faccioni F., Torricelli P., Fini M., Giardino R.: Fibroin hydrogels for biomedical applications: preparation, characterization and *in vitro* cell culture studies. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2004; 15: 851–864
- [25] Nazarov R., Jin H.J., Kaplan D.L.: Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*, 2004; 5: 718–726
- [26] Numata K., Hamasaki J., Subramanian B., Kaplan D.L.: Gene delivery mediated by recombinant silk proteins containing cationic and cell binding motifs. *J. Control. Release*, 2010; 146: 136–143
- [27] Numata K., Kaplan D.L.: Silk-based delivery systems of bioactive molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2010; 62: 1497–1508
- [28] Numata K., Kaplan D.L.: Silk-based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides. *Biomacromolecules*, 2010 (w druku)
- [29] Numata K., Subramanian B., Currie H.A., Kaplan D.L.: Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials*, 2009; 30: 5775–5784
- [30] Pérez-Rigueiro J., Biancotto L., Corsini P., Marsano E., Elices M., Plaza G.R., Guinea G.V.: Supramolecular organization of regenerated silkworm silk fibers. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2009; 44: 195–202
- [31] Rammensee S., Huemmerich D., Hermanson K.D., Scheibel T., Bausch A.R.: Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Appl. Phys. A*, 2006; 82: 261–264
- [32] Rammensee S., Slotta U., Scheibel T., Bausch A.R.: Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 6590–6595
- [33] Scheibel T.: Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb. Cell Fact.*, 2004; 3: 14
- [34] Scheibel T., Bausch A.R., Huemmerich D., Hermanson K.D.: Sposób otrzymywania nano- i mikrokapsulek z białka pajęczego jedwabiu. Patent PL/EP1757276, 2007
- [35] Scheller J., Henggeler D., Viviani A., Conrad U.: Purification of spider silk-elastin from transgenic plants and application for human chondrocyte proliferation. *Transgenic Res.*, 2004; 13: 51–57
- [36] Seidel A., Liivak O., Calve S., Adaska J., Ji G., Yang Z., Grubb D., Zax D.B., Jelinski L.W.: Regenerated spider silk: processing, properties, and structure. *Macromolecules*, 2000; 33: 775–780
- [37] Slotta U., Tammer M., Kremer F., Koelsch P., Scheibel T.: Structural analysis of spider silk films. *Supramolecular Chemistry*, 2006; 18: 465–471
- [38] Slotta U.K., Rammensee S., Gorb S., Scheibel T.: An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008; 47: 4592–4594
- [39] Spiess K., Lammel A., Scheibel T.: Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol. Biosci.*, 2010; 10: 998–1007
- [40] Spiess K., Wohlrab S., Scheibel T.: Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter*, 2010; 6: 4168–4174
- [41] Vendrely C., Scheibel T.: Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol. Biosci.*, 2007; 7: 401–409
- [42] Vepari C., Kaplan D.L.: Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.*, 2007; 32: 991–1007
- [43] Wang X., Yucel T., Lu Q., Hu X., Kaplan D.L.: Silk nanospheres and microspheres from silk/pva blend films for drug delivery. *Biomaterials*, 2010; 31: 1025–1035
- [44] Widhe M., Bysell H., Nystedt S., Schenning I., Malmsten M., Johansson J., Rising A., Hedhammar M.: Recombinant spider silk as matrices for cell culture. *Biomaterials*, 2010; 31: 9575–9585
- [45] Xia X.X., Qian Z.G., Ki C.S., Park Y.H., Kaplan D.L., Lee S.Y.: Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 14059–14063

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.

