Наноматериалы на основе биополимеров

МФК-2020

Лекция 6.

**Природные наносистемы на основе белковых волокон**

В природе встречаются материалы, сделанные на основе белковых волокон. Примерами могут служить паутинный шелк, сухожилия и мышцы животных и др. Каждый материал несет определенную функциональную нагрузку, поэтому и компоненты этих систем, и тонкое их строение значительно различаются. Однако все эти материалы сходны вот чем: это макроскопические материалы, построенные из строительных блоков (молекул фибриллярных белков) нанометрового размера; практически все они относятся к гибридным материалам, в состав которых входят белковые и небелковые компоненты; кроме того, организация строительных блоков в этих материалах регулярная и подчиняется строгой иерархии на разных размерных уровнях. Благодаря такой иерархии, во-первых, подобные материалы и обладают уникальным комплексом свойств, позволяющих им выполнять биологическую функцию. Во-вторых, это сложное строение затрудняет производство синтетических или искусственных материалов, имитирующих природные системы. Сегодняшнее занятие посвящено обзору таких природных систем с фокусом на особую роль, которую в них играют белки, а также попыткам создания и использования материалов-миметиков.

Классическим примером природного материала на основе разных типов белковых волокон является межклеточный матрикс (слайд 3 и далее). Межклеточный матрикс (МКМ) образован трехмерной сеткой белковых волокон, в которые входят:

- протеогликаны – белки МКМ, модифицированные ковалентно множественными олигосахаридными цепями;

- структурные волокна;

- эластичные волокна.

Олигосахаридные цепи в протеогликанах представлены гликозаминогликанами, несущими множество отрицательно заряженных групп (хондроитинсульфат, гепарансульфат, кератансульфат), они связывают множество молекул воды и образуют гелеобразный матрикс. Белковые волокна играют в нем армирующую роль, от содержания структурных и эластичных волокон в значительной степени зависят механические свойства полученного материала. Структурные волокна в основном образованы белками коллагеном, фибронектином, эластичные волокна – эластином и другими белками. Белки в составе волокон взаимодействуют друг с другом, образуя узлы сетки. Полученная трехмерная структура служит поддержкой для клеток соответствующего типа. Белки типа ламинина играют роль посредников, образуя контакты с разными типами волокон и белков клеточной адгезии, прикрепляя клетки к элементам МКМ. Таким образом построены практически все мягкие (неминерализованные) ткани животных. Такая же структура составляет основу минерализованных тканей, примеры которых были рассмотрены в прошлой лекции.

Механические свойства белкового волокна и его функциональная роль (структурное/эластичное) определяется несколькими факторами. Прежде всего они завися от аминокислотного состава белковой цепи. Показано, что количественное соотношение двух типов аминокислот, пролина и глицина, оказывает большое влияние на механические свойства белкового волокна. Остатки глицина G придают полипептидной цепи большую конформационную подвижность, а пролина Р – большую жесткость. От конформационных свойств цепи зависят и свойства волокна. Так, диаграмма на слайде 4 иллюстрирует, что белки с высоким соотношением G/P образуют волокна с высокой эластичностью (эластин, резилин, биссус), а с низким соотношением G/P – с вболее ысокой жесткостью (например, волокна амилоидного типа).

Другим фактором, влияющим на эластические свойства белкового волокна, является вторичная структура, характерная для белковой молекулы. На слайде 5 приведены примеры вторичной структуры, входящей в состав белков, образующих разные типы природных волокон. Обратите внимание, что такие белки, как правило, содержат в своей аминокислотной последовательности повторяющиеся фрагменты небольшой длины (слайд 6). На уровне третичной структуры многие волокнообразующие белки построены из повторяющихся трехмерных модулей – доменов (слайд 7).

На слайдах 8-9 показана организация волокон на основе коллагена, основного белка, образующего структурные волокна МКМ. Аминокислотная последовательность цепи коллагена включает большое количество остатков пролина или гидроксипролина, что придает цепи конформационную жесткость. Поэтому полипептидная цепь коллагена образует особую трехмерную укладку, называемую полипролиновой спиралью. Три молекулы коллагена образуют т.н. тропоколлаген; множество тропоколлагеновых единиц затем укладываются особым образом в фибриллы и далее в волокна. Благодаря ОН-группам модифицированного пролина цепи коллагена могут взаимодействовать за счет водородных (нековалентных) связей; каждая такая связь непрочная, но их образуется множество, и в сумме они дают значительный вклад в стабилизацию межмолекулярных связей в волокне коллагена. В межмолекулярные взаимодействия в волокне коллагена также вовлечено множество молекул воды. Нековалентный характер межмолекулярных связей обусловливает значительные эластичные свойства волокна коллагена – оно способно растягиваться на 10% от исходной длины. Волокна коллагена далее могут образовывать более сложные материалы, например, слои - различные типы материалов характерны для различных типов коллагена.

Другой пример образования волокна МКМ показан на слайде 10. Белок тропоэластин экспрессируется, например, в фибробластах и после секреции в межклеточное пространство ассоциирует с такими же молекулами и взаимодействует с фибриллярной матрицей, также построенной из белковых единиц (белок фибриллин). В результате образуется волокно эластина. В оде созревания волокна остатки лизина в молекулах тропоэластина модифицируются специальными ферментами, в результате чего образуются особые ковалентные сшивки между молекулами белка. Сшивки эти с участием окисленных остатков лизина из 4-х цепей (слайд 11) оставляют молекулам большую свободу при механическом растяжении, что является одним из важных факторов, обуславливающих эластичность эластинового и коллагенового волокон. Кроме того, сшивки обеспечивают эластиновому волокну нерастворимость и устойчивость к протеолитической деградации. Более подробно про факторы, придающие волокнам эластичность, будет рассказано ниже.

Иерархическая организация волокон на основе кератинов показана на слайдах 12-13. Кератины – это множество различных структурных белков, объединяемых в две большие группы в соответствии с их вторичной структурой (α- или β-кератины). Мех, шерсть, волосы, рога, копыта и ногти животных, панцири и чешуи рептилий, клювы и перья птиц и многие другие природные материалы построены из волокон на основе кератинов. В случае α-кератинов две α-спиральные полипептидные цепи образуют суперспиральную димерную структуру, которая стабилизируется в числе прочих факторов ионным взаимодействием между разноименно заряженными остатками в этих мономерах (слайд 12, слева). Далее димеры иерархически объединяются в тетрамеры, протофиламенты и более сложные структуры (слайд 13). Особенностью кератиновых волокон являются ковалентные межмолекулярные сшивки между SH-группами остатков цистеина, которые, в отличие от эластиновых волокон, придают кератиновым волокнам жесткость и снижают их эластичность. Кроме волокон, известны и другие иерархически построенные наносистемы на основе α-кератинов, к числу которых относится ядерная оболочка – ламина (слайд 14). Дефекты в строении ламинов, белков семейства α-кератинов, образующих ядерную оболочку, может приводить к невозможности их взаимодействия с модифицированными гистонами в составе хроматина, к нарушению пространственной архитектуры ядра и как следствие к нарушению временнОго расписания экспрессии генов. В частности, это может приводить к прогерии - преждевременному старению.

Иерархическое объединение протофиламентов α-кератинов в фибриллы совместно с другими компонентами приводит к образованию более сложного волокна, в частности, волоса человека или меха животных (слайды 15-16).

На слайдах 17-22 показаны схемы и микрофотографии, иллюстрирующие иерархическую организацию молекул β-кератинов в фибриллы и волокна, составляющие основу пуха и перьев птиц.

К иерархическим наноструктурированным системам на основе белковых волокон относятся и интереснейшие природные материалы, которые получили широкую известность среди технологов, - поверхность листа лотоса и адгезивная система лапок геккона (слайды 23-26). Лист лотоса известен своим несмачиваемым эфектом. Лапки геккона известны своей высокой и контролируемой адгезивностью, причем (в отличие от большинства известных адгезивов) к различным по структуре типам поверхностей. За недостатком времени я не буду здесь про них рассказывать, лишь обращу ваше внимание, что уникальные свойства обоих материалов обусловлены строгой организацией элементов иерархической системы, от белковых мономеров до волокон и их более сложных образований. Подобное строение воспроизведено во многих биомиметиках на основе синтетических материалов.

К β-кератинам относятся и белки, из которых построены уникальные наноструктуры волокна шелка (слайд 27 и далее). Шелк непарного шелкопряда образован в основном белком фиброином, волокно паутинного шелка в основном белком спидроином. Оба типа белков построены по принципу волокнообразующих белков, т.е. содержат в своем составе повторы из коротких аминокислотных последовательностей. Как и для других волокнообразующих белков, для фиброина и спидроина характерно высокое содержание аминокислотных остатков с необъемными, маленькими заместителями – аланина, глицина, серина и т.п. Однако полипептидные цепи этих белков уложены в пространстве специальным образом, благодаря чему природные волокна на основе фиброина и спидроина обладают уникальными механическими свойствами.

Волокно шелка непарных шелкопрядов получают из кокона, которым окукливаются гусеницы, планирующие превращаться в бабочек. Каждый кокон состоит практически из единого волокна, которое, помимо фиброина, содержит и другие компоненты, хотя в значительно меньшем количестве (например, адгезивный белок серицин, слайд 28). В волокне шелка фиброин образует своеобразный нанокомпозитный материал, в котором различные участки полипептидной цепи образуют различные по строению и свойствам фазы. Так назывемые глицин-богатые участки не имеют характерной вторичной структуры и образуют аморфную фазу, которая играет в материале роль адгезивного наполнителя и связующего (слайд 29). Так называемые аланин-богатые повторы образуют уникальные суперпрочные «кристаллиты», трехмерные кусочки, напоминающие многослойные материалы на основе лего-пептидных филаментов (слайд 30). Полипептидная цепь фиброина в данных участках уложена в β-цепи; несколько участков цепи образуют β-складчатый слой; несколько β-складчатых слоев укладываются в плотную многослойную структуру, в которой боковые группы остатков аланина удерживают слои вместе (слайд 31). Такие плотно уложенные структуры могут образоваться только при высоких давлениях, которые получаются на выходе из специальных желез насекомых, продуцирующих шелк. Кристаллиты в готовом материале играют армирующую роль; кроме того, по-видимому, концы отдельных полипептидных цепей также убраны внутрь этих структур, благодаря чему волокно шелка имеет высокую удельную прочность на разрыв.

Родственный фиброину белок спидроин образует похожую по строению наноструктуру волокна паутинного шелка (слайд 32 и далее). Пауки различных видов продуцируют до 10 разных видов паутины для разных функций, из которых наиболее ценится своими механическими свойствами т.н. dragline – нить, на которой паук висит в ожидании добычи (слайд 33). Строение волокна паутинного шелка (слайды 32, 34) аналогично строению волокна шелка шелкопрядов, однако в полипептидной цепи спидроина присутствуют дополнительно третий вид участков, которые образуют менее плотные β-структурированные компоненты материала. Их роль в получающемся волокне до конца не выяснена, но комбинация всех трех типов участков придает волокну паутинного шелка уникальные механические свойства (суммированы на слайде 35 в сравнении с некоторыми видами искусственных и синтетических волокон и материалов), в частности, высокую удельную прочность на разрыв в сочетании с сохранением значительной эластичности. Поскольку, в отличие от гусениц шелкопряда, пауков не удается разводить в неволе, то природный паутинный шелк остается одним из наиболее дорогих и не может найти широкого распространения в производстве наноматериалов. Несмотря на то, что мы много знаем о строении волокон паутинного шелка и природе их уникальных свойств, воспроизвести подобное строение в искусственных или синтетических наноматериалах до сих пор не получается. По-видимому, важным фактором в получении такой системы является комплекс условий, создаваемых в продуцирующей железе, а эти условия до конца не поняты (слайд 37).

Белки паутинного и гусеничного шелка тем не менее широко используются в производстве наноматериалов, в основном в медицинских приложениях. Компания Nexia разработала технологию получения рекомбинантного спидроина в молоке рекомбинантных коз; получаемое из него волокно существенно уступало природному по механическим свойствам, однако на его основе предложено получать многие материалы, например, гели, гидрогели, мембраны, губки для тканевой инженерии, для синтеза небелковых материалов и др., в том числе в сочетании с другими волокнобразующими белками – кератином, коллагеном и т.д. (например, слайды 39-40). Помимо полноразмерных белков, в производстве наноматериалов широко используются так называемые шелкоподобные пептиды (SLP, silk-like peptides) – пептиды, содержащие повторяющуюся единицу последовательности спидроина или фиброина. Для других волокнообразующих белков также широко используются в нанотехнологиях пептиды, имитирующие повторяющиеся участки их последовательности, например, эластиноподобные пептиды (ELP), коллагеноподобные пептиды и др. Если вас заинтересовала эта тема, в интернете можно найти огромное множество обзоров и статей с примерами получения и применения наноматериалов на основе белков шелка и других воокнообразующих белков; пара ссылок на обзоры приведена в презентации.