Наноматериалы на основе биополимеров

МФК-2020

Лекция 7.

**Эластомерные белковые материалы**

Наноматериалы из волокнообразующих белков, разобранные на прошлом занятии, привлекают внимание технологов, в частности, в качестве основы для получения гидрогелей. Гидрогели – это материалы, основу которых составляет нерастворимая в водных растворах трехмерная сетка из поперечно сшитых волокнистых структурных единиц, которая способна к сорбции большого количества воды. Такие материалы очень востребованы при разработке матриц для тканевой инженерии, платформ для доставки in vivo и других материалов биомедицинского назначения. Природные гидрогелевые материалы привлекают внимание тем, что они отличаются высокой биосовместимостью, т.к. имитируют природное окружение клеток в межклеточном матриксе.

Другой важной особенностью природных материалов на основе волокнообразующих белков является их эластичность: они способны выдерживать высокие деформации без разрыва и после окончания нагрузки возвращаться к исходному состоянию. Большинство подобных материалов выдерживают множество циклов повторяющейся нагрузки. В отличие от свойств материалов нерегулярного строения (о которых рассказывалось на первом занятии), эластомерные свойства белковых материалов очень сильно зависят от природы самого белка. Выяснение молекулярных механизмов эластичности природных эластомерных белков необходимо для направленного дизайна материалов-миметиков, как на основе синтетических волокон, так и искусственных материалов с использованием рекомбинантных аналогов природных белков.

Эластомерные белки отличаются характерным аминокислотным составом, вторичной структурой и наличием уникальных межмолекулярных сшивок. Напомним, что в эластомерных белках, как правило, превалируют аминокислотные остатки с небольшими боковыми группами – это, например, Ala, Ser и т.д., но всегда в небольшом количестве присутствуют аминокислотные остатки с полярными и/или заряженными функциональными группами, способными к образованию желаемых межмолекулярных взаимодействий – Asp, Tyr, Lys, оксипролин и т.п. Для обеспечения характерной вторичной структуры также в состав эластомерных белков часто включаются «структурные» аминокислотные остатки – Gly и Pro. (слайды 3-5).

В общем случае причиной эластичности является тот факт, что при деформации белковый материал запасает энергию деформации, а после окончания приложенной нагрузки использует эту энергию для возвращения к исходному состоянию. Рассмотрим более подробно некоторые механизмы эластичности для разных белков.

Большую группу эластомерных белков составляют такие белки, в которых индивидуальные молекулы или их части не имеют упорядоченной структуры. К ним относятся, например, белки эластин и резилин. Эластин – белок животных, основная составляющая упругих стенок крупных артерий, например, аорты. Резилин – белок насекомых, он обеспечивает периодическое сокращение и расслабление мышц, которые отвечают за движение крыльев (слайд 6). Для него характерна высокая, до 95%, упругость в условиях высокой частоты сокращений; резилиновое волокно может удлиняться на 300% от исходной длины (т.е. в 4 раза) без разрыва; модуль упругости составляет около 0,1 – 3 МРа. Полипептидная цепь резилина (слайд 7) включает три функционально важных домена, так называемых экзона: экзон 1 содержит 18 повторов глицин-богатого фрагмента (GGRPSDSYGAPGGGN), экзон 2 отвечает за связывание с хитиновыми структурами, и экзон 3 содержит 11 повторов глицин-богатого фрагмента (GYSGGRPGGQDLG). Глицин-богатые участки молекул в отсутствие нагрузки имеют случайную конформацию, или “random coil”. Аналогичные глицин-богатые регионы имеются и в молекуле эластина. Волокна, образованные эластином или резилином, содержат трехмерную сетку индивидуальных молекул, кросс-сшитых ковалентно специальными связями. При приложении механической нагрузки к материалу участки индивидуальных белковых цепей вытягиваются в протяженную конформацию или укладываются в элементы вторичной структуры, например, β-шпильки в случае резилина (слайды 7-9). При этом энтропия системы снижается. При окончании нагрузки увеличение энтропии является основным фактором, обеспечивающим возвращение в исходное состояние.

Вторым фактором, необходимым для обеспечения эластичности белковых материалов, являются особые ковалентные межмолекулярные сшивки, благодаря которым индивидуальные молекулы белков объединяются в нерастворимую трехмерную сетку - основу природного наноматериала (слайд 10). Эти сшивки необходимы для равномерного перераспределения приоженной нагрузки по материалу; а также они предотвращают расхождение молекул и, как следствие, разрыв материала при нагрузке. В качестве примеров таких сшивок на слайдах 11-12 показаны сшивки с использованием остатков тирозина в резилине и остатков лизина в эластине. Возможности к поперечным сшивкам между молекулами и структурными единицами есть и в других волокнообразующих белках, например, коллагене (слайд 14).

Еще один механизм эластичности, характерный для некоторых белков, например, эластина, основа на определенных элементах вторичной структуры, которые могут образовываться внутри повторяющихся фрагментов полипептидной цепи. У эластина, например, помимо участков цепи, богатых остатками Lys (за их счет осуществляются межмолекулярные сшивки), присутствуют повторяющиеся фрагменты, богатые гидрофобными остатками: VPGVG или VGGVG. Эластин в тканях животных служит более 70 лет, за это время эластиновое волокно претерпевает порядка 1 миллиарда циклов растяжения/релаксации. На основе структурных исследований было показано, что поли(VPGVG) в составе эластина может образовывать так называемую бета-спираль, построенную из бета-поворотов II типа (слайд 15). При нормальных условиях молекула эластина представляет собой не идеализированную бета-спираль, как представляли ранее (на слайде слева), а скорее аморфное волокно (справа снизу на слайде), в котором гидрофобные повторы включают случайный набор конформаций – флуктуирующие бета-повтры, цепи в random coil конформации и т.п. Эта динамическая структура в определенных условиях (например, при повышении температуры) может претерпевать «гидрофобный коллапс», при котором образуется компактное белковое ядро, из белка при этом вытесняется связанная в нем гидратационная вода. Подобный конформационный переход с участием молекул воды вносит вклад в упругость волокна эластина, а также является причиной аномальной температурной зависимости гелеобразующих свойств эластина или эластиноподобных пептидов.

Существует еще один механизм эластичности, уникальный для белков, поскольку он основан на особенностях трехмерной структуры этих биополимеров. Напоминаем, что полипептидная структура белков уложена в пространстве уникальным образом, и эта укладка стабилизирована в водном растворе за счет набора нековалентных взаимодействий в основном электростатической природы. В некоторых случаях третичная структура может обратимо разворачиваться под действием механической нагрузки. Такая обратимая механическая денатурация характерна для нескольких известных укладок, в том числе для иммуноглобулинов, фибронектина и др. Белки, в которых подобный домен (упругий модуль) повторяется множество раз, обладают эластомерными свойствами.

Фибронектин – белок межклеточного матрикса, который на разных стадиях жизни может связываться с разными другими компонентами межклеточного матрикса и с клеточными белками. Его полипептидная цепь включает множество повторов доменов трех типов, из которых упругим модулем является домен FN-III (слайды 16-17). Укладка этого домена представляет собой 7-тяжевый бета-сэндвич. При приложении механической нагрузки водородные связи между бета-тяжами могут разрушаться, в результате чего модули FN-III по очереди денатурируют. Этот процесс обратим, и при отсутствии нагрузки трехмерная укладка доменов восстанавливается. На сайте <https://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/> можно посмотреть фильм, полученный методом молекулярно-динамической симуляции, показывающий постепенное разворачивание фибронектинового домена (ссылка на видео: <https://www.ks.uiuc.edu/Research/fibronectin/movies/stretching-fn1.mpg> ).

Другим типичным упругим модулем является иммуноглобулиновый домен, также уложенный в бета-сэндвич (слайд 18).

Некоторые белки содержат сразу несколько типов упругих модулей. Характерным примером такого модульного белка является титин (слайды 19 и далее), белок мышц, который вносит большой вклад в пассивную упругость мышечных волокон и их релаксацию после сокращения. Титин – гигантский белок, его молекулярная масса достигает 4 МДа, а длина молекулы – 1 мкм. Его полипептидная цепь содержит иммуноглобулиновые и фибронектиновые домены (всего более 300 штук), а также множество повторов глицин-богатых эластичных фрагментов PEVK. При приложении нагрузки эти эластичные элементы работают по очереди (слайды 20-21). Подробнее про растяжение цепи титина можно прочитать на сайте <https://www.ks.uiuc.edu/Research/z1z2/> .

На слайде 21 можно увидеть характерную для модульных эластомерных белков кривую зависимости force-extention: если для обычных материалов нагрузка выше определенного значения приводит к удлинению и затем к разрыву, то для модульных белков эта кривая имеет пилообразный характер, где каждый зубец показывает постепенное разворачивание упругих доменов в составе белка. Количество зубцов на кривой соответствует количеству упругих доменов в полипептидной цепи, а удлинение для каждого зубца соответствует различию в длине свернутого (уложенного) домена и длине развернутого участка цепи.

Таким образом, эластомерные природные материалы на основе волокнообразующих белков показывают несколько типов эластичности, проявляющися на разных уровнях структурной организации. Эти механизмы могут быть использованы в синтетических и искусственных наноматериалах как на основе аналогов природных белков, так и на основе синтетических структурных единиц.