

Received: 2011.02.07
Accepted: 2011.05.11
Published: 2011.06.17

Inżynierowany jedwab pajęczy: inteligentny biomateriał przyszłości. Część I

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

**Anna Florczak^{1,2*}, Konrad Piekoś², Katarzyna Kaźmierska^{1,2},
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

Unikalne właściwości nici pajęczej, takie jak wytrzymałość, rozciągliwość, energia pęknięcia (wiązość), biokompatybilność oraz biodegradowalność spowodowały intensywny rozwój technologii biomateriałów opartych na białkach jedwabiu pajęczego. Postęp badań naukowych był hamowany przez długi czas brakiem metod pozyskiwania odpowiedniej ilości materiału. Przełomem technologicznym było opracowanie strategii biologii molekularnej, które doprowadziło do stworzenia warunków do produkcji inżynierowanych pajęczych białek jedwabiu (IPJ). Strategia ta polega na konstruowaniu sztucznych białek jedwabiu, których sekwencje oparte są na motywach konsensusowych białek naturalnych. Ponadto białka inżynierowane genetycznie, można skonstruować tak, aby nadać im „nowe” funkcje. Strategia białek hybrydowych zakłada, iż IPJ są rdzeniem, nośnikiem, nadającym strukturę, do którego można dołączyć (na poziomie DNA) sekwencję nadającą funkcję np. rozpoznającą receptory komórkowe, enzymy, wiążącą metale, cukry i inne. Obecnie prowadzone są intensywne badania, które z jednej strony skupiają się na ustaleniu szczegółowej budowy i zrozumieniu procesu tworzenia się jedwabnej nici w naturze, a z drugiej strony próbuje się udoskonalić metody produkcji IPJ. Dzięki zdobytej wiedzy i rozwojowi powyższej technologii inżynierowany jedwab stanie się „inteligentnym” biomateriałem przyszłości, a otrzymywany na skalę przemysłową wywoła rewolucję biotechnologiczną.

Słowa kluczowe:

jedwab pajęczy • inżynierowany jedwab pajęczy • białka hybrydowe • produkcja rekombinowanych białek • biomateriał

Summary

The unique properties of spider silk such as strength, extensibility, toughness, biocompatibility and biodegradability are the reasons for the recent development in silk biomaterial technology. For a long time scientific progress was impeded by limited access to spider silk. However, the development of the molecular biology strategy was a breaking point in synthetic spider silk protein design. The sequences of engineered spider silk are based on the consensus motives of the corresponding natural equivalents. Moreover, the engineered silk proteins may be modified in order to gain a new function. The strategy of the hybrid proteins constructed on the DNA level combines the sequence of engineered silk, which is responsible for the biomaterial structure, with the

* Wkład pracy pierwszych trzech autorów był równorzędny.

sequence of polypeptide which allows functionalization of the silk biomaterial. The functional domains may comprise receptor binding sites, enzymes, metal or sugar binding sites and others. Currently, advanced research is being conducted, which on the one hand focuses on establishing the particular silk structure and understanding the process of silk thread formation in nature. On the other hand, there are attempts to improve methods of engineered spider silk protein production. Due to acquired knowledge and recent progress in synthetic protein technology, the engineered silk will turn into intelligent biomaterial of the future, while its industrial production scale will trigger a biotechnological revolution.

Key words: spider silk • engineered spider silk • hybrid proteins • recombinant protein production • biomaterial

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=948960>

Word count: 4305

Tables: 3

Figures: 3

References: 92

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

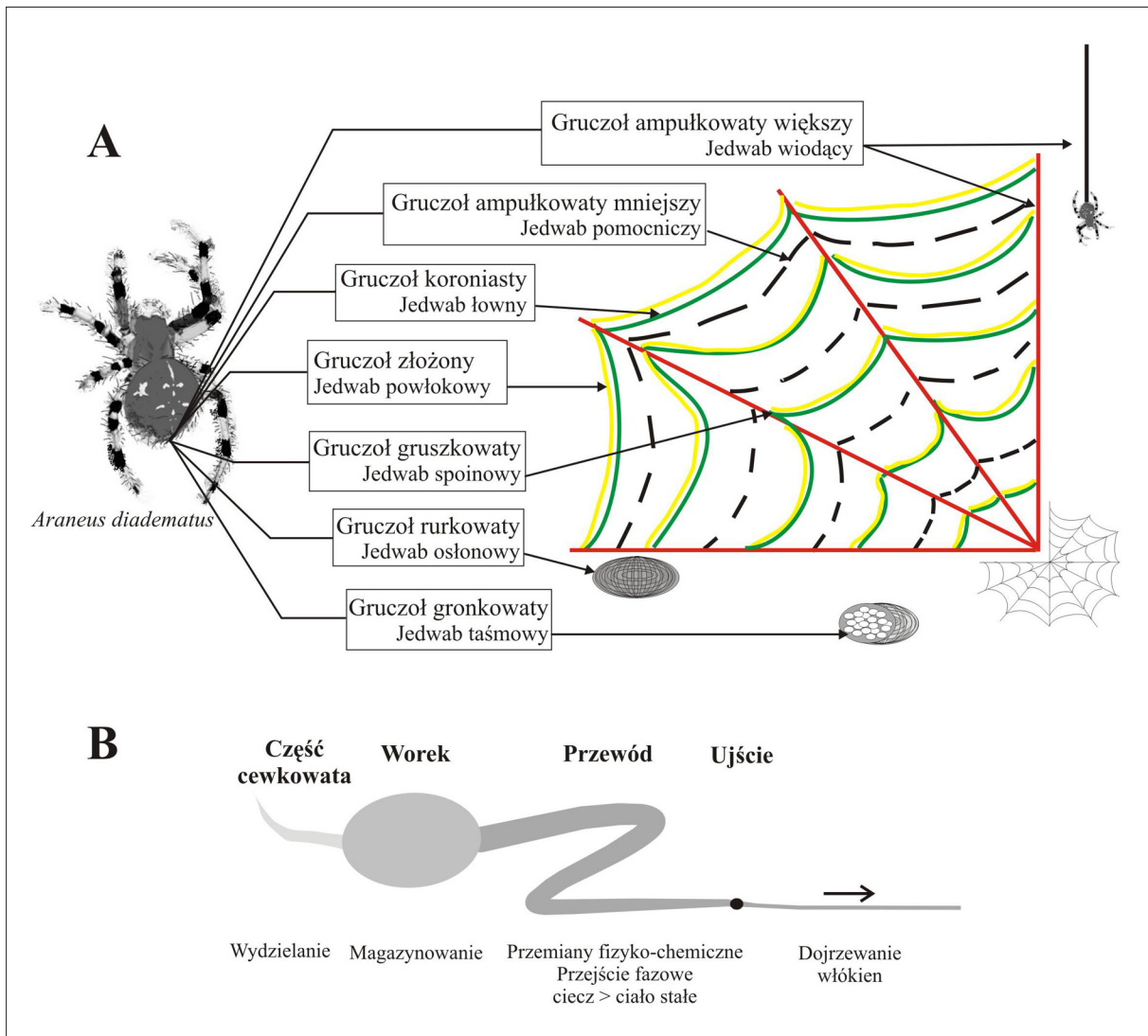
WPROWADZENIE

Pająki pojawiły się na Ziemi około 400 milionów lat temu. Podczas długiej drogi ewolucji stały się producentami substancji o unikalnych właściwościach: jedwabnej nici. Pająki potrafią wytwarzać nawet do siedmiu rodzajów jedwabiu różniących się właściwościami, takimi jak: wytrzymałość, rozciągliwość, czy wiązkość (energia pęknięcia) [29,49]. Sieci pajęczę fascynują ludzkość. Potrafią one nie tylko zatrzymać owada w locie, ale są na tyle mocne by utrzymać ofiarę. Ocenia się, że pajęczą liną o grubości ołówka byłaby w stanie zatrzymać lądujący odrzutowiec wojskowy [41]. Jedwab pajęczy jest wytrzymalszy od stali, a przy tym bardziej rozciągliwy niż nylon [67]. Ponadto jest odporny na rozdarcie, może pochłoniąć ogromną ilość energii i nie pękać. Oprócz znakomych parametrów mechanicznych, jedwab pajęczy ma także inne cenne zalety. Jego budulcem jest białko rozpuszczalne w wodzie, jest wytwarzany w temperaturze otoczenia w roztworach wodnych. Ponadto produkt końcowy, który jest nierozpuszczalny w wodzie, z czasem ulega enzymatycznej biodegradacji.

Unikalne cechy sprawiają, że jedwab pajęczy jest obiektem zainteresowań wielu różnych dziedzin nauki. W przemyśle może posłużyć do produkcji nowych materiałów, które wytrzymałością znacznie przewyższałyby syntetyczne materiały, takie jak nylon czy Kevlar. Białka jedwabiu pajęczego mogą być użyte do produkcji ultralekkiego i nadzwyczaj wytrzymałego włókna, które mogłoby być wykorzystane w produkcji spadochronów, kamizelek kuloodpornych, części samolotów, samochodów, tkanin czy produktów sportowych [78]. Duże możliwości jego zastosowania upatrywane są również w medycynie. Przykładem są bardzo wytrzymałe, nietoksyczne nici chirurgiczne, które nie zużywałyby się mimo częstego rozciągania, byłyby odporne na uderzenia i wysokie ciśnienie, a jednocześnie z czasem ulegałyby degradacji. Możliwe jest również wykorzystanie jedwabiu do produkcji rozciągliwych bandaży czy opatrunków na rany. Ponadto konstruować można implanty, sztuczne więzadła

i ścięgna, trójwymiarowe rusztowania do wzrostu komórek biorących udział w odbudowie włókien nerwowych, kości, chrząstek, mięśni czy skóry [78]. Możliwe jest to dzięki dużej biokompatybilności i długiemu czasowi biodegradacji jedwabiu. Struktury z jedwabiu zawierające białka lub specyficzne czynniki wzrostu komórek, mogą zachowywać się jak matrix zewnątrzkomórkowa i powodować wiązanie, rozprzestrzenianie, proliferację i różnicowanie się komórek. Niedawno opublikowane wyniki prac doświadczalnych wykazały wiązanie, rozprzestrzenianie się, proliferację osteoblastów, komórek podścieliska szpikowego (bone-marrow stromal cells), komórek Schwanna czy fibroblastów [2,10,71,78]. Jako cząsteczki samoorganizujące się, łatwo funkcjonalizowalne i ulegające biodegradacji, białka jedwabiu mogą służyć jako nośnik substancji aktywnych. Obecnie prowadzone są prace nad wykorzystaniem białek jedwabiu pajęczego do produkcji nano- i mikrokapsulek oraz nano- i mikrosfer. Struktury takie mogłyby zawierać nie tylko składniki farmaceutyczne (leki), ale również kosmetyczne i żywnościowe.

Wymienione i inne potencjalne zastosowania jedwabiu pajęczego są obecnie przedmiotem intensywnych badań naukowych. Badania skupiają się nad poznaniem biologii pajaków, rozpracowaniem powstawania różnych jedwabnych struktur, np. pajęczyny, poznaniem nici ją budujących, białek wchodzących w skład włókien, czy procesów zachodzących w gruczołach przędnych. Wiedza ta służy opracowywaniu sekwencji IPJ, a następnie metod ich produkcji i oczyszczania. Analiza procesu przechodzenia białek jedwabiu z roztworu do fazy stałej zachodzącego w gruczole przędnym pajaka przyczynia się do zrozumienia, a zatem kontroli procesów wytwarzania jedwabnych biomateriałów. Naśladując naturę w warunkach sztucznych naukowcy pracują nad kontrolowanym przejściem fazowym IPJ przy jednoczesnym nadawaniu pożądanego kształtu tworzonego biomateriału. Wiadomości dotyczące jedwabnych biomateriałów opisano w dwóch częściach. W prezentowanej pracy (część I) zebrano wiadomości dotyczące biologii wytwarzania pajęczych nici oraz opracowywania



Ryc. 1. (A) Gruczoły przednie pająka, rodzaje i funkcje jedwabiu pajęczego; (B) Budowa gruczołu przedniego. Poszczególne części gruczołu pełnią określoną funkcję. Spidroiny wydzielane są w części cewkowej gruczołu, a magazynowane są w worku gruczołowym. Formowanie włókien zaczyna się w chwili przejścia białka do przewodu, gdzie na skutek zmian fizyko-chemicznych następuje przejście fazowe ciecz/ciało stałe. Ostateczne dojrzewanie włókna odbywa się w chwili wyciągania nici przez ujście znajdujące się na kądziółku przednim

metod produkcji rekombinowanych IPJ. Natomiast zestawienie osiągnięć w dziedzinie wytwarzania jedwabnych biomateriałów przedstawiono w części drugiej.

GRUCZOŁY PRZEDNE, JEDWABNE NICI, ICH FUNKCJE I WŁAŚCIWOŚCI

Pająki wytwarzają kilka rodzajów jedwabnych nici, a każdy z nich jest wytwarzany w odrębnym gruczole przednim [23,31]. Choć liczbę i rodzaj gruczołów zależy od gatunku pająka, wszystkie pająki przędą przynajmniej jeden rodzaj nici. Pająki z rodziny krzyżakowatych wytwarzają 5–7 rodzajów jedwabnej przędzy. Gruczoły przednie znajdują się w brzusznej części odwłoka, a ich ujścia są umiejscowione na końcu odwłoka w tzw. kądziółkach przednich, zwanych inaczej brodawkami przednimi. Największym gruczolem przednim jest gruczoł ampułkowany większy (major ampullate gland), który wytwarza jedwab wodzący (dragline silk). Służy on do budowy szkieletu pajęczyny i nici asekuracyjnej, umożliwiającej pająkowi ucieczkę podczas ataku [49].

Gruczoły ampułkowane mniejsze (minor ampullate gland) odpowiadają z kolei za wytwarzanie jedwabiu pomocniczego, który pająk wykorzystuje do budowy wewnętrznej spirali pajęczyny [79]. Nicią tą jest pozbawiona kleistej wydzieliny i służy pająkowi jako rusztowanie podczas budowy właściwej, lepkiej spirali łownej. Rusztowanie to, po wypełnieniu swojej funkcji, jest zjadane przez „budowniczego”. Gruczoł koroniasty (flagelliform gland) wytwarza jedwab łowny tworzący spiralę łowną, pokrytą lepka wydzielina gruczołu złożonego (aggregate gland), tzw. jedwab powłokowy [27]. Łączenie poszczególnych elementów sieci łownej, a także przytwierdzenie sieci do podłoża odbywa się za pomocą jedwabiu spoinowego wytwarzanego w gruczołach gruszkowatych (pyriform gland). Gruczoły rurkowe (tubuliform gland) oraz gronkowe (aciniform gland) służą do wytwarzania jedwabiu tworzącego kokony chroniące jaja: odpowiednio jedwab osłonowy i taśmowy. Jedwab osłonowy tworzy zewnętrzną powłokę kokonu, a taśmowy wyścieła jego wnętrze. Jedwab taśmowy służy ponadto do owijania

Tabela 1. Rodzaje gruczołów przednich, produkowanych jedwabiu, ich naturalna funkcja oraz charakterystyka białek budujących dane włókna

Gruzoł przedny	Jedwab	Funkcja jedwabiu	Spidroiny	Najczęściej powtórzone motywy aminokwasowe
Ampułkowy większy	wiodący	rusztowanie pajęczyny, nić asekuracyjna	MaSp1, MaSp2	A_n , GGX ^a A_n , GPGXX ^a
Ampułkowy mniejszy	pomocniczy	wzmocnienie sieci, spirala pomocnicza pajęczyny	MiSp1, MiSp2	A_n , (GA) _n , GGX, sekwencja rozdzielająca (137 AA) ^a
Koroniasty	łowny	spirala łowna	Flag	GPGG(X) _n , GGX, sekwencja rozdzielająca (28 AA) ^a
Gruszkowaty	spoinowy	łączenie poszczególnych nici, przytwierdzenie sieci do podłoża	PySp1	AAARAQAQAEARAKAE, AAARAQAQAE, oraz odcinki zbudowane z 78 AA ^b
Złożony	powłokowy	lepka powłoka spirali łownej	SCP-1 ^b , SCP-2 ^b	NZ
Rurkowaty	osłonowy	zewnętrzna powłoka jaj	TuSp1, TuSp2	A_n , S _n , T _n , (SX) _n ^a A_n , S _n , T _n , (SX) _n ^c
Gronkowaty	taśmowy	wewnętrzne wyścielenie jaj, owijanie ofiary	AcSp1	S _n , TGPSG ^d

Motywy aminokwasowe występujące w białkach pochodzących odpowiednio od: ^a – *Nephila clavipes*, ^b – *Latrodectus hesperus*, ^c – *Argiope bruennichi*, ^d – *Argiope trifasciata*, NZ – nie ma zastosowania. Dane opracowano na podstawie [31,57,66,79].

Tabela 2. Zestawienie właściwości mechanicznych wybranych jedwabi pajęczych i innych materiałów

Materiał	Wytrzymałość (napężenie występujące w materiale przed zerwaniem) (GPa)	Rozciągliwość (%)	Wiązkość (energia pochłaniana zanim nastąpi przerwanie ciągłości materiału) (10 ⁴ J/kg)
Jedwab wiodący	4	35	40
Jedwab pomocniczy	1	5	3
Jedwab łowny	1	>200	40
Jedwab osłonowy	1	20	10
Jedwab taśmowy	0,7	80	600 000
Kevlar	4	5	3
Guma	0,001	600	8
Ściągno	0,001	5	0,5

Dane opracowane na podstawie [49].

schwytanych ofiar [49]. Rodzaje gruczołów i wytwarzany przez nie jedwab przedstawiono na ryc. 1A oraz w tabeli 1.

Gruczoły przedne mają różną wielkość i kształt, jednak ich organizacja funkcjonalna opiera się na podobnym schemacie. Najlepiej poznanym gruczołem, ze względu na duży rozmiar jest gruczoł ampułkowy większy (ryc. 1B). Możemy wyróżnić cztery podstawowe elementy jego struktury anatomicznej: (i) część cewkowata gruczołu przedniego, w której odbywa się ekspresja i sekrecja białka, (ii) worek gruczołowy będący miejscem przechowywania roztworu białka, (iii) przewód gruczołu przedniego, w którym dochodzi do przemian fizyko-chemicznych roztworu białkowego oraz (iv) ujście przewodu gruczołu przedniego, przez które włókno opuszcza organizm pająka. Ujścia przybierają kształt rurek lub stożków [57].

WŁAŚCIWOŚCI MECHANICZNE JEDWABNYCH WŁÓKIEN

Poszczególne rodzaje jedwabiu różnią się właściwościami mechanicznymi, co umożliwia wyróżnienie

wśród nich jedwabiu bardzo wytrzymałego na zerwanie, bardzo rozciągliwego lub mającego znamiona obu tych cech w różnym nasileniu. Jedwab taśmowy ma największą wiązkowość (energia pęknięcia) ze wszystkich jedwabiu oraz większości znanych materiałów (tabela 2). Jedwab wiodący cechuje się niezwykłą wytrzymałością podobną do Kevlaru przy jednocześnie znacznie większej rozciągliwości (odpowiednio, jedwab wiodący 35%, Kevlar 5%) [68]. Wprawdzie przy pękaniu pochłania ponad 10 000 razy mniej energii niż jedwab taśmowy, jego wiązkowość (energia pęknięcia) jest nadal 10 razy większa od Kevlaru i ponad 100-krotnie większa od wiązkowości ludzkiego ścięgna. Jedwab pomocniczy jest również bardzo wytrzymały, ale wykazuje małą sprężystość. Nieodwracalnie odkształca się w czasie rozciągania [15]. Jedwab łowny budujący spiralę łowną jest najbardziej sprężysty, powraca do swej pierwotnej długości nawet po trzykrotnym rozciągnięciu. Jest jednak tylko w połowie tak wytrzymały jak jedwab nici wiodącej [27,68,79].

WYTWARZANIE JEDWABIU PAJĘCZEGO

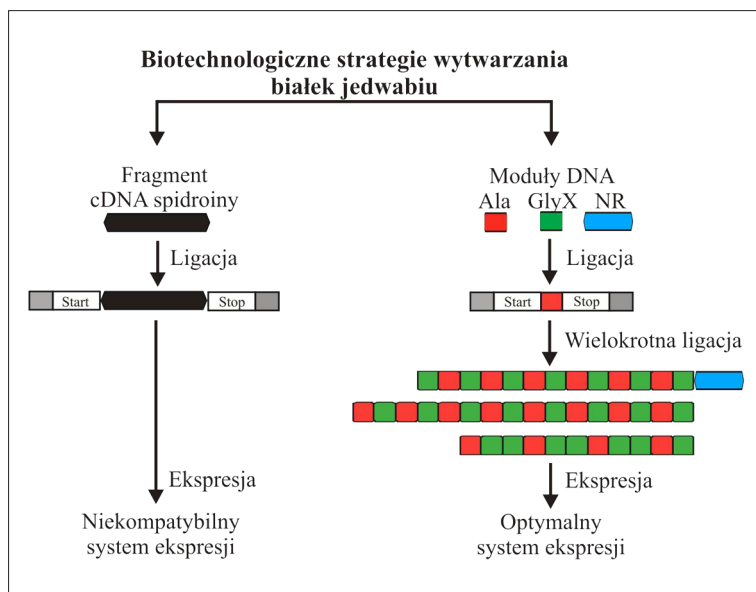
Mechanizm wytwarzania jedwabiu pajęczego jest niezwykły. Pająk w wyniku ewolucji wytworzył maszynę zdolną do wytwarzania różnych pod względem właściwości mechanicznych nici, które są zbudowane prawie wyłącznie z białek (tzw. spidroin). Proces ekspresji i przemian fizycznych białek pajęczych w bardzo krótkim czasie dostarcza odpowiedniej ilości budulca do wytworzenia nici pozwalającej pająkowi np. na ucieczkę. System replikacji i transkrypcji genów jest bardzo sprawny, mimo że geny kodujące spidroiny są bardzo duże, zawierają sekwencje powtarzające się i bogate w cytozyny i guaniny [6]. Nabłonek wnętrza gruczołu ma zdolność powielania całego genomu bez jednoczesnego podziału mitotycznego komórki [24]. Ponadto poszczególne geny mogą występować w wielu kopiach [7,65]. Komórki nabłonkowe gruczołów zawierają bardzo dużą pulę t-RNA glicyny i alaniny ze względu na dominującą zawartość tych aminokwasów w spidroinach [12]. Spidroiny łatwo ulegają samoagregacji, ale mimo to pająkowi udaje się utrzymać je w postaci rozpuszczalnej wewnątrz gruczołu [30] zachowując bardzo duże stężenie białka osiągające 30–50% (w/v) [14]. Proces formowania włókien podlega ścisłej kontroli, umożliwiając niemal nieprzerwany proces przedzenia pajęczej nici [87].

Najlepiej poznano proces powstawania nici wiodącej złocego pająka jedwabnego. Ekspresja i wydzielanie białek budujących włókno odbywa się w części cewkowej gruczołu przedniego, w komórkach walcowatych nabłonka [9]. Spidroiny są wydzielane do worka gruczołowego, gdzie utrzymywane są w postaci roztworu o stężeniu 300–500 g/l. Na tym etapie łańcuchy polipeptydowe układają się w kształt kłębka statystycznego (random-coil) i struktury przypominające helisę poliprolinową typu II [48]. Worek gruczołowy pełni funkcję magazynu białka, a gdy pojawi się zapotrzebowanie na nową nić, część jego zawartości przesuwana jest do krętego przewodu gruczołu przedniego. Podczas przepływu przez przewód roztwór białek pod wpływem sił fizycznych oraz przemian chemicznych zostaje przekształcony w nierozpuszczalne w wodzie włókno o dominującej strukturze drugorzędowej typu pofałdowanej kartki β . Średnica przewodu sukcesywnie zmniejsza się, osiągając minimum na końcu. Malejąca średnica przewodu powoduje, że zwiększa się przepływ wzdłużny przy jednoczesnym zwiększeniu działania sił ścinających. Ponadto, dochodzi do zmiany stężenia niektórych jonów, lekkiego zakwaszenia środowiska (8–6 pH) oraz zagęszczenia roztworu. Stężenie jonów Na^+ w roztworze białka wpuszczonego do przewodu gruczołu wynosi 3,1 mg/g w przeliczeniu na suchą masę (s.m.), natomiast zawartość tych jonów we włóknie opuszczającym przewód gruczołowy osiąga 0,3 mg/g. Stężenie jonów K^+ wzrasta odpowiednio z 0,75 mg/g (s.m.) do 2,9 mg/g, a zawartość jonów fosforanowych wzrasta w przewodzie pięciokrotnie [22]. Wzrost zawartości jonów potasowych i fosforanowych determinuje stan wysolenia, który sprzyja agregacji białek. Dalsze przemiany są związane z obniżeniem pH, co zwiększa udział oddziaływań hydrofobowych [17]. W ostatnim ramieniu przewodu przedniego następuje szybkie usunięcie wody za pośrednictwem konwekcji. Jest to możliwe dzięki komórkom nabłonkowym wyścielającym przewód, które poprzez mikrokosmki znacząco zwiększają powierzchnię kontaktu nabłonka z roztworem białka.

Przemiany biochemiczne i fizyczne determinują przejście białek jedwabiu z fazy ciekłej do stałej, co prowadzi do utworzenia niedojrzałych włókien. Mechanizm przemiany fazowej nie jest do końca poznany. Obecnie uważa się, iż może on przebiegać dwojako. Jedna z teorii zakłada, że roztwór białka zachowuje się jak ciekły kryształ, co może wynikać z jego dużej koncentracji w przewodzie gruczołu przedniego i ruchu wszystkich cząsteczek w jednym kierunku [80]. Według drugiego modelu, białka w roztworze łączą się początkowo tworząc micelle o średnicy 100–200 nm, które grupując się tworzą globule o wielkości kilku mikrometrów. Przepływ wzdłużny i siły ścinające powodują wydłużanie się globuli, co ostatecznie prowadzi do formowania włókien [40]. Niedojrzałe włókno wyciskane jest przez ujście zaopatrzone w zastawkę mięśniową. Zastawka ściśle przylega do wychodzącego włókna, co umożliwia dalsze usuwanie wody oraz regulację średnicy włókna w granicach 0,1–0,8 μm [16,80]. Wychodzące nici dojrzewają poprzez ostateczne odparowanie wody na powietrzu oraz działanie sił, takich jak ciągnięcie i/lub naprężanie. Ma to bardzo duże znaczenie w kształtowaniu właściwości mechanicznych włókien. Pająki regulują to zarówno w sposób bierny jak i czynny. Biernie wykorzystują swoją masę oraz siły grawitacji. Aktywnie używają tylnych odnóży do wyciągania nici regulując przy tym szybkość przedzenia. Najmocniejsze włókna wytwarzane są najwolniej. Innym aktywnym sposobem może być przedzenie mocnego jedwabiu. Pająki stosując technikę pionowego schodzenia po powierzchni, używają sił tarcia w celu pozyskania siły ciągnącej, która jest dwa razy większa od tej uzyskiwanej dzięki swojej masie ciała [63]. Niezależnie od stosowanej techniki ciągnięcia/naprężania właściwości włókien są również zależne od czynników środowiskowych, takich jak: dieta, temperatura, wilgotność [29,51].

SPIDROINY I ICH STRUKTURA ORGANIZACYJNA

W białkach budujących włókna (spidroinach) możemy wyróżnić trzy regiony: (i) niepowtarzająca się domena N-końcowa licząca około 130 aminokwasów, (ii) dominujący fragment zbudowany z motywów powtarzających się oraz (iii) niepowtarzający się koniec C zawierający około 110 aminokwasów [5,25]. Region najdłuższy zbudowany jest z wielu powtórzeń sekwencji peptydowych, które układają się w następujące grupy: (i) $(\text{GPGXX})_n$, $(\text{GPGGX})_n$, (ii) $(\text{GGX})_n$, (iii) łańcuchy alaninowe A_n lub $(\text{GA})_n$ oraz (iv) unikalne sekwencje rozdzielające [68,74]. Sekwencja aminokwasowa jest najważniejsza w kształtowaniu struktury przestrzennej, a tym samym właściwości mechanicznych jedwabiu. Pierwsze dwie grupy sekwencji powtórzonych odpowiadają prawdopodobnie za rozciągliwość jedwabiu, przy czym różnią się przyjmowaną konformacją przestrzenną. Sekwencje $(\text{GPGXX})_n$ i $(\text{GPGGX})_n$ są zaangażowane w tworzenie struktury spirali β -zwrotnej. Występują głównie w białku Flag (flagelliform) budującym najbardziej rozciągliwy z jedwabiu – jedwab łowny. Motywy te obecne są również w białkach tworzących rozciągliwy jedwab wiodący od pająka jedwabnego *Nephila clavipes*, tj. w białku MaSp2 (major ampullate spidroins), są w białkach nici wiodącej wytwarzanej przez pająka krzyżaka ogrodowego *Araneus diadematus* ADF-3 i ADF-4 (araneus diadematus fibroin). Jedwab wiodący nie jest tak rozciągliwy jak jedwab łowny (35% versus >200%), co koreluje z liczbą nieprzerwanych ciągów motywu GPGXX (odpowiednio



Ryc. 2. Biotechnologiczne strategie wytwarzania białek jedwabiu pajęczego. Pierwsza strategia zakłada użycie fragmentów cDNA kodujących naturalne spidroiny. Strategia białek inżynierowanych wykorzystuje moduły DNA powstałe w oparciu o motywy powtarzające się spidroin. Zoptymalizowane do potencjalnego gospodarza pod względem preferencji kodonów moduły klonuje się w różnych kombinacjach, co prowadzi do powstania syntetycznych genów. Moduły DNA: Ala – kodujący polipeptyd alaminowy, GlyX – kodujący polipeptyd bogaty w glicynę, NR – kodujący niepowtarzającą się domenę N- lub C-kończącą spidroin

najwyżej 9 razy powtórzony *versus* przynajmniej 43 razy) [68]. Bogata w glicynę sekwencja $(GGX)_n$ tworząca potrójną helisę prawdopodobnie warunkuje również rozciągliwość jedwabiu. Jest ona charakterystyczna dla białek jedwabiu pomocniczego MiSp (*minor ampullate spidroins*), a także występuje w białkach MaSp1, ADF3 i Flag. Powtórzone motywy alaninowe i $(GA)_n$ przyjmujące konformację β -kardki zapewniają wytrzymałość jedwabiu. Są one dominującymi sekwencjami w białkach bardzo wytrzymałego jedwabiu wodącego i pomocniczego [66,68]. Nie występują w białku Flag budującym najbardziej rozciągliwą nić. Unikalne sekwencje rozdzielające dzielą motywy powtarzające się na skupiska, a ich wpływ na strukturę białek nie jest znany. Są one charakterystyczne dla białek MiSp1, MiSp2, czy Flag. Niedawno przeprowadzone badania udowodniły, że domeny N- i C-końcowa odgrywają ważną rolę w procesie formowania się włókien. Zapobiegają niepożądanym agregacjom białek w czasie magazynowania, a także promują odpowiednie grupowanie białek wzdłuż osi włókna w trakcie procesu powstawania jedwabnej nici [5,25]. Domena N-końcowa reaguje na zmiany odczynu. W pH panującym w worku gruczołowym (pH powyżej 7) domena ta hamuje agregację promując postać rozpuszczalną białek jedwabiu. Natomiast w pH wynoszącym około 6,3 promuje grupowanie spidroin i formowanie się włókien [5]. Domena znajdująca się na karboksylowym końcu białka również wpływa zarówno na proces przechowywania jak i formowania nici [25]. Warunki panujące w worku gruczołu powodują, że domena C-końcowa stabilizuje rozpuszczalną postać spidroin. Podczas procesu wysalania białka jonami fosforanowymi domena C-końcowa działa wraz z umiejscowionym w jej obrębie mostkiem dwusiarczkowym jako kotwica odpowiedniego pozycjonowania sekwencji powtarzających się między cząsteczkami białka. Domena ta jest niewrażliwa na zmiany pH [25]. W trakcie przemieszczania się białek jedwabiu wzdłuż przewodu gruczołowego następuje zmiana pH i kompozycji soli, co powoduje, że domeny N- i C-końcowe działają jak mediatory przemian prowadzących do zbliżania się spidroin. Następnie przepływ wzdłużny i siły ścinające indukują tworzenie struktur pofałdowanej

kardki β , co ostatecznie skutkuje tworzeniem się włókien [66]. Zestawienie domen wraz z ich miejscami występowania przedstawiono w tabeli 1.

BIOTECHNOLOGICZNE STRATEGIE WYTWARZANIA BIAŁEK JEDWABIU PAJĘCZEGO

Próby uzyskania naturalnych nici jedwabnych od pajaków na skalę przemysłową okazały się trudne do realizacji. W przeciwieństwie do jedwabników, pajaków nie udaje się hodować, gdyż są kanibalami i pożerają się wzajemnie. Ponadto jednocześnie wytwarzają różne rodzaje jedwabiu [79]. Brak dostępności wystarczającej ilości tego materiału zmusił naukowców do podjęcia prób odtworzenia jedwabnych włókien pajęczych. Badania skupiają się na poznaniu szczegółów budowy i zrozumieniu procesu tworzenia się jedwabnej nici, w celu wytworzenia jej syntetycznego odpowiednika, a także próbuje się udoskonalać metody produkcji i oczyszczania rekombinowanego jedwabiu pajęczego. Stosowane są dwie strategie wytwarzania rekombinowanego jedwabiu (ryc. 2) [78]. Pierwsza wykorzystuje znane fragmenty cDNA kodujące naturalne białka jedwabiu, druga stosuje techniki inżynierii genetycznej. Próbuje się tworzyć syntetyczne geny kodujące inżynierowany pajęczy jedwab (IPJ), których sekwencje są zbliżone do sekwencji białek naturalnych [66].

WYTWARZANIE NATURALNYCH BIAŁEK JEDWABIU PAJĘCZEGO

Do wytwarzania rekombinowanych białek pajęczych są wykorzystywane organizmy prokariotyczne i eukariotyczne. Jako systemy ekspresyjne stosuje się bakterie (np. *Escherichia coli*) [3], drożdże (np. *Pichia pastoris*) [19], komórki owadzie i ssacze [35,46], a także transgeniczne rośliny [69,70,71] i zwierzęta [83]. Powyższe systemy różnią się wydajnością, złożonością procesu technologicznego, stopniem zanieczyszczenia oraz kosztami. Wiele białek eukariotycznych wymaga modyfikacji potranslacyjnych (glikozylacja, fosforylacja), zapewniających prawidłowe fałdowanie i aktywność biologiczną [44]. Może mieć to znaczenie w procesie wytwarzania białek jedwabiu, gdyż

w spidroinach obserwuje się fosforylację reszt tyrozyny i seryny. Wpływ tych modyfikacji na fizyczne właściwości jedwabiu pajęczonego pozostaje jednak niewyjaśniony [55]. Sekwencja nukleotydowa spidroin, ze względu na długość, wielokrotne powtórzenia oraz obecność licznych reszt guaniny i cytozyny, do niedawna była poznana jedynie częściowo. W ostatnim czasie udało się całkowicie zsekwencjonować pierwsze geny kodujące spidroiny. Poznano pełną sekwencję DNA białek MaSp1 i MaSp2 pająka czarna wdowa (*Latrodectus hesperus*) oraz białka Flag złotego pająka jedwabnego (*Nephila clavipes*) [6,26]. Poznane częściowo sekwencje spidroin próbowano wykorzystać do produkcji rekombinowanych białek jedwabiu. Napotkano jednak wiele trudności wynikających z wielkości genów kodujących te białka (do 15000 kpz) oraz powtarzalnych sekwencji. Ponadto, ekspresji rekombinowanych białek jedwabiu towarzyszyła genetyczna niestabilność insertów, będąca wynikiem rekombinacji homologicznej [3,19,20,64]. Możliwe także, że cięcie insertów oraz niski poziom ekspresji wynikały z ograniczonej liczby niektórych tRNA. Komórki wytwarzające spidroiny u pająków, w przeciwieństwie do komórek pochodzących z innych źródeł, mają wyspecjalizowaną pulę tRNA, które biorą udział w translacji sekwencji bogatych w Ala i Gly [12]. Niska ekspresja białka może również wynikać z tego, że sekwencja mRNA spidroin wykazuje tendencję do tworzenia wyższych struktur drugorzędowych, co prawdopodobnie powoduje przerwę w translacji oraz odłączenie od rybosomów [20]. Istotnym problemem jest również tworzenie zagregowanych, nierozpuszczalnych białek oraz trudności uzyskania białek sekrecyjnych. Prowadzi to w trakcie procesu oczyszczania do utraty istotnej ilości wytworzonego białka oraz wymaga stosowania czynników denaturujących. Konieczna jest więc optymalizacja warunków produkcji (np. dostosowanie kodonów [20], modyfikacja składu pożywki [72]) oraz zastosowanie różnych systemów ekspresyjnych.

Pierwsze próby ekspresji naturalnych spidroin złotego pająka jedwabnego *Nephila clavipes* przeprowadzono w systemie *Escherichia coli*. Wykorzystano 1500 oligonukleotydowy fragment sekwencji cDNA C-końca białka MaSp [3]. Proces był mało wydajny prawdopodobnie dlatego, że *Escherichia coli* nie rozpoznaje efektywnie kodonów sekwencji jedwabiu pajęczonego. Zaobserwowano brak ciągłości translacji i związane z tym produkty o mniejszej masie cząsteczkowej. Inne próby prowadzono w bakulowirusowym systemie ekspresyjnym, który ze względu na filogenetyczne pokrewieństwo owadów i pająków, wydawał się najbardziej odpowiedni [35,54]. Podczas wytwarzania cytoplazmatycznego, fragment C-końcowy białka ADF-3 pozostawał w postaci rozpuszczalnej, natomiast region C-końca białka ADF-4 przybierał postać włókien [35]. Przypuszczalnie potranslacyjne modyfikacje zachodzące w warunkach naturalnych w gruczołach pajęczych zwiększają rozpuszczalność tych białek. W związku z tym, że modyfikacje dotyczą głównie białek sekrecyjnych, białko ADF-4 zmodyfikowano tak, aby mogło być wydzielane z komórki. W tym celu do sekwencji cDNA białka ADF-4 dołączono sekwencję sygnałową genu melityny pszczoły miodnej. Wydzielane białka wykazywały lepszą rozpuszczalność, jednak analiza roli potranslacyjnych modyfikacji wymaga dalszych badań [78]. Najbardziej zaawansowana technologia produkcji białek wykorzystuje komórki ssaków. Udana próba ekspresji fragmentów

cDNA kodujących białka MaSp pająków *Nephila clavipes* i *Araneus diadematus* uzyskano w komórkach nabłonkowych bydłych gruczołów piersiowych (MAC-T) oraz komórkach nerkowych chomika (BHK) [46]. Inna strategia obejmuje ekspresję fragmentów spidroin w roślinach czy zwierzętach transgenicznym. Białka jedwabiu o ciężarze cząsteczkowym do 100 kDa otrzymano w transgenicznym tytoniu i ziemniaku [53,70]. Kanadyjscy naukowcy wyprodukowali spidroiny wydzielane do mleka kóz transgenicznych. Wadą tej metody było jednak niewielkie stężenie białek jedwabiu w mleku [83]. Najnowsze doniesienia opisują ekspresję fragmentu białka MaSp1 pająka *Nephila clavipes* w kokonach transgenicznych jedwabników morwowych (*Bombyx mori*) [81]. 1500 nukleotydowy fragment genu MaSp1 będący pod kontrolą promotora genu serycyny (Ser1) jedwabnika morwowego wbudowano do genomu *B. mori* przez zastosowanie systemu piggyBac. Otrzymany rekombinowany jedwab odznaczał się niewiele lepszą wytrzymałością i rozciągliwością niż jedwab naturalny.

WYTWARZANIE INŻYNIEROWANYCH PAJĘCZYCH JEDWABI (IPJ)

Ze względu na ograniczenia związane z użyciem naturalnych sekwencji cDNA spidroin (wydajność a koszty) do pozyskiwania rekombinowanych białek jedwabiu bardziej obiecujące jest stosowanie strategii wykorzystującej syntetyczne geny [42,68]. Technologia ta polega na syntezie krótkiej nici DNA kodującej sekwencję konsensusową danej spidroiny (tzw. moduł DNA) (ryc. 2). Konstrukcja modułów DNA zakłada optymalizację kodonów do danego systemu ekspresyjnego. Na końcach 3' i 5' znajdują się odcinki DNA pozwalające na kontrolowaną ligację. Są one rozpoznawane przez dwa różne enzymy restrykcyjne, generujące komplementarne do siebie lepkie końce. Sekwencja DNA jest poddawana w procesie ligacji, a prawidłowa orientacja insertu jest weryfikowana w wyniku analizy restrykcyjnej. W pozycji połączenia sekwencji, miejsce restrykcyjne nie jest odtwarzane. W ten sposób można łączyć dowolną liczbę powtarzających się motywów. Znane są przykłady 4–96 powtórzeń inżynierowanych białek pajęczych opartych głównie na sekwencjach konsensusowych białek MaSp1, MaSp2 i Flag pochodzących od złotego pająka jedwabnego oraz pająka krzyżaka ogrodowego (tabela 3).

Wielkość cząsteczkowa uzyskiwanych analogów IPJ opartych na sekwencji MaSp złotego pająka jedwabnego była heterogenna i wynosiła 12–285 kDa [20,21,34,50,64,77,84,88]. Za pośrednictwem multimerizacji otrzymano warianty genów różniące się liczbą powtórzeń modułów, a tym samym wielkością białka. Przykładem modułu opartego na białku MaSp1 jest polipeptyd GRGGLGGQGAGAAAAGGAGQGGYGGLGSQGTS [10]. Użycie bioreaktora zwiększa wydajność produkcji inżynierowanych IPJ. Niestety w wyniku niespecyficznych oddziaływań i precipitacji białka, obserwowano duże straty w trakcie procesu oczyszczania. Zastosowanie bioreaktora pozwoliło uzyskać 1500 mg 15-meru powyższego polipeptydu z jednego litra hodowli. Po procesie oczyszczania jego ilość została oceniona tylko na 2,5 mg/l [10]. Proces oczyszczania rekombinowanych IPJ istotnie wpływa na ostateczną ilość pozyskanego białka. Zastosowanie kwasu organicznego do lizy komórek bakteryjnych pozwala na

Tabela 3. Produkcja rekombinowanych inżynierowanych i naturalnych fragmentów białek jedwabiu pajęczego w różnych systemach ekspresyjnych

Organizm	Pochodzenie	Opis białka	Wielkość (kDa)	Piśmiennictwo
Prokarioty				
<i>Escherichia coli</i>	polimer syntetyczny jedwabiu pajęczego	motywy powtarzające się	76–89	[13]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1, MaSp2	11–41	[64]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1, MaSp2	65–163	[20]
	<i>Nephila clavipes</i>	motywy bogate w Gly	9–20	[21]
	<i>Nephila clavipes</i>	naturalny region C-końcowy MaSp1	43	[3]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	25	[77,84,85]
	<i>Nephila clavipes</i>	motywy bogate w Gly z Flag	25	[92]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1, MaSp2	43–56	[4]
	<i>Araneus diadematus</i>	sekwencje powtarzające się ADF3, ADF4	34–60	[34]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1, MaSp2	20–56	[52]
	<i>Araneus diadematus</i>	sekwencje powtarzające się ADF3, ADF4	48–106	[18,36,45,72,73]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	45	[86]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	48	[10]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	49–60	[32]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp2	58	[50]
	<i>Nephila edulis</i>	region C-końcowy MaSp1, MaSp2	10	[76]
	<i>Nephila antipodiana</i>	naturalny region C-końcowy TuSp	No	[33]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się Flag	14–94	[28]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	100–285	[88]
Eukarioty				
Drożdże				
<i>Pichia pastoris</i>	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	65	[19]
	polimer syntetyczny jedwabiu pajęczego	syntetyczne sekwencje powtórzone	28–32	[82]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	94–113	[11]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	94	[1]
Komórki owadzie				
<i>Sf9 (Spodoptera frugiperda)</i>	<i>Araneus diadematus</i>	naturalny region C-końcowy ADF3, ADF4	35–56	[35]
	<i>Araneus diadematus</i>	naturalny region C-końcowy ADF3, ADF4	50–60	[37–39]
	<i>Araneus ventricosus</i>	naturalny region C-końcowy Flag	28	[47]
<i>BmN (Bombyx mori)</i>	<i>Nephila clavipes</i>	motyw powtarzający się Flag	37	[54]
Komórki ssacze <i>MAC-T, BHK</i>	<i>Araneus diadematus</i> , <i>Nephila clavipes</i>	naturalny region C-końcowy ADF3, MaSp1 i MaSp2	60–140	[46]
Organizmy transgeniczne				
Tytoń (<i>Nicotiana tobaccum</i>)	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	13–100	[70,71]
Ziemniak (<i>Solanum tuberosum</i>)				
Tytoń (<i>Nicotiana tobaccum</i>)	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1, MaSp2	60	[53]
	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp2	65	[62]
Rzodkiewnik (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1, MaSp2	64	[91]
Mysz (<i>Mus musculus</i>)	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	31–66	[89]
Jedwabnik morwowo (<i>Bombyx mori</i>)	<i>Nephila clavipes</i>	sekwencje powtarzające się MaSp1	70	[81]

No – nieokreślono. Dane uzupełnione na podstawie referencji [29,66,78].

uzyskanie 4–5-krotnie większej ilości białka niż użycie buforu zawierającego 8M mocznik [52]. Użycie kwasu organicznego zwiększyło rozpuszczalność jedwabiu, przy jednoczesnej denaturacji białek bakteryjnych, co pozwoliło na odzyskanie większej ilości oczyszczonego IPJ (pochodnego MaSp1 od *Nephila clavipes*) [52]. W mikrobiologicznych systemach ekspresyjnych wydajność otrzymywania oczyszczonego IPJ wynosi 2–40 mg na litr pożywki [3,21,64,84]. Ponadto zaobserwowano spadek wydajności produkcji IPJ w miarę wzrostu wielkości insertu wprowadzanego do wektora ekspresyjnego [64,84,85]. Problemy związane z produkcją rekombinowanych IPJ w systemie bakteryjnym, wynikające głównie z dużej zawartości glicyny (43–45%), można zminimalizować poprzez modyfikację samych bakterii ekspresyjnych. Przykładem jest wprowadzenie zmian w szlaku metabolicznym glicylo-tRNA *Escherichia coli* [88]. Glicylo-tRNA jest syntetyzowany poprzez przyłączenie glicyny do odpowiedniej cząsteczki tRNA (tRNA^{Gly}) w obecności syntetazy glicylo-tRNA. Nadekspresja odpowiednich tRNA^{Gly} (rozpoznających GGC i GGU) pozwoliła na zwiększenie puli glicylo-tRNA, co z kolei zapewniło bardziej wydajne wytwarzanie większych fragmentów białka. Dalsze podwyższenie wydajności uzyskano dzięki wprowadzeniu genu odpowiedzialnego za syntezę glicyny (glyA). W oparciu o tę strategię wyprodukowano inżynierowane białka MaSp1, uzyskując produkty o różnej liczbie powtórzeń monomerów (32–96). Masa cząsteczkowa otrzymanych białek wynosiła odpowiednio 100,7–284,9 kDa. Największe uzyskane IPJ osiągnęło wielkość podobną do spidroin naturalnych (250–320 kDa) wytwarzanych w gruczołach pajęczych [88].

Kolejnymi białkami, które wyprodukowano stosując powyższą technologię były białka oparte na sekwencjach ADF-3 i ADF-4 [34]. Skonstruowano dwa syntetyczne moduły naśladujące powtarzalną sekwencję ADF-3: (i) poli(A) przypominający bogatą w alaninę pajęczą sekwencję konsensusową oraz (ii) poli(Q) o dużej zawartości glutaminy. Analogicznie zaprojektowano pojedynczy motyw dla konsensusowej, powtarzającej się sekwencji białka ADF-4 (moduł C). Ponadto utworzono białka hybrydowe polegające na połączeniu inżynierowanego cDNA z naturalną sekwencją pajęczą kodującą niepowtarzający się region końca 3' genu ADF-3 (NR3) [34]. Sekwencję regionu NR3 zamplifikowano z użyciem reakcji PCR. Kodony sekwencji NR3 utrudniające ekspresję białka w systemie bakteryjnym zostały wymienione za pośrednictwem ukierunkowanej mutagenyzy. Produkt reakcji PCR (NR3) następnie połączono z syntetyczną, powtarzającą się sekwencją ADF-3. Podobnie skonstruowano powtarzającą się sekwencję białka ADF-4 zawierającą wielokrotnie powtórzony motyw konsensusowy (moduł C) oraz sekwencję kodującą region NR końca 3' genu ADF4 (NR4). Inżynierowane białka (AQ)₁₂, (AQ)₁₂NR3, (QAQ)₈, (QAQ)₈NR3, C₁₆, C₁₆NR4 wyprodukowano w systemie *Escherichia coli* z porównywalną wydajnością (10–30 mg/l pożywki hodowlanej). Zastosowanie bioreaktora pozwoliło na uzyskanie dużej wydajności rzędu 140–360 mg oczyszczonego białka na litr pożywki hodowlanej [34]. Białka oczyszczono stosując bardzo prostą, dwustopniową metodę. Lizat bakteryjny poddawano termicznej denaturacji (70–80°C), co powodowało denaturację białek bakteryjnych. IPJ następnie wytrącano siarczanem amonu (20–30%) [34]. Metoda ta, prosta, szybka, tania, niewymagająca technik chromatograficznych

stwarza realne możliwości wykorzystania jedwabiu pajęczego w przemyśle.

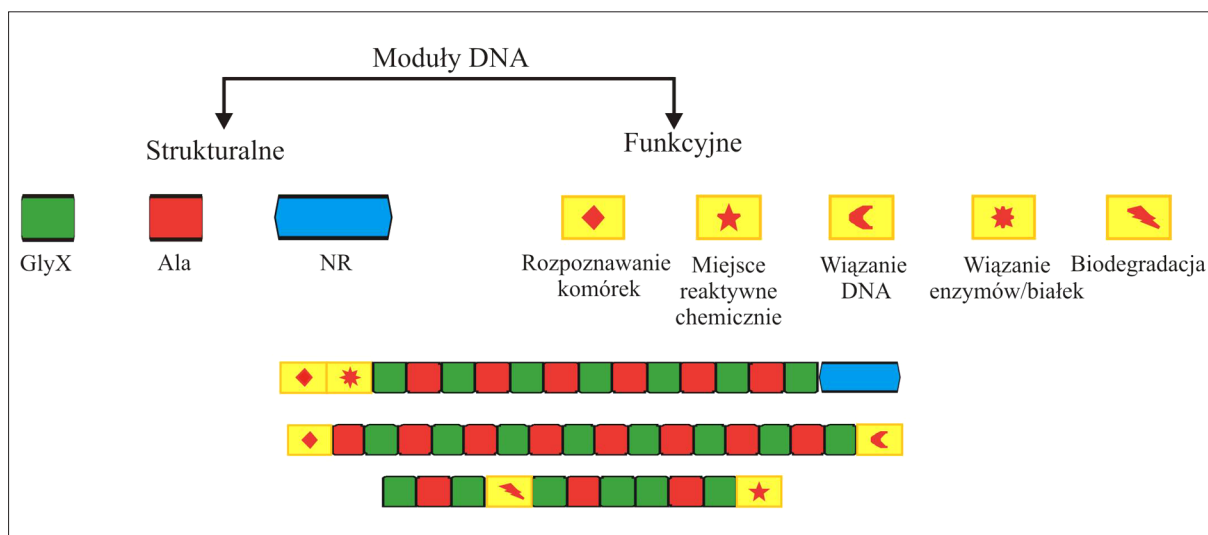
Oprócz bakteryjnych systemów nadekspresji stosowano także drożdżowy system produkcji *Pichia pastoris*. IPJ uzyskiwano w ilościach zadowalających (do 1000 mg/l), jednak występowały problemy z procesem jego oczyszczania z powodu tworzących się agregatów [19]. Ponadto przeprowadzono pierwsze próby produkcji rekombinowanych IPJ w transgenicznym roślina, takich jak tytoń [8,53,70], ziemniak [70,71] czy rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) [8,69,90]. IPJ były kierowane do różnych organów roślinnych w celu osiągnięcia możliwie najwyższej wydajności. W liściach tytoniu i ziemniaka produkowano wariant naśladujący białko MaSp1 od *Nephila clavipes*. W przypadku liści tytoniu uzyskano wydajność na poziomie 2% całkowitego rozpuszczalnego białka [70]. Przy produkcji w rzodkiewniku pospolitym kierowanie do apoplastu liści pozwoliło uzyskać akumulację rzędu 8,5% (w/w), natomiast do retikulum endoplazmatycznego nasion – 18% białka całkowitego [90]. Produkcja IPJ w systemach roślinnych wydaje się obiecującą alternatywą, jednak zwiększenie efektywności produkcji wymaga dalszych badań. Próbuje się również uzyskać wysokocząsteczkowy inżynierowany jedwab pajęczy wykorzystując zwierzęta transgeniczne np. myszy [89]. Wydajność produkcji jest jednak niska, a koszt bardzo wysoki.

Produkcja naturalnych i inżynierowanych białek jedwabiu pajęczego w różnych systemach ekspresyjnych została przedstawiona w tabeli 3.

FUNKcjONALIZACJA IPJ

Istotną zaletą IPJ jest możliwość tworzenia różnych ich wariantów o określonych właściwościach fizycznych i funkcjonalnych. Funkcjonalizację inżynierowanych genetycznie białek jedwabiu można modulować na etapie konstruowania modułów DNA. Strategia ta polega na przyłączaniu do sekwencji konsensusowych multimeru jedwabiu syntetycznych oligonukleotydów kodujących domeny funkcyjne. Sekwencje „obce” mogą nadawać nową cechę powstałej chimerze. Mogą to być miejsca chemicznie reaktywne, pozwalające na późniejszą (po utworzeniu odpowiedniej struktury) „dekorację” biotworzywa, czy też sekwencje peptydowe rozpoznające/wiążące metale, enzymy, receptory komórkowe, itp. Przykład mechanizmu modyfikowania rekombinowanych IPJ przedstawia ryc. 3.

Znane są przykłady wprowadzania pojedynczych aminokwasów np. cysteiny, metioniny [75, 77], czy też wprowadzanie sekwencji polipeptydowych. Pojedyncze aminokwasy wprowadzają grupę funkcyjną wykorzystywaną do przyłączania aktywnych cząstek, np. barwników, czy też pozwalają na kontrolę struktury jedwabiu [75]. Najczęściej wykorzystywanym motywem polipeptydowym nadającym funkcję jest peptyd RGD [10,58, 59]. Domena RGD będąca składową fibronektyny odpowiada za wiązanie do receptorów znajdujących się na powierzchni błony komórkowej [43]. Jest ona wykorzystywana w celu zwiększenia adhezji komórek do biotworzywa. Inny przykład, to nowy system dostarczania genów, który opiera się na fuzji polimerów opartych na IPJ z kationowymi modułami poli(L-lizyny) [60,61]. Polipeptydy kationowe mają zdolność



Ryc. 3. Białka hybrydowe – przykład funkcjonalizacji inżynierowanych białek jedwabiu pajęczego. Moduły DNA kodujące polipeptydy spełniające określone funkcje są przyłączane za pomocą klonowania do modułów DNA kodujących inżynierowane białka jedwabiu pajęczego. Pajęczęce domeny nadają strukturę, np. włókna, film, hydrożel, rusztowania, mikrokapsułki, mikro-, nanosfery

interakcji z DNA poprzez elektrostatyczne oddziaływania, mogą więc być wykorzystane do transfekcji komórek. Ponadto dołączenie domeny RGD do domeny poli(L-lizyny) warunkuje wydajność procesu [59]. Najnowsze doniesienia opisują fuzję IPJ z krótkimi peptydami przenikającymi i destabilizującymi błonę komórkową (CPPs) [60]. Ich przyłączenie wraz z zastosowaniem domen poli(L-lizyn) wzmacnia również transfer genów. Inne przykłady do funkcjonalizacji dla potrzeb medycyny regeneracyjnej. Przykładem jest przyłączenie do inżynierowanej sekwencji MaSp1 fragmentu białka elastyn (ELP) [71]. Modyfikacja IPJ poprzez wprowadzenie domen selektywnie oddziałujących z komponentami nieorganicznymi generuje nowatorskie organiczno-nieorganiczne kompozytowe systemy materiałowe [32,56,86]. W przypadku dołączenia peptydu R5 pochodzącego od białka silafiny na powierzchni jedwabnego biopolimeru odkłada się krzemionka. Inżynieria genetyczna posłużyła także do skonstruowania hybrydowych białek jedwabiu pajęczego z fragmentem białka macierzy dentyny 1 (DMP1) [32]. Domena białkowa będąca składową macierzy dentyny zapewniała IPJ zdolność wiązania i gromadzenia cząsteczek hydroksyapatytu wapnia (HA). Kompozytowe materiały mogą być wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej kości.

PODSUMOWANIE

Nadzwyczajne właściwości nici pajęczych, takie jak wytrzymałość, rozciągliwość, odporność na pękanie, a przy

PIŚMIENICTWO

- [1] Agapov I.I., Pustovalova O.L., Moiseyevich 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] Allmeling C., Jokuszies A., Reimers K., Kall S., Vogt P.M.: Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. J. Cell Mol. Med., 2006; 10: 770–777

tym biokompatybilność i biodegradowalność inspirowały naukowców do poszukiwania rozwiązań produkcji białek jedwabiu i wytwarzania z nich biomateriałów. W ostatnich dwudziestu latach obserwujemy olbrzymi postęp w poznaniu biologii jedwabnych nici, począwszy od genetyki, poprzez biochemię, a skończywszy na badaniach biofizycznych. Wiedza ta zaowocowała rozwojem technologii inżynierowanych pajęczych jedwabiu (IPJ), czego kontynuacją jest idea białek hybrydowych (struktura plus funkcja). Celem są białka hybrydowe, dzięki którym jedwab pajęczycy będzie inteligentnym biomateriałem przyszłości. Ostatnie osiągnięcia w dziedzinie optymalizacji metod produkcji i oczyszczania spidroin przełamują barierę dostępności materiału, co pozwala na rozwijanie technologii pozyskiwania różnych postaci morfologicznych biomateriałów. Biokompatybilne i biodegradowalne filmy, hydrożele, włókna, zręby, mikrokapsułki, mikro- i nanosfery, kompleksy jedwab/DNA mogą mieć duże zastosowanie nie tylko w medycynie. Sposoby wytwarzania jedwabnych biomateriałów oraz potencjalnego ich wykorzystania przedstawiono w części drugiej pracy przeglądowej dotyczącej inżynierowanego jedwabiu pajęczego.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują dr Pawłowi Szymkowiakowi i prof. dr hab. Jackowi Dabertowi za pomoc w trakcie powstawania manuskryptu.

- [3] Arcidiacono S., Mello C., Kaplan D., Cheley S., Bayley H.: Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1998; 49: 31–38
- [4] Arcidiacono S., Mello C.M., Butler M., Welsh E., Soares J.W., Allen A., Ziegler D., Laue T., Chase S.: Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silk. Macromolecules, 2002; 35: 1262–1266
- [5] Askarieh G., Hedhammar M., Nordling K., Saenz A., Casals C., Rising A., Johansson J., Knight S.D.: Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. Nature, 2010; 465: 236–238

- [6] Ayoub N.A., Garb J.E., Tinghitella R.M., Collin M.A., Hayashi C.Y.: Blueprint for a high-performance biomaterial: full-length spider dragline silk genes. *PLoS One*, 2007; 2: e514
- [7] Ayoub N.A., Hayashi C.Y.: Multiple recombining *loci* encode MaSp1, the primary constituent of dragline silk, in widow spiders (*Latrodectus*: Theridiidae). *Mol. Biol. Evol.*, 2008; 25: 277–286
- [8] Barr L.A., Fahnestock S.R., Yang J.: Production and purification of recombinant DP1B silk-like protein in plants. *Mol. Breeding*, 2004; 13: 345–356
- [9] Bell A.L., Peakall D.B.: Changes in fine structure during silk protein production in the ampullate gland of the spider *Araneus sericatus*. *J. Cell Biol.*, 1969; 42: 284–295
- [10] 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
- [11] Bogush V.G., Sokolova O.S., Davydova L.I., Klinov D.V., Sidoruk K.V., Esipova N.G., Neretina T.V., Orchansky I.A., Makeev V.Y., Tumanyan V.G., Shaitan K.V., Debabov V.G., Kirpichnikov M.P.: A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 2009; 4: 17–27
- [12] Candelas G.C., Arroyo G., Carrasco C., Dompenciel R.: Spider silk-glands contain a tissue-specific alanine tRNA that accumulates *in vitro* in response to the stimulus for silk protein synthesis. *Dev. Biol.*, 1990; 140: 215–220
- [13] Cappello J., Crissman J., Dorman M., Mikolajczak M., Textor G., Marquet M., Ferrari F.: Genetic engineering of structural protein polymers. *Biotechnol. Prog.*, 1990; 6: 198–202
- [14] Chen X., Knight D.P., Vollrath F.: Rheological characterization of *nephila* spidroin solution. *Biomacromolecules*, 2002; 3: 644–648
- [15] Colgin M.A., Lewis R.V.: Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like “spacer regions”. *Protein Sci.*, 1998; 7: 667–672
- [16] Colgin M.A., Lewis R.V.: Spider silk: A biomaterial for the future. *Chem. Industry*, 1995; 24: 1009–1012
- [17] Dicko C., Kenney J.M., Vollrath F.: β -silks: enhancing and controlling aggregation. *Adv. Protein Chem.*, 2006; 73: 17–53
- [18] Eisoldt L., Hardy J.G., Heim M., Scheibel T.R.: The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J. Struct. Biol.*, 2010; 170: 413–419
- [19] Fahnestock S.R., Bedzyk L.A.: Production of synthetic spider dragline silk protein in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997; 47: 33–39
- [20] Fahnestock S.R., Irwin S.L.: Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1997; 47: 23–32
- [21] Fukushima Y.: Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Biopolymers*, 1998; 45: 269–279
- [22] Gaines W.A., Sehorn M.G., Marcotte W.R.Jr.: Spidroin N-terminal domain promotes a pH-dependent association of silk proteins during self-assembly. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 40745–40753
- [23] Gosline J.M., Demont E.M., Denny M.W.: The structure and properties of spider silk. *Endeavor*, 1986; 10: 37–43
- [24] Gregory T.R., Shorthouse D.P.: Genome sizes of spiders. *J. Hered.*, 2003; 94: 285–290
- [25] 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
- [26] Hayashi C.Y., Lewis R.V.: Molecular architecture and evolution of a modular spider silk protein gene. *Science*, 2000; 287: 1477–1479
- [27] Hayashi C.Y., Lewis R.V.: Spider flagelliform silk: lessons in the protein design, gene structure, and molecular evolution. *BioEssays*, 2001; 23: 750–756
- [28] Heim M., Ackerschott C.B., Scheibel T.: Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains. *J. Struct. Biol.*, 2010; 170: 420–425
- [29] Heim M., Keerl D., Scheibel T.: Spider silk: from soluble protein to extraordinary fiber. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009; 48: 3584–3596
- [30] Hijirida D.H., Do K.G., Michal C., Wong S., Zax D., Jelinski L.W.: ¹³C NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophys. J.*, 1996; 71: 3442–3447
- [31] Hu X., Vasanthavada K., Kohler K., McNary S., Moore A.M., Vierra C.A.: Molecular mechanisms of spider silk. *Cell Mol. Life Sci.*, 2006; 63: 1986–1999
- [32] 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
- [33] Huang W., Lin Z., Sin Y.M., Li D., Gong Z., Yang D.: Characterization and expression of a cDNA encoding a tubuliform silk protein of the golden web spider *Nephila antipodiana*. *Biochimie*, 2006; 88: 849–858
- [34] Huennerich D., Helsen C.W., Quedzuweit S., Oschmann J., Rudolph R., Scheibel T.: Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry*, 2004; 43: 13604–13612
- [35] Huennerich D., Scheibel T., Vollrath F., Cohen S., Gat U., Ittah S.: Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr. Biol.*, 2004; 14: 2070–2074
- [36] Huennerich D., Slotta U., Scheibel T.: Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Applied Physics A: Materials Sci. Process.*, 2006; 82: 219–222
- [37] Ittah S., Barak N., Gat U.: A proposed model for dragline spider silk self-assembly: insights from the effect of the repetitive domain size on fiber properties. *Biopolymers*, 2010; 93: 458–468
- [38] Ittah S., Cohen S., Garty S., Cohn D., Gat U.: An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules*, 2006; 7: 1790–1795
- [39] Ittah S., Michaeli A., Goldblum A., Gat U.: A model for the structure of the C-terminal domain of dragline spider silk and the role of its conserved cysteine. *Biomacromolecules*, 2007; 8: 2768–2773
- [40] Jin H.J., Kaplan D.L.: Mechanism of silk processing in insects and spiders. *Nature*, 2003; 424: 1057–1061
- [41] Klauza I.: Pajęczy jedwab. 2007. <http://www.biotechnolog.pl/news-547.htm> (23.05.2011)
- [42] Kluge J.A., Rabotyagova O., Leisk G.G., Kaplan D.L.: Spider silks and their applications. *Trends Biotechnol.*, 2008; 26: 244–251
- [43] Krzyżanowska-Golab D., Lemanska-Perek A., Katnik-Prastowska I.: Fibronektyna jako aktywny składnik macierzy pozakomórkowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2007; 61: 655–663
- [44] Kukuruzinska M.A., Lennon K.: Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 1998; 9: 415–448
- [45] Lammel A., Schwab M., Slotta U., Winter G., Scheibel T.: Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem*, 2008; 1: 413–416
- [46] Lazaris A., Arcidiacono S., Huang Y., Zhou J.F., Duguay F., Chretien N., Welsh E.A., Soares J.W., Karatzas C.N.: Spider silk fibres spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science*, 2002; 295: 472–476
- [47] Lee K.S., Kim B.Y., Je Y.H., Woo S.D., Sohn H.D., Jin B.R.: Molecular cloning and expression of the c-terminus of spider flagelliform silk protein from *Araneus ventricosus*. *J. Biosci.*, 2007; 32: 705–712
- [48] Lefevre T., Leclerc J., Rioux-Dube J.F., Buffeteau T., Paquin M.C., Rousseau M.E., Cloutier I., Auger M., Gagne S.M., Boudreault S., Cloutier C., Pezolet M.: Conformation of spider silk proteins *in situ* in the intact major ampullate gland and in solution. *Biomacromolecules*, 2007; 8: 2342–2344
- [49] Lewis R.V.: Spider silk: ancient ideas for new biomaterials. *Chem. Rev.*, 2006; 106: 3762–3774
- [50] Lewis R.V., Hinman M., Kothakota S., Fournier M.J.: Expression and purification of a spider silk protein: a new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Expr. Purif.*, 1996; 7: 400–406
- [51] Madsen B., Shao Z.Z., Vollrath F.: Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999; 24: 301–306
- [52] Mello C.M., Soares J.W., Arcidiacono S., Butler M.M.: Acid extraction and purification of recombinant spider silk proteins. *Biomacromolecules*, 2004; 5: 1849–1852
- [53] Menassa R., Zhu H., Karatzas C.N., Lazaris A., Richman A., Brandle J.: Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant. Biotechnol. J.*, 2004; 2: 431–438
- [54] Miao Y., Zhang Y., Nakagaki K., Zhao T., Zhao A., Meng Y., Nakagaki M., Park E.Y., Maenaka K.: Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006; 71: 192–199
- [55] Michal C.A., Simmons A.H., Chew B.G., Zax D.B., Jelinski L.W.: Presence of phosphorus in *Nephila clavipes* dragline silk. *Biophys. J.*, 1996; 70: 489–493

- [56] 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
- [57] Mikulska I.: Pająk. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1953; 53–54
- [58] 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
- [59] 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
- [60] Numata K., Kaplan D.L.: Silk-Based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides. *Biomacromolecules*, 2010; 11: 3189–3195
- [61] Numata K., Subramanian B., Currie H.A., Kaplan D.L.: Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials*, 2009; 30: 5775–5784
- [62] Patel J., Zhu H., Menassa R., Gyenies L., Richman A., Brandle J.: Elastin-like polypeptide fusions enhance the accumulation of recombinant proteins in tobacco leaves. *Transgenic Res.*, 2007; 16: 239–249
- [63] Perez-Rigueiro J., Elices M., Plaza G., Real J.I., Guinea G.V.: The effect of spinning forces on spider silk properties. *J. Exp. Biol.*, 2005; 208: 2633–2639
- [64] Prince J.T., McGrath K.P., DiGirolamo C.M., Kaplan D.L.: Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry*, 1995; 34: 10879–10885
- [65] Rising A., Johansson J., Larson G., Bongcam-Rudloff E., Engstrom W., Hjalml G.: Major ampullate spidroins from *Euprostheno australis*: multiplicity at protein, mRNA and gene levels. *Insect. Mol. Biol.*, 2007; 16: 551–561
- [66] Rising A., Widhe M., Johansson J., Hedhammar M.: Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure-function relationships and biomedical applications. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010; 68: 169–184
- [67] Romer L., Scheibel T.: The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. *Prion*, 2008; 2: 154–161
- [68] Scheibel T.: Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb. Cell Fact.*, 2004; 3: 14
- [69] Scheller J., Conrad U.: Plant-based material, protein and biodegradable plastic. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 2005; 8: 188–196
- [70] Scheller J., Guhrs K.H., Grosse F., Conrad U.: Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat. Biotechnol.*, 2001; 19: 573–577
- [71] 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
- [72] Schmidt M., Romer L., Strehle M., Scheibel T.: Conquering isoleucine auxotrophy of *Escherichia coli* BLR(DE3) to recombinantly produce spider silk proteins in minimal media. *Biotechnol. Lett.*, 2007; 29: 1741–1744
- [73] 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
- [74] Spiess K., Lammel A., Scheibel T.: Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol. Biosci.*, 2010; 10: 998–1007
- [75] Spiess K., Wohlrab S., Scheibel T.: Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Sott. Matter.*, 2010; 6: 4168–4174
- [76] Spöner A., Unger E., Grosse F., Weisshart K.: Conserved C-termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules*, 2004; 5: 840–845
- [77] Szela S., Avtges P., Valluzzi R., Winkler S., Wilson D., Kirschner D., Kaplan D.L.: Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk. *Biomacromolecules*, 2000; 1: 534–542
- [78] Vendrely C., Scheibel T.: Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol. Biosci.*, 2007; 7: 401–409
- [79] Vollrath F.: Pajęczce sieci i jedwabie. *Świat Nauki*, 1992; 5: 60–67
- [80] Vollrath F., Knight D.P.: Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature*, 2001; 410: 541–548
- [81] Wen H., Lan X., Zhang Y., Zhao T., Wang Y., Kajiura Z., Nakagaki M.: Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol. Biol. Rep.*, 2010; 37: 1815–1821
- [82] Werten M.W., Moers A.P., Vong T., Zuilhof H., van Hest J.C., de Wolf F.A.: Biosynthesis of an amphiphilic silk-like polymer. *Biomacromolecules*, 2008; 9: 1705–1711
- [83] Williams D.: Sows' ears, silk purses and goats' milk: new production methods and medical applications for silk. *Med. Device Technol.*, 2003; 14: 9–11
- [84] Winkler S., Szela S., Avtges P., Valluzzi R., Kirschner D.A., Kaplan D.: Designing recombinant spider silk proteins to control assembly. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1999; 24: 265–270
- [85] Winkler S., Wilson D., Kaplan D.L.: Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation. *Biochemistry*, 2000; 39: 12739–12746
- [86] Wong Po Foo C., Patwardhan S.V., Belton D.J., Kitchel B., Anastasiades D., Huang J., Naik R.R., Perry C.C., Kaplan D.L.: Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 9428–9433
- [87] Work R.: Mechanisms of major ampullate silk fiber formation by orb-weaver spinning spiders. *Trans Am. Microsc. Soc.*, 1977; 96: 170–189
- [88] 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
- [89] Xu H.T., Fan B.L., Yu S.Y., Huang Y.H., Zhao Z.H., Lian Z.X., Dai Y.P., Wang L.L., Liu Z.L., Fei J., Li N.: Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Anim. Biotechnol.*, 2007; 18: 1–12
- [90] Yang J., Barr L.A., Fahnestock S.R., Liu Z.B.: High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic. Res.*, 2005; 14: 313–324
- [91] Yang M., Asakura T.: Design, expression and solid-state NMR characterization of silk-like materials constructed from sequences of spider silk, *Samia cynthia ricini* and *Bombyx mori* silk fibroins. *J. Biochem.*, 2005; 137: 721–729
- [92] Zhou C.Z., Confalonieri F., Jacquet M., Perasso R., Li Z.G., Janin J.: Silk fibroin: structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins*, 2001; 44: 119–122

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.