



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE

Promocijas darba
kopsavilkums

Viktors Romaņuks

REKOMBINANTO
ZIRNEKĻA ZĪDA
PROTEĪNU ĶĪMISKĀ
MODIFIKĀCIJA

Rīga 2025



LATVIJAS
UNIVERSITĀTE

**MEDICĪNAS UN DZĪVĪBAS
ZINĀTŅU FAKULTĀTE**

Viktors Romaņuks

**REKOMBINANTO ZIRNEKĻA ZĪDA
PROTEĪNU ĶĪMISKĀ MODIFIKĀCIJA**

PROMOCIJAS DARBA KOPSAVILKUMS

zinātniskā doktora grāda (*Ph. D.*) iegūšanai
dabaszinātnēs ķīmijas nozarē

Apakšnozare: organiskā ķīmija

Rīga 2025

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā laika posmā no 2019. gada līdz 2025. gadam.

Darbs sastāv no ievada, 3 nodaļām, nobeiguma, literatūras saraksta, 3 pielikumiem.

Darba forma: disertācija ķīmijas nozarē, organiskās ķīmijas apakšnozarē.

Darba zinātniskais vadītājs: *Dr. chem. Gints Šmits*.

Darba recenzenti:

- 1) *Dr. chem. Antons Sizovs* (Latvijas Organiskās sintēzes institūts);
- 2) *Dr. pharm. Edijs Vāvers* (Tartu Universitāte);
- 3) *Dr. sc. ing. Dagnija Loča* (Baltijas Biomateriālu ekselences centrs).

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2025. gada 19. decembrī plkst. 12:00 Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares promocijas padomes atklātā sēdē Latvijas Universitātes Dabaszinātņu akadēmiskajā centrā, Jelgavas iela 1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties Latvijas Universitātes Bibliotēkā Rīgā, Raiņa bulvārī 19.

LU Ķīmijas zinātņu nozares

promocijas padomes

priekšsēdētājs _____ / Prof., *Dr. chem. Edgars Sūna* /
(paraksta vieta)

Promocijas

padomes sekretāre _____ / Asoc. prof., *Dr. chem. Vita Rudoviča* /
(paraksta vieta)

© Viktors Romaņuks, 2025

© Latvijas Universitāte, 2025

ISBN 978-9934-36-463-1

ISBN 978-9934-36-464-8 (PDF)

ANOTĀCIJA

Rekombinanto zirnekļa zīda proteīnu ķīmiskā modifikācija. Romaņuks, V., darba vadītājs: *Dr. Chem.* Šmits, G. Promocijas darbs, 96 lappuses, 63 attēls, 9 tabulas, 232 literatūras avoti un 3 pielikumiem. Darbs uzrakstīts latviešu valodā.

Darbs ir veltīts jaunu metožu izstrādei rekombinanto zirnekļa zīda proteīnu efektīvai iegūšanai un to pārstrādei biomateriālos.

Izstrādātās metodes zinātniskā novitāte ir oriģināla pieeja, ievadot cisteīna atlikumu zirnekļa zīda proteīna C-terminālajā domēnā, kas ļauj specifiski un efektīvi realizēt tiola–maleimīda reakciju starp minispidroīnu un maleimīda grupu saturošu PEG. Šī metode ievērojami vienkāršo rekombinanto zirnekļa zīda ražošanas procesu, samazina nepieciešamību ekspresēt pilnus spidroīnus un ļauj manipulēt ar materiālu īpašībām, mainot biokonjugācijas parametrus un reaģentus. Darba ietvaros tika optimizēta spidroīnu ekspresija, attīrīšana un biokonjugācija, kā arī pārbaudīta iegūto biokonjugātu piemērotība vērpsšanai un analizētas iegūto šķiedru fizikālās īpašības. Iegūtās šķiedras demonstrē fizikālās īpašības, kas ir salīdzināmas vai pat pārākas par šķiedrām, kuras iegūtas no proteīniem ar lielāku molmasu. Tādējādi darbs sniedz būtisku ieguldījumu materiālzinātnē ar fokusu uz biodegradējamo materiālu izstrādi biomedicīnas un audu inženieriju pielietojumiem.

Atslēgvārdi: biokonjugācija, spidroīni, mākslīgais zirnekļu zīds, PEG, šķiedras.

SATURA RĀDĪTĀJS

ANOTĀCIJA	3
APZĪMĒJUMU SARAĶSTS	5
VISPĀRĪGAIS DARBA RAKSTUROJUMS	6
Tēmas aktualitāte.....	6
Pētījuma mērķis un uzdevumi	8
Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti	8
Promocijas darba rezultātu aprobācija.....	8
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI	10
1. Spidroīnu iegūšana	10
2. Biokonjugācijas optimizēšana.....	14
3. Biokonjugātu vēršana.....	19
4. Iegūto šķiedru fizikālās īpašības	22
SECINĀJUMI	27
LITERATŪRAS SARAĶSTS	28

APZĪMĒJUMU SARAKSTS

Cys	Cisteīns
CT	C-Terminālais domēns
DCM	Dihlormetāns
DTT	1,4-dimerkapto-2,3-butāndiols
EtOAc	Etilacetāts
FlSp	Flagelliformā zīda spidroīni
IPTG	<i>Izo</i> -propil- β - <i>d</i> -1-tiogalaktopiranozīds
LB	<i>Luria-Bertani</i> barotne
Mal	Maleimīds
MaSp	Lielā ampulāta zīda spidroīni
NHS	<i>N</i> -hidroksisukcinimīds
NT	<i>N</i> -Terminālais domēns
OD ₆₀₀	Optiskais blīvums pie 600 nm viļņa garuma
PBS	Fosfāta buferšķīdums
PEG	Polietilēna glikols
SCM	Sukcinimīds
SDS-PAGE	Nātrija dodecilsulfāta–poliakrilamīda gēla elektroforēze
TCEP	Tris(2-karboksietil)fosfīns
THF	Tetrahidrofurāns

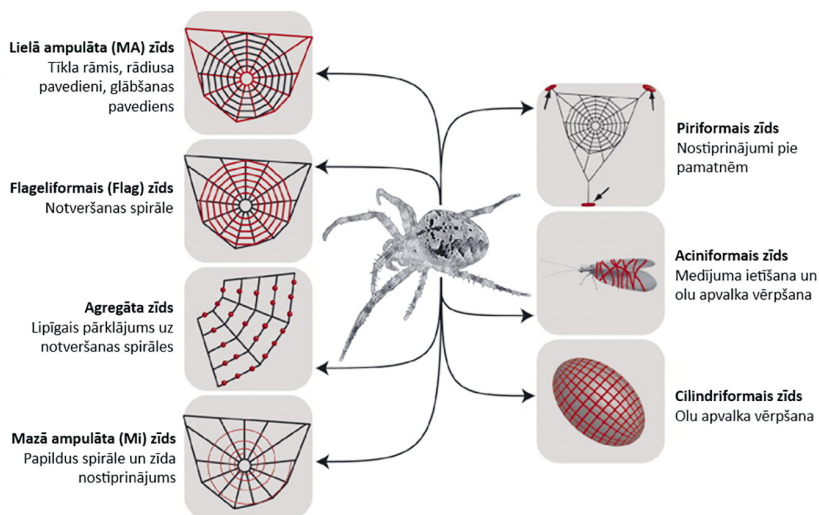
VISPĀRĪGAIS DARBA RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

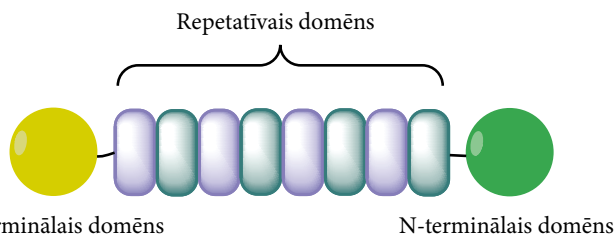
Zirnekļu zīds tiek uzskatīts par vienu no dabas izturīgākajiem materiāliem, kas vairākas desmitgades piesaistījis gan akadēmiskās vides, gan industriālā sektora pētnieku uzmanību. Tā izturība, elastība, zemais blīvums un citi parametri ir izrādījušies pat pārāki par attiecīgajiem raksturlielumiem vienam no izturīgākajiem sintētiskajiem polimēriem – kevlāram. Papildus tam zirnekļu zīds ir gan bioloģiski saderīgs, gan bionoārdāms, kas padara šo materiālu atraktīvu ne tikai no materiālzinātnes perspektīvas, bet arī kosmētikas un medicīnas nozarē.

Zirnekļi dabā spēj izveidot līdz pat septiņiem dažādiem tīkla veidiem (1. att.).

Lielā ampulāta zīds (*major ampullate (MA) silk*) tiek izmantots, lai izveidotu tīkla pamatkonstrukcijas, savukārt flageliformais zīds (*flagelliform (FlSp) silk*) tiek pielietots notveršanas spirāles būvniecībā. Agregātu zīds (*aggregate silk*) veido lipīgu pārklājumu uz notveršanas spirāles, bet mazā ampulāta zīds (*minor ampullate (Mi) silk*) tiek izmantots, lai uzbūvētu papildspirāli un nostiprinātu tīklu. Piriformais zīds (*pyriform silk*) tiek pielietots, lai izveidotu papildus stiprinājumu uz virsmām. Aciniformo zīdu (*aciniform silk*) izmanto, lai satvertu medījumu un veidotu oliņu pārklājumu. Cilindriformo zīdu (*cylindriform silk*) izmanto oliņu apvalka veidošanai. [1]



1. att. Shematisks attēlojums 7 dažādiem zirnekļa zīda veidiem. [1]



2. att. Spidroīna shematiska uzbūve.

Globālais pieprasījums pēc zirnekļa zīda katru gadu mērāms simtos tonnu, un tā tirgus vērtība mērāma > 2 mljrd USD, turklāt šiem apjomiem ir tendence katru gadu palielināties. [2] Neskatoties uz to, zirnekļa zīda un tā sastāvā esošo zirnekļa zīda proteīnu (spidroīnu) iegūšana rūpnieciskos apjomos aizvien sagādā vērā ņemamus izaicinājumus. Kā galvenais iemesls jāmin zirnekļu kanibālistiskais un teritoriālais dzīvesveids, kas liedz rūpniecisku zirnekļa zīda iegūvi tiešā veidā no zirnekļiem. Šis trūkums ir veicinājis alternatīvu biotehnoloģisko metožu izstrādi rekombinanto spidroīnu iegūšanai lielā apjomā. Viena no visplašāk izmantotajām metodēm rekombinanto spidroīnu iegūšanai ir proteīnu ekspresija *Escherichia coli* baktērijās. [3] Daudz retāk rekombinantos proteīnus iegūst no raugiem [4], augiem [5], dzīvniekiem vai to šūnām. [6, 7] Materiālu, kuru iegūst šādā veidā, mēdz dēvēt par rekombinanto zirnekļa zīdu.

Dabiskais zirnekļa zīds sastāv no trim pamatblokiem (2. att.).

- **C-terminālais domēns** (CT), kurš uzlabo spidroīnu šķīdību un veicina šķiedras veidošanu zirnekļa dziedzerī
- **N-terminālais domēns** (NT), kurš pH un vides izmaiņu ietekmē dime-rizējas un veicina šķiedras izveidošanu.
- **Repetitīvais domēns**, kurš sastāda ap 90% no visām spidroīna amino-skābēm, un tieši šis pamatbloks ir atbildīgs par zīda fizikālām īpašībām.

Tā piemēram, lielā ampulāta zīds (MaSp) pamatā sastāv no glicīna un alanīna repetitīvajā domēnā, kas sniedz zīdam izturību un stingrību, bet fla-gelliformais zīds (FlSp) pamatā sastāv no glicīna un prolīna, kas padara zīdu daudz elastīgāku. [8]

Lai palielinātu spidroīna iegūšanas efektivitāti, īpaši no baktērijām, tiek veidoti minispidroīni, kuriem repetitīvā domēna garums ir daudzreiz īsāks nekā pilnam spidroīnam. Turpmākajos soļos šos minispidroīnus ir iespējams biokonjugēt ar polimēriem vai citiem savienojumiem. Šī ir metode, kas ļauj tieši modificēt proteīna struktūru, eventuāli ļaujot uzlabot proteīna farmakokinētiku, šķīdību, savienojuma stabilitāti, kā arī tā fizikālās īpašības. To iespējams panākt, ķīmiski modificējot sākotnējo proteīnu, piemēram, ar karbodiimīdu vai aktivētu esteru, kā arī izmantojot pēdējā laikā aizvien aktuālākās “klik” ķīmijas metodes. [9] Polietilēnglikols (PEG) ir viens no plašāk izplatītajiem polimēriem, ko

izmanto proteīnu biokonjugācijā. Šobrīd tirgū ir vairāk nekā 20 proteīna-PEG konjugātu. Šiem biokonjugātiem ir plašs pielietojums – sākot no ķīmijterapijas izraisītas neitropēnijas profilakses līdz retu iedzimtu vielmaiņas slimību ārstēšanai. Konjugēti koagulācijas aģenti (Adynovate [10]) tiek izmantoti hemofilijas terapijā, savukārt konjugēti antivielu fragmenti, piemēram, certolizumaba pegols (Cimzia [11]), tiek lietoti autoimūnu slimību, tostarp Krona slimības un reimatoīdā artrīta, ārstēšanā. [12]

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas darba mērķis ir jaunas un efektīvas metodes izstrāde rekombinantā zirnekļa zīda iegūšanai, papildus pielietojot zirnekļa zīdu veidojošo minispidroīnu biokonjugāciju ar PEG, kā arī veicot biomimētisku vēršanu.

Darba mērķa īstenošanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

- 1) izpētīt un optimizēt spidroīnu biokonjugācijas reakcijas apstākļus;
- 2) pārbaudīt dažādu biokonjugātu vēršanas efektivitāti;
- 3) pārbaudīt iegūto šķiedru fizikālās īpašības;
- 4) proteīna iegūšanas mērogošana.

Zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

Darba rezultātā tika atrasta un attīstīta metode minispidroīnu iegūšanai bioreaktorā, ar kuru iegūtais proteīna daudzums vairāk kā par kārtu pārsniedz rezultātus kolbās. Tika piemeklēta un optimizēta metode minispidroīna biokonjugācijai ar polietilēna glikolu, kura noris ar vairāk kā 70% efektivitāti. Iegūtie minispidroīna-PEG konjugāti tika vērpti biomimētiskā ceļā, iegūstot šķiedras, kuras ir salīdzināmas vai atsevišķos gadījumos to fizikālās īpašībās pat pārsniedz citas mākslīgas šķiedras bāzētas uz līdzīgiem proteīniem.

Promocijas darba rezultātu aprobācija

Zinātniskās publikācijas

- Romaņuks, V., Fridmanis, J., Schmuck, B., A. L. Bula A. L., Lends, A., Senkane, K., Leitis, G., Gaidukovs, S., Smits, K., Rising, A., Smits, G., Jaudzems, K., Biomimetic Spider Silk by Crosslinking and Functionalization with Multiarm Polyethylene Glycol. *Adv. Funct. Mater.* **2024**, 2409487.

Patents

- Jaudzems, K.; Romaņuks, V.; Frīdmanis, J.; Bula, A., L.; Šmits, G. Chemically modified engineered spider silk proteins. WO2023227926A1, 30.11.2023

Konferenču tēzes

- Romaņuks, V. Artificial spider silk by crosslinking and functionalization with multi-arm polyethylene glycol. *8th China-Europe Symposium on Biomaterials in Regenerative Medicine*, 15.–18. septembris, **2024**, Nirnberga, Vācija. CESB 2024 Book of Abstracts, 143–144 lpp.
- Romaņuks, V. Biomimetic Spinning of Crosslinked and Functionalized Spider-Silk Proteins with Multiarm Polyethylene Glycol. *7th International Conference on Chemistry*, 11.–12. novembris, **2024**, Barselona, Spānija.
- Romaņuks, V. Ķīmiski modificēts mākslīgs zirnekļa zīds. *Latvijas materiālu pētīšanas biedrības 31. kongress*, 27. marts, **2025**, Rīga, Latvija.

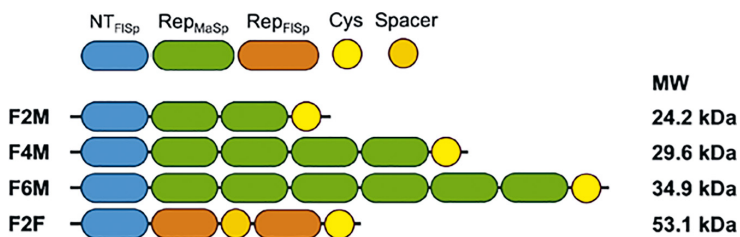
PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

1. Spidroīnu iegūšana

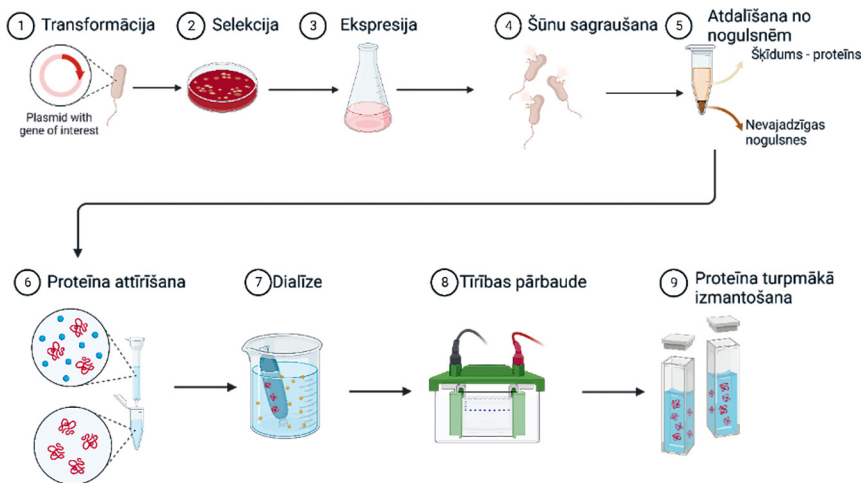
Pirmais mūsu darba uzdevums bija zirnekļa zīda proteīnu jeb spidroīnu iegūšana tālākajiem pētījumiem. Šim mērķim izvēlējāmies plašāk lietoto pieeju – spidroīnu ekspresiju (sintēzi) baktērijās. Dabīgie spidroīni ir lielmēra biomolekulas, kuru molmasas var sasniegt pat 350 kDa. [1] Tik lielu spidroīnu ekspresija baktērijās ir neefektīva, jo izsauc plazmīdu nestabilitāti un tiem ir zema šķīdība. Tā, piemēram, proteīna ar masu 46 kDa un vienu repetatīvo domēnu šķīdība ir 565 mg/mL, bet šī paša proteīna garākai alternatīvai – ar masu 104 kDa un 4 repetatīvajiem domēniem, šķīdība ir vairs tikai 134 mg/mL. [13] Šie faktori savukārt rezultējas ar zemu proteīnu ekspresijas efektivitāti; iepriekš minētajā gadījumā iegūtais proteīna iznākums bija attiecīgi 254 mg/L un 89 mg/L. [14]

Lai palielinātu spidroīnu ekspresijas iznākumu šūnās, kā arī efektīvāk realizētu nākamajos soļos plānoto spidroīnu biokonjugāciju ar PEG, nolēmām ekspresēt minispidroīnus. To repetatīvā domēna garums ir daudz īsāks nekā dabiskajiem spidroīniem. Turklāt to C-terminālo domēnu aizstājam ar cisteīnu, kas papildus deva arī iespēju veikt maleimīda – tiola konjugāciju. Šādā veidā ir iespējams iegūt proteīnu konjugātus, sākot no dimēriem līdz pat oktamēriem, kuri savstarpēji ir saistīti ar PEG. Šie konjugāti turpmāk dimerizējas N-terminālajā domēnā pie zema pH, veidojot šķiedru.

Mūsu iegūtie minispidroīni (3. att.) satur N-terminālo domēnu no *N. Clavipes* F1Sp, kurš ir labi šķīstošs ūdenī un dimerizējas pie pH ~ 5,5. [15–17] Repetatīvais domēns savukārt bija iegūts no *N. Clavipes* F1Sp vai no *E. Australis* lielā ampulāta spidroīna 1 (MaSp 1). F2M proteīns satur iepriekš minēto N-terminālo domēnu un divus repetatīvos domēnus no *E. Australis*, F4M satur četrus repetatīvos domēnus un F6M satur sešus repetatīvos domēnus. F2F satur iepriekš minēto N-terminālo domēnu un divus repetatīvos domēnus no *N. Clavipes*.



3. att. Izmantoto spidroīnu struktūras un to monomēru molmasas.



4. att. Proteīna vispārēja iegūšanas shēma.

1.1. tabula. Minispidroīnu iegūšanas efektivitāte

Minispidroīns	Vidējais proteīna iznākums, mg/L šūnu kultūras
F2M	116,0 ± 17,4
F4M	50,6 ± 11,2
F6M	30,1 ± 11,4
F2F	56,0 ± 10,2

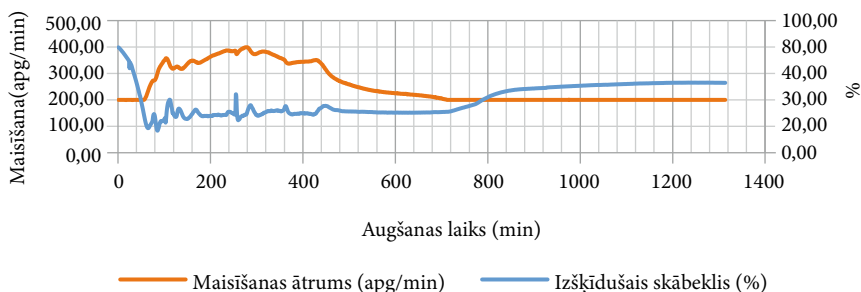
Spidroīni tika iegūti, izmantojot shēmu, kas redzama 4. attēlā. Pirmajā posmā ķīmiski kompetentās *E. coli* šūnas tika transformētas ar plazmīdu – nelielu DNS struktūru, kas satur gan mērķa proteīna kodējošo sekvenci, gan antibiotiku rezistences gēnu. Šūnas tālāk tika pavairotas uz 1/100 LB platēm, kas satur 50 µg/mL kanamicīna, un audzētas pie 30 °C pa nakti (4. att. 2. solis). Pēc tam viena kolonija tika pārnesta 50 mL LB šķīdumā, kas satur 50 µg/mL kanamicīna, un atkārtoti audzēta pa nakti 25 °C. Izveidotajai nakts kultūrai pēc tam atkārtoti pievienoja 1L LB šķīduma un nomērīja OD₆₀₀, kam vidēji uz to brīdi jābūt ap 0,01. Šķīdumu pārnesa 2,5 L koniskajās kolbās un inkubēja pie 37 °C līdz OD₆₀₀ ~ 0,6. Proteīnu ekspresija tika inducēta ar 0,05 mM IPTG, temperatūru samazinot līdz 25 °C. Pēc nakts ekspresijas šūnas tika savāktas, centrifugējot šķīdumu 7000 x g apgriezīenos 15 min 4 °C (4. att. 3. solis).

Pēc šūnu lizēšanas (4. att. 4. solis) un atdalīšanas no nogulsnēm (4. att. 5. solis) proteīni tika attīrīti ar niķeļa afinitātes hromatogrāfiju (*nickel affinity chromatography*) (4. att. 6. solis). Mērķa proteīnu saturošās frakcijas tika apvienotas, dializētas, lai atbrīvotos no imidazola (4. att. 7. solis), un iekonzentrētas. Visbeidzot, ar SDS-PAGE gēlu tika pārbaudīta iegūtā proteīna tīrība (4. att. 8. solis). Ekspresēto proteīnu iznākumi apkopoti 1.1. tabulā.

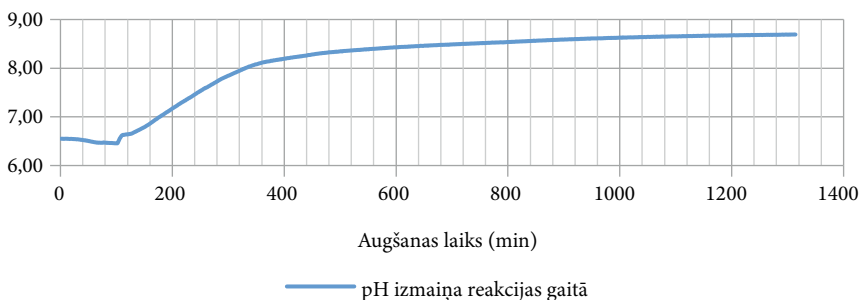
No iegūtajiem rezultātiem var secināt, ka visiem šiem minispidroiniem ir salīdzinoši labs ekspresijas rezultāts, un iznākums sakrīt ar literatūras datiem, kur tas variē no 10–300 mg/L. [8, 18, 19] Palielinot repetatīvo domēnu skaitu, proteīna iznākums drastiski samazinās.

Salīdzinot mūsu iegūto rezultātu ar literatūrā aprakstīto daudzumu bioreaktorā, kur pētnieki ieguva desmitkārtīgi lielāku proteīna daudzumu salīdzinājumā ar to pašu proteīnu, kas ekspresēts kolbās [20], var secināt, ka šūnu iznākums bioreaktorā pat par kārtu var pārsniegt iznākumu kolbās. Tas ir skaidrojams ar to, ka bioreaktorā ir labāka aerācija, ir iespējams kontrolēt vides pH, kā arī ir iespējams nogādāt šūnām papildus barības vielas, kas kopumā rezultējas ar efektīvāku baktēriju vairošanos. Lai veiksmīgi pārietu no proteīnu ekspresijas kolbā uz bioreaktoru, ir nepieciešams veikt vairāku apstākļu optimizāciju – skābekļa daudzuma padevi, pH regulāciju, barības vielu padevi, maisīšanas ātrumu, inkubēšanas temperatūru un citus faktorus, kā arī ir jāzina reakcijas dabiskā kinētika.

Pirmajā eksperimentā mēs izmantojām LB barotni un centāmies iegūt F1Sp proteīnu, bet galvenais eksperimenta mērķis bija iepazīt augšanas kinētiku bioreaktorā.



5. att. Maisīšanās ātruma un izšķīdušā skābekļa izmaiņa bioreaktora darbības laikā.



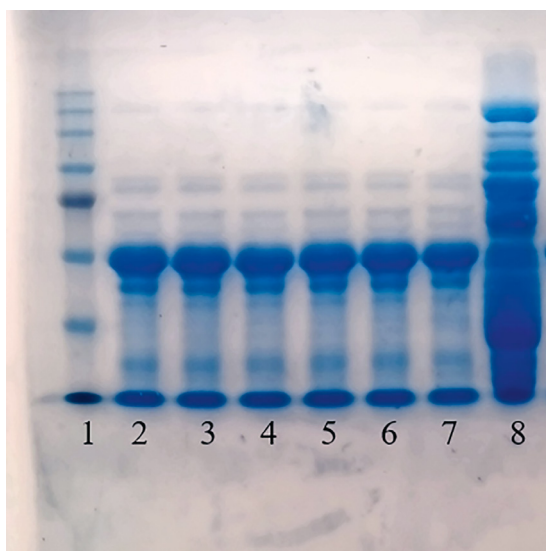
6. att. pH izmaiņa bioreaktora darbības laikā.

No iegūtajiem rezultātiem mēs secinājām, ka bez pH kontroles baktēriju aktīvais augšanas posms ir ~ 450 min pēc baktēriju inkubēšanas uzsākšanas, pēc tam vides pH paliek pārāk bāzisks baktēriju augšanai. Tas norāda uz to, ka pirmais nepieciešamais optimizācijas solis ir pH kontrole. Arī tas, ka gandrīz bija sasniegts maksimālais maisīšanas ātrums, norāda uz to, ka ir nepieciešama lielāka skābekļa padeve par pieņemto 1 L/min saspīestā gaisa uz 1 L barotnes. Pēc pirmā eksperimenta mēs ieguvām 50 mg F2F proteīna no 1 L barotnes, kas ir salīdzināms ar proteīna iegūšanu kolbās.

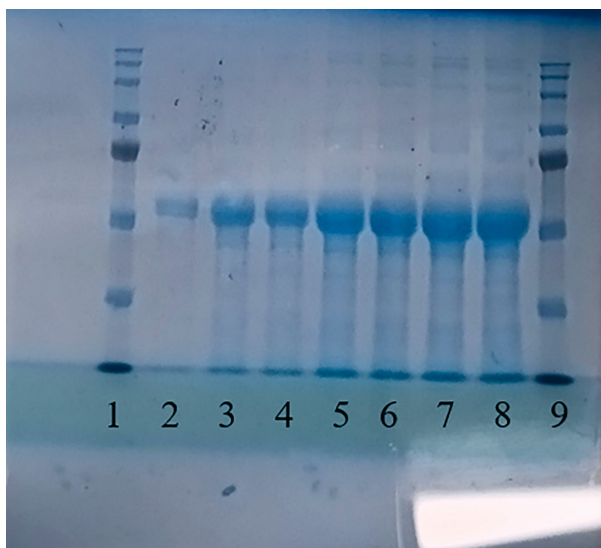
Modificējot apstākļus un vidi, kas tika atrasta literatūrā [20, 21], sistēmai tika palielināts gaisa padošanas ātrums un maisīšanās ātrums, no barotnes sastāva tika izņemta glikoze, un baktēriju augšanas laikā šūnas tika aktīvi piebarotas. No diviem litriem barotnes sanāca iegūt 413 g mitro šūnu. Veicot BugBuster analīzi, lai noteiktu kopējo proteīna daudzumu, tika secināts, ka teorētiskais maksimums vēlamajam proteīnam ir 2,6 g/L barotnes. Pēc attīrīšanas tika iegūti 1,93 g/L barotnes.

Tā kā rekombinētie zirnekļa zīda proteīni denaturējas augstākā temperatūrā nekā pārējie proteīni, ir iespējams izgulsnēt lielāko daļu nevajadzīgo proteīnu, šķīdumā atstājot mērķproteīnu.

Ar svaigi iegūtu paraugu pēc šūnu lizēšanas proteīnu mikstūra tika pakļauta 50 °C, 60 °C un 70 °C karsēšanai 15 min ar maisīšanu. Pēc karsēšanas beigām paraugi tika strauji atdzesēti ledus un ūdens maisījumā, centrifugēti ar ātrumu 8000 x g, dekantēti un analizēti ar SDS-PAGE gēlu.



7. att. SDS-PAGE gēls paraugiem pēc karsēšanas. 1. līnija – marķieris. 2.–7. līnija – izkarsētais paraugs 50°C. 8. līnija – izejas materiāls.

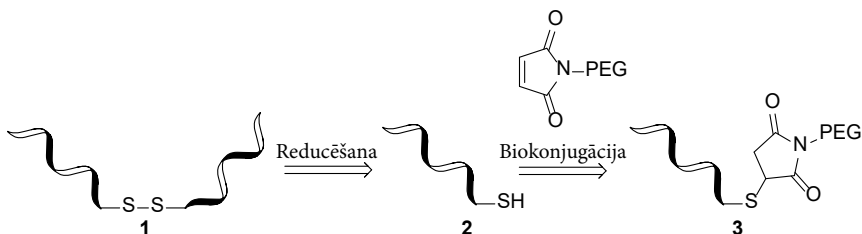


8. att. SDS-PAGE gēls paraugiem pēc karsēšanas 60°C.

No iegūtajiem rezultātiem (7. un 8. att.) redzams, ka proteīnu var iegūt salīdzinoši tīru gan pēc 50 °C karsēšanas, gan arī pietiekami tīru (>80%) pēc 60 °C karsēšanas. Pie 70 °C paraugs daļēji sažēlē, padarot tālāku analīzi neiespējamu.

2. Biokonjugācijas optimizēšana

Nākamais solis pēc proteīnu iegūšanas ir to biokonjugācija (9. att.) un attiecīgi šīs reakcijas optimizācija. Tā kā iepriekšējos soļos iegūtais proteīns parasti šķīdumā pastāvēja disulfīda dimēra formā **1**, sākotnēji bija jāveic tā reducēšana, lai iegūtu brīvo tiolu **2**, kuru turpmāk iespējams konjugēt, iegūstot mērķa konjugātu **3**. Klasiski šiem mērķiem izmanto ūdenī šķīstošo TCEP vai DTT. Tā kā TCEP reducēšanas metode ir ērtāk realizējama un pats reaģents stabilāks uzglabājot, turpmākajos eksperimentos izmantotāj to.



9. att. Rekombinanto zīrnēkļa zīda proteīnu biokonjugācija ar PEG.

2.1. tabula. Neizreaģējušā TCEP inhibēšanas/atdališanas metožu salīdzinājums

	2-roku PEG-Mal ar azīda inhibēšanu	2-roku PEG-Mal ar niķeļa afinitātes kolonnu
Neizreaģējis proteīns	12 %	10 %
Monokonjugāts	39 %	15 %
Dikonjugāts	44 %	75 %

Visas turpmākās reakcijas bija veiktas 20 mM nātrija fosfāta buferī, kurš saturēja 300 mM NaCl, pie pH 7,2. Reducēšanas optimizēšanas laikā tika pārbaudīti sekojoši apstākļi – reducēšanas aģenta daudzums, reducēšanas ilgums, temperatūra, reducēšanas aģenta inhibēšanas metode, kā arī papildvielu klātesamība. Pēc reducēšanas proteīns tika konjugēts ar PEG nemainīgā attiecībā un analizēts ar nātrijas dodecilsulfāta – poliakrilamīda gēla elektroforēzi (SDS-PAGE).

Darba gaitā optimizējām sekojošus parametrus: reducējošā aģenta stehiometriju (10 eq., 20 eq., 30 eq., 50 eq., un 100 eq.), reducēšanas ilgumu (16 h, 24 h, 48 h un 72 h) un temperatūru (4 °C, 20 °C un 37 °C). Pārpalikušā reducēšanas aģenta inhibēšana tika veikta ar PEG azīdiem. Šie azīdi ir ūdenī šķīstoši un maigos apstākļos ātri reaģē ar TCEP, inhibējot to pēc Štaudingera tipa mehānisma un pārvēršot to oksidētā, neaktīvā formā. [22] Kā alternatīva tika izmantota niķeļa afinitātes kolonna, ar kuru palīdzību pāri palikušo TCEP var atdalīt hromatogrāfiskā ceļā.

Veicot vairākus optimizācijas ciklus, tika secināts, ka efektīvākie reducēšanas apstākļi ir sekojoši – nepieciešami 10 eq. TCEP reaģenta, reducēšana ir jāveic pie 4 °C 24 h laikā, lieko TCEP no reakcijas maisījuma visefektīvāk aizvākt ar niķeļa afinitātes kolonnu, turklāt nevienas papildvielas esamība šķīdumā neuzlabo reducēšanas efektivitāti. TCEP reaģenta daudzuma, reducēšanas laika vai temperatūras paaugstināšana noved pie nevēlamas proteīna agregācijas un turpmākās izgulsnēšanās. Salīdzinot ar atsāļošanas hromatogrāfiju, PEG azīdu izmantošana neizreaģējušā TCEP inhibēšanai nav pietiekami efektīva, un sekojošā biokonjugācija norit ar daudz zemāku iznākumu. (2.1. tabula.)

Pēc reducēšanas apstākļu optimizācijas nākamais solis bija biokonjugācijas soļa optimizēšana. Tika pārbaudīti sekojoši biokonjugācijas procesa parametri: reakcijas temperatūra (4 °C, 20 °C un 37 °C), reaģentu savstarpējā stehiometrija (0,5 eq. proteīna uz 1 maleimīda grupu (roku), līdz 3 eq. proteīna uz 1 roku), biokonjugācijas reakcijas ilgums (16 h vai 24 h), kā arī proteīna pievienošanas ātrums (~ 1 ml/min). Biokonjugācija tika veikta ar sekojošiem PEG: 2-roku PEG, ar kuru ir iespējams izveidot lineāru konjugātu, 4-roku vai 8-roku PEG, kuri eventuāli var veidot šķērssašūtu konjugātu.

Veicot vairākus optimizācijas ciklus, tika secināts, ka biokonjugācija, tāpat kā reducēšana, ir jāveic pie 4 °C, reakcijas ilgums nebūtiski ietekmē reakcijas efektivitāti, vidējai attiecībai starp reaģentiem ir jābūt ap 1,2 eq. proteīna uz

1 roku un reaģents jāpievieno pakāpeniski. Līdzīgi kā ar reducēšanu, ilgstoši veicot reakciju pie paaugstinātas temperatūras, notiek proteīna agregācija un izgulsnēšanās; lielāks proteīna daudzums uz 1 roku nepalielina biokonjugācijas aizvietošanas efektivitāti, un, pievienojot proteīnu pakāpeniski, tiek sasniegta augstāka konjugācijas konversija salīdzinājumā ar ātru proteīna pievienošanu.

Pēc iegūtajiem rezultātiem (2.2. tabula) var secināt, ka vidēji izdevās sasniegt 50–70% proteīnu konjugāciju ar polimēru. Diemžēl nevienā no gadījumiem nebija iespējams sasniegt pilnīgu produkta konversiju ar maksimālu aizvietojamību.

Viens no promocijas darba mērķiem bija iegūt spidroīnus, kuri kovalenti modificēti ar lipofilām alkilķēdēm. Šīs modifikācijas eventuāli ļautu kontrolēt mitruma daudzumu savērtajās šķiedrās. Respektīvi, neļautu tām pilnībā izžūt vai uzņemt pārāk daudz mitruma.

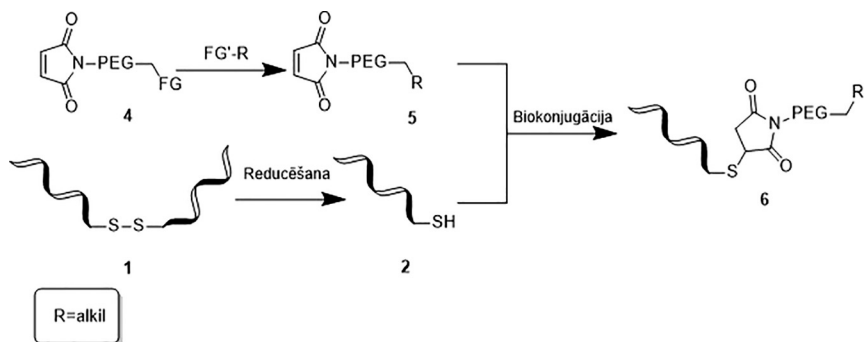
Šim mērķim iespējams izmantot hetero-bifunkcionālu PEG 4, kuram viena roka ir sukcinimīds vai spirts, bet pārējās trīs – maleimīdi. (10. att.) Heterobifunkcionālais polimērs 4 vispirms varētu tikt funkcionalizēts ar lipofilo daļu, iegūstot starpsavienojumu 5, kurš nākamajā solī varētu tikt konjugēts ar brīvo tiola funkciju proteīnā 2, veidojot attiecīgo konjugātu 6.

Sākotnēji pārbaudījām Mal-PEG-OH konjugāciju ar alifātiskām karbonskābēm, izmantojot Stegliha (*Steglich*) esterificēšanas metodi (11.att.).

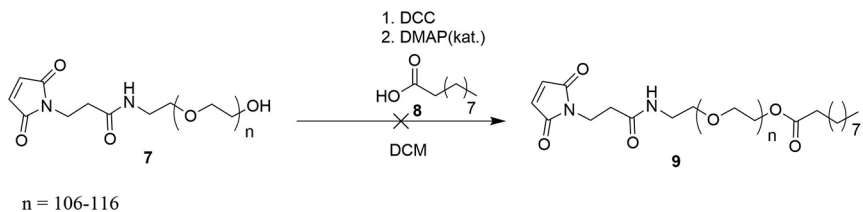
Lai gan pati esterificēšanas reakcija šķietami notika veiksmīgi, secinājām, ka attīršanas procesā, izmantojot tiešās vai apgrieztās fāzes kolonnas, notiek produkta 9 degradācija – maleimīda dubultās saites sairšana. Produkta izgulsnēšana arī nesniedza labu rezultātu. Turpmākajos pētījumos šī metode netika izmantota.

2.2. tabula. Pārskats par biokonjugācijas rezultātiem

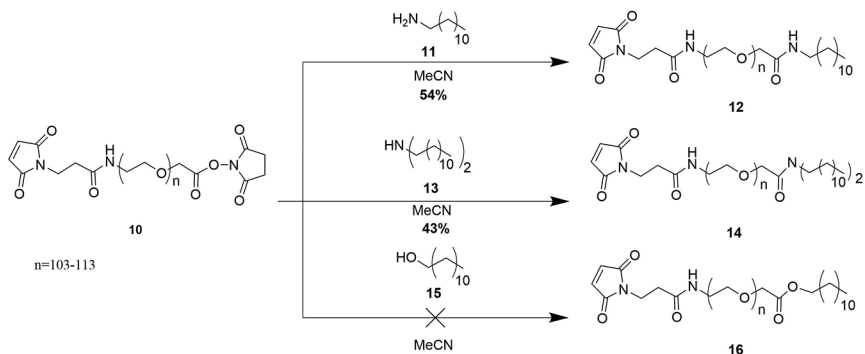
	F2M-2 roku PEG	F2M-4 roku PEG	F2M-8 roku PEG	F4M-2 roku PEG	F4M-4 roku PEG	F6M-2 roku PEG	F6M-4 roku PEG	F2F-2 roku PEG	F2F-4 roku PEG	F2F-8 roku PEG
Neizre- aģējis proteīns	46 ± 17%	57 ± 3%	-	50 ± 7%	39 ± 9%	45 ± 9%	43 ± 6%	18 ± 5%	50 ± 7%	32 ± 7%
Mono- konj.	15 ± 8%	0%	0%	20 ± 4%	0%	23 ± 5%	9 ± 3%	50 ± 15%	6 ± 1%	0%
Dikonj.	39 ± 19%	13 ± 2%	9 ± 1%	30 ± 3%	24 ± 3%	32 ± 5%	22 ± 2%	32 ± 11%	20 ± 3%	11 ± 2%
Trikonj.	-	19 ± 1%	11 ± 1%	-	23 ± 4%	-	19 ± 2%	-	18 ± 2%	12 ± 1%
Tetra- konj.	-	11 ± 1%	14 ± 1%	-	15 ± 2%	-	7 ± 1%	-	7 ± 1%	13 ± 2%
Augstā- kās pakā- pes konj. (5–8)	-	-	66 ± 10%	-	-	-	-	-	-	32 ± 3%



10. att. Ar lipofilajām ķēdēm modificēta spiroiroīna 6 iegūšanas vispārīgā shēma.



11. att. Lipofilu karbonskābju konjugēšana ar Mal-PEG-OH.



12. att. Lipofilās daļas konjugēšana ar 2-roku hetero-bifunkcionāliem PEG.

Tālākajos pētījumos izmantojām aktivētu NHS esteri **10** (Mal-PEG-SCM). Līdzīgi kā iepriekš, arī šajā gadījumā konjugēšana ar spirtu nedz ekvimolārā, nedz pārākumā nesniedza vēlamo produktu **16**. Daudz veiksmīgāka pieeja izrādījās **10** konjugēšana ar alifātiskiem amīniem, šajā gadījumā sekmīgi izdevās iegūt vēlamos produktus gan ar vienu alifātisku ķēdi (**12**), gan ar divām (**14**).

2.3. tabula. Iegūtie biokonjugācijas rezultāti ar lipofilo grupu

	12 konjugāts ar F2F	14 konjugāts ar F2F	18 konjugāts ar F2F	19 konjugāts ar F2F	21 konjugāts ar F2F	22 konjugāts ar F2F
Neizreaģējis proteīns	24%	22%	23 ± 6%	24 ± 6%	14 ± 3%	12 ± 5%
Monokonj.	76%	78%	19 ± 1%	22 ± 4%	13 ± 4%	17 ± 3%
Dikonj.	–	–	35 ± 4%	26 ± 8%	14 ± 3%	8 ± 3%
Trikonj.	–	–	24 ± 2%	28 ± 9%	12 ± 3%	17 ± 5%
Augstākās pakāpes konj. (4–7)	–	–	–	–	47 ± 15%	46 ± 13%

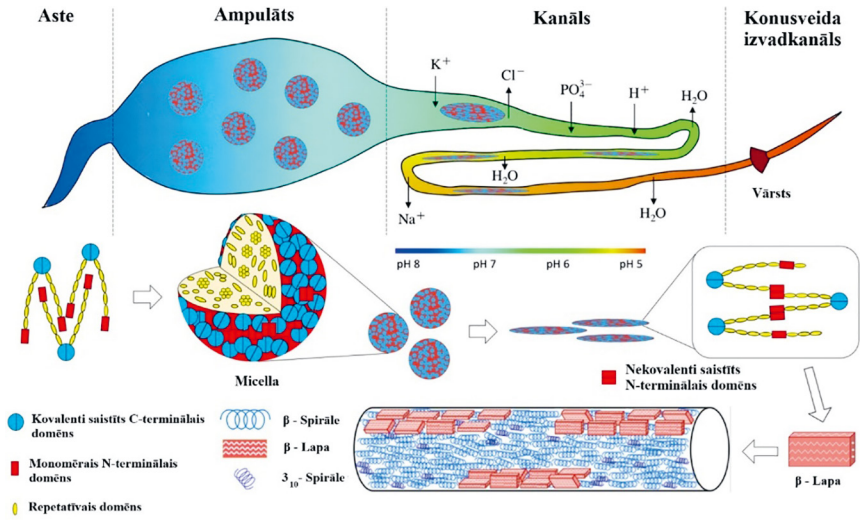
Iegūtos savienojumus nākamajos soļos konjugējām ar minispidroīniem pēc optimizētas metodes; rezultāti apkopoti 2.3. tabulā. No iegūtajiem datiem redzams, ka kopējā aizvietojamība un konjugācijas reakcijas efektivitāte ir salīdzinoši augsta, lielākā daļa savienojumu izveido maksimāli aizvietotu produktu.

3. Biokonjugātu vēršana

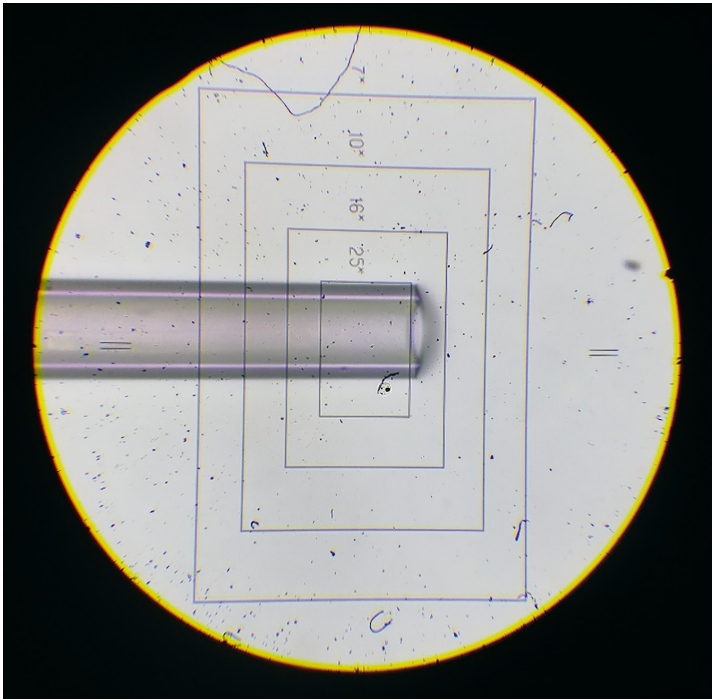
Zirnekļa zīds zīda dziedzeros veidojas vairāku sekvenciālu procesu rezultātā. Vispirms astes daļā tiek sintezēti zīdu veidojošie spidroīni. Tālāk ampulāta daļā šie proteīni veido micellas dažu desmitu nanometru diametrā. Šajā posmā proteīnu koncentrācija ir ļoti augsta – līdz pat 50% no masas (w/v). [23] Pēc tam micellas tiek ievadītas kanālā, kur tās tiek izlīdzinātas un orientētas kanāla virzienā. Šajā posmā samazinās arī vides pH no 7,5 uz 5, notiek jonapmaiņa un spidroīnu tālāka iekonzentrēšana. Kanāla beigu daļā vides skābums un proteīnu koncentrācija ir visaugstākā un tie jau atrodas šķīdru kristālu stāvoklī. Kanāla beigās zīds tiek vērpts no konusveida gala, kur šķiedru veidojošie proteīni jau iegūst stabilu otrējo spirālveida struktūru.

Biomimētiska zirnekļa tīkla vēršana laboratorijā iespēju robežās cenšas maksimāli atdarināt dabīgā zirnekļa tīkla vēršanu dziedzerī. Vēršanas procesā pH līmeņa izmaiņa izraisa molekulu sasaistīšanos. Atšķirībā no tradicionālajām metodēm, kur izmanto agresīvus organiskos šķīdinātājus, biomimētiskā vēršana balstās tikai uz ūdens buferiem un maigiem apstākļiem, tādējādi saglabājot proteīniem dabisko struktūru un funkcionalitāti.[25]

Lai iegūtu šķiedras diametru, maksimāli pietuvinātu dabīgajam zirnekļu zīdam (2–4 μm), ir nepieciešams šķiedras novirzīt garā un šaurā piltuvveida kanālā. To iespējams izdarīt ar speciāli izveidotu stikla kapilāru, kura vidējais iekšējais diametrs ir 40–60 μm. Mazāks diametrs par 40 μm noved pie biežāka kanāla aizsērēšanas, kas padara kapilāru nelietojamu. Šos stikla kapilārus izgatavojām ar OSI stikla pūtēja Gundara Leiša palīdzību. Kapilāru gatavo no stikla pipetes, to uzkaršējot liesmā un izstiepjot. Nākamajā solī atdzesētais kapilārs zem mikroskopa tiek nolauzts vietā, kur tā diametrs ir 40–60 μm.



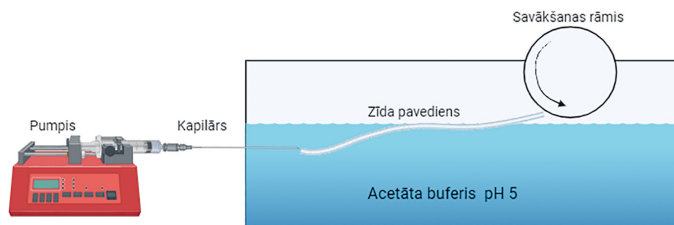
15. att. Zirnekļa dziedera un proteīnu shematiskais attēlojums. [24]



16. att. Stikla kapilārs zem mikroskopa pēc plēšanas.

Tālāk jau seko pati vērpšana (17. att.): vispirms proteīns tiek iekonzentrēts līdz ~150–300 mg/mL un caur iepriekš aprakstīto stikla kapilāru injicēts acetāta buferšķīdumā ar pH ~ 5. Eksperimentāli noskaidrojām, ka zemākās proteīna koncentrācijās šķiedru veidošanās nenotiek. pH maiņa no 7,4 uz ~ 5 izsauc momentānu proteīna koagulāciju pavediena veidā, kurš tālāk tiek ievākts uz savākšanas rāmja.[25] Savākšanas rāmja griešanās ātrums tiek pieskaņots katrai šķiedrai individuāli ar mērķi maksimāli pastiept šķiedru pirms savākšanas, bet tajā pašā laikā minimizēt šķiedras pārplīšanu. Palielinot attālumu starp kapilāra izeju un savākšanas rāmi, var sasniegt efektīvāku šķiedras izstiepšanu, taču palielinās risks procesā pārplēst šķiedru.

Kopumā tika mēģināts vērtēt 14 dažādas šķiedras, no kurām 7 ir spidroīna MaSp dažāda veida konjugāti, 6 F2F minispidroīna konjugāti un nekonjugēts spidroīns F2F. (3.1. tabula).



17. att. Shematisks attēlojums zīda vērpšanas iekārtai.

3.1. tabula. Biokonjugātu vērpšanas efektivitāte

N.P.K.	Minispidroīns	Biokonjugācijas proteīns	Šķiedru vērpšanas efektivitāte
1.	F2M	2-roku-PEG	-
2.	F2M	2-roku-PEG-C12	-
3.	F2M	2-roku-PEG-(C12) ₂	-
4.	F2M	4-roku-PEG	+
5.	F2M	4-roku-PEG-C12	-
6.	F2M	4-roku-PEG-(C12) ₂	-
7.	F2M	8-roku-PEG	-
8.	F2F	-	+++
9.	F2F	2-roku-PEG	+++
10.	F2F	4-roku-PEG	+++
11.	F2F	4-roku-PEG-C12	++
12.	F2F	4-roku-PEG-(C12) ₂	+
13.	F2F	8-roku-PEG	+++
14.	F2F	8-roku-PEG-C12	-

+++ laba vērpšanas efektivitāte, visa šķiedra bija savākta uz savākšanas rāmjiem, nevienu reizi nepārplīstot;

++ vidēja vērpšanas efektivitāte, visa šķiedra bija savākta uz rāmjiem, pāris reizes pārplīstot;

+ zema vērpšanas efektivitāte, šķiedra konstanti plīsa, uznesot to uz savākšanas rāmjiem;

- šķiedru savērt neizdodas.

F4M un F6M konjugāti vērpšanas eksperimentos netika izmantoti to nestabilitātes dēļ. Šie proteīni izrādījās jutīgi uz temperatūras svārstībām, kā arī ir daudz nestabilāki, salīdzinot ar F2M. Šie proteīni pāris stundu laikā pēc attīrīšanas izkrit nogulsnēs, padarot neiespējamu vērpšanas materiālu sagatavošanu.

Vērpjot F2M biokonjugātus, iegūtā šķiedra bija gēlveidīga un plīsa no vieglākiem pieskārieniem, tikai vienu no konjugātiem bija iespējams savērpēt, ievērojami samazinot vērpšanas ātrumu, savākšanas rāmja attālumu un griešanās ātrumu (3.1. tabula 1.–7. rinda). Zemu F2M vērpšanas efektivitāti iespējams izskaidrot ar relatīvi zemu repetatīvo domēnu masas daļu proteīnā, kas noved pie vājākas starpmolekulāras mijiedarbības.

Gandrīz visi paraugi, kuros izmantots F2F proteīns, parādīja ļoti labu vērpšanas efektivitāti (3.1. tabula 8.–13. rinda). Bija arī novērots, ka, palielinot lipofīlās daļas masas daļu biokonjugātā, vērpšanas efektivitāte samazinājās (3.1. tabula 11., 12., 14. rinda).

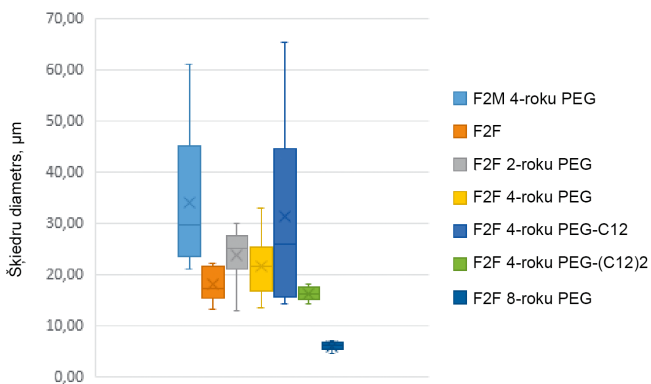
4. Iegūto šķiedru fizikālās īpašības

Iegūto šķiedru fizikālās īpašības tika testētas mūsu sadarbības partnera laboratorijā Zviedrijā (A. Rising un B. Shmuck, Karolinskas Institūts). Testi tika veikti pie relatīvi zema mitruma (<30%), kas ir svarīgi, jo pilnībā sausām šķiedrām ir sliktākas fizikālās īpašības. F2M 4-roku PEG šķiedras diametrs bija viens no lielākajiem (23–45 μm vidēji) (18. att.), ko var skaidrot ar pazeminātu vērpšanas ātrumu un samazinātu attālumu starp kapilāra izeju un savākšanas rāmi. Arī šķiedras diametra izkliedi var skaidrot ar to, ka, tā kā šķiedra bieži plīsa, nebija iespējams vienmērīgi izstiept visas šķiedras pēc vērpšanas. Šīs šķiedras bija minimāli izstiepjamas (19. att.). Stiepes izturība (20. att.) šīm šķiedrām ir salīdzināma ar minispidroīnu šķiedrām, kuras satur 12–20 repetatīvos domēnus. [26, 27] PEG nav manāmas ietekmes uz šķiedras izstiepjamību, salīdzinot ar citām mākslīgām šķiedrām, kuras ir veidotas no MaSp spidroīna.

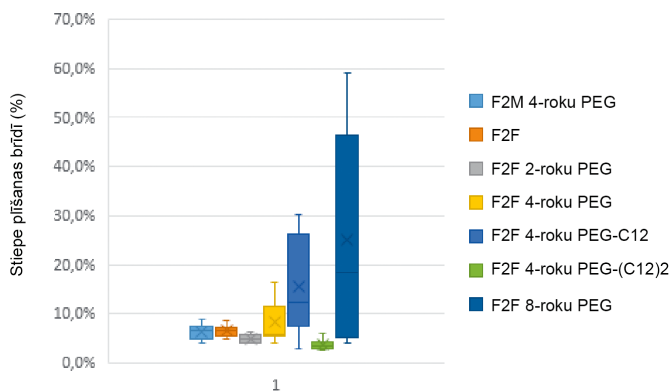
F2F 2-roku un 4-roku PEG šķiedru izstiepjamība (19. att.) un stiepes izturība (20. att.) ir līdzīga F2M 4-roku PEG. Nekonjugēta F2F un F2F 8-roku PEG stiepes izturība ir gandrīz divas reizes labāka par citiem paraugiem, kā arī 3–4 reizes lielāka nekā līdzīgām mākslīgi vērpētām šķiedrām, balstītām uz FlSp proteīna. [28]

Labākos rezultātus šķiedras izstiepjamībā uzrādīja tieši F2F 8-roku PEG konjugāts, ko var izskaidrot gan ar augstu biokonjugācijas efektivitāti, gan arī ar sarežģītu šķērssaistītu struktūru.

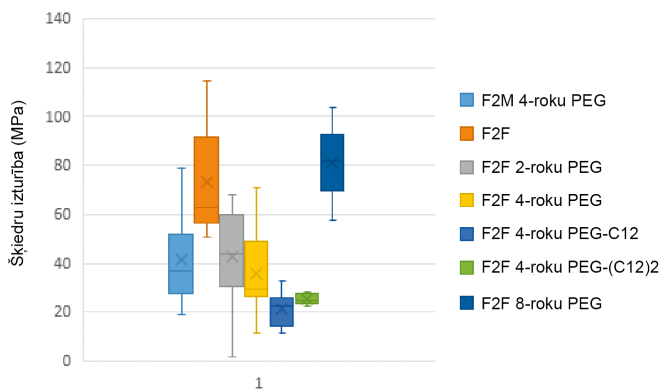
Diemžēl lipofilo ķēžu ieviešana biokonjugātos manāmus uzlabojumus attiecīgo šķiedru fizikālajās īpašībās neieviesa. Šķiedras izstiepjamība F2F 4-roku PEG-C12, salīdzinot ar F2F 4-roku PEG, ir augstāka, bet pasliktinājās izturības rādītājs. Biokonjugātam ar divām lipofilajām sānu ķēdēm fizikālās



18. att. Uzvērpto šķiedru vidējais diametrs.



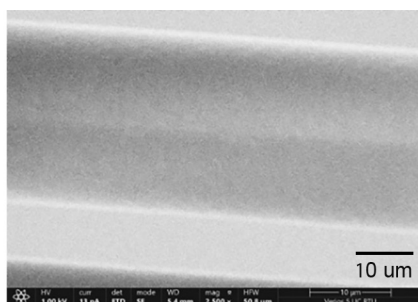
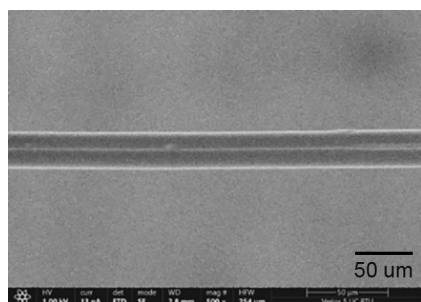
19. att. Šķiedru izstiepjamība pie saplīšanas (atskaitot rupjās kļūdas).



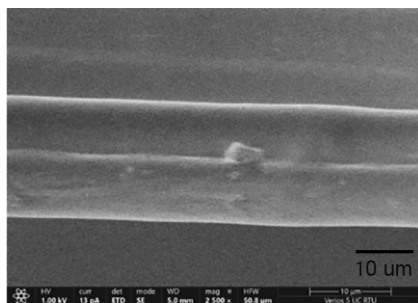
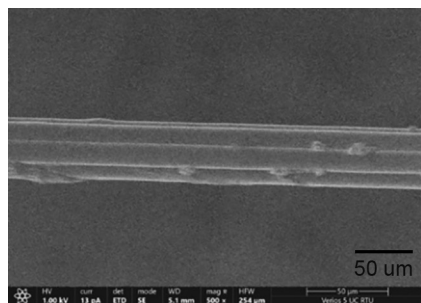
20. att. Stiepes izturība pie saplīšanas (atskaitot rupjās kļūdas).

īpašības ir vēl zemākas. Tas netieši norāda uz to, ka ieviestā lipofilo slāņu masas attiecība savienojumā ir pārāk maza, lai efektīvi pasargātu šķiedru no izžūšanas. Tā, piemēram, dabīgajā zirnekļu zīda šķiedrā lipofilais slānis ir ap 3–5% no zīda masas, bet pēc mūsu metodes lipīdu masas daļa ir tikai ap 0,1 %. [29]

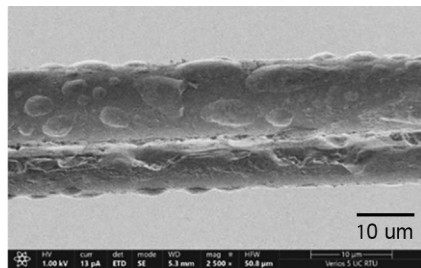
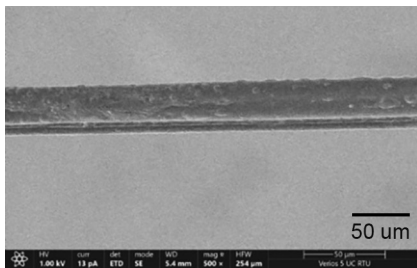
Papildus F2F-PEG konjugāti tika pētīti, izmantojot skenējošu elektronu mikroskopiju (SEM), ar mērķi salīdzināt šķiedru virsmas morfoloģijas. Šos pētījumus veicām sadarbībā ar Prof. S. Gaidukovu (RTU, DTF). Noskaidrojām, ka visas biokonjugātu šķiedru virsmas saturēja sfēriskus aglomerātus. F2F 2-roku PEG (22. att.), F2F 4-roku PEG – C12 (24. att.) un F2F 8-roku PEG (26. att.) uzrādīja līdzīgu virsmas morfoloģiju, saturot tikai nelielu daudzumu sfērisku veidojumu. Var novērot, ka augstāks roku skaits PEG palielina sfērisko veidojumu daudzumu uz šķiedras virsmas. F2F 4-roku PEG paraugā (23. att.) veidojumu daudzums uz virsmas drastiski palielinājās, līdzīgi ir arī F2F 4-roku PEG-2C12 (25. att.), kā arī to forma izmainījās no sfēriskas uz neregulāru. Tajā pašā laikā šķiedra, kas bija iegūta no nekonjugēta F2F minispidroīna (21. att.), uzrādīja gludu virsmu, kas norāda uz to, ka sfēriski veidojumi uz šķiedras virsmas sastāv galvenokārt no PEG un alifātiskām ķēdēm.



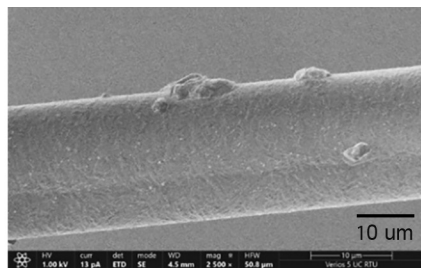
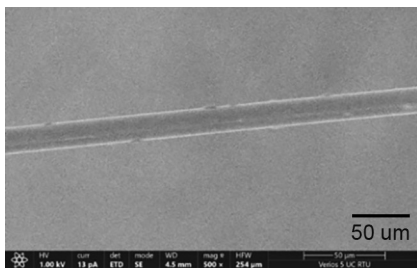
21. att. F2F proteīna šķiedras virsmas morfoloģija.



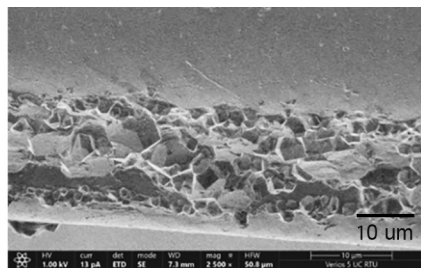
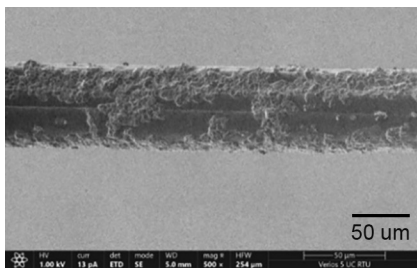
22. att. F2F 2-roku PEG konjugāta šķiedras virsmas morfoloģija.



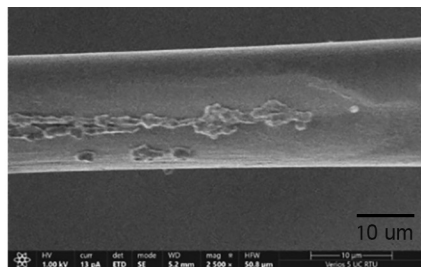
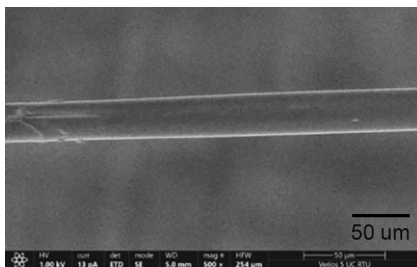
23. att. F2F 4-roku PEG konjugāta šķiedras virsmas morfoloģija.



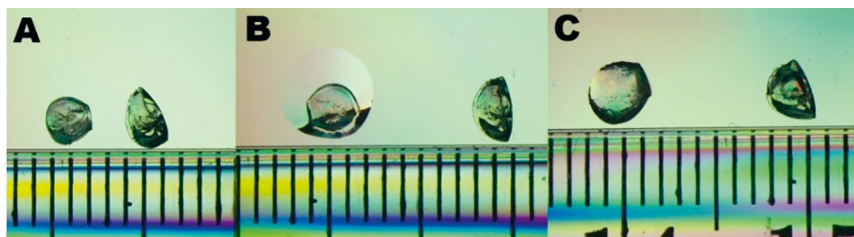
24. att. F2F 4-roku PEG-C12 konjugāta šķiedras virsmas morfoloģija.



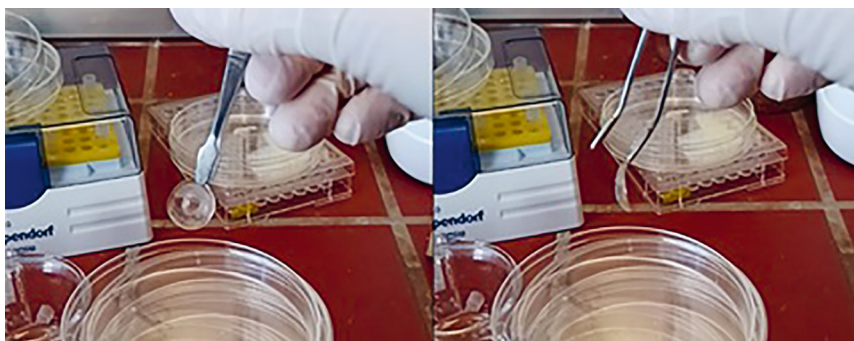
25. att. F2F 4-roku PEG-2C12 konjugāta šķiedras virsmas morfoloģija.



26. att. F2F 8-roku PEG konjugāta šķiedras virsmas morfoloģija.



27. att. Divi biokonjugēta spidroīna paraugi. Vienas iedaļas vērtība – 1 mm. A – abi paraugi izkaltēti. B – vienam no paraugiem uzliets dejonizēts ūdens. C – uzbriedis paraugs (pa kreisi), un izkaltis paraugs.



28. att. Iegūtais lēcveidīgais materiāls no spidroīna.

Papildus pie uzvērptā zīda tika pārbaudītas arī pirms vērpsšanas materiāla īpašības. Sauss proteīna biokonjugāts tika iemērķts destilētā ūdenī un novērota tā uzbriešana.

Šīs lodītes sākotnēji ir salīdzinoši mīkstas un elastības, bet žūstot, saraujas apmēram divas reizes un to forma kļūst neregulāra (27. att. A). Pēc ūdens pievienošanas novērojām, kā pakāpeniski ūdens difundē caur parauga sienām (27. att. B). Pēc 2 h paraugs, kuram pievienoja ūdeni, tika nosusināts un tam atkārtoti nomērīts diametrs (27. att. C)., ka paraugs ir atjaunojis iepriekšējo sfēriskumu, virsma ir kļuvusi gludāka, un tā diametrs no sākotnējiem ~ 2 mm pieauga līdz ~4 mm jeb gandrīz 2 reizes.

Optimizējot spidroīnu šķīdumu polimerizācijas apstākļus eventuāli izdevās iegūt izturīgu lēcveidīgu materiālu ~20 mm diametrā un ~2 mm biezumā.

SECINĀJUMI

1. Mūsu lietoto minispidroīnu pilnīgai reducēšanai nepieciešamas 24 h, 4 °C un 10 eq. TCEP. Ilgāks reducēšanas laiks, lielāka temperatūra vai lielāks ekvivalentu skaits degradē proteīnu.
2. Efektīvākā metode TCEP aizvākšanai no reakcijas maisījuma ir jonu apmaiņas hromatogrāfijas izmantošana.
3. 0,1–0,2 ekviv. proteīna pārrākums attiecībā pret PEG-maleimīda grupusekmejas labākā reakcijas efektivitātē.
4. Lipofilās daļas konjugēšanā pie PEG ir jāizmanto 0,05–0,1 ekviv. lipofilās daļas pārrākums, kā arī reakcijas laikam nav jābūt ilgākam par 1h nevēlamās *aza*-Maikla blakusreakcijas dēļ.
5. MaSp proteīni ekspresējas aptuveni 2 reizes vairāk no litra barotnes, salīdzinot ar FlSp.
6. FlSp biokonjugāti vērpjot plīst daudz mazāk, salīdzinot ar MaSp.
7. Palielinot lipofilās daļas masas daļu biokonjugātā, vērpšanas efektivitāte samazinās.
8. PEG ieviešana biokonjugātā uzlabo šķiedras izturību, kas ir salīdzināma ar minispidroīniem, kuri satur 12–20 repetatīvus domēnus.
9. PEG nav negatīvas ietekmes uz šķiedras izstiepjamību, salīdzinot ar citām mākslīgi iegūtām MaSp minispidroīna šķiedrām.
10. Samazinot šķiedru diametru, uzlabojas šķiedru fizikālās īpašības.
11. Nekonjugēta rekombinantā F2F minispidroīna un F2F 8-roku PEG konjugāta stiepes izturība ir manāmi augstāka nekā līdz šim vērtajām šķiedrām, kuras ir balstītas uz FlSp proteīnu.
12. Lipofilās daļas ieviešana manāmi neuzlaboja šķiedras fizikālās īpašības. To var skaidrot ar salīdzināmi zemāku lipofilās daļas masas daļu biokonjugātā, salīdzinot ar dabīgo zirnekļa zīdu.
13. Bioreaktors ļauj iegūt gandrīz 37 reizes vairāk proteīna, salīdzinot ar iegūto rezultātu kolbās.

LITERATŪRAS SARAKSTS

- [1] Eisoldt, L., A. Smith, and T. Scheibel, *Decoding the secrets of spider silk*. Materials Today, 2011. **14**(3): pp. 80–86.
- [2] *Spider Silk Market Size, Share & Trends Analysis Report by Technology (Genetically Modified E-Coil Fermentation, Genetically Modified Silkworm, Genetically Modified Yeast Fermentation) And Application (Automotive, Defense, Healthcare, Textile)- Market Outlook And Industry Analysis 2024–2031*. 2024; Available from: <https://www.insightanalytics.com/report/spider-silk-market/1587>.
- [3] Venkatesan, H., J. Chen, and J. Hu, *Fibers Made of Recombinant Spidroins – A Brief Review*. AATCC Journal of Research, 2019. **6**(1_suppl): p.p 37–40.
- [4] Fahnestock, S. R. and L.A. Bedzyk, *Production of synthetic spider dragline silk protein in Pichia pastoris*. Appl Microbiol Biotechnol, 1997. **47**(1): pp. 33–9.
- [5] Schillberg, S., et al., *Critical Analysis of the Commercial Potential of Plants for the Production of Recombinant Proteins*. Front Plant Sci, 2019. **10**: p. 720.
- [6] Copeland, C. G., et al., *Development of a Process for the Spinning of Synthetic Spider Silk*. ACS Biomater Sci Eng, 2015. **1**(7): p. 577–584.
- [7] Xu, H. T., et al., *Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice*. Anim Biotechnol, 2007. **18**(1): pp. 1–12.
- [8] Whittall, D. R., et al., *Host Systems for the Production of Recombinant Spider Silk*. Trends in Biotechnology, 2021. **39**(6): pp. 560–573.
- [9] Matthew, S. A. L. and F. P. Seib, *The Dawning Era of Anticancer Nanomedicines: From First Principles to Application of Silk Nanoparticles*. Advanced Therapeutics, 2025. **8**(1): p. 2400130.
- [10] Dunn, A.L., S.P. Ahuja, and E.S. Mullins, *Real-world experience with use of Antihemophilic Factor (Recombinant), PEGylated for prophylaxis in severe haemophilia A*. Haemophilia, 2018. **24**(3): pp. e84–e92.
- [11] Goel, N. and S. Stephens, *Certolizumab pegol*. MAbs, 2010. **2**(2): pp. 137–47.
- [12] *Polymer-Protein Conjugates: From Pegylation and Beyond*. 1 ed. 2019, Amsterdam: Elsevier. 512.
- [13] Jia, Q., R. Wen, and Q. Meng, *Novel Highly Soluble Chimeric Recombinant Spidroins with High Yield*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(18).
- [14] Connor, A., et al., *Novel insights into construct toxicity, strain optimization, and primary sequence design for producing recombinant silk fibroin and elastin-like peptide in E. coli*. Metabolic Engineering Communications, 2023. **16**: p. e00219.
- [15] Askarieh, G., et al., *Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay*. Nature, 2010. **465**(7295): pp. 236–238.
- [16] Kronqvist, N., et al., *Sequential pH-driven dimerization and stabilization of the N-terminal domain enables rapid spider silk formation*. Nature Communications, 2014. **5**(1): p. 3254.
- [17] Sarr, M., et al., *The dimerization mechanism of the N-terminal domain of spider silk proteins is conserved despite extensive sequence divergence*. Journal of Biological Chemistry, 2022. **298**(5): p. 101913.

- [18] Huang, Y., et al., *Scale up of fermentation of recombinant Escherichia coli for efficient production of spider drag silk protein MaSp1s and its dimers*. *Microb Cell Fact*, 2025. **24**(1): p. 108.
- [19] Li, X., et al., *Customized Flagelliform Spidroins Form Spider Silk-like Fibers at pH 8.0 with Outstanding Tensile Strength*. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022. **8**(1): pp. 119–127.
- [20] Schmuck, B., et al., *High-yield production of a super-soluble miniature spidroin for biomimetic high-performance materials*. *Materials Today*, 2021. **50**: pp. 16–23.
- [21] da Silva, A. J., et al., *Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in *E. coli* fed-batch cultures*. SpringerPlus, 2013. **2**(1): p. 322.
- [22] Kantner, T., B. Alkhwaja, and A.G. Watts, *In Situ Quenching of Trialkylphosphine Reducing Agents Using Water-Soluble PEG-Azides Improves Maleimide Conjugation to Proteins*. *ACS Omega*, 2017. **2**(9): pp. 5785–5791.
- [23] Arndt, T., et al., *Spidroin N-terminal domain forms amyloid-like fibril based hydrogels and provides a protein immobilization platform*. *Nature Communications*, 2022. **13**(1): p. 4695.
- [24] Zhao, Y., et al., *Observation of spider silk by femtosecond pulse laser second harmonic generation microscopy*. *Surface and Interface Analysis*, 2019. **51**(1): pp. 56–60.
- [25] Andersson, M., et al., *Biomimetic spinning of artificial spider silk from a chimeric minispidroin*. *Nature Chemical Biology*, 2017. **13**(3): pp. 262–264.
- [26] Heidebrecht, A., et al., *Biomimetic Fibers Made of Recombinant Spidroins with the Same Toughness as Natural Spider Silk*. *Advanced Materials*, 2015. **27**(13): pp. 2189–2194.
- [27] Teulé, F., et al., *Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers*. *Journal of Materials Science*, 2007. **42**(21): pp. 8974–8985.
- [28] Adrianos, S. L., et al., *Nephila clavipes Flagelliform Silk-Like GGX Motifs Contribute to Extensibility and Spacer Motifs Contribute to Strength in Synthetic Spider Silk Fibers*. *Biomacromolecules*, 2013. **14**(6): pp. 1751–1760.
- [29] Sponner, A., et al., *Composition and hierarchical organisation of a spider silk*. *PLoS One*, 2007. **2**(10): p. e998.