

Instytut Chemii Bioorganicznej  
Polskiej Akademii Nauk  
w Poznaniu



**Projektowanie i wytwarzanie cząstek wirusopodobnych jako  
nośników nanomateriałów**

mgr inż. Aleksander Strugała

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Systemowej

Promotor: prof. dr hab. Marek Figlerowicz

Promotor pomocniczy: dr hab. Anna Urbanowicz

Poznań 2022

*Pragnę złożyć najserdeczniejsze podziękowania mojemu promotorowi*

**Prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi**

*za przekazaną wiedzę, ogromny wkład w mój rozwój naukowy,  
nieocenione wsparcie merytoryczne, a także wyrazić wdzięczność  
za cenne wskazówki oraz inspirujące dyskusje  
dotyczące zarówno tematyki badawczej,  
jak i szeroko rozumianej filozofii,  
które były dla mnie inspiracją  
do poszukiwania prawdy  
i zrozumienia natury  
otaczającego mnie świata.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam promotor pomocniczej*

**Dr hab. Annie Urbanowicz**

*za niezastąpioną pomoc w planowaniu doświadczeń oraz kreatywne  
podejście w poszukiwaniu rozwiązań problemów biologicznych,  
a także za cierpliwość, wyrozumiałość i serdeczność  
okazywane przez wszystkie lata wspólnej pracy.*

*Dziękuję również*

**Kolegom i Koleżankom  
z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN  
oraz Europejskiego Centrum Bioinformatyki i Genomiki**  
*za stworzenie miłej atmosfery pracy  
i wspólnie spędzone lata.*

*Szczególne wyrazy wdzięczności składam mojej **Rodzinie**,  
przede wszystkim mojej żonie **Michalinie**, za wiarę we mnie i okazane wsparcie,  
moim dzieciom **Halszce, Ambrożemu i Bernardowi**  
za nieustające przypominanie, że poza pracą istnieje inny, równie piękny wymiar życia,  
moim **Rodzicom** za miłość, wychowanie i przygotowanie do dorosłego życia  
oraz mojej babci, **śp. Marii**, za nieustającą motywację do bycia wytrwałym w pracy naukowej.*

## SPIS TREŚCI

Streszczenie .....	5
Abstract .....	6
1. Wprowadzenie .....	7
2. Cel pracy .....	17
3 . Krótkie omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	18
4. Podsumowanie .....	28
5. Bibliografia.....	29
6. Wykaz używanych skrótów .....	34
7. Załączniki .....	37

Wykaz artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. **Strugała A**, Kręcisz M, Rybka JD, Urbanowicz A, Szpotkowski K, Bierwagen P, Figlerowicz M, Kozak M, Böttcher C, Giersig M. „Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method.” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017 Nov 15;1068-1069:157-163. doi:10.1016/j.jchromb.2017.10.022. Epub 2017 Oct 12.
2. Mieloch AA, Kręcisz M, Rybka JD, **Strugała A**, Krupiński M, Urbanowicz A, Kozak M, Skalski B, Figlerowicz M, Giersig M. „The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core.” *AIP Advances* 8, 035005(2018); doi 10.1063/1.5011138
3. **Strugała A**, Jagielski J, Kamel K, Nowaczyk G, Radom M, Figlerowicz M, Urbanowicz A. „Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System.” *Int J Mol Sci.* 2021 Mar 18;22(6):3098. doi: 10.3390/ijms22063098.

Wykaz artykułów nie wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ruszkowski M, **Strugała A**, Indyka P, Tresset G, Figlerowicz M, Urbanowicz A. “Cryo-EM reconstructions of BMV-derived virus-like particles reveal assembly defects in the icosahedral lattice structure.” *Nanoscale.* 2022 Feb 24;14(8):3224-3233. doi: 10.1039/d1nr05650f.
2. **Strugała A**, Bierwagen P, Rybka JD, Giersig M, Figlerowicz M, Urbanowicz A. “BMV Propagation, Extraction and Purification Using Chromatographic Methods.” *Bio Protoc.* 2018 Jul 20;8(14):e2935. doi: 10.21769/BioProtoc.2935. eCollection 2018 Jul 20.
3. Nawrocki MJ, **Strugała AJ**, Piotrowski P, Wudarski M, Olesińska M, Jagodziński PP. ”JHDM1D and HDAC1-3 mRNA expression levels in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus.” *Z Rheumatol.* 2015 Dec;74(10):902-10. doi: 10.1007/s00393-015-1619-9.
4. **Strugała AJ**, Jagodziński PP “Conversion of estrone to 17 beta-estradiol in Jurkat acute T cell leukemia Hut-78 T- and Raji B lymphoma cell lines in vitro.” *Biomed Pharmacother.* 2013 May;67(4):299-303. doi: 10.1016/j.biopha.2012.11.003. Epub 2012 Nov 20.

## STRESZCZENIE

Kapsydy wirusowe zdefiniować można jako naturalne białkowe nanokontenery. Małe rozmiary, stosunkowo prosta budowa, w przypadku wirusów roślinnych brak właściwości patogennych wobec organizmu ludzkiego, to cechy umożliwiające ich wykorzystanie jako bezpiecznych nośników biologicznie aktywnych substancji, także tych stosowanych w medycynie. Niniejsza praca poświęcona została zagadnieniom dotyczącym wykorzystania wirusa mozaiki stokłosa (BMV) do otrzymywania cząstek wirusopodobnych (VLP) oraz ich zastosowania jako nośników nanocząstek.

Pierwszy etap prac polegał na stworzeniu i optymalizacji nowej metody otrzymywania natywnego BMV. Opracowana metoda bazowała na technikach chromatograficznych i pozwalała całkowicie pominąć czasochłonny proces ultrawierowania, wcześniej standardowo stosowany w tego typu procedurach. Ocena jakości cząstek wirusowych uzyskanych nową metodą obejmowała pomiary wielkości wirionów oraz analizę struktury II-rzędowej białek kapsydowych (CP). Uzyskane tą drogą informacje potwierdziły wysoką jakość otrzymanych preparatów i stanowiły podstawę do dalszych prac zmierzających do wykorzystania kapsydów BMV jako nośników nanocząstek.

Kolejny etap badań koncentrował się wokół zagadnień dotyczących użycia uzyskanych wirionów do enkapsydacji nanocząstek tlenku żelaza. Nanocząstki funkcjonalizowane były poli(tlenkiem etylenu) oraz diheksadecylofosoforanem (DHP) w celu wprowadzenia na ich powierzchnię ujemnego ładunku. Uznaliśmy, iż zabieg ten jest konieczny, by wymusić tworzenie kapsydów wokół nanocząstek. Prace zakończono sukcesem, czyli otrzymaniem VLP z magnetycznym rdzeniem. Ponadto stwierdziliśmy, że w procesie składania VLP bardzo istotną rolę pełni zarówno ładunek na powierzchni enkapsydowanej cząstki, jak i struktura związku użytego do jej funkcjonalizacji.

Celem ostatniego etapu badań było otrzymanie i scharakteryzowanie VLP utworzonych ze zrekombinowanych CP wyprodukowanych w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Dodatkowo postanowiliśmy stwierdzić jaki wpływ na właściwości VLP wywiera struktura zawartego w niej polianionu (ustrukturyzowanego tRNA i nieustrukturyzowanego siarczanu polistyrenu (PSS)) oraz mutacje wprowadzone do CP. Uzyskane wyniki ujawniły istotny wpływ polianionu oraz oddziaływań CP-CP na trwałość i strukturę VLP.

## ABSTRACT

Viral capsids can be defined as natural protein nanocontainers. Small size, relatively simple structure, and in case of plant viruses no pathogenic properties for humans, these are the features that enable their use as safe carriers of biologically active substances, also those used in medicine. This paper is devoted to the issues related to the use of Brome mosaic virus (BMV) for the preparation of virus-like particles (VLP) and their use as carriers of nanoparticles.

The first stage of work was to create and optimize a new method of obtaining native BMV. The developed method was based on chromatographic techniques and allowed to completely omit the time-consuming ultracentrifugation process, previously standardized in such procedures. The evaluation of the quality of viral particles obtained with the new method included the measurements of virion size and the analysis of the second-order structure of capsid proteins (CP). The information obtained this way confirmed the high quality of the received preparations and formed the basis for further work aimed at using BMV capsids as carriers for nanoparticles.

The next stage of research focused on the issues related to the use of the obtained virions for the encapsidation of iron oxide nanoparticles. The nanoparticles were functionalized with poly (ethylene oxide) and dihexadecylphosphate (DHP) in order to introduce a negative charge to their surface. We decided that this procedure was necessary for the formation of capsids around nanoparticles. The work was successfully completed, i.e. obtaining a VLP with a magnetic core. Moreover, we found that both the charge on the surface of the encapsidated particle and the structure of the compound used for its functionalisation, play a very important role in the process of VLP assembly.

The aim of the last stage of the research was to obtain and characterize VLPs made from recombinant CPs produced in a bacterial expression system. In addition, we decided to find out what influence the structure of the polyanion (structured tRNA and unstructured polystyrene sulfonate (PSS)) and the mutations introduced into the CP have on the properties of the VLP. The obtained results revealed a significant influence of the polyanion and CP-CP interactions on the durability and structure of the VLP.

## 1. WPROWADZENIE

Nanotechnologia jest stosunkowo nową, dynamicznie rozwijającą się dziedziną, której zdobycze są coraz szerzej stosowane między innymi w medycynie i biotechnologii<sup>1</sup>. W ostatnich latach opracowano różne rodzaje nanocząstek mogących służyć jako leki, markery diagnostyczne, czy szczepionki. Bardzo ważnym zagadnieniem bezpośrednio związanym z praktycznym wykorzystaniem nanocząstek jest znalezienie odpowiedniego systemu do ich transportu. Jego podstawową funkcją jest ochrona transportowanych związków przed degradacją spowodowaną niespecyficznym metabolizmem, neutralizacją przez układ immunologiczny lub przedwczesnym wydalaniem z organizmu<sup>1</sup>. Dodatkowo, nośniki takie powinny umożliwiać dostarczenie transportowanych cząstek do docelowych komórek, np. nowotworowych. Co więcej, w przypadku zastosowań medycznych, nośniki nie mogą być toksyczne dla organizmu pacjenta. Powinny stosunkowo łatwo ulegać degradacji, tak by nie tworzyć złogów mogących być potencjalnym źródłem stanów zapalnych<sup>1,2</sup>. Niebagatelne znaczenie ma też sprawny i stosunkowo prosty mechanizm załadunku i rozładunku substancji czynnej. Aby sprostać powyższym wymaganiom bada się dziś wiele różnych typów nośników. Są wśród nich między innymi: nanorurki węglowe, liposomy, dendrymery, czy micelle polimerowe. Jednymi z najbardziej obiecujących typów nośników wydają się być cząstki bazujące na wirusach. Zasadniczo można wyróżnić dwa typy takich cząstek. W szerszym ujęciu mamy do czynienia z nanocząstkami wirusowymi (VNP). Pojęcie to obejmuje zmodyfikowane wirusy, np. poprzez modyfikacje kapsydu, zmiany w genomie lub dołączenie dodatkowej cząsteczki. Kluczowym elementem dla wyróżnienia VNP jest to, że materiał genetyczny wirusa pozostaje elementem tej nanocząstki. Drugim typem są cząstki wirusopodobne (virus-like particles, VLP). Są to cząstki zbudowane z białek kapsydu (CP) wirusa, które w odróżnieniu od cząstek wirusowych pozbawione są wirusowego materiału genetycznego. Mimo, że w teorii rozróżnienie VLP i VNP jest stosunkowo proste, w dostępnej literaturze pojęcia te nierzadko na siebie nachodzą. Potencjalne możliwości zastosowania cząstek bazujących na wirusach są ogromne<sup>1,3,4,5</sup>. Obecnie prowadzone badania skupiają się na skonstruowaniu VLP pełniących funkcję szczepionek, nośników leków, odczynników do obrazowania, terapeutyków bazujących na kwasach nukleinowych, czy rusztowań dla inżynierii tkankowej<sup>1</sup>. Jedną ze szczepionek użytych w walce z wirusem SARS CoV2 jest preparat firmy AstraZeneca, w którym jako wektor wykorzystany jest zmodyfikowany adenowirus<sup>6</sup>. Jest to szczepionka wektorowa, jednak jedne z pierwszych prób stworzenia szczepionki przeciw koronawirusom były prowadzone już na początku lat 2000 z wykorzystaniem VLP<sup>7</sup>. Użyty przez badaczy system bakulowirusowy służył do wytworzenia VLP złożonego z białek M, E i S koronawirusa<sup>7</sup>. Ekspozycja tego ostatniego białka na powierzchni VLP, stanowiła podstawę do prowadzenia dalszych badań mających na celu opracowanie szczepionki<sup>7</sup>. Według danych WHO, obecnie trwają prace nad

pięcioma różnymi typami szczepionek przeciw COVID których podstawą są VLP<sup>8</sup>. Przykładowo, grupie badaczy z Chin udało się stworzyć VLP złożone z rekombinowanych białek M i E SARS CoV, które zostały wyprodukowane w ssaczym systemie ekspresyjnym, a którego wykorzystanie pozwoliło białkom zachować właściwy schemat glikozylacji, co ma kluczowe znaczenie w rozpoznaniu antygeny przez układ odpornościowy człowieka<sup>9</sup>. Również wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZWB) jest chorobą przeciwko której intensywnie pracuje się nad szczepionką opartą o VLP. Wg danych WHO w roku 2019 na świecie żyło ok 296 milionów ludzi z przewlekłą odmianą WZWB, z czego ok. 820 000 osób zmarło z jej powodu<sup>10</sup>. W ciągu trzech ostatnich dziesięcioleci prowadzono prace nad 3 generacjami szczepionek bazujących na VLP, skierowanych przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (HBV). Pierwsza generacja szczepionki była oparta na VLP wyizolowanych z krwi zakażonych pacjentów. Druga bazowała na VLP złożonych z białka antygeny powierzchniowego HBV (HBsAg), które otrzymano w drożdżowym systemie ekspresyjnym<sup>10,11</sup>. Szczepionka trzeciej generacji, której przedstawicielem jest produkt Sci-B-Vac<sup>®</sup>, opiera się na VLP prezentującym 3 antygeny HBV. Białka użyte w Sci-B-Vac<sup>®</sup> zostały uzyskane w systemie ekspresyjnym komórek jajnika chomika chińskiego (CHO)<sup>12</sup>. Użycie 3 antygenów w jednej cząsteczce VLP skutkuje zwiększoną immunogennością szczepionki, w efekcie czego istnieje możliwość obniżenia stężenia podawanych dawek<sup>11</sup>. VLP wykorzystywane są także w badaniach nad stworzeniem szczepionek m. in. przeciwko wirusom: Ebola<sup>13</sup>, HPV<sup>14</sup>, malarii<sup>14</sup>, czy grypy<sup>15</sup>. Co więcej niektóre badania zaowocowały już komercyjnie dostępną szczepionką. Wśród nich, oprócz wspomnianej wyżej Sci-B-Vac<sup>®</sup>, są m.in. Gardasil-9<sup>®</sup> i Cervarix<sup>®</sup> (przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV)), Hecolin<sup>®</sup> (przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu E), czy Mosquirix<sup>™</sup> (przeciwko malarii)<sup>12</sup>.

Szczepionki działające na bazie wirusów są także przedmiotem badań pod kątem użycia ich w terapiach przeciwnowotworowych. W 2015 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) dopuściła do użytku nakierowany na czerniaka produkt o nazwie Talimogen laherparepvek (T-VEC), którego podstawę stanowi wirus onkolityczny – atenuowany wirus opryszczki typu 1 (HSV 1)<sup>16</sup>. Zasadą funkcjonowania wirusów onkolitycznych jest ich selektywna replikacja w komórkach nowotworowych. Prowadzi ona do lizy tych komórek, i uwolnienia antygenów przeciwnowotworowych. Również na polu terapii antynowotworowych trwają prace eksperymentalne nad szczepionką opartą o VLP. Badacze z Niemiec bazując na mysim modelu, wykorzystali rekombinowanego wirusa odry w walce z przerzutami<sup>17</sup>. Wspomniany wirus odry zawierał wewnątrz kapsydu kasetę ekspresyjną z sekwencją kodującą białka gag oraz antygeny TAA. Prezentacja antygenów TAA umieszczonych na VLP prowadziła do indukcji humoralnej odpowiedzi immunologicznej<sup>17</sup>. Innym przykładem użycia VLP, są badania nad zastosowaniem ich w walce z rakiem piersi, jajnika, płuc czy jelita grubego. W tych badaniach, prowadzonych na mysich modelach, wykorzystywano puste VLP bazujące na wirusie mozaiki wspięgi chińskiej (CPMV). W modelu raka płuc, pusty kapsyd CPMV aplikowano myszom poprzez inhalację. W



efekcie, aktywowane były m.in. neutrofile, co w konsekwencji prowadziło do produkcji cytokin i chemokin, które dalej indukowały reakcję antynowotworową<sup>18</sup>. W przypadku badań dotyczących modeli czerniaka i raka jajnika pusty kapsyd CPMV był aplikowany przez bezpośrednie zastrzyki do guza. Również w tym przypadku efektem takiej terapii była indukcja odpowiedzi antynowotworowej<sup>1,18</sup>. Badacze sugerują, że do wzbudzenia odpowiedzi immunologicznej doszło w odpowiedzi na wzorzec molekularny związany z patogenem (PAMP), który zawarty jest w strukturze wirusowego kapsydu<sup>18</sup>. Wyniki tych badań są o tyle ciekawe, że użyty pusty kapsyd wirusa CPMV nie był w żaden sposób modyfikowany.

Badania nad zastosowaniem VLP są także prowadzone pod kątem transportu leków. Przykładowo, kapsyd bakteriofaga MS2, który został zmodyfikowany poprzez dodanie peptydu kierującego SP94, testowany był jako nośnik antynowotworowych związków, takich jak: doksorubicyna (DOX), cisplatyna czy fluorouracyl (5-FU)<sup>19</sup>. Wprowadzenie peptydu SP94 miało na celu umożliwienie selektywnego wnikania VLP do komórek raka wątrobowokomórkowego (HCC). Wyniki testów wykazały 20 razy wyższą skuteczność antynowotworową DOX transportowanej przez VLP w porównaniu do DOX bez nośnika<sup>19</sup>. Użycie VLP bada się także w kontekście zastosowania ich w terapii m. in. chorób Parkinsona<sup>20</sup>, Alzheimer<sup>21</sup>, czy zakażenia syncytialnym wirusem oddechowym (RSV)<sup>22</sup>.

VLP mogą znaleźć zastosowanie również w diagnostyce jako transportery związków używanych w obrazowaniu z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), czy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET)<sup>1</sup>. Pierwiastkiem będącym podstawą większości związków kontrastowych używanych w rezonansie magnetycznym (MRI) jest gadolin (Gd). Niestety, jest on toksyczny dla człowieka i może odkładać się w narządach wewnętrznych. W odpowiedzi na ten problem, grupa badaczy analizowała możliwość wykorzystania wirusa chlorotycznej plamistości wspanięci (CCMV), jako nośnika dla Gd<sup>3+</sup>. Jego użycie skutkowałoby zmniejszeniem toksyczności przez izolację Gd wewnątrz kapsydu oraz skrócenie czasu przebywania tego pierwiastka w organizmie pacjenta. Wyniki badań prowadzonych dla różnych VLP pokazują, że charakteryzują się one stosunkowo krótkim czasem półtrwania w organizmie, liczącym nawet w minutach<sup>23,24,25</sup>. Dla porównania, nośniki, które stworzone są z syntetycznych materiałów mogą pozostawać w ciele pacjenta nawet przez kilka miesięcy<sup>26,27</sup>.

Cząstki bazujące na wirusach znajdują zastosowanie nie tylko w medycynie, ale także w biotechnologii. Jedną z technik, w których się je wykorzystuje jest metoda phage display. Polega ona na wprowadzeniu do genomu bakteriofaga sekwencji kodującej pożądane białko. Podczas kolejnych cykli replikacyjnych wirusa, wprowadzone białko ulega translacji i ekspozycji na powierzchni kapsydu, dzięki czemu jego detekcja jest ułatwiona. Metoda ta z powodzeniem znajduje zastosowanie w poszukiwaniu białek i peptydów wiążących m. in. antygeny nowotworowe<sup>28,29</sup>. VLP wykorzystywane są również jako elementy składowe biosensorów<sup>1</sup>. Przykładem mogą być VLP utworzone z białka kapsydu cirkowirusa świń typu 3 (PCV3), które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce opartej o test ELISA. Metodę tą

wykorzystuje się w celu detekcji przeciwciał anti-PCV3 w świńskiej surowicy<sup>30</sup>. Kapsydy wirusów używa się także w testach diagnostycznych, gdzie pełnią rolę osłonki dla kwasu nukleinowego będącego próbką kontrolną<sup>1</sup>. Kapsyd bakteriofaga MS2 chroni fragment genu *gag* ludzkiego wirusa niedoboru odporności typu pierwszego (HIV-1), stanowiący kontrolę pozytywną w testach na obecność wirusa HIV<sup>31</sup>. Podobną strategię obrano w przypadku prac nad testem do wykrywania enterowirusa (EV71)<sup>32</sup>. VLP znajdują też zastosowanie w badaniach nad nanoreaktorami. Idea nanoreaktorów polega na zamknięciu enzymu we wnętrzu VLP. Dzięki temu jest on odporny na degradację. Co więcej, rozmiary porów w kapsydzie umożliwiają w miarę swobodny przepływ substratów i produktów reakcji katalizowanej przez zamknięty wewnątrz enzym. W efekcie, cała reakcja może przebiegać z większą wydajnością<sup>33</sup>. Przykładem takiej struktury może być kapsyd wirusa CCMV zawierający w swoim wnętrzu lipazę B z gatunku *Candida antarctica*<sup>34</sup>. Niektóre nanoreaktory mogą pomieścić większą liczbę białek. VLP uzyskane na bazie bakteriofaga P22 zostały użyte do zapakowania 3 enzymów biorących udział w metabolizmie laktozy<sup>35</sup>.

VLP wykorzystywane są także w technikach agrarnych. VLP stworzone na bazie wirusa nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej (RCNMV) były badane jako nośniki dostarczające do ziemi uprawnej insektycyd – abamektynę, stosowaną w celu zwalczania żerujących na roślinach uprawnych nicieni<sup>36</sup>. Wykazano, że abamektyna umieszczona we wnętrzu VLP charakteryzowała się większą skutecznością niż insektycyd w formie wolnej.

Zdolność wirusowych kapsydów do samoskładania może być wykorzystana również w rozwoju energetyki: do pobierania, gromadzenia i transferu energii. Wirusy takie jak wirus mozaiki tytoniu (TMV) i bakteriofag M13 dodatkowo posiadają zdolność do tworzenia długich, helikalnych struktur, które mogą być użyte np. przy konstruowaniu nanokabli<sup>37,38</sup>. Same nanokable znajdują zastosowanie przy tworzeniu urządzeń takich jak tranzystory<sup>39</sup>, lasery<sup>40</sup>, baterie<sup>41</sup>, czy mikromanipulatory używane w mikroskopii TEM<sup>42</sup>. Jednak wykorzystanie białek kapsydów wirusowych jako dodatkowego elementu biologicznego w procesie ich tworzenia, może mieć szereg pozytywnych implikacji, takich jak choćby zwiększenie kontroli nad procesem powstawania nanokabli (w tym ich rozmiarów), zwiększenie stabilności w szerokim spektrum pH oraz łatwa skalowalność produkcji<sup>34,43</sup>. Wykorzystanie białek kapsydów wirusowych przy tworzeniu nanokabli jest w początkowej fazie rozwoju, jednak wydaje się, że ta gałąź inżynierii będzie się bardzo szybko rozwijać.

Wirusy badane są też pod kątem wykorzystania ich przy tworzeniu bio-półprzewodników, które mogą znaleźć zastosowanie biomedyczne<sup>44</sup>. Projekty takie opierają się na możliwości modyfikacji wirusów poprzez różne procesy, takie jak mineralizacja zewnętrznej lub wewnętrznej strony kapsydu, czy połączenie z materiałami przewodnikowymi lub półprzewodnikowymi.

VLP były wykorzystywane również w badaniach nad stworzeniem sztucznego systemu absorbującego światło, który imituje maszynę roślinnych fotosystemów<sup>1</sup>. W takiej konstrukcji, wirusowe kapsydy najczęściej pełnią rolę rusztowania, do którego przyczepia się chromofory absorbujące fotony.

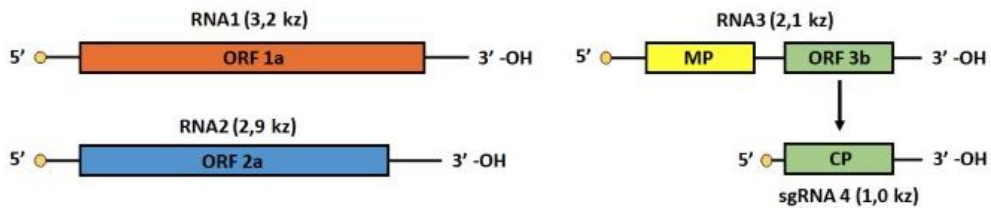
Powyższe przykłady pokazują olbrzymi potencjał aplikacyjny kapsydów wirusowych. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się VLP wywodzące się z wirusów roślinnych<sup>1</sup>. Wynika to z charakterystycznych dla nich cech, takich jak: niewielkie rozmiary, prosta budowa (wirusy roślinne nie posiadają osłonki lipidowej, a ich kapsyd najczęściej złożony jest z jednego typu białka (CP)), a także wysoka stabilność względem trudnych warunków środowiskowych (zdolne do infekcji wirusy roślinne znajdowane były m.in. w chmurach, we mgle, w morzu, jeziorach glacialnych, glebie, czy ściekach)<sup>45</sup>. Co więcej, produkcja CP wirusów roślinnych jest relatywnie prosta i tania, a sam VLP może być w kontrolowany sposób rozkładany i składany przez zmianę parametrów roztworu w którym się znajduje, takich jak pH, siła jonowa, czy temperatura<sup>46</sup>. Ważną cechą sprzyjającą wykorzystaniu VLP wywodzących się z patogenów roślinnych w medycynie jest fakt, że wirusy te nie namnażają się w organizmie człowieka nie są więc dla niego groźne<sup>45,47</sup>. Co prawda obecność wirusów roślinnych, które zachowują zdolność do infekcji, potwierdzono w próbkach ludzkiego kału, a wirusa TMV wykryto także w ślinie i w płucach palaczy, to powyższe obserwacje nie wiązały się z występowaniem objawów chorobowych u badanych osób<sup>45,47</sup>. Wykazano również, że obecność niektórych wirusów roślinnych, takich jak np. wirus ziemniaka Y (PVY), czy TMV w organizmie myszy skutkowało u nich zwiększoną produkcją przeciwciał IgG. Jednak i w tym przypadku nie korelowało to z występowaniem objawów chorobowych<sup>45,48</sup>. Inne badania dotyczące przekraczania barier międzygatunkowych, które były oparte o analizy *in vitro*, wykazały, że RNA wirusa TMV może ulegać translacji w oocytach żaby *Xenopus laevis*<sup>49</sup>, a wirus CPMV może oddziaływać z wimentyną - białkiem cytoszkieletu eukariontów, i w konsekwencji wnikać do wnętrza komórek ssaczy<sup>50</sup>. Zaobserwowano również, że wirus CPMV, 3 dni po wprowadzeniu do krwioobiegu myszy, nadal był obecny w różnych organach tego gryzonia, m. in. w płucach, nerkach, śledzionie, dwunastnicy, czy mózgu, a także w węzłach chłonnych, szpiku kostnym czy krwi<sup>51</sup>. Wynika stąd, że cały czas nie mamy pełnej wiedzy na temat oddziaływania wirusów roślinnych z różnymi organizmami, w tym, wydawać by się mogło, tak odległymi gatunkowo jak człowiek, czy ssaki w ogóle. Jednakże długa koegzystencja gatunku ludzkiego i wirusów roślinnych, przy jednoczesnym braku jednoznacznych oznak chorobowych, predestynują te ostatnie do użycia ich w medycynie.

Wirus mozaiki stokłosa (BMV) jest jednym z najlepiej poznanych wirusów roślinnych. Jego średnica wynosi ok. 28 nm. Genom wirusa BMV to podzielony na 3 części jednoniciowy RNA o dodatniej polarności (ssRNA(+)) (Rys.1.A)). Każda z genomowych cząsteczek pakowana jest do osobnego wirionu. Dwie pierwsze cząsteczki RNA (RNA1 i RNA2) mają ok. 3,2 kb i 2,9 kb i zawierają sekwencje kodujące białka 1a i 2a. Białka te odpowiadają za replikację wirusowego materiału genetycznego. Trzecia

cząsteczka genomowa (RNA3) jest krótsza (2,1 kb) i zawiera dwie ramki odczytu. Kodują one kolejno białko MP oraz białko kapsydu (CP). Sekwencja kodująca CP, ulega ekspresji poprzez subgenomowy RNA (sgRNA 4) o wielkości 0,8 kb, który jest pakowany do wirionu razem z RNA3. Białko MP jest wykorzystywane przez wirusa do systemicznej infekcji rośliny.

Cząsteczki RNA wirusów ssRNA(+) pełnią dwie główne funkcje. Z jednej strony odgrywają rolę analogiczną dla eukariotycznego mRNA, czyli są matrycą dla biosyntezy białek. Z drugiej strony są matrycą dla replikacji wirusowego materiału genetycznego. Cząsteczki RNA BMV posiadają na końcu 5' czapkę – 7-metyloguanozynę, przyłączoną do wirusowego RNA wiązaniem 5'-5' trójfosforanowym. Funkcją czapki jest ochrona wirusowego RNA przed degradacją. Na końcu 3' RNA wirus BMV posiada region nie ulegający translacji (UTR)<sup>52</sup>. Region UTR składa się z 3 pseudowęzłów oraz charakterystycznego odcinka obejmującego ok. 200 nt, a który swoją strukturą przestrzenną przypomina tRNA (TLS). Fragment TLS wirusa BMV może ulec aminoacylacji tyroziną i pełni kilka zasadniczych funkcji<sup>53,54</sup>. Przede wszystkim zabezpiecza cząsteczkę RNA przed degradacją, będąc analogiem telomeru. Jest również elementem promotorowym, który inicjuje replikację ujemnej cząsteczki RNA oraz translację białek<sup>53</sup>. Z uwagi na fakt, że wirusowy RNA jest matrycą zarówno dla replikacji jak i translacji, TLS pełni także funkcję regulatorową obu procesów, tak aby nie zachodziły one w tym samym czasie<sup>53,55</sup>. TLS odgrywa również ogromną rolę w procesie składania kapsydu BMV w warunkach naturalnych. Warto zwrócić uwagę, że TLS występuje u wielu wirusów roślinnych, może mieć odmienną budowę i nie zawsze pełni te same funkcje<sup>52</sup>. Motywy TLS obecne w genomowych cząsteczkach RNA1, RNA2 i RNA3 BMV różnią się kilkoma nukleotydami, co wpływa na ich nieco odmienne właściwości<sup>54</sup>. Badania, w których usuwano i zamieniano odcinki TLS między poszczególnymi cząsteczkami RNA wirusa BMV skutkowało zmianą wydajności transkrypcji i translacji poszczególnych fragmentów RNA<sup>54</sup>.

A)



B)

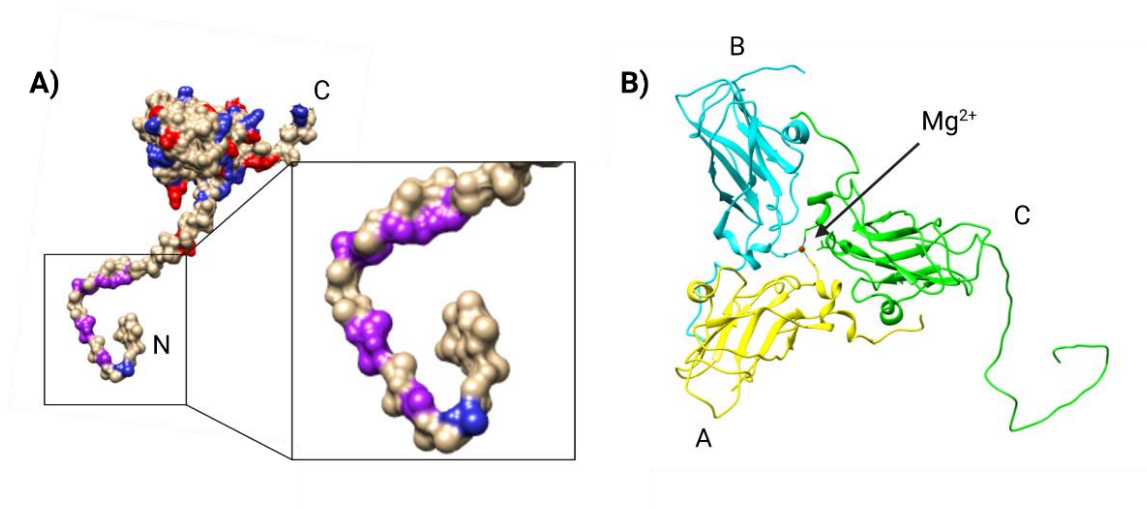


**Rys. 1 Wirus mozaiki stokłosy (BMV).** A) Genom wirusa składa się z 3 pojedynczych nici RNA(+) oraz z subgenomowego RNA4. RNA1 i RNA2 zawierają sekwencje kodujące białka biorące udział w replikacji materiału genetycznego BMV. Nici RNA1 i RNA2 są pakowane do oddzielnych wirionów. RNA3 zawiera sekwencję kodującą białko MP oraz sekwencję będącą matrycą dla syntezy sgRNA4. RNA3 i sgRNA4 pakowane są razem do jednego kapsydu. Każdy RNA posiada czapkę na końcu 5' oraz TLS na końcu 3'. B) Kapsyd BMV posiada strukturę ikozaedralną (T=3). Na schemacie zaznaczono charakterystyczne jej elementy. Na czerwono przedstawiony trimer CP (A, B i C odpowiadają oznaczeniom poszczególnych monomerów CP). Na zielono zaznaczone zostały monomery CP tworzące przykładowe pentamery. Na niebiesko zaznaczone zostały monomery CP tworzące przykładowe heksamery. Rysunek wykonany za pomocą BioRender.com;

Kapsyd BMV składa się ze 180 białek CP i przyjmuje ikozaedryczną strukturę<sup>56</sup> (Rys. 1.B). Wirusowe kapsydy opisywane są liczbą triangulacji T, która została zaproponowana przez duet badaczy, Caspara i Kluga, jeszcze w latach 60-tych XX wieku<sup>57</sup>. Odpowiada ona 60 podjednostkom białkowym oraz ich wielokrotności. I tak, dla przykładu, T=1 oznacza, że na kapsyd składa się 60 białek, dla T=3 tych białek jest 180, a dla T=4: 240. W przypadku BMV T wynosi więc 3. Badania nad strukturą przestrzenną wirusowych kapsydów wykazały, że składa się on z heksamerów i pentamerów. Liczba pentamerów w kapsydie o ikozaedrycznej budowie jest stała i niezależnie od liczby T, wynosi 12, natomiast liczbę heksamerów można obliczyć dla danego wirionu na podstawie wzoru  $10(T - 1)$ .

Monomer CP składa się ze 189 aminokwasów. Ma on globularną budowę, z wystającym do wnętrza kapsydu końcem aminowym (Rys. 2.A). Pierwsze 25 reszt aminokwasowych końca aminowego CP, to

region bogaty w argininy (ARM). Odcinek ten nadaje dodatni ładunek tej części białka, dzięki czemu może ono oddziaływać elektrostatycznie z ujemnie naładowanym RNA wirusa, będąc tym samym jednym z ważniejszych elementów inicjujących składanie kapsydu oraz stabilizujących jego strukturę. Kluczowym elementem dla efektywnego wykorzystania wirusów jako systemu nośnikowego jest poznanie mechanizmu składania kapsydu. Proces ten przebiega w zależności od typu wirusa, budowy CP, długości i struktury genomu wirusowego (RNA, czy DNA; nić pojedyncza czy podwójna);<sup>58</sup>. Niezależnie jednak od różnic, samoorganizacja kapsydu zachodzi dzięki wzajemnym oddziaływaniom poszczególnych części wirionu<sup>59,60</sup>.



**Rys. 2 Białko kapsydu (CP) wirusa BMV.** **A)** Monomer CP z zaznaczonymi końcami aminowym (N) oraz karboksylowym (C). Na niebiesko zaznaczone są aminokwasy o polarności dodatniej, na czerwono o polarności ujemnej. Fragment w ramce ukazuje powiększony odcinek aminowego końca CP, który jest bogaty w reszty argininy (ARM). Argininy zaznaczone są na fioletowo. **B)** Trimer CP ze związanym pośrodku atomem  $Mg^{2+}$  (zaznaczonym na czerwono oraz wskazanym przez strzałkę). Poszczególne łańcuchy trimery są odpowiednią literą i kolorem (łańcuch A – żółty, łańcuch B – cyjan, łańcuch C – zielony, rysunek wykonany przy użyciu BioRender.com oraz UCSF Chimera, na podstawie pliku PDB 1JS9);

W przypadku BMV głównym czynnikiem determinującym proces składania kapsydu są oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy aminowym końcem CP, oraz ujemnie naładowaną cząsteczką genomowego RNA. O wysokiej skuteczności tego mechanizmu obserwowanego u wirusów z rodziny *Bromoviridae* świadczy brak pustych kapsydów BMV i CCMV w warunkach naturalnych<sup>54,59</sup>. Podstawową jednostką budulcową kapsydu BMV są dimery CP. Mechanizm składania kapsydów wirusowych *in vivo* nie jest w pełni poznany, jednak dane uzyskane *in vitro*, przedstawiają dwa modele składania ikozaedralnego kapsydu<sup>46,54</sup>. Pierwszy z nich zakłada rozpoczęcie procesu składania otoczki białkowej od uformowania załączka (nucleus), po którym następuje przyłączenie kolejnych CP aż do powstania pełnego kapsydu. Załączek powstaje poprzez oddziaływanie kilku dimerów CP z pakowanym RNA<sup>46</sup>. W badaniach mechanizmu składania kapsydu CCMV, prowadzonych z wykorzystaniem modeli matematycznych

zauważono, że tworzony załączek przyjmował formę pentameru<sup>61,62</sup>. Z analizy Złotnicka i współpracowników wynika, że pentamer, będący załączkiem kapsydu jest złożony z dimerów CP<sup>61</sup>. Co więcej, autorzy pracy podkreślają, że mechanizm składania kapsydu pustego oraz z RNA może być zupełnie różny. Modelowanie procesu składania kapsydu CCMV metodą Monte Carlo (MC) potwierdziło wcześniejsze hipotezy dotyczące załączka kapsydu przyjmującego formę pentameru, jednak nie wskazało by był on złożony z dimerów<sup>62</sup>. Nie można jednak wykluczyć, że pierwsza struktura tworząca załączek składa się z dimerów, które są podstawową jednostką budulcową kapsydu. Utworzenie pentameru połączonego z wirusowym RNA jest momentem krytycznym dla tworzenia całego kapsydu. Z tych samych badań wynika, że kiedy już załączek zostanie uformowany (przyłączonych zostanie 4 lub 5 podjednostek), proces budowy kapsydu staje się bardziej korzystny energetycznie i zachodzi już dużo szybciej<sup>62</sup>. Symulacja metodą MC pokazała, że tworzenie załączka trwa około 70 sekund, a dalsze formowanie kapsydu jedynie 33 sekundy, aczkolwiek dla innych wirusów te czasy mogą być różne<sup>62</sup>. Nie bez znaczenia przy składaniu kapsydu jest także stężenie CP. Im większe stężenie, tym proces formowania zachodzi szybciej<sup>62</sup>.

Istotnym elementem w procesie składania kapsydów u niektórych wirusów jest TLS. Fragment ten może pełnić różne funkcje u różnych gatunków tych patogenów. Widać to wyraźnie na przykładzie dwóch bliskich filogenetycznie wirusów: BMV i CCMV. Brak TLS u BMV skutkuje niemożnością złożenia kapsydu *in vitro*. W przypadku CCMV, TLS nie jest elementem koniecznym do tego by mógł powstać pusty kapsyd<sup>63</sup>. Co więcej, kapsyd CCMV może ulec złożeniu, zamykając wewnątrz, pozbawiony odcinka TLS, genom wirusa BMV. Z drugiej strony, CP BMV w obecności pozbawionego fragmentu TLS RNA BMV, nie mogą uformować kapsydu. Dopiero dodanie do roztworu TLS lub tRNA powoduje, że CP składa się w płaszcz białkowy wirusa. Różnice w roli TLS w składaniu kapsydów obu wirusów mogą być spowodowane tym, że infekują one różne typy roślin i mają nieco odmienny system propagacji wewnątrz zakażonego organizmu<sup>63</sup>. Niemniej, świadczy to o tym, że TLS jest dla BMV istotnym czynnikiem wpływającym na składanie kapsydu.

Drugi model składania kapsydu, nazywany „*en masse*”, zakłada, że liczne CP przyłączają się do wirusowego RNA w tym samym czasie nie tylko do TLS, tworząc kilka załączków formowania się kapsydu. Początkowo proces składania jest nieuporządkowany. Podobnie jak w pierwszym opisywanym modelu, dopiero przyłączenie odpowiedniej liczby CP, prowadzi do rearanżacji całego kapsydu, i przyjęcia ostatecznej struktury. Czynnikiem wzmacniającym oddziaływanie RNA-CP w warunkach *in vitro* jest obniżenie siły jonowej buforu. Wynika to z elektrostatycznej natury oddziaływania RNA-CP. Wysoka siła jonowa roztworu powoduje, że duża liczba jonów znajdujących się w roztworze wiąże się z RNA i CP, uniemożliwiając tym samym ich wzajemne oddziaływanie. Obniżenie siły jonowej prowadzi do tego, że coraz mniej jonów ekranuje oddziaływania RNA-CP, a co za tym idzie, umożliwia im wzmocnienia wzajemnych interakcji.

W obu opisywanych modelach bardzo ważnym etapem formowania się kapsydu jest strukturyzacja kompleksu nukleoproteinowego, która opiera się na słabych, ale licznych, hydrofobowych oddziaływaniach CP-CP<sup>46,64</sup>. Wzmocnienie tych oddziaływań wzrasta wraz ze spadkiem pH. Wynika to z faktu, że wraz z obniżeniem pH dochodzi do protonowania reszt aminokwasowych CP. W rezultacie skutkuje to z jednej strony osłabieniem oddziaływań elektrostatycznych, które odpowiadają za wzajemne odpychanie podjednostek kapsydowych, a z drugiej wzmocnieniem oddziaływań hydrofobowych, które są odpowiedzialne za ich przyciąganie. Zjawisko to jest wykorzystywane podczas składania VLP *in vitro*, gdzie obniżenie pH skutkuje stabilizacją struktury wirionu.

Wirusy BMV i CCMV były już badane pod kątem możliwości ich użycia jako transporterów nanocząstek. Z powodzeniem wewnątrz kapsydu BMV zamknięto między innymi: nanocząstki złota, tlenku żelaza, czy kropki kwantowe<sup>65,66</sup>. We wszystkich przypadkach elementem kluczowym dla efektywnego zapakowania nanocząstek były oddziaływania elektrostatyczne między ujemnie naładowaną nanocząstką, a dodatnio naładowanym fragmentem CP. Ujemny ładunek uzyskiwano najczęściej przez opłaszczenie nanocząstki glikolem polietylowym (PEG).

Mechanizm rozkładania i ponownego składania kapsydu nie jest jedynym sposobem na wprowadzenie nanocząstek do wnętrza otoczki białkowej. Małe związki, takie jak np. DOX, czy barwniki, można umieścić wewnątrz kapsydu wykorzystując zjawisko jego pęcznienia<sup>67</sup>. Zjawisko to zostało dobrze opisane na przykładzie wirusa RCNMV i polega na osłabieniu siły oddziaływań między białkami, na tyle, by CP oddaliły się od siebie zwiększając rozmiar porów w kapsydzie. Podstawą tego mechanizmu jest usunięcie jonów dwuwartościowych, takich jak  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  z kapsydu oraz podwyższenie pH. W natywnych wirionach BMV i CCMV w przestrzeni pomiędzy trzema podjednostkami CP znajdują się jony  $Mg^{2+}$ , które stabilizują ich strukturę (Rys. 2 B). W przypadku wirusa BMV jon  $Mg^{2+}$  koordynowany jest przede wszystkim przez grupy karboksylowe kwasów glutaminowych znajdujące się w pozycji 84 każdego z trzech łańcuchów CP<sup>56</sup>. Z analizy struktury krystalograficznej BMV wynika dodatkowo, że oprócz kwasu glutaminowego, w pobliżu jonu  $Mg^{2+}$  znajdują się także reszty kwasu asparaginowego oraz treoniny, które będąc w odległości 6Å mogą z nim oddziaływać za pomocą mostków wodorowych dodatkowo stabilizując całą strukturę<sup>56</sup>. Usunięcie tych jonów osłabia oddziaływanie CP-CP i prowadzi do wzmocnienia odpychających sił między podjednostkami białkowymi, szczególnie, jeśli nastąpi dodatkowo wzrost pH, gdyż powoduje on deprotonację części reszt aminokwasowych. W rezultacie, przyciągające białka oddziaływania hydrofobowe stają się słabsze, natomiast rosnące w siłę elektrostatyczne oddziaływania odpychające prowadzą do oddalania się od siebie CP. W pH 7 kapsyd CCMV nie rozpada się, lecz zwiększa się jego średnica podobnie jak średnica występujących w nim porów<sup>68,69</sup>. Są one na tyle duże, że małe związki, jak np. wspomniana wyżej DOX może bez problemu przeniknąć do wnętrza kapsydu.



## 2. CEL PRACY

Celem pracy doktorskiej było opracowanie wydajnych metod pozyskiwania białek kapsydu BMV oraz konstruowania na ich bazie cząstek wirusopodobnych mogących pełnić funkcje nośników nanocząstek. Osiągnięcie tego celu wymagało realizacji następujących zadań:

- (I) Opracowania metody pozyskiwania homogennych preparatów BMV z zakażonych wirusem roślin.
- (II) Opracowania metody wprowadzania nanocząstek do wnętrza kapsydu BMV.
- (III) Opracowania metody produkcji rekombinowanego białka kapsydu BMV.
- (IV) Wykazania, iż modyfikując rekombinowane białka kapsydu BMV można otrzymywać VLP o nowych właściwościach.

### 3. KRÓTKIE OMÓWIENIE WYNIKÓW PRZEDSTAWIONYCH W PUBLIKACJACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Szeroko stosowaną metodą oczyszczania cząstek wirusowych izolowanych z roślin jest ultrawierowanie w gradiencie chlorku cezu lub sacharozy<sup>56</sup>. Rozpoczynając pracę z VLP szukaliśmy alternatywnego sposobu oczyszczania wirusów, który umożliwiałby pominięcie żmudnego etapu ultrawierowania. Ze względu na wysoką wydajność oraz praktycznie nieograniczoną możliwość zwiększania lub zmniejszania skali eksperymentu zdecydowaliśmy się na zastosowanie chromatografii cieczowej FPLC. Efekty prac nad optymalizacją procedury oczyszczania wirusa BMV zostały przedstawione w pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej. Oprócz szczegółowego opisu procedury oczyszczania BMV, w pracy zawarliśmy także wyniki biofizycznych analiz jakości otrzymanego preparatu. Badania biofizyczne zostały wykonane we współpracy z zespołem kierowanym przez prof. M. Giersiga, w skład którego wchodziłi: Monika Kręcisz, Jakub Rybka, Maciej Kozak i Christoph Böttcher.

Izolację wirusa BMV przeprowadzaliśmy standardową i szeroko stosowaną metodą opracowaną przez J. Bujarskiego polegającą na ekstrakcji fenolem i chloroformem i wytrąceniu z użyciem PEG<sup>70</sup>. Do oczyszczenia wirionów wykorzystaliśmy techniki chromatograficzne. Stwierdziliśmy, że dwuetapowe oczyszczanie z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej ze złożem dietyloaminoetylocelulozowym (DEAE-C) oraz sączenia molekularnego (SEC) pozwala uzyskać preparat o bardzo wysokiej czystości. Analiza metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) pokazała, że otrzymane próbki BMV nie zawierały agregatów i charakteryzowały się dużą jednorodnością wirionów. Koronnym dowodem potwierdzającym, iż zastosowana procedura oczyszczania nie wpływa negatywnie na strukturę wirionów BMV były ich obrazy uzyskane przy użyciu mikroskopu Cryo-TEM. Zdjęcia te zostały wykonane przez dr Christoph'a Böttchera, na Freie Universität w Berlinie.

Opracowana przez nas metoda oczyszczania BMV daje co najmniej tak dobre rezultaty jak protokoły oparte na ultrawierowaniu. Dodatkowo jest ona relatywnie łatwa w skalowaniu względem pożądanej ilości materiału wyjściowego, dzięki czemu stanowi realną alternatywę dla już istniejącej metody oczyszczania wirusów.

W pracy przedstawione zostały również wyniki analiz biofizycznych BMV oczyszczonego przy pomocy metod chromatograficznych. Obejmowały one pomiary przy użyciu spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR) wykonane przez Monikę Kręcisz z Centrum Zaawansowanych Technologii (CZT) w Poznaniu, a także statycznego rozpraszania światła (SLS), DLS, i dichroizmu kołowego (CD), które zostały przeprowadzone przez Kamila

Szpotkowskiego z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Wyniki eksperymentów wykazały, że pH roztworu wpływa na średnicę wirusowego kapsydu, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami poczynionymi dla innych wirusów roślinnych, takich jak: wirus kędzierzawości rzepy (TCV), CCMV, czy wirus krzaczastej karłowatości pomidora (TBSV)<sup>71,72,73,74</sup>. Z naszych badań wynika, że wzrost pH buforu, w którym znajduje się wirus z 5,6 do 8,4, skutkuje powiększeniem średnicy kapsydu o ok. 7%. Analiza SLS ujawniła dodatkowo, że wzrost pH, koreluje ze spadkiem wartości drugiego osmotycznego współczynnika wirusowego ( $B_{22}$ ). W praktyce, obniżenie wartości współczynnika  $B_{22}$  oznacza osłabienie oddziaływań odpychających między wirionami.

Wpływ pH na strukturę II-rzędową białek kapsydu BMV określony został na podstawie pomiarów CD i ATR-FTIR. Oba pokazały, że zmiana pH w przedziale 5,6-8,4 powoduje jedynie nieznaczne rearanżacje II-rzędowej struktury białka, chociaż konkretne wyniki liczbowe były różne, podobnie jak analogiczne parametry określone na podstawie struktury krystalograficznej. Różnice te wynikają najprawdopodobniej z zastosowania odmiennych buforów. Obserwacje te raz jeszcze potwierdzają, że skład buforu w którym umieszczony jest wirus, ma istotny wpływ na strukturę II-rzędową CP.

Podsumowując, w pierwszej pracy zaprezentowaliśmy nową chromatograficzną metodę oczyszczania BMV. Pokazaliśmy, że jest ona atrakcyjną alternatywą dla technik dotychczas stosowanych. Główną zaletą nowo opracowanej metody jest łatwość skalowania ilości preparatu oraz większa możliwość kontroli procesu oczyszczania. Pomiar jakości uzyskanych wirionów świadczą, że preparaty BMV oczyszczone metodą chromatograficzną stanowią dobry materiał do dalszych prac nad wykorzystaniem VLP jako nośników nanocząstek. Metoda oczyszczania BMV w oparciu o techniki chromatograficzne została również przez nas szczegółowo przedstawiona w nie załączonej do rozprawy pracy pod tytułem: „*BMV Propagation, Extraction and Purification Using Chromatographic Methods*”. Analizy biofizyczne wirusa w fizjologicznym spektrum pH wskazują na wysoką stabilność i trwałość wirionów i jako całość stanowią cenne uzupełnienie stanu wiedzy na temat BMV.

Kolejnym celem moich badań było opracowanie efektywnych metod pakowania nanocząstek do kapsydów BMV. Sposób jego osiągnięcia przedstawiony został w pracy zatytułowanej „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*”. Proces pakowania nanocząstek do wirusowego kapsydu zależy jest od właściwości pakowanej nanocząstki, a w szczególności jej ładunku powierzchniowego oraz mechanizmu składania kapsydu. Pakowanym elementem w naszych badaniach były nanocząstki tlenku żelaza, które wykazywały właściwości superparamagnetyku (SPION). Zaletami SPION, są: niska toksyczność, stosunkowo wysoka wydajność metody ich otrzymywania oraz możliwość modyfikowania ich

powierzchni. Superparamagnetyczne właściwości otwierają drogę do wykorzystania tej nanocząstki w biologii i medycynie m. in. w celowanym obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego lub jako nośniki leków<sup>75,76,77,78</sup>. Nanocząstki tlenku żelaza (III) były otrzymane poprzez dysocjację termiczną acetyloacetonu żelaza (III) z kwasem oleinowym. Proces syntezy, funkcjonalizacji oraz pakowania nanocząstek do kapsydu BMV, był prowadzony we współpracy z Adamem Mielochem oraz Moniką Kręcisz w CZT. Rozmiar i kształt nanocząstek określono przy pomocy CryoTEM w Berlinie. Właściwości superparamagnetyczne nanocząstek zostały potwierdzone przez Monikę Kręcisz z CZT przy pomocy urządzenia do pomiaru natężenia pola magnetycznego (SQUID). W wyniku tych analiz wykazano, że koercja magnetyczna dla nanocząstki osiągała wartość około 0 Oe w temperaturze 300 K, co świadczy o jej superparamagnetycznych właściwościach. Z uwagi na obecność kwasu oleinowego na powierzchni nanocząstek, konieczna była ich funkcjonalizacja. Miała ona na celu umieszczenie ujemnego ładunku na powierzchni cząstek tlenku żelaza i zwiększenie rozpuszczalności nanocząstek w roztworach wodnych. Ujemny ładunek nadany cząstkom SPION miał również umożliwić ich oddziaływanie z dodatnio naładowanym końcem aminowym białka CP i w rezultacie, doprowadzenie do złożenia pełnego kapsydu. Funkcjonalizacja polegała na przyłączeniu do powierzchni nanocząstek tlenku żelaza związków: distearoilu-sn-glicero-3-fosfoetanoloamino-N-[karboksy(PEG)2000] (COOH-PEG-PL) lub fosforanu diheksadecylu (DHP). Średnica otrzymanych SPION wynosiła w przybliżeniu 15 nm. Celem przyłączenia COOH-PEG-PL lub DHP było także zwiększenie średnicy nanocząstek do 18 nm, dzięki czemu powinny one idealnie wpasować się w kapsyd BMV.

Wirusy były izolowane i oczyszczane zgodnie z procedurą opisaną w pierwszej prezentowanej pracy. Następnie wirusy poddawane były dializie i wirowaniu, w celu rozbicia wirionów na pojedyncze CP i usunięcia wirusowego RNA. Usunięcie materiału genetycznego zwiększa poziom bezpieczeństwa preparatu, co jest szczególnie istotne przy zastosowaniach medycznych. Oczyszczone CP były następnie użyte do opłaszczania cząstek SPION. Wykorzystany został do tego wspomniany we wprowadzeniu protokół przedstawiony w pracy m. in. przez Chevreuil i wsp., oparty na dwustopniowej dializie, w której pierwszym etapem było obniżenie siły jonowej buforu, a następnym obniżenie pH<sup>46</sup>. Pierwsza dializa skutkowałą zwiększeniem sił oddziaływań między naładowanym dodatnio końcem aminowym CP, a ujemnie naładowaną powierzchnią SPION. Natomiast podczas obniżania pH, dochodziło do uprotonowania reszt aminokwasowych CP i zwiększenia siły oddziaływań hydrofobowych między białkami. W rezultacie następowała stabilizacja i ukształtowanie się VLP. Na podstawie analiz zdjęć z mikroskopu CryoTEM oszacowano, że nanocząstki funkcjonalizowane przez COOH-PEG-PL zostały opłaszczone białkami CP z wydajnością około 90 % (w około 90 % złożonych kapsydów widoczne były nanocząstki). Dodatkowo, stwierdziliśmy, że występowały one przeważnie w postaci pojedynczych cząstek. Równocześnie zaobserwowaliśmy, że VLP z nanocząstkami

funkcjonalizowanymi DHP formowały agregaty. Zjawisko to można wytłumaczyć tym, że przyłączanie kolejnych podjednostek CP do DHP podczas składania kapsydu skutkuje stopniową neutralizacją wypadkowego ujemnego ładunku SPION. Konsekwencją tego jest obniżenie siły oddziaływań odpychających między nanocząstkami. W efekcie nanocząstki mogą tworzyć agregaty. Z drugiej strony, nanocząstki z COOH-PEG-P tylko w niewielkim stopniu łączą się ze sobą w większe skupiska. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w budowie cząsteczki PEG w porównaniu do DHP. Podsumowując, nanocząstki SPION, funkcjonalizowane przez COOH-PEG-PL charakteryzują się dużo większą jednorodnością i brakiem agregacji w porównaniu do nanocząstek funkcjonalizowanych DHP.

VLP były analizowane przy pomocy dwóch technik: mikroskopii CryoTEM oraz DLS. Wyniki otrzymane przy pomocy obu tych technik znacząco różniły się od siebie. Z analizy zdjęć z CryoTEM wynika, że VLP zawierające nanocząstki opłaszczone COOH-PEG-PL miały średnicę równą  $26,4 \pm 2,1$  nm, a te opłaszczone DHP,  $25,5 \pm 2,7$  nm. Otrzymane wartości dla obu typów VLP były podobne do wielkości natywnego wirusa BMV. Analiza DLS otrzymanych VLP wykazała, że mają one o wiele większe rozmiary niż natywne wiriony BMV: średnica hydrodynamiczna VLP z nanocząstkami opłaszczonymi COOH-PEG-P wyniosła  $63 \pm 13$  nm, natomiast VLP zawierające nanocząstki z DHP miały średnicę  $145 \pm 27$  nm. Przyczyną tak dużych rozmiarów VLP otrzymanych w pomiarze DLS może być fakt, że VLP zawierające nanocząstki z DHP miały tendencję do tworzenia agregatów, co uwidoczniono za pomocą mikroskopu CryoTEM. Pewną wadą techniki DLS jest tendencja do maskowania obecności małych cząsteczek przez większe obiekty obecne w roztworze nawet w niewielkiej liczbie. W związku z powyższym, wydaje się, że agregaty, które tworzą się zarówno w przypadku nanocząstek z DHP jak i z PEG, są odpowiedzialne za większe rozmiary mierzonych VLP w porównaniu do natywnego wirusa BMV. Potwierdzają to zdjęcia uzyskane za pomocą CryoTEM. Co więcej, sama metoda DLS mierzy średnicę hydrodynamiczną, czyli rozmiar cząsteczki wraz z powłoką jonów ją okalających. W efekcie pomiary DLS wykazują nieco większe rozmiary badanych cząstek niż są one w rzeczywistości.

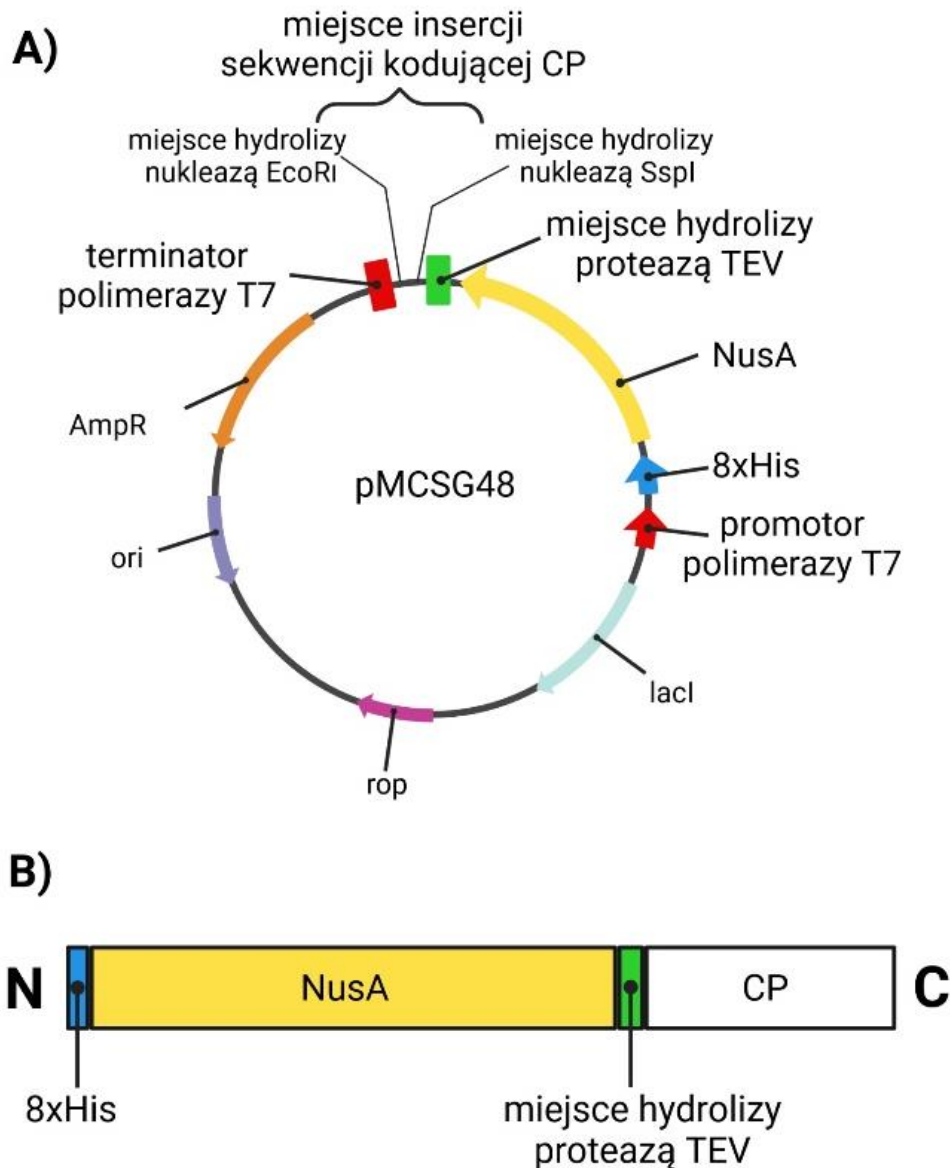
Analiza zdjęć uzyskanych za pomocą CryoTEM pozwoliła na pomiar grubości ścian kapsydów. Dla VLP z COOH-PEG-P wynosiła ona  $5,2 \pm 0,03$  nm a dla VLP z DHP  $5,53 \pm 0,97$  nm. Wartości te są zbliżone do występujących w natywnym wirusie BMV. Na tej podstawie można sądzić, że kapsyd składany w warunkach *in vitro* wokół nanocząstki ma podobną budowę do wirusa powstającego w warunkach naturalnych.

Podsumowując, w ramach pracy pt. „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*” przeprowadziliśmy funkcjonalizację nanocząstek tlenku żelaza, dzięki której możliwa była enkapsydacja tego związku wewnątrz VLP zbudowanych z CP BMV. Kluczowym czynnikiem warunkującym prawidłowe uformowanie VLP okazał

się związek użyty do funkcjonalizacji nanocząstki, który nie tylko wprowadził ujemny ładunek na jej powierzchnię, ale także zapewnił odpowiednie właściwości steryczne, dzięki którym nie dochodziło do agregacji. Prawidłowo złożone kapsydy z zamkniętymi wewnątrz nanocząstkami były analizowane za pomocą DLS i zostały zobrazowane z wykorzystaniem mikroskopu CryoTEM. Zdjęcia te pokazały stosunkowo niską zawartość agregatów pośród nanocząstek funkcjonalizowanych COOH-PEG-P w porównaniu do nanocząstek funkcjonalizowanych DHP. VLP z DHP i COOH-PEG-P mają podobne rozmiary jak natywny BMV. Niemniej najważniejszym osiągnięciem powyższej pracy było skuteczne uformowanie VLP zawierających wewnątrz nanocząstkę o właściwościach superparamagnetycznych.

Praca z VLP wymaga sprawnego systemu produkcji podjednostek białkowych, z których można je złożyć. Wirusy roślinne, w tym BMV namnaża się w roślinach. Podejście to wymaga jednak specjalistycznej infrastruktury do uprawy roślin (szklarni lub fitotronu) a także czasu potrzebnego najpierw na ich wzrost, a następnie na inokulację oraz propagację wirusów wewnątrz rośliny. Co więcej, myśląc o poszukiwaniu nowych właściwości VLP, należy zwrócić uwagę, że sekwencją CP otrzymywaną w układzie natywnym manipulować można tylko w wąskim zakresie. Aby wyeliminować te ograniczenia, postanowiliśmy wykorzystać bakteryjny system do produkcji tzw. rekombinowanego CP BMV (rCP). System ten nie tylko umożliwił znaczące skrócenie czasu produkcji CP, ale także pozwolił ominąć etap usuwania wirusowego RNA z preparatu. Optymalizacja produkcji rCP stanowiła preludeum do trzeciej pracy składającej się na niniejszą rozprawę doktorską, zatytułowanej: „*Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in Bacterial System*”. Do ekspresji genu kodującej rCP wybraliśmy wektor pMCSG48, który zawiera m. in. dwa kluczowe elementy: sekwencję kodującą białko fuzyjne NusA oraz fragment kodujący osiem reszt histydynowych (tzw. His-tag) (Rys. 3.A). Białko NusA zwiększa rozpuszczalność partnera fuzyjnego w środowisku wodnym, natomiast His-tag umożliwia oczyszczanie preparatu białkowego metodą chromatografii powinowactwa na złożu z jonami niklu. Do produkcji rCP wykorzystaliśmy szczep bakteryjny Rosetta2 DE3 pLysS. Ten zmodyfikowany genetycznie szczep został zaprojektowany w celu zwiększenia wydajności produkcji rekombinowanego białka. Syntetyzuje on tRNA dla kodonów, które bardzo rzadko występują w bakteriach, ale dość często występują u eukariotów. Dzięki temu szczep Rosetta2 DE3 pLysS charakteryzuje się zwiększoną wydajnością ekspresji białek eukariotycznych. Dodatkowo jest on wyposażony w gen polimerazy T7 zależnej od RNA oraz lizozym T7. Oba te elementy dodatkowo stabilizują proces produkcji rekombinowanego białka. Otrzymany w systemie bakteryjnym konstrukt zbudowany był w następujący sposób: od strony końca 5' posiadał sekwencję kodującą His-tag, dalej położone były kolejno sekwencje kodujące białko fuzyjne NusA, miejsce hydrolizy proteolitycznej TEV oraz białko CP. Wyizolowane rCP z partnerem fuzyjnym NusA poddawaliśmy procedurze oczyszczania

z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, natomiast usunięcie fragmentu fuzyjnego NusA odbywało się poprzez hydrolizę proteazą TEV i ponowne oczyszczanie metodą chromatografii powinowactwa.



**Rys. 3 Konstrukt rCP.** **A)** Schematyczne przedstawienie wektora ekspresyjnego pMCSG48. AmpR – sekwencja kodująca  $\beta$ -laktamazę, która odpowiada za oporność bakterii na antybiotyki – ampicylinę. Ori – miejsce rozpoczęcia replikacji plazmidu. Rop – sekwencja kodująca białko rop, które jest odpowiedzialne za utrzymanie małej liczby kopii plazmidu w bakterii. LacI – sekwencja kodująca represor *lac*. Promotor polimerazy T7 – miejsce inicjacji transkrypcji sekwencji kodującej białko docelowe. 8xHis – sekwencja kodująca osiem reszt histydy. NusA – sekwencja kodująca białko fuzyjne zwiększające rozpuszczalność białka docelowego. Miejsce hydrolizy proteazą TEV – sekwencja nukleotydów kodująca sekwencję aminokwasów rozpoznawaną przez proteazę TEV. Miejsce insercji sekwencji kodującej – odcinek plazmidu pomiędzy dwoma miejscami restrykcyjnymi (dla enzymów EcoRI i SspI), miejsce w którym nastąpi wprowadzenie sekwencji kodującej białko docelowe. Terminator polimerazy T7 – miejsce terminacji transkrypcji. **B)** Schematyczne przedstawienie białka rCP. Od lewej strony N – aminowy koniec białka. 8xHis – osiem reszt histydy. NusA – białko fuzyjne. Miejsce hydrolizy proteazą TEV – sekwencja aminokwasów rozpoznawana i hydrolizowana przez proteazę TEV. CP – białko kapsydu BMV. C – koniec karboksylowy białka. (Rys. wykonany przy użyciu BioRender.com);

Próby składania VLP z otrzymanego rCP, poprzedzone zostały analizą wzajemnych oddziaływań białko-białko. Badania te przeprowadzone były w celu weryfikacji, czy protokół składania VLP opracowany dla natywnych białek kapsydu BMV, oparty na podwójnej dializie będzie optymalny podczas składania VLP z białka rekombinowanego. W tym celu wykonaliśmy pomiary metodą termoforezy w skali mikro (MST), które przeprowadzone zostały przez Annę Urbanowicz z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Użycie metody MST umożliwiło uzyskanie informacji o wzajemnym powinowactwie rCP na podstawie pomiaru prędkości ich migracji w gradiencie temperatur. Analiza MST wykazała, że białka kapsydu BMV otrzymane w bakteryjnym systemie ekspresyjnym oddziałują ze sobą silniej przy niższych stężeniach soli i przy niższym pH, przy czym zmiany pH miały na te oddziaływania większy wpływ niż stężenie NaCl<sup>79</sup>. Znaczenie pH dla oddziaływań rCP-rCP potwierdzone zostało poprzez reakcję sieciowania rCP (cross-link). Mobilność elektroforetyczna produktów reakcji sieciowania powstałych w różnych pH różniła się znacząco, co wskazuje na istotny wpływ pH na konformacje wzajemnie oddziałujących białek. Wszystkie te obserwacje stanowiły cenną wskazówkę dla optymalizacji protokołu składania VLP i były zbieżne z doniesieniami innych badaczy dotyczącymi mechanizmu składania wirusowych kapsydów<sup>46</sup>.

W badaniach prowadzonych nad składaniem VLP postanowiliśmy wykorzystać drożdżowy tRNA zakładając, że podobieństwo strukturalne do TLS genomowej cząsteczki RNA wirusa BMV umożliwi tRNA zainicjowanie składania VLP. Dodatkowo, niewątpliwą zaletą drożdżowego tRNA jest duża stabilność oraz łatwa dostępność, co jest szczególnie ważne na etapie optymalizacji protokołu. Proces składania VLP z rCP otrzymanych w ekspresyjnym systemie bakteryjnym, podobnie jak w przypadku składania go z CP pochodzących z natywnego BMV, polegał na dwuetapowej dializie. Podejście to zastosowaliśmy na podstawie danych literaturowych popartych wynikami pomiarów powinowactwa<sup>46,80</sup>. Dwie dializy miały na celu kolejno: wzmocnienie elektrostatycznych oddziaływań między tRNA i rCP i wstępne złożenie VLP oraz zwiększenie siły hydrofobowych oddziaływań pomiędzy podjednostkami rCP i ostateczne uporządkowanie całej struktury VLP. Dane literaturowe wskazują, że elementem mocno wpływającym na wydajność składania kapsydu jest stosunek masowy CP do RNA<sup>81</sup>. Badania prowadzone na wirusie CCMV wskazały na wartość 4:1 (CP:RNA) jako optymalną do pełnego zapakowania genomowego RNA<sup>81</sup>. Przeprowadzone przeze mnie eksperymenty składania VLP przy różnych stosunkach masowych rCP:tRNA wskazały na wartości 4:1, 5:1 i 6:1, jako te, w których enkapsydacja następowała najefektywniej. Do dalszych prac wybraliśmy stosunek rCP:tRNA 6:1.

W przypadku kapsydu BMV, tRNA może być istotnym czynnikiem inicjującym jego składanie<sup>82</sup>. W ramach prowadzonych badań, sprawdziliśmy także jak przebiega składanie kapsydu bez tRNA lub w



obecności innego czynnika mogącego inicjować ten proces. Podjęliśmy zatem próby składania pustych VLP oraz VLP zawierających PSS. PSS to polimer posiadający ujemny ładunek dzięki grupom sulfonowym, jednak nie wykazujący stabilnej struktury drugo- i trzeciorzędowej, jaką możemy zaobserwować w genomowej cząsteczce RNA BMV. Składanie zarówno pustego VLP jak i zawierającego tRNA i PSS miało na celu zapoznanie się z wpływem pakowanej cząsteczki na strukturę i mechanizm składania kapsydu.

Równoległe do prowadzonych prac nad formowaniem VLP, prowadziliśmy badania nad wprowadzeniem zmian do sekwencji CP. Celem miało być uzyskanie VLP o nowych właściwościach. Wraz z Karolem Kamelem zaprojektowaliśmy mutacje dwóch aminokwasów w sekwencji kodującej rCP: L w pozycji 123 na D oraz F w pozycji 183 na T. W natywnym kapsydie oba wymienione wyżej aminokwasy są zaangażowane w hydrofobowe oddziaływania CP-CP. Wprowadzane zmiany w założeniu miały być na tyle nieznaczne, żeby nie uniemożliwiały składania kapsydu, a z drugiej strony, by efekt ich wprowadzenia był stosunkowo łatwo zauważalny. Przeprowadzone *in silico* symulacje zmutowanych białek CP pokazały, że zmiana oddziaływań między aminokwasami z hydrofobowych na hydrofilowe, skutkowałą osłabieniem siły oddziaływań rCP – rCP. Opisane substytucje wprowadziliśmy do sekwencji kodującej rCP za pomocą metody PCR ze starterami niosącymi mutacje. Procedura produkcji i oczyszczania zmutowanego białka przebiegała tak samo jak w przypadku rCP. Zmutowane rCP używaliśmy następnie do składania VLP.

Uzyskane VLP: puste, z tRNA, z PSS, zarówno te złożone z rCP, jak i te zbudowane z jego zmutowanej wersji, analizowaliśmy przy pomocy mikroskopii CryoTEM oraz techniki DLS. Zdjęcia z mikroskopu CryoTEM, wykonane przez Jakuba Jagielskiego i Grzegorza Nowaczyka, pracowników Nanobiocentrum przy Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza, potwierdziły obecność sferycznych cząsteczek o wielkości zbliżonej do obserwowanej dla wirusa BMV we wszystkich próbkach, za wyjątkiem VLP z PSS. Niestety dla tych ostatnich nie udało nam się otrzymać mikroskopowych zdjęć. Jednak analiza DLS wykazała w próbkach VLP z PSS obecność sferycznych struktur o rozmiarach nieco mniejszych niż średnica natywnego BMV.

Analiza zdjęć z mikroskopu CryoTEM wykazała, że puste cząsteczki VLP, zarówno złożone z rCP (eVLP), jak i z jego zmutowanej wersji (eMVLP), mają większy zakres rozmiarów niż analogiczne VLP z tRNA (tVLP i tMVLPS). Szczególnie szeroki zakres wielkości jest widoczny dla eMVLP. Pomiary wykonane na podstawie zdjęć z mikroskopu CryoTEM wykazały, że rozmiary eMVLP miały od 30 do nawet 80 nm średnicy. Dla porównania eVLP miały średnicę w zakresie 20-65 nm. O strukturze eVLP decydują jedynie oddziaływania CP-CP. Brakuje w nich oddziaływań elektrostatycznych, które w naturalnych warunkach zapewnia genomowy RNA wirusa. Dlatego osłabienie oddziaływań rCP-rCP poprzez

wprowadzenie mutacji mogło skutkować zaburzeniem całej struktury eMVLP, a w konsekwencji powstaniem cząstek o bardzo różnych rozmiarach, wśród których wiele charakteryzuje się dużą średnicą. Wydaje się, że mutacje oraz brak rdzenia we wnętrzu eMVLP mogą mieć również wpływ na proces składania kapsydu, ponieważ analiza zdjęć z mikroskopu CryoTEM wykazała bardzo małą liczbę złożonych cząstek w porównaniu do pozostałych typów VLP. Brak tRNA w środku cząstki wirusopodobnej wpływa na osłabienie całej konstrukcji VLP, jednak ogromny rozrzut wielkości VLP w populacji eMVLP, nawet w stosunku do pustej, niezmutowanej cząsteczki VLP, podkreśla znacznie mutacji. Co więcej, brak tRNA może znacząco obniżać efektywność procesu składania VLP ze zmutowanych rCP. Co ciekawe eVLP zbudowane z niezmutowanych rCP, mimo braku RNA jako źródła elektrostatycznych oddziaływań wewnątrz struktury kapsydu, przyjmują rozmiary niewiele większe od tVLP. Sugeruje to znaczący udział aminokwasów L123 i F183 w tworzeniu i utrzymaniu struktury VLP. Mniejsze rozmiary tVLP można zinterpretować jako efekt elektrostatycznych oddziaływań między tRNA a CP, które konsolidują całą cząstkę. Podobne wnioski można wysnuć dla tMVLP. Mają one rozmiary bliskie tVLP i zdecydowanie mniejsze od eMVLP. Wielkość wszystkich typów badanych VLP analizowana była również za pomocą DLS. Wyniki uzyskane tą metodą potwierdziły ogólne wnioski płynące z analiz zdjęć z mikroskopu CryoTEM. Co jednak ciekawe, technika DLS pozwoliła przeanalizować PVLP i mPVLP, czyli cząstki wirusopodobne z enkapsydowanym PSS. Zarówno PVLP jak i mPVLP wykazywały najmniejsze rozmiary wśród wszystkich typów analizowanych VLP. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest najprawdopodobniej budowa PSS. Brak ustrukturyzowania przestrzennego cząsteczki PSS, przy jednoczesnym zachowaniu ujemnego ładunku powierzchniowego, mógł prowadzić do większego upakowania VLP, a w konsekwencji do mniejszych rozmiarów cząstki.

Rozmiary poszczególnych typów VLP były także analizowane za pomocą metody DLS w gradiencie temperatury, w zakresie 30-52 °C. Cząstkami, które zachowały swoje rozmiary przez całe powyższe spektrum temperaturowe, były tVLP. Ta obserwacja jeszcze raz potwierdza, że cząsteczka tRNA zapewnia ujemny ładunek i strukturę, które stanowią istotne czynniki silnie stabilizujące VLP. Cząstki eVLP i PVLP są bardziej podatne na zmiany temperaturowe. W populacji PVLP przy 44 °C, a dla eVLP w 45 °C, stopniach zaczynały się pojawiać agregaty o rozmiarach powyżej 100 nm średnicy. Potwierdza to wcześniejsze obserwacje i wskazuje na ogromną rolę, jaką pełni rdzeń wewnątrz VLP. Jest on istotny, nie tylko jako źródło elektrostatycznych oddziaływań, które cząstka PSS zapewnia, ale wskazuje również na rolę struktury wyższego rzędu, której, w przeciwieństwie do tRNA, PSS już nie posiada.

Analiza rozmiarów cząstek MVLP w gradiencie temperatur wykazała pewne różnice w stosunku do populacji VLP złożonego z rCP typu dzikiego. Wprowadzenie mutacji L123D i F183T osłabiło oddziaływania hydrofobowe między rCP, co w efekcie wpłynęło na obniżoną stabilność termiczną tMVLP. Z drugiej strony eMVLP zachowywały standardowe rozmiary aż do temperatury 51 °C, co

mogłoby wskazywać na zwiększenie stabilności tej cząstki w stosunku do eVLP. Zdobyte w tym eksperymencie dane były jednak zbyt skąpe, aby w pełni odpowiedzieć na pytania o przyczynę różnic w rozmiarach między VLP i MVLP w różnych temperaturach.

Podsumowując, wykorzystanie bakterii do produkcji CP BMV umożliwia nie tylko otrzymywanie rCP zdolnych do samoorganizacji w VLP, lecz także racjonalne projektowanie VLP poprzez wprowadzanie mutacji. Przeprowadzone badania potwierdziły ogromne znaczenie właściwości fizykochemicznych enkapsydowanych nanocząstek dla struktury i stabilności VLP. Dodatkowo, analiza VLP z wprowadzonymi przez nas mutacjami ujawniła istotność reszt L123 i F183 i hydrofobowych oddziaływań, w które te reszty są zaangażowane, dla samoskładania i utrzymywania struktury kapsydu.

#### 4. PODSUMOWANIE

BMV od lat pełni funkcję modelowego roślinnego wirusa RNA. To właśnie na jego przykładzie ustalono jak przebiega proces replikacji genomowych RNA i poznano podstawowe funkcje białek wirusowych. BMV był także wirusem, dla którego po raz pierwszy zaobserwowano rekombinację RNA oraz zaproponowano jej mechanizm. Dzięki badaniom stanowiącym trzon niniejszej rozprawy doktorskiej BMV staje się także układem modelowym w badaniach VLP. Stało się to możliwe między innymi dzięki stworzeniu przez nas nowej metody oczyszczania wirusa. Pozwala ona w sposób prosty i wydajny pozyskiwać duże ilości wirusów a przez to i białek kapsydu. Niebagatelne znaczenie dla zastosowania VLP jako nośników nanocząstek miały także przeprowadzone analizy biofizyczne, w ramach których scharakteryzowano wpływ czynników środowiskowych takich jak pH, czy siła jonowa na strukturę kapsydu BMV.

Wyniki uzyskane w trakcie badań enkapsydacji nanocząstek SPION dodatkowo ukazały rolę jaką w składaniu kapsydu odgrywać może związek do niego pakowany. Stwierdziliśmy między innymi, że kluczowe znaczenie ma nie tylko ujemny ładunek powierzchniowy pakowanej nanocząstki, ale także rodzaj funkcjonalizującej ją grupy chemicznej. Dobór odpowiednich warunków środowiskowych, takich jak pH i siła jonowa buforu oraz właściwa funkcjonalizacja pakowanej nanocząstki warunkuje efektywny przebieg procesu samoskładania VLP.

Dodatkowo pokazaliśmy, że użycie bakterii do produkcji rekombinowanego CP otwiera nowe perspektywy w badaniach VLP. Podejście to nie tylko skraca czas potrzebny na uzyskanie białek tworzących VLP, ale także pozwala na ich modyfikację, a więc na tworzenie kapsydów wykazujących różne właściwości. Prace dotyczące enkapsydacji tRNA i PSS oraz składania pustych kapsydów uwiaryściły ogromny potencjał tRNA, jako cząsteczki, będącej elementem inicjującym pakowanie innych nanocząstek do VLP. Badania różnych wariantów CP (natywnych, rekombinowanych oraz mutantów) ujawniły istotne znaczenie oddziaływań hydrofobowych zarówno dla powstawania jak i stabilizacji VLP.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Wen AM, Steinmetz NF. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem Soc Rev*. 2016;45(15):4074-4126. doi:10.1039/C5CS00287G
2. Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *J Control Release*. 2012;161(1):38-49. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.036
3. van Rijn P, Schirhagl R. Viruses, Artificial Viruses and Virus-Based Structures for Biomedical Applications. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(12):1386-1400. doi:10.1002/adhm.201501000
4. Matsuura K. Synthetic approaches to construct viral capsid-like spherical nanomaterials. *Chem Commun*. 2018;54(65):8944-8959. doi:10.1039/c8cc03844a
5. Lee KL, Steinmetz N. vaccines. 2017. doi:10.1002/wnan.1383.Virus-based
6. Ura T, Yamashita A, Mizuki N, Okuda K, Shimada M. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Vaccine*. 2021;39(2):197-201. doi:10.1016/j.vaccine.2020.11.054
7. Mortola E, Roy P. Efficient assembly and release of SARS coronavirus-like particles by a heterologous expression system. *FEBS Lett*. 2004;576(1-2):174-178. doi:10.1016/j.febslet.2004.09.009
8. COVID-19 vaccine tracker and landscape. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>. Accessed November 16, 2021.
9. Xu R, Shi M, Li J, Song P, Li N. Construction of SARS-CoV-2 Virus-Like Particles by Mammalian Expression System. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8(July):1-6. doi:10.3389/fbioe.2020.00862
10. Nooraei S, Bahrulolum H, Hoseini ZS, et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnology*. 2021;19(1):1-27. doi:10.1186/s12951-021-00806-7
11. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Semin Immunol*. 2017;34(July):123-132. doi:10.1016/j.smim.2017.08.014
12. Qian C, Liu X, Xu Q, et al. Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines*. 2020;8(1):1-14. doi:10.3390/vaccines8010139
13. Sun Y, Jr RC, Ye L, et al. NIH Public Access. 2010;383(1):12-21. doi:10.1016/j.virol.2008.09.020.Protection
14. Janitzek CM, Peabody J, Thrane S, et al. A proof-of-concept study for the design of a VLP-based combinatorial HPV and placental malaria vaccine. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-10. doi:10.1038/s41598-019-41522-5
15. Quan F-S, Huang C, Compans RW, Kang S-M. Virus-Like Particle Vaccine Induces Protective Immunity against Homologous and Heterologous Strains of Influenza Virus. *J Virol*. 2007;81(7):3514-3524. doi:10.1128/jvi.02052-06
16. Conry RM, Westbrook B, McKee S, Norwood TG. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccines Immunother*. 2018;14(4):839-846. doi:10.1080/21645515.2017.1412896
17. Hutzler S, Erbar S, Jabulowsky RA, et al. Antigen-specific oncolytic MV-based tumor vaccines

- through presentation of selected tumor-Associated antigens on infected cells or virus-like particles. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-15. doi:10.1038/s41598-017-16928-8
18. Lizotte PH, Wen AM, Sheen MR, et al. In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. *Nat Nanotechnol*. 2016;11(3):295-303. doi:10.1038/nnano.2015.292
  19. Ashley CE, Carnes EC, Phillips GK, et al. Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*. 2011;5(7):5729-5745. doi:10.1021/nn201397z
  20. Doucet M, El-Turabi A, Zabel F, et al. Preclinical development of a vaccine against oligomeric alpha-synuclein based on virus-like particles. *PLoS One*. 2017;12(8):1-25. doi:10.1371/journal.pone.0181844
  21. Wiessner C, Wiederhold KH, Tissot AC, et al. The second-generation active A $\beta$  immunotherapy CAD106 reduces amyloid accumulation in APP transgenic mice while minimizing potential side effects. *J Neurosci*. 2011;31(25):9323-9331. doi:10.1523/JNEUROSCI.0293-11.2011
  22. Cai M, Wang C, Li Y, et al. Virus-like particle vaccine by intranasal vaccination elicits protective immunity against respiratory syncytial viral infection in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2017;49(1):74-82. doi:10.1093/abbs/gmw118
  23. Kaiser CR, Flenniken ML, Gillitzer E, et al. Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):715-733.
  24. Bruckman MA, Randolph LN, Vanmeter A, et al. Spheres in Mice. 2015:163-173. doi:10.1016/j.virol.2013.10.035.Biodistribution
  25. Singh P, Prasuhn D, Yeh RM, et al. Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles in vivo. *J Control Release*. 2007;120(1-2):41-50. doi:10.1016/j.jconrel.2007.04.003
  26. Liu Y, Zhao Y, Sun B, Chen C. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. *Acc Chem Res*. 2013;46(3):702-713. doi:10.1021/ar300028m
  27. Jaganathan H, Godin B. Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(15):1800-1819. doi:10.1016/j.addr.2012.05.008
  28. Borysowski J, Górski A. Zastosowanie metody phage display w eksperymentalnej terapii onkologicznej. *Postep Hig Med Dosw*. 2004;58:100-107.
  29. Peabody DS, Manifold-Wheeler B, Medford A, Jordan SK, do Carmo Caldeira J, Chackerian B. Immunogenic Display of Diverse Peptides on Virus-like Particles of RNA Phage MS2. *J Mol Biol*. 2008;380(1):252-263. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.049
  30. Wang Y, Wang G, Duan WT, et al. Self-assembly into virus-like particles of the recombinant capsid protein of porcine circovirus type 3 and its application on antibodies detection. *AMB Express*. 2020;10(1). doi:10.1186/s13568-019-0940-0
  31. Pasloske BL, Walkerpeach CR, Obermoeller RD, Winkler M, Dubois DB. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J Clin Microbiol*. 1998;36(12):3590-3594. doi:10.1128/jcm.36.12.3590-3594.1998
  32. Song L, Sun S, Li B, et al. External quality assessment for enterovirus 71 and coxsackievirus A16 detection by reverse transcription-PCR using armored RNA as a virus surrogate. *J Clin Microbiol*. 2011;49(10):3591-3595. doi:10.1128/JCM.00686-11

33. Wilkerson JW, Yang SO, Funk PJ, Stanley SK, Bundy BC. Nanoreactors: Strategies to encapsulate enzyme biocatalysts in virus-like particles. *N Biotechnol.* 2018;44(September 2017):59-63. doi:10.1016/j.nbt.2018.04.003
34. Schoonen L, Nolte RJM, Van Hest JCM. Highly efficient enzyme encapsulation in a protein nanocage: Towards enzyme catalysis in a cellular nanocompartment mimic. *Nanoscale.* 2016;8(30):14467-14472. doi:10.1039/c6nr04181g
35. Patterson DP, Schwarz B, Waters RS, Gedeon T, Douglas T. Encapsulation of an enzyme cascade within the bacteriophage P22 virus-like particle. *ACS Chem Biol.* 2014;9(2):359-365. doi:10.1021/cb4006529
36. Cao J, Guenther RH, Sit TL, Lommel SA, Opperman CH, Willoughby JA. Development of abamectin loaded plant virus nanoparticles for efficacious plant parasitic nematode control. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(18):9546-9553. doi:10.1021/acsami.5b00940
37. Chen PY, Dang X, Klug MT, et al. M13 virus-enabled synthesis of titanium dioxide nanowires for tunable mesoporous semiconducting networks. *Chem Mater.* 2015;27(5):1531-1540. doi:10.1021/cm503803u
38. Bromley KM, Patil AJ, Perriman AW, Stubbs G, Mann S. Preparation of high quality nanowires by tobacco mosaic virus templating of gold nanoparticles. *J Mater Chem.* 2008;18(40):4796-4801. doi:10.1039/b809585j
39. Coradini DSR, Tunes MA, Kremmer TM, Schön CG, Uggowitzer PJ, Pogatscher S. Degradation of Cu nanowires in a low-reactive plasma environment. *npj Mater Degrad.* 2020;4(1). doi:10.1038/s41529-020-00137-2
40. Yan R, Gargas D, Yang P. Nanowire photonics. *Nat Photonics.* 2009;3(10):569-576. doi:10.1038/nphoton.2009.184
41. Nam KT, Kim D, Yoo PJ, et al. Virus-Enabled Synthesis and Assembly Battery Electrodes. *Science (80- ).* 2006;(May):885-888.
42. Gorji S, Kashiwar A, Mantha LS, et al. Nanowire facilitated transfer of sensitive TEM samples in a FIB. *Ultramicroscopy.* 2020;219(June):113075. doi:10.1016/j.ultramic.2020.113075
43. Zhou JC, Soto CM, Chen MS, et al. Biotemplating rod-like viruses for the synthesis of copper nanorods and nanowires. *J Nanobiotechnology.* 2012;10:1-12. doi:10.1186/1477-3155-10-18
44. Thangavelu RM, Ganapathy R, Ramasamy P, Krishnan K. Fabrication of virus metal hybrid nanomaterials: An ideal reference for bio semiconductor. *Arab J Chem.* 2020;13(1):2750-2765. doi:10.1016/j.arabjc.2018.07.006
45. Balique F, Lecoq H, Raoult D, Colson P. Can plant viruses cross the kingdom border and be pathogenic to humans? *Viruses.* 2015;7(4):2074-2098. doi:10.3390/v7042074
46. Chevreuil M, Law-Hine D, Chen J, et al. Nonequilibrium self-assembly dynamics of icosahedral viral capsids packaging genome or polyelectrolyte. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-9. doi:10.1038/s41467-018-05426-8
47. Liu R, Vaishnav RA, Roberts AM, Friedland RP. Humans Have Antibodies against a Plant Virus: Evidence from Tobacco Mosaic Virus. *PLoS One.* 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0060621
48. Friedland RP, Tedesco JM, Wilson AC, et al. Antibodies to potato virus Y bind the amyloid  $\beta$  peptide: Immunohistochemical and NMR studies. *J Biol Chem.* 2008;283(33):22550-22556. doi:10.1074/jbc.M802088200

49. Knowland J. Protein synthesis directed by the RNA from a plant virus in a normal animal cell. *Genetics*. 1974;78(1):383-394. doi:10.1093/genetics/78.1.383
50. Koudelka KJ, Destito G, Plummer EM, Trauger SA, Siuzdak G, Manchester M. Endothelial targeting of cowpea mosaic virus (CPMV) via surface vimentin. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):1-10. doi:10.1371/journal.ppat.1000417
51. Rae CS, Wei Khor I, Wang Q, et al. Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice via the oral route. *Virology*. 2005;343(2):224-235. doi:10.1016/j.virol.2005.08.017
52. Dreher TW. Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res*. 2009;139(2):217-229. doi:10.1016/j.virusres.2008.06.010
53. Barends S, Rudinger-Thirion J, Florentz C, Giegé R, Pleij CWA, Kraal B. tRNA-Like Structure Regulates Translation of Brome Mosaic Virus RNA. *J Virol*. 2004;78(8):4003-4010. doi:10.1128/jvi.78.8.4003-4010.2004
54. Rao ALN, Cheng Kao C. The brome mosaic virus 3' untranslated sequence regulates RNA replication, recombination, and virion assembly. *Virus Res*. 2015;206:46-52. doi:10.1016/j.virusres.2015.02.007
55. Chapman MR, Kao CC. A minimal RNA promoter for minus-strand RNA synthesis by the brome mosaic virus polymerase complex. *J Mol Biol*. 1999;286(3):709-720. doi:10.1006/jmbi.1998.2503
56. Lucas RW, Larson SB, McPherson A. The crystallographic structure of brome mosaic virus. *J Mol Biol*. 2002;317(1):95-108. doi:10.1006/jmbi.2001.5389
57. CASPAR DL, KLUG A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1962;27:1-24. doi:10.1101/SQB.1962.027.001.005
58. Speir JA, Johnson JE. Nucleic acid packaging in viruses. *Curr Opin Struct Biol*. 2012;22(1):65-71. doi:10.1016/j.sbi.2011.11.002
59. Bruinsma RF, Comas-Garcia M, Garmann RF, Grosberg AY. Equilibrium self-assembly of small RNA viruses. *Phys Rev E*. 2016;93(3):1-14. doi:10.1103/PhysRevE.93.032405
60. Garmann RF, Comas-Garcia M, Gopal A, Knobler CM, Gelbart WM. The assembly pathway of an icosahedral single-stranded RNA virus depends on the strength of inter-subunit attractions. *J Mol Biol*. 2014;426(5):1050-1060. doi:10.1016/j.jmb.2013.10.017
61. Zlotnick A, Aldrich R, Johnson JM, Ceres P, Young MJ. Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*. 2000;277(2):450-456. doi:10.1006/viro.2000.0619
62. Panahandeh S, Li S, Marichal L, Leite Rubim R, Tresset G, Zandi R. How a Virus Circumvents Energy Barriers to Form Symmetric Shells. *ACS Nano*. 2020;14(3):3170-3180. doi:10.1021/acsnano.9b08354
63. Annamalai P, Rao ALN. Dispensability of 3' tRNA-like sequence for packaging cowpea chlorotic mottle virus genomic RNAs. *Virology*. 2005;332(2):650-658. doi:10.1016/j.virol.2004.12.009
64. Perlmutter JD, Perkett MR, Hagan MF. Pathways for virus assembly around nucleic acids. *J Mol Biol*. 2014;426(18):3148-3165. doi:10.1016/j.jmb.2014.07.004
65. Dixit SK, Goicochea NL, Daniel MC, et al. Quantum dot encapsulation in viral capsids. *Nano Lett*. 2006;6(9):1993-1999. doi:10.1021/nl061165u
66. Huang X, Stein BD, Cheng H, et al. Magnetic virus-like nanoparticles in *N. benthamiana* plants: A new paradigm for environmental and agronomic biotechnological research. *ACS Nano*.



- 2011;5(5):4037-4045. doi:10.1021/nn200629g
67. Loo L, Guenther RH, Lommel SA, Franzen S. Infusion of dye molecules into Red clover necrotic mosaic virus. *Chem Commun.* 2008;(1):88-90. doi:10.1039/b714748a
  68. Wilts BD, Schaap IAT, Schmidt CF. Swelling and softening of the cowpea chlorotic mottle virus in response to pH shifts. *Biophys J.* 2015;108(10):2541-2549. doi:10.1016/j.bpj.2015.04.019
  69. Tama F, Brooks CL. The mechanism and pathway of pH induced swelling in cowpea chlorotic mottle virus. *J Mol Biol.* 2002;318(3):733-747. doi:10.1016/S0022-2836(02)00135-3
  70. Bujarski JJ. Bromovirus isolation and RNA extraction. *Methods Mol Biol.* 1998;81(5):183-188. doi:10.1385/0-89603-385-6:183
  71. Incardona NL, Kaesberg P. A Ph-induced structural change in brome grass mosaic virus. *Biophys J.* 1964;4:11-21.
  72. Robinson IK, Harrison SC. Structure of the expanded state of tomato bushy stunt virus. *Nature.* 1982;297(5867):563-568. doi:10.1038/297563a0
  73. Sorger PK, Stockley PG, Harrison SC. Structure and assembly of turnip crinkle virus. II. Mechanism of reassembly in vitro. *J Mol Biol.* 1986;191(4):639-658. doi:10.1016/0022-2836(86)90451-1
  74. Lavelle L, Michel JP, Gingery M. The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *J Virol Methods.* 2007;146(1-2):311-316. doi:10.1016/j.jviromet.2007.07.020
  75. Petri-Fink A, Chastellain M, Juillerat-Jeanneret L, Ferrari A, Hofmann H. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials.* 2005;26(15):2685-2694. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.023
  76. Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim WS. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci Technol Adv Mater.* 2015;16(2):23501. doi:10.1088/1468-6996/16/2/023501
  77. Amstad E, Textor M, Reimhult E. Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Nanoscale.* 2011;3(7):2819-2843. doi:10.1039/c1nr10173k
  78. Klein S, Sommer A, Distel LVR, Neuhuber W, Kryschi C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;425(2):393-397. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.108
  79. Strugała A, Jagielski J, Kamel K, et al. Virus-like particles produced using the brome mosaic virus recombinant capsid protein expressed in a bacterial system. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):1-15. doi:10.3390/ijms22063098
  80. Vega-Acosta JR, Cadena-Nava RD, Gelbart WM, Knobler CM, Ruiz-García J. Electrophoretic mobilities of a viral capsid, its capsid protein, and their relation to viral assembly. *J Phys Chem B.* 2014;118(8):1984-1989. doi:10.1021/jp407379t
  81. Cadena-Nava RD, Comas-Garcia M, Garmann RF, Rao ALN, Knobler CM, Gelbart WM. Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *J Virol.* 2012;86(6):3318-3326. doi:10.1128/jvi.06566-11
  82. Choi YG, Dreher TW, Rao ALN. tRNA elements mediate the assembly of an icosahedral RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):655-660. doi:10.1073/pnas.022618199

## 6. WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

5-FU	– fluorouracyl (ang. <i>fluorouracil</i> );
Aa	– aminokwas (ang. <i>amino acid</i> );
ARM	– motyw bogaty w reszty argininowe (ang. <i>arginine rich motive</i> );
ATR-FTIR	– spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (z transformacją Fouriera) (ang. <i>attenuated total reflectance-Fourier-transform infrared spectroscopy</i> );
B <sub>22</sub>	– drugi osmotyczny współczynnik wirusowy (ang. <i>osmotic second viral coefficient</i> )
BMV	– wirus mozaiki stokłosa (ang. <i>brome mosaic virus</i> );
CCMV	– wirus chlorotycznej plamistości wspanię (ang. <i>cowpea chlorotic mosaic virus</i> )
CD	– dichroizm kołowy (ang. <i>circular dichroism</i> );
CHO	– komórki jajnika chomika chińskiego (ang. <i>chinese hamster ovary</i> );
COOH-PEG-PL	– distearoilo-sn-glicero-3-fosfoetanolamino-N-[karboksy(PEG)2000]
CP	– białko kapsydu (ang. <i>capsid protein</i> );
CPMV	– wirus mozaiki wspanię chińskiej (ang. <i>cowpea mosaic virus</i> );
CryoTEM	– transmisyjna mikroskopia krioelektronowa (ang. <i>transmission electron criomicroscopy</i> );
DEAE-C	– dietyloaminoetyloceluloza (ang. <i>diethyloaminoethyl cellulose</i> )
DLS	– dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>dynamic light scattering</i> );
DHP	– fosforan diheksadecylu (ang. <i>dihexadecyl phosphate</i> );
DOX	– doksorubicyna (ang. <i>doxorubicin</i> );
eVLP	– pusta cząstka wirusopodobna (ang. <i>empty virus-like particle</i> );
eMVLP	– pusta zmutowana cząstka wirusopodobna (ang. <i>empty, mutated virus-like particle</i> );
EV71	– enterowirus 71 (ang. <i>enterovirus 71</i> );
FDA	– Agencja Żywności i Leków (ang. <i>Food and Drug Administration</i> );
gag	– antygen grupowy (ang. <i>group-specific antygen</i> );
Gd	– gadolin (ang. <i>gadolinium</i> )
GFP	– białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescent protein</i> );
HBsAg	– antygen powierzchniowy wirusa HBV (ang. <i>hepatitis B surface antigen</i> )
HBV	– wirus zapalenia wątroby typu B (ang. <i>hepatitis B virus</i> );

HCC	– rak wątrobowokomórkowy (ang. <i>hepatocellular carcinoma</i> );
His-tag	– polihistydynowy znacznik białkowy
HIV-1	– ludzki wirus niedoboru odporności typu pierwszego (ang. <i>human immunodeficiency virus type 1</i> )
HPV	– wirus brodawczka ludzkiego (ang. <i>human papilloma virus</i> );
HSV	– wirus opryszczki pospolitej (ang. <i>herpes simplex virus</i> );
Kz	– kilo zasad –1000 nukleotydów;
MC	- metoda Monte Carlo;
MP	– białko odpowiedzialne za rozprzestrzenianie BMV w zakażonej roślinie (ang. <i>movement protein</i> );
MRI	– rezonans magnetyczny (ang. <i>magnetic resonance imaging</i> )
MST	– termoforeza w skali mikro (ang. <i>microscale thermophoresis</i> );
nt	– nukleotyd (ang. <i>nucleotide</i> );
NusA	– białko fuzyjne używane w wektorach do zwiększania rozpuszczalności białka docelowego (ang. <i>N utilization substance A</i> );
NMR	– jądrowy rezonans magnetyczny (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
PAMP	– wzorce molekularne związane z patogenami (ang. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> );
PCV3	– cirkowirus świni typ 3 (ang. <i>Porcine circovirus 3</i> );
PEG	– glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i> );
PET	– pozytonowa tomografia emisyjna (ang. <i>positron emission tomography</i> )
PSS	– siarczan polistyrenu (ang. <i>polystyrene sulfonate</i> );
PMVLP	– zmutowana cząstka wirusopodobna zawierająca wewnątrz kapsydu PSS;
PVLP	– cząstka wirusopodobna zawierająca wewnątrz kapsydu PSS;
PVY	– wirus ziemniaka Y (ang. <i>potato virus Y</i> )
rCP	– rekombinowane białko kapsydu (ang. <i>recombined capsid protein</i> );
RSV	– syncytialny wirus oddechowy (ang. <i>respiratory syncytial virus</i> )
RCNMV	– wirus nekrotycznej mozaiki koniczyny czerwonej (ang. <i>red clover necrotic mosaic virus</i> )
SARS CoV2	– drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> );
SEC	– sączenie molekularne (ang. <i>size exclusion chromatography</i> );
sgRNA 4	– subgenomowy RNA 4;

SLS	– statyczne rozpraszanie światła (ang. <i>static light scattering</i> );
SPION	– superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza (ang. <i>superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i> );
SP94	– peptyd występujący w komórkach raka wątrobykomórkowego;
SQUID	– urządzenie do pomiaru natężenia pola magnetycznego (ang. <i>superconducting quantum interference device</i> );
ss	– jednoniciowy (ang. <i>single stranded</i> );
TAA	– antygeny powiązane z nowotworem (ang. <i>tumor associated antigens</i> );
TBSV	– wirus krzaczastej karłowatości pomidora (ang. <i>tomato bushy stunt virus</i> )
TCV	– wirus kędzierzawości rzepy (ang. <i>turnip crinckle virus</i> )
TEV protease	– proteaza pochodząca z wirusa TEV;
TLS	– struktura tRNA-podobna (ang. <i>tRNA-like structure</i> );
TMV	– wirus mozaiki tytoniu (ang. <i>Tobacco mosaic virus</i> );
tVLP	– cząstka wirusopodobna zawierająca wewnątrz kapsydu tRNA;
tMVLP	– zmutowana cząstka wirusopodobna zawierająca wewnątrz kapsydu tRNA;
VLP	– cząstka wirusopodobna (ang. <i>virus-like particle</i> );
VNP	– nanocząstka wirusowa (ang. <i>viral nanoparticle</i> );
WZWB	– wirusowe zapalenie wątroby typu B (ang. <i>Hepatitis B</i> )

## 7. ZAŁĄCZNIKI

1. Oświadczenia o wkładzie pracy kandydata w artykuły zawarte w rozprawie doktorskiej.

2. PUBLIKACJA NR 1.

Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method.

3. PUBLIKACJA NR 2.

The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core.

4. PUBLIKACJA NR 3.

Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System.

Poznań, 24.11.2021r.

**Mgr inż. Aleksander Strugała**  
Zakład Biologii Molekularnej i Systemowej  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań

## OŚWIADCZENIE KANDYDATA O WŁASNYM WKŁADZIE W PUBLIKACJE NAUKOWE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Tytuł artykułu naukowego:** „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*”

**Autorzy:** Aleksander Strugała, Monika Kręcisz, Jakub Dalibor Rybka\*, Anna Urbanowicz\*, Kamil Szpotkowski, Paulina Bierwagen, Marek Figlerowicz, Maciej Kozak, Christoph Böttcher, Michał Giersig

**Czasopismo:** Journal of Chromatography B

**Data opublikowania:** 15-11-2017

Ja, Aleksander Strugała, oświadczam, że mój wkład autorski w artykuł naukowy o tytule „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*” polegał na:

- Prowadzeniu uprawy roślin w celu propagacji wirusa BMV;
- Izolacji i oczyszczaniu wirusa BMV z wykorzystaniem metod chromatograficznych;
- Wstępnej analizie jakościowej i ilościowej otrzymanego preparatu wirusowego;
- Przygotowaniu wstępu literaturowego, rozdziału metodyki dotyczącego oczyszczania wirusa BMV oraz współpracy przy tworzeniu wyników, dyskusji i konkluzji.

  
.....  
Podpis kandydata

**Tytuł artykułu naukowego:** „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*”

**Autorzy:** Adam A Mieloch, Monika Kręcisz, Jakub Dalibor Rybka\*, **Aleksander Strugała**, Michał Kurpiński, Anna Urbanowicz, Maciej Kozak, Bohdan Skalski, Marek Figlerowicz, Michael Giersig

**Czasopismo:** AIP Advances

Data opublikowania: 05-03-2018

Ja, Aleksander Strugała, oświadczam, że mój wkład autorski w artykuł naukowy o tytule „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*” polegał na:

- Namnożeniu, izolacji i oczyszczeniu wirusa BMV;
- Napisaniu fragmentu metodyki opisującego proces izolacji i oczyszczania wirusa BMV.

  
.....  
Podpis kandydata

**Tytuł artykułu naukowego:** „*Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System*”


**Autorzy:** Aleksander Strugała, Jakub Jagielski, Karol Kamel, Grzegorz Nowaczyk, Marcin Radom, Marek Figlerowicz, Anna Urbanowicz\*

**Czasopismo:** International Journal of Molecular Sciences

**Data opublikowania:** 18-03-2021

Ja, Aleksander Strugała, oświadczam, że mój wkład autorski w artykuł naukowy o tytule „*Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System*” polegał na:

- Przygotowaniu konstruktów, kodujących zrekombinowane białko kapsydu BMV;
- Produkcji i oczyszczaniu zrekombinowanego białka kapsydu BMV;
- Projektowaniu mutacji w sekwencji białka kapsydu BMV;
- Przeprowadzeniu składania pustych cząstek wirusopodobnych (VLP) oraz VLP z cząsteczkami polianionów;
- Przeprowadzeniu pomiaru DLS VLP oraz przygotowaniu wykresów obrazujących te wyniki;
- Przygotowaniu wstępu literaturowego, wyników oraz dyskusji.

  
.....  
Podpis kandydata



Poznań, 24.11.2021r.

**dr hab. Anna Urbanowicz**  
Pracownia Inżynierii Białek  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań

**OŚWIADCZENIE AUTORA KORESPONDENCYJNEGO O WKŁADZIE  
KANDYDATA W PUBLIKACJE NAUKOWE ZAWARTE W ROZPRAWIE  
DOKTORSKIEJ**

**Tytuł artykułu naukowego:** „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*”

**Autorzy:** **Aleksander Strugała**, Monika Kręcisz, Jakub Dalibor Rybka\*, Anna Urbanowicz\*, Kamil Szpotkowski, Paulina Bierwagen, Marek Figlerowicz, Maciej Kozak, Christoph Böttcher, Michał Giersig

**Czasopismo:** Journal of Chromatography B

**Data opublikowania:** 15-11-2017

Ja, Anna Urbanowicz, oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Aleksandra Strugały w artykuł naukowy o tytule „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*” polegał na:

- Prowadzeniu uprawy roślin w celu propagacji wirusa BMV;
- Izolacji i oczyszczaniu wirusa BMV z wykorzystaniem metod chromatograficznych;
- Wstępnej analizie jakościowej i ilościowej otrzymanego preparatu wirusowego;
- Przygotowaniu wstępu literaturowego, rozdziału metodyki dotyczącego oczyszczania wirusa BMV oraz współpracy przy tworzeniu wyników, dyskusji i konkluzji.



Podpis autora korespondencyjnego

Poznań, 24.11.2021r.

**dr hab. Anna Urbanowicz**  
Pracownia Inżynierii Białek  
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
ul. Noskowskiego 12/14  
61-704 Poznań

**OŚWIADCZENIE AUTORA KORESPONDENCYJNEGO O WKŁADZIE  
KANDYDATA W PUBLIKACJE NAUKOWE ZAWARTE W ROZPRAWIE  
DOKTORSKIEJ**

**Tytuł artykułu naukowego:** „*Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System*”

**Autorzy:** Aleksander Strugała, Jakub Jagielski, Karol Kamel, Grzegorz Nowaczyk, Marcin Radom, Marek Figlerowicz, Anna Urbanowicz\*

**Czasopismo:** International Journal of Molecular Sciences

**Data opublikowania:** 18-03-2021

Ja, Anna Urbanowicz, oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Aleksandra Strugały w artykuł naukowy o tytule „*Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System*” polegał na:

- Przygotowaniu konstruktów, kodujących zrekombinowane białko kapsydu BMV;
- Produkcji i oczyszczaniu zrekombinowanego białka kapsydu BMV;
- Projektowaniu mutacji w sekwencji białka kapsydu BMV;
- Przeprowadzeniu składania pustych cząstek wirusopodobnych (VLP) oraz VLP z cząsteczkami polianionów;
- Przeprowadzeniu pomiaru DLS VLP oraz przygotowaniu wykresów obrazujących te wyniki;
- Przygotowaniu wstępu literaturowego, wyników oraz dyskusji.



.....  
Podpis autora korespondencyjnego

Poznań, 24.11.2021r.

**prof. UAM, dr hab. Jakub Rybka**

**OŚWIADCZENIE AUTORA KORESPONDENCYJNEGO O WKŁADZIE  
KANDYDATA W PUBLIKACJE NAUKOWE ZAWARTE W ROZPRAWIE  
DOKTORSKIEJ**

**Tytuł artykułu naukowego:** „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*”

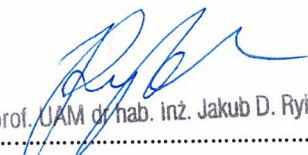
**Autorzy:** Aleksander Strugała, Monika Kręcisz, Jakub Dalibor Rybka\*, Anna Urbanowicz\*, Kamil Szpotkowski, Paulina Bierwagen, Marek Figlerowicz, Maciej Kozak, Christoph Böttcher, Michał Giersig

**Czasopismo:** Journal of Chromatography B

**Data opublikowania:** 15-11-2017

Ja, Jakub Rybka, oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Aleksandra Strugały w artykule naukowy o tytule „*Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method*” polegał na:

- Prowadzeniu uprawy roślin w celu propagacji wirusa BMV;
- Izolacji i oczyszczaniu wirusa BMV z wykorzystaniem metod chromatograficznych;
- Wstępnej analizie jakościowej i ilościowej otrzymanego preparatu wirusowego;
- Przygotowaniu wstępu literaturowego, rozdziału metodyki dotyczącego oczyszczania wirusa BMV oraz współpracy przy tworzeniu wyników, dyskusji i konkluzji.

  
.....  
prof. UAM dr hab. inż. Jakub D. Rybka  
Podpis autora korespondencyjnego

**Tytuł artykułu naukowego:** „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*”

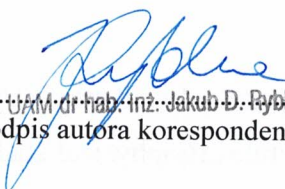
**Autorzy:** Adam A Mieloch, Monika Kręcisz, Jakub Dalibor Rybka\*, **Aleksander Strugała**, Michał Kurpiński, Anna Urbanowicz, Maciej Kozak, Bohdan Skalski, Marek Figlerowicz, Michael Giersig

**Czasopismo:** AIP Advances

Data opublikowania: 05-03-2018

Ja, Jakub Rybka, oświadczam, że wkład autorski mgr inż. Aleksandra Strugały w artykule naukowy o tytule „*The influence of ligand charge and length on the assembly of Brome mosaic virus derived virus-like particles with magnetic core*” polegał na:

- Namnożeniu, izolacji i oczyszczeniu wirusa BMV;
- Napisaniu fragmentu metodyki opisującego proces izolacji i oczyszczania wirusa BMV.

  
prof. tyt. m. dr hab. inż. Jakub D. Rybka....  
Podpis autora korespondencyjnego



## Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method



Aleksander Strugała<sup>a</sup>, Monika Kręciszczyńska<sup>b</sup>, Jakub Dalibor Rybka<sup>b,\*</sup>, Anna Urbanowicz<sup>a,f,\*\*</sup>, Kamil Szpotkowski<sup>a</sup>, Paulina Bierwagen<sup>a</sup>, Marek Figlerowicz<sup>a,g,h</sup>, Maciej Kozak<sup>c</sup>, Christoph Böttcher<sup>d</sup>, Michał Giersig<sup>b,e</sup>

<sup>a</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Science, Poznań, Poland

<sup>b</sup> Center of Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

<sup>c</sup> Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

<sup>d</sup> Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>e</sup> Institut für Experimentalphysik, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>f</sup> Institute of Chemical Technology and Engineering, Poznan University of Technology, Poznan, Poland

<sup>g</sup> Institute of Computing Science, Poznan University of Technology, Poznań, Poland

<sup>h</sup> European Center for Bioinformatics and Genomics, Poznań, Poland

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Brome mosaic virus  
Circular dichroism  
Fourier transform infrared spectroscopy  
Cryogenic transmission electron microscopy  
Light scattering

### ABSTRACT

Brome mosaic virus (BMV) has been successfully loaded with different types of nanoparticles. However, studies concerning its application as a nanoparticle carrier demand high-purity virions in large amounts. Existing BMV purification protocols rely on multiple differential ultracentrifugation runs of the initially purified viral preparation. Herein, we describe an alternative method for BMV purification based on ion-exchange chromatography and size-exclusion chromatography (SEC) yielding 0.2 mg of virus from 1 g of plant tissue. Our method is of similar efficiency to previously described protocols and can easily be scaled up. The method results in high-quality BMV preparations as confirmed by biophysical analyses, including cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM), dynamic light scattering (DLS), static light scattering (SLS), and circular dichroism (CD) measurements and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) spectroscopy. Our results revealed that purified BMV capsids are stable and monodisperse and can be used for further downstream applications. In this work, we also characterize secondary structure and size fluctuations of the BMV virion at different pH values.

### 1. Introduction

Currently, medicine strongly cooperates with biotechnology and nanotechnology. Although many novel nanomaterials have medical applications, the accurate delivery of these substances remains problematic. Site-specific delivery not only increases the efficacy of drugs but also decreases the side-effects of the therapy and is crucial for targeted therapy, in which the treatment is customized for each patient. In this approach, there is a need for an appropriate carrier of drugs and materials. Such a carrier should be stable enough to transport guest molecules, to specifically recognize the target tissue, and to release the cargo at the destination. Virus-like particles (VLPs), especially those based on plant viruses, seem to have many of these desirable features. First, unlike animal or human viruses, plant virus-based VLPs are not

pathogenic for humans. Second, viral capsids self-assemble from coat protein monomers, which can be useful during nanoparticle packing [1,2]. Furthermore, disassembling and reassembling the capsid is not the only way to load the nanoparticles inside the VLP. Smaller nanoparticles can be loaded or released through pores in the capsid during capsid swelling, which depends on the physicochemical conditions of environment. By adjusting the pH and ion concentration, it is possible to control the opening and closing of the pores and to release the cargo at a specific place [1,3]. The simple, uniform construction of the capsids and the various capsid sizes and shapes mean that plant viruses are promising candidates for use as nanoparticle carriers [4]. Finally, the production of the capsids is relatively cheap and fast.

Brome mosaic virus (BMV) is a good candidate for use as a nanoparticle carrier since it shows all of the abovementioned features and is

**Abbreviations:** BMV, brome mosaic virus; VLP, virus-like particle; cryo-TEM, cryogenic transmission electron microscopy; CD, circular dichroism; ATR-FTIR, attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy; DLS, dynamic light scattering; SLS, static light scattering

\* Corresponding author at: Wielkopolska Centre for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, Umultowska 89C, 61-641 Poznań, Poland.

\*\* Corresponding author at: Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Science, Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań, Poland.

E-mail addresses: [jrybka@amu.edu.pl](mailto:jrybka@amu.edu.pl) (J.D. Rybka), [aniau@ibch.poznan.pl](mailto:aniau@ibch.poznan.pl) (A. Urbanowicz).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.022>

Received 18 July 2017; Received in revised form 3 October 2017; Accepted 9 October 2017

Available online 12 October 2017

1570-0232/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

one of the best known model plant viruses [5–8]. BMV is a positive-sense RNA plant virus of the Bromoviridae family and the Bromovirus genus [9]. The BMV genome is composed of three positive-sense single-strand RNAs [10–12]. The 3.2-kb RNA1 and the 2.9-kb RNA2 are packed into separate capsids, while RNA3 (2.1 kb) and sgRNA4 (1 kb) are co-packed into one capsid [13]. Monocistronic RNA1 and RNA2 encode 1a and 2a proteins, respectively, which are responsible for virus replication [14]. Dicistronic RNA3 encodes movement protein (MP) and coat protein (CP). MP is translated directly from RNA3 or from subgenomic RNA3a, and CP undergoes translation from subgenomic RNA (sgRNA4), which is transcribed from RNA3 [7,15]. All BMV RNAs have a cap at the 5'UTR and a conservative 3'UTR, except for RNA3a, which terminates with a polyA tail. However, the 3'UTR is a conservative region, and all BMV RNAs have functional differences in their structures [16]. The 3' UTR takes part in many important BMV processes, such as translation, minus-strand RNA synthesis and encapsidation [16]. The 3'UTR sequence forms a tRNA-like structure (TLS), which plays a crucial role during capsid assembly but also contains a recognition site for viral replicase [17–20]. Rao et al. have confirmed that the BMV 3' TLS is very important for specific virion assembly and that when this fragment is lacking, virion assembly fails [21]. The functions of various fragments of the BMV genome in RNA replication and recombination have been characterized [16,20,22].

For successful plant infection, all 3 BMV genomic RNAs are needed [12]. The molecular weight of the BMV virion is 4.6 MDa, and its diameter is approximately 28 nm. The BMV capsid has a T = 3 icosahedral construction and comprises 180 19.4-kDa CP monomers [19]. The polypeptide chain of CP consists of 189 amino acids and adopts one of three conformations, A, B or C, which form characteristic configurations during capsid construction [19]. A subunits form 12 pentamers while B and C subunits form 20 hexamers [23,24]. Hexamer configuration is important for the T = 3 structure, and mutations in the CP sequence that alter this configuration result in aberrant capsid assembly [25]. CP plays many roles in the BMV life cycle. Apart from its structural function, CP is required for viral RNA replication and regulates RNA1 and 2 translation [26–28]. The CP monomer is a globular protein with a characteristic N-terminal arm, which is directed toward the inside of the capsid. The first 25 amino acids of the N-terminal arm contain an arginine-rich motive (ARM) where, besides arginine, few other positively charged amino acids are present [19]. ARM is responsible for electrostatic interactions with negatively charged viral RNA that are essential for appropriate BMV virion assembly. In natural BMV populations, no empty BMV capsids have been detected [19,23,29]. Mutated forms of CP devoid of an N-terminal arm assemble into T = 1 capsids *in vitro*, and these are incapable of infection [19,30]. The C-terminus is another important part of CP because it interacts with the neighboring subunits in the capsid. However, these protein – protein interactions are weaker than the interactions between RNA and CP. Although BMV virions are structurally indistinguishable by transmission electron microscopy, several physicochemical and structural differences occur, which are related to the encapsidated RNA – capsid interaction [31]. According to Kao et al., different parts of the inner surface of the capsid bind different parts of each viral RNA, thus altering virion stability. The structural heterogeneity of the virions is functionally relevant because it allows the gradual release of RNAs and regulates the viral gene expression profile during different stages of viral infection [31].

BMV has already been successfully used as a carrier for various nanoparticles. Dragnea et al. have shown that BMV-based VLPs are functional vessels for gold nanoparticles of various diameters [32–34]. The most effective VLP formation was obtained when gold nanoparticles were coated with polyanions, such as carboxylated polyethylene glycol [35]. BMV capsids are flexible enough to adopt different conformations depending on the size of the core [35]. In addition to gold, other nanoparticles have been incorporated into BMVs. Huang et al. has reported the use of BMV-based VLPs with spherical and cubic

iron oxide cores [36,37]. Dragnea et al. reported that the BMV capsid is able to carry quantum dots, which can be used as luminescent bioprobes [38]. In addition, Jung et al. demonstrated the encapsulation of a chromophore, indocyanine green, into empty BMV capsids [39]. The preparation of BMV-based VLPs demands large amounts of high-purity capsids. All previous reports described BMV preparations that were purified by differential ultracentrifugation using sucrose or cesium chloride gradients. In this work, we present an efficient method of obtaining BMV of high purity and quality; this method is an easier alternative to existing methods that are based on ultracentrifugation in cesium chloride solutions [14,31]. The produced BMV capsids show high monodispersity and structure-environment dependency, features that are crucial for VLP formation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. BMV propagation, extraction and purification

Two-week-old *Hordeum vulgare* plants were inoculated with a BMV preparation. The plants were maintained in a growth chamber at 22 °C, 40% humidity and a 16/8 photoperiod. BMV virions were extracted at 14 dpi [5,6]. Briefly, frozen leaves were homogenized in liquid nitrogen and macerated in virus extraction buffer ((0.5 M sodium acetate (Sigma), 0.3 M boric acid (ICN Biomedicals), 0.01 M magnesium chloride (Sigma), pH 4.5)). The mixture was subjected to chloroform (Chempur) extraction and the virus was then precipitated from the aqueous phase with PEG 8000 (Bioshop). Viral pellets were dissolved in 1 x L buffer ((0.01 M disodium phosphate (Sigma), pH 7.5)) and centrifuged at 16,000g for 5 min at 4 °C to remove plant tissue remains [5]. Next, the supernatant was purified by ion-exchange chromatography using diethylaminoethyl cellulose (Sigma) packed in a sc-205558 column (2.5 cm × 10 cm, CrystalCruz) and equilibrated with 1 x L buffer containing 5% glycerol (Carl Roth). Glycerol was also added to the virus solution to a final concentration of 5% before loading the column. The virions were washed and eluted with 1 x L buffer containing a sodium chloride (Carl Roth) gradient (0.01 M disodium phosphate, 5% glycerol; sodium chloride gradient: 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M and 0.5 M). Virus-containing fractions were collected and concentrated using an Amicon Ultra Filter 100 kDa (Merck Millipore) to a 2-ml volume. An additional purification step used size-exclusion chromatography (SEC) on a prepacked HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 High-Resolution column (GE Healthcare) equilibrated with phosphate-buffered saline (PBS) (BioShop) and yielded a homogenous virus fraction. Finally, virus-containing fractions were concentrated using an Amicon Ultra Filter 100 kDa (Merck Millipore). The concentration of the virus in the filtrate was determined by measuring the absorbance at 260 nm using a BioPhotometer (Eppendorf) and taking into account a molar extinction coefficient of  $\epsilon = 5.15 \text{ (cm}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ ml)}$  [40,41]. The polydispersity and hydrodynamic radius ( $R_h$ ) of the virions were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer  $\mu$ V (Malvern Instruments). The measurements were performed immediately after the concentration step using a 3- $\mu$ l sample in a quartz cuvette with a 1-cm path-length (Hellma 105.231-QS).

### 2.2. Structural characterization by cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM)

A droplet (5  $\mu$ l) of the sample solution was placed on hydrophilized (60 s plasma treatment at 8 W using a BALTEC MED 020 device, Leica Microsystems), perforated carbon-film grids (R4/1 batch of Quantifoil Micro Tools GmbH). Excess fluid was blotted off to create an ultra-thin layer (typical thickness, 200–300 nm) of the solution, which spanned the holes of the support film. The prepared samples were immediately vitrified by propelling the grids into liquid ethane at its freezing point (–184 °C). The vitrified sample grids were transferred under liquid nitrogen using a Gatan (Pleasanton, CA) cryo-holder

(Model 626) into a Tecnai F20 TEM (FEI company, Oregon, USA) equipped with FEG and operated at an acceleration voltage of 160 kV. Microscopy was carried out at  $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$  (sample temperature) using the microscope's low dose protocol at calibrated primary magnifications of 50k. The defocus was set at  $3.98\text{ }\mu\text{m}$ . Images were recorded using a 4k-Eagle CCD camera (FEI Company) at 2k resolution (binning 2).

### 2.3. Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

Samples for the spectroscopic determination of the secondary structure of the virus were prepared in phosphate buffer (0.01 M) at pH 5.6, 6.4, 7.4 and 8.4. Dialysis (24 h) from PBS buffer to phosphate buffer was performed to achieve solutions with a broad range of pH values. Samples were prepared twice for each pH. FTIR measurements were performed on a TENSOR 27 spectrometer (Bruker Optics) equipped with a three-reflection ATR system with zinc selenide (ZnSe) crystal. Data were collected at a resolution of  $4\text{ cm}^{-1}$  and, 256 scans were collected for each run. All samples were measured at least three times. Background buffer correction (buffer without protein) was performed using OPUS spectrometer software. Subtractions, baseline corrections and Fourier self-deconvolutions of the region from  $1590\text{ cm}^{-1}$  to  $1700\text{ cm}^{-1}$  were also performed in OPUS to analyze the amide I band regions. The positions and areas of individual bands and fractions of the total area in the amide I band region were determined using PeakFIT software to calculate the secondary structure content of the virus (Supplementary Fig. 3). Peak positions and fractions calculated for all spectra collected at the same pH were averaged. The standard deviations of these values were also calculated.

### 2.4. Circular dichroism (CD)

CD spectra were collected using a J-815 CD spectrometer (JASCO) equipped with a Peltier thermostat-based temperature-controlled cell holder. Virus solution (0.025 mg/ml) in buffer (0.01 M sodium phosphate and 0.14 M NaF at pH 5.6, 6.4, 7.4, or 8.4) was analyzed in a 1-cm quartz cuvette (Hellma 100-QS). Each CD spectrum was generated based on 10 scans using continuous scanning mode with a scanning speed of  $50\text{ nm min}^{-1}$ , a 1-nm bandwidth, a 0.1-nm data pitch, and a data integration time of 1 s. Data were collected at wavelengths in the range from 190 to 300 nm. The spectra were analyzed using the CONTIN algorithm (available on the DichroWeb server) after processing with the Jasco Spectra Manager software (background correction). References set in the range from 190 to 240 nm were used (Supplementary Fig. 2.). The normalized root mean square deviation (NRMSD) for each CD spectrum analysis was less than 0.1. CD data are presented in terms of ellipticity (in millidegrees; mdeg) or as the mean residue ellipticity ( $[\theta]_{\text{MRW}}$  in  $\text{deg cm}^2\text{ dmol}^{-1}$ ).

### 2.5. Light scattering measurements

Static and dynamic light scattering (SLS and DLS) measurements were recorded using a Zetasizer uV instrument (Malvern Instruments). The measurements were performed at a wavelength  $\lambda = 488\text{ nm}$  and at a  $90^{\circ}$  incidence angle of the light beam; a 2- $\mu\text{l}$  quartz cuvette was used, which was maintained at 293 K using a thermostat. The concentration range of BMV virus was 0.1–1.2 mg/ml. Twelve measurements were performed for each concentration. The hydrodynamic radius ( $R_h$ ) was assessed based on the DLS measurements using the Stokes-Einstein equation:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D};$$

where  $k$  is Boltzmann's constant,  $T$  is the absolute temperature,  $\eta$  is the solvent viscosity, and  $D$  is the translational diffusion coefficient [42].

The molecular weight ( $M_w$ ) and osmotic second virial coefficient

( $B_{22}$ ) were determined from the Debye plot based on the SLS results according to the following formula:

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M_w} + 2B_{22}c,$$

where  $R$  is the excess Rayleigh scattering of the saline protein solution beyond that of the aqueous salt solution (Rayleigh ratio),  $K$  is the light scattering optical constant, and  $c$  is the protein concentration.

The optical constant  $K$  was determined from the solution scattering properties according to the following formula:

$$K = \frac{4\pi^2 \left[ n_s \left( \frac{dn}{dc} \right) \right]^2}{\lambda^4 N_A}$$

where  $\lambda$  is the wavelength of the incident light,  $n$  is the refractive index of the protein solution,  $n_s$  is the refractive index of the solvent, and  $N_A$  is Avogadro's number [42,43].

## 3. Results and discussion

### 3.1. BMV propagation and purification

Here, we applied for the first time a three-step BMV purification procedure including the standard virus extraction protocol elaborated by Bujarski [44] (I); ion-exchange chromatography (II); and SEC (III). Existing methods utilize 2–3 cycles of differential ultracentrifugation after step (I) [45,46]. Purified BMV virions in PBS had an average diameter of  $31.02 \pm 5.46\text{ nm}$ , and the solution was 100% mono-disperse, as indicated by DLS measurements (Supplementary Fig. 1.). To further characterize the BMV samples, we used cryo-TEM imaging (Fig. 1). The observed BMV preparations appeared as intact icosahedral virions with an average diameter of  $29.4 \pm 1.7\text{ nm}$ . The image was processed using ImageJ software, and 100 virions were analyzed to determine the size of the BMV virion. Despite the high concentration of the samples, no aggregates or virion decay products were detected.

The total efficiency of our purification procedure was 0.2 mg of BMV per 1 g of infected barley leaves. No published data are available on the total efficiency of BMV purification using ultracentrifugation-based methods, but the average efficiency for other plant viruses purified

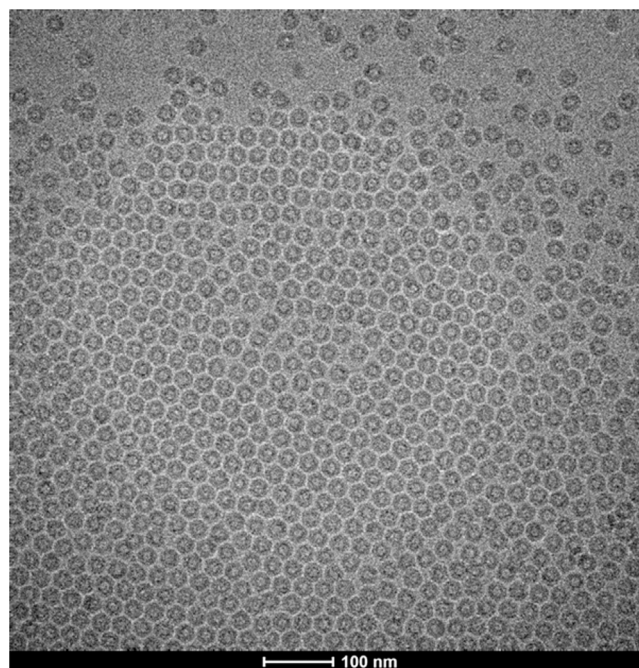


Fig. 1. Cryo-TEM image of BMV in PBS. The observed BMV intact icosahedral virions have an average diameter of  $29.4 \pm 1.7\text{ nm}$  (based on 100 virions).

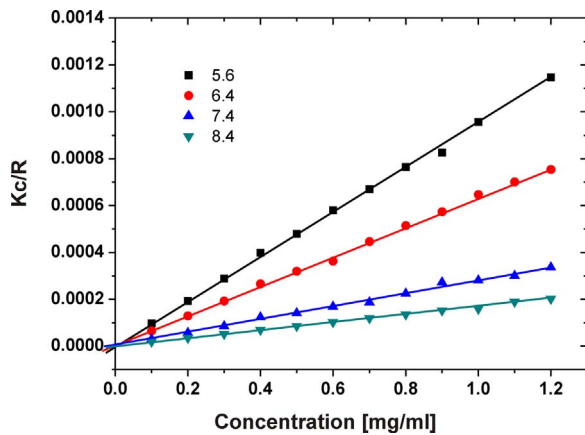


Fig. 2. Debye plot for BMV. SLS measurements were performed at four pH values at virus concentrations ranging from 0.1–1.2 mg/ml. The molecular weight of BMV was determined from the Debye plot as 4.6 MDa, as described in Materials and methods. Black squares indicate pH 5.6, red dots indicate pH 6.4, blue triangles indicate pH 7.4, and dark cyan triangles indicate pH 8.4. The osmotic second virial coefficient  $B_{22}$  calculated for each pH is presented in Table 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

using this method is similar (0.08–0.3 mg of virus per 1 g of plant tissue) [47,48]. The advantage of our protocol over the previous method is that it is easily scaled up to produce higher virus yields [49,50]. The chromatographic protein purification methods have been widely used in the biotechnology industry; for example, in the production of antibodies or serum protein-based products [51]. Thus, the application of our protocol might accelerate studies on further applications of BMV in different fields of nanotechnology and other sciences.

### 3.2. Biophysical characterization of the BMV virions

We used dynamic and static light scattering to characterize the purified BMV virions. Debye plots based on SLS measurements showed that the  $M_w$  of the virus is approximately 4.6 MDa, a constant value that is independent on the solution pH (Fig. 2). These results are consistent with the data published by Bockstahler concerning the biophysical properties of BMV [40]. The lack of a change in the molecular weight indicates that the isolation and purification procedures presented in this work do not affect the integrity of the BMV virions.

It has been proposed that viral capsids react to pH changes via structural rearrangements. Plant virus persistence at low pH in the guts of insect carriers is determined by capsid stability, while the replication cycle in plant cells is initiated at higher pH after capsid swelling and the release of the genetic material into the host cell [52–55]. During swelling at higher pH, deprotonation at specific sites in the capsid protein induces electrostatic repulsions among them and genomic RNA as well as further dissociation that leads to the release of the 5' end of genomic RNA into the host cytoplasm [53]. The swelling of viral capsids has been observed for many plant viruses, including Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV), Turnip Crinkle Virus (TCV) and Cowpea Chlorotic Mottle Virus (CCMV) [56–58]. CCMV, which belongs to the Bromoviridae family, is very similar to BMV (70% identity to the CP amino acid composition). CCMV virions are stable at pH values in the range from 3 to 6 under low ionic strength ( $I \sim 0.1$  M), and they undergo swelling; their size increases by approximately 10% when the pH is increased above 7 [59].

The radial expansion of BMV virions with increasing pH was reported over 50 years ago; however, this phenomenon has not been studied in detail [54]. To determine how BMV capsids are influenced by pH changes, we conducted a series of assays. First, virion size was assessed using DLS measurements at various pH values. According to our observations, BMV diameter changes are correlated with increases in pH, ranging from 29.06 nm at pH 5.6–31.08 nm at pH 8.4 and the

Table 1

Dependence of BMV diameter ( $D_0$ ) and the osmotic second virial coefficient ( $B_{22}$ ) on the pH of the solution. The BMV diameter was assessed based on the DLS measurements using the Stokes-Einstein equation. The osmotic second virial coefficient  $B_{22}$  was determined from the Debye plot based on the SLS results, as described in Materials and methods. The diameter measurement errors are shown in brackets.

pH	$D_0$ [nm]	$B_{22}$ [mol ml/mg <sup>2</sup> ]
5.6	29.06 (± 0.55)	$4.7695 \times 10^{-4}$
6.4	29.17 (± 0.40)	$3.1725 \times 10^{-4}$
7.4	30.99 (± 0.50)	$1.3929 \times 10^{-4}$
8.4	31.08 (± 0.56)	$0.8325 \times 10^{-4}$

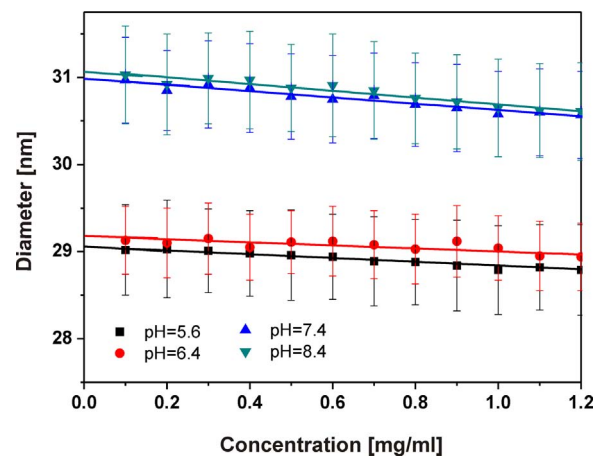


Fig. 3. Dependence of BMV diameter on solution pH. The diameter of BMV at concentrations ranging from 0.1 to 1.2 mg/ml was assessed through DLS measurements at different pH values according to the Stokes-Einstein equation, as described in Materials and methods. Black squares indicate pH 5.6, red dots indicate pH 6.4, blue triangles indicate pH 7.4, and dark cyan triangles indicate pH 8.4. BMV diameter at zero concentration is presented in Table 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

swelling involves an approximately 7% increase of diameter (Table 1, Fig. 3). Similarly, Kaesberg et al. showed that the BMV virion diameter at pH 6 was 27 nm and that this increased to 31 nm at pH values above 7 [54]. Slight differences among the BMV virion dimensions assessed by Kaesberg et al. and our results could be due to the different techniques used to measure BMV size and differences in the buffer in which BMV was suspended. Our DLS results include the hydrodynamic layer of the measured particle, which results in a slightly higher value for the particle diameter compared to X-ray scattering, which was used by Kaesberg et al. On the other hand, Nikitin et al. reported a BMV capsid diameter of  $32.1 \pm 0.6$  nm in acetate buffer at pH 4.5 [60]. However, as they noted, DLS measurements can be influenced by aggregates or contamination of the sample resulting in enlarged diameters of BMV virions at low pH [60]. The BMV purification procedure presented in our work includes size-exclusion chromatography, which eliminates aggregation products and results in a monodisperse sample.

Literature data indicate that the isoelectric point of the BMV virus occurs at pH 6.8 [61], but other reports have linked differences in virus physicochemical properties with plant host-specific posttranslational modifications [62]. These data suggest that BMV from *Hordeum vulgare* has an isoelectric point at pH 6.4. Our DLS results revealed that the greatest enlargement in BMV diameter (by approximately 2 nm) occurred between pH 6.4 and 7.4 (Fig. 3, Table 1). This enlargement might be a consequence of changing the capsid protein net charge from neutral at pH 6.4 to negative at pH 7.4, thus increasing the repulsive forces among the capsid protein units and negatively charged genomic RNA.

The osmotic second virial coefficient ( $B_{22}$ ) is calculated based on SLS results and describes the interactions among particles in solution,



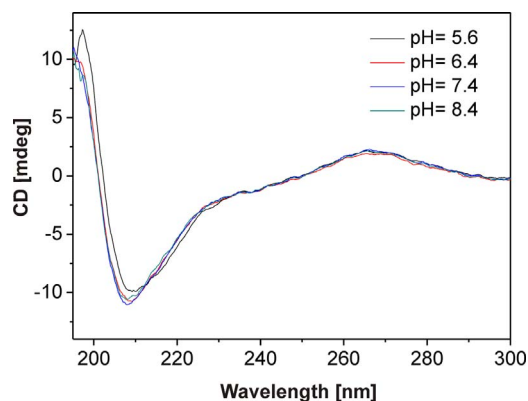


Fig. 4. CD spectra of BMV at different pH values and 20 °C. Each CD spectrum was generated based on 10 scans, as described in Materials and methods. The black line indicates pH 5.6, the red line indicates pH 6.4, the blue line indicates pH 7.4, and the dark cyan green line indicates pH 8.4. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

thus providing insight into the self-assembly or aggregation of viruses [63].  $B_{22}$  calculated for BMV at different pH values had positive values, indicating the presence of repulsive interactions among the BMV virions. The decrease of  $B_{22}$  values is correlated with increasing pH and indicates a decrease in repulsive interactions at higher pH, thus decreasing of the thickness of virion hydration shell [64] (Table 1). This confirms that the enlargement of the BMV virions in association with increasing pH as recorded by DLS is caused by capsid swelling rather than an expansion of the hydration shell. The  $B_{22}$  assessments presented by others also show that it decreases with the pH increase [65].

According to crystallographic studies,  $Mg^{2+}$  ions are coordinated by water bridges with  $Glu^{84}$ ,  $Thr^{145}$  and  $Asp^{148}$  from A, B and C CP trimer subunits and stabilize the BMV capsid structure, in which  $Glu^{84}$  constitutes a part of the  $\alpha$ -helix [23]. Thus, the lack of  $Mg^{2+}$  ions or pH changes may contribute to virion secondary structure content. To learn more about the structural changes within the BMV capsid during its pH-dependent swelling, we performed CD spectroscopic measurements (Fig. 4). Table 2 presents the impact of pH changes on the secondary structure content of the capsid protein, which is rather minimal. According to our results, approximately 23.9% of the protein structure at pH 5.6 comprises  $\beta$ -sheets. This percentage increases to 26.0% at pH 8.4. The  $\alpha$ -helix content is 24.0% at pH 5.6 and 21.0% at pH 8.4.  $\beta$ -turns comprise 25.3% of the secondary structure at pH 5.6 and 25.0% at pH 8.4. The level of structural disorder in the capsid increases from 26.8% at pH 5.6–28.0% at pH 8.4.

The structural changes of the BMV capsid were also monitored using ATR-FTIR spectroscopy. At pH 5.6, there was  $17.9 \pm 2.8\%$   $\alpha$ -helix,  $38.7 \pm 5.6\%$   $\beta$ -sheet,  $20.0 \pm 3.8\%$   $\beta$ -turns and  $23.4 \pm 2.1\%$  unordered structures. In phosphate buffer at pH 6.4, the BMV virus had a somewhat large  $\alpha$ -helix content,  $19.7 \pm 1.6\%$ , while the content of  $\beta$ -sheet (in contrast to the same structures at other pH values) reached its lowest value of  $32.1 \pm 3.3\%$ . The content of  $\beta$ -turns ( $25.1 \pm 2.9\%$ ) at this pH is the highest over the entire pH range. Unordered structures

Table 2

Secondary structure content of the BMV capsid at different pH values calculated from CD spectra. The percentage of the particular secondary structures was assessed using the CONTIN algorithm available on the DichroWeb server using references set in the range from 190 to 240 nm, as described in Materials and methods (see also Supplementary Fig. 2).

pH	$\alpha$ -helices	$\beta$ -sheets	$\beta$ -turns	unordered
8.4	21.0%	26.0%	25.0%	28.0%
7.4	22.0%	25.8%	24.1%	28.1%
6.4	24.3%	25.2%	26.1%	24.4%
5.6	24.0%	23.9%	25.3%	26.8%

Table 3

Secondary structure content of the BMV virus at different pH values calculated using ATR-FTIR spectroscopy. To calculate the secondary structure content of the virus, the positions and areas of individual bands and fractions of the total area in the amide I band region were determined using PeakFIT software, as described in Materials and methods (see also Supplementary Fig. 3).

pH	$\alpha$ -helices	$\beta$ -sheets	$\beta$ -turns	unordered
8.4	20.4%	40.6%	19.8%	19.3%
7.4	16.5%	42.0%	21.8%	19.7%
6.4	19.7%	32.1%	25.1%	20.2%
5.6	17.9%	38.7%	20.0%	23.4%

reached  $20.2 \pm 2.6\%$  at pH 6.4. At physiological pH, the secondary structural contents were as follows:  $16.5 \pm 0.6\%$   $\alpha$ -helix,  $42.0 \pm 4.0\%$   $\beta$ -sheet,  $21.8 \pm 3.5\%$   $\beta$ -turns and  $19.7 \pm 3.8\%$  unordered structures. At pH 8.4 the  $\alpha$ -helix content ( $20.4 \pm 4.6\%$ ) reached its highest level over the entire pH range, while  $\beta$ -sheets comprised  $40.6 \pm 5.3\%$ ,  $\beta$ -turn content reached its lowest value of  $19.8 \pm 5.4\%$ , and unordered structures comprised  $19.3 \pm 3.3\%$ . Overall, the  $\beta$  structure content underwent the widest range of changes (by 9.9%) with the lowest value of  $32.1 \pm 3.3\%$  at pH 6.4 and the highest value of  $42.0 \pm 4.0\%$  at pH 7.4 (see Table 3).

CD measurements show that the contents of particular secondary structures in the BMV capsid are not strongly influenced by pH; most of the observed changes were less than 5%, while significant structural changes were recorded by ATR-FTIR at pH 6.4. These differences in the ATR-FTIR spectra may be because the isoelectric point of the BMV virus occurs at approximately pH 6.4 [62]. Changing the net charge to neutral can influence the apparent rearrangement in the secondary structures of the protein at this pH. The percentage secondary structure contents of the BMV protein in the solutions over the entire pH range showed large differences, especially the  $\beta$ -sheet contents. These changes may be associated with the observed BMV swelling at pH values above its isoelectric point [61]. However, it is also likely that the various amounts of  $\beta$ -sheet structures at the various pH values may be caused by additional contributions from vibrations of the amino acid side chains located near the band at  $1628\text{--}1629\text{ cm}^{-1}$  [66].

On the other hand, the crystallographic structure of the BMV virion (at pH 5.2 and  $Mg^{2+}$  ions presence) shows approximately 10.23%  $\alpha$ -helix and approximately 20.81%  $\beta$ -sheet contents [23]. The differences in secondary structure content determined by the different methods could result from the use of different buffers and the virus concentration used. The buffer used for ATR-FTIR had 5-fold lower ionic strength than that used for the CD measurements. Both solutions were bereft of divalent ions.  $Mg^{2+}$  ions were present in the crystallization buffer, and this might be responsible for the more compact capsid structure since, as noted earlier,  $Mg^{2+}$  ions interact with amino acids involved in an  $\alpha$ -helix structure. In our analysis, BMV is in solution, and the virus is in its native state in which the protein structure can fluctuate.

#### 4. Conclusion

The purification procedure presented in this work allows BMV to be obtained for use for further applications. Biophysical analysis of BMV over the physiological pH range revealed a high integrity and stability of the virus. The purified BMV virions were capable of responding to alterations in pH in the same manner as that obtained via other methods. Interestingly, the recorded DLS and FTIR data reveal that the most significant structural changes in the virions occurred between pH 6.4 (the isoelectric point for BMV produced in *H. vulgare*) and pH 7.4. A knowledge of BMV swelling and the secondary structure analysis may be useful for improving the application of the BMV capsid as a carrier for nanoparticles. Finally, our protocol might be easily adapted for larger-scale purification and applicable to the purification of other plant viruses of similar capsid size.

## Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by grant no. UMO-2012/06/A/ST4/00373 from the National Science Center (Poland) and by the Polish Ministry of Science and Higher Education under the KNOW program.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.10.022>.

## References

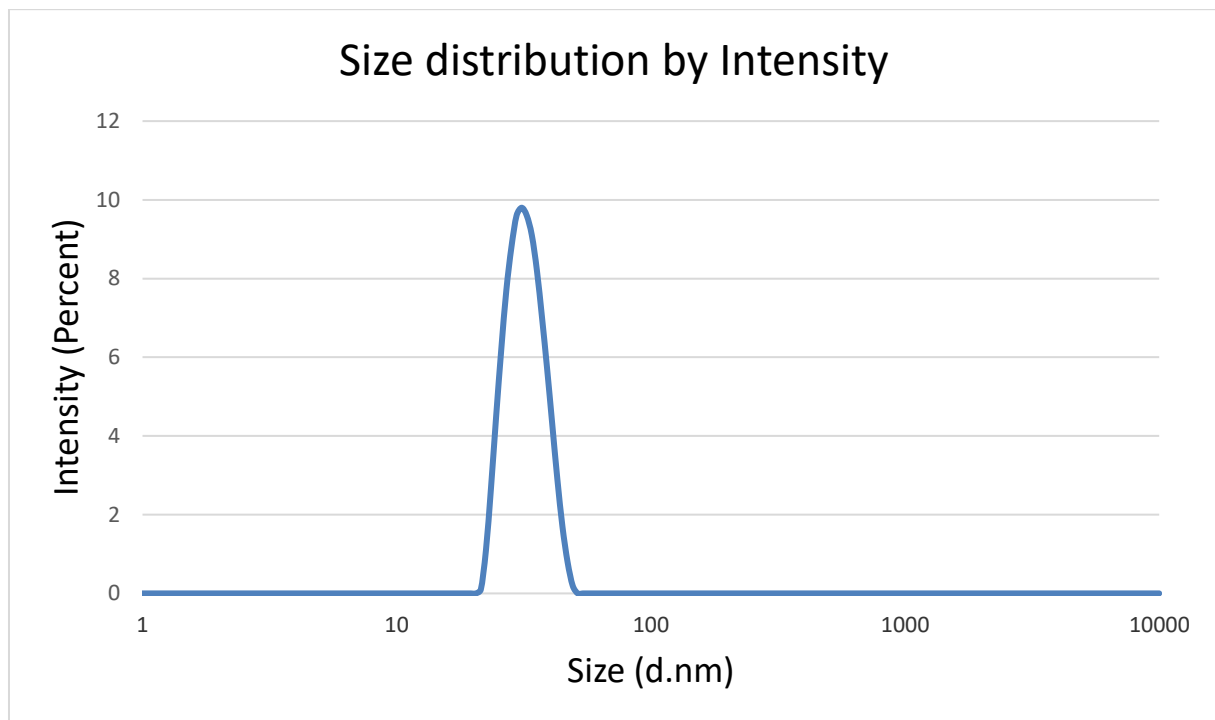
- C. Arcangeli, P. Circelli, M. Donini, A.A. Aljabali, et al., Structure-based design and experimental engineering of a plant virus nanoparticle for the presentation of immunogenic epitopes and as a drug carrier, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 32 (4) (2014 Apr) 630–647.
- Y. Ren, S.M. Wong, L.Y. Lim, Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: a novel delivery platform for doxorubicin, *Bioconjug. Chem.* 18 (May–June (3)) (2007) 836–843.
- L. Loo, R.H. Guenther, S.A. Lommel, S. Franzen, Encapsulation of nanoparticles by red clover necrotic mosaic virus, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (September (36)) (2007) 11111–11117.
- S. Deshayes, R. Gref, Synthetic and bioinspired cage nanoparticles for drug delivery, *Nanomedicine (Lond.)* 9 (July (10)) (2014) 1545–1564.
- A. Urbanowicz, M. Alejska, P. Formanowicz, J. Blazewicz, et al., Homologous crossovers among molecules of brome mosaic bromovirus RNA1 or RNA2 segments in vivo, *J. Virol.* 79 (May (9)) (2005) 5732–5742.
- A. Urbanowicz, A. Kurzyńska-Kokorniak, A. Jankowska, M. Alejska, M. Figlerowicz, Low recombination activity of R region located at both ends of the HIV-1 genome, *Acta Biochim. Polonica.* 59 (4) (2012) 619–626.
- R. Wierzchowski, A. Urbanowicz, A. Działot, M. Figlerowicz, M. Bujarski, Characterization of a novel 5' subgenomic RNA3a derived from RNA3 of Brome mosaic bromovirus, *J. Virol.* 80 (December (24)) (2006) 12357–12366.
- M. Alejska, N. Malinowska, A. Urbanowicz, M. Figlerowicz, Two types of non-homologous RNA recombination in brome mosaic virus, *Acta Biochim. Pol.* 52 (4) (2005) 833–844.
- Maloy, T.D. Murry, *Encyclopedia of plant pathology*, in: A.L.O.C. Rao (Ed.), Bromoviruses, John Wiley & Sons, Mississauga; Ontario, Canada, 2001, pp. 155–158.
- M.F. Hagan, A theory for viral capsid assembly around electrostatic cores, *J. Chem. Phys.* 21 (130 (11)) (2009 Mar) 114902.
- S.L. Calhoun, A.L. Rao, Functional analysis of brome mosaic virus coat protein RNA-interacting domains, *Arch. Virol.* 153 (2) (2008) 231–245.
- P. Annamalai, A.L. Rao, Packaging of brome mosaic virus subgenomic RNA is functionally coupled to replication-dependent transcription and translation of coat protein, *J. Virol.* 80 (October (20)) (2006) 10096–10108.
- A.L. Rao, Genome packaging by spherical plant RNA viruses, *Annu. Rev. Phytopathol.* 44 (2006) 61–87.
- M. Hema, A. Murali, P. Ni, R.C. Vaughan, et al., Effects of amino-acid substitutions in the Brome mosaic virus capsid protein on RNA encapsidation, *Mol. Plant Microbe Interact.* 23 (November (11)) (2010) 1433–1447, <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0118>.
- K. Mise, R.F. Allison, M. Janda, P. Ahlquist, Bromovirus movement protein genes play a crucial role in host specificity, *J. Virol.* 67 (May (5)) (1993) 2815–2823.
- A.L. Rao, C. Cheng Kao, The brome mosaic virus 3' untranslated sequence regulates RNA replication, recombination, and virion assembly, *Virus Res.* 3 (August (206)) (2015) 46–52.
- Y.G. Choi, T.W. Dreher, A.L. Rao, tRNA elements mediate the assembly of an icosahedral RNA virus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 655–660.
- T.W. Dreher, T.C. Hall, Mutational analysis of the sequence and structural requirements in brome mosaic virus RNA for minus strand promoter activity, *J. Mol. Biol.* 201 (1988) 31–40.
- C.C. Kao, P. Ni, M. Hema, X. Huang, B. Dragnea, The coat protein leads the way: an update on basic and applied studies with the Brome mosaic virus coat protein, *Mol. Plant Pathol.* 12 (May (4)) (2011) 403–412.
- P. Ahlquist, Bromovirus RNA replication and transcription, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2 (1992) 71–76.
- M. Cuillel, C. Berthet-Colominas, B. Krop, A. Tardieu, et al., Self-assembly of brome mosaic virus capsids: kinetic study using neutron and X-ray solution scattering, *J. Mol. Biol.* 164 (March (4)) (1983) 645–650.
- M. Figlerowicz, Role of RNA structure in non-homologous recombination between genomic molecules of brome mosaic virus, *Nucleic Acids Res.* 28 (April (8)) (2000) 1714–1723.
- R.W. Lucas, S.B. Larson, A.J. McPherson, The crystallographic structure of brome mosaic virus, *Mol. Biol.* 317 (March (1)) (2002) 95–108.
- A.C. Steven, P.R. Smith, R.W. Horne, Capsid fine structure of cowpea chlorotic mottle virus: from a computer analysis of negatively stained virus array, *J. Ultrastruct. Res.* 64 (1978) 63–73.
- M. De Wispelaere, S. Chaturvedi, S. Wilkens, A.L. Rao, Packaging and structural phenotype of brome mosaic virus capsid protein with altered N-terminal  $\beta$ -hexamer structure, *Virology* 419 (1 (October (10)) (2011) 17–23.
- J. Effic Zhu, K. Gopinath, A. Murali, G. Yi, et al., RNA-binding proteins that inhibit RNA virus infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 3129–3134.
- G. Yi, E. Letteney, C.H. Kim, C.C. Kao, Brome mosaic virus capsid protein regulates accumulation of viral replication proteins by binding to the replicase assembly RNA element, *RNA* 15 (2009) 615–626.
- G. Yi, R.C. Robert Vaughan, I. Ian Yarbrough, S. Dharmiaiah, C.C. Kao, RNA binding by the brome mosaic virus capsid protein and the regulation of viral RNA accumulation, *J. Mol. Biol.* 391 (2009) 314–326.
- J.A. Speir, S. Munshi, G. Wang, T.S. Baker, J.E. Johnson, Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy, *Structure* 3 (1995) 63–78.
- R. Sacher, P. Ahlquist, Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection, *J. Virol.* 63 (1989) 4545–4552.
- R. Vaughan, B. Tragesser, P. Ni, X. Ma, et al., The tripartite virions of the brome mosaic virus have distinct physical properties that affect the timing of the infection process, *J. Virol.* 88 (June (11)) (2014) 6483–6491.
- B. Dragnea, C. Chen, E.S. Kwak, B. Stein, C.C. Kao, Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for in vitro studies on single viruses, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (May (21)) (2003) 6374–6375.
- C. Chen, E.S. Kwak, B. Stein, C.C. Kao, B. Dragnea, Packaging of gold particles in viral capsids, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 5 (December (12)) (2005) 2029–2033.
- C. Chen, M.C. Daniel, Z.T. Quinkert, M. De, et al., Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages, *Nano Lett.* 6 (April (4)) (2006) 611–615.
- S.K. Dixit, N.L. Goicochea, M.C. Daniel, A. Murali, et al., Quantum dot encapsulation in viral capsids, *Nano Lett.* 6 (September (9)) (2006) 1993–1999.
- X. Huang, L.M. Bronstein, J. Retrum, C. Dufort, et al., Self-assembled virus-like particles with magnetic cores, *Nano Lett.* 7 (August (8)) (2007) 2407–2416.
- X. Huang, B.D. Stein, H. Cheng, A. Malyutin, et al., Magnetic virus-like nanoparticles in *N. benthamiana* plants: a new paradigm for environmental and agro-nomic biotechnological research, *ACS Nano* 24 (May (5)) (2011) 4037–4045.
- S.K. Dixit, N.L. Goicochea, M.C. Daniel, A. Murali, et al., Quantum dot encapsulation in viral capsids, *Nano Lett.* 6 (September (9)) (2006) 1993–1999.
- B. Jung, A.L. Rao, B. Anvari, Optical nano-constructs composed of genome-depleted brome mosaic virus doped with a near infrared chromophore for potential biomedical applications, *ACS Nano* 5 (February (2)) (2011) 1243–1252.
- L.E. Bockstahler, P. Kaesberg, The molecular weight and other biophysical properties of bromegrass mosaic virus, *Biophys. J.* 2 (January (1)) (1962) 1–9.
- A.W. Wen, K.L. Lee, I. Yildiz, M.A. Bruckman, et al., Viral nanoparticles for *In vivo* tumor imaging, *J. Vis. Exp.* 69 (2012) (4352).
- E. Banachowicz, Light scattering studies of proteins under compression, *Biochim. Biophys. Acta* 1764 (2006) 405–413.
- J. Czubiński, J. Barciszewski, M. Gilski, K. Szpotkowski, et al., Structure of gamma-conglutin: insight into the quaternary structure of 7S basic globulins from legumes, *Acta Crystallogr. Sect. D* 71 (2015) 224–238.
- J.J. Bujarski, Bromovirus isolation and RNA extraction, *Methods Mol. Biol.* 81 (1998) 183–188.
- R. Quadt, E.M. Jaspars, Purification and characterization of brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase, *Virology* 178 (1) (1990 Sep) 189–194.
- H.S. Hoover, J.C. Wang, S. Middleton, P. Ni, A. Zlotnick, R.C. Vaughan, C.C. Kao, Phosphorylation of the brome mosaic virus capsid regulates the timing of viral infection, *J. Virol.* 12 (August (17)) (2016) 7748–7760, <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00833-16>.
- J.A. Speir, S. Munshi, T.S. Baker, J.E. Johnson, Preliminary X-ray data analysis of crystalline cowpea chlorotic mottle virus, *Virology* 193 (1) (1993 Mar) 234–241.
- J. Cao, R.H. Guenther, T.L. Sit, C.H. Opperman, S.A. Lommel, J.A. Willoughby, Loading and release mechanism of red clover necrotic mosaic virus derived plant viral nanoparticles for drug delivery of doxorubicin, *Small* 29 (December(24)) (2014 Dec) 5126–5136, <http://dx.doi.org/10.1002/sml.201400558> (Epub 2014 Aug 5).
- Y. Chisti, M. Moo-Young, Large scale protein separations: engineering aspects of chromatography, *Biotechnol. Adv.* 8 (4) (1990) 699–708.
- Li. Zhiguo, Gu. Yesong, Gu. Tingyue, Mathematical modeling and scale-up of size-exclusion chromatography, *Biochem. Eng. J.* 2 (1998) 145–155.
- P. Hong, S. Koza, E.S. Bouvier, Size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (November (20)) (2012) 2923–2950.
- J.B. Bancroft, G.J. Hills, R. Markham, A study of the self-assembly process in a small spherical virus: formation of organized structures from protein subunits in vitro, *Virology* 31 (February (2)) (1967) 354–379.
- B.J.M. Verduin, Early interactions between viruses and plants, *Semin. Virol.* 3 (2016) 423–431.
- N.L. Incardona, P. Kaesberg, A pH-induced structural change in bromegrass mosaic virus, *Biophys. J.* 4 (1 Pt 1) (1964) 11–21.
- B.D. Wilts, I.A. Schaap, C.F. Schmidt, Swelling and softening of the cowpea chlorotic mottle virus in response to pH shifts, *Biophys. J.* 108 (May (10)) (2015) 2541–2549.
- I.K. Robinson, S.C. Harrison, Structure of the expanded state of TBSV, *Nature* 297 (1982) 563–567.
- P.K. Sorger, P.G. Stockley, S.C. Harrison, Structure and assembly of turnip crinkle

- virus II: mechanism of reassembly in vitro, *J. Mol. Biol.* 191 (1986) 639–658.
- [58] H. Liu, C. Qu, J.E. Johnson, D.A. Case, Pseudo-atomic models of swollen CCMV from cryo-electron microscopy data, *J. Struct. Biol.* 142 (June (3)) (2003 Jun) 356–363.
- [59] L. Lavelle, J.P. Michel, M. Gingery, The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids, *J. Virol. Methods* 146 (December (1-2)) (2007) 311–316 (Epub 2007 Sep 4).
- [60] N. Nikitin, E. Trifonova, E. Evtushenko, M. Kirpichnikov, et al., Comparative study of non-enveloped icosahedral viruses size, *PLoS One* 6 (November(11)) (2015) e0142415.
- [61] R.H. Rice, J. Horst, Isoelectric focusing of viruses in polyacrylamide gels, *Virology* 49 (2) (1972) 602–604.
- [62] P. Ni, R.C. Vaughan, B. Tragesser, H. Hoover, C.C. Kao, The plant host can affect the encapsidation of brome mosaic virus (BMV) RNA: BMV virions are surprisingly heterogeneous, *J. Mol. Biol.* 426 (5) (2014) 1061–1076.
- [63] J.F. Vega, E. Vicente-Alique, R. Núñez-Ramírez, Y. Wang, J. Martínez-Salazar, Evidences of changes in surface electrostatic charge distribution during stabilization of HPV16 virus-like particles, *PLoS One* 17 (February(2)) (2016 Feb) e0149009.
- [64] B.L. Neal, D. Asthagiri, O.D. Velev, A.M. Lenhoff, E.W. Kaler, Why is the osmotic second virial coefficient related to protein crystallization, *J. Cryst. Growth* 196 (1999) 377–387.
- [65] F. Bonneté, D. Vivarès, Interest of the normalized second virial coefficient and interaction potentials for crystallizing large macromolecules, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58 (Pt 10 Pt 1) (2002) 1571–1575.
- [66] J. Kong, S. Yu, Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39 (8) (2007) 549–559.

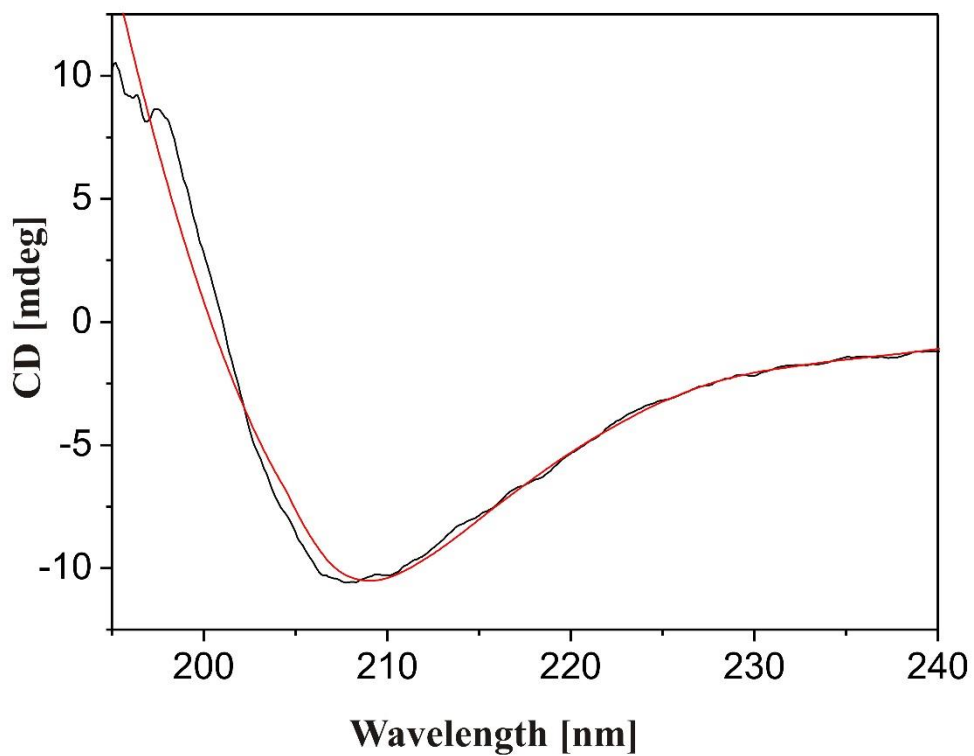
## SUPPLEMENTARY DATA

### Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method

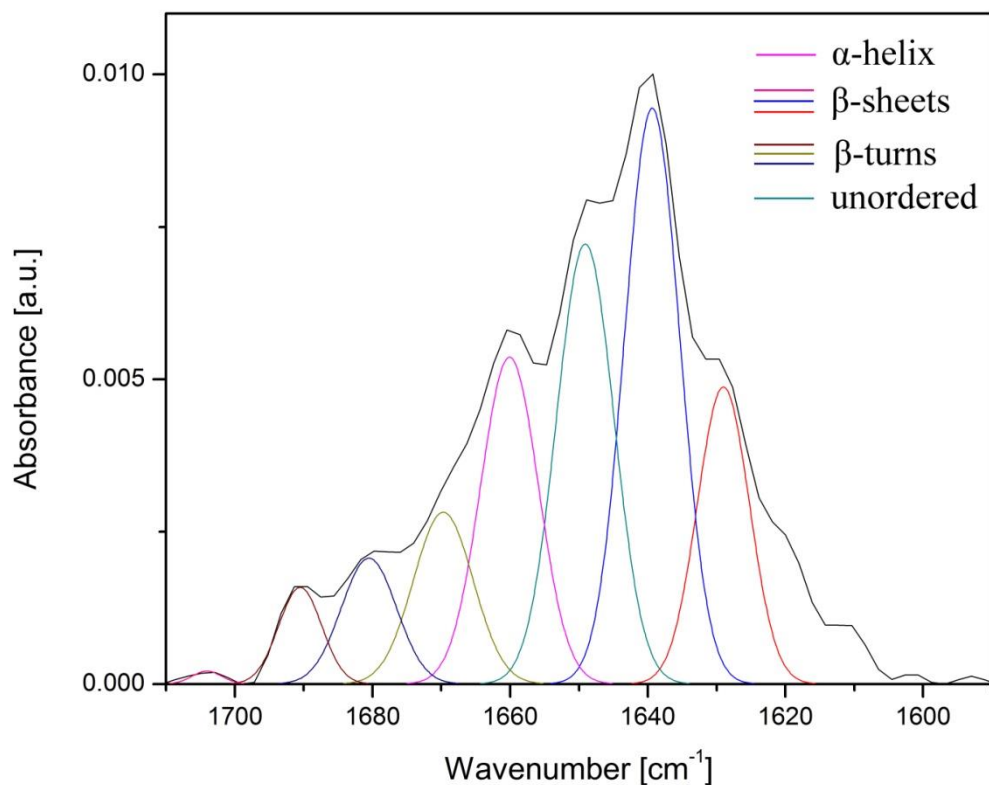
Strugała A, Kręcisz M, Rybka JD, Urbanowicz A, Szpotkowski K, Bierwagen P, Figlerowicz M, Kozak M, Böttcher C, Giersig M



**Supplementary Figure 1. Exemplary DLS measurement data on BMV after SEC.** BMV virions in PBS had  $31.02 \pm 5.46$  nm diameter and the solution was 100% monodisperse.



**Supplementary Figure 2. Experimental CD spectrum (black line) and fit (red line) determined with Contin algorithm available on Dichroweb server, collected and generated for BMV.** Experimental data refers to measurement at pH 8.4. The experimental data were processed using references set in the range from 190 to 240 nm.



**Supplementary Figure 3. An example of a deconvoluted FTIR spectrum in the region of amide I.** The analysis of FTIR spectral region of amide I at different pHs revealed fitting of eight peaks which can be associated with the secondary structure of the protein backbone. Peaks which appeared in region  $1701.1 \pm 2.2 - 1701.9 \pm 1.8 \text{ cm}^{-1}$  were assigned to  $\beta$ -sheets [S.1,67]. Bands  $1667.7 \pm 2.5 - 1669.2 \pm 3.9 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1679.1 \pm 4.5 - 1680.3 \pm 2.1 \text{ cm}^{-1}$  and  $1685.0 \pm 0.5 - 1691.0 \pm 1.1 \text{ cm}^{-1}$  were established as vibrations from  $\beta$ -turn structures [S.2,67]. Peaks from region  $1658.5 \pm 2.2 - 1659.1 \pm 1.6 \text{ cm}^{-1}$  were determined as vibrations from  $\alpha$ -helix structures [S.1,S.2,64]. Unordered structures were related with vibrations at wavenumbers  $1646.9 \pm 2.1 - 1649.0 \pm 1.5 \text{ cm}^{-1}$  [S.1,S.3,67]. Two last peaks from fitted regions  $1638.7 \pm 1.0 - 1640.1 \pm 0.7 \text{ cm}^{-1}$  and  $1628.0 \pm 0.9 - 1629.5 \pm 1.2 \text{ cm}^{-1}$  were assigned to  $\beta$ -sheets structures [S.1,S.3,67]. Bands matching of specific structures vary depending on the pH. These differences hovering around in the range of  $1 - 3 \text{ cm}^{-1}$ . Bands from region  $1610 - 1620 \text{ cm}^{-1}$  which were also visible on the spectra probably derived from vibrations of amino acids side chains [67]. Peak located near  $1602 \text{ cm}^{-1}$  may be linked with ring vibration from tyrosine [67]. FTIR spectrum is represented by the black line. Fitted bands derived from Gaussian curve-fitting, which are correlated with the vibrations from the secondary structure of the BMV protein backbone are shown below the spectrum. Magenta line refers to the structure of  $\alpha$ -helix. Pink, light blue and red lines refer to the structures of  $\beta$ -sheets. Brown, olive and dark blue lines refer to the structures of  $\beta$ -turns and cyan blue line refers to the unordered structures.

## SUPPLEMENTARY DATA REFERENCES

[S.1] Fu, K., Griebenow, K., Hsieh, L., Klibanov, A.M., Langer, R., FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*. 58, 1999, 357-366.

[S.2] Pelton, J.T., McLean, L.R., *Spectroscopic Methods for Analysis of Protein Secondary Structure*. *Analytical Biochemistry*, 277 2000, 167-176.

[S.3] Barth, A., *Infrared spectroscopy of proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1767 2007, 1073-1101.

[64] Vega, J.F., Vicente-Alique, E., Núñez-Ramírez, R., Wang, Y., Martínez-Salazar, J., Evidences of Changes in Surface Electrostatic Charge Distribution during Stabilization of HPV16 Virus-Like Particles. *PLoS One*. 2016 Feb 17;11(2):e0149009.

[67] Kong, J., Yu, S., *Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 39 (8) 2007, 549-559

## The influence of ligand charge and length on the assembly of *Brome mosaic virus* derived virus-like particles with magnetic core

Adam A. Mieloch,<sup>1,2,a</sup> Monika Kręcisz,<sup>1,2,a</sup> Jakub D. Rybka,<sup>1,2,b</sup>  
Aleksander Strugała,<sup>1,3</sup> Michał Krupiński,<sup>4</sup> Anna Urbanowicz,<sup>3,5</sup>  
Maciej Kozak,<sup>6</sup> Bohdan Skalski,<sup>1</sup> Marek Figlerowicz,<sup>3,7,8</sup>  
and Michael Giersig<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznan, Poland

<sup>2</sup>Centre for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznan, Poland

<sup>3</sup>Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland

<sup>4</sup>The Henryk Niewodniczański Institute of Nuclear Physics, Polish Academy of Sciences, 31-342 Krakow, Poland

<sup>5</sup>Institute of Chemical Technology and Engineering, Poznan University of Technology, 60-965 Poznan, Poland

<sup>6</sup>Faculty of Physics, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznan, Poland

<sup>7</sup>Institute of Computing Science, Poznan University of Technology, 60-965 Poznań, Poland

<sup>8</sup>European Centre for Bioinformatics and Genomics, Poznań 60-965, Poland

(Received 30 October 2017; accepted 25 February 2018; published online 5 March 2018)

Virus-like particles (VLPs) have sparked a great interest in the field of nanobiotechnology and nanomedicine. The introduction of superparamagnetic nanoparticles (SPIONs) as a core, provides potential use of VLPs in the hyperthermia therapy, MRI contrast agents and magnetically-powered delivery agents. Magnetite NPs also provide a significant improvement in terms of VLPs stability. Moreover employing viral structural proteins as self-assembling units has opened a new paths for targeted therapy, drug delivery systems, vaccines design, and many more. In many cases, the self-assembly of a virus strongly depends on electrostatic interactions between positively charged groups of the capsid proteins and negatively charged nucleic acid. This phenomenon imposes the negative net charge as a key requirement for the core nanoparticle. In our experiments, Brome mosaic virus (BMV) capsid proteins isolated from infected plants *Hordeum vulgare* were used. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) with 15 nm in diameter were synthesized by thermal decomposition and functionalized with COOH-PEG-PL polymer or dihexadecylphosphate (DHP) in order to provide water solubility and negative charge required for the assembly. Nanoparticles were characterized by Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential, Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) and Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) magnetometry. TEM and DLS study were conducted to verify VLPs creation. This study demonstrates that the increase of negative surface charge is not a sufficient factor determining successful assembly. Additional steric interactions provided by longer ligands are crucial for the assembly of BMV SPION VLPs and may enhance the colloidal stability. © 2018 Author(s). All article content, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). <https://doi.org/10.1063/1.5011138>

<sup>a</sup>equal contribution

<sup>b</sup>Corresponding Author: Dipl.-Ing. Dr.nat.techn. Jakub Rybka [jrybka@amu.edu.pl](mailto:jrybka@amu.edu.pl), Centre for Advanced Technologies, Adam Mickiewicz University, ul. Umultowska 89C, 61-614 Poznan, Poland tel: +48 61 829 1875





## INTRODUCTION

The definition of virus-like particles (VLPs) includes a plethora of biological structures related to viruses in terms of morphology, structure and self-assembly. In most cases, the term describes entities of viral origin subjected to structural or functional alterations e.g. capsids deprived of nucleic acid or genetically-modified capsid subunits. The most prominent characteristic of VLPs is their relative ease of creation through self-assembly of viral proteins. Due to a very broad spectrum of potential applications VLPs have been extensively studied for over three decades.<sup>1,2</sup> Combined effort of many research groups proved their exceptional utility as vaccines, gene-carrying nanocontainers, MRI contrast agents, drug-delivery vectors etc.<sup>3-6</sup>

Brome mosaic virus (BMV) is an icosahedral plant virus containing 4 ssRNA strands, incorporated within three separate particles. RNA1 and RNA2 are packaged separately, while RNA3 and RNA4 are co-packaged. The capsid forms a T=3 lattice and consists of 180 identical proteins. Subsequently, they form dimers and then, pentameric or hexameric subunits. Native form of the virus has the outer diameter of approximately 28 nm and the inner diameter of 18 nm. The mechanism of self-assembly is mainly driven by electrostatic interactions between positively charged arginine-rich motifs (ARMs) of the coat protein and negatively charged phosphate groups of the RNA.<sup>7,8</sup> The BMV capsid remains stable in buffers with pH below 5.0 and moderate ionic strength. The increase in pH above 7.5 and ionic strength higher than 0.5 M promotes capsid dissociation and allows for viral RNA precipitation. Decrease of the pH and ionic strength back to previous values initiates reassembly of the capsid.<sup>9</sup> This approach has been utilized in creation of BMV VLPs containing various cores e.g. gold nanoparticles, quantum dots, magnetite nanoparticles.<sup>9-11</sup>

BMV can be obtained through infection of various hosts. Importantly, the physicochemical differences between virions produced in barley, wheat and *Nicotiana benthamiana* are not trivial. The study done by Ni *et al.*, revealed host-specific variations in electrostatic charges, isoelectric profiles and capsid-RNA interactions of the virions. These parameters were shown to affect thermal stability of the capsid.<sup>12</sup> Obtained data indicates that the host effects plays an important role in the self-assembly of the VLPs and has to be taken into consideration while drawing conclusions regarding BMV VLPs assembly mechanisms.

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have a set of unique magnetic and physicochemical characteristics qualifying them as a promising tool in many biomedical applications. High-yield production methods, low-toxicity and tunable surface and magnetic properties render them exceptionally useful in many applications e.g. contrast agent in MRI, magnetically driven carrier in targeted drug delivery or in magnetic hyperthermia for cancer treatment, etc.<sup>13-17</sup> Theoretical studies done by Kusters *et al.* indicates that the core size polydispersity, as low as 1%, strongly affects the assembly efficiency.<sup>18</sup> Therefore, high monodispersity of SPIONs is an essential prerequisite.

In our study, 15 nm in diameter SPIONs were obtained *via* thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in organic solvent. This method provides high quality and quantity of the SPIONs.<sup>19</sup> Obtained nanoparticles contain oleic acid residues on the surface. Further functionalization was required to obtain water solubility and negative charge on the surface of the SPIONs. Two compounds were chosen for the experiment: distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy-(PEG)2000] (HOOC-PEG-PL), used in similar experiments by Dragnea *et al.*, and dihexadecylphosphate (DHP).<sup>10</sup> We estimated, that 15 nm particles after functionalization will have ~ 18 nm in diameter, which is commensurate with inner cavity of BMV T=3 capsid. Both compounds share similar mechanism of functionalization through hydrophobic interactions between oleic acid residues on the surface of the SPIONs and twin alkyl chains. Our study investigates how different values of negative surface charge and steric effects influence the process of BMV self-assembly on functionalized SPIONs.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) synthesis

SPIONs were synthesized *via* modified route of iron (III) acetylacetonate thermal decomposition in 1-octadecene with oleic acid as surfactant (NP OA).<sup>20</sup> Obtained nanoparticles were analyzed with

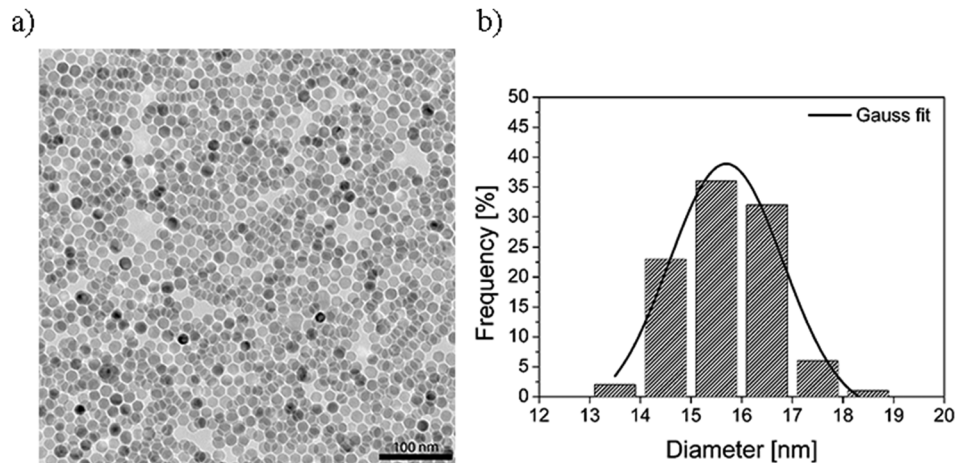


FIG. 1. **a)** SPIONs synthesized via thermal decomposition of  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  suspended in chloroform visualized in TEM. **b)** SPIONs size distribution histogram.

TEM (Figure 1a). Data shows that  $15.70 \pm 0.95$  nm in diameter nanoparticles were spherical and monodispersed (Figure 1b).

### Magnetic behavior of SPIONs

Magnetic properties of the obtained nanoparticles were assessed with SQUID magnetometry. Magnetic coercivity ( $H_c$ ) of the 15.7 nm at 300K is close to 0 Oe, which means that there is no energy dissipated during repeated reversing of magnetization – defining the material as superparamagnetic (Figure 2b). Magnetic saturation at this temperature ( $M_s$ ) equals 39.6 emu/g (Figure 2b). Blocking temperature obtained from zero field cooling and field cooling (ZFC-FC) measurement is 139 K (Figure 2a). Below blocking temperature at 5 K,  $H_c = 700$  Oe and  $M_s = 42.9$  emu/g (Figure 2c).

### SPIONs functionalization

As synthesized, SPIONs surface is covered in alkyl chains of oleic acid rendering them hydrophobic. Two compounds were used for functionalization: COOH-PEG-PL copolymer and dihexadecylphosphate (DHP) (Figure 3). Both compounds functionalize the surface of SPIONs through hydrophobic interactions between oleic acid residues and alkyl chains, creating micelles. COOH-PEG-PL has been successfully used as a coating agent in previous studies regarding BMV assembly with magnetic cores.<sup>10</sup> The main drawbacks of this compound is its cost and low availability, which drastically decreases commercial potential. Our goal was to find an alternative compound providing negative surface charge density sufficient for self-assembly.<sup>21</sup> DHP is an anionic surfactant molecule with two alkyl chains and negatively charged phosphate group, which has been widely utilized in the field of electrochemical sensing and biosensing.<sup>22</sup> Due to explicit differences in structure, we

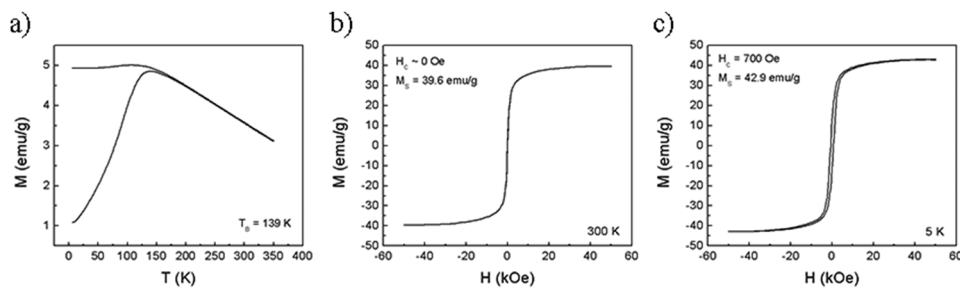


FIG. 2. SQUID magnetometry of the SPIONs. **a)** ZFC-FC, blocking temperature **b)** Magnetic coercivity ( $H_c$ ) and magnetic saturation ( $M_s$ ) at 300K. **c)**  $H_c$  and  $M_s$  at 5K.

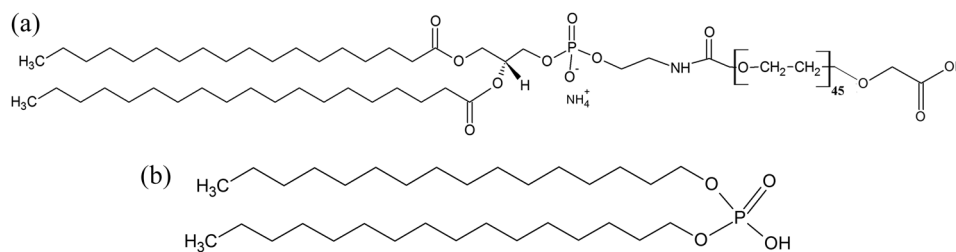


FIG. 3. Molecular structure of ligands used to functionalize SPIONs. a) COOH-PEG-PL. b) DHP.

decided to investigate whether the presence of long polymer chain is as a prerequisite for BMV VLPs creation. Zeta potential analysis revealed the difference in values between functionalized SPIONs: DHP =  $-56.6 \pm 0.7$  mV (further referred as NP DHP), COOH-PEG-PL =  $-31 \pm 0.4$  mV (further referred as NP PEG) (Figure 4). We assumed that higher value of total negative charge could compensate for possible low ligand density and still provide sufficient surface charge density required for self-assembly. Hydrodynamic diameter of the functionalized SPIONs was assessed using Dynamic Light Scattering (DLS) measurement (Figure 5a). NP PEG were  $57 \pm 15$  nm in diameter. NP DHP had slightly smaller diameter of  $52 \pm 12$  nm. Broad distributions and significant standard deviations of size diameters for both DLS measurements can be related with particles size distribution revealed with TEM analysis.

Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) analyses showed that all spectra for nanoparticles contain peaks around  $574\text{ cm}^{-1}$  and  $623\text{ cm}^{-1}$  originating from stretching vibrations of Fe-O, which confirm existence of iron oxide nanoparticles (Figure 6).<sup>23,24</sup> Peaks around  $1400\text{ cm}^{-1}$  and  $1630\text{ cm}^{-1}$  on the NP OA spectrum can be attributed to the symmetric and asymmetric stretching of carboxylate (COO<sup>-</sup>), which refers to the binding between iron oxide and oleic acid.<sup>25,26</sup> Broad peaks in the region between  $3200 - 3600\text{ cm}^{-1}$  visible in almost all spectra, can be assigned to the vibrations of the hydroxyl group (OH<sup>-</sup>). Strong absorption bands around  $3400\text{ cm}^{-1}$  can also originate from bonds of nanoparticles' surface.<sup>23,24</sup> Stretchings of double bonded C=O group are also visible around  $1700\text{ cm}^{-1}$  on spectra for nanoparticles and pure PEG. All spectra contain sharp peaks in the range of  $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$  assigned to the vibrations of the C-H group.<sup>23</sup> We assumed that functionalization process was successful for either PEG and DHP polymer due to the shifts of asymmetric and symmetric CH<sub>2</sub> vibrations and presence of characteristic peaks. On the spectrum of nanoparticles with oleic acid we established high values of wavenumbers for those vibrations. It can be correlated with conformation of the alkyl chains – *trans* and *gauche* isomers. Shift toward lower wavenumbers for functionalised particles indicates that more chains are in *trans* conformation and particles are in more ordered state.<sup>27,28</sup> Characteristic sharp peak around  $1111\text{ cm}^{-1}$  visible on spectra for pure

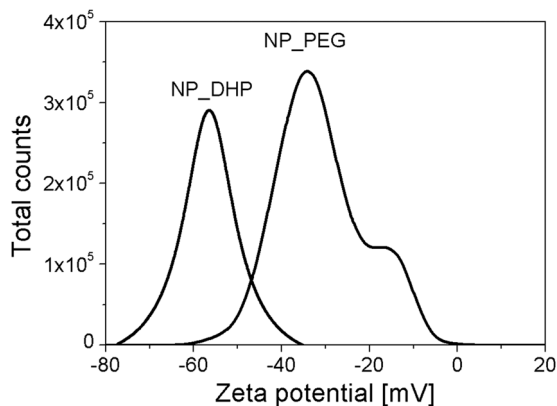


FIG. 4. Zeta potential measurement of SPIONs functionalized with DHP (NP\_DHP) and COOH-PEG-PL (NP\_PEG).

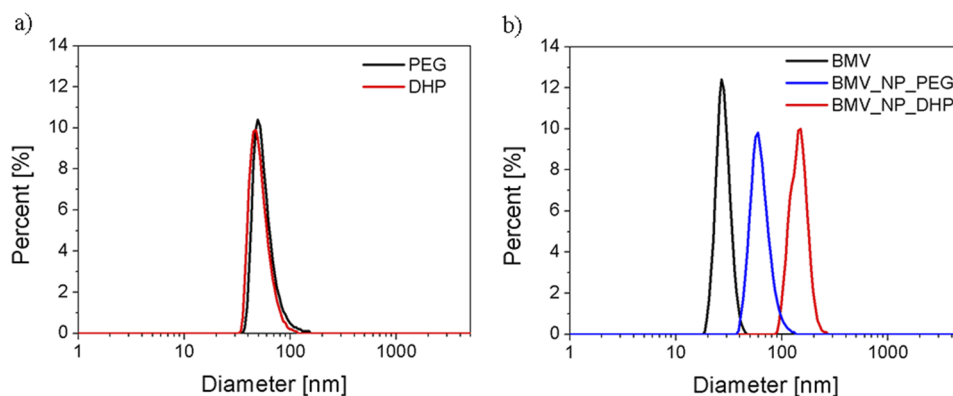


FIG. 5. Number-based particle size distributions of **a)** SPIONs functionalized with DHP and COOH-PEG-PL (PEG) **b)** VLPs assembled with magnetic cores and native BMV.

PEG and nanoparticles functionalised with this polymer correspond to the stretching vibrations of C-O-C group from repeated units of the polyethylene glycol backbone.<sup>28</sup> On the spectra for pure polymers and functionalised particles we can also see peaks connected with other CH<sub>2</sub> group vibrations - wagging (1350 cm<sup>-1</sup>), twisting (1250 cm<sup>-1</sup>) of CH<sub>2</sub> and scissoring bands in the range of 1430-1490. Peaks from asymmetric and symmetric stretching of PO<sub>2</sub><sup>-</sup> group can also be found on those spectra.<sup>28</sup>

### VLPs assembly

The assembly of BMV NP PEG was performed according to previously published protocol.<sup>10</sup>

The native structure of synthesized virus is shown in Fig. 7a, in this cryo-microscopic image the monodisperse without defects structure is clearly visible. In followed TEM images the core-shell structures (magnetic core and protein shell) was the superparamagnetic particles was in ca 90% of viruses detected (see Figure 7b). Calculated size of the VLPs was  $26.4 \pm 2.1$  nm which is similar to diameter of the native BMV  $\sim 28$  nm. This indicates T=3 capsid symmetry as shown in other studies.<sup>9</sup> Calculated thickness of the shell was  $5.20 \pm 0.03$  nm, which also corresponds to the native form of the BMV.<sup>8</sup> This method provided well separated VLPs containing only one core particle

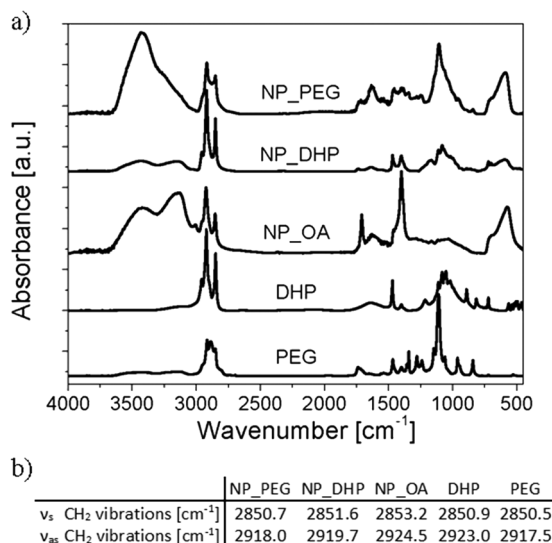


FIG. 6. FTIR spectra of functionalization intermediates and products **a)** with wavenumber characteristic **b)** of their symmetric ( $\nu_s$ ) and asymmetric ( $\nu_{as}$ ) stretching CH<sub>2</sub> vibrations.

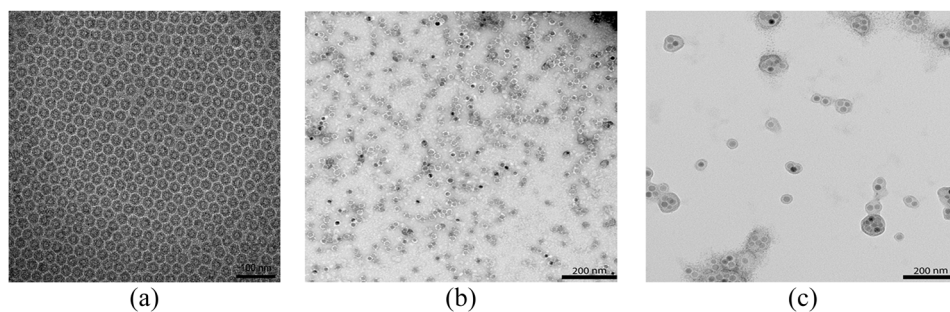


FIG. 7. TEM images of the assembled VLPs. **a)** cryo TEM images of natives BMV virus **b)** BMV VLPs with COOH-PEG-PL functionalized SPIONs as core **c)** BMV VLPs with DHP functionalized SPIONs as core.

in majority. In case of BMV NP DHP assembly, applying the same protocol did not result in VLPs creation. Mixing NP DHP with BMV dimers in the assembly buffer, resulted in precipitation and no VLPs were created. According to our experience drawn from HBcAg assembly studies, NP DHP proved stable in phosphate/citrate buffer. Abiding the rationale behind BMV self-assembly, modified assembly buffer has been introduced. This approach has been successful and resulted in BMV DHP VLPs formation (Figure 7b). Obtained VLPs were  $25.5 \pm 2.7$  nm in diameter. The thickness of the shell was  $5.53 \pm 0.97$  nm. This indicates that despite different coatings, the result of the assembly is similar. However, in case of BMV DHP VLPs, many multicore aggregates were also formed. One of possible explanations for this result is a gradual neutralization of the surface charge by BMV capsid proteins, leading to deprivation of electrostatic repulsive forces. Gradually decreasing stability of NP DHP could significantly facilitate formation of multicore and aggregated VLPs. In case of NP PEG, colloid stability is achieved through both steric and electrostatic interactions. Therefore, neutralization of the surface charge does not attenuate overall stability sufficiently to disturb the assembly, leaving the steric component intact. Our studies also showed longer storage stability of BMV NP PEG, which can be attributed to two characteristics: higher amount of well dispersed single core VLPs and some portion of PEG tails protruding out of VLP through protein shell, adding to its stability. Comparative study by Malyutin *et al.* revealed the behavior of poly(ethylene glycol) tails in BMV and hepatitis B virus (HBV) VLPs, indicating that in case of BMV VLPs majority of tails remain entrapped between the core and the protein layer. Whether the remaining fraction of protruding PEG tails contributes significantly to the increased stability, remains to be elucidated. Dynamic Light Scattering measurements revealed hydrodynamic diameters of VLPs (Figure 5b). Number distributions and hydrodynamic diameters of native BMV established at  $28.1 \pm 4.4$  nm. BMV NP PEG diameter was established at  $63 \pm 13$  nm and it is larger than diameter for both pure nanoparticles with PEG polymer and native BMV, which was also measured by DLS and appointed at  $28.1 \pm 4.4$  nm. BMV NP DHP diameter shifted toward higher values of  $145 \pm 27$  nm. Such high value of the hydrodynamic diameter in comparison with diameters of the native BMV and nanoparticles with DHP polymer, can be related with possibility of clusters or aggregates formation during the assembly process.

## CONCLUSIONS

Our study demonstrates how electrostatic and steric properties of the functionalized SPIONs govern the process of the BMV VLPs assembly. Usage of PEG tail containing COOH-PEG-PL compound as a functionalizing agent resulted in well dispersed single core VLPs. DHP functionalized SPIONs required major modifications in the assembly buffer composition. This resulted in BMV VLPs creation, however obtained particles formed many clusters and fewer single core VLPs could be found. Obtained results indicate that nanoparticles stabilized solely through electrostatic interactions may require different approach in core containing VLPs creation. The lack of steric stabilization poses a disadvantage in terms of VLPs assembly, morphology and storage stability.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Oleic acid (technical grade 90%), Iron (III) acetylacetonate (97%), Sodium chloride (99%), Dihexadecyl phosphate, 1-Octadecene (90%), 2-Butanol (95.5%), Trizma<sup>®</sup> base (99.9%), Calcium chloride (97%), Magnesium chloride (98%), Magnesium acetate tetrahydrate (99%), Sodium acetate (99%), Glycine (99%), Glycerol (99%), Citric acid (99.5%), Sodium phosphate dibasic (99%) Sigma-Aldrich (Poznan, Poland). Toluene (99.5%), n-Hexane (99%), Chloroform (98.5%), Hydrochloric acid (30-35%), Avantor (Gliwice, Poland). Boric acid (99%), ICN biomedical (USA). PEG 8000 (reagent grade) BioShop (Canada). 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[carboxy-(polyethylene glycol)2000] (ammonium salt) (COOH-PEG- PL, 2000 Da PEG (99%) Avanti (USA). Snakeskin<sup>®</sup> Dialysis Tubing 10K MWCO, Thermo Fisher Scientific (USA). All chemicals were used as received. Water was purified by Hydrolab HLP5 instrument (0.09  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ).

### Methods

#### **Synthesis of iron oxide nanoparticles**

Spherical iron oxide nanoparticles were synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ . Briefly, 6 mmol of  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  and 12 mmol of oleic acid were dissolved in 40 ml of 1-octadecene. The reaction was performed with continuous stirring and nitrogen flow. Temperature of the solution was increased to 220 °C and maintained for 1 hour. Then, the temperature was increased further to 320 °C and maintained for 1 hour. After synthesis, 3:1 v/v mixture of 2-butanol and toluene was added and the solution was placed on neodymium magnet to precipitate. The precipitate was washed thrice with the same mixture. Obtained nanoparticles were suspended in chloroform. Nanoparticles concentration was estimated by weighing dried sample.

#### **Functionalization of iron oxide nanoparticles with COOH-PEG-PL (NP PEG)**

Functionalization was performed according to method published elsewhere,<sup>10</sup> with minor modifications. Briefly, 2.5 mg COOH-PEG-PL was added to chloroform solution containing 3 mg of as synthesized nanoparticles coated with oleic acid. The sample was shortly sonicated and left open for chloroform evaporation. Obtained waxy solid was heated for 1 min in 80 °C water bath. Then, 1 ml of water was added and the sample was vortexed to enhance micelles formation. Subsequently, the sample was washed thrice with chloroform to remove unbound COOH-PEG-PL. In order to remove chloroform residuals, the sample was diluted with water to total volume of 10 ml and centrifuged for 20 min at 12 000 x g, RT. Supernatant was discarded and the precipitate redispersed in 1 ml of water. Nanoparticles concentration was estimated by weighing dried sample.

#### **Functionalization of iron oxide nanoparticles with dihexadecyl phosphate (DHP) (NP DHP)**

The protocol describing in-depth preparation and characterization of DHP coated NP is in preparation and will be published at later date. Briefly, 6 mg of DHP was dissolved in 20 ml of hexane. Dissolution was heat-assisted at 75°C. Then, chloroform solution containing 6.3 mg of as synthesized nanoparticles coated with oleic acid was added and kept at 75°C for 10 min to allow for alkyl chains relaxation. The mixture was shortly sonicated and 80 ml of water was added. Subsequently, obtained two phase solution was briefly vortexed and sonicated until the water phase became turbid. In the next step, the solution was placed in sonicating bath for 3-4 h without temperature control. The reaction was continued until the mixture became homogenous and no signs of phase separation occurred for at least 1 min after mixing. After functionalization, the solution was left undisturbed overnight to allow for phase separation. Bottom phase was collected, filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  pores and centrifuged for 20 min at 10 000 x g, 4°C. Centrifugation was repeated until no precipitate was found. Collected precipitate was redispersed in water and filtered through 0.22  $\mu\text{m}$  pores. Final concentration was measured by weighing dried sample.

#### **BMV propagation, extraction and purification**

BMV virions were multiplied in *Hordeum vulgare* plants. Briefly, after inoculation and incubation period, frozen leaves were homogenized in liquid nitrogen and macerated in a virus extraction

buffer (0.5 M NaOAc, 0.3 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, pH 4.5). The mixture was subjected to chloroform extraction and the virus was precipitated from the aqueous phase with PEG 8000. Virions were purified by ion exchange chromatography and concentrated using Amicon Ultra Filter 100 kDa (Merck Millipore) to 2 ml volume. Obtained sample was additionally purified by size-exclusion chromatography (SEC) and once more concentrated by previously mentioned method.

### **VLPs assembly protocol (BMV PEG VLPs, BMV DHP VLPs)**

Virus like particles were prepared according to modified protocol for encapsulation of nanoparticles in BMV coat proteins.<sup>29</sup> BMV virions were dissociated in disassembly buffer: 1 M CaCl<sub>2</sub>, 0.005 M Trizma<sup>®</sup>Base, pH 7.4, purified *via* centrifugation (13 000 g, 20 min, 4°C) and dialysed against desalting buffer (0.01 M Trizma<sup>®</sup>Base, pH 7.4). Obtained BMV dimers were dialysed against storage in buffer with high ionic strength: 1 M KCl, 0.005 M MgCl<sub>2</sub>, 0.01 M Trizma<sup>®</sup>Base, pH 7.4. NP PEG and BMV coat proteins (present as dimers) were mixed at 1:3 ratio (NP:BMV) and dialysed against assembly buffer: 0.01 M KCl, 0.05 M NaCl, 0.005 M MgCl<sub>2</sub>, 0.05 M Trizma<sup>®</sup>Base, pH 7.4. After encapsulation VLPs were dialysed against low ionic strength storage buffer: 0.05 M NaOAc, 0.008 M Mg(OAc)<sub>2</sub>, pH 4.6. Encapsulation of NP.DHP was performed in the same ratio (1:3) and dialysed against modified assembly buffer (0.15 M NaCl, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 1% w/v Glycine, 10% v/v Glycerol, 0.03 M Citric acid, 0.05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4.5 and stored in the same buffer. All dialyses were performed with Snakeskin<sup>®</sup> Dialysis Tubing 10K MWCO.

### **Characterization methods**

Transmission electron microscopy (TEM) images were acquired with Hitachi TEM HT7700 microscope. Grids were made of copper coated with carbon film, mesh 300. Samples of functionalized nanoparticles were prepared by placing 15 µl drop on the grid and draining the excess solution with blotting paper. Samples of assembled VLPs were prepared similarly. VLPs samples were additionally negatively stained with 5 µl of 2% uranyl acetate. Particle size analysis was performed with ImageJ software. At least 50 particles were analyzed.

Hysteresis loops at 5K and 300 K and ZFC-FC plots were obtained with SQUID MPMS XL Quantum Design system. The zero field-cooled (ZFC) and field-cooled (FC) magnetization curves were obtained using a standard protocol. After demagnetization at 300 K the system was cooled to 5 K without a magnetic field. Then, an external magnetic field of 100 Oe was applied, and the ZFC curve was recorded during heating to 300 K. The FC curve was measured during cooling from 300 K down to 5 K in the same external magnetic field.

Zeta potential measurement was performed on Particulate Systems NanoPlus instrument in standard zeta cell with dome electrode. Measurements were repeated in triplicate.

DLS measurement was performed on Malvern Zetasizer µV instrument in quartz cuvette (QS Hellma, Type 105.231 – 1 cm path-length). Before measurement samples were briefly sonicated, diluted to optimal concentration and filtered with 0.2 µm syringe filter. Measurements were repeated in triplicate.

Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to confirm nanoparticles functionalization. Samples were dried, mixed with KBr and pressed into pellets before measurement. Spectra were obtained on TENSOR 27 (Bruker Optics) in the range of 4000 - 400 cm<sup>-1</sup> with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>, and accumulation of 256 scans.

BMV concentrations were determined via UV-Vis absorption (NanoDrop 2000 spectrophotometer) and Lambert-Beer's law. Proteins concentration were established with absorbance at 280 nm.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by UMO-2012/06/A/ST4/00373 grant from National Science Centre (Poland).

The authors declare no financial or commercial conflicts of interest.

- <sup>1</sup> C. Liu, S.-H. Chung, Q. Jin, A. Sutton, F. Yan, A. Hoffmann, B. K. Kay, S. D. Bader, L. Makowski, and L. Chen, "Magnetic viruses via nano-capsid templates," *J. Magn. Magn. Mater.* **302**, 47–51 (2006).
- <sup>2</sup> J. Yun, A. M. Sonabend, I. V. Ulasov, D.-H. Kim, E. A. Rozhkova, V. Novosad, S. Dashnaw, T. Brown, P. Canoll, J. N. Bruce *et al.*, "A novel adenoviral vector labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles for real-time tracking of viral delivery," *J. Clin. Neurosci.* **19**, 875–880 (2012).
- <sup>3</sup> D. Gao, X. Lin, Z. Zhang, W. Li, D. Men, X. Zhang, and Z. Cui, Intracellular Cargo Delivery by Virus Capsid State Key Laboratory of Virology, Wuhan Institute of Virology Chinese Academy of Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. (2015).
- <sup>4</sup> K. M. Frieze, D. S. Peabody, and B. Chackerian, "Engineering virus-like particles as vaccine platforms," *Curr. Opin. Virol.* **18**, 44–49 (2016).
- <sup>5</sup> J. L. Sagaseta, E. Malito, R. Rappuoli, and M. J. Bottomley, "Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines," *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **14**, 58–68 (2015).
- <sup>6</sup> A. G. Malyutin, R. Easterday, Y. Lozovyy, A. Spilotos, H. Cheng, O. R. Sanchez-Felix, B. D. Stein, D. G. Morgan, D. I. Svergun, B. Dragnea *et al.*, "Viruslike nanoparticles with maghemite cores allow for enhanced MRI contrast agents," *Chem. Mater.* **27**, 327–335 (2015).
- <sup>7</sup> C. C. Kao and K. Sivakumaran, "Brome mosaic virus, good for an RNA virologist's basic needs," *Mol. Plant Pathol.* **1**, 91–97 (2000).
- <sup>8</sup> A. L. N. Rao, "Molecular studies on bromovirus capsid protein," *Virology* **232**, 385–395 (1997).
- <sup>9</sup> J. Sun, C. DuFort, M.-C. Daniel, A. Murali, C. Chen, K. Gopinath, B. Stein, M. De, V. M. Rotello, A. Holzenburg *et al.*, "Core-controlled polymorphism in virus-like particles," *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 1354–1359 (2007).
- <sup>10</sup> X. Huang, L. M. Bronstein, J. Retrum, C. Dufort, I. Tsvetkova, S. Aniahyei, B. Stein, G. Stucky, B. McKenna, N. Remmes *et al.*, "Self-assembled virus-like particles with magnetic cores," *Nano Lett.* **7**, 2407–2416 (2007).
- <sup>11</sup> S. K. Dixit, N. L. Goicochea, M. C. Daniel, A. Murali, L. Bronstein, M. De, B. Stein, V. M. Rotello, C. C. Kao, and B. Dragnea, "Quantum dot encapsulation in viral capsids," *Nano Lett.* **6**, 1993–1999 (2006).
- <sup>12</sup> P. Ni, R. C. Vaughan, B. Tragesser, H. Hoover, and C. C. Kao, "The plant host can affect the encapsidation of brome mosaic virus (BMV) RNA: BMV virions are surprisingly heterogeneous," *J. Mol. Biol.* **426**, 1061–1076 (2014).
- <sup>13</sup> A. Petri-fink, M. Chastellain, L. Juillerat-jeanneret, A. Ferrari, and H. Hofmann, "Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells" **26**, 2685–2694 (2005).
- <sup>14</sup> W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W.-S. Kim, "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16**, 23501 (2015).
- <sup>15</sup> E. Amstad, M. Textor, and E. Reimhult, "Stabilization and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *Nanoscale* **3**, 2819 (2011).
- <sup>16</sup> S. Klein, A. Sommer, L. V. R. Distel, W. Neuhuber, and C. Kryschi, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **425**, 393–397 (2012).
- <sup>17</sup> A. Silva, É. Silva-Freitas, and J. Carvalho, "Magnetic particles in biotechnology: From drug targeting to tissue engineering," *Adv. Appl. Biotechnol.* 237–256 (2012).
- <sup>18</sup> R. Kusters, H.-K. Lin, R. Zandi, I. Tsvetkova, B. Dragnea, and P. van der Schoot, "Role of charge regulation and size polydispersity in nanoparticle encapsulation by viral coat proteins," *J. Phys. Chem. B* **119**, 1869–1880 (2015).
- <sup>19</sup> M. Giersig and M. Hilgendorff, "Magnetic nanoparticle superstructures," *Eur. J. Inorg. Chem.* 3571–3583 (2005).
- <sup>20</sup> S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, and G. Li, "Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles," *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 273–279 (2004).
- <sup>21</sup> M. C. Daniel, I. B. Tsvetkova, Z. T. Quinkert, A. Murali, M. De, V. M. Rotello, C. C. Kao, and B. Dragnea, "Role of surface charge density in nanoparticle-templated assembly of bromovirus protein cages," *ACS Nano* **4**, 3853–3860 (2010).
- <sup>22</sup> B. C. Janegitz, M. Baccarin, P. A. Raymundo-Pereira, F. A. Dos Santos, G. G. Oliveira, S. A. S. Machado, M. R. V. Lanza, O. Fatibello-Filho, and V. Zucolotto, "The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing," *Sensors and Actuators, B: Chemical* **220**, 805–813 (2015).
- <sup>23</sup> J. Sangeetha, S. Thomas, J. Arutchelvi, M. Doble, and J. Philip, "Functionalization of iron oxide nanoparticles with biosurfactants and biocompatibility studies," *J. Biomed. Nanotechnol.* **9**, 751–764 (2013).
- <sup>24</sup> I. Karimzadeh, M. Aghazadeh, M. R. Ganjali, T. Doroudi, and P. H. Kolivand, "Preparation and characterization of iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles coated with polyvinylpyrrolidone/polyethylenimine through a facile one-pot deposition route," *J. Magn. Magn. Mater.* **433**, 148–154 (2017).
- <sup>25</sup> A. G. Roca, M. P. Morales, K. O'Grady, and C. J. Serna, "Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors," *Nanotechnology* **17**, 2783–2788 (2006).
- <sup>26</sup> L. Zhang, R. He, and H. C. Gu, "Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles," *Appl. Surf. Sci.* **253**, 2611–2617 (2006).
- <sup>27</sup> F. G. Wu, J. J. Luo, and Z. W. Yu, "Infrared spectroscopy reveals the nonsynchronicity phenomenon in the glassy to fluid micellar transition of DSPE-PEG2000 aqueous dispersions," *Langmuir* **26**, 12777–12784 (2010).
- <sup>28</sup> C. Yue-Jian, T. Juan, X. Fei, Z. Jia-Bi, G. Ning, Z. Yi-Hua, D. Ye, and G. Liang, "Synthesis, self-assembly, and characterization of PEG-coated iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent," *Drug Dev. Ind. Pharm.* **36**, 1235–1244 (2010).
- <sup>29</sup> B. P. Orner, *Protein Cages* (2015), Vol. 1252.





Article

# Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System

Aleksander Strugała<sup>1</sup>, Jakub Jagielski<sup>2</sup>, Karol Kamel<sup>1</sup> , Grzegorz Nowaczyk<sup>2</sup> , Marcin Radom<sup>1,3</sup> ,  
Marek Figlerowicz<sup>1</sup> and Anna Urbanowicz<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, 61-704 Poznan, Poland; astrugała@ibch.poznan.pl (A.S.); kamel@ibch.poznan.pl (K.K.); Marcin.Radom@cs.put.poznan.pl (M.R.); Marek.Figlerowicz@ibch.poznan.pl (M.F.)

<sup>2</sup> NanoBioMedical Centre, Adam Mickiewicz University, 61-614 Poznan, Poland; jakub.jagielski@amu.edu.pl (J.J.); nowag@amu.edu.pl (G.N.)

<sup>3</sup> Institute of Computing Science, Poznan University of Technology, 60-965 Poznan, Poland

\* Correspondence: aniau@ibch.poznan.pl

**Abstract:** Virus-like particles (VLPs), due to their nanoscale dimensions, presence of interior cavities, self-organization abilities and responsiveness to environmental changes, are of interest in the field of nanotechnology. Nevertheless, comprehensive knowledge of VLP self-assembly principles is incomplete. VLP formation is governed by two types of interactions: protein–cargo and protein–protein. These interactions can be modulated by the physicochemical properties of the surroundings. Here, we used brome mosaic virus (BMV) capsid protein produced in an *E. coli* expression system to study the impact of ionic strength, pH and encapsulated cargo on the assembly of VLPs and their features. We showed that empty VLP assembly strongly depends on pH whereas ionic strength of the buffer plays secondary but significant role. Comparison of VLPs containing tRNA and polystyrene sulfonic acid (PSS) revealed that the structured tRNA profoundly increases VLPs stability. We also designed and produced mutated BMV capsid proteins that formed VLPs showing altered diameters and stability compared to VLPs composed of unmodified proteins. We also observed that VLPs containing unstructured polyelectrolyte (PSS) adopt compact but not necessarily more stable structures. Thus, our methodology of VLP production allows for obtaining different VLP variants and their adjustment to the incorporated cargo.

**Keywords:** virus-like particles; brome mosaic virus; capsid; self-assembly



**Citation:** Strugała, A.; Jagielski, J.; Kamel, K.; Nowaczyk, G.; Radom, M.; Figlerowicz, M.; Urbanowicz, A. Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 3098. <https://doi.org/10.3390/ijms22063098>

Academic Editor:  
Ayae Sugawara-Narutaki

Received: 26 February 2021  
Accepted: 16 March 2021  
Published: 18 March 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Viral capsids are natural nanostructures that evolved towards the efficient delivery of viral genetic material to host cells. Their nanoscale dimensions, presence of an interior cavity, self-organization abilities and responsiveness to environmental conditions are desired features in terms of nanotechnology. Additional attributes of viral capsids, including homogeneity, susceptibility to chemical modification and, in the case of plant viruses, lack of pathogenic activity to humans, give them potential as biologically active compound carriers in the biomedical field. The reports on potential applications of viral capsids in nanotechnology and biomedical fields has been thoroughly reviewed [1–4]. The key to the utilization of viral capsids is understanding and controlling their assembly and disassembly processes.

Brome mosaic virus (BMV) is one of the most extensively studied plant viruses. Its structure and biology are well known, and numerous reports describe the potential applications of BMV as a vehicle for nanoparticle delivery. BMV is a typical representative plant virus with a genome composed of single-stranded RNA and nonenveloped spherical virions. BMV belongs to the Bromovirus genus. The BMV capsid is composed of 180 capsid protein (CP) subunits with a weight of 20 kDa. The virion has an approximately 28 nm

diameter, depending on the surrounding conditions, and it shows  $T = 3$  icosahedral symmetry [5]. The cargo space inside the virion is limited by the internal cage with the  $T = 1$  triangulation number. CP consists of 189 amino acids and has a globular shape with a protruding N-terminal arginine-rich motif (ARM) directed into the interior of the capsid. The ARM, due to its positive charge, interacts with negatively charged RNA and therefore is crucial for capsid assembly.

Capsid assembly is currently being extensively analyzed, and some general rules of this process have already been determined. The formation of capsid depends on the temperature, pH, ionic strength, CP concentration and features of the encapsidated core molecules [6–8]. Due to the recent development of experimental and computational techniques in the field of physical virology, the static descriptions of viral particles have been replaced by dynamic models based on soft-mode dynamics and kinetic trapping [9]. Still, the knowledge of the capsid assembly is not sufficient to control it or rationally design VLPs with desired features. The disassembly and reassembly of BMV virions containing their native RNA or RNA derived from another virus is possible in the course of dialysis, starting from a high-salt to a low-salt buffer at neutral pH [10–12]. Under natural conditions, BMV capsids as well as those of similar viruses, such as cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), begin forming via the nucleation process, driven by electrostatic interactions between CP dimers and the viral genome. The assembly of complete virions is further continued mostly due to interactions among CPs [13]. The key to BMV virion assembly is the approximately 200-nucleotide-long 3' end of the genomic RNA, which forms a tRNA-like structure (TLS). The importance of TLSs was initially shown by Choi et al. in an experiment in which BMV capsid assembly attempted upon RNA with truncated TLSs failed, while the addition of yeast tRNA promoted virion formation [14]. Later, it was shown that not only RNA but also other materials, such as gold nanoparticles, quantum dots [15], and even cubic-shaped nanoparticles [16], may be encapsulated in the BMV capsid. The primary requirement for in vitro encapsidation of any type of cargo is the negative charge forming electrostatic interactions with the positively charged N-terminal portion of the BMV CP. Under in vitro conditions, these interactions are heavily dependent on the ionic strength of the buffer and as such can be modulated [6,13,17].

The capsid assembly process is driven not only by CP-cargo interactions but also by interactions among the CPs. The importance of such interactions can clearly be seen in the formation of CP dimers, which are the basic building blocks for capsid structures. CP dimers attach to each other, creating larger protein complexes and leading to full capsid formation [7]. The interactions among CPs are based on hydrophobic attractions and hydrophilic repulsions, in contrast to the interactions between CP and cargo [13]. Assembly of BMV-derived empty capsids is pH-dependent and, according to molecular dynamics and dynamic light scattering (DLS) analysis, is initiated by the formation of CP trimer nuclei at pH close to 5 [18].

Considering the utilization of plant viral capsids as biologically active compounds vehicles, attempts are made to obtain VLPs showing desired features. The easiest way to modify VLPs is to introduce mutations into the CP sequence. However, during viral replication in native host plants, most CP mutations result in the loss of viral infectivity or are reversed to the wild-type sequence [19]. This phenomenon is related to error-prone RNA replication, RNA recombination and subsequent selective pressure, which eliminates viral variants with lower fitness compared to the wild type [19–22]. To overcome this impediment, heterologous expression systems are applied that offer CP production without selective pressure working on protein mutants.

In this paper, we describe the in vitro assembly of VLPs with the application of recombinant BMV CP (rCP) produced in a bacterial expression system. We used the rCP to study the impact of environmental factors and encapsulated cargo on the assembly process and properties of the resulting VLPs. In our assay, we applied a spectrum of methods, including protein crosslinking, electrophoresis, microscale thermophoresis (MST), cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM), atomic force microscopy (AFM)

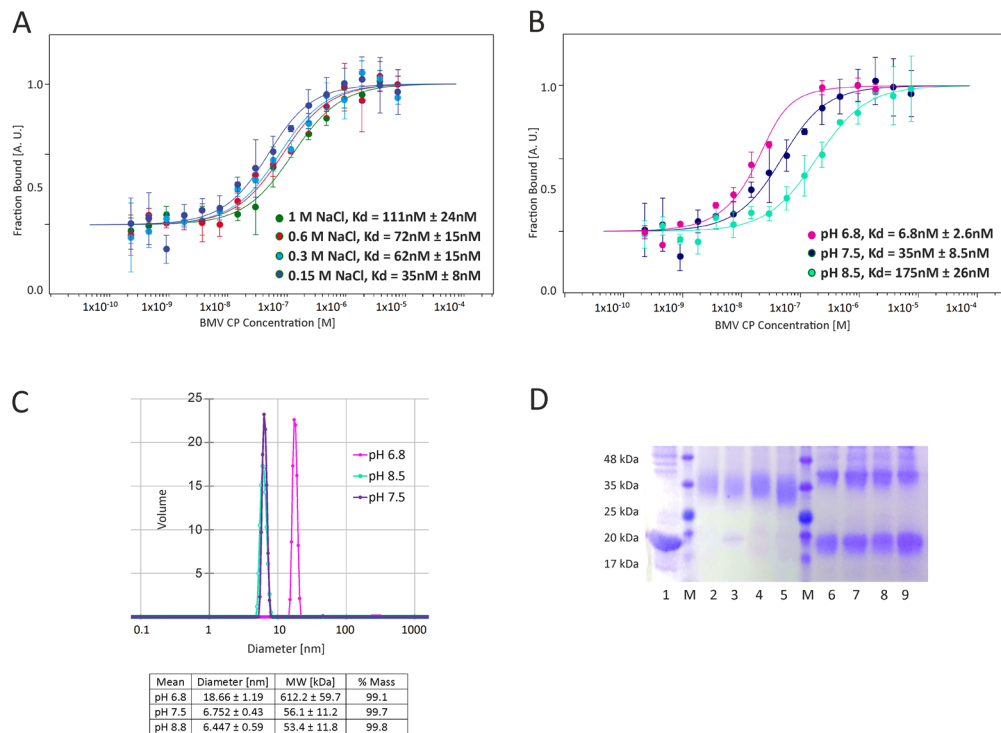
and dynamic light scattering (DLS). We also produced and studied a CP mutant designed to slightly weaken the CP-CP interaction. Our results show that pH is a crucial factor influencing CP-CP interactions, but we also noticed the significant influence of ionic strength. We also observed that the physicochemical parameters of VLPs, such as diameter, polydispersity and thermal stability, are strongly influenced by the cargo. Interestingly, CP carrying mutations formed VLPs showing a wide range of possible diameters compared to the wild-type VLPs.

## 2. Results

### 2.1. Searching for Optimal Conditions of Empty VLP Formation

Earlier, it was shown that a decreasing pH is crucial for CP-CP interactions during VLP formation; however, the influence of ionic strength has not been taken into account. To assess the influence of both factors on the strength of the interaction between rCP and empty VLP assembly, we performed microscale thermophoresis (MST) assays. In the MST assay, a fluorescently labeled molecule (in our case rCP labelled with fluorescent marker) of constant concentration is titrated with a dilution series of the ligand (unlabeled rCP). The affinity between the proteins is assessed taking into account differences in a movement of the fluorescently labelled protein in a temperature gradient (thermophoresis) which is altered by any changes of the charge, size or hydration shell resulting from the ligand binding [23]. Two series of MST assays were performed: in Tris buffer at constant pH 7.5 with increasing salt concentration (150, 300, 600 and 1000 mM NaCl) and in Tris buffer at constant NaCl concentration of 150 mM and increasing pH (6.8, 7.5 and 8.5) (Figure 1A,B, respectively). The MST signals recorded for each measurement were plotted against rCP concentration to obtain dose-response curves, from which the  $K_d$  was evaluated. The rCP bound each other with a  $K_d$  in the nanomolar range at all tested conditions, which indicates a tight interaction. All the MST data collected clearly confirmed that both the pH and ionic strength significantly influence the interaction between rCPs. The  $K_d$  at pH 8.5 was 175 nM, that at pH 7.5 was 35 nM and that at pH 6.8 was 6.8 nM. At decreasing ionic strength,  $K_d$  reached 111 nM, 72 nM, 62 nM and 35 nM at 1000, 600, 300 and 150 mM NaCl, respectively. The influence of pH on the interaction between rCPs seems to be more significant than that of ionic strength, as illustrated by a two orders of magnitude higher range of  $K_d$  changes at pH gradient.

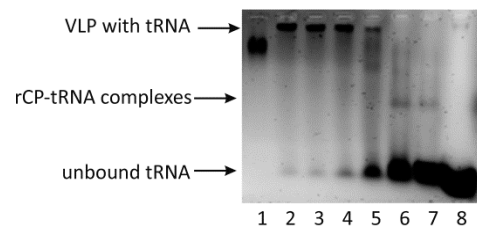
To confirm the MST results, additional experiments were performed. The DLS analyses at the three mentioned pH points revealed that at pH 8.5 and 7.5, rCPs existed mostly in dimeric form (~6 nm hydrodynamic diameter) (Figure 1C). In addition, small fractions of particles with diameters corresponding to VLPs (~39–49 nm) and rCP aggregates (hydrodynamic diameter > 100 nm) were detected. At pH 6.8, particles of ~18 nm hydrodynamic diameter and a small population of particles with 286 nm diameter were observed. Interestingly, at pH 6.8, we did not detect rCP dimers. This result was verified by rCP cross-linking at pH 6.8 and 7.5 (Figure 1D). After the cross-linking reaction, the rCP complexes were analyzed by SDS PAGE. This confirmed that at pH 7.5, the main product was the rCP dimer, while at pH 6.8, rCP formed complexes/aggregates of relatively higher molecular weight than dimer. The results from DLS measurements and cross-linking reactions indicated that at pH 6.8, rCPs formed other kinds of rCP oligomers. To determine whether VLPs would be formed at pH 6.8, rCP was incubated in pH 6.8 buffer at 4 °C for 24 h. Subsequent DLS measurements revealed that VLPs did not form. Exclusively rCP oligomers 18 nm in diameter were present in the solution. In summary, the above observations indicated that a gradual decrease in both pH and ionic strength in the course of dialysis should enhance VLP formation. Thus, to obtain each type of VLP described in this study, we applied two-step dialysis.



**Figure 1.** CP-CP affinity analysis in various buffer conditions. **(A)** MST results for the interaction in NaCl gradient. **(B)** MST results for the interaction in pH gradient. The binding curves and the corresponding  $K_d$  values resulted from the analysis of raw MST data. The curves and  $K_d$  values estimated from the same measurement are marked with the same colors. **(C)** DLS analysis of rCP hydrodynamic diameter at concentration of 0.1 mg/mL in a pH gradient (volume distribution). The colors of DLS curves correspond to the results from **(B)**. **(D)** The cross-linked CP visualized via SDS-PAGE. Lanes: 1—CP without cross-linking, M—molecular weight marker, 2–5—CP crosslinked at pH 7.5 after 5, 10, 15 and 30 min, respectively, 6–9—CP crosslinked at pH 6.8 after 5, 10, 15 and 30 min, respectively.

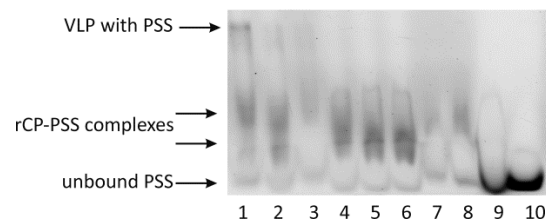
## 2.2. Cored VLP Assembly

Under native conditions, the formation of the BMV capsid is initiated by interactions between CP and viral genomic RNA. This process is facilitated by the electrostatic interactions between the positively charged N-termini of CP and the negatively charged TLS located at the 3' end of BMV genomic RNA [5,14,22]. Therefore, in the first experiments on VLP assembly, two-step dialyses were carried out in buffer containing yeast tRNA as a potential VLP assembly initiator. In the first step, the ionic strength and in the second step, the pH gradually decreased. A series of two-step dialyses were performed in which the tRNA:rCP molecular ratio was changed from 1:1 to 1:6. Prior to two-step dialyses, rCP was stored in buffer with high ionic strength and pH 7.2. After the second dialysis, rCP samples were subjected to native agarose gel electrophoresis. The obtained results indicated that tRNA stimulated the formation of VLPs (Figure 2). For the samples with tRNA:rCP ratios of 1:1 and 1:2, the band corresponding to native BMV was not observed. However, for both samples, in addition to the thick band at the bottom, which contained unbound tRNA, we observed additional thin bands in the middle of the lane, which might correspond to RNA-rCP complexes. For the sample with a tRNA:rCP ratio of 1:3, there was a thin band corresponding to the fully assembled VLPs and still many unbound tRNAs at the bottom of the lane. For samples with tRNA:rCP ratios of 1:4 to 1:6, only the bands migrating to a similar position as that of BMV were visible. Considering the above results in our further experiments on VLP assembly, a 1:6 tRNA:rCP mass ratio was applied. The fact that putative VLPs formed by rCP and tRNA moved slower in the agarose gel than native BMV might be explained by the differences in total charge and conformation between the two particles.



**Figure 2.** BMV-based VLPs formation according to various CP/tRNA mass ratios in native agarose gel electrophoresis. Lanes: 1—wt BMV, 2–7—various CP/tRNA mass ratios (from 6:1 to 1:1), 8—tRNA without CP. The arrows indicate formed VLP with tRNA inside, intermediate CP-tRNA complexes and the unbound tRNA.

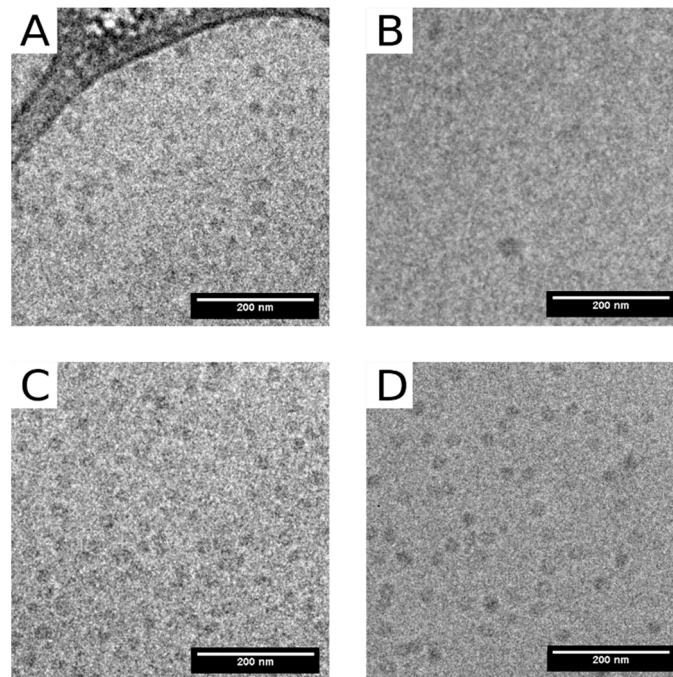
To determine whether polyelectrolytes other than RNA can be applied to assemble VLPs, we used 75-kDa polystyrene sulfonic acid (PSS), a synthetic polymer with a negative charge. PSS is capable of interacting with rCP and thus to some extent can mimic RNA, although PSS lacks complex secondary and tertiary structures. VLP assembly was analyzed in a series of two-step dialyses in which PSS:rCP mass ratios were changed from 1:1 to 1:8 (Figure 3) [24]. Agarose gel electrophoresis revealed that VLPs were formed exclusively in the reactions with the highest excess of CP, i.e., in the reaction with PSS-rCP mass ratios of 1:8. For subsequent experiments with PSS, a mass ratio of 1:8 (PSS:rCP) was used.



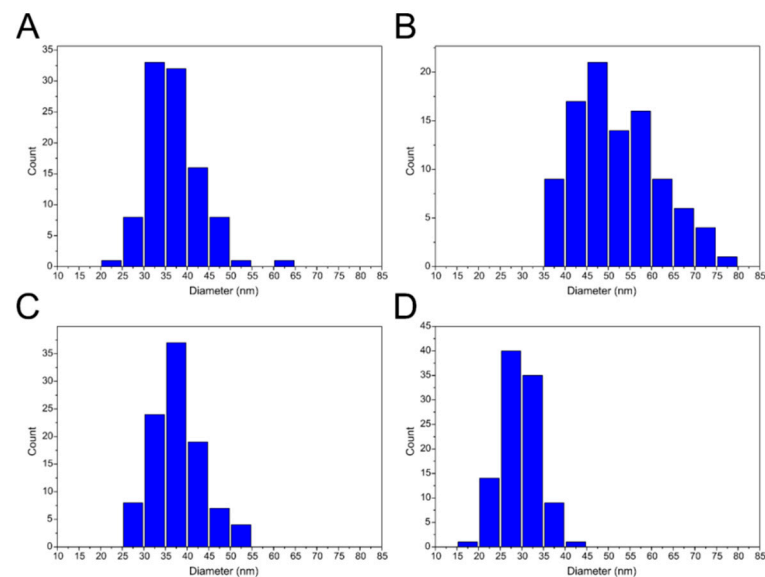
**Figure 3.** BMV-based VLPs formation according to various CP/PSS mass ratios in native agarose gel electrophoresis. Lanes: 1 to 8—various PSS/CP mass ratios (from 1:8 to 1:1). Lane 9—PSS without protein. Lane 10—tRNA without protein. The arrows indicate formed VLP with PSS inside, intermediate CP-PSS complexes and the unbound PSS.

### 2.3. Properties of Empty and Cored VLPs

Three types of VLPs, empty VLPs (eVLPs), those with yeast tRNA (tVLPs) and those with polystyrene sulfonic acid (PVLVPs), were characterized using a wide range of physico-chemical methods. Cryo-TEM images revealed spherical structures of eVLPs and tVLPs (Figure 4A,C). The size of the former ranged from 20 to 65 nm with dominant fractions of 30–40 nm, and that of the latter ranged from 25 to 55 nm with dominant fractions of 30–40 nm (Figure 5A,C). In addition, cryo-TEM images confirmed that CP-CP interactions alone are strong enough to form spherical VLPs. Unfortunately, for PVLVPs, we were unable to obtain cryo-TEM images.

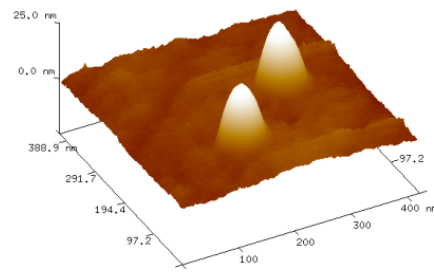


**Figure 4.** Cryo-TEM images of BMV-based VLPs. (A) Empty VLPs obtained from wt CP (eVLPs). (B) Empty VLPs obtained from mutated CP (eMVLPs). (C) VLPs obtained from wt CP with tRNA (tVLPs). (D) VLPs obtained from mutated CP with tRNA (tMVLPs).



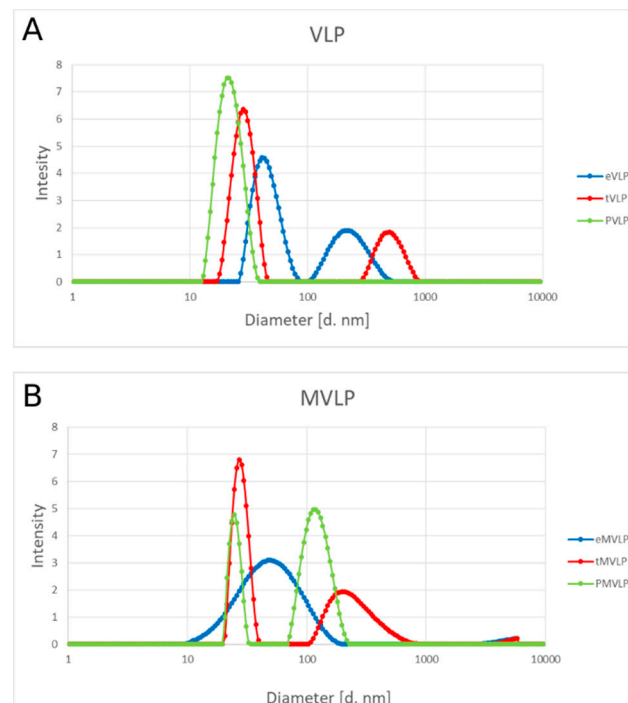
**Figure 5.** Size distribution of VLP populations from cryo-TEM images. (A) Empty VLPs obtained from wt CP (eVLPs). (B) Empty VLPs obtained from mutated CP (eMVLPs). (C) VLPs obtained from wt CP with tRNA (tVLPs). (D) VLPs obtained from mutated CP with tRNA (tMVLPs).

The empty VLP analyses also involved atomic force microscopy (AFM). Experiments performed in air revealed that empty VLPs stably retained their spherical structure and dimensions in a dry environment (Figure 6). The average diameter of VLPs was 32 nm and ranged from 16 to 63 nm.



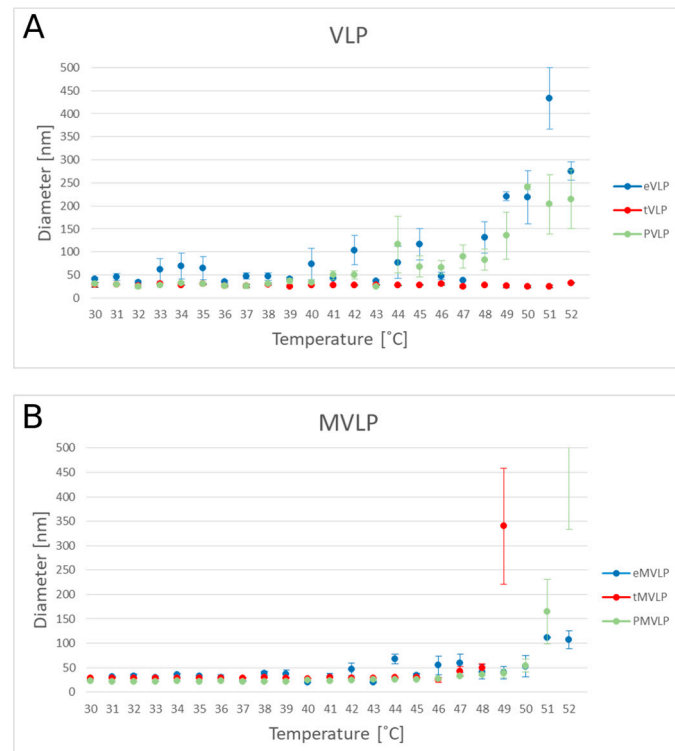
**Figure 6.** Exemplary picture of empty VLPs recorded using AFM tapping mode.

Consistent with the cryo-TEM results, DLS measurements also showed variations in hydrodynamic diameters both within and among the studied VLP populations (Figure 7). The eVLP population had the largest and most variable diameter, approximately  $40 \pm 10$  nm. The diameter of tVLPs was approximately  $28 \text{ nm} \pm 5$  nm, and that of PVLPs was approximately  $21 \text{ nm} \pm 5$  nm.



**Figure 7.** Size distribution of BMV-based VLPs in sodium acetate buffer (pH 4.8) and  $25^\circ\text{C}$  by dynamic light scattering (DLS). Wild-type VLPs (A) and mutated VLPs (B). Empty VLPs are in blue, VLPs with tRNA are in red, and VLPs with PSS are in green.

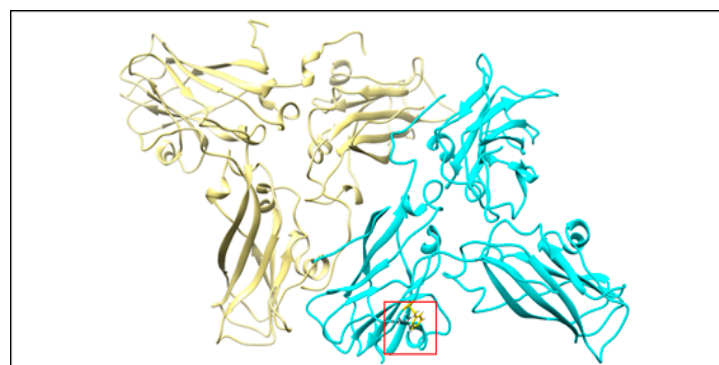
To determine the thermal stability of VLPs, we used DLS to measure how their size changed with increasing temperature from  $30$  to  $52^\circ\text{C}$  (Figure 8). At  $30$ – $47^\circ\text{C}$ , the major fraction of eVLPs had diameters ranging from  $25$ – $66$  nm, which was consistent with our earlier observations. However, in this temperature range, a small population of eVLPs with diameters  $> 100$  nm were also observed. At  $48^\circ\text{C}$  and higher temperatures, the population of particles with diameters  $> 100$  nm became dominant. tVLP were the most stable. Throughout the whole temperature range ( $30$ – $52^\circ\text{C}$ ), the tVLP hydrodynamic diameter was  $18$ – $34$  nm. PVLP sizes ranged from  $16$ – $38$  nm until  $40^\circ\text{C}$ . Above  $40^\circ\text{C}$ , some larger particles were formed ( $<70$  nm), and above  $44^\circ\text{C}$ , aggregates  $> 100$  nm appeared.



**Figure 8.** BMV-based VLPs size as a function of temperature. The diameter of VLPs was measured by DLS through a gradient of increasing temperature (30–52 °C). Wild type VLPs (A) and mutated VLPs (B). Empty VLPs (eVLPs (A) and eMVLPs (B)) are in blue, VLPs with tRNA (tVLPs (A) and tMVLPs (B)) are in red, and VLPs with PSS (PVLPs (A) and PMVLPs (B)) are in green.

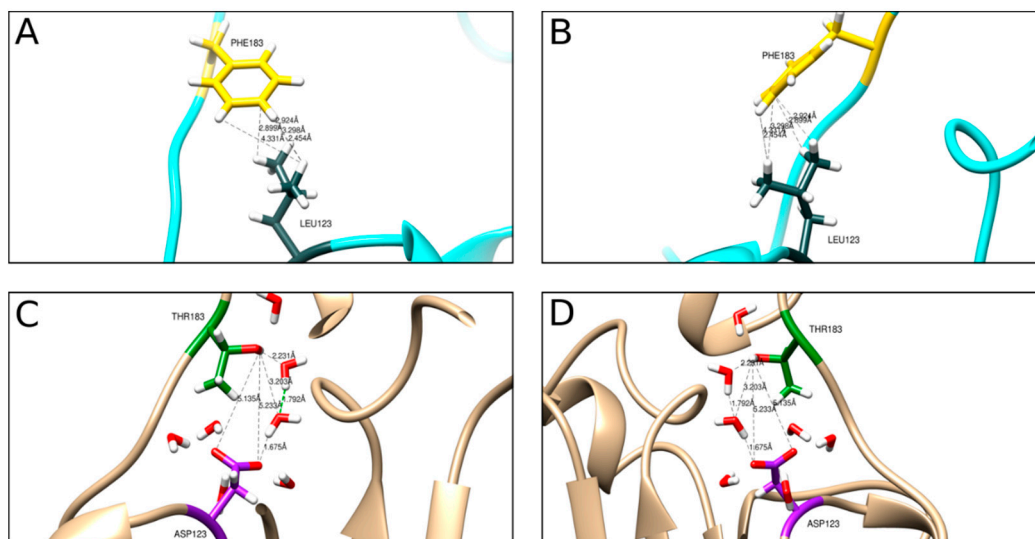
#### 2.4. Rational Designing of BMV-Based VLPs

The production of rCP in the heterologous system creates the possibility of obtaining VLPs with altered properties. To this end, we used molecular dynamics methods to design rCP mutant with a modified CP-CP interaction pattern (Figures 9 and 10). Based on in silico-generated data, we expected that the exchange of two hydrophobic amino acids into hydrophilic groups (L123D and F183T) would weaken CP-CP binding. The rCP mutant was produced, and VLPs (MVLPs) were assembled in the same way as described above for unmutated ones.



**Figure 9.** Computational model of two wild-type BMV capsid protein trimers. One trimer in yellow, second in cyan. The red square shows the place of interaction between two amino acid residues on two neighboring chains—the target for our mutation.





**Figure 10.** Computational model of a fragment of the BMV capsid protein. (A,B) depict wild-type virus hydrophobic interactions of two interacting amino acid residues on two neighboring chains. Leu123 in slate gray, Phe183 in yellow, rest of the protein in cyan. Black dashed lines show distances (in Å) between residues involved in hydrophobic contacts. (C,D) depict the hydrogen bond interaction pattern between mutated residues. Asp123 is shown in magenta, Thr183 in green, and the rest of the protein in beige. The electrostatic interactions between residues are mediated by water molecules. Black dashed lines show electrostatic interactions between residues and residue/water molecules.

The formation of empty VLPs and with tRNA, from mutated rCPs (eMVLPs and tMVLPs, respectively) was confirmed with cryo-TEM (Figure 4B,D). However, similarly as for wild-type rCP, we failed to record cryo-TEM images of PMVLPs. The cryo-TEM images showed only a few eMVLPs (Figure 4B). On the other hand, the number of tMVLPs was significantly higher (Figure 4D). The eMVLPs were spheres of highly variable size from 35 to 80 nm (Figure 5B). The tMVLP spheres were smaller and more homogenous. Their size oscillated between 15 and 35 nm (Figure 5D). Interestingly, cryo-TEM analysis showed that tMVLPs were smaller than tVLPs (25–55 nm), which was confirmed by DLS analysis.

DLS measurements of mutated VLPs confirmed a wide size range of eMVLPs (Figure 7B). Mutated VLPs carrying negatively charged cores, and the wild-type VLPs, had larger diameters if formed with tRNA (tMVLPs:  $27 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ ) than with PSS (PMVLPs:  $24 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ ).

MVLPs also showed different stabilities than unmutated VLPs. The size of the eMVLPs varied within the whole range of temperatures applied in our experiment (from 19 to 85 nm). In the eMVLP sample, the amount of large aggregates (>100 nm) was significantly increased at 51 °C. We also observed that tMVLPs were not as stable as their tVLP analogs. At 46 °C, the size of tMVLPs was approximately 27–31 nm, but at higher temperatures, larger aggregates appeared. At 49 °C, a majority of tMVLPs were >300 nm. PMVLPs were smaller than other MVLPs until the temperature reached 41 °C. From 42 °C, the average size of the PMVLPs increased. At 51 °C and above, the majority of PMVLPs were >100 nm.

### 3. Discussion

There are two main types of interactions important for BMV capsid formation: CP-CP and RNA-CP. The lack of empty capsids in BMV-infected plants indicates that *in vivo*, RNA-CP interactions are pivotal for the formation of viral particles [25]. However, CP-CP interactions are sufficient to form BMV-based VLPs *in vitro* [26]. Our analysis showed that strong CP-CP binding depends on pH. We noticed that at the lowest tested pH of 6.8, rCPs tended to form an oligomeric structure, most likely rCP trimers proposed to initiate the nucleation process leading to capsid formation [18] (Figure 1). This result is consistent with the observation of Chevreuil and coworkers that a decrease in pH leads to stronger interactions between CPs of CCMV and more compact VLP formation [24]. Additionally, van Eldijk and coworkers showed that changing the pH can control empty CCMV capsid

formation [26]. Here, we showed that the ionic strength may also significantly influence CP-CP interactions, suggesting that ionic interactions might be involved in empty VLP assembly apart from hydrophobic interactions. We also observed that a rapid decrease in pH induces the transformation of CP dimers into larger CP oligomers and blocks VLP formation. Thus, we proposed that two-step dialysis gradually decreasing the ionic strength and pH is a good method to assemble both empty and cored VLPs. This protocol proves to be particularly efficient for the production of tRNA-cored VLPs. Other types of VLPs, including empty capsids, were formed less effectively (Figure 4). Moreover, experiments involving empty capsids showed that VLPs preserve their structure even after drying (Figure 6).

Considering that virion assembly is based upon CP-RNA binding under native conditions, Rao distinguished two types of CP-RNA interactions that impact this process [25]. The first type depends on a specific RNA structure and involves the TLS located at the 3' end of BMV genomic RNAs [14]. It was shown that the encapsidation of BMV RNA lacking TLSs is not effective but can be restored after complementation with yeast tRNA or separate TLSs [8]. We show that yeast tRNA alone is sufficient to mediate the formation of stable and homogenous VLPs. The mass ratio of yeast tRNA to rCP was similar to those shown by Cadena-Nava et al., which indicates that the length of the RNA molecule is less important [27]. Our results also confirm that the structural features of the cargo, apart from its negative charge, are important factors influencing VLP formation and features. Accordingly, VLPs containing tRNA better resembled native BMV capsids in terms of their size than VLPs containing PSS [28,29].

The second type of CP-RNA interaction, crucial for capsid formation, is sequence-independent electrostatic attraction between negatively charged RNA and the positively charged CP N-terminus. The importance of those interactions was demonstrated by Cadena-Nava and coworkers, who showed that CCMV CPs were able to encapsidate longer RNA than viral genomes [27]. The importance of a negative charge was also shown by Cheveruil and coworkers by encapsidating PSS in a VLP composed of CCMV CPs [24]. Here, we confirmed the above observations by showing that PSS mediated the formation of BMV rCP-based VLPs. In addition, our data suggest that due to the electrostatic interaction between rCP and cargo, VLPs are more compact. Thus, tVLPs and PVLP were smaller than eVLPs. As expected, the dimensions of VLPs also depended on the cargo size; accordingly, PVLPs were smaller than tVLPs and BMV capsids. Although PSS particles are longer than tRNA and do not form complex spatial structures, due to the hydrophobic core, they adopt compact structures in water environments. Chevreuil and coworkers obtained similar results studying VLPs based on CCMV CP [24]. The authors also explain this effect by the hydrophobic properties of PSS, which is poorly soluble in water and exists in a collapsed form [24]. Moreover, they noted that linear, flexible PSS chains require less free energy to be encapsulated than particles with stiff conformations, such as RNA [24,30].

In contrast to tVLPs and PVLPs, empty VLPs that rely only on weak CP-CP interactions are more flexible and less stable than those relying on strong CP-RNA or CP-PSS interactions. Accordingly, eVLPs, both wild-type and mutated, have a broader range of diameters than the corresponding loaded VLPs (Figures 5 and 7). However, our designed eMVLP exhibits considerably higher assembly potential. The introduced mutations change the hydrophobic interaction between amino acid residues of two CPs into hydrophilic ones, which results in VLPs showing a wider range of diameters (Figure 10). Higher amounts of formed eVLPs in comparison to eMVLPs also indicate that hydrophobic interactions between two CPs (L123 and F183) are significant for BMV capsid assembly. The addition of cargo strongly influences MVLP formation (Figure 8B). Mutated VLPs containing tRNA were similar in size to wild-type tVLPs. This suggests that CP interactions with the tRNA structure strongly compensate for the weaker CP-CP interactions among the mutated CPs and are crucial for the formation of VLPs resembling native capsids. This observation once again confirms that the spatial conformation of tRNA strongly enhances VLP assembly, which was also presented by Rao et al. [25]. On the other hand, MVLPc-containing PSSs

are smaller than wild-type PSSs and are more homogenous. PSS, as mentioned above, can form a collapsed structure that, together with weaker CP-CP interactions and higher flexibility of the mutated VLP shell, might result in better adjustment of rCPs to its cargo and bring it closer to the VLP's core.

The results showing the thermal stability of the produced VLP are consistent with the above observations. We found that TLS and the negative charge of the cargo stabilize VLPs. PSS and tRNA stabilized wild-type capsid VLPs up to 40 °C. However, above this temperature, PVLPs were unstable, unlike tVLPs. As concluded earlier, TLSs and electrostatic interactions with rCPs significantly stabilize VLPs better than negative charge alone (Figure 8A). Our results indicate that tRNA presence is not mandatory for VLP formation but is crucial for particle stabilization. Mutated VLPs had slightly different thermal stability than wild-type VLPs. eMVLPs showed a wider range of sizes at room temperature than vVLPs. Interestingly, the aggregation of eMVLPs started to appear at 51 °C, while wild-type VLPs began to aggregate at 45 °C. This could be the effect of the stronger hydrophilic interactions resulting from the substitutions of two nonpolar amino acids with polar amino acids in the mutated CP. However, explaining this observation demands further study. For tMVLPs, 49 °C seems to be the temperature at which large aggregates start to prevail. Thus, tMVLPs seem to be less stable than tVLPs, which also indicates the significance of lateral CP-CP interactions on capsid stability. Interestingly, better adjustment of the cargo and CP in MVLPs was also confirmed by their higher thermal stability (aggregation proceeds at 42–51 °C) than that of VLPs (aggregation proceeds at 40–44 °C).

In summary, we have shown that recombinant BMV CP produced in a bacterial expression system is capable of self-assembly mediated by both CP-CP and CP-cargo interactions. By encapsidating tRNA and PSS, we highlighted the influence of cargo features on the structure and stability of BMV-based VLPs. We noted the profound influence of TLSs on the features of VLPs, while the negative charge of the cargo and CP-CP interactions seems to play a secondary but also important role. Moreover, we demonstrated that using genetic engineering, one can obtain VLPs with altered properties in comparison to VLPs formed by wild-type CP. Thus, the usage of a bacterial expression system for BMV CP production provides potential for the rational design of VLPs and research on their properties.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Protein Production and Purification

DNA coding for brome mosaic virus CP was cloned into the pMCSG48 expression plasmid and expressed in Rosetta<sup>TM</sup> 2(DE3)pLysS competent *E. coli* cells (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. Briefly, bacterial cells were transformed with plasmids encoding wt or mutated BMV CP by a heat shock method. Then, each transformant was used to inoculate 250 mL of LB medium containing 100 mg/L ampicillin and 34 mg/L chloramphenicol. Bacteria were grown at 37 °C with shaking. When the OD<sub>600</sub> of the culture reached 0.5–0.8, IPTG was added to a final concentration of 0.5 mM. After induction, bacteria were cultured for 16 h at 20 °C. The cells were harvested and frozen on dry ice for storage at –20 °C. Approximately 5 g of cells was suspended in 40 mL of lysis buffer I [25 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl, 0.2 mg/mL lysozyme (BioShop, Ontario, Canada), 250 U benzonase nuclease (Novagen,)] and sonicated. Cell debris was removed by centrifugation, and the supernatant was mixed with the same amount of buffer II [25 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole (BioShop)]. To purify BMV CP, affinity chromatography was used. After protein binding with Ni-NTA resin, the column was washed with buffer II. Next, the protein was eluted from the column using an imidazole gradient: 200, 300 and 500 mM in buffer II. The eluted protein was dialyzed using buffer III (25 mM Tris pH 8, 0.5 M NaCl). To remove the N-terminal tag, 1 mg of TEV protease was added per 10 mg of eluted protein. After TEV digestion, the sample was once again applied to a Ni-NTA charged column to remove the tag and any undigested protein. The first flowthrough was collected, and the purified proteins were

concentrated by ultrafiltration (Amicon Ultra-10,000 MWCO, Millipore, Burlington, MA, USA). The concentration of the protein was determined by measuring the absorbance at 280 nm (NanoPhotometer N60, Implen, Westlake Village, CA, USA). The purity of the protein samples was assessed by SDS-PAGE, and the monodisperse state of the protein solutions was confirmed by dynamic light scattering (DLS) measurements using a Zetasizer  $\mu$ V (Malvern Panalytical, Malvern, GB) with the application of 6  $\mu$ L of sample in a quartz cuvette with a 1 cm path length (Hellma QS 105.231). The correct molecular masses of all recombinant proteins were confirmed with Ultraflex extreme MALDI ToF/ToF MS (Bruker Daltonics, Billerica, MA USA).

Two mutations, L123D and F183T, were introduced into the DNA sequence coding for BMV CP through PCR with specific primers. The mutated BMV CP sequence was then cloned into the pMCSG48 expression plasmid and amplified in DH5 $\alpha$  competent *E. coli* cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The plasmids were isolated and verified for L123D and F183T presence via DNA sequencing. Mutated protein expression, isolation and purification were performed as described above for the wild-type BMV CP. Isolated and purified BMV rCP was dialyzed against protein storage buffer (PSB) [1 M NaCl (BioShop), 1 mM EDTA (Merck), 20 mM Tris (BioShop), pH 7.2].

#### 4.2. VLP Assembly

rCP (stored in the PSB) solution was subjected to a two-step dialysis process with the application of SnakeSkin Dialysis Tubing with a 3500 MWCO (Thermo Fisher Scientific). First, dialysis was performed against VLP assemble buffer (1) [50 mM NaCl (BioShop), 10 mM KCl (BioShop), 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck), 50 mM Tris (BioShop), pH 7.2] for 16 h at 4 °C. Next, dialysis was performed against VLP assemble buffer (2) [25 mM NaCl (BioShop), 10 mM KCl (BioShop), 25 mM NaOAc (Merck), 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Merck), 50 mM Tris (BioShop), pH 7.8] for 16 h at 4 °C. Afterwards, the samples were centrifuged (10 min, 10,000 rcf, 4 °C), and the supernatant was collected for further examination.

Assembly reactions of the VLP with tRNA or PSS were performed in a mass ratio gradient from 1:1 to 1:6 for tRNA:rCP and 1:1 to 1:8 for PSS:rCP. Assembly reactions proceeded as a two-step dialysis, as described above. Afterwards, the samples were centrifuged (10 min, 10,000 rcf, 4 °C), and the supernatant was transferred for further examination. Agarose gel electrophoresis was conducted to visualize the results of the VLP-core assembly gradient. A 1% agarose gel was used and stained with Midori Green (ABO). 10  $\mu$ L of tVLP sample with 2  $\mu$ L of loading dye (EURX, Gdańsk, Poland) and 25  $\mu$ L of PVLP sample with 5  $\mu$ L of loading dye was loaded on the gel. Samples were electrophoresed for 1.5 h at 80 V in 0.5 $\times$  TBE buffer (BioShop). Gel was depicted on the ChemicDoc XRS+ System (BioRad, Hercules, CA, USA).

#### 4.3. Cryo-TEM Measurements

Specimens for cryo-TEM imaging were prepared using CryoPunge 3 System (Gatan, Pleasanton, CA, USA). At room temperature and 95% relative humidity in the chamber, 4  $\mu$ L droplet of each sample was put on a lacey carbon coated copper grid (Lacey C only, Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) which were previously hydrophilized for 1 min using ELMO glow discharge system (Cordouan Technologies, Bordeaux, France). Subsequently to blotting the excess liquid, specimens were instantaneously plunged into a liquid ethan and shock frozen to ca.  $-183.15$  °C. Vitrified samples were then transferred to Gatan 626 cryo-holder (Gatan, Pleasanton, CA, USA) that maintained temperature below  $-178.15$  °C during the imaging. Imaging was carried out using Jeol JEM1440 transmission electron microscopy (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) at accelerating voltage of 120 kV.

#### 4.4. AFM Measurements

The VLP solution was diluted to a low concentration of 5  $\mu$ g/mL, applied to a mica sample disc and left to dry. The dried sample was loaded onto a Multimode 8 instrument (Bruker, Billerica, MA, USA), and AFM tapping mode with an SNL-10 probe (Bruker) was

used to record the shape of the prepared eVLPs. The results of the measurement were analyzed with NanoScope Analysis 1.5 software.

#### 4.5. DLS Measurements

DLS measurements were recorded using a Zetasizer uV instrument (Malvern Instruments). The measurements were performed at a wavelength  $\lambda = 488$  nm and at a  $90^\circ$  incidence angle of the light beam; a 2  $\mu$ L quartz cuvette was used. The concentration of rCP was 0.1 mg/mL. Twelve measurements were performed for each VLP at  $25^\circ\text{C}$  for standard DLS measurements and at temperatures ranging from  $30$ – $52^\circ\text{C}$  to analyze the thermal stability of the VLPs.

#### 4.6. MST Experiments

Purified rCP was transferred to MST assay buffer for ionic strength studies (50 mM Tris, pH 7.5: 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 150, 300, 600, or 1000 mM NaCl) or pH studies (50 mM Tris, pH 8.5, 7.5 or 6.8: 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and 150 mM NaCl) using Zeba<sup>TM</sup> Spin desalting columns (ThermoFisher Scientific). CP was fluorescently labeled following the manufacturer's instructions (Nanotemper Technology, Munich, Germany), i.e., using Monolith NT<sup>TM</sup> Protein Labeling Kit RED-NHS 647. The concentration of labeled proteins was adjusted to 50 nM. A dilution series (starting from 15  $\mu$ M) of up to 16 unlabeled protein concentrations was prepared in a final volume of 10  $\mu$ L. Ten microliters of labeled protein was added to each dilution and mixed with a pipette. All samples were centrifuged for 5 min at 10,000  $g$  prior to MST measurement. Capillaries were filled and loaded into a Monolith NT.115 instrument, and the thermophoresis experiment was performed. The results were analyzed with MO.Affinity Analysis software (Nanotemper).

#### 4.7. Protein Cross-Linking

CP crosslinking was performed using 5 mM disuccinimidyl suberate (DSS, Thermo Scientific) in DMSO according to the manufacturer's instructions using rCP in MST buffer described above at pH 7.5 and 6.8. The reaction was stopped after 5, 10, 15 and 30 min by adding 1 M TRIS-HCl, pH 7.5. The crosslinking results were visualized by SDS-PAGE.

#### 4.8. CP Mutant Design

The hexamer model of the BMV coat protein and of the mutant variant were constructed using the UCSF Chimera program [31] on the basis of the 1JS9 structure from the PDB repository. Proper protonation and parameterization of protein models was performed using the pdb2gmx module of the GROMACS 4.6.7 package [32], employing the Amber99SB-ILDN [33] force field. CP hexamers were immersed in a truncated dodecahedral simulation box containing TIP3P model water molecules. Solvated systems were subsequently neutralized, and an excess of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  ions was added to obtain a final concentration of 0.1 M NaCl.

The geometry of the systems was optimized using the energy minimization technique with the steepest descent algorithm. Next, optimized systems were relaxed during 200 ps NVT ensemble simulation runs and subsequently 200 ps NPT runs. Such relaxed systems were used as starting structures for final, 50 ns production NPT runs. During all runs, the time step was 2 fs. During equilibration runs, the output frequency was set to 100 time steps (200 fs), whereas in production simulations, it was set to 1000 time steps (2 ps). Long-range electrostatic interactions were calculated using the particle mesh Ewald method, with a cutoff value of 1 nm. Velocity rescaling was used to scale the temperature and Parinello-Rahman barostat to maintain constant pressure in the simulated systems.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.U., A.S. and M.F.; methodology, A.U., G.N. and A.S.; software, M.R. and K.K.; mutant design, K.K., A.S.; MD simulations, K.K.; validation, A.U., A.S. and M.F.; investigation, A.U., A.S. and J.J.; formal analysis, A.U.; resources, A.U.; data curation, A.U. and G.N.; writing—original draft preparation, A.S. and A.U.; writing—review and editing, A.U., A.S. and M.F.; visualization, M.R., K.K., A.S. and J.J.; supervision, A.U.; project administration, A.U.; funding acquisition, G.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The research involving cryo-TEM imaging was conducted by Jakub Jagielski and Grzegorz Nowaczyk and funded by National Science Centre grant number 2016/22/E/ST3/00458.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** Atomic force microscopy experiments have been performed at European Centre of Bioinformatics and Genomics, a consortium of Poznan University of Technology and the Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences. The authors are grateful to Paulina Bierwagen for preparation of expression plasmid. Karol Kamel is grateful to Sebastian Kmiecik from the Laboratory of Computational Biology, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw and Grzegorz Firlik for granting access to the FUN-K computational cluster.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Wen, A.M.; Steinmetz, N.F. Design of virus-based nanomaterials for medicine, biotechnology, and energy. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4074–4126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. van Rijn, P.; Schirhagl, R. Viruses, artificial viruses and virus-based structures for biomedical applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2016**, *5*, 1386–1400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Matsuura, K. Synthetic approaches to construct viral capsid-like spherical nanomaterials. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 8944–8959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lee, K.L.; Twyman, R.M.; Fiering, S.; Steinmetz, N.F. Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2016**, *8*, 554–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Lucas, R.W.; Larson, S.B.; McPherson, A. The crystallographic structure of brome mosaic virus. *J. Mol. Biol.* **2002**, *317*, 95–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Garmann, R.F.; Comas-Garcia, M.; Gopal, A.; Knobler, C.M.; Gelbart, W.M. The assembly pathway of an icosahedral single-stranded RNA virus depends on the strength of inter-subunit attractions. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 1050–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Daniel, M.C.; Tsvetkova, I.B.; Quinkert, Z.T.; Murali, A.; De, M.; Rotello, V.M.; Kao, C.C.; Dragnea, B. Role of Surface Charge Density in Nanoparticle-templated Assembly of Bromovirus Protein Cages. *ACS Nano* **2010**, *4*, 3853–3860. [[CrossRef](#)]
8. Bruinsma, R.F.; Wuite, G.J.L.; Roos, W.H. Physics of viral dynamics. *Nat. Rev. Phys.* **2021**, *3*, 76–91. [[CrossRef](#)]
9. Panahandeh, S.; Li, S.; Marichal, L.; Leite Rubim, R.; Tresset, G.; Zandi, R. How a Virus Circumvents Energy Barriers to Form Symmetric Shells. *ACS Nano* **2020**, *14*, 3170–3180. [[CrossRef](#)]
10. Hiebert, E.; Bancroft, J.B.; Bracker, C.E. The assembly in vitro of some small spherical viruses, hybrid viruses, and other nucleoproteins. *Virology* **1968**, *34*, 492–508. [[CrossRef](#)]
11. Adolph, K.W.; Butler, P.J. Assembly of a spherical plant virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **1976**, *276*, 113–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Herzog, M.; Hirth, L. In Vitro encapsidation of the four RNA species of brome mosaic virus. *Virology* **1978**, *86*, 48–56. [[CrossRef](#)]
13. Maassen, S.J.; de Rooter, M.V.; Lindhoud, S.; Cornelissen, J.J.L.M. Oligonucleotide Length-Dependent Formation of Virus-Like Particles. *Chem. A Eur. J.* **2018**, *24*, 7456–7463. [[CrossRef](#)]
14. Choi, Y.G.; Dreher, T.W.; Rao, A.L.N. tRNA elements mediate the assembly of an icosahedral RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 655–660. [[CrossRef](#)]
15. Dixit, S.K.; Goicochea, N.L.; Daniel, M.-C.; Murali, A.; Bronstein, L.; De, M.; Stein, B.; Rotello, V.M.; Kao, A.C.C.; Dragnea, B. Quantum dot encapsulation in viral capsids. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1993–1999. [[CrossRef](#)]
16. Huang, X.; Stein, B.D.; Cheng, H.; Malyutin, A.; Tsvetkova, I.B.; Baxter, D.V.; Remmes, N.B.; Verchot, J.; Kao, C.; Bronstein, L.M.; et al. Magnetic virus-like nanoparticles in *N. benthamiana* plants: A new paradigm for environmental and agronomic biotechnological research. *ACS Nano* **2011**, *5*, 4037–4045. [[CrossRef](#)]
17. Vega-Acosta, J.R.; Cadena-Nava, R.D.; Gelbart, W.M.; Knobler, C.M.; Ruiz-Garcia, J. Electrophoretic mobilities of a viral capsid, its capsid protein, and their relation to viral assembly. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1984–1989. [[CrossRef](#)]

18. Chen, C.; Kao, C.C.; Dragnea, B. Self-assembly of brome mosaic virus capsids: Insights from shorter time-scale experiments. *J. Phys. Chem. A* **2008**, *112*, 9405–9412. [[CrossRef](#)]
19. Alejska, M.; Malinowska, N.; Urbanowicz, A.; Figlerowicz, M. Two types of non-homologous RNA recombination in brome mosaic virus. *Acta Biochim. Pol.* **2005**, *52*, 833–844. [[CrossRef](#)]
20. Komorowska, B.; Hasiów-Jaroszewska, B.; Elena, S.F. Evolving by deleting: Patterns of molecular evolution of Apple stem pitting virus isolates from Poland. *J. Gen. Virol.* **2019**, *100*, 1442–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Alejska, M.; Kurzyńska-Kokorniak, A.; Broda, M.; Kierzek, R.; Figlerowicz, M. How RNA viruses exchange their genetic material. *Acta Biochim. Pol.* **2001**, *48*, 391–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Figlerowicz, M. Role of RNA structure in non-homologous recombination between genomic molecules of brome mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1714–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wienken, C.J.; Baaske, P.; Rothbauer, U.; Braun, D.; Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chevreuil, M.; Law-Hine, D.; Chen, J.; Bressanelli, S.; Combet, S.; Constantin, D.; Degrouard, J.; Möller, J.; Zeghal, M.; Tresset, G. Nonequilibrium self-assembly dynamics of icosahedral viral capsids packaging genome or polyelectrolyte. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rao, A.L.N. Genome packaging by spherical plant RNA viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2006**, *44*, 61–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Van Eldijk, M.B.; Wang, J.C.Y.; Minten, I.J.; Li, C.; Zlotnick, A.; Nolte, R.J.M.; Cornelissen, J.J.L.M.; Van Hest, J.C.M. Designing two self-assembly mechanisms into one viral capsid protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18506–18509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Cadena-Nava, R.D.; Comas-Garcia, M.; Garmann, R.F.; Rao, A.L.N.; Knobler, C.M.; Gelbart, W.M. Self-Assembly of Viral Capsid Protein and RNA Molecules of Different Sizes: Requirement for a Specific High Protein/RNA Mass Ratio. *J. Virol.* **2012**, *86*, 3318–3326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Bockstahler, L.E.; Kaesberg, P. The Molecular Weight and Other Biophysical Properties of Bromegrass Mosaic Virus. *Biophys. J.* **1962**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)]
29. Strugała, A.; Kręcisz, M.; Rybka, J.D.; Urbanowicz, A.; Szpotkowski, K.; Bierwagen, P.; Figlerowicz, M.; Kozak, M.; Böttcher, C.; Giersig, M. Biophysical analysis of BMV virions purified using a novel method. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, *1068–1069*, 157–163. [[CrossRef](#)]
30. Li, S.; Erdemci-Tandogan, G.; Van Der Schoot, P.; Zandi, R. The effect of RNA stiffness on the self-assembly of virus particles. *J. Phys. Condens. Matter* **2018**, *30*. [[CrossRef](#)]
31. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]
32. Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A.E.; Berendsen, H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1701–1718. [[CrossRef](#)]
33. Lindorff-Larsen, K.; Piana, S.; Palmo, K.; Maragakis, P.; Klepeis, J.L.; Dror, R.O.; Shaw, D.E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2010**, *78*, 1950–1958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]