

University of Groningen

## Viruses as a tool in nanotechnology and target for conjugated polymers

Gruszka, Agnieszka

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Gruszka, A. (2016). *Viruses as a tool in nanotechnology and target for conjugated polymers*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. Rijksuniversiteit Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## Samenvatting

Virussen zijn decennia lang intensief bestudeerd. Vandaag de dag zijn ze niet alleen erkent om hun klinische impact, maar worden ook gezien als inspiratiebron en een krachtig instrument in multidisciplinair onderzoek.

In Hoofdstuk 1 worden de voornaamste prestaties op het gebied van virusmodificaties beschreven. De virusmodificatie wordt gedaan met focus op de vorming van virusachtige deeltjes (VLPs) als nanocontainers. Deze objecten bestaan uit geassembleerde capsid eiwitten (mantel-eiwitten) en bevatten doorgaans geen viraal genetisch materiaal. In plaats daarvan kunnen ze worden voorzien van verschillende ladingen met diverse functionaliteiten. Bovendien kan de buitenkant worden gedecoreerd met een grote verscheidenheid aan groepen, die geïntroduceerd kunnen worden via chemische koppeling of genetische modificatie. Deze multifunctionele bionanodeeltjes zijn reeds gevormd rondom metaal en halfgeleider deeltjes, synthetische polymeren of imaging middelen en zijn succesvol gebruikt in sonden voor in vivo imaging, voor doelgerichte therapie of als substraat voor syntheses met ruimtelijke beperkingen. Tenslotte wordt de betekenis van virale oncotherapie, genterapie en vaccinontwikkeling uitgelicht, aangezien hier de meest prominente voorbeelden van het gebruik van producten ontstaan uit virus engineering in de moderne geneeskunde gevonden kunnen worden.

In Hoofdstuk 2 introduceren we enkelwandige koolstofnanobuisjes (SWCNTs) als een nieuw functioneel materiaal en laten zien dat deze

efficiënt ingekapseld kunnen worden in een eiwitmantel. Om de interactie van de eiwitten met het oppervlak van de SWCNTs te beheersen, wordt DNA-geleide opbouw van de eiwitten uitgevoerd. Daarna worden de assemblages van twee draadachtige en een bolvormige virus op de SWCNTs gekarakteriseerd doormiddel van elektronen microscopie in een waterige omgeving (tobacco mosaic virus (TMV), potato virus X (PVX) en cowpea chlorotic mottle virus (CCMV), respectievelijk). Hieruit werd duidelijk dat de draadachtige viruskandidaten niet als eiwitdonor gebruikt kunnen worden. Het gebruik van CCMV eiwitten daarentegen resulteerde in een uniforme en volledig dekkende laag om de koolstofnanobuisjes. Hiermee is gedemonstreerd dat DNA-gedispergeerde SWCNTs goed gebruikt kunnen worden als substraat ondanks hun extreme vorm-anisotropie. De door ons gekozen methode gebruikt geen chemische modificatie, wat gewenst is voor het behoud van de functionaliteit van de SWCNTs en de eiwit structuur. Tegelijkertijd kan door de incorporatie van de grondig bestudeerde eiwitmantels in zulke hybriden voordeel behaald worden uit de beschikbare genetische en chemische manipulaties, wat optimalisatie van het systeem voor toekomstig gebruik mogelijk maakt.

In het volgende hoofdstuk is de invloed van eiwit coatings op de elektrische eigenschappen van SWCNTs onderzocht. De methoden beschreven in Hoofdstuk 2 zijn aangepast om hybride materialen te verkrijgen met gedefinieerde elektrische eigenschappen. Ten eerste werd een specifieke DNA volgorde gebruikt om enkel halfgeleidende SWCNTs te isoleren. In de volgende stap worden deze hybride materialen gebruikt om een virus-achtig SWNT systeem te vormen. Uit de experimenten is duidelijk geworden dat de lengte van de oligonucleotiden die gebruikt worden als dispersie middel een belangrijke rol speelt in het vormen van de virus capsid. DNA sequenties met meer dan 22 basen vormen een goede basis en resulteren in compleet geëncapsuleerde SWNTs. Met deze materialen zijn twee elektrische circuits gevormd, waarvan er één op enkel object niveau werkt en één het gehele netwerk van SWCNTs meet. De metingen op enkele nanobuisjes in een veldeffecttransistor configuratie lieten zien dat de gevormde hybride materialen halfgeleider eigenschappen vertonen, wat terug geleid kan worden naar de aanwezigheid van SWCNTs. Echter, er werd ook duidelijk dat de gevormde eiwit capsid resulteert in aanzienlijke elektrische isolatie. Vervolgens zijn metingen verricht aan een SWCNT netwerk. Hier werd gevonden dat de hybride

materialen resulteren in assemblages die gekarakteriseerd worden door een aan/uit ratio van  $10^5$ , ondanks de aanwezigheid van twee lagen van isolerende eiwitten. Wij zijn er daarom van overtuigd dat dit systeem gemakkelijk aangepast kan worden voor gebruik in de detectie van biologische materialen.

De studie die in Hoofdstuk 4 gepresenteerd wordt is gefocust op de exploitatie van een nieuw polymeer die manipulatie van de activiteit van het Human Immunodeficiency Virus (HIV) mogelijk maakt. Ondanks dat een aantal polymeren reeds gebruikt zijn in de virologie, is de variëteit van onderzochte structuren beperkt en zijn meer complexe verbindingen nog niet bestudeerd. Daarom introduceren wij twee geconjugeerde water oplosbare polyfluorenen, een polykation TMPF-P en een polyanion PPF-P, die respectievelijk gefunctionaliseerd zijn met quarternair ammonium zouten en fosfaat groepen. Tevens zijn monomeer en dimeer analogen van de polymeren inbegrepen in de onderzoeken om zo hun activiteit met die van het polymeer te vergelijken. Er kon aangetoond worden dat het negatief geladen PPF-P een virucide werking heeft. De kationische variant, daarentegen, vertoonde een tegenovergestelde activiteit bevorderde virale infecties juist. Tegelijkertijd vertoonden de laag moleculaire analogen geen activiteit. Tevens bleken beide polymeren geen toxische eigenschappen te hebben. Ondanks dat alle uitgevoerde experimenten suggereren dat de polymeer activiteit virus georiënteerd is, blijft de manier van werking van deze materialen onzeker.

In Hoofdstuk 5 zijn model membranen ontworpen die de lipid compositie van HIV en de gast cellen representeren in hun oppervlaktelading en vloeibaarheid. De uitgevoerde biophysische studies in dit hoofdstuk tonen aan dat de PPF-P interactie vertoont met de phospholipide membranen en deze in zeker mate destabiliseert, onafhankelijk van de lading. Dit komt overeen met de eerder gevonden uitkomsten van de biologische experimenten. De gerichte membraan destabilisatie en lage cytotoxiciteit maken PPF-P een veelbelovende virucidale verbinding. Vervolgens is ook aangetoond dat de activiteit van TMPF-P veroorzaakt wordt door elektrostatiche interacties. De aanwezigheid van het kationische polymeer TMPF-P leidt tot een vermindering van de elektrostatiche barrière tussen de negatief geladen virussen en cellen, resulterende in de vorming van vele aggregaten. Naar verwachting worden deze aggregaten ook gevormd met HIV virussen, waardoor deze sneller op de cellen bezinken, wat de

kans op infectie vergroot. Er is eerder uitgelicht dat dergelijke retrovirussen vaak gebruikt worden voor genoverdracht in moleculaire biologie en genterapie. Zulke infectie versterkers kunnen dus de efficiëntie van beide methoden potentieel verbeteren, zowel in vitro als ook in vivo.