

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.*

## Streszczenie

Badania nad wirusami są intensywnie prowadzone od wielu dziesięcioleci. Jednak dziś, wirusy coraz częściej rozpoznawane są nie tylko jako zagrożenie kliniczne, ale również jako inspiracja oraz narzędzie pracy w wielu dyscyplinach nauki.

Rodział 1 jest wprowadzeniem do bioinżynierii wirusów i opisuje najważniejsze osiągnięcia tej gałęzi nauki. Najwięcej uwagi jest poświęcone projektowaniu cząsteczek wirusopodobnych. Jest to rodzaj nanocząsteczek o rozmiarach  $<100 \cdot 10^{-9}$  metra, do budowy których wykorzystywane są białka kapsydu wirusów. Odpowienio oczyszczone białka kapsydowe mogą tworzyć „puste”, niezakaźne, bo przeważnie pozbawione materiału genetycznego, wirusy. Wnętrze takich nanocząsteczek może być różnorodnie zagospodarowane. Dodatkowo, białka kapsydowe mogą być zmodyfikowane chemicznie lub za pomocą inżynierii genetycznej. Takie multifunkcyjne nanocząsteczki wirusopodobne mogą zostać wypełnione różnymi metalami, materiałami o charakterze półprzewodników, syntetycznymi polimerami, a także barwnikami kontrastowymi lub lekami. Są one następnie wykorzystywane w medycynie, jako narzędzia diagnostyczne w wielu technikach obrazowania tkanek, do targetowanego dostarczania leków, a także jako nanoreaktory i szablony do produkcji syntetycznych nanocząsteczek wybranych materiałów o precyzyjnie określonych nanorozmiarach. Dodatkowo w Rozdziale 1 opisane są również najbardziej znaczące osiągnięcia bioinżynierii wirusów, tj. zastosowanie nanocząsteczek wirusopodobnych jako szczepionek oraz jako nowej generacji leków przeciwnowotworowych.

W Rozdziale 2 i 3 wirusy zostały wykorzystane jako budulec nowych materiałów. W Rozdziale 2 opracowana jest technika wykorzystania nanorurek węglowych jako szablonu, na którym po raz pierwszy zbudowana zostanie nanocząsteczka wirusopodobna. Nanorurki węglowe są nowoczesnym, syntetycznym materiałem; są to grafenowe cylindry o średnicy rzędu kilku nanometrów, natomiast o długości nawet kilka tysięcy razy większej. Jest to materiał bardzo wytrzymały mechanicznie, a do tego może mieć charakter metaliczny lub półprzewodnikowy. Żeby wokół takiego obiektu zbudowany mógł zostać zamknięty płaszcz z białek wirusa, zaprojektowany został eksperyment inspirowany naturalnym cyklem życiowym tych patogenów. W pierwszym kroku, hydrofobowe nanorurki węglowe zostały przygotowane w formie zawiesiny za pomocą syntetycznych nici DNA. Następnie, trzy wirusy roślinne zostały przetestowane jako donory białek kapsydowych: dwa wirusy o geometrii cylindrycznej: TMV i PVX oraz sferyczny wirus CCMV. Eksperyment został przeanalizowany za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Udowodniliśmy, że białko sferycznego wirusa CCMV rozpoznało DNA użyte do zdyspergowania pojedynczych rurek węglowych jako własny materiał genetyczny i było w stanie zbudować zamknięty kapsyd wirusowy dookoła pojedynczej nanorurki węglowej. Natomiast białka wirusów o geometrii cylindrycznej, czyli w większym stopniu zbliżonej do użytego szablonu, nie zdołały zbudować płaszcza białkowego. Zaproponowana strategia nie zakłada żadnych modyfikacji chemicznych, zarówno komponentu syntetycznego, jak i białkowego, zatem i nanorurka węglowa, i białko w pełni zachowują swoje właściwości w powstałej hybrydzie.

W Rozdziale 3, zbadane zostały właściwości elektroniczne nanorurki węglowej zamkniętej w kapsydie wirusa. Ponieważ nanorurki węglowe otrzymywane są jako mieszanina rurek metalicznych i półprzewodzących, najpierw opracowaliśmy metodę ich oczyszczania. Następnie jedynie materiał o właściwościach typowych dla półprzewodników, został użyty do zbudowania dwóch typów tranzystorów. Pierwszy tranzystor został skonstruowany z pojedynczej nanorurki węglowej z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych, natomiast drugi – z wykorzystaniem sieci nanorurek. Obie konfiguracje pokazały, że kapsyd wirusopodobny, zbudowany wokół rurki węglowej ma charakter elektrycznego izolatora. Sama nanorurka natomiast zachowuje w pełni swoje elektroniczne właściwości. Otoczka białkowa

może być dowolnie modyfikowana na drodze chemicznej lub za pomocą narzędzi bioinżynierii molekularnej, w celu dalszego przygotowania zaproponowanych struktur do konstrukcji biosensorów.

Kolejne dwa rozdziały poświęcone są polimerom modulującym aktywność ludzkich wirusów otoczkowych. W Rozdziale 4 przedstawiona została synteza dwóch polimerów z grupy polifluorenów o analogicznej budowie podstawowego łańcucha, natomiast o różnych modyfikacjach bocznych tj. polifluorenu o charakterze kationowym oraz polifluorenu o charakterze anionowym. Oba polimery są rozpuszczalne w wodzie i mogą być bezpośrednio wykorzystane w badaniach biologicznych. Jako modelowy wirus wykorzystany został ludzki wirus niedoboru odporności (HIV). Z testów wynikało, że anionowy polimer ma charakter silnie wirusobójczy, nie wykazując przy tym znaczącej cytotoksyczności. Natomiast polimer o przeciwnym ładunku elektrycznym przyspiesza infekcje wirusowe. Ta właściwość może być z kolei wykorzystana w nowoczesnych terapiach genetycznych, gdzie wirusy pokrewne HIV są stosowane do naprawy uszkodzonych genów w ludzkich komórkach. Przeprowadzone badania sugerują, że testowane polimery oddziałują bezpośrednio na otoczkę wirusa, jednak dokładny mechanizm ich działania nie mógł zostać potwierdzony w trakcie badań biologicznych.

Rozdział 5 jest poświęcony badaniu potencjalnego mechanizmu działania biologicznie aktywnych polimerów prezentowanych w poprzednim rozdziale. W związku z tym, zaprojektowany został zestaw modelowych liposomów, przypominających składem kompozycje wirusa HIV i infekowanej komórki oraz, dodatkowo, neutralny zestaw kontrolnych liposomów. Liposomy wirusowe i komórkowe różnią się ładunkiem powierzchni oraz zawartością cholesterolu. Przeprowadzone testy sugerują, że anionowy polimer w znacznym stopniu destabilizuje modelowe membrany, które stają się przez to bardziej przepuszczalne. Jest to o tyle ciekawe, że zarówno membrana jak i polimer są tak samo naładowane, a zatem tak silne wzajemne oddziaływania nie były spodziewane. W przypadku kontrolnych liposomów neutralnych, czyli przy braku odpychania elektrostatycznego pokazane zostały jeszcze silniejsze efekty. Eksperymenty przeprowadzone z polimerem kationowym, pokazały że prowadzi on do bardzo silnej agregacji liposomów oraz do ich wytrącania z roztworu. Liposomy nie ulegają jednak zniszczeniu, są natomiast jedynie silnie zkoagulowane. Przeprowadzone testy wskazują, że polifluoreny są nową grupą

związków o interesującym profilu aktywności. Mechanizm działania, zasugerowany w Rozdziale 4, został potwierdzony, co czyni z nich związki aktywne nie tylko przeciwko HIV, ale także potencjalnie przeciw innym wirusom otoczkowym.