

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Enrika Celitan

Saccharomyces cerevisiae L-BC-1 viruso
kilmės nanodalelių savybių ir jų
pernašos galimybių vertinimas

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2025

Disertacija rengta 2019–2023 metais Vilniaus universiteto, Gyvybės mokslų centro, Biomokslų instituto, Biochemijos ir Molekulinės Biologijos katedroje.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas – prof. dr. Saulius Serva (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

Nariai:

dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Dukas Jurėnas (Briuselio laisvasis universitetas (ULB), Belgija, gamtos mokslai, biochemija – N004);

dr. Mindaugas Zaremba (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004);

dr. Živilė Strazdaitė-Žielienė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biochemija – N004).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2025 m. birželio mėn. 25 d. 13 val., VU Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje, Saulėtekio al. 7.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.784>

<https://orcid.org/0009-0006-4427-438X>

VILNIUS UNIVERSITY

Enrika Celitan

Evaluation of the Properties and Delivery Potential of *Saccharomyces* *Cerevisiae* L-BC-1 Virus-Derived Nanoparticles

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2025

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biosciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology.

The dissertation is defended on an external basis.

Academic consultant - Prof. Dr. Saulius Serva (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Dissertation Defence Panel:

Chairman - Prof. Dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

Members:

Dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr. Dukas Jurėnas (Université Libre de Bruxelles, Belgium, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr. Mindaugas Zaremba (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004);

Dr. Živilė Strazdaitė-Žielienė (Nature Research Centre, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

The dissertation will be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 13:00 on 25 June 2025, in Room R-401 of the Life Sciences Center, Vilnius University, Sauletekio Ave. 7.

The text of this dissertation can be accessed at the library of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	9
MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ	11
GINAMIEJI TEIGINIAI	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Mielės <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.2. Mielėse <i>S. cerevisiae</i> randami dgRNR virusai	14
1.2.1. L-A, L-BC virusų ir M palydovo genomai	15
1.2.2. Virusų ciklas ląstelėje	18
1.2.3. L-A ir L-BC virionų struktūra	20
1.3. Į virusus panašios dalelės	22
1.3.1. Į virusus panašių dalelių tipai	23
1.3.2. Sintezės sistemos	26
1.3.3. Gryninimo ir charakterizavimo metodai	31
1.3.4. Dalelių funkcionalizavimas	36
1.4. Į virusus panašių dalelių panaudojimas	40
1.4.1. Vakcinų kūrimas	41
1.4.2. Nanodalelėmis paremtos pernašos sistemos	48
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	55
2.1. Medžiagos	55
2.1.1. Reagentai, komerciniai rinkiniai ir kitos priemonės	55
2.1.2. Oligonuokleotidai	56
2.1.3. Plazmidiniai vektoriai	57
2.1.4. Tirpalai ir terpės	57
2.1.5. Ląstelių kamienai ir linijos	59
2.2. Metodai	60
2.2.1. dgRNR išskyrimas iš mielių <i>S. cerevisiae</i>	60
2.2.2. Atvirkštinė transkripcija	61
2.2.3. Polimerazinė grandininė reakcija	61
2.2.4. Plazmidinių vektorių konstravimas	62
2.2.5. Kompetentinių <i>E. coli</i> ląstelių paruošimas ir cheminė transformacija	63
2.2.6. Plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės metodu	64
2.2.7. Kompetentinių <i>S. cerevisiae</i> ląstelių paruošimas ir transformacija	64
2.2.8. Rekombinantinių baltymų sintezė bakterijose	65
2.2.9. Rekombinantinių baltymų sintezė mielėse	65
2.2.10. Į virusus panašių dalelių gryninimas	66
2.2.11. Buferinio tirpalo pakeitimas	66
2.2.12. Nukleorūgščių elektroforezė agaroziniame gelyje	67
2.2.13. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis	67

2.2.14. Vidutinio dalelių dydžio tirpale nustatymas	67
2.2.15. Mėginių analizavimas elektroniniu mikroskopu.....	68
2.2.16. Terminio poslinkio tyrimas.....	68
2.2.17. Nizino įkapsuliavimas į virusus panašias daleles	69
2.2.18. Antibakterinio aktyvumo nustatymas	69
2.2.19. Žinduolių ląstelių transdukcija.....	69
2.2.20. Žinduolių ląstelių fluorescencinė analizė ir gyvybingumo vertinimas	70
2.2.21. Rezultatų statistinė analizė.....	71
3. REZULTATAI	72
3.1. Raiškos vektorių konstravimas	72
3.2. Gag baltymo sintezė bakterijose ir mielėse.....	75
3.3. Gag baltymo formuojamų dalelių gryninimas	77
3.4. Gag baltymo gebėjimo formuoti daleles nustatymas	81
3.5. Gag baltymo formuojamų dalelių stabilumo tyrimai	82
3.5.1. Gag baltymo formuojamų dalelių dydžio stabilumas	83
3.5.2. Gag baltymo formuojamų dalelių stabilumo vertinimas TSA metodu	90
3.5.3. Gag baltymo formuojamų dalelių disociacijos tyrimai.....	93
3.6. Gag baltymo formuojamų dalelių įkapsuliavimo tyrimai	96
3.6.1. Fluorescuojančio baltymo mCherry įkapsuliavimas genų suliejimo metodu.....	96
3.6.2. Antimikrobinio peptido nizino Z įkapsuliavimas pasyvios difuzijos metodu	99
3.7. Žinduolių ląstelių transdukcija Gag dalelėmis	103
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	107
IŠVADOS.....	115
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	116
SUMMARY	139
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	172
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS	172
GYVENIMO APRAŠYMAS.....	173
CURRICULUM VITAE	175
PADĖKA.....	177

SANTRUMPOS

AF4-MALS	asimetrinio srauto lauko-srauto frakcionavimas kombinuotas su daugiakampe šviesos sklaida (angl. <i>asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multiple-angle light scattering</i>)
AFM	Atominės jėgos mikroskopija (angl. <i>atomic force microscopy</i>)
AHA	Azidohomoalaninas
ANS	1-Anilino-8-naftalenosulfono rūgštis
AUC	Analitinis ultracentrifugavimas
BMV	Bromo mozaikos virusas (angl. <i>brome mosaic virus</i>)
BSA	Jaučio serumo albuminas (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
BTV	Mėlynojo liežuvio virusas (angl. <i>bluetongue virus</i>)
B-VLP	Iš bakterijų išgrynintos į virusus panašios dalelės
CBB	<i>Coomassie</i> briliantinis mėlis
CCMV	Kininės pupuolės chlorotinės demėtligės virusas (angl. <i>cowpea chlorotic mottle virus</i>)
CHO	Kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelės (angl. <i>Chinese hamster ovary cells</i>)
CPMV	Kininės pupuolės mozaikos virusas (angl. <i>cowpea mosaic virus</i>)
CuMV	Agurkų mozaikos virusas (angl. <i>cucumber mosaic virus</i>)
CuMV _{TT}	Agurkų mozaikos virusas, sujungtas su universaliu T-ląstelių epitopu
DLS	Dinaminė šviesos sklaida (angl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMSO	Dimetilsulfoksidas
DOX	Doksorubicinas (angl. <i>doxorubicin</i>)
DTT	Ditiotreitolis
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimido hidrochloridas
EDTA	Etilendiaminotetraacto rūgštis
ELISA	Imunofermentinės analizės metodas (angl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM	Elektroninė mikroskopija
ES-DMA	Diferencialinio mobilumo analizė (angl. <i>electrospray differential mobility analysis</i>)
HA	Gripo viruso hemagliutinino baltymas
HBV	Hepatito B virusas
HCC	Hepatoceliulinė karcinoma
HEK	Žmogaus embriono inkstų ląstelės (angl. <i>human embryonic kidney cells</i>)
HER2	Žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus-2 (angl. <i>human epidermal growth factor receptor-2</i>)
HIV	Žmogaus imunodeficito virusas
HIV-Tat	Žmogaus imunodeficito viruso transaktyvuoto transkripcijos aktyvatoriaus peptidas

HPV	Žmogaus papilomos virusas (angl. <i>human papilloma virus</i>)
HSV1-TK	<i>Herpes simplex</i> viruso 1 timidino kinazė
IBDV	Infekcinės bursalinės ligos virusas (angl. <i>infectious bursal disease virus</i>)
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
MHC	Pagrindinis audinių suderinamumo kompleksas (angl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MIANS	2-(4'-Maleimidil-anilin)-naftaleno-6-sulfoninė rūgštis
M-VLP	Iš mielių išgrynintos į virusus panašios dalelės
NA	Gripo viruso neuraminidazės baltymas
NHS	n-Hidroksisukcinimidas
ORF	Atviro skaitymo rėmelis (angl. <i>open reading frame</i>)
PEG	Polietilenglikolis
PhMV	Fizalio dėmėtligės virusas (angl. <i>physalis mottle virus</i>)
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoridas
Pptox	Preprotoksinas (angl. <i>preprotoxin</i>)
PTM	Po-transliacinės modifikacijos
RCNMV	Raudonųjų dobilų nekrozinis mozaikos virusas (angl. <i>red clover necrotic mosaic virus</i>)
RdRp	Nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (angl. <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
RP-HPLC	Atvirkščių fazių didelio efektyvumo skysčių chromatografija (angl. <i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>)
ScV-L-A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielių virusai L-A
ScV-L-BC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> mielių virusai L-BC
SDS-PAGE	Denatūruojanti natrio dodecilsulfato poliakriamidinio gelio elektroforezė
SHIV	Simpanzių-žmonių imunodeficito virusas (angl. <i>simian-human immunodeficiency virus</i>)
TEM	Transmisinė elektronų mikroskopija
TEMED	N'-tetrametiletildiaminas
TLR	<i>Toll</i> -tipo receptoriai (angl. <i>toll-like receptors</i>)
TMV	Tabako mozaikos virusas
TSA	Terminio poslinkio metodas (angl. <i>thermal shift assay</i>)
UTR	Netransliuojami regionai (angl. <i>untranslated region</i>)
VLP	Į virusus panašios dalelės (angl. <i>virus-like particles</i>)
vRNR	Visuminė RNR

IVADAS

Dažna klasikinių gydymo metodų problema – trumpas vaistų veikimo laikotarpis ir nepageidaujamas šalutinis poveikis, kuris gali reikšmingai pabloginti gydomo paciento gyvenimo kokybę. Tikslinė vaistų pernaša yra vienas perspektyviausių, tačiau kartu ir sudėtingiausių metodų, galinčių pagerinti daugelio ligų gydymą. Pagrindiniai tikslinės pernašos privalumai yra tai, kad į reikiamą vietą pristatomas didesnis terapinio preparato kiekis ir taip sumažinamas galimas šalutinis poveikis bei padidinamas gydymo veiksmingumas. Vaistų pernašai bandomos taikyti įvairios nanodalelės, įskaitant liposomines, polimerines ar metalo nanodaleles. Šios struktūros turi eilę trūkumų, tokių kaip dalelių nestabilumas, imunogeniškumas ar toksiškumas (Rohovie *et al.*, 2017). Siekiant išvengti šių problemų, daug dėmesio skiriama baltymų pagrindu sukurtoms nanodalelėms, tarp jų – į virusus panašioms dalelėms (VLP, angl. *virus-like particles*). Atlikus dažniausiai šioms dalelėms apibūdinti naudojamo termino „*virus like particles*“ paiešką Google Scholar paieškos sistemoje, vien 2024 metais rasta 83 000 publikacijų – tai rodo didelę VLP technologijų svarbą ir perspektyvumą.

Kitaip nei natyvūs virusai, VLP neturi genetinės medžiagos, todėl yra neinfektyvios. Pasitelkus pasyvios difuzijos metodą, genų inžineriją, cheminę konjugaciją ar kontroliuojamą kapsidės baltymų susirinkimą, į šių dalelių vidų arba išorinį paviršių galima įterpti tiek biologinės, tiek sintetinės kilmės molekules (Chung *et al.*, 2020; McNeale *et al.*, 2023). Įterpimui į VLP pasirinkus atitinkamus ligandus galima ne tik užtikrinti dalelių patekimą į norimą vietą, bet ir kontroliuoti pernešamos medžiagos atpalaidavimą (Ikwuagwu *et al.*, 2022). Plačios VLP funkcionalizavimo galimybės, sintezės sistemų pasirinkimas ir struktūrinė įvairovė lemia šių dalelių taikymą įvairiose srityse (Tariq *et al.*, 2022; Deshayes *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023).

Vakcinų kūrimui naudojamos dalelės, kilusios iš žmogui patogeniškų virusų, tokių kaip žmogaus papilomos, gripo, hepatito B ir E bei koronavirusų, kurių komponentai sukelia stiprų ląstelinį ir humoralinį imuninį atsaką (Tariq *et al.*, 2022). Tikslinėje pernašoje dalelių imunogeniškumas yra vengtinas, kadangi ląstelės-šeimininkės apsaugos mechanizmai gali sukelti dalelių degradaciją ir priešlaikinį pernešamos medžiagos atpalaidavimą (Dai *et al.*, 2018; He *et al.*, 2022). Kuriant pernašos nanodalelėmis sistemas taip pat svarbu užtikrinti dalelių stabilumą, kadangi VLP agregacija yra dažna problema, veikianti jų imunogeniškumą bei antigeniškumą (Chen *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2023; Masarudin *et al.*, 2015). Dėl šių priežasčių, siekiant

sukurti efektyvią pernašos nanodalelėmis sistemą tiriamos įvairios kilmės VLP.

Mielės *Saccharomyces cerevisiae* – tai vienas geriausiai ištirtų organizmų, kuris JAV maisto ir vaistų administracijos (FDA, angl. *food and drug administration*) visuotinai pripažintas saugiu (GRAS, angl. *generally recognized as safe*), o Europoje turintis kvalifikuotos saugos prielaidos (QPS, angl. *qualified presumption of safety*) statusą, todėl plačiai naudojamas natyvių ir rekombinantinių produktų gamybai (Gronchi *et al.*, 2022). Daugumoje *S. cerevisiae* kamienų randami dviejų tipų ekstraląstelinės fazės neturintys totivirusai – L-A bei L-BC (Ribas ir Wickner, 1996; Schmitt ir Breinig, 2002). L-BC virusams būdingas dvigrandininės RNR (dgRNR) genomas, koduojantis pagrindinį kapsidės baltymą Gag ir nuo RNR priklausomą RNR polimerazę Pol (Park *et al.*, 1996). L-BC virusų dgRNR genomas supakuotas 38,5 nm dydžio ikosaedro simetrijos kapsidėje, sudarytoje iš 120 Gag monomerų, iš kurių keletas yra sulieti su Pol baltymu (Grybchuk *et al.*, 2022). Iki šiol tirtos tik struktūrinės šių virusų savybės ir galimos jų funkcijos mielių ląstelėje. Šiame darbe įvertintos L-BC-1 viruso kilmės nanodalelių taikymo kuriant VLP paremtas pernašos sistemas galimybės.

Darbo tikslas:

Įvertinti *Saccharomyces cerevisiae* L-BC-1 viruso pagrindinio kapsidės baltymo Gag formuojamų nanodalelių stabilumą ir įkapsuliavimo galimybes, siekiant jas pritaikyti pernašos sistemų kūrimui.

Darbo uždaviniai:

1. Susintetinti L-BC-1 viruso Gag baltymą *E. coli* ir *S. cerevisiae* raiškos sistemose ir nustatyti jo gebėjimą formuoti į virusus panašias daleles.
2. Ištirti ir palyginti bakterijose ir mielėse susintetintų Gag formuojamų dalelių dydžio stabilumą skirtingose sąlygose.
3. Ištirti ir palyginti bakterijose ir mielėse susintetintų Gag formuojamų dalelių temperatūrinį stabilumą skirtingose sąlygose.
4. Įvertinti Gag formuojamų dalelių įkapsuliavimo galimybes genų suliejimo ir pasyvios difuzijos metodais.
5. Nustatyti Gag formuojamų dalelių gebėjimą patekti į plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos žinduolių ląsteles ir jų poveikį šių ląstelių gyvybingumui.

MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Klasikiniai vėžio bei kitų ligų gydymo metodai dažnai pasižymi šalutiniu poveikiu, kurio galima išvengti taikant tikslines pernašos sistemas. Tokių sistemų kūrimui naudojamos įvairių tipų nanodalelės, įskaitant skirtingos kilmės į virusus panašias daleles.

Šiame darbe į virusus panašių dalelių sintezei pasirinktas *Saccharomyces cerevisiae* randamas ekstraląstelinės fazės neturintis L-BC-1 virusas, nesukeliantis neigiamo poveikio ląstelei-šeimininkei. Pirmą kartą bakterijose *Escherichia coli* ir mielėse *Saccharomyces cerevisiae* susintetintas rekombinantinis L-BC-1 viruso kapsidės baltymas Gag, sėkmingai formuojantis simetriškas sferiškas ~40 nm dydžio daleles. Naudojant dinaminės šviesos sklaidos, transmisinės elektronų mikroskopijos ir terminio poslinkio metodus ištirtas Gag baltymo formuojamų dalelių dydžio ir temperatūrinis stabilumas. Remiantis ilgalaikio dalelių dydžio stabilumo tyrimo rezultatais nustatyta, kad susintetintų dalelių dydis išlieka stabilus net iki 24 savaitių buferiniuose tirpaluose, turinčiuose skirtingas pH reikšmes, joninę jėgą bei kitus priedus. Pademonstruota, kad bakterijose susintetintų dalelių ilgalaikis stabilumas priklauso nuo saugojimui naudojamos temperatūros – aukštesnėse temperatūrose jos agreguoja. Įvairių destabilizuojančių reagentų poveikis parodė, kad dalelės suyra itin šarminėje aplinkoje arba veikiant karbamidu. Temperatūrinio stabilumo tyrimų metu nustatyta, kad didinant temperatūrą Gag baltymo formuojamų dalelių struktūros praradimas vyksta dviem etapais. Šio tyrimo metu taip pat nustatyta, kad dalelės savo stabilumą praranda ne tik šarminėje, bet ir rūgštinėje aplinkoje, kurioje Gag baltymas dalelių neformuoja.

Šiame darbe pademonstruotas sėkmingas dviejų skirtingų junginių įkapsuliavimas į Gag baltymo formuojamas daleles. Pasyvios difuzijos būdu į Gag daleles patekęs antimikrobinis peptidas nizinas Z suteikė dalelėms antibakterinį aktyvumą. Genų suliejimo būdu į daleles patalpintas didelis kiekis raudonai fluorescuojančio mCherry baltymo, nepaveikiant Gag baltymo gebėjimo formuoti daleles. Tokiomis dalelėmis pademonstruotas Gag baltymo formuojamų dalelių patekimas į žinduolių ląsteles, nenaudojant transdukcijos reagentų. Parodyta, kad bakterijose susintetintos dalelės pasižymi citotoksiniu poveikiu žinduolių ląstelėms, o mielėse susintetintos dalelės tokio poveikio ląstelėms neturi.

Iki šiol tirtas tik natyvus L-BC-1 virusas, todėl atlikti rekombinantinio Gag baltymo formuojamų dalelių dydžio, temperatūrinio stabilumo bei

įkapsuliavimo ir pernašos galimybių tyrimai suteikia vertingų žinių apie šio viruso savybes ir pagrindžia galimą jo pritaikymą biotechnologijoje.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Bakterijose ir mielėse susintetintas L-BC-1 viruso kapsidės baltymas Gag formuoja į virusus panašias daleles.
2. Gag baltymo formuojamos dalelės pasižymi ilgalaikiu dydžio stabilumu, kuris priklauso nuo dalelių sintezės sistemos ir saugojimo temperatūros.
3. Gag baltymo formuojamos dalelės praranda integralumą itin šarminėje aplinkoje arba veikiant karbamidu.
4. Gag baltymo formuojamų dalelių struktūros praradimas dėl temperatūrinio poveikio vyksta dviem etapais.
5. Genų suliejimo ir pasyvios difuzijos metodai yra tinkami Gag baltymo formuojamų dalelių įkapsuliavimui.
6. Gag baltymo formuojamos dalelės patenka į A549 linijos žinduolių ląsteles be papildomo poveikio, o jų įtaka ląstelių gyvybingumui priklauso nuo dalelių sintezės sistemos.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje pateikta literatūros apžvalga, apimanti mieles *S. cerevisiae*, žinomus šių mielių virusus ir jų savybes; į virusus panašias daleles, jų tipus, sintezės sistemas, gryninimo metodus ir charakterizavimą, modifikacijas bei panaudojimą.

1.1. Mielės *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, vienaląsčiai eukariotiniai organizmai, plačiai žinomi kaip kepimo mielės, yra vieni geriausiai ištirtų ir charakterizuotų organizmų, turintys visiškai iššifruotą ir anotuotą genomą, kurio dydis siekia apie 12 Mb (Goffeau *et al.*, 1996; Fisk *et al.*, 2006). *S. cerevisiae* genomas yra organizuotas į 16 chromosomų ir koduoja 6000 atviro skaitymo rėmelių (ORF, angl. *open reading frame*). Visą informaciją apie mielių genomą, genų anotaciją ir jų funkcijas galima rasti *Saccharomyces* genomo duomenų bazėje (www.yeastgenome.org), sukurtoje bendradarbiaujant plačiai mokslininkų bendruomenei iš viso pasaulio (Hirschman *et al.*, 2006; Cherry *et al.*, 2012).

Nepaisant to, kad *S. cerevisiae* yra vienaląsčiai eukariotiniai organizmai, jie pasižymi funkcijomis, būdingomis daugeliui aukštesniųjų eukariotų, todėl šios mielės plačiai naudojamos kaip modelinis organizmas. Mielių kaip modelinio organizmo panaudojimas ypatingai išaugo po to, kai 1978 metais Hinnen su kolegomis paskelbė sėkmingą *S. cerevisiae* mielių transformaciją hibridine bakterine plazmidine DNR su įterptu mielių genu, kuri stabilų *leu2*-mutantą pavertė *LEU2+* ir atvėrė galimybes atlikti daug manipuliacijų su mielėmis (Hinnen *et al.*, 1978).

Dėl atsparumo nepalankioms osmoliariškumo ir žemo pH sąlygoms *S. cerevisiae* plačiai taikomos ne tik moksliniuose tyrimuose, bet ir biotechnologijos pramonėje (Parapouli *et al.*, 2020). Mielės dėl jų vykdomo fermentacijos proceso nuo senų laikų laikomos vienu pagrindinių komponentų žmonių civilizacijoje, ypatingai maisto (duonos, kepinių, šokolado) ir gėrimų (vyno, alaus, sidro) gamyboje (Stewart, 2014) ir yra visuotinai pripažintos esančios saugios (angl. *generally recognized as safe*). Europos mielių pramonėje kasmet pagaminamas apie 1 milijonas tonų mielių ir kiekvienais metais šis skaičius tik auga (Parapouli *et al.*, 2020). Taip pat mielės taikomos ir bioetanolio gamyboje, kuris gaminamas atliekant cukrų fermentaciją, panaudojant įvairius augalus, tokius kaip cukranendres, cukrinius runkelius, vaisius ir krakmolą, nemaistines medžiagas, priklausančias lignoceliuliozinei biomasei (mediena, šiaudai, javų ir maisto atliekos), bei dumblius (Mohd Azhar *et al.*, 2017; Eliodóro *et al.*, 2019).

Nepaisant efektyvaus įvairių *S. cerevisiae* kamienų pritaikymo minėtuose procesuose, atliekami papildomi tyrimai, kurie ne tik padeda optimizuoti jau esančius kamienus, bet ir pritaikyti bei ištirti didelį kiekį gamtinių izoliatų. Be plataus *S. cerevisiae* mielių pritaikymo, šios mielės pasižymi dar viena įdomia savybe – gamtiniuose *S. cerevisiae* izoliatuose randami ekstrachromosominiai genetiniai elementai, tokie kaip mitochondrinė DNR, 2 mikronų žiedinė plazmidė, retrotranspozonai bei viengrandinės RNR (vgRNR) ir dgRNR molekulės (Futcher, 1988; Wickner, 1996a). Kai kurie iš šių elementų susiję su mielių biocidiniu aktyvumu, kuris plačiau aptariamas sekančiame skyriuje (žr. 1.2).

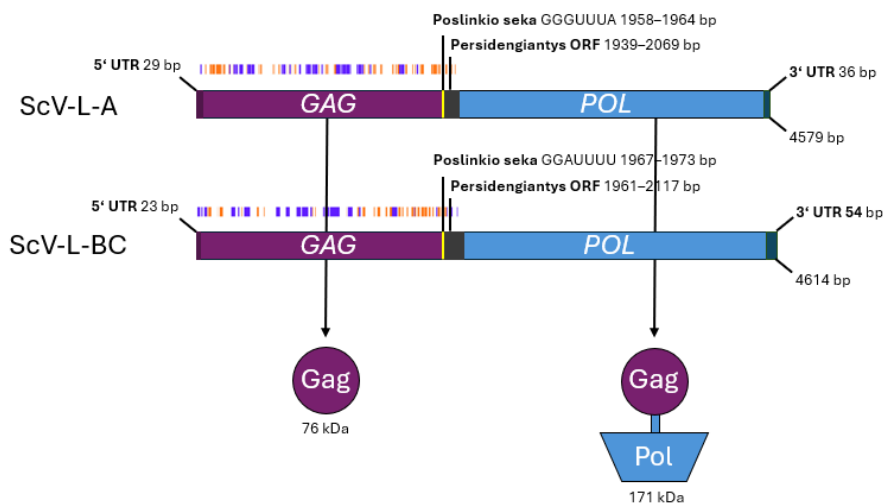
1.2. Mielėse *S. cerevisiae* randami dgRNR virusai

RNR genomą turintys virusai yra vienas iš citoplazminių genetinių elementų, randamų daugelyje grybų. Kitaip nei kituose organizmuose randami virusai, jie neturi ekstraląstelinės fazės ir tarp grybų yra perduodami vykstant ląstelių pasidalinimui, sporogenezei ar ląstelių susiliejimui (Ghabrial, 1998; McCabe *et al.*, 1999). Manoma, kad prie tokio perdavimo būdo šie virusai prisitaikė dėl storo ląstelės sienelės barjero ir dažno poravimosi bei hifų susiliejimo, kurie ekstraląstelinį perdavimo kelią pavertė nebūtinu (Wickner, 1996a). Grybuose randami dgRNR genomą turintys virusai, priklausantys net 8 virusų šeimoms: *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Megabirnaviridae*, *Chrysoviridae*, *Quadriviridae*, *Reoviridae*, *Amalgaviridae*, *Polymycoviridae*; ir vienai *Botybirnavirus* (neklasifikuota) virusų genčiai (Hough *et al.*, 2023). Visgi, *Amalgaviridae* šeimos virusai dažniau aptinkami augaluose, o grybuose – tik išimtiniais atvejais (Vendrell-Mir *et al.*, 2021).

Mielėse *S. cerevisiae* aptinkami dviejų tipų dgRNR genomą turintys totivirusai: L-A ir L-BC (Wickner, 1992, 1996a, 1996b; Wickner *et al.*, 2013). Dauguma *S. cerevisiae* kamienų turi vieno arba abiejų tipų totivirusus, kurie stabiliai replikuojasi ląstelėse nesulėtindami jų augimo greičio. Tai parodo, kad tarp ląstelės-šeimininkės ir šių virusų palaikomas tam tikras balansas (Wickner, 1996a). L-A virusą turintys *S. cerevisiae* kamienai papildomai dar gali turėti palydovinį M virusą (1,5–2,3 kb), kurio palaikymui ląstelėje būtinas L-A virusas. Pilnai funkcionalūs M palydovai koduoja sekretuojamus toksinus, suteikiančius mielių kamienams biocidinį aktyvumą prieš šių virusų neturinčius kamienus (Magliani *et al.*, 1997; Schmitt ir Breinig, 2002 bei 2006; Rodriguez-Cousiño *et al.*, 2011).

1.2.1. L-A, L-BC virusų ir M palydovo genomai

S. cerevisiae infekuojantys L-A (ScV-L-A) bei L-BC (ScV-L-BC) virusai priklauso *Totiviridae* virusų šeimai. Iš viso *S. cerevisiae* mielėse rasti keturi L-A (L-A-1, L-A-2, L-A-28 ir L-A-lus) (Rodríguez-Cousiño *et al.*, 2013 ir 2017; Konovalovas *et al.*, 2016; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017) bei trys L-BC virusai (L-BC-1, L-BC-2, L-BC-lus) (Park *et al.*, 1996; Rodríguez-Cousiño ir Esteban, 2017). Šie virusai turi viensegmentinį apie 4,6 kb ilgio dgRNR genomą, kuriame yra du ORF – pirmajame koduojamas apie 76–78 kDa dydžio pagrindinis kapsidės baltymas Gag, o antrajame – apie 171 kDa dydžio nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (RdRp, angl. *RNA-dependent RNA polymerase*) Pol, kuri sintetinama tik kaip sulietinis Gag-Pol baltymas, įvykus -1 ribosominio rėmelio poslinkiui (1.2.1.1 pav.) (Wickner, 1996; Schmitt ir Breinig, 2006).



Pav. 1.2.1.1. ScV-L-A ir ScV-L-BC genomų organizacijos palyginimas (modifikuota pagal Taylor *et al.*, 2013). Paveiksle nurodyta pagrindinio kapsidės baltymo Gag ir nuo RNR priklausomos RNR polimerazės Pol ORF persidengimo sritys (patamsinta spalva); 5' ir 3' netransliuojami regionai (UTR, angl. *untranslated region*); ribosominio rėmelio poslinkio sekos (geltonas brūkšnyš). Kapsidės baltymų antrinių struktūrų domenai nurodyti violetine (α -spirālės) ir oranžine (β -klostės) spalvomis.

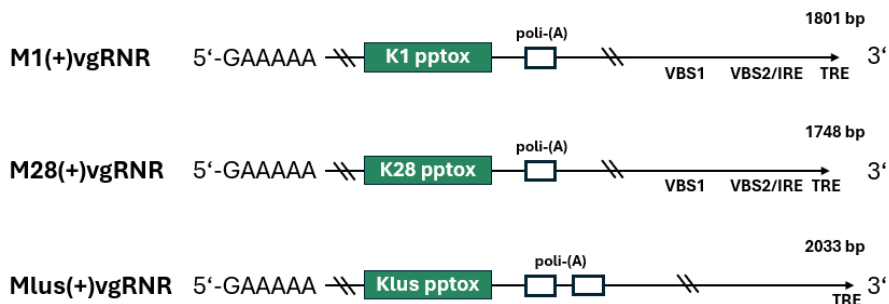
Šių virusų genome be dviejų ORF randamos ir kelios kitos svarbios geno sritys. Gag-Pol sulietinis baltymas sintetinas tik įvykus -1 ribosominio rėmelio poslinkiui, vykstančiam dėl Gag ir Pol ORF persidengimo srityje esančios poslinkio sekos. L-A virusų atveju ši seka yra 5'-...G GGU UUA...-3', o L-BC – 5'-...G GAU UUU...-3' (Ramirez *et al.*, 2021 ir 2022). Šalia šios sekos 3' galo yra susidaręs pseudomazgas, dėl kurio

ribosoma sustoja (ties pabrauktais kodonais) ir grįžta vienu nukleotidu atgal. Ribosominio rėmelio poslinkis įvyksta apie 2 % atvejų, taip užtikrinant tinkamą Gag ir Gag-Pol baltymų santykį virione. Šis mechanizmas atlieka kelias funkcijas: a) viename RNR segmente koduojami du skirtingi baltymai, taip sutaupant vietą genome; b) reguliuojamas Gag ir Gag-Pol sintezės santykis; c) užtikrinama, kad Pol bus kapsidės viduje, kur ji atlieka replikacijos ir transkripcijos procesus (Dinman ir Wickner, 1992; Naitow *et al.*, 2002). L-A ir L-BC virusų genomuose 3' galo srityse taip pat randami ir geno pakavimo į virionus bei replikacijos signalai, kuriems būdingos stiebo-kilpos tipo antrinės struktūros. Pol baltymą koduojančiame ORF taip pat randamas polimerazinį aktyvumą užtikrinantis domenas bei vgRNR surišimo ir pakavimo domenai, užtikrinantys sėkmingą koduojančios RNR grandinės supakavimą į virioną ir jos transkripciją bei replikaciją (Wickner *et al.*, 2013).

Nors ScV-L-A ir ScV-L-BC virusų genomų organizacija atrodo labai panaši, tačiau net didžiausio panašumo regione (717 a. r.) jų identiškas siekia tik 30 % (Wickner *et al.*, 2012). Taip pat, šie virusai skirtingai reaguoja į chromosominės mutacijas – mutacijos, lemiančios L-BC virusų praradimą, nelemia L-A praradimo ir atvirkščiai (Wickner *et al.*, 2012). Įdomu ir tai, kad dgRNR virusus turinčios *S. cerevisiae* mielės yra praradusios RNR interferencijos sistemą, kuri įprastai naudojama apsaugai nuo virusinių infekcijų. Įterpus į šias mieles artimos mielių rūšies *Saccharomyces castellii* RNR interferencijos baltymus, daugumoje mielių ląstelių stebimas L-A ir M virusų praradimas, o L-BC virusas nėra prarandamas, tačiau jo kiekis ląstelėje sumažėja (Drinnenberg *et al.*, 2011). Neseniai atliktame tyrime Vijayraghavan ir jo kolegos ištyrė net 100 *S. cerevisiae* kamienų dėl L-A ir L-BC virusų buvimo. L-A virusas rastas tik apie trečdalyje tirtų kamienų, o L-BC identifikuotas visuose 100 tirtų kamienų, tačiau skirtingais kiekiais (Vijayraghavan *et al.*, 2023). Platesnio L-BC viruso paplitimo priežastis nėra žinoma, tačiau nors jis aptinkamas didesniame kiekyje *S. cerevisiae* kamienų nei L-A virusas, bendras jo kiekis ląstelėje sudaro tik apie 10–20 % L-A kiekio. Tai galimai susiję su tuo, kad L-A ir M virusų sistema, kitaip nei L-BC, daro teigiamą poveikį mielių ląstelėms suteikdama joms biocidinį fenotipą (Field *et al.*, 1982; Sommer ir Wickner, 1982).

Kitaip nei L-A ir L-BC virusai, palydoviniai M virusai turi tik vieną ORF, kuriame koduojamas preprotoksinas (angl. *preprotoxin*, pptox) – sekretuojamo kilerinio toksino pirmtakas, suteikiantis ląstelei šeimininkei imunitetą sintetinamam toksinui (1.2.1.2 pav.) (Schmitt ir Becker, 2021). Šis pirmtakas po-transliacinių modifikacijų metu apdorojamas signalinės

peptidazės bei Kex1p ir Kex2p proteazių iki brandaus kilerinio toksino (Wickner *et al.*, 2013). Iš viso mielėse *S. cerevisiae* rasti keturi M palydoviniai virusai – M1 (1,6 kb), M2 (1,5 kb), M28 (1,75 kb) ir Mlus (2,1–2,3 kb) (Vijayraghavan *et al.*, 2023).

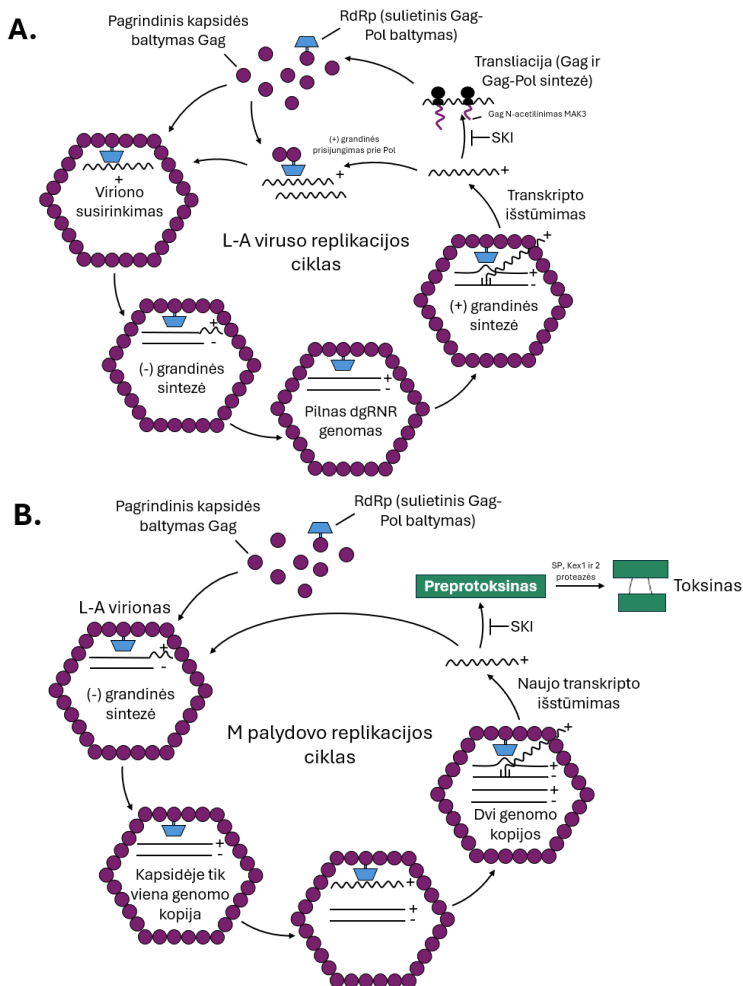


Pav. 1.2.1.2. *S. cerevisiae* M1, M28 ir Mlus genomų organizacijos palyginimas (modifikuota pagal Schmitt ir Becker, 2021). Paveiksle nurodyti poli-A turtingi regionai, atitinkamus preprotoksinus (K1, K28, Klus) koduojantys genai, virusų prisirišimo sritys (VBS, angl. *viral binding site*), vidiniai replikacijos enhanceriai (IRE, angl. *internal replication enhancer*) ir 3' galo atpažinimo elementai (TRE, angl. *3' terminal recognition element*).

Kadangi M virusų genome nėra koduojami kapsidės baltymai, jų palaikymui reikalinga kito viruso, šiuo atveju ScV-L-A, kapsidė. Dėl šios priežasties M virusai yra vadinami palydoviniais, o L-A – pagalbiniais virusais. Skirtingų M palydovų buvimas vienoje mielių ląstelėje *in vivo* negalimas, kadangi kiekvienas toksiną koduojantis M palydovas pašalina vienas kitą replikaciniame lygyje, tačiau tikslūs šio proceso mechanizmai nėra aiškūs (Wickner, 1986; Schmitt ir Tipper, 1992). Atlikti tyrimai rodo, kad šis apribojimas gali būti apeinamas atliekant *in vitro* M2 ir M28 palydovų preprotoksinus koduojančių genų kopijinės DNR (kDNR) įterpimą į M1 palydovą turinčią mielių ląstelę-šeimininkę. Taip sukuriamas stabilus trigubas biocidinis kamienas, kuris ne tik gamina tris skirtingus toksinus, bet yra ir atsparus jiems (Schmitt ir Schernikau, 1997). Taikant virusų eliminavimo strategijas parodyta, kad *S. cerevisiae* biocidiniuose kamienuose, iš kurių pašalintas L-A virusas, tačiau ne L-BC, stebimas pilnas biocidinio fenotipo praradimas. Todėl tiksliai žinoma, kad L-BC negali būti pagalbinis virusas M palydovui ir biocidinį fenotipą šioms mielėms suteikia būtent L-A ir M virusų sistema (Sommer ir Wickner, 1982). Nors *S. cerevisiae* mielėse L-BC virusas neatlieka pagalbinės funkcijos M palydovų palaikyme, nustatyta, kad *Torulaspora delbrueckii* mielėse rastas TdV-L-BC-barr2 virusas geba palaikyti netgi du, TdV-Mbarr1 ir TdV-M1, palydovinius virusus ir suteikti šioms mielėms biocidinį fenotipą (Ramírez *et al.*, 2021).

1.2.2. Virusų ciklas ląstelėje

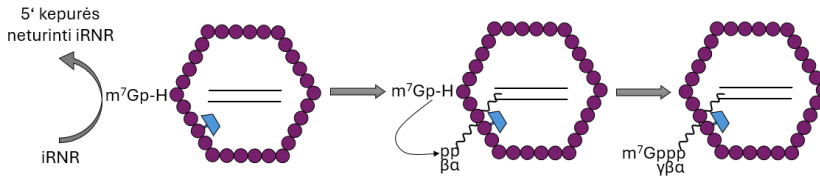
ScV-L-A ir L-BC virusų replikacijos ir transkripcijos ciklai vyksta viruso kapsidės viduje, kur lokalizuota ir šių virusų RdRp, veikianti ir kaip replikazė, ir kaip transkriptazė. Koduojančios grandinės sintezė nuo dgRNR genomo vyksta konservatyviu mechanizmu ir naujai susintetintas transkriptas išstumiamas į citoplazmą, kur vyksta transliacijos procesas ir/arba transkripto įkapsuliavimas į naujai susidariusius virionus. Į naujas daleles įkapsuliuota koduojanti grandinė konvertuojama į dgRNR ir taip užbaigiamas L-A bei L-BC virusų ciklas (1.2.2.1 pav. A) (Wickner *et al.*, 2013). Kadangi M palydovas nekoduoja kapsidės baltymų, savo ciklui panaudoja L-A viruso kapsidę. M palydovo atveju koduojanti grandinė replikuojama tol, kol kapsidėje gaunamos dvi dgRNR molekulės ir tik tada naujai susintetintas transkriptas yra išstumiamas iš kapsidės (1.2.2.1 pav. B) (Esteban ir Wickner, 1986 ir 1988). L-A viruso ir M palydovo replikacijos ir transkripcijos ciklai vykdomi atskirose kapsidėse (Bostian *et al.*, 1980).



Pav. 1.2.2.1. *S. cerevisiae* L-A ir M virusų replikacijos ciklai (modifikuota pagal Wickner et al., 2013). (A) L-A viruso replikacijos ciklas prasideda nuo koduojančios grandinės sintezės, kuri išstumiama į citoplazmą virusinių baltymų transliacijai. Transliaciją reguliuoja mielių superkilleriniai genai (SKI, angl. *superkiller genes*). Susintetinti Gag ir Gag-Pol baltymai savaime susirenka į kapsidės, kuriose įkapsuliuojamas L-A viruso transkriptas. Kapsidės viduje nuo koduojančios grandinės susintetinama dgRNR molekulė ir ciklas kartojamas. (B) M palydovo atveju transkriptas įkapsuliuojamas į atskirą L-A viruso kapsidę ir viduje nuo koduojančios grandinės susintetinamos dvi dgRNR molekulės. M palydovo transkripte koduojamas preprotoksinas, kuris signalinės peptidazės ir Kex1 bei Kex2 proteazių verčiamas brandžiu sekretuojamu toksinu.

Eukariotinė informacinė RNR (iRNR) 5' gale turi vadinamą 5' kepurę ($m^7G(5')ppp(5')X$), kuri yra būtina iRNR stabilumui užtikrinti. ScV-L-A ir L-BC virusai šios struktūros neturi ir gali būti atpažįstami ląstelės-šeimininkės imuninės sistemos ir degraduojami. Nustatyta, kad šie totivirusai turi kepurės nuskėlimo funkciją (angl. *deccaping*), t. y. jie geba pašalinti 5' kepurę nuo

ląstelės-šeimininkės iRNR ir pernešti ją ant savo virusinio transkripto 5' galo ir taip jį apsaugoti (1.2.2.2 pav.). L-A viruso atveju šią reakciją katalizuoja kapsidės išoriniame griovelyje esanti His154 aminorūgštis, o L-BC atveju – His156 (Fujimura ir Esteban, 2011).



Pav. 1.2.2.2. ScV-L-A ir L-BC virusų 5' kepurės nuskėlimo nuo ląstelės-šeimininkės iRNR schema (modifikuota pagal Wickner *et al.*, 2013). L-A ir L-BC virusai nuskelia iRNR 5' kepurę ir suformuoja tarpinį produktą su m⁷Gp kepure per His154 arba His156 grupę, esančią kapsidės išorėje. Tada 5' kepurė perkeliama ant virusinio transkripto difosforilinto 5' galo (pp) ir su 5' kepure suformuojamas 5'-5' trifosfatinis ryšys (m⁷Gppp).

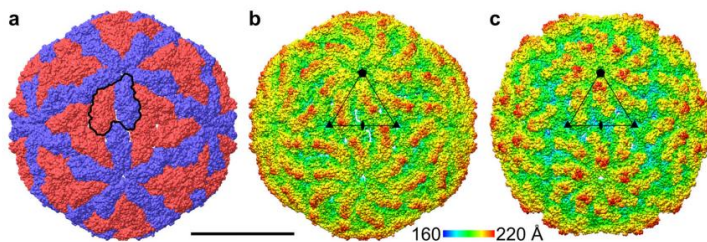
Į citoplazmą išstūmus susintetintą transkriptą ir prie jo prijungus 5' kepurę, atliekama virusinių transkriptų translacija ir susintetinami Gag bei sulietinis Gag-Pol baltymai (Fujimura ir Wickner, 1988; Icho ir Wickner, 1989; Dinman *et al.*, 1991). ScV-L-A virionų susidarymui yra būtinas Gag baltymo N-acetilimas, kurį atlieka ląstelės-šeimininkės baltymai Mak3, Mak10 ir Mak31, kartu suformuojantys N-acetiltransferazės kompleksą (Sommer ir Wickner, 1982; Tercero ir Wickner, 1992). Mak3 atpažįsta L-A Gag baltymo keturias N galo aminorūgštis ir atlieka metionino acetilinimą (Tercero *et al.*, 1992 ir 1993; Tercero ir Wickner, 1992). Pademonstruota, kad ScV-L-BC viruso atveju Gag baltymo N-acetilimas nėra vykdomas ir jis nėra reikalingas virionams susidaryti (Wesolowski ir Wickner, 1984).

1.2.3. L-A ir L-BC virionų struktūra

Nors dgRNR virusai infekuoja įvairius organizmus (nuo bakterijų iki žinduolių), jie pasižymi panašiomis struktūrinėmis ir funkcinėmis savybėmis (Luque *et al.*, 2018). ScV-L-A viruso struktūra pirmą kartą nustatyta 1997 metais krio-elektroninės mikroskopijos (krio-EM) metodu (16 Å), o 2002 metais – naudojant rentgeno struktūrinę kristalografiją (3,4 Å) (Castón *et al.*, 1997; Naitow *et al.*, 2002). ScV-L-BC viruso struktūra nustatyta tik 2022 metais, naudojant krio-EM (2,9 Å) (Grybchuk *et al.*, 2022).

ScV-L-A ir L-BC virusams būdingos ikosaedrinės simetrijos kapsidės, sudarytos iš 2 rūšių subvienetų A ir B – kapsidės baltymo Gag asimetrinių

dimerų (1.2.3.1 pav. a). A subvienetas sujungia kapsidės antro ir penkto laipsnio rotacinės simetrijos ašis, o B subvienetas išsidėstęs trečio laipsnio rotacinės simetrijos ašyse (1.2.3.1 pav. b ir c) (Naitow *et al.*, 2002; Grybchuk *et al.*, 2022). Šių virusų kapsidė dar gali būti įsivaizduojama sudaryta iš 12 dekamerų, kurių kiekvienas sudarytas iš 5 asimetrinių Gag baltymo dimerų. Tokia virionų struktūros savybė yra bendra virusams, replikuojantiems savo dgRNR genomą kapsidės viduje (Luque *et al.*, 2018).



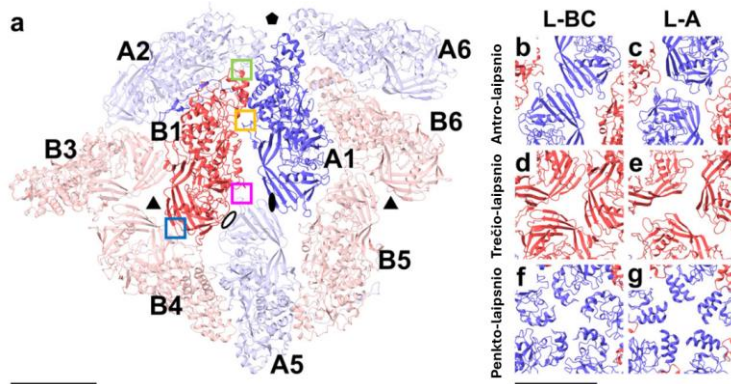
Pav. 1.2.3.1. ScV-L-BC ir ScV-L-A virionų struktūrų palyginimas (Grybchuk *et al.*, 2022).

(a) Dalelės paviršiui suteiktos spalvos, priklausančios nuo subvieneto, formuojančio ikosaedro asimetrinį vienetą: A subvienetas pažymėtas mėlynai, B – raudonai. Juodu kontūru pažymėtas asimetrinis kapsidės vienetas. Nurodyta skalė – 200 Å. (b) ScV-L-BC ir (c) ScV-L-A dalelių paviršiams suteiktos vaivorykštinės spalvos, priklausančios nuo atstumo iki dalelės centro. Penkto, trečio ir antro laipsnio rotacinės simetrijos ašių pozicijos nurodytos atitinkamai penkiakampiu, trikampiu ir ovalu.

Nors L-A ir L-BC virusams būdinga labai panaši struktūra, jų kapsidėse randami ir skirtumai – L-BC virionai yra 38,5 nm skersmens, o L-A virusas yra kiek mažesnis 37 nm dydžio. L-A virusas (1.2.3.1 pav. c) penkto laipsnio rotacinės simetrijos ašyje turi didesnius išsikišimus (pažymėti raudona spalva), o antro laipsnio ašyse – mažesnius griovelius (pažymėti žydra spalva). Bendrai, L-BC virusui būdingas lygesnis kapsidės paviršius nei L-A virusui. Abiejų kapsidžių storis yra 6 nm. Vidinis L-A kapsidės tūris yra 17 000 nm³, o L-BC – 18 000 nm³ (Grybchuk *et al.*, 2022).

Kadangi virusų genomine dgRNR yra stiprus įgimtos imuninės sistemos aktyvatorius, virusai savo genomą apsaugo kapside, kurioje taip pat yra ir RdRp, būtina viriono viduje vykstančiai genomo sintezei (Okamoto *et al.*, 2020). Per kapsidėje esančias poras į virionų vidų patenka nukleozidų trifosfatai, reikalingi transkripcijos procesui, o iš porų į citoplazmą atpalaiduojamas kapsidėje susintetintas transkriptas tolimesniam virusinių baltymų transliacijos procesui (Guglielmi *et al.*, 2010). L-A ir L-BC virusai taip pat turi poras kapsidėse – L-BC virusas turi 12 Å ir 9 Å poras atitinkamai penkto ir trečio laipsnio rotacinės simetrijos ašyse, o L-A turi 18 Å poras penkto laipsnio rotacinės simetrijos ašyse (1.2.3.2 pav. b–g). L-BC virusas papildomai tarp kapsidės baltymų turi 4–7 nm pločio plyšius (Grybchuk *et al.*,

2022). Šių virusų kapsidėse šalia penkto laipsnio rotacinės simetrijos ašyse esančių porų randama RdRp, padedanti koordinuoti transkripto judėjimą iš kapsidės (Luque *et al.*, 2018).



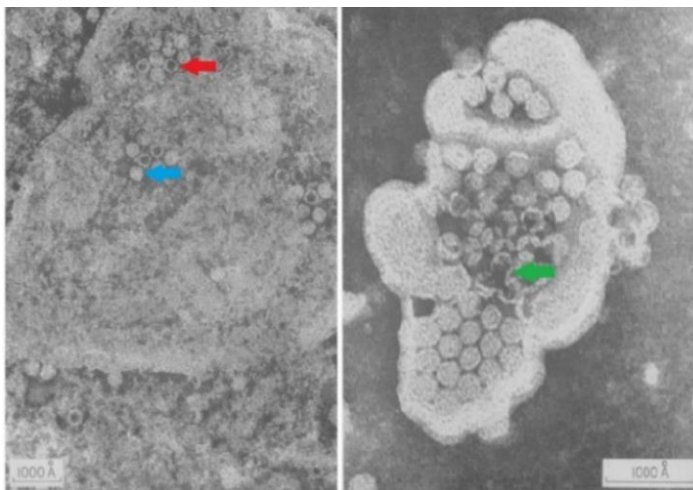
Pav. 1.2.3.2. Tarpsubvienetinės sąveikos ScV-L-BC ir ScV-L-A kapsidėse (modifikuota pagal Grybchuk *et al.*, 2022). (a) L-BC kapsidės baltymų formuojamas ikosaedro asimetrinis vienetas (pažymėta ryškesnėmis mėlyna ir raudona spalvomis) ir aplink sąveikaujantys subvienetai (blankesnės mėlyna ir raudona spalvos). Subvienetai, priklausantys skirtingiems ikosaedro vienetais, pažymėti skaičiais. (b–g) L-BC ir L-A virusų tarpvienetinių sąveikų, esančių skirtingose rotacinės simetrijos ašyse, palyginimas. Nurodyta skalė – 50 Å.

ScV-L-A ir L-BC vidiniai kapsidžių paviršiai, kaip ir daugumos grybų dgRNR virusų, įkrauti neigiamai. Manoma, kad tai padeda transkripcijos metu vykstančiam RNR judėjimui kapsidės viduje ir susidariusių transkriptų išstūmimui iš kapsidės (Pan *et al.*, 2009; Grybchuk *et al.*, 2022). Įdomu tai, kad tiriant natyvaus L-BC viruso struktūrą nustatyta, kad tik apie 4 % virionų savo vidinėje ertmėje turėjo genomą, 9 % dalelių buvo „atviros“ struktūros, t. y. joms trūko vieno iš 12 kapsidės baltymų dekamerų, ir net 87 % dalelių buvo tuščios (Grybchuk *et al.*, 2022). Šie rezultatai pademonstravo, kad *Totiviridae* virusų kapsidės susirenka iš kapsidės baltymų dekamerų, bei patvirtino, kad geno neturinčios virusinės dalelės yra natūrali virusų ciklo dalis. Genomo neturinčios dalelės ne tik randamos natūralioje virusų aplinkoje, bet gali būti ir susintetintos įvairiose raiškos sistemose.

1.3. Į virusus panašios dalelės

Į virusus panašios dalelės – tai nanostruktūros, sudarytos iš savaime susirenkančių virusinės kilmės baltymų. Jos atkartoja natyvaus viruso struktūrą, bet yra neinfektyvios, kadangi neturi genetinės informacijos (Nooraei *et al.*, 2021). Vienas pirmųjų tyrimų, kurių metu buvo identifikuotos VLP, atliktas dar 1959 metais. Elektronų mikroskopijos metodu tirtos poliomelito virusu infekuotos HeLa ląstelės ir po 5,5 val. nuo infekcijos

pradžios identifiikuotos trijų tipų dalelės: pilnos, dalinai susiformavusios ir tuščios (1.3.1 pav.). Šie rezultatai sutapo su prieš tai atliktu tyrimu, kurio metu po ultracentrifugavimo sacharozės gradientu taip pat buvo identifiikuotos trijų rūšių dalelės. Buvo manoma, kad pilnos dalelės yra infektyvus virusas, o tuščios – neinfektyvios dalelės (Horne ir Nagington, 1959). Tobulėjant technologijoms, atliekant vis daugiau tyrimų su virusais ir įgyjant daugiau žinių parodyta, kad virusiniai kapsidės, voko bei šerdies baltymai *in vivo* gali formuoti ne tik virionus, bet ir VLP (Grgacic ir Anderson, 2006).



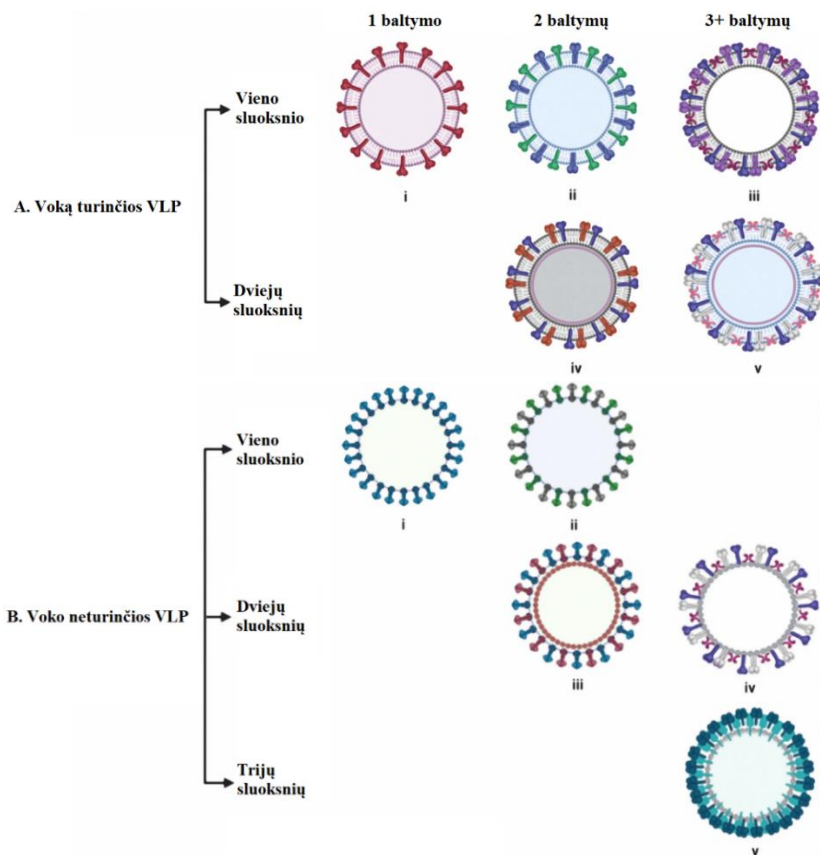
Pav. 1.3.1. Poliomelito viruso dalelių identifikavimas HeLa ląstelėse (modifikuota pagal Horne ir Nagington, 1959). Tiriamuosiuose mėginiuose rasti poliomelito virionai, esantys skirtinguose etapuose: pilnos (žydros spalvos rodyklė), dalinai susiformavusios (žalios spalvos rodyklė) ir tuščios dalelės, arba kitaip VLP (raudonos spalvos rodyklė). Nurodyta skalė – 1000 Å.

Kadangi VLP sudarytos iš baltyminių subvienetų, jos gali būti sintetinės rekombinantiniu būdu laboratorinėmis sąlygomis (Zeltins, 2013). VLP gali būti sudarytos tiek iš vieno baltymo, tiek iš kelių to paties ar skirtingų virusų baltymų, kurie gali būti išsidėstę 1 ar daugiau sluoksnių, taip praplečiant jų panaudojimą. Dėl modifikavimo galimybės ir tuščios vidinės ertmės, į kurią gali būti patalpinami įvairūs junginiai, VLP plačiai taikomos vakcinų, biomolekulių bei nanomedžiagų pernašai (Tariq *et al.*, 2022).

1.3.1. Į virusus panašių dalelių tipai

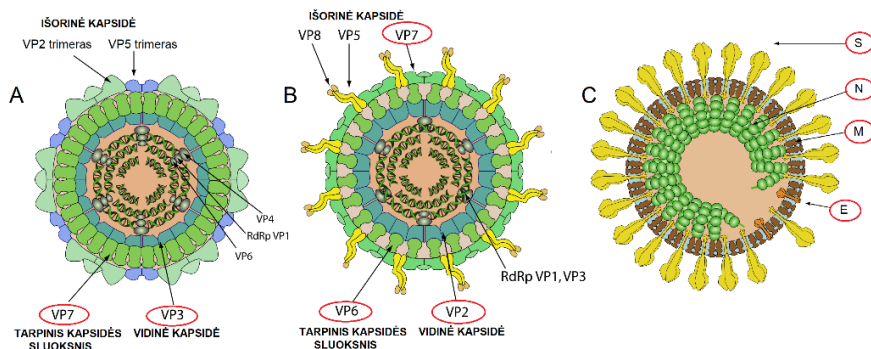
Vykstant kapsidės baltymų susirinkimui, priklausomai nuo natyvaus viruso kilmės gali būti formuojamos ikosaedro ar spiralinės simetrijos, lazdelės ar sferos formos dalelės (Comas-Garcia *et al.*, 2020). VLP pagal savo struktūrinį sudėtingumą klasifikuojamos į skirtingas grupes: baltymai gali būti išsidėstę

vienu, dviem ar net trimis sluoksniais, o tuos sluoksnius gali formuoti vienas ar daugiau skirtingų baltymų (1.3.1.1 pav.). Iš vieno baltymo formuojamos VLP pasižymi paprasta struktūra, o iš kelių skirtingų baltymų sudarytos VLP – sudėtingesnėmis ir unikalesnėmis savybėmis. Šios struktūros papildomai gali būti apgaubtos lipidiniu sluoksniu, todėl VLP skirstomos į voką turinčias (1.3.1.1 pav. A) bei neturinčias daleles (1.3.1.1 pav. B) (Nooraei *et al.*, 2021). Voką turinčios dalelės gali turėti ir matrikso baltymų, lokalizuotų iš šeimininko kilusioje lipidinėje membranoje, kurioje taip pat yra įsiterpusių glikoproteinų (Ding *et al.*, 2018).



Pav. 1.3.1.1. VLP struktūrų klasifikacija (modifikuota pagal Nooraei *et al.*, 2021). (A) Voką turinčių VLP atveju vieno sluoksnio dalelės gali būti formuojamos iš vieno baltymo (i) arba dviejų baltymų (ii). Atliekant trijų ir daugiau baltymų sintezę taip pat gali būti formuojamos vieno sluoksnio dalelės (iii). Dvisluoksnės dalelės gali būti formuojamos iš dviejų (iv) arba trijų ir daugiau baltymų (v). (B) Voko neturinčių dalelių atveju vieno tipo baltymas formuoja vieno sluoksnio daleles (i), o dviejų tipų baltymai gali formuoti tiek viensluoksnes (ii), tiek dvisluoksnes (iii) daleles. Atliekant trijų ir daugiau baltymų sintezę, voko neturinčios dalelės gali formuoti dvisluoksnes (iv) ar net trisluoksnes (v) daleles.

Voko neturinčios VLP gali būti sudarytos iš vieno ar kelių kapsidės baltymų, išsidėsčiusių vienu, dviem ar trimis sluoksniais (Nooraei *et al.*, 2021). Pats paprasčiausias voko neturinčių VLP pavyzdys yra žmogaus papilomos viruso (HPV, angl. *human papilloma virus*) dalelės. Šios VLP sudarytos iš vieno kapsidės baltymo L1 ir gali būti sintetinės tiek prokariotinėse (*E. coli* bakterijose), tiek eukariotinėse (*Schizosaccharomyces pombe* mielėse) sistemose (Chen *et al.*, 2001; Sasagawa *et al.*, 1995). Atliekant sudėtingesnių, iš kelių baltymų formuojamų VLP sintezę atsiranda daugiau iššūkių. Tokios dalelės dažniausiai sintetinės eukariotinėse raiškos sistemose: mielių, žinduolių, augalų ir vabzdžių ląstelėse. Skirtingi kapsidės baltymai gali būti sintetiniai ir surenkami į daleles vienoje ląstelėje. Tokių VLP pavyzdys – mėlynojo liežuvio viruso (BTV, angl. *blue-tongue*) VLP. *Spodoptera frugiperda* vabzdžių ląstelėse atlikta dviejų BTV kapsidės baltymų VP3 ir VP7 sintezė ir sėkmingas šių baltymų susirinkimas į dvisluoksnės VLP (1.3.1.2 pav. A) (French ir Roy, 1990). Pasitelkus vabzdžių bakulovirusinę sistemą sėkmingai susintetintos net trisluoksnės rotaviruso VLP – susintetinti trys VP2, VP6 ir VP7 kapsidės baltymai, formuojantys vidinį, tarpinį ir išorinį kapsidės sluoksnį (1.3.1.2 pav. B) (Vieira *et al.*, 2005).



Pav. 1.3.1.2. Virusų, kurių pagrindu sukurtos VLP, struktūrų pavyzdžiai (modifikuota pagal Hulo *et al.*, 2011). (A) BTV išorinę kapsidę sudaro VP2 ir VP5 trimerai, tarpinį sluoksnį – VP7, vidinį – VP3 baltymai. Taip pat kapsidėje yra RdRp (VP1) bei VP4 ir VP6 baltymai. (B) Rotaviruso išorinę kapsidę sudaro VP5, VP8 ir VP7 baltymai, tarpinį sluoksnį – VP6, vidinį – VP2 baltymai. Taip pat aptinkama RdRp (VP1) ir šalia jos esantis VP3 baltymas, su RdRp sudarantis kompleksą. (C) SARS-CoV-2 virionai sudaryti iš nukleokapsidės, membranos, voko ir spyglio baltymų. Raudonai pažymėti baltymai, iš kurių sėkmingai susintetintos VLP.

Voką turinčios VLP skirstomos į vieno sluoksnio ir dvisluoksnės struktūras, apgaubtas lipidinio voko. Lipidinę membraną dalelės gauna savaiminio susirinkimo ir atsipumpuravimo nuo ląstelės metu (Motsa ir Stahelin, 2021). Į lipidinę membraną gali būti įterptas vienas ar daugiau glikoproteinų, veikiančių kaip pagrindiniai antigenai, atpažįstami ląstelės-šeimininkės imuninės sistemos. Kadangi voko sudėtis priklauso nuo VLP

kilmės, norint užtikrinti reikiamų ląstelės-šeimininkės komponentų įterpimą į sintetinių VLP struktūrą, reikia pasirinkti tinkamą raiškos sistemą (Dai *et al.*, 2018). Voką turinčių dalelių pavyzdys – žmogaus embriono inkstų (angl., *human embryonic kidney*) 293 ląstelėse (HEK-293T) ir Vero E6 žinduolių ląstelėse susintetintos voką turinčios SARS-CoV-2 voką VLP. Šios dalelės gautos atlikus 4 skirtingus baltymus, spyglio (S), voko (E), membranos (M) ir nukleokapsidės (N), koduojančių plazmidžių ko-transfekciją į ląsteles (1.3.1.2 pav. C) (Xu *et al.*, 2020).

1.3.2. Sintezės sistemos

Pirmas etapas VLP gamyboje yra virusinių struktūrinių genų klonavimas į raiškos vektorius, todėl sintezės sistemos pasirinkimas turi būti atliktas dar prieš pirmąjį etapą. VLP sintezei naudojamos bakterijų, mielių, vabzdžių bei žinduolių ląstelės, turinčios savus privalumus ir trūkumus (1.3.2 lentelė) (Jeong ir Seong, 2017). Po-transliacinės modifikacijos (PTM), tokios kaip glikozilinimas ar fosforilinimas, daro įtaką ketvirtinei kapsidės baltymų struktūrai, todėl ji gali kisti priklausomai nuo raiškos sistemos, o tai gali daryti įtaką sintetinių dalelių imunogeniškumui (Donaldson *et al.*, 2015).

Lentelė 1.3.2. VLP sintezės sistemų palyginimas (sukurta pagal Dai *et al.*, 2018).

	Bakterijos	Mielės	Vabzdžių ląstelės	Žinduolių ląstelės	Augalai
VLP tipas	Be voko	Su arba be voko	Su arba be voko	Su arba be voko	Su arba be voko
Sekretacija	-	+	++	++	+
Greitis	+++	+++	++	++/+	++/+
Kaina	+	+	++	+++	++
Apimtis	+++	+++	++	++	++
VLP išeiga	+++	++	++	+	+
VLP sudėtingumas	+	++	+++	++	++

Bakterijos yra viena dažniausiai naudojamų rekombinantinių baltymų, įskaitant ir VLP, sintezės sistemų – net apie 28 % VLP susintetintos bakterijose (Zeltins *et al.*, 2013). Bakterijos įprastai naudojamos paprastų voko neturinčių VLP, sudarytų iš vieno ar dviejų virusinių struktūrinių baltymų, sintezei (Fuenmayor *et al.*, 2017). Dažniausiai naudojamos *E. coli* bakterijos, pasižyminčios greitu augimu ir maža kaina, didelėmis sintetinių baltymų išeigomis ir galimybe didinti auginimo apimtį (Dai *et al.*, 2018; Rosano ir Ceccarelli, 2014). Šios savybės ypatingai svarbios kuriant VLP

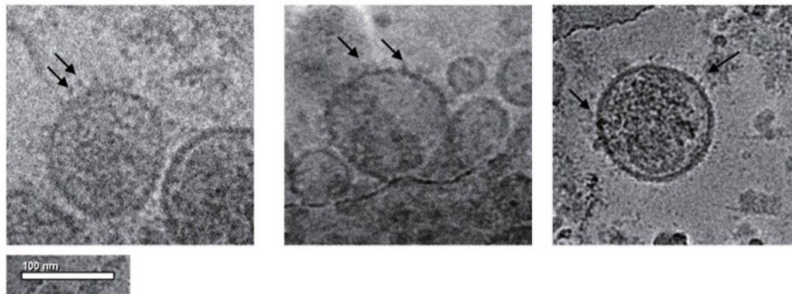
paremtas vakcinas, kadangi didelė vakcinų gamybos kaina dažnai apriboja jų panaudojimą (Huang *et al.*, 2017). Dėl PTM ir disulfidinių tiltelių formavimo trūkumo bei baltymų tirpumo problemų, ši sistema nėra tinkama voką turinčių VLP sintezei (Naskalska ir Pyré, 2015). Nepaisant šios sistemos trūkumų, *E. coli* susintetintos ir sudėtingesnės VLP, kurių formavimuisi reikia daugiau nei vieno tipo struktūrinių baltymų. 2003 metais atliktame tyrime *E. coli* ląstelėse susintetintos infekcinės bursalinės ligos viruso (IBDV, angl. angl. *infectious bursal disease virus*) VLP. IBDV viruso genomui būdingi du segmentai, kurių pirmasis turi du tarpusavyje persidengiančius ORF – pagrindinis ORF koduoja polipeptidą VP2-VP4-VP3. VP4 yra serino proteazė, atliekanti šio polipeptido auto-proteolizę, kurios metu gaunamas išorinis struktūrinis baltymas VP2 bei vidinis struktūrinis baltymas VP3, formuojantys daleles. Tyrimo metu sukonstruota plazmidė tokio polipeptido sintezei *E. coli* bakterijose ir sėkmingai gauta visu trijų baltymų raiška bei suformuotos imunologiškai aktyvios VLP (Rogel *et al.*, 2003). Nors dažniausiai VLP sintezei naudojamos *E. coli* bakterijos, taikomos ir kitos bakterijos, pavyzdžiui, *Lactococcus lactis* bei *Pseudomonas fluorescens* (Phelps *et al.*, 2007; Cortes-Perez *et al.*, 2009).

Dar vienas dažnai VLP gamybai naudojamas organizmas yra mielės. Jos pasižymi greitu augimu, didelėmis sintetinamų baltymų išeigomis, galimybe didinti auginimo apimtis ir nedidele gamybos kaina (Donaldson *et al.*, 2015; Dai *et al.*, 2018). Mielės geba atlikti glikozilinimą, fosforilinimą bei acetilinimą, kurie gali būti svarbūs tam tikrų virusinės kilmės baltymų susirinkimui į VLP (Freivalds *et al.*, 2015). Dažniausiai VLP sintezei naudojamos gerai ištirtos *S. cerevisiae* mielės, tačiau norint gauti didesnes baltymų išeigas tinkamesnės gali būti *Pichia pastoris* mielės. Visgi reikėtų atsižvelgti į tai, kad dažniausiai baltymų sintezei *P. pastoris* mielėse naudojami vektoriai su metanoliu indukuojamais promotoriais. *Hansenula polymorpha* mielėms taip pat būdingas gan aukštas sintezės lygis, tačiau ši sistema nėra taip plačiai ištirta ir naudojama rečiau (Porro *et al.*, 2005). Dažniausiai mielės naudojamos voko neturinčių VLP sintezei, tačiau paruošus mielių sferoplastus galima net ir sudėtingesnių voką turinčių dalelių sintezė. Tokią strategiją pritaikė Sakuragi ir jo kolegos, kurie pademonstravo žmogaus imunodeficito viruso-1 (HIV) kapsidės baltymo formuojamų dalelių atspūrimą iš *S. cerevisiae* sferoplastų (Sakuragi *et al.*, 2002). Mielės panaudotos net 7 iš 12 licencijuotų vakcinų VLP sintezei. Engerix-B® (HBV), Recombivax HB (HBV), Gardasil® ir Gardasil-9® (HPV) vakcinoms naudojamos dalelės gautos *S. cerevisiae* mielėse, o Heplisav-B, Fendrix® ir Hepavax-Gene® (HBV) – *H. polymorpha* mielėse (Qian *et al.*, 2020). Dirbant

su mielių sistemomis gali būti susiduriama su problemomis, tokiomis kaip baltymų hipermanozilinimas, plazmidžių praradimas ir kiek mažesnė sintetinamų baltymų išeiga, palyginti su bakterijomis (Dai *et al.*, 2018). Atlikti tyrimai rodo, kad esant didelėms baltymų išeigoms mielių kultūrose aktyvuojamas streso atsakas, galintis sukelti lėtą ar neteisingą baltymų susilankstymą (Kim ir Kim, 2017).

Kaip ir *E. coli*, vabzdžių ląstelėse susintetinta net apie 28 % VLP. Ši sistema naudojama tiek voko neturinčių, tiek turinčių dalelių sintezei (Dai *et al.*, 2018; Zeltins *et al.*, 2013). Genų integravimui į bakuloviruso genomą naudojamos dvi strategijos: komerciškai prieinama Bac-to-Bac sistema, pagrįsta tikslinio geno Tn7 transpozicija iš pernašos vektoriaus į bakulovirusinį genomą, ir BagMagic™ arba flashBAC™ sistemos, pagrįstos homologine rekombinacija (Jarvis *et al.*, 2009). VLP sintezei dažniausiai naudojamos vabzdžių ląstelių linijos *Spodoptera frugiperda* Sf9 bei Sf21 ir *Trichoplusia ni* Tn5 (Dai *et al.*, 2018; Fernandes *et al.*, 2013). Šiai sistemai būdingos didelės sintetinamų baltymų išeigos, palyginamos su bakterijų ir mielių sistemomis, PTM atlikimas ir gebėjimas sintetinti sudėtingas daugiasluoksnes VLP (Donaldson *et al.*, 2015). *S. frugiperda* vabzdžių ląstelėse sėkmingai susintetintos įvairios daugiasluoksnės voką turinčios VLP: SARS-CoV viruso, Ebola viruso, hepatito C, *Herpes simplex* viruso, gripo A viruso, enteroviruso 71, HIV-1, Čikungunijos viruso, Zika viruso ir begalės kitokių virusų kilmės dalelių (Zeltins *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013). Bakulovirusinės sistemos greitis ir gebėjimas sintetinti sudėtingas VLP paverčia šią sistemą ypatingai tinkamą kurti vakcinas prieš virusus, greitai keičiančius savo paviršinius antigenus, pavyzdžiui, vykstant gripo ar kitų virusų epidemijai (Fuenmayor *et al.*, 2017). Nors vabzdžių ląstelėse atliekamos PTM, jose gaminami glikoproteinai turi kitokius N-glikanus nei žinduolių ląstelėse. Pradinėse stadijose N-glikanų gavimas vabzdžių ir žinduolių ląstelėse vyksta panašiu keliu, tačiau dėl sialiltransferazės, N-acetilgalaktoziltransferazės ir N-galaktoziltransferazės trūkumo vabzdžių ląstelėse, N-glikanai modifikuojami tik iki paucimanozės. Ši problema išspręsta sukuriant sistemą SweetBac, į bakuloviruso genomą integruojant genus, koduojančius N-acetilgliukozaminiltransferazę II ir β-1,4-galaktoziltransferazę. Tokiu būdu gauta sistema, gebanti gaminti žinduoliams būdingus glikoproteinus (Liu *et al.*, 2013; Palmberger *et al.*, 2012). Didžiausias šios sistemos trūkumas yra mėginių tarša bakulovirusinėmis dalelėmis. Dėl papildomų gryninimo etapų poreikio padidėja VLP gamybos kaina bei laikas (Cervera *et al.*, 2019). Norint išvengti užteršimo bakulovirusais naudojamos ir kitos vabzdžių linijos, tokios kaip S2

ląstelės, kilusios iš *Drosophila melanogaster*, rekombinantinių baltymų sintezę atliekant stabilios transformacijos būdu (Zitzmann *et al.*, 2017). Stabiliai transfekuotose *Drosophila* S2 ląstelėse sėkmingai susintetintos HIV-1 VLP, sudarytos iš kapsidės baltymo Gag p55 ir glikoproteino gp120. Tiriant gautas daleles nustatyta, kad jos savo paviršiuje turi apie 17 spyglio formos struktūrų, būdingų laukinio tipo HIV-1 virionams (1.3.2.1 pav.) (Yang *et al.*, 2012).



Pav. 1.3.2.1. *Drosophila melanogaster* S2 ląstelėse gautų HIV-1 VLP elektronų mikrofotografijos (Yang *et al.*, 2012). Rodyklėmis nurodytos iš gp120 glikoproteino susidariusios spyglio formos struktūros. Nurodyta bendra skalė – 100 nm.

Žinduolių ląstelių raiškos sistema taikoma paprastų bei sudėtingų, voką turinčių ir neturinčių VLP sintezei (Fuenmayor *et al.*, 2017; Dai *et al.*, 2018). Ši sistema laikoma pačia efektyviausia rekombinantinių baltymų gamybai, kadangi žinduolių ląstelės atlieka net ir sudėtingas PTM (Naskalska ir Pyrc, 2015). VLP sintezei naudojamos tokios ląstelių linijos kaip Kininio žiurkėno kiaušidžių (CHO, angl. *Chinese hamster ovary*), žiurkėno jauniklio ląstelių 21 linija, HEK-293T ląstelių linija, CAP-T linija, kilusi iš žmogaus amniocitų, bei Vero 9. Kadangi CHO ląstelių linija kilusi ne iš žmogaus ląstelių, ji pasižymi mažesne taršos žmogaus virusais rizika (Fuenmayor *et al.*, 2017). VLP gamyba žinduolių ląstelėse gali būti gaunama tiek trumpalaikės, tiek stabilios transfekcijos būdais. Transfekcijai gali būti naudojami virusiniai vektoriai arba nevirusiniai metodai, skirstomi į cheminius (kalcio fosfatas, katijoniniai lipidai, polimerai) bei fizikinius (elektroporacija, ultragarsas, magnetofekcija) (Kim *et al.*, 2010; Khan, 2013). Žinduolių ląstelės dažnai taikomos žmonių virusų kilmės, pavyzdžiui, visiems gerai žinomo pasaulinę pandemiją sukėlusio SARS-CoV-2 viruso, dalelių gamybai. SARS-CoV-2 VLP gautos atlikus HEK-293T bei Vero E6 ląstelių ko-transfekciją keturiomis plazmidėmis, turinčiomis spyglio, voko, membranos ir nukleokapsidės baltymus koduojančius genus. Nustatyta, kad nors HEK-293T ląstelėse baltymų sekrecija buvo geresnė, Vero E6 ląstelėse gautos stabilesnės dalelės, turinčios vientisesnę morfologiją ir ilgesnes spyglio tipo struktūras. Vero E6

ląstelėse gautų dalelių transmisinės elektronų mikroskopijos (TEM) mikrografijose matoma SARS-CoV-2 virusui būdinga korona-tipo struktūra – spyglių trimerų susidarymas ant voko. Ši tyrėjų grupė pirmi sėkmingai susintetino SARS-CoV-2 VLP žinduolių ląstelėse – būtent tokie tyrimai prisideda prie platesnio suvokimo apie virusus ir gali padėti sukurti naujus gydymo būdus (Xu *et al.*, 2020). Nors žinduolių ląstelės plačiai taikomos įvairių VLP sintezei, tačiau mažos dalelių išeigos, didelė gamybos kaina, ilgas laikas bei taršos žmogaus virusais rizika yra laikomi didžiausiais šios sistemos trūkumais, apribojančiais jų klinikinį panaudojimą (Dai *et al.*, 2018).

1983 metais, atradus *Agrobacterium* genties bakterijų gebėjimą efektyviai pernešti plazmidinę DNR į augalų ląsteles, buvo pradėta transgeninių augalų kūrimo era (Grunewald *et al.*, 2013). Pasitelkus šią technologiją, 1992 metais augaluose susintetintas pirmasis vakcinos kandidatas – hepatito B viruso paviršinis antigenas, gebantis formuoti VLP (Mason *et al.*, 1992). Pirminiai bandymai augaluose susintetinti VLP buvo susiję su idėja sukurti valgomas vakcinas, tačiau vakcinoms būtina tiksli sudėtis ir kontroliuojama dozė, todėl injekcinė vakcinų forma yra tinkamesnė (Rybicki, 2010). Augalų ląstelių sistemai būdinga pakankamai maža baltymų gamybos kaina, eukariotinė PTM sistema, teisingu baltymų sulankstymu ir yra naudojama įvairių VLP gamybai (Chen ir Lai, 2013). Dažniausiai naudojamas transgeninis tabakas, bulvės, kopūstai, pomidorai, taip pat *Nicotiana benthamiana* augalas (Scotti ir Rybicki, 2013). Ši sistema pasižymi galimybe didinti gamybos apimtį, kadangi augalams reikia tik vandens, CO₂, neorganinių maisto medžiagų ir šviesos augimui (Marsian ir Lomonossoff, 2016). Nors augalų ląstelės naudojamos net ir sudėtingesnių bei voką turinčių VLP sintezei, šios sistemos pritaikymas daugiausiai apribotas mažų VLP išeigų. Šis trūkumas gali būti išvengiamas sukuriant stabilias transgeninių augalų linijas, tačiau palyginti su kitomis sistemomis, tai užima daug daugiau laiko (Santi *et al.*, 2006; Chen ir Lai, 2013). Atliekant stabilią transformaciją, tikslinis genas integruojasi atsitiktinai ir nuo to priklauso, kaip efektyviai vyks baltymo sintezė (Burnett ir Burnett, 2020). *N. benthamiana* augale sėkmingai pagamintos hepatito B paviršinio antigeno (HBsAg) VLP – tam panaudotas magnICON augalų virusinis vektorius, kuriuo elektroporacijos būdu transformuotos agrobakterijos ir jomis infilttruotas dviejų mėnesių augalas. Po 10 dienų nuo infekcijos gauta nemaža HBsAg išeiga – 300 µg/g šviežių lapų masės. Jau 11 dieną išeiga pradėjo mažėti, o po 14 dienų buvo stebima pilna lapų nekrozė – tai atskleidžia vieną iš sistemos trūkumų, kai netgi naudojant įvairias antibiotikų kombinacijas nepavyksta apriboti agrobakterijų dauginimosi ir augalas žūsta (Huang *et al.*, 2008).

Atliekant VLP gamybą *in vivo* sunku kontroliuoti aplinkos sąlygas, dalelės gali būti toksiškos ir sutrikdyti normalų ląstelių augimą. Tokiu atveju gali praversti neląstelinės sintezės sistemos, pasižyminčios universalumu ir lengvu apimties didinimu (Rodríguez-Limas *et al.*, 2013). Ši sistema taip pat vadinama ląstelių lizatais – joje nėra ląstelių membranų ir genominės DNR, tačiau yra visi substratai ir biomolekulės, reikalingos rekombinantinių baltymų sintezei (Khambhati *et al.*, 2019). Neląstelinės sistemos leidžia sukurti optimalias sąlygas dalelių sintezei, tokias kaip joninė jėga, pH ir/arba redokso potencialas (Bundy *et al.*, 2008). Kontroliuojant redokso potencialą neląstelinėje sistemoje, kilusioje iš *E. coli*, gautos HBV VLP su net 95 % susiformavusių disulfidinių ryšių (Bundy ir Swartz, 2011). Iš *S. cerevisiae* kilusi neląstelinė sistema pritaikyta HPV L1 VLP sintezei, *P. pastoris* mielių – HBV VLP, *E. coli* – žmogaus noroviruso VLP, kviečių gemalo ekstrakto – hepatito B ir C, žmogaus ir beždžionių imunodeficitu virusų VLP, tabako ląstelių lizatas (BY-2) – HBV VLP sintezei (Spice *et al.*, 2020; Armero-Gimenez *et al.*, 2023). Nors naudojant neląstelines sistemas gaunamos didelės VLP išeigos ir išvengiama mėginių tarša ląstelinių komponentais, šiai sistemai būdinga didelė baltymų gamybos kaina ir ribotas pritaikomumas sudėtingesnėms VLP gauti. Nepaisant šios sistemos trūkumų, ji sėkmingai pritaikyta dviejų VLP vakcinų Inflexal (gripo vakcina) ir Epaxal (hepatito A vakcinai) gamybai (Nooraei *et al.*, 2021; Gupta *et al.*, 2023). Atlikti tyrimai rodo, kad tinkamos sintezės sistemos pasirinkimas yra svarbus etapas VLP kūrime, todėl atliekant virusinės kilmės dalelių gamybą svarbu įvertinti visas pasirinktos sistemos galimybes ir apribojimus.

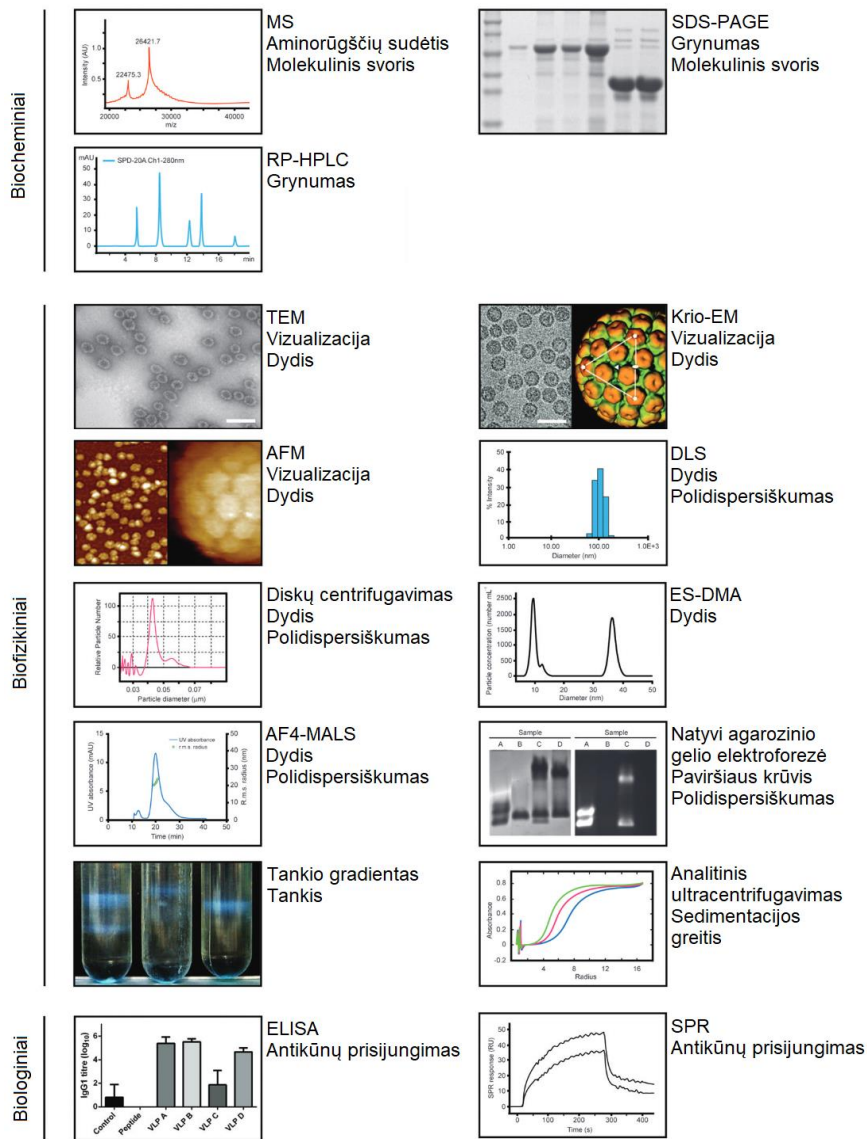
1.3.3. Gryninimo ir charakterizavimo metodai

Tolimesniam dalelių pritaikymui būtinas ląstelės šeiminingų komponentų ir auginimo terpės priemaišų pašalinimas, atliekamas dalelių gryninimo metu. Gryninimo metodai turi būti efektyvūs, taupūs, pasižymintys galimybe didinti gryninimo apimtį ir pageidautina pritaikomi įvairių VLP gryninimui (Vicente *et al.*, 2011). Ląstelių suardymas yra svarbus gryninimo etapas, tačiau šis žingsnis ne visada būtinas, kadangi dauguma žinduolių ir vabzdžių ląstelių užtikrina VLP sekreciją į terpę. Bakterijų, mielių ir augalų ląstelių suardymui reikalingas stiprus mechaninis poveikis, atliekamas ultragarsu, veikiant fermentais, abrazyviomis medžiagomis (aliuminio oksidu ar stiklo rutuliukais), naudojant šaldymo/šildymo ciklus ar aukšto slėgio homogenizatorius (angl. *French press*). Siekiant nustatyti optimalų būdą bei išlaikyti dalelių integralumą, VLP gryninimui taikomi skirtingi ardymo

metodai bei tirpalai (Zeltins, 2013). Po ląstelių suardymo ir netirpių komponentų pašalinimo, dalelių gryninimui naudojami metodai, originaliai pritaikyti natyviems virusams – dalelės gryninamos priklausomai nuo savo dydžio ir tankio, pavyzdžiui, naudojant ultracentrifugavimą per sacharozės ar/ir CsCl gradientus (Vicente *et al.*, 2011). Kadangi ultracentrifugavimo metodai nėra pritaikomi dideliems kiekiams ir reikalauja daug darbo, o CsCl yra toksiškas ir gali sukelti dalelių deformaciją, VLP gryninimui vis plačiau taikomi chromatografiniai metodai (Burova ir Ioffe, 2005). Iš pradžių lizatas nuskaidrinamas taikant lėtą centrifugavimą ar tangentinio srauto filtravimą, o tada atliekamas gryninimas naudojant jonų mainų, giminingumo ar dydžių išskyrimo chromatografiją (Morenweiser, 2005).

Išgryninus daleles, atliekamas jų charakterizavimas. Struktūrinė ir funkcinė VLP įvairovė nustatoma taikant įvairius biocheminius, biofizikinius bei biologinius metodus (1.3.3.1 pav.) (Lua *et al.*, 2014). Charakterizuojant VLP nustatoma aminorūgščių sudėtis, molekulinis svoris bei grynumas. Masių spektrometrija (MS) yra nepakeičiamas įrankis analizuojant baltymų sekas, suteikiantis informacijos apie tiriamojo baltymo molekulinę masę bei aminorūgščių sudėtį. Šis metodas naudingas proteolitiniuose bei PTM tyrimuose. Tiriant VLP, sukurtas iš bulvių viruso Y kapsidės baltymo su N gale įterptu HBV viruso epitopu (preS1), nustatyta, kad sintetinamas keliais kilodaltonais (nuo 29,9 kDa iki 26,4 kDa) sutrumpėjęs kapsidės baltymas. Nepaisant proteolitinių procesų, dalelės sukėlė stiprų imuninį atsaką pelėse (Kalnciema *et al.*, 2012). Naudojant MS bei denatūruojančios natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezės (SDS-PAGE) metodus, pirmą kartą nustatyta, kad *P. pastoris* mielėse atliekamas hepatito B šerdies baltymo fosforilinimas (Freivalds *et al.*, 2011). Baltymo grynumo analizė dažniausiai atliekama naudojant SDS-PAGE bei atvirkščių fazių didelio efektyvumo skysčių chromatografiją (RP-HPLC, angl. *reversed-phase high performance liquid chromatography*). RP-HPLC pritaikyta stebėti HPV-16 VLP, konkrečiau daleles formuojančio L1 baltymo kiekį lizate bei išgrynintame preparate. Autoriai teigia sukūrę greitą (apie 20 min. trunkantį) ir patikimą metodą (Peruri *et al.*, 2024). SDS-PAGE metodas kartu su imunobloto analize naudingi tiriant VLP, sudarytas iš kelių kapsidės baltymų. Bright ir jo kolegos tyrė gripo viruso H3N2 VLP, sudarytas iš hemagliutinino (HA), neuraminidazės (NA) ir matrikso (M1) baltymų. Po gryninimo sacharozės tankio gradientu gautos frakcijos tirtos imunobloto metodu, naudojant specifinius antikūnus, ir patvirtinta visų trijų baltymų sintezė bei HA ir NA glikozilinimas (Bright *et al.*, 2007). Natyvi agarozinio gelio elektroforezė naudojama analizuoti nukleorūgščių įkapsuliavimui į VLP –

tiriant mėginius paveiktus ir nepaveiktus DNaze I, patvirtintas į infekcinės poodinės ir hematopoetinės nekrozės virusą (angl. *infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus*) panašių dalelių įkapsuliavimas artimo genomui dydžio (3,9 kb) dgDNR (Weerachatyanukul *et al.*, 2022).



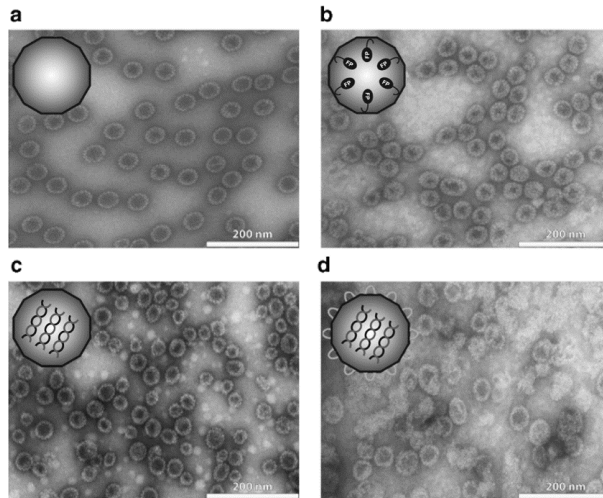
Pav. 1.3.3.1. VLP biocheminių, biofizikinių bei biologinių savybių nustatymui naudojami metodai (modifikuota pagal Lua *et al.*, 2013).

Informacija apie VLP morfologiją ir kitas savybes gali būti gaunama atliekant analitinį ultracentrifugavimą (AUC) bei ultracentrifugavimą tankio gradientu. AUC suteikia informacijos apie molekulinį svorį, konformaciją ir

heterogeniškumą, o ultracentrifugavimas tankio gradientu suteikia informaciją apie dalelių tankį. VLP formavimuisi patvirtinti šie metodai kombinuojami kartu su TEM (Lua *et al.*, 2013). Nors TEM yra pakankamai paprastas ir greitas metodas, tačiau mėginio paruošimo metu dėl naudojamų reagentų gali būti sukelta dalelių deformacija ir suteikiama klaidinga informacija apie dalelių dydį (Nooraei *et al.*, 2021). Kaip alternatyva gali būti naudojama krio-EM ir atominės jėgos mikroskopija (AFM, angl. *atomic force microscopy*). Ruošiant mėginius krio-EM ir AFM analizei, atliekamas staigus užšaldymas, todėl sumažėja dalelių deformacijos tikimybė (Lua *et al.*, 2013). Šie metodai taikyti charakterizuojant HPV (Zhao *et al.*, 2014; Patel *et al.*, 2009), SARS-CoV-2 (Sullivan *et al.*, 2022; Gourdelier *et al.*, 2022) ir HBV VLP (Oropesa *et al.*, 2013; Spice *et al.*, 2020).

Biofizikinių VLP savybių charakterizavimui naudojami tokie metodai kaip dinaminė šviesos sklaida (DLS, angl. *dynamic light scattering*), diskų centrifugavimo analizė, elektropurškiamoji diferencialinio mobilumo analizė (ES-DMA, angl. *electrospray differential mobility analysis*) bei asimetrinio srauto lauko-srauto frakcionavimas kombinuotas su daugiakampe šviesos sklaida (AF4-MALS, angl. *asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multiple-angle light scattering*). DLS yra paprastas ir greitas metodas, kurio metu gaunami duomenys apie vidutinį dalelių dydį tirpale. Taip pat, kadangi šis metodas itin jautrus didelių, gerai šviesą išsklaidančių dalelių nustatymui, jis tinkamas stebėti agregatų susidarymą (Lua *et al.*, 2014). Kombinuojant TEM su ES-DMA bei AF4 tirtos 4 tipų pelių poliomaviruso VLP: a) tuščios, b) su viduje supakuotais peptidais (glutathiono-S-transferaze, S ir His žymėmis), c) su viduje supakuota genomine DNR ir d) su išorėje pateiktais gripo viruso HA fragmentais bei viduje supakuota genomine DNR. TEM analizė pademonstravo, kad tuščios dalelės yra ne sferiškos, o labiau primena elipsoidus. Galimai tokia forma dalelėms būdinga dėl deformacijos, įvykusios dėl viruso genetinės medžiagos trūkumo arba mėginio paruošimo proceso (1.3.3.2 pav. a). Dalelės su viduje supakuotais peptidais buvo keliais nm didesnės (1.3.3.2 pav. b). VLP su viduje supakuota genomine DNR buvo keliais nm mažesnės, galimai dėl vykstančios elektrostatinės sąveikos tarp kapsidės baltymo N galo ir DNR (1.3.3.2 pav. c). Kaip ir buvo tikimasi, gripo viruso HA fragmentais dekoruotų VLP dydis buvo kiek didesnis, kadangi HA fragmentai turėtų išsikišti iš išorinio VLP paviršiaus (1.3.3.2 pav. d). Nors TEM suteikia informacijos apie dalelių morfologiją ir leidžia jas vizualizuoti, tačiau šis metodas yra brangus ir norint įvertinti dalelių dydžio pasiskirstymą mėginyje reiktų skirti daug laiko. Tokiu atveju ES-DMA ir AF4-MALS metodai yra tinkamesni – per 1 valandą įvertintas net 10^5 dalelių kiekis. Šiais

metodais nustatytas dalelių dydis ir jų pokytis sutapo su TEM gautais rezultatais ir leido atlikti greitą dalelių dydžio pasiskirstymo analizę (Pease *et al.*, 2009).

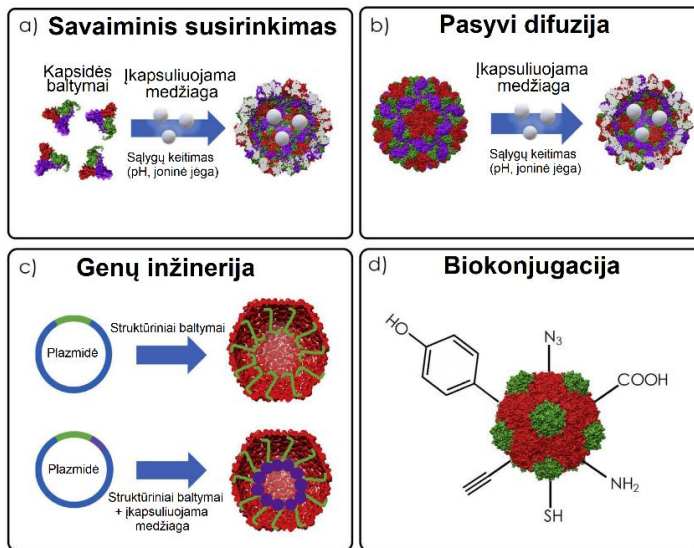


Pav. 1.3.3.2. Skirtingų pelių poliomaviruso VLP variantų TEM analizė (modifikuota pagal Pease *et al.*, 2009). (a) Tuščios dalelės, b) dalelės su viduje supakuotais svetimais peptidais, c) dalelės su viduje supakuota genomine DNR ir d) dalelės su išorėje pateiktais gripo viruso HA fragmentais ir viduje supakuota genomine DNR. Nurodyta skalė – 200 nm.

Biologinis VLP charakterizavimas dažniausiai atliekamas tiriant VLP prisijungimą prie žinomų antikūnų. VLP tyrimuose dažnai naudojami tokie metodai kaip su imunofermentinės analizės metodas (ELISA, angl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), taškinio imunobloto (angl. *dot blot*), imuninio nusodinimo, imuninės difuzijos metodai bei paviršiaus plazmonų rezonansas (Lua *et al.*, 2013). ELISA metodas pritaikytas tiriant SARS-CoV2 ir HPV-16 VLP, panaudojant šias daleles kaip antigenus, siekiant sukurti *in vitro* diagnostinius prietaisus antikūnų nustatymui žmonių serumų mėginiuose (Hirschberg *et al.*, 2022; Kirnbauer *et al.*, 1994). Žmogaus poliomaviruso BK VLP antigeniškumui įvertinti pritaikytas taškinio imunobloto metodas: nustatyta, kad natyvios VLP sąveikauja su žmogaus ir triušio antikūnais, o SDS denatūruotos dalelės su sąveikauja prastai – galimai skiriasi natyvių ir denatūruotų VLP antigeniniai epitopai (Li *et al.*, 2003). 2021 metais sukurtas paviršiaus plazmonų rezonanso biosensorius, paremtas hepatito A kapsidės baltymu VP1, leidžiantis aptikti antikūnus prieš hepatitą A (Santos *et al.*, 2021). Minėti charakterizavimo metodai padeda nustatyti VLP savybes, stabilumą ir įvertinti tolimesnį jų pritaikymą.

1.3.4. Dalelių funkcionalizavimas

Natūralus virusų kroviny yra jų genomai, t. y. nukleorūgštys, tačiau VLP yra lankstūs ir universalūs įrankiai, leidžiantys įkapsuliuoti ir pernešti įvairias molekules. Įkapsuliuojamos molekulės gali būti tiek biologinės kilmės (nukleorūgštys ar baltymai), tiek sintetinės kilmės (chemoterapiniai vaistai). Molekulių patalpinimui į VLP vidų arba jų pateikimui dalelių išorėje taikomi skirtingi metodai, tokie kaip savaiminis kapsidžių susirinkimas, pasyvi difuzija, genų inžinerija bei biokonjugacija (1.3.4.1 pav.) (Chung *et al.*, 2020).



Pav. 1.3.4.1. Metodai, naudojami molekulių patalpinimui į VLP vidų arba jų pateikimui ant išorinio paviršiaus (modifikuota pagal Chung *et al.*, 2020). (a) Savaiminis kapsidės formavimasis iš kapsidės baltymų, atliekamas keičiant buferinio tirpalo sąlygas; (b) pasyvi difuzija per kapsidėje esančias poras, taip pat atliekama keičiant buferinio tirpalo sąlygas; (c) baltyminio krovinio konjugavimas su struktūriniais virusiniais baltymais genų inžinerijos būdu ir (d) biokonjugacija, atliekama per dalelių paviršiuje esančias aktyvias aminorūgščių grupes.

Virusai savo genetinę medžiagą supakuoja vykstant savaiminiam virionų formavimuisi iš kapsidės baltymų. Panaudojus šią savybę į VLP galima supakuoti įvairias molekules. Pradžioje, keičiant buferinio tirpalo sąlygas (pH, joninę jėgą) atliekamas kapsidės struktūros suardymas, o tada – atgalinis kapsidės formavimas su įkapsuliuojama medžiaga. Kininės pupuolės chlorotinės demėtligės viruso (CCMV, angl. *cowpea chlorotic mottle virus*) kapsidės praranda integralumą ir atpalaiduoja savo RNR genomą esant fiziologiniam pH (>7) ir aukštai joninei jėgai (1 M). Pakeitus buferinio tirpalo pH į 3–6 ir sumažinus joninę jėgą (0,1 M), sukeliamas atgalinis kapsidės formavimasis (1.3.4.1 pav. a) (Lavelle *et al.*, 2007). Naudojant šį metodą

atliktas CpG sintetinių oligodeoksinukleotidų įkapsuliavimas į CCMV VLP, kuris pagerino oligodeoksinukleotidų efektyvumą, sulėtino naviko augimą ir prailgino pelių išgyvenamumą (Cai *et al.*, 2020). VLP disociacija taip pat gali būti atliekama pridėjus redukuojančių ar denatūruojančių medžiagų. Bakteriofago Qβ ir PP7 VLP suardomos buferiniame tirpale, sudarytame iš 20 mM Tris-HCl, 6 M karbamido, 50 mM NaCl ir 10 mM DTT, o atgalinis kapsidės formavimasis inicijuojamas dializės būdu, pakeičiant buferinį tirpalą į 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) su 50 mM NaCl. Tokiu būdu į Qβ ir PP7 VLP įkapsuliuotas mažas ultravioletinėje šviesoje raudonai fluorescuojantis baltymas (angl. *small-ultrared fluorescent protein*). Gautos dalelės pasižymėjo natyviu virusui būdingu dydžiu bei morfologija. Dalelės lengvai vizualizuotos pelių odoje – šie rezultatai rodo potencialą kuriant VLP sekimo audiniuose sistemas (Herbert *et al.*, 2020). Sėkmingas įkapsuliavimas priklauso nuo įkapsuliuojamos medžiagos dydžio ir paviršiaus krūvio, elektrostatiinių sąveikų, hidrofobiškumo ir kitų sąveikų, susidarančių formuojantis dalelėms (Chung *et al.*, 2020). Dalelių įkapsuliavimas taip pat gali būti atliekamas remiantis elektrostatinėmis sąveikomis, susidarančiomis tarp teigiamai įkrauto kapsidžių vidinio paviršiaus ir neigiamai įkrauto krovinių, imituojančio neigiamai įkrautas nukleorūgštis (Aanei *et al.*, 2018).

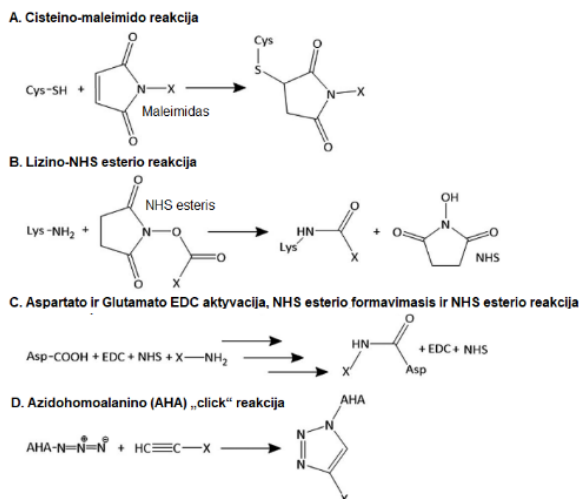
Daugumai VLP yra būdinga porėta struktūra, leidžianti atlikti mažų molekulių įkapsuliavimą į jų vidinę ertmę pasyvios difuzijos būdu (Qian *et al.*, 2020). Nustatyta, kad raudonųjų dobilų nekrozinio mozaikos viruso (RCNMV, angl. *red clover necrotic mosaic virus*) virionų paviršiuje yra $390 \pm 30 \text{ Ca}^{2+}$ jonų, o viduje – $420 \pm 25 \text{ Mg}^{2+}$ jonų. Šių jonų pašalinimas pridėjus etilendiaminotetraacto rūgšties (EDTA) lemia struktūrinius pokyčius, kurių metu susiformuoja 11–13 Å skersmens poros, užsiveriančios į tirpalą atgal pridėjus Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonų (1.3.4.1 pav. b) (Sherman *et al.*, 2006). Remiantis šia savybe, doksorubicinas įkapsuliuotas į RCNMV VLP, konjuguotass su į CD46 nukreipiančiu peptidu – dalelės pateko į HeLa ląsteles ir sukėlė reikšmingą citotoksiškumą ląstelėms (Lockney *et al.*, 2011). Be pasyvaus ir nespecifinio įkapsuliavimo, įkapsuliavimas gali būti atliekamas pasitelkus specifines sąveikas – į MS2 bakteriofago VLP norimą medžiagą galima patalpinti ją konjuguojant su 19 nt ilgio RNR stiebo-kilpos struktūra. Šios kilpos dideliu afiniškumu jungiasi prie kapsidės baltymų, vykstant elektrostatinėms sąveikoms. Tokiu būdu į MS2 sėkmingai supakuoti kvantiniai taškai, chemoterapiniai vaistai (doksorubicinas, cisplatina, 5-fluoruracilas) bei ricino toksino A grandinės (Ashley *et al.*, 2011).

Didžioji dalis struktūrinių VLP baltymų geba formuoti daleles net ir tada, kai jie suliejami su svetimais baltymais ar peptidais. Šis procesas leidžia

tiesiogiai prijungti pernešamą medžiagą prie struktūrinių baltymų ir jį pateikti dalelės išorėje arba viduje (He *et al.*, 2022). Pernešamą medžiagą koduojanti seka įterpiama į kapsidės baltymo seką genų inžinerijos būdu, leidžiančiu kontroliuoti įkapsuliuojamos medžiagos kiekį (Chung *et al.*, 2020). Taikant tokį metodą BTV VLP įkapsuliuotos 41 kDa dydžio *Herpes simplex* viruso 1 timidino kinazės (HSV1-TK) fermentu – BTV viruso vidinio kapsidės baltymo VP3 N-galas sulietas su HSV1-TK (1.3.4.1 pav. c). HSV1-TK verčia provaistą ganciklovirą į jo monofosfatinį variantą, kuris toliau endogeninių kinazių konvertuojamas į trifosfatą. Gancikloviro trifosfatas yra atpažįstamas DNR polimerazių, lemia grandinės terminaciją, sulaiko DNR replikaciją, taip paskatinant ląstelių, sintetinančių HSV1-TK, apoptozę. BTV VLP, įkapsuliuotos HSV1-TK, sėkmingai pateko į glioblastomos ląsteles ir esant ganciklovirui efektyviai jas žudė. Jos sugebėjo išeiti iš endosomų ir leido HSV1-TK pasiekti citozolinį ATP, reikalingą gancikloviro fosforilnimui (Thuenemann *et al.*, 2021).

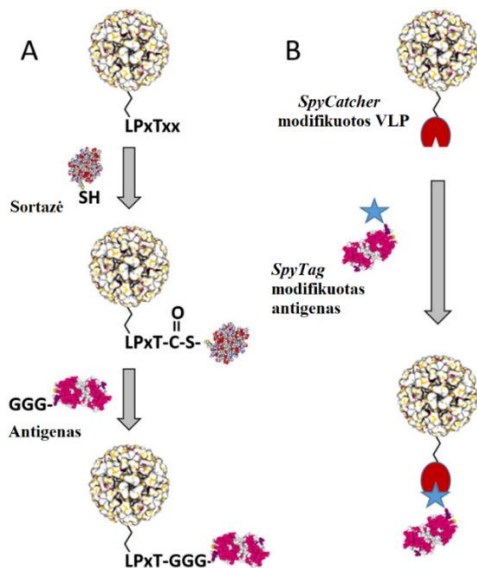
Baltymai ar peptidai prie VLP gali būti prijungiami pasitelkus chemines reakcijas arba kitaip vadinamą biokonjugaciją. Tam panaudojamos virusiniuose baltymuose esančios amino, sulfhidrilo, karboksilo ir kitos funkcinės grupės (1.3.4.1 pav. d) (Balke ir Zeltins, 2019). Cisteino sulfhidrilo grupė panaudojama atliekant reakcijas su maleimido junginiais, kurie esant pH 6,5–7,5 lengvai ir negrįžtamai formuoja tioeterinius ryšius su cisteino liekanomis (1.3.4.2 pav. A) (Rohovie *et al.*, 2017). Šis metodas pritaikytas bakteriofago P22 VLP modifikavimui. Pradžioje į P22 VLP išorėje esančią kilpą įterptas cisteinas, tada tokios dalelės paveiktos 2-(4'-maleimidil-anilin)naftaleno-6-sulfonine rūgštimi (MIANS), naudojama kaip fluorescencinis žymuo. Laisva MIANS turi labai žemą arba jokios fluorescencijos, tuo tarpu kovalentiškai ją prijungus prie laisvos sulfhidrilo grupės, MIANS fluorescencija stipriai padidėja (Kang *et al.*, 2008). Kita dažnai biokonjugacijai naudojama aminorūgštis yra lizinas. Pradžioje prie n-hidroksisukcinimido (NHS) esteriniu ryšiu prijungiamas norimas ligandas, o tada šis junginys reaguoja su lizino amino grupe ir sudaro amidinį ryšį atpalaiduojant patį NHS (1.3.4.2 pav. B) (Rohovie *et al.*, 2017). Šiuo būdu prie CCMV VLP prijungti du skirtingi ligandai: biotinas ir digoksigeninas. Gautos dalelės disocijuotos, mėginiai sumaišyti tarpusavyje skirtingais santykiais ir inicijuotas atgalinis dalelių formavimasis – tokiu būdu gautos dalelės, turinčios tiek biotiną, tiek digoksigeniną. Modifikuotos CCMV VLP išgrynintos naudojant streptavidino agarozę, o abiejų ligandų buvimas dalelėse patvirtintas atlikus imunobloto analizę. Toks metodas leido gauti daleles su dviem skirtingais ligandais bei kontroliuoti jų kiekį (Gillitzer *et al.*,

2006). Rečiau naudojamų karboksilinių aminorūgščių aspartato ir glutamato reakcijoms reikalingi keli etapai: pradžioje karboksilinė aminorūgštis aktyvuojama naudojant 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimido hidrochloridą (EDC), po aktyvacijos vyksta reakcija su NHS ir suformuojamas esteris. Kai karboksilinės aminorūgšties šoninė grandinė tampa NHS esteriu, pridodamas norimas prijungti ligandas su pirminio amino grupe ir suformuojamas stabilus amidinis ryšys (1.3.4.2 pav. C) (Rohovie *et al.*, 2017). Ši strategija panaudota fluorescencinio žymens eozino kadaverino pateikimui ant CCMV VLP. Modifikuotos dalelės buvo didesnės (32 nm), palyginti su nemodifikuotomis VLP (25 nm) (Gillitzer *et al.*, 2002). Be natūralių aminorūgščių, VLP modifikacijai taikomos ir nenatūralios aminorūgštys – į kapsidės baltymus gali būti įterpiamas azidohomoalaninas (AHA). AHA įterpimas atliekamas globalaus metionino pakeitimo metodu. Kadangi AHA labai panašus į metioniną, esant metionino trūkumui kartu su AUG kodonu įterpiamas AHA. AHA turi azidinę grupę, dalyvaujančią vario(I) katalizuojamame azido-alkino ciklo-prijungime, ar kitaip vadinamoje *click* reakcijoje, kurios metu suformuojami kovalentiniai triazolo žiedai su alkiną turinčiais ligandais (1.3.4.2 pav. D) (Rohovie *et al.*, 2017). *Click* reakcijos metodas pritaikytas folio rūgšties-polietilenglikolio (PEG) konjugato bei prie intergrino prisijungiančio RGD peptido (Arg-Gly-Asp) pateikimui ant kininės pupuolės mozaikos viruso (CPMV, angl. *cowpea mosaic virus*) VLP (Destito *et al.*, 2007; Hovlid *et al.*, 2012).



Pav. 1.3.4.2. VLP funkcionalizavimui naudojamos biokonjugacijos reakcijos (modifikuota pagal Rohovie *et al.*, 2017). (A) Cisteino-maleimido reakcija, (B) lizino-NHS esterio reakcija, kurios metu papildomai susidaro NHS, (C) aspartato/glutamato EDC aktyvacija, NHS esterio formavimasis ir NHS-esterio reakcija, (D) azidohomoalanino (AHA) *click* reakcija. X pažymėtas norimas prijungti krovinsys ar ligandas.

Taip pat svarbu paminėti ir du naujausius VLP modifikacijos metodus, paremtus transpeptidazės ir izopeptidazės reakcijomis (1.3.4.3 pav.). Amidinio ryšio formavimui tarp VLP ir norimo prijungti peptido gali būti panaudojama bakterinė transpeptidazė sortazė A (1.3.4.3 pav. A) (Antos *et al.*, 2016; Thérien *et al.*, 2017). *SpyCatcher* sistemoje, kilusioje iš *Streptococcus pyogenes* bakterijų, naudojami peptidai, spontaniškai formuojantys izopeptidinius ryšius. *SpyTag* konjuguoti antigenai formuoja kovalentinius ryšius su *SpyCatcher* modifikuotomis VLP (1.3.4.3 pav. B) (Reddington ir Howarth, 2015; Brune *et al.*, 2016).



Pav. 1.3.4.3. Fermentiniai metodai, naudojami antígeno-VLP konjugatų sintezei (modifikuota pagal Balke ir Zeltins, 2019). (A) Sortazė A paremta VLP ir antígeno sujungimo sistema, (B) *Spy-Catcher* sistema, naudojama su *SpyTag* konjuguoto antígeno kovalentiniam prijungimui prie VLP, turinčioms *SpyCatcher* domeną. L pažymėtas leucinas, P – prolinas, T – treoninas, G – glicinas, X – bet kokia aminorūgštis.

Naujų funkcionalizavimo metodų atradimas bei esamų metodų pritaikymas ne tik leidžia įgyti naujų žinių apie VLP, bet ir praplečia jų pritaikymo galimybes.

1.4. Į virusus panašių dalelių panaudojimas

VLP yra sudarytos iš virusinių struktūrinių baltymų, atkartojančių natyvių virusų struktūrą ir antigenines savybes, tačiau jos neturi genetinės informacijos. Dėl joms būdingo 20–150 nm dydžio ir didelio paviršiaus ploto, VLP priskiriamos nanodalelėms (Yan *et al.*, 2015). Palyginti su kitomis nanodalelėmis, VLP turi kelis privalumus: a) jos gali būti

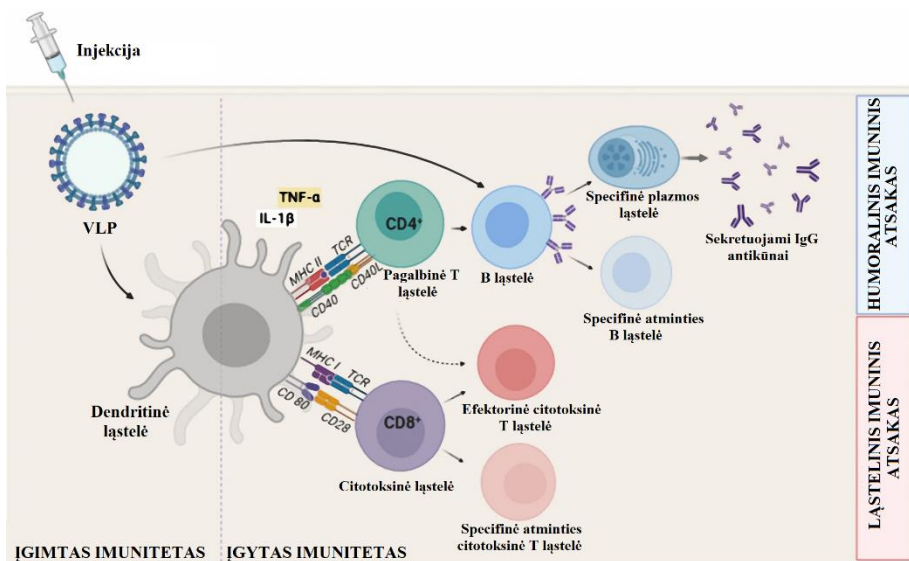
funkcionalizuojamos taip, kad ant jų vidinio ar išorinio paviršiaus būtų pateikti norimi baltymai, leidžiantys atlikti tikslinę vaistų pernašą ir sumažinti nenorimus šalutinius poveikius, b) VLP suteikia stabilią aplinką kroviniui, apsaugo jį nuo degradacijos bei leidžia kontroliuoti jo atpalaidavimą. Taip pat, kadangi VLP yra struktūriškai panašios į natyvius virusus, joms būdingos imunomoduliacinės savybės. Galiausiai VLP laikomos biologiškai suderinamomis ir gerai toleruojamomis organizmo. Dėl šių unikalių savybių ir privalumų VLP plačiai taikomos kuriant vakcinas ir įvairias nanodalelėmis paremtas pernašos sistemas (Taghizadeh *et al.*, 2024).

1.4.1. Vakcinų kūrimas

Didžioji dauguma profilaktinių virusinių vakcinų sudarytos iš susilpnintų ar inaktyvuotų virusų. Nors susilpnintų virusų vakcinas gerai imituoja virusinę infekciją ir sukelia stiprų B ir T ląstelių atsaką, tačiau teoriškai jos vis dar yra laikomos „gyvomis“ ir išlieka tikimybė, kad įvyks grįžimas į patogeninę formą. Inaktyvuotų virusų vakcinas yra saugesnės ir stabilesnės bei sukelia stiprų B ląstelių ir antikūnų atsaką. Tačiau, nesugebėdamos infekuoti šeimininkės ląstelių, šios vakcinas dažnai nesukelia pakankamo T ląstelių atsako. Taip pat inaktyvinimo procesas gali lemti pokyčius epitopų struktūroje (Kozak ir Hu, 2023). Naujos kartos vakcinas yra saugesnės, nes vietoj virusų naudojami baltyminiai subvienetai, DNR/RNR ar VLP. Subvienetinės vakcinas yra sudarytos iš išgrynintų virusinių baltymų, veikiančių kaip antigenai, tačiau jie nesukelia infekcijos, todėl šios vakcinas yra laikomos saugiomis. Pagrindinis jų trūkumas yra tas, kad dažnai sukeliamas tik antikūnų atsakas, o norint sukelti ir ląstelinį atsaką reikalingi adjuvantai (Apostolopoulou ir Chavda, 2024). DNR ir RNR vakcinose naudojama viruso genetinė medžiaga, kurią įterpus į ląsteles susintetinamas numatytas kiekis patogeno, kuris sukelia imuninį atsaką. Šios vakcinas sukelia tiek B, tiek T ląstelių atsaką ir yra lengvai modifikuojamos. Tačiau RNR vakcinų saugojimui ir transportavimui reikalinga žema temperatūra, RNR gali sukelti interferonų atsaką, o naudojant DNR vakcinas kyla rizika dėl integravimosi į genomą (Leitner *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2021). VLP vakcinas yra laikomos saugiomis, kadangi jos neturi virusinio genomo ir negali sukelti infekcijos. Kadangi VLP imituoja natyvaus viruso struktūrą, jos sukelia stiprų imuninį atsaką prieš antigenus, pateiktus jų paviršiuje. Šios dalelės gali būti chemiškai arba genetiškai modifikuojamos ir gali pasižymėti geresniu funkcionalumu, monodispersiškumu ir stabilumu (Kyriakidis *et al.*, 2021; Tariq *et al.*, 2022).

Dėl VLP privalumų, palyginti su kitų tipų vakcinomis, pastaraisiais metais susidomėjimas VLP technologija stipriai išaugo (Fuenmayor *et al.*, 2017).

VLP geba aktyvuoti tiek humoralinį, tiek ląstelinį imuninius atsakus (1.4.1.1 pav.). Dendritinės ląstelės, vienos iš antigeną pateikiančių ląstelių, su VLP sąveikauja per motyvų atpažinimo receptorius (angl. *pattern recognition receptors*), tokius kaip toll-tipo (TLR, angl. *toll-like*) ar C-tipo lektino receptorius, ir perneša VLP į antrinius limfoidinius audinius, pavyzdžiui, blužnį. Taip inicijuojamas dendritinių ląstelių brendimas, kuris paskatina pro-uždegiminių faktorių, tokių kaip naviko nekrozės faktoriaus α ir interleukino 8, gamybą. Pro-uždegiminiai faktoriai pritraukia daugiau antigeną pateikiančių ląstelių ir suaktyvina lizosominės proteolizės procesą dendritinėse ląstelėse. Tai lemia VLP pagrindu sukurtos vakcinos apdorojimą iki mažų peptidų, kurie suformuoja pagrindinio audinių suderinamumo komplekso (MHC, angl. *major histocompatibility complex*) ir peptido kompleksus ant dendritinės ląstelės paviršiaus. Tuo pačiu metu ant dendritinių ląstelių paviršiaus atsiranda limfocitų ko-stimuliacinės molekulės, pavyzdžiui, CD80 ir CD86, aktyvuojančios B ir T ląsteles. II klasės MHC-peptido kompleksas ir ko-stimuliacinės molekulės aktyvuoja CD4+ T pagalbines ląsteles, kurios sąveikauja su B ląstelėmis ir skatina IgG antikūnų sekreciją plazmos ląstelėmis bei atminties B ląstelių gamybą – taip sukeliamas humoralinis ląstelinis atsakas. Tam tikrais atvejais B ląstelės gali atpažinti VLP ir tiesiogiai aktyvuoti humoralinį imunitetą, nepriklausomai nuo įgyto imuniteto ar T pagalbinių ląstelių. Ląstelinis imuninio atsako sužadinimas vyksta susidarant I klasės MHC-peptido kompleksui, aktyvuojančiam CD8+ citotoksines T ląsteles, kurios proliferuoja ir diferencijuojasi į efektorinius bei atminties citotoksinius T limfocitus (Nooraei *et al.*, 2021).



Pav. 1.4.1.1. VLP vakcinos sukeliama įgyto imuninio atsako schema (modifikuota pagal Nooraei *et al.*, 2021). Po vakcinos injekcijos, VLP yra fagocituojamos antigeną pateikiančių ląstelių, tokių kaip dendritinės ląstelės. Tada VLP yra apdorojamos ir pateikiamos MHC-II ir MHC-I, kad būtų atpažįstamos atitinkamai $CD4^+$ ir $CD8^+$ T ląstelių. Humoralinio atsako sužaidinimui B ląstelės sąveikauja su $CD4^+$ T pagalbinėmis ląstelėmis, kad VLP būtų paimamos B ląstelių receptorių. Esant sąveikai tarp $CD4^+$ T pagalbinių ląstelių ir B ląstelių inicijuojama IgG antikūnų sekrecija plazmos ląstelėmis ir atminties B ląstelių gamyba. Ląstelinio imuniteto sužaidinimui nebrandūs $CD8^+$ citotoksiniai T limfocitai proliferuoja ir diferencijuojama į efektorines ir specifines atminties citotoksines T ląsteles. Efektorinės $CD4^+$ T pagalbinės ląstelės paskatina antigeno pateikimą antigeną pateikiančiomis ląstelėmis sekretuodamos citokinus ir padėdamos aktyvuoti citotoksiniams T ląstelėms.

Šiuo metu rinkoje galima rasti 17 licencijuotų vakcinų, sukurtų VLP pagrindu: Heptavax-B, Engerix-B, Recombivax HB, PreHevbrio, Heplisav-B, Fendrix ir Hepavax-Gene vakcinos, suteikiančios imunitetą prieš hepatito B virusą, Gardasil, Cervavax, Gardasil-9, Cocolin ir Walrinvax – prieš žmogaus papilomos virusą, Hecolin prieš hepatito E virusą, Flublok trivalentė ir keturvalentė vakcinos prieš gripo virusą ir tik prieš porą metų rinkoje atsiradusios Nuvaxovid ir Covifenz vakcinos prieš SARS-CoV-2 (1.4.1 lentelė). Daugybė kitų VLP pagrindu sukurtų vakcinų tiriamos įvairiose ikiklinikinėse bei klinikinėse stadijose. Šios vakcinos kuriamos siekiant apsaugos prieš gripą, COVID-19, encefalitą, gastroenteritą, dengės karštligę, maliariją, hepatitą C, rankų, kojų ir burnos ligą bei 1 tipo diabetą (Qian *et al.*, 2020; Hassine *et al.*, 2024).

Lentelė 1.4.1.1. Licencijuotos VLP pagrindu sukurtos vakcinos (sukurta pagal Qian *et al.*, 2020; Hassine *et al.*, 2024).

Vakcina	Ekspresijos sistema	Adjuvantas	Taikinys	Antigenas
Heptavax-B	- (iš plazmos)	Al(OH) ₃		HBV S antigenas
Engerix-B	Mielių <i>S. cerevisiae</i>	Al(OH) ₃		HBV S antigenas
Recombivax HB	Mielių <i>S. cerevisiae</i>	Al ₂ (SO ₄) ₃		HBV S antigenas
PreHevbrio	Žinduolių CHO ląstelės	Al(OH) ₃	Hepatitis B	HBV S antigenas, pre-S1 (L), pre-S2 (M)
Heplisav-B	Mielių <i>H. polymorpha</i>	1018 ISS		HBV S antigenas
Fendrix	Mielių <i>H. polymorpha</i>	Al(OH) ₃ ir MPL		HBV S antigenas
Hepavax-Gene	Mielių <i>H. polymorpha</i>	Al(OH) ₃		HBV S antigenas, pre-S2 (M)
Gardasil	Mielių <i>S. cerevisiae</i>	AAHS		HPV L1 6/11/16/18
Cervavax	Vabzdžių High Five™	ASO4:Al(OH) ₃ ir MPL		HPV L1 16/18
Gardasil-9	Mielių <i>S. cerevisiae</i>	AAHS	Žmogaus papilomos viruso infekcija	HPV L1 6/11/16/18/31/33/45/53/58
Cecolin	Bakterijų <i>E. coli</i>	Al(OH) ₃		HPV L1 16/18
Walrinvax	Mielių <i>P. pastoris</i>	ASO4		HPV L1 16/18

Vakcina	Ekspresijos sistema	Adjuvantas	Taikinys	Antigenas
Hecolin	Bakterijų <i>E. coli</i>	Al(OH) ₃	Hepatitis E	HEV ORF2 (368-606 a. r.)
Flublok trivalentė	Vabzdžių Sf9	-	Gripas	HA A/H1N1, A/H3N2, B
Flubok keturvalentė	Vabzdžių Sf9	-		HA A/H1N1, A/H3N2, B/Yamagata, B/Victoria
Nuvaxovid	Vabzdžių Sf9	Matrix-M	COVID-19	SARS-CoV-2 spyglio antigenas
Covifenz	Augalų <i>N. benthamiana</i>	ASO3		SARS-CoV-2 spyglio antigenas

ISS – sintetiniai CpG oligodeoksinukleotidai su imunostimuliaciniu aktyvumu; **MPL** – monofosforilo lipidas A; **ASO4** – adjuvantas, sudarytas iš aliuminio hidroksido ir monofosforilo lipido A; **AAHS** – amorfinis aliuminio hidroksifosfato sulfatas; **Matrix M** – adjuvantas, sudarytas iš saponinų, išgrynintų iš *Quillaja saponaria* Molina medžio, kombinuotų su cholesteroliu ir fosfolipidais, kad būtų suformuotos 40 nm atviros nanodalelės; **ASO 3** – adjuvantas, sudarytas iš skvaleno, DL- α -tokoferolio ir polisorbato 80.

Stiprus citotoksinių T limfocitų sukeltas imuninis atsakas yra svarbus veiksnys naikinant navikines ląsteles ir VLP gebėjimas sukelti tokį atsaką, pernešant antigeną į citozolį ir aktyvuojant I klasės MHC kelią, daro jas puikiais kandidatais kuriant priešvėžines vakcinas. Keletas imuninės sistemos elementų atlieka svarbų vaidmenį kovojant su vėžinėmis ląstelėmis. Pirmia, dendritinės ląstelės turi gauti pakankamai signalų, kad vyktų brendimas ir būtų stimuliuojamas įgytas imunitetas. Tai svarbu siekiant užtikrinti, kad imuninė sistema netaptų tolerantiška antigenui, aktyvuodama reguliacines T ląsteles ir slopindama imuninę sistemą. Antra, dauguma vėžinių antigenų yra giminingi arba identiški saviems antigenams. Galiausiai, T ląstelės turi sugebėti įveikti imunitetą slopinančius signalus, kuriuos generuoja naviko ląstelės. VLP būdingos savybės, padedančios įveikti šiuos iššūkius (Nooraei *et al.*, 2021). Krūties vėžys yra labiausiai paplitęs vėžio tipas tarp moterų, tačiau juo serga ir vyrai. Apie 20–30 % invazinio krūties vėžio atvejų yra susiję su padidinta žmogaus epidermio augimo faktoriaus receptoriaus-2 (HER2, angl. *human epidermal growth factor receptor-2*), dalyvaujančio proliferacijoje ir programuotos ląstelių mirties slopinime, raiška (Slamon *et al.*, 1987; Bianchini ir Gianni, 2014). Monokloninių antikūnų panaudojimas pasyvaus imunogeniškumo indukcijai veiksmingai užkerta kelią metastazėms ir naviko augimui, tačiau šis metodas yra brangus ir ilgalaikiai apsaugai reikalingas reguliarius daugkartinis vartojimas, o taip pat stebimas šalutinis poveikis (Garg *et al.*, 2014; Leyland-Jones, 2001). Yra parodyta, kad VLP pagrindu sukurtos priešvėžinės vakcinos padeda šias problemas išspręsti. 2017 metais atliktame tyrime, naudojant *SpyCatcher* sistemą prie *Acinetobacter phage* AP205 kapsidės baltymo prijungtas pilnas HER2 domenas, taip sukuriant VLP, kurių kiekviena turi vidutiniškai 183 vienetus *SpyCatcher*-HER2 antigenų. Atlikus laukinio tipo FVB pelių, kurioms buvo persodintos HER2 ekspresuojančios žmogaus krūties vėžio ląstelės, vakcinaciją sėkmingai pavyko įveikti B ląstelių toleranciją ir indukuotas didelis kiekis anti-HER2 IgG antikūnų, kurie užkirto kelią naviko augimui (Palladini *et al.*, 2018). Dar vienu taikiniu krūties vėžio terapijoje laikomas SLC7A11 geno produktas xCT – tai transmembraninis baltymas, kurio sintezė yra padidėjusi vėžio kamieninėse ląstelėse. Šis baltymas aktyvuoja reguliacines T ląsteles, mažina glutationo sintezę ir skatina naviko invaziją, kadangi reguliacinės T ląstelės slopina imuninę sistemą, kad skatintų imuniteto toleranciją naviko ląstelėms (Conti *et al.*, 2020). xCT baltymo ekstraląstelinis domenas ECD3 įterptas į bakteriofago MS2 VLP per kapsidės baltymo paviršiaus kilpą. Šiomis MS2-ECD3 VLP imunizuotos pelės, turinčios metastazines krūties vėžio ląsteles ir indukuoti dideli kiekiai anti-xCT antikūnų bei stebėtas sumažėjęs metastazių

formavimasis *in vivo* (Rolih *et al.*, 2020). Daugelio vėžio atvejų, įskaitant ir kasos vėžį, stebima padidėjusi ląstelių paviršiaus glikoproteino mezotelino raiška, todėl jis laikomas potencialiu priešvėžinių vaistų taikiniu. Šis glikoproteinas dalyvauja ląstelių adhezijoje ir lemia vėžinių ląstelių masės prisitvirtinimą prie mezotelio ląstelių. Šimpanzių-žmonių imunodeficito viruso (SHIV) dalelių paviršiuje pateiktas pelių mezotelinas ir tokiais mezotelino-SHIV VLP imunizuotos pelės, turinčios kasos naviko ląstelių. Po vakcinacijos stebėtas naviko augimo slopinimas ir net apie 60 % pelių išgyvenamumas. Tokios VLP stipriai stimuliuojo specifinių anti-navikinių antikūnų gamybą ir CD8⁺ T ląstelių imunitetą (Zhang *et al.*, 2013). Šie pavyzdžiai atskleidžia VLP kaip galimų priešvėžinių vakcinų potencialą.

Šiuo metu vienintelis galimas alergijos gydymo būdas yra alergenui specifinė desensibilizacija (angl. *allergen-specific desensitization*). Ši strategija reikalauja ilgalaikio alergenų taikymo ir gali sukelti gyvybei pavojingą anafilaksinį šoką (Cappella ir Durham, 2012). Patrauklia alergijų gydymo strategija laikomos terapinės vakcinos, galinčios palengvinti alergijos simptomus vos po kelių injekcijų. Vienas iš pavyzdžių – terapinė vakcina, skirta gydyti alergiją katėms, sudaryta iš pagrindinio kačių alergeno Fel d1, konjuguoto prie bakteriofago Q β VLP. Q β -Fel d1 VLP dalelės pasižymėjo dideliu imunogeniškumu pelėse ir jau po vienos imunizacijos serume buvo aptinkamas didelis kiekis ilgalaikių antigenų specifinių IgG antikūnų. Vakcinacija Q β -Fel d1 dalelėmis stipriai sumažino I tipo alerginių reakcijų kiekį pelėse bei buvo visiškai panaikintas IgE atminties B ląstelių atsakas į antigeną. Stebina tai, kad Fel d1 pateikimas ant Q β VLP iš esmės panaikino jo gebėjimą sukelti alergines reakcijas pelėms arba žmogaus bazofilų, gautų iš alergiškų asmenų, degranuliaciją. Taigi Fel d1 pateikimas ant Q β VLP padidino alergeno imunogeniškumą ir terapinį veiksmingumą, kartu stipriai sumažindamas jo reaktyvumą (Schmitz *et al.*, 2009). Alergija žemės riešutams yra viena iš dažniausių anafilaksinio reakcijų priežasčių tarp maistui alergiškų pacientų. Ara h 2 ir Ara h 6 yra dažniausi alergenai, nustatyti riešutams alergiškuose pacientuose. Ara h 2 gali būti svarbiausias alerginių reakcijų į žemės riešutus sukėlėjas, kurį galima panaudoti alergenų specifinei imunoterapijai. VLP pagrindu sukurta efektyvi vakcina VLP *Peanut*, sudaryta iš dviejų baltymų: a) kapsidės baltymo, kilusio iš agurkų mozaikos viruso (CuMV) sujungto su universaliu T-ląstelių epitopu (CuMV_{TT}) ir b) CuMV_{TT} subvienetas, sulietas su žemės riešutų alergenu Ara h 2, kurie kartu formuoja mozaikines CuMV_{TT}/CuMV_{TT}-Ara h 2 VLP. Sintezės bakterijose metu į šias daleles įkapsuliuojama prokariotinė vgRNR, taip pat atliekanti svarbų vaidmenį imunizacijoje: ji stabilizuoja daleles bei tarnauja kaip TLR7/8

ligandas, skatinantis IgG klasės persijungimą ir antrinių plazminių ląstelių susidarymą. Imunizacija tokiomis dalelėmis abejose naiviose ir žemės riešutais įjautrintose pelėse sukėlė stiprų anti-Ara h 2 IgG atsaką. Tokios dalelės pateko į žemės riešutams jautrias peles nesukeliant alerginių reakcijų, išliko stipriai imunogeniškos, apsaugojo nuo visų žemės riešutų alergenų tipų ir suteikė apsaugą nuo žemės riešutų sukeltos anafilaksijos (Sobczak *et al.*, 2023). Šiuo metu VLP Peanut vakcina yra pirmoje klinikinių tyrimų fazėje ir yra perspektyvus kandidatas gydant alergiją žemės riešutams (Krenger *et al.*, 2024).

1.4.2. Nanodalelėmis paremtos pernašos sistemos

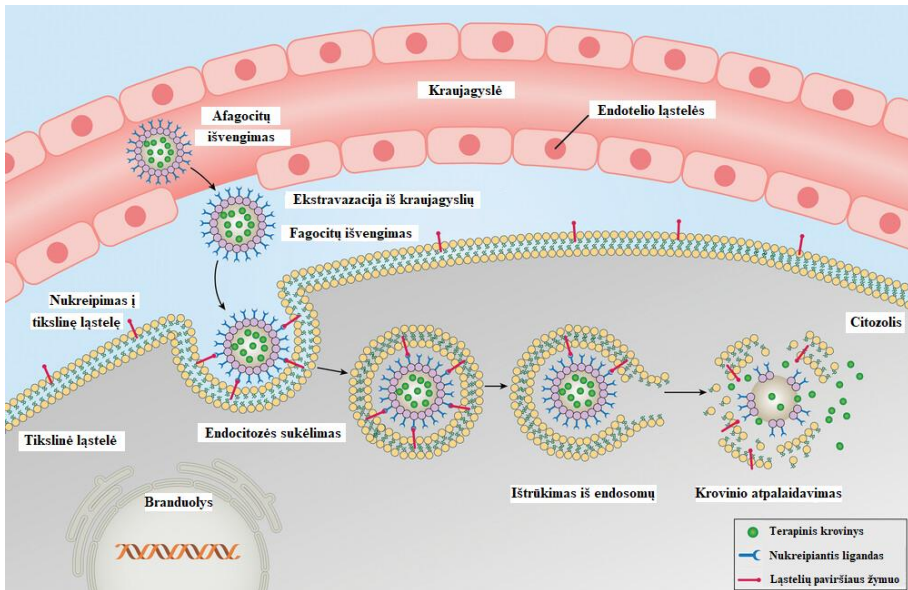
Nanodalelės ir nanomedžiagos vis dažniau tiriamos dėl jų potencialaus pritaikymo medicinoje. Viena iš perspektyviausia taikymo sričių yra tikslinė vaistų pernaša į specifines organizmo ląsteles ar audinius panaudojant nanodaleles, kurios dar vadinamos nanonešikliais. Nanodalelės gali būti sukonstruotos taip, kad jų paviršius pasižymėtų savybėmis, leidžiančiomis joms selektyviai veikti reikiamas ląsteles, o tai padidina vaistų efektyvumą ir sumažina jų šalutinį poveikį. Nanodalelės taip pat gali būti naudojamos diagnostikos tikslais, pavyzdžiui, kaip kontrastinė medžiaga biovaizdinime arba specifinių biomolekulių aptikimui biologiniuose mėginiuose (Yusuf *et al.*, 2023). Nanodalelių kaip nanonešiklių pritaikymas sparčiai plečiasi, o tai skatina ieškoti alternatyvių pernašos sistemų su pranašiausiomis savybėmis.

Molekulių pernašai taikomos įvairios nanodalelės: lipidų pagrindu sukurtos dalelės, sintetiniai ir natūralūs polimerai bei neorganinės dalelės (Mitchell *et al.*, 2021). Lipidų pagrindu sukurtooms nanodalelėms, pavyzdžiui, liposomoms būdingas geras biosuderinamumas, mažas imunogeniškumas ir jos naudojamos hidrofilinių, hidrofobinių bei lipofilinių vaistų pernašai. Jų toksiškumas gali būti sumažinamas keičiant jų dydį, krūvį bei kitas paviršiaus savybes (Li *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2021). Vis dėlto, 2022 metais rinkoje buvo prieinama tik 14 liposominių produktų, o tai rodo, kad ši sistema turi ir trūkumų, vienas iš jų – stabilumo problemos (Liu *et al.*, 2022). Siekiant jas stabilizuoti turi būti atliekamas papildomas padengimas kitomis biomedžiagomis, pavyzdžiui, PEG (Hashmi ir Koester, 2018). Kiti liposomų trūkumai yra galimos alerginės reakcijos į liposomų sudedamąsias dalis, oksidacija ir fosfolipidinio dvisluoksnio hidrolizės-tipo reakcijos, įkapsuliuoto vaisto „nutekėjimas“, didelės gamybos sąnaudos ir tam tikrais atvejais – mažas tirpumas (Tutunji, 2023). Plačiai tiriamos ir polimerinės nanodalelės, sudarytos iš polilaktokoglikolio rūgšties ar polilakto rūgšties,

taip pat vis daugiau dėmesio skiriama ir chitozanui dėl jo biosuderinamumo, mažo imunogeniškumo ir toksiškumo (Nicolas *et al.*, 2018; Cheung *et al.*, 2015). Nors polimerinėms dalelėms būdingas mažas dydis, geras dispersiškumas vandenyje bei kontroliuojamas vaistų atpalaidavimas, tačiau dažnai stebimas polimerų citotoksiškumas, taip pat staigus vaisto atpalaidavimas (angl. *burst drug release*), galimi organinių tirpiklių likučiai (Jiang *et al.*, 2017). Neorganinės dalelės, tokios kaip dendrimerai, magnetinės, aukso, silicio dioksido, geležies oksido nanodalelės, taip pat plačiai naudojamos vaistų pernašai ir biovaizdinimui. Šios dalelės gali būti įvairios morfologijos bei dydžio – plačiausiai tiriamos aukso nanodalelės gali sudaryti tokias struktūras kaip nanosferas, nanovamzdelius, nanonarvelius, nanožvaigždes ar nanoapvalkalėlius (Vines *et al.*, 2019). Neorganinės nanodalelės pasižymi unikaliomis fizikinėmis, elektrinėmis, magnetinėmis ir optinėmis savybėmis, kurias lemia medžiaga, iš kurios jos yra sudarytos. Aukso nanodalelės savo paviršiuje turi laisvųjų elektronų, kurie nuolat svyruoja dažniu, priklausančiu nuo jų dydžio ir formos, todėl joms būdingos fototerminės savybės (Wang *et al.*, 2020). Kita dažnai neorganinių nanodalelių sintezei naudojama medžiaga yra geležies oksidas – tokios dalelės sudaro didžiąją dalį FDA patvirtintų neorganinių nanodalelių pagrindu sukurtų vaistų (Bobo *et al.*, 2016). Magnetinės geležies oksido nanodalelės, sudarytos iš magnetito (Fe_3O_4) arba magemito (Fe_2O_3), pasižymi superparamagnetinėmis savybėmis ir pritaikomos kaip kontrastinės medžiagos, vaistų nanonešikliai bei naudojamos fototerminėje terapijoje (Arias *et al.*, 2018). Nors neorganinės dalelės turi įvairių patrauklių savybių, jų klinikinis panaudojimas yra ribotas dėl prasto tirpumo ir didelio citotoksiškumo – jos gali sukelti oksidacinį stresą, reaktyvių deguonies formų susidarymą, uždegimą ir apoptozę (Bhatti *et al.*, 2022). Išvardinti nanodalelių apribojimai paskatino alternatyvių, baltyminiu pagrindu sukurtų VLP panaudojimą įvairių junginių pernašai. VLP pasižymi savybėmis, būtinomis biomedicininiam pritaikyme, tokiomis kaip tirpumas vandenyje, biosuderinamumas ir biosuirimas, minimalus toksiškumas, kontroliuojamas susirinkimas ir krovinių atpalaidavimas, tinkamas dydis, vientisa struktūra ir lengvas funkcionalizavimas (Kim *et al.*, 2023).

Atliekant pernašą nanodalelėmis susiduriama su keliais iššūkiais. Visų pirma, krovinyi turi būti patalpinamas į nanodalelę, modifikuotas taip, kad krovinyi būtų pristatytas į tikslines ląsteles. Nanodalelės turi išlikti stabilios kraujotakoje ir tarpląstelinuose audiniuose, išlaikyti savo krovinį ir išvengti nespecifinio įtraukimo į fagocitų vidų. Be to, po ekstravazacijos į ekstravaskulinį (prie kraujagyslių sienelių išorės esantį) audinį nanodalelės turi

būti nukreiptos į tikslines ląsteles, išvengiant patekimo į sveikas ląsteles, kad būtų apribotas kaupimasis organuose ir toksiškumas. Po adsorbcijos į tikslines ląsteles ir patekimo per receptorinės endocitozės kelius, krovinį nešančios dalelės turi ištrūkti iš endosomų, disocijuoti ir atpalaiduoti terapinį krovinį į citozolį (1.4.2.1 pav.). Atliekant mažų stabilų molekulių pernašą dalelių ištrūkimas iš endosomų gali būti ir nebūtinas, kadangi dalelių lizosominė degradacija vis tiek turėtų atpalaiduoti krovinį (Rohovie *et al.*, 2017).



Pav. 1.4.2.1. VLP pernašos ląstelėje schema (modifikuota pagal Hajebi *et al.*, 2022). VLP paviršius modifikuotas ir funkcionalizuotas ligandais, kurie naudojami nukreipimui į tikslines ląsteles. Po ekstravazacijos VLP patenka į tikslinę ląstelę išvengiant imuninės sistemos. Po endocitozės VLP ištrūksta iš endosomų, disocijuoja ir taip atpalaiduojamas kroviny.

Siekiant VLP nukreipti į tikslines ląsteles pasitelkiami įvairūs funkcionalizavimo metodai, leidžiantys dalelių paviršiuje pateikti peptidus, sąveikaujančius su ant tikslinių ląstelių esančiais receptoriais. SP94 peptidas sėkmingai panaudotas doksorubicino, siRNR, kvantinių taškų bei ricinos toksino A-grandinės pernašai bakteriofago MS2 VLP į žmogaus kepenų karcinomos ląsteles (Ashley *et al.*, 2011). RGD peptidas (Arg-Gly-Asp), sąveikaudamas su ant vėžinių ląstelių paviršiaus esančiais integriniais $\alpha_v\beta_3$, lemia doksorubicino pernašą HBV VLP į U87MG vėžį turinčias peles – tokios dalelės integriniais aktyvuotos endocitozės būdu patenka į lizosomas, kur VLP degraduojamos, o doksorubicinas atpalaiduojamas į viduląstelinę erdmę (Shan *et al.*, 2018). Peptidas transferinas panaudotas siRNR, veikiančių prieš žinomą naviko taikinį *bcl* onkogeno transkriptą, pernašai MS2 VLP į HeLa ląsteles receptorinės endocitozės būdu (Galaway *et al.*, 2012).

VLP gali būti sukuriamos taip, kad jų paviršiuje būtų pateikti ne tik nukreipiantys ligandai, bet ir į ląstelę prasiskverbiantys peptidai, kurie naudojant mažas koncentracijas padeda dalelėms ištrūkti iš endosomų. Tokio metodo pritaikymas gali būti reikalingas norint pagerinti funkcionalios terapinės medžiagos pernašą. Po to, kai krovinį nešančios VLP yra endocituojamos tikslinių ląstelių, jos turi ištrūkti iš endosomos iki pasiekiant endosominio kelio galą – lizosomą. Lizosomos sudegraduoja ne tik VLP, bet ir bet kokią nukleorūgščių, peptidų ar baltyminių krovinių, tačiau mažamolekuliniai kroviniai po VLP degradacijos turėtų išlikti stabilūs (Erazo-Oliveras *et al.*, 2012). VLP ištrūkimui iš endosomų prie MS2 bakteriofago prijungtas transaktyvuoto transkripcijos aktyvatoriaus (HIV-Tat) bei histidinu-turtingas H5WYG peptidas (Pan *et al.*, 2012; Ashley *et al.*, 2011), prie CPMV VLP – argininu-turtingas R5 peptidas (Wu *et al.*, 2012). Katijoninių peptidų, tokių kaip HIV-Tat ir R5, veikimas pagrįstas tuo, kad jie tiesiogiai elektrostatiškai sąveikauja su neigiamai įkrautais fosfolipidais, formuojančiais endosomos membraną, taip destabilizuoja membraną ir sukelia endosomų lizę (Blanco *et al.*, 2015). Į ląsteles prasiskverbiantys peptidai, turintys protonuojamas antrines ar tretines aminų grupes, pavyzdžiui, H5WYG peptidas, sumažėjęs pH gali elgtis kaip buferins medžiaga ir absorbuoti protonus. Šalia endolizosominės membranos susidaręs elektrocheminis gradientas lemia vandens ir/arba jonų srautą, sukeliantį endosomų išbrinkimą ir plyšimą. Šis procesas vadinamas „protonų kempinės“ (angl. *proton sponge*) efektu (Martens *et al.*, 2014). Dėl prieš tai minėtų plačių VLP funkcionalizavimo galimybių ir kitų privalumų šios dalelės tiriamos ir bandomos pritaikyti ne tik vakcinų gamyboje, bet ir chemoterapijoje, genų terapijoje ir biovaizdinime.

Vienas iš dažniausių vėžio gydymo būdų yra chemoterapija. Chemoterapijos metu naudojami tokie junginiai kaip doksorubicinas (DOX, angl. *doxorubicin*), cisplatina, paklitakselis bei 5-fluoruracilas, pažeidžiantys DNR (Tilsed *et al.*, 2022). Šie vaistai veikia ne tik vėžines, bet ir sveikas ląsteles, todėl siekiant sumažinti šalutinį chemoterapinių vaistų poveikį naudojami vaistų nanonešikliai. Chemoterapinių vaistų pernašai į vėžines ląsteles panaudotos CCMV, HBV, kojų ir burnos ligos viruso, fizalio dėmėtligės viruso (PhMV, angl. *physalis mottle virus*), tabako mozaikos viruso (TMV), bakteriofago MS2 bei rotaviruso VLP (Kim *et al.*, 2023; Zhao *et al.*, 2022; Ashley *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). TMV VLP buvo įkapsuliuotos cisplatina, vykstant elektrostatinei sąveikai tarp teigiamai įkrautos cisplatinos (cisPt²⁺) bei neigiamai įkrauto TMV dalelių vidaus, ir sėkmingai atlikta cisplatinos pernaša į pelių kiaušidžių vėžio ląsteles.

Cisplatina įkapsuliuotos TMV VLP pasižymėjo didesniu efektyvumu nei laisva cisplatina, buvo stebimas naviko augimo sumažėjimas ir padidėjęs pelių išgyvenamumas (Zhao *et al.*, 2022). 2011 metais Zhao ir jo kolegos prie rotaviruso VP6 kapsidės baltymo kovalentiškai prijungė DOX ir esant tinkamai joninei jėgai DOX-VP6 konjugatai susirinko į VLP. Prie tokių dalelių buvo prijungta laktobioninė rūgštis, kuri fermentinės hidrolizės metu konvertuojama į galaktozę, taip nukreipiant šias daleles į žmogaus kepenų vėžio ląsteles HepG2, turinčias asialoglikoproteino galaktozinius receptorių. Imunofluorescentinė analizė parodė, kad laktobioninė rūgštis ant dalelių paviršiaus lemia jų endocitozę, todėl matomas dalelių pasiskirstymas citoplazmoje. Po keturių valandų DOX buvo pilnai patekęs į vėžinių ląstelių branduolius ir atlikus citotoksiškumo tyrimus nustatyta, kad visos ląstelės žuvo (Zhao *et al.*, 2011).

Vienas didžiausių genų terapijos iššūkių yra veiksminga DNR, iRNR ir mažųjų RNR molekulių pernaša į tikslines ląsteles, kur jos būtų panaudotos funkciškai pakeisti pažeistus genus arba pakeisti specifinių baltymų raišką. Tai svarbu gydant genetines ligas arba kovojant su virusinėmis infekcijomis. Nepaisant genų terapijos lūkesčių, *in vitro* ir *in vivo* genų pernaša yra sudėtinga ir dažniausiai apsiriboja adenovirusais, adeno-asocijuotais virusais ir lentivirusinėmis sistemomis. Šios genų pernašos sistemos gali sukelti onkogenezę, uždegiminį atsaką ir gali būti toksiškos (Goverdhana *et al.*, 2005). Genų terapijai plačiausiai naudojami augalų virusų, TMV, CPMV, CCMV ir bromo mozaikos viruso (BMV, angl. *brome mosaic virus*) VLP, gyvūnų virusų, Džono Kaningemo viruso (angl. *John Cunningham virus*) bei HBV VLP, ir Qβ bei MS2 bakteriofagų VLP (Comas-Garcia *et al.*, 2020). Bakteriofago MS2 VLP panaudotos mikro RNR (miRNR) įkapsuliuavimui – tai endogeninės mažos nekoduojančios RNR, galinčios sąveikauti su tikslinės iRNR 3' UTR ir neigiamai reguliuoti jų genų raišką, slopindamos transliaciją arba degraduodamos tikslinę iRNR potranskripciniame lygyje. Kadangi prieš tai buvo nustatytas potencialus miRNR terapinis efektas, jos gali būti naudojamos gydant vėžį, pavyzdžiui, hepatoceliulinę karcinomą (HCC) (Borel *et al.*, 2012). miR-122, kurios sumažėjimas nustatytas tiek HCC sergantiems pacientams, tiek HCC ląstelių linijose, neigiamai reguliuoja kelių tikslinių genų, pavyzdžiui, ciklino G1, serumo atsako faktoriaus bei insulino tipo augimo faktoriaus 1 receptoriaus raišką. Norint nustatyti šios miRNR kaip priešvėžinio vaisto kandidato potencialą tirtas miR-122 poveikis HCC *in vivo* ir *in vitro*. Įkapsulivus miR-122 į MS2 VLP, ant kurių paviršiaus buvo pateiktas prieš tai minėtas į ląsteles efektyviai prasiskverbiantis HIV-Tat peptidas, gautos MS2-Tat-miR-122 VLP sėkmingai pateko į ląsteles ir sukėlė

apoptozę visose trijose tirtose ląstelių linijose, Hep3B, HepG2 ir Huh7. Taip pat nustatyta, kad MS2-Tat-miR-122 paveiktose grupėse sumažėjo ir ciklino G1 bei insulino tipo augimo faktoriaus 1 receptoriaus raiška. Siekiant nustatyti slopinantį MS2-Tat-miR-122 VLP poveikį *in vivo*, panaudoti BALB/c pelių HCC modeliai. Palyginti su neigiamomis kontrolėmis, po dalelių suleidimo į Hep3B turinčias peles stebėtas naviko augimo greičio sumažėjimas. Taip pat, palyginti su MS2-miR-122 dalelėmis, Tat peptidą turinčios dalelės pasižymėjo tiek geresniu citotoksiškumu, tiek geresniu naviko augimą slopinančiu poveikiu (Wang *et al.*, 2016). BMV VLP panaudotos mažų interferuojančių RNR (siRNR) įkapsuliavimui. Genų nutildymas pademonstruotas su siGFP – po 6 valandų nuo krūties vėžio ląstelių (MDA-MB-231) poveikio BMV-siGFP VLP gautas efektyvus krovinio atpalaidavimas ir sustabdyta GFP sintezė, nenaudojant jokių papildomų nukreipiančių ligandų. Tada į BMV VLP įkapsuliuota priešvėžinė siRNR Akt1 (siAkt1) kinazė, dalyvaujanti ląstelės proliferacijos, migracijos ir transformacijos procesuose. BMV-siAkt1 VLP buvo suleistos krūties vėžio naviką turinčioms pelėms, atliekant pakartotiną injekciją kas tris dienas dvi savaites. Naviko dydis vertintas du kartus per savaitę 28 dienas. Nustatytas reikšmingas skirtumas – BMV-siAkt1 VLP pasižymėjo didžiausiu aktyvumu ir, palyginti su kontrole, sumažino naviko dydį net apie 50 % (Nuñez-Rivera, *et al.*, 2020).

Audinių ir ląstelių biovaizdinimas gali būti naudingas ikiklinikinėje vėžio diagnostikoje, paciento būklės stebėjimui ir tikslinių audinių aptikimui operacijos metu. Pastaraisiais metais tiriamos nanomedžiagų įgalintos biologinio vaizdinimo technologijos, įskaitant kvantinius taškus, aukso nanodaleles, silicio dioksido nanodaleles, polimerus bei VLP (Kim *et al.*, 2023). Pozitronų emisijos tomografija yra labai jautrus ir neinvazinis klinikinis metodas. Dėl didelio jautrumo ir erdvinės skiriamosios gebos jis svarbus ankstyvoje vėžio diagnostikoje ir stadijos nustatyme (Gambhir, 2002; Aanei *et al.*, 2016). Pozitronų emisijos tomografijoje naudojami įvairūs radioizotopai, tokie kaip ^{18}F , ^{64}Cu bei ^{68}Ga , tačiau dauguma jų turi trumpą pusėjimo trukmę ir žemą specifiskumą. Dėl savo biosuderinamumo ir lengvo paviršiaus funkcionalizavimo VLP naudojamos siekiant prailginti radioizotopų pusėjimo trukmę (Farkas *et al.*, 2013; Shukla ir Steinmetz, 2015). PEG funkcionalizuotos MS2 VLP, turinčios *p*-aminofenilalanino ir cisteino grupes, panaudotos maleimido-DOTA- ^{64}Cu konjugavimui. Modifikuotos ^{64}Cu -DOTA-MS2 VLP pasižymėjo dideliu stabilumu serume ir neatpalaidavo ^{64}Cu . Panaudojus pelių modelį su implantuotomis žmogaus krūties vėžio MCF7cL18 ląstelėmis po 24 valandų nuo injekcijos naviko

vietoje buvo nustatytas 3 kartus didesnis kiekis ^{64}Cu -DOTA-MS2 VLP, palyginti su laisvu ^{64}Cu . Taip pat kraujyje nustatytas net 10 kartų didesnis procentinis kiekis (suleistos dozės gramui audinio) ^{64}Cu -DOTA-MS2 VLP nei laisvo ^{64}Cu – šie rezultatai rodo, kad VLP pagerino ^{64}Cu cirkuliacijos laiką kraujyje. Visgi, naviko vietoje aptikta nepakankama dalelių koncentracija (Farkas *et al.*, 2013). Magnetinio rezonanso vaizdinimas taip pat yra neinvazinis metodas, kuriame naudojamos kontrastinės medžiagos (Caravan, 2006). Į VLP įkapsuluotos kontrastinės medžiagos pasižymi sustiprinta relaksacija *in vitro* ir *in vivo*, palyginti su įprastomis kontrastinėmis medžiagomis. Naudojant *click* reakciją prie PhMV VLP išorinio paviršiaus konjuguotas prostatos vėžinėms ląstelėms PC-3 specifinis peptidas Asp-Gly-Glu-Ala, o prie vidinio paviršiaus – daugiafunkcinės kontrastinės medžiagos Cy5.5 (fluorescentinis dažas) bei Gd^{3+} (DOTA). Gautos Gd-Cy5.5-PhMV-mPEG VLP pasižymėjo 7 kartus geresne relaksacija nei Gd^{3+} (DOTA) komercinė T1 kontrastinė medžiaga. Suleidus tokių VLP PC-3 naviką turinčioms pelėms, naviko vietoje po 240 valandų nustatyta 2 kartus didesnė Gd^{3+} koncentracija, palyginti su VLP, neturinčiomis Asp-Gly-Glu-Ala ligando. Šie rezultatai rodo, kad sukurtos dalelės leidžia atlikti ilgalaikę naviko diagnostiką, joms būdingas geresnis relaksacijos laikas ir gebėjimas patekti į tikslines vėžines ląsteles (Hu *et al.*, 2019).

VLP būdingos patrauklios savybės, tokios kaip lengva gamyba pasitelkus įvairias sintezės sistemas, didelė funkcionalizavimo ir įkapsuliavimo įvairovė, stabilumas, vientisa struktūra, biosuderinamumas, kontroliuojamas krovinių atpalaidavimas bei mažas toksiškumas. Dėl šių savybių VLP plačiai taikomos kuriant vakcinas ir įvairias pernašos nanodalelėmis sistemas. Nepaisant šių privalumų, dauguma VLP pritaikymo tyrimų kol kas yra labiau fundamentiniai ir norint sukurti rinkoje prieinamus produktus reikalingi išsamesni dalelių savybių tyrimai bei bandymai su žinduolių ląstelėmis ir modelinėmis sistemomis.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

Šiame darbe naudotos medžiagos ir metodai atitinkamai pateikti 2.1 ir 2.2 poskyriuose.

2.1. Medžiagos

2.1.1. Reagentai, komerciniai rinkiniai ir kitos priemonės

Šiame darbe naudoti reagentai, komerciniai rinkiniai bei kitos priemonės ir jų gamintojai nurodyti 2.1.1 lentelėje.

Lentelė 2.1.1. Tyrimui naudoti reagentai, komerciniai rinkiniai ir kitos priemonės bei jų gamintojai.

Gamintojas	Reagentai, komerciniai rinkiniai ir kitos priemonės
Agar Scientific, Didžioji Britanija	Anglimi dengti vario tinkleliai
Roth, Vokietija	Gliukozė, galaktozė, EDTA, Tris, β -merkptoetanolis (β ME), SDS, fenolis, natrio acetatas, izopropanolis, 0,22 μ m polivinilideno fluorido filtrai, PEG-4000, DTT, ličio acetatas, $MgCl_2$, $CaCl_2$, LiCl, CsCl, bromfenolio mės, glicerolis, <i>Coomassie</i> briliantinis mės (CBB) R-250, ampicilinas, kanamicinas, formaldehidas, NaOH, izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas (IPTG), L-arabinozė, sacharozė, 40 % akrilamido ir bisakrilamido mišinys (37,5:1), glicinas, amonio persulfatas, fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF), stiklo rutuliukai, acto rūgštis, etidžio bromidas, karbamidas, paraformaldehidas (PFA)
Epredia, Vokietija	12 mm skersmens dengiamieji stikleliai
Handary, Belgija	Nizinas Z
Honeywell, JAV	Etanolis
Leica, Vokietija	Imersinis aliejus Type F
Liofilchem®, Italija	Peptonas, mielių ekstraktas, triptonas, agaras
Merck, Vokietija	MTT reagentas
Sigma Aldrich, JAV	N'-tetrametiletilelendiaminas (TEMED), dimetilsulfoksidas (DMSO)

Gamintojas	Reagentai, komerciniai rinkiniai ir kitos priemonės
Thermo Fisher Scientific, Lietuva	Dnazė I, RevertAid atvirkštinė transkriptazė, DreamTaq ir Phusion High-Fidelity polimerazės, restrikcijos endonukleazės (BcuI, BglII, BshTI, Ecl136II, EcoRI, Esp3I, HindIII, MlsI, NdeI, NotI, XhoI), Klenow fragmentas, T4 polinukleotidų kinazė, FastAP termojautri šarminė fosfatazė, T4 DNR ligazė ir atitinkami fermentų reakcijų buferiniai tirpalai, dNTP mišinys, ATP, molekulinės masės standartai (Generuler DNA Ladder Mix, PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder, PageRuler™ Unstained Protein Ladder), nukleorūgščių dažas DNA Gel Loading Dye (6×), agarozė, koncentatoriai Pierce™ Protein Concentrators PES (100K MWCO), gelfiltracinės kolonėlės Zeba™ Spin Desalting Columns (7K MWCO), 24 šulinėlių ląstelių kultivavimo plokštelės, objektiniai stikliukai, reagentas ProLong™ Diamond Antifade Mountant, fluorescuojantis dažas Hoechst 33342, terpė DMEM high glucose GlutaMAX™ Supplement pyruvate, fetalinis veršelio serumas, penicilino-streptomicino mišinys, ląstelių disociacijos reagentas TrypLE™ Express
	Komerciniai rinkiniai: GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit, GeneJET Gel Extraction Kit, GeneJET Plasmid Miniprep Kit, GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit
TPP Techno Plastic Products, Šveicarija	96 šulinėlių ląstelių kultivavimo plokštelės, T25 talpos ląstelių kultivavimo indai

2.1.2. Oligonukleotidai

Šiame darbe genų ir jų sričių padauginimui naudoti sintetiniai oligonukleotidai nurodyti 2.1.2 lentelėje. Tyrime naudotų oligonukleotidų sintezė atlikta įmonėje Metabion (Vokietija).

Lentelė 2.1.2. Tyrime naudotų sintetinių oligonukleotidų DNR sekos.

Oligonukleotidai	Seka (5'→3')	Paskirtis
L-A-R2.2-F	GATGTTCTCACTCACAA G	Naudoti L-A-1 <i>POL</i> geno srities
L-A-R3-R	GCGTCCATTATTCTTAC TG	padauginimui (461 bp)
L-BC-pol-dir-1	GATAACGATGGACATAT CATG	Naudoti L-BC-1 viruso <i>POL</i> geno srities
L-BC-rev-4	GTGGTTGCCTGTATATC ATG	padauginimui (475 bp)
L-BC-dir-3	CCGTCTCACATGTCCTC TCTGTAAATTCATTAC	Naudoti pilno ilgio L-BC-1 viruso <i>GAG</i> geno
L-BC-rev-2	CTATTCTATATCCGGTG GAAG	padauginimui ir <i>Esp3I</i> atpažinimo sekos įterpimui (2103 bp)

2.1.3. Plazmidiniai vektoriai

Šiame darbe naudotos plazmidės nurodytos 2.1.3 lentelėje.

Lentelė 2.1.3. Tyrime naudotos plazmidės ir jų aprašymai.

Plazmidė	Savybės ir paskirtis
pFX7	Mielių raiškos vektorius, turintis galaktoze indukuojamą <i>GAL10</i> promotorių, <i>PYK1</i> geno, koduojančio piruvatkinazę promotoriaus fragmentą, <i>PGK1</i> terminatorių, dvi DNR replikacijos pradžios sekas (mielių 2 μ plazmidės ORF ir bakterijų ORI DNR fragmentą), atsparumo ampicilinui bei formaldehidui genus, naudotas L-BC Gag ir Gag+mCherry baltymų sintezei mielėse
pET28a	Bakterijų raiškos vektorius, turintis IPTG indukuojamą T7 promotorių, <i>lac</i> operatorių, <i>lac</i> represorių, ribosomų prisijungimo sritį, T7 terminatorių, dvi DNR replikacijos pradžios sekas (bakteriofagų (f1) ir bakterijų (ColE1 PBR322) ORI DNR) bei atsparumo kanamicinui geną, naudotas L-BC Gag ir Gag+mCherry baltymų sintezei bakterijose

Plazmidės gautos iš Eukariotų genų inžinerijos skyriaus.

2.1.4. Tirpalai ir terpės

Šiame darbe naudoti tirpalai ir jų sudėtys nurodyti 2.1.4.1 lentelėje.

Lentelė 2.1.4.1. Tyrime naudoti tirpalai ir jų sudėtys.

Tirpalo pavadinimas	Sudėtis
Ca tirpalas	5 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM CaCl ₂ , 5 mM MgCl ₂
Na tirpalas	5 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂
1× TE tirpalas	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 8)
1× Tris-Gly-SDS buferinis tirpalas	25 mM Tris, 0,192 M glicino, 0,1 % SDS, pH 8,3
3 % PFA tirpalas	3 % PFA, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
5× SDS-PAGE mėginio paruošimo buferinis tirpalas	313 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 0,05 % bromfenolio mėlis, 50 % glicerolis, 215 mM βME
50× TAE tirpalas	2 M Tris, 1 M ledinės acto rūgšties ir 50 mM EDTA (pH 8,0)
1× Ardymo buferinis tirpalas	100 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
CBB R-250 dažymo tirpalas	0,125 % (w/v) CBB R-250, 50 % izopropanolio, 10 % acto rūgšties
Natrio fosfato ir citrato buferiniai tirpalai	Ruošiami iš 0,1 M citrinos rūgšties ir 0,2 M Na ₂ HPO ₄ tirpalų
dPBS buferinis tirpalas	0,9 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,1 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Fosfatiniai buferiniai tirpalai	Ruošiami iš 0,2 M KH ₂ PO ₄ ir 0,2 M K ₂ HPO ₄ tirpalų
Frakcionuojantis gelis (10,8 %)	Gaminamas iš 4,73 mL vandens, 2,7 mL 40 % AA:BIS mišinio, 2,5 mL 1,5 M Tris-HCl su 0,4 % SDS (pH 8,8), 60 μL 10 % APS ir 13 μL TEMED
Koncentruojantis gelis (5,6 %)	Gaminama iš 3 mL vandens, 0,7 mL 40 % AA:BIS mišinio, 1,25 mL 0,5 M Tris-HCl su 0,4 % SDS (pH 6,8), 25 μL 10 % APS ir 20 μL TEMED
LPTE tirpalas	100 mM LiAc (pH 7,5), 40 % PEG-4000, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
LTE tirpalas	100 mM LiAc (pH 7,5), 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 mM EDTA
PBS buferinis tirpalas	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PEG4000 išsodinimo reagentas	25 % PEG4000, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 2,5 M NaCl, 10 mM EDTA

Tirpalo pavadinimas	Sudėtis
PEG4000 plovimo tirpalas	5 % PEG4000, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 3 M NaCl, 10 mM EDTA
TES buferinis tirpalas	10 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,2 % SDS

Šiame darbe naudotos terpės ir jų sudėtys nurodytos 2.1.4.2 lentelėje.

Lentelė 2.1.4.2. Tyrime naudotos terpės ir jų sudėtys.

Terpė	Sudėtis
YPD	2 % bakterinio peptono, 1 % mielių ekstrakto, 2 % gliukozės
YPG	2 % bakterinio peptono, 1 % mielių ekstrakto, 2 % galaktozės
LB	1 % triptono, 1 % NaCl, 0,5 % mielių ekstrakto
Triptono-sojų	1,7 % peptono iš kazeino, 0,3 % peptono iš sojų miltų, 0,25 % gliukozės, 0,5 % NaCl, 0,25 % K ₂ HPO ₄ (pH 7,3)
Žinduolių kultivavimo terpė	DMEM terpė, papildyta 10 % fetalinio veršelio serumo ir 1 % penicilino-streptomicino mišiniu

Jeigu naudojamos agarizuotos terpės, papildomai į terpę dedama 2 % agarų.

2.1.5. Ląstelių kamienai ir linijos

Šiame darbe plazmidžių padauginimui naudotas *E. coli* DH10B kamienas (*F*– *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* λ – *rpsL*(*Str*^R) *nupG*), o baltymų sintezei – BL21-AI (*F*– *ompT* *hsdSB* (*rB*-*mB*-) *gal* *dcm* *araB::T7RNAPtetA*) (Invitrogen). L-BC-1 viruso GAG geno padauginimui, baltymų sintezei ir mielių metabolizmo tyrimams naudoti *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa* *his3* Δ *I* *leu2* Δ *0* *met15* Δ *0* *ura3* Δ *0*, *ScV*-*LA-1*, *ScV*-*LBC-1*), BY4741[*LA*-*LBC*-] (*MATa* *his3* Δ *I* *leu2* Δ *0* *met15* Δ *0* *ura3* Δ *0*, *ScV*-*LA-1-0*, Δ *ScV*-*LBC-1*) bei M437[*LA*+*M*+] (*ScV*-*LA-lus*, *M*-2), M437[*LA*+*M*-] (*ScV*-*LA-lus*, *M*-2-0), M437[*LA*-*M*-] (*ScV*-*LA-lus*-0, *M*-2-0) kamienai iš laboratorijos kolekcijos. Tyrime naudota plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 ląstelių linija suteikta dr. J. Skerniškytės.

2.2. Metodai

2.2.1. dgRNR išskyrimas iš mielių *S. cerevisiae*

Pavienė mielių kolonija suspenduojama 5 mL skystos YPD terpės ir auginama purtant 20 val. 30 °C temperatūroje. Mielių biomasė surenkama centrifuguojant 10 min. 1000 × g. Ląstelės resuspenduojamos 1 mL 50 mM EDTA tirpalo ir surenkamos centrifuguojant 1 min. 6000 × g. Ląstelės resuspenduojamos 1 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8) tirpalo ir 10 µL βME, gerai išmaišoma ir 15 min. inkubuojama 21 °C temperatūroje. Ląstelės centrifuguojamos 1 min. 6000 × g, resuspenduojamos 800 µL TES buferinio tirpalo ir 600 µL rūgštinio fenolio, gerai išmaišoma ir inkubuojama stipriai purtant 30 min. 21 °C temperatūroje. Mėginiai centrifuguojami 20 min. 20 000 × g 4 °C ir 600 µL viršutinės vandeninės fazės perkeliama į naujus mėgintuvėlius. Užpilama 60 µL natrio acetato tirpalo (pH 5,2) ir 660 µL šalto izopropanolio, gerai išmaišoma ir centrifuguojama 10 min. 20 000 × g 4 °C. Nuosėdos plaunamos 150 µL 70 % etanolio tirpalu, gerai išmaišoma ir centrifuguojama 5 min. 20 000 × g 4 °C. Pašalinus supernatantą, visuminės RNR (vRNR) nuosėdos džiovinamos ir tirpinamos steriliame vandenyje.

Į 30 µL vRNR mėginio pridedama 70 µL 4 M LiCl tirpalo, kad galutinė LiCl koncentracija būtų 2,8 M, ir mišinys inkubuojamas 16 val. 4 °C. Po inkubacijos mėginys centrifuguojamas 45 min. 20 000 × g 4 °C. Apie 90 µL supernatante esančios dgRNR perkeliama į naują mėgintuvėlį ir pridedama 9 µL 3 M NaCl tirpalo bei 99 µL 100 % izopropanolio. Centrifuguojama 10 min. 20 000 × g 4 °C ir nuosėdos užpilamos 150 µL 70 % etanolio tirpalo, gerai išmaišoma ir centrifuguojama 5 min. 20 000 × g 4 °C. Pašalinus supernatantą, dgRNR nuosėdos džiovinamos ir tirpinamos steriliame vandenyje.

Siekiant pašalinti galimas genomines DNR priemaišas, į 1 µg dgRNR mėginio pridedamas 1 µL DNazės I 10× reakcijos buferinio tirpalo su MgCl₂, 1 µL DNazės I ir sterilaus vandens, kad bendras reakcijos mišinio tūris būtų 10 µL. Reakcijos mišinys inkubuojamas 30 min. 37 °C, po inkubacijos pridedamas 1 µL 50 mM EDTA tirpalo ir inkubuojama 10 min. 65 °C.

Visi auginimai atliekami termostatinėje purtyklėje Innova® 40 (Eppendorf, Vokietija) arba vandens vonelėje THERMOLAB® 1083 (GFL, Vokietija). Centrifugavimams naudojama šaldoma centrifuga 5804R (Eppendorf, Vokietija). Mėginių inkubavimams naudojamas termomaišytuvas TS-100 (Biosan). Nukleorūgščių koncentracijos nustatomos

spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Visi nukleorūgščių mėginiai saugomi -20 °C temperatūroje.

2.2.2. Atvirkštinė transkripcija

kDNR sintezė atliekama atvirkštinės transkripcijos būdu, naudojant RevertAid RT atvirkštinę transkriptazę ir išgrynintą dgRNR (žr. 2.2.1) kaip matricą. Atvirkštinės reakcijos mišinio komponentai ir jų kiekiai nurodyti 2.2.2 lentelėje. Individualiam atvejui naudoti pradmenys nurodyti 2.1.2 lentelėje (žr. 2.1.2).

Lentelė 2.2.2. Atvirkštinės transkripcijos reakcijos mišinių komponentai ir jų kiekiai.

Reakcijos mišinio komponentas	Kiekis
Gryna dgRNR (žr. 2.2.1)	0,01 pg–0,5 µg
10 µM tiesioginis pradmuo	1 µL
10 µM atvirkštinis pradmuo	1 µL
5× atvirkštinės transkriptazės buferinis tirpalas	4 µL
10 mM dNTP mišinys	2 µL
Revert AID RT atvirkštinė transkriptazė	1 µL
Sterilus vanduo	Iki 20 µL

Reakcija vykdoma 60 min. 42 °C ir fermentas inaktyvuojamas inkubuojant 5 min. 70 °C.

2.2.3. Polimerazinė grandininė reakcija

Gauta kDNR (žr. 2.2.2) padauginama polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) būdu naudojant termociklerį Biometra T-Personal 48 (Analytik Jena, Vokietija). Virusų nustatymui mielių *S. cerevisiae* kamienuose naudojama DreamTaq DNR polimerazė, o plazmidinių vektorių konstravimui reikalingų genų fragmentų padauginimui – Phusion High-Fidelity DNR polimerazė. Individualiam atvejui naudoti pradmenys nurodyti 2.1.2 lentelėje (žr. 2.1.2).

Lentelė 2.2.3.1. PGR reakcijos mišinių komponentai ir jų kiekiai.

Reakcijos mišinio komponentas	DreamTaq	Phusion HF
	Kiekis	
kDNR (žr. 2.2.2)	0,5–2 μ L	
10 μ M tiesioginis pradmuo	1 μ L	
10 μ M atvirkštinis pradmuo	1 μ L	
Atitinkamai 10 arba 5 $\times$ polimerazės buferinis tirpalas	2 μ L	4 μ L
10 mM dNTP mišinys	0,4 μ L	
Polimerazė	0,2 μ L	
Sterilus vanduo	Iki 20 μ L	

PGR reakcijų sąlygos nustatomos remiantis gamintojo rekomendacijomis. Pradmenų prilydimo temperatūros (X) apskaičiuojamos naudojant internetinę skaičiuoklę NEB Tm Calculator (<https://tmcaculator.neb.com/>). Jeigu PGR fragmentas naudojamas ligavimui, jis papildomai valomas nuo druskų naudojant GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit rinkinį remiantis gamintojo rekomendacijomis.

2.2.4. Plazmidinių vektorių konstravimas

Tikslinių baltymų (Gag ir Gag+mCherry) sintezei bakterijose ir mielėse atitinkamai naudojami pET28a ir pFX7 indukuojamos raiškos vektoriai (žr. 2.1.3). PGR metodu padaugintas L-BC GAG genas (žr. 2.2.3 ir 3.1) hidrolizuojamas Esp3I restrikcijos endonukleaze, gryninamas iš agarozinio gelio, fosforilinamas ir įterpiamas į defosforilintą bakterijų raiškos vektorių pET28a, hidrolizuotą NcoI bei Ecl136II restrikcijos endonukleazėmis. To paties GAG geno fragmento lipnūs galai užpildomi, fragmentas gryninamas iš agarozinio gelio ir įterpiamas į defosfosforilintą mielių raiškos vektorių pFX7, hidrolizuotą BglII restrikcijos endonukleaze. Gaunami pET28a- ir pFX7-L-BC-gag plazmidiniai vektoriai. mCherry baltymą koduojantis geno fragmentas hidrolizuojamas EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis iš prieš tai sukonstruotos plazmidės pYAK3-L-BC-gag+mCherry (nepublikuota, Gerda Skinderytė), gryninamas iš agarozinio gelio ir įterpiamas į sukonstruotą bakterijų raiškos vektorių pET28a-LBC-gag, hidrolizuotą tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis. Kitu atveju mCherry baltymą koduojantis geno fragmentas iš plazmidės pYAK3-L-BC-gag+mCherry hidrolizuojamas BcuI ir BshTI restrikcijos

endonukleazėmis, atliekamas lipnių galų užpildymas ir fragmentas įterpiamas į sukonstruotą mielių raiškos vektorių pFX7-L-BC-gag, hidrolizuotą BglII restrikcijos endonukleaze. Gaunami pET28a- ir pFX7-L-BC-gag+mCherry plazmidiniai vektoriai.

Plazmidinių vektorių konstravimui arba sekoskaitai reikalingos plazmidinės DNR išskyrimas atliekamas naudojant GeneJET Plasmid Miniprep Kit rinkinį. Fragmentų hidrolizė atliekama pasirinktomis restrikcijos endonukleazėmis. Po hidrolizės gauti fragmentai atskiriami 1 % agaroziniame gelyje (žr. 2.2.12), iš kurio gryninami naudojant GeneJET Gel Extraction Kit rinkinį. Fragmentų fosforilinimas atliekamas naudojant T4 polinukleotidų kinazę, o defosforilinimas – FastAP™ termojautrią šarminę fosfatazę. Lipnių DNR fragmentų galų užpildymas atliekamas naudojant Klenow fragmentą. Fragmentų įterpimas į raiškos vektorius atliekamas naudojant T4 DNR ligazę. Visos procedūros atliekamos remiantis gamintojo rekomendacijomis. Atliekant ligatais transformuotų bakterijų kolonijų atranką, plazmidinės DNR išskyrimas atliekamas šarminės lizės metodu (žr. 2.2.6). Plazmidinių vektorių konstravimui *in silico* ir sekoskaitos duomenų analizei naudojama programinė įranga SnapGene Viewer v5.3.2 (www.snapgene.com) ir Vector NTI Advance v11.0.

2.2.5. Kompetentinių *E. coli* ląstelių paruošimas ir cheminė transformacija

Plazmidžių padauginimui naudojamas *E. coli* DH10B kamienas, o rekombinantinių baltymų raiškai – BL21-AI. Pavienė bakterijų kolonija suspenduojama 10 mL skystos LB terpės ir auginama purtant 14–16 val., 37 °C. Naktinė kultūra skiedžiama santykiu 1:50 į 20 mL šviežios LB terpės ir ląstelės auginamos tomis pačiomis sąlygomis, kol ląstelių kultūros optinis tankis 600 nm bangos ilgyje pasiekia 0.5–0.6 optinio vieneto. Optinio tankio matavimai atliekami spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf, Vokietija). Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 1000 × g 4 °C ir resuspenduojamos ½ pradinio tūrio šalto Na tirpalo. Ląstelės centrifuguojamos 10 min. 1000 × g 4 °C, resuspenduojamos ½ pradinio tūrio Ca tirpalo ir 30–60 min. inkubuojamos lede. Centrifuguojama tokiomis pačiomis sąlygomis ir paruoštos kompetentinės ląstelės resuspenduojamos 1/12 pradinio tūrio Ca tirpalo. Jeigu ląstelės naudojamos ne iš karto, jos užšaldomos -80°C, pridėjus lygų tūrį sterilaus 50 % glicerolio.

Į 50 µL paruoštų kompetentinių bakterijų ląstelių pridedama 5 µL ligato arba 10–20 ng plazmidinės DNR ir mišinys inkubuojamas 15 min. lede. Atliekamas ląstelių temperatūrinis šokas inkubuojant 2 min. 42 °C ir mėginiai

dedami atgal į ledus. Pridedama 450 µL šviežios LB terpės ir inkubuojama 30–60 min. 37 °C termostate. Mėginiai su ligatu centrifuguojami 30 sek. 6000 × g, supernatantas pašalinamas, ląstelės resuspenduojamos 50 µL LB terpės ir paskleidžiamos ant agarizuotos LB terpės, papildytos reikiamu antibiotiku. Bakterijoms, transformuotoms plazmidėms pYAK3 ir pFX7 naudojamas ampicilinas (100 µg/mL), o pET28a – kanamicinas (50 µg/mL). Atliekant plazmidžių padauginimą, iš viso po atgaivinimo gauto tūrio (0,5 mL) ant agarizuotos terpės paskleidžiama tik 50 µL ląstelių. Plazmidėmis transformuotos bakterijų ląstelės auginamos 14–18 val. 37 °C.

2.2.6. Plazmidinės DNR išskyrimas šarminės lizės metodu

Apie 0,25 cm² ant agarizuotos LB terpės užaugusios bakterijų biomasės suspenduojama 100 µL 2× TE buferinio tirpalo. Pridedama 200 µL 0,1 M NaOH su 1 % SDS tirpalo ir atsargiai maišoma, mėgintuvėlį lėtai vartant 4–6 kartus. Mišinys inkubuojamas 5 min. 21 °C temperatūroje, pridedama 150 µL 3 M NaOAc (pH 7) tirpalo ir lėtai vartoma 4–6 kartus. Pridedama 450 µL chloroformo, lėtai vartoma 4–6 kartus ir centrifuguojama 10 min. 20 000 × g. Po centrifugavimo apie 300 µL vandeninės fazės perkeliama į naują mėgintuvėlį, pridedamas lygus tūris 100 % izopropanolio ir gerai išmaišoma. Centrifuguojama 5 min. 20 000 × g ir nuosėdos plaunamos 150 µL 70 % etanolio, gerai išmaišoma ir centrifuguojama 5 min. 20 000 × g. Pašalinus supernatantą nuosėdos džiovinamos ir tirpinamos 20 µL sterilaus vandens. Mėginiai analizuojami 1 % agaroziniame gelyje (žr. 2.2.12).

2.2.7. Kompetentinių *S. cerevisiae* ląstelių paruošimas ir transformacija

Pavienė *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] kolonija suspenduojama 10 mL YPD terpės ir auginama purtant 16–20 val. 30 °C. Naktinė kultūra skiedžiama santykiu 1:50 į 20 mL šviežios YPD terpės ir ląstelės auginamos tomis pačiomis sąlygomis, kol dienos mielių kultūros optinis tankis 600 nm bangos ilgyje pasiekia 1,0 optinį vienetą. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. 1000 × g ir suspenduojamos 25 mL 1× TE tirpalo. Ląstelės centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis ir resuspenduojamos 1,5 mL LTE tirpalo bei inkubuojamos 10 min.

Į 100 µL paruoštų kompetentinių ląstelių pridedama 1–2 µg plazmidinės DNR ir 700 µL LPTE tirpalo. Mišinys gerai išmaišomas ir inkubuojamas 30 min. 30 °C. Į mišinį dedama 88 µL DMSO tirpalo, gerai išmaišoma ir inkubuojama 7 min. 42 °C. Po temperatūrinio šoko ląstelės centrifuguojamos 1 min. 6000 × g, resuspenduojamos 1 mL šviežios YPD terpės ir

inkubuojamos purtant 14–16 val., 30 °C. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 1 min. $6000 \times g$, resuspenduojamos 1 mL $1 \times$ TE tirpalo ir centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Ląstelės resuspenduojamos 50 μ L $1 \times$ TE tirpalo, paskleidžiamos ant agarizuotos YPD terpės, papildytos 0,024 % formaldehido, ir auginamos apie 48–72 val. 30 °C.

2.2.8. Rekombinantinių baltymų sintezė bakterijose

Pavienė pET28a plazmide transformuoto *E. coli* BL21-AI kamieno kolonija suspenduojama 20 mL skystos LB terpės, papildytos 50 μ g/mL kanamicino, ir auginama purtant 16–18 val. 37 °C. Naktinė kultūra skiedžiama santykiu 1:50 į 600 mL šviežios LB terpės, papildytos 50 μ g/mL kanamicino, ir ląstelės auginamos tomis pačiomis sąlygomis, kol kultūros tankis 600 nm bangos ilgyje pasiekia 0,7–0,8 optinio vieneto. Rekombinantinio baltymo sintezė indukuojama į terpę pridėjus 0,1 % L-arabinozės ir 0,1 mM IPTG (jeigu nenurodyta kitaip). Indukcija atliekama kultūrą purtant 4 val. 21 °C temperatūroje. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. $5000 \times g$ 4 °C. Jeigu ardymas atliekamas ne iš karto, biomasė užšaldoma -20 °C šaldiklyje.

Surinkta bakterijų biomasė resuspenduojama 10 tūrių ardymo buferinio tirpalo (1 g biomasės – 10 mL tirpalo) su 1 mM PMSF ir atliekamas ardymas ultragarsu, 40 % amplitudė, 6–7 kartus po 40 sek., po kiekvieno ardymo darant 40 sek. pertraukas. Ardymui naudojamas ultragarsinis sonikatorius Vibra-cell VCX-130 (Sonics and Materials, JAV). Mėginiai viso ardymo proceso metu laikomi lede. Po ardymo tirpi baltymų frakcija nuo suardytų ląstelių ir netirpių baltymų frakcijos atskiriama centrifuguojant 15 min. $15\,000 \times g$ 4 °C. Baltymų frakcijos analizuojamos SDS-PAGE gelyje (žr. 2.2.13).

2.2.9. Rekombinantinių baltymų sintezė mielėse

Pavienė pFX7 plazmide transformuoto *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] kamieno kolonija suspenduojama 250–300 mL YPD terpės, papildytos 0,012 % formaldehido, ir auginama purtant 16–24 val. 30 °C. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. $1000 \times g$ 4 °C ir perkeliama į 300 mL YPG indukcijos terpės su 2 % galaktozės, papildytos 0,012 % formaldehido. Indukcija atliekama kultūrą purtant 16–24 val. 30 °C (jeigu nenurodyta kitaip). Ląstelės surenkamos centrifuguojant 10 min. $1000 \times g$ 4 °C ir resuspenduojamos viename tūryje ardymo buferinio tirpalo (1 g biomasės – 1 mL tirpalo) su 1 mM PMSF. Pridedamas dvigubas kiekis 212–300 μ m skersmens stiklo rutuliukų (1 g biomasės – 2 g rutuliukų). Ląstelės ardamos stipriai purtant 10 kartų po 30 sek., po kiekvieno purtymo mėginius 30 sek.

perkeliant į ledus. Ardymui naudojamas purtytuvas Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, JAV). Po ardymo gautas mielių ląstelių lizatas centrifuguojamas 10 min. $1000 \times g$ 4 °C, kad būtų pašalintos ląstelių nuolaužos ir stiklo rutuliukai. Surinktas lizatas dar kartą centrifuguojamas 10 min. $10\,000 \times g$ 4 °C, kad būtų atskirta tirpi ir netirpi baltymų frakcijos. Baltymų frakcijos analizuojamos SDS-PAGE gelyje (žr. 2.2.13).

2.2.10. Į virusus panašių dalelių gryninimas

Tiriant mielių virusų ryšį su ląstelės šeimininkės metabolizmu, dalelių išsodinimui iš tirpių baltymų frakcijos naudojamas išsodinimo PEG reagentu metodas – į tirpių baltymų frakciją pridedama 0,25 tūrio PEG išsodinimo reagento (1 mL frakcijos – 0,25 mL reagento) ir inkubuojama 30 min. lede. Centrifuguojama 10 min. $15000 \times g$ 4 °C, išsodintos dalelės resuspenduojamos 0,6 tūrio PEG plovimo tirpale (1 mL frakcijos – 0,6 mL tirpalo). Centrifuguojama 5 min. $15000 \times g$ 4 °C, supernatantas pašalinamas ir nuosėdų frakcija su dalelėmis resuspenduojama 220 µL ardymo buferinio tirpalo.

Susintetintų VLP išsodinimui naudojamas dalelių išsodinimas ultracentrifuguojant. Iš mielių arba bakterijų gauta tirpių baltymų frakcija skiedžiama ardymo buferiniu tirpalu iki 15 mL ir visas tūris atsargiai užpilamas ant 15 mL 45 % sacharozės-ardymo buferinio tirpalo. Dalelių išsodinimas atliekamas centrifuguojant 16–18 val. $76\,000 \times g$ 4 °C, naudojant ultracentrifugą MSE MS60 (Sanyo, Japonija) ir rotorį TST 28.38 (Kontron, Vokietija). Supernatantas pašalinamas, o nuosėdų frakcija su dalelėmis resuspenduojama 300 µL ardymo buferinio tirpalo.

Išsodintos dalelės lėtai pilamos ant 2,4 mL $1,36 \text{ g/cm}^3$ tankio cezio chlorido-ardymo buferinio tirpalo. Dalelių gryninimas atliekamas ultracentrifuguojant 24 val. $75\,000 \times g$ 4 °C, naudojant tą pačią ultracentrifugą ir rotorį TST 60.4 (Kontron, Vokietija). Po ultracentrifugavimo surenkamos 9 frakcijos. Mėginiai analizuojami SDS-PAGE gelyje (žr. 2.2.13).

2.2.11. Buferinio tirpalo pakeitimas

Mėginių buferinių tirpalų keitimas atliekamas naudojant 0,5 mL talpos gelfiltracines kolonėles Zeba™ Spin, skirtas baltymams, kurių molekulinė masė didesnė už 7 kDa (7K MWCO). Prieš naudojimą nulaužiama kolonėlės apačia, kolonėlė perkeliama į mėgintuvėlį ir atlaisvinus dangtelį kolonėlė centrifuguojama 1 min. $1500 \times g$ 4 °C, kad būtų pašalinamas kolonėlės saugojimo buferinis tirpalas. Ant kolonėlės pilama 300 µL pasirinkto tirpalo, į kurį keičiamas esamas tirpalas, ir centrifuguojama 1–2 min. $1500 \times g$ 4 °C.

Šis procesas kartojamas tris kartus. Kolonėlė perkeliama į naują mėgintuvėlį ir ant jos pilama 70–130 μL baltyminio mėginio. Centrifuguojama 2 min. 1500 $\times$ g 4 $^{\circ}\text{C}$ ir gaunamas baltyminis mėginys su pakeistu tirpalu.

2.2.12. Nukleorūgščių elektroforezė agaroziniame gelyje

Nukleorūgščių mėginiai sumaišomi su 6 $\times$ DNR užnešimo dažų DNA Gel Loading Dye. Kaip molekulinės masės standartas naudojamas mišinys Generuler DNA Ladder Mix. DNR elektroforezė atliekama 1 % agaroziniame gelyje, paruoštame 1 $\times$ TAE buferiniame tirpale, horizontalioje elektroforezės vonelėje Wide Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad, JAV), naudojant elektroforezės srovės šaltinį PowerPac™ HC High-current (Bio-Rad, JAV). Gelis dažomas vandeniniame etidžio bromido tirpale (0,5 $\mu\text{g/mL}$) 2–3 min. ir plaunamas vandenyje 10–15 min. DNR fragmentai vizualizuojami naudojant UV transiluminatorių Gel Doc XR+ (Bio-Rad, JAV).

2.2.13. Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

Baltyminiai mėginiai sumaišomi su 5 $\times$ SDS-PAGE mėginio paruošimo buferiniu tirpalu, turinčio βME , ir kaitinami 10 min. 95 $^{\circ}\text{C}$. Kaip molekulinės masės standartas naudojamas mišinys PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder arba PageRuler™ Unstained Protein Ladder. Paruošti mėginiai frakcionuojami gelyje, sudarytame iš 5,6 % koncentruojančio ir 10,8 % frakcionuojančio gelio sluoksnių, 1 $\times$ Tris-Gly-SDS elektroforezės buferiniame tirpale. Elektroforezė atliekama vertikalios elektroforezės vonelėje Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, JAV), naudojant elektroforezės srovės šaltinį EV265 (Consort, Belgija). Mėginiai koncentruojami 10 min. esant 15 mA/1 geliui srovės stipriui ir frakcionuojami 45–60 min. esant 25 mA/1 geliui srovės stipriui. Gelis dažomas CBB R-250 dažymo tirpale švelniai purtant 10–20 min. Nupylus dažą, gelis blukinamas 30 % izopropanolio ir 10 % acto rūgšties tirpale švelniai purtant 10–20 min. ir perkeliamas į vandenį. Baltymų koncentracijos nustatymui poliakrilamidiniame gelyje naudojama programinė įranga ImageJ v1.53t (Schneider *et al.*, 2012).

2.2.14. Vidutinio dalelių dydžio tirpale nustatymas

Vidutinio dalelių dydžio matavimai atliekami naudojant analizatorių Zetasizer μV su 4 mW HeNe lazeriu (633 nm) (Malvern Panalytical, Jungtinė

Karalystė). Išsklaidytos šviesos intensyvumo matavimai atliekami 22 °C, 90° kampu, naudojant 2 µL talpos kvarcinę kiuvetę ZMV1002 (Malvern Panalytical, Jungtinė Karalystė). Dalelių dydžio pasiskirstymas gaunamas iš koreliacijos funkcijų. Gauti duomenys konvertuojami naudojant programinę įrangą Malvern Zetasizer v8.02 (<https://www.malvernpanalytical.com/en>). Matavimams naudojami VLP mėginiai, kuriuose baltymų koncentracija yra 0,4–0,6 mg/mL. Prieš kiekvieną mėginį atliekamas 30 sek. prietaiso kalibravimas. Tas pats mėginys matuojamas tris kartus ir išvedamas vidurkis. Vidutinio dalelių dydžio grafikai sudaromi naudojant programinę įrangą GraphPad Prism v.8.0.1 (www.graphpad.com).

2.2.15. Mėginių analizavimas elektroniniu mikroskopu

Ant anglimi dengto vario tinklelio pilama 3 µL VLP mėginio, kuriame baltymų koncentracija yra 0,1–0,2 mg/mL. Po 1 min. tinklelis nusauginamas filtriniu popieriumi, 10 s. plaunamas 3 µL sterilaus vandens ir vėl nusauginamas. Mėginys 10 s. dažomas 3 µL 2 % uranilo acetato tirpalu, nusauginamas ir papildomai džiovinamas 1 min. atvirame ore. Dalelių vizualizavimas atliekamas transmisiniu elektronų mikroskopu Morgagni 268 (D) (FEI, Olandija) arba Talos™ L120C (Thermo Fisher Scientific). Struktūrų dydžio nustatymui gautose mikrografijose naudojama programinė įranga ImageJ v1.53t (Schneider *et al.*, 2012).

2.2.16. Terminio poslinkio tyrimas

Terminio poslinkio vertinimas atliekamas naudojant realaus laiko PGR prietaisą Rotor-Gene Q (Qiagen, Vokietija). Į 10 µL VLP mėginio, kuriame baltymų koncentracija yra 0,4 mg/mL, pridedama 0,2 µL 10 mM 1-anilino-8-naftalenosulfono rūgšties (ANS) fluorescentinio dažo, ištirpinto 100 % DMSO tirpale. Paruošto mišinio temperatūra didinama po 1 °C per min. nuo 25 iki 99 °C, išmatuojant reporterinį signalą kiekviename etape. Fluorescencijos sužaditimui naudojama 365 nm bangos ilgio šviesa, o detekcijai – 460 nm. Mėginių lydymosi temperatūrų (T_m) nustatymui naudojamas programinės įrangos įrankis Thermott (Gedgaudas *et al.*, 2022.). Fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros diagramos sudaromos naudojant programinę įrangą GraphPad Prism v.8.0.1 (www.graphpad.com).

2.2.17. Nizino įkapsuliavimas į virusus panašias daleles

Ruošiamas 300 μM (1 mg/mL) koncentracijos pradinis antimikrobinio peptido nizino Z vandeninis tirpalas, kuris saugomas 4 °C iki naudojimo. Prieš įkapsuliavimo tyrimą pradinis nizino tirpalas skiedžiamas steriliu vandeniu iki 220, 22 ir 2,2 μM (atitinkamai 0,74, 0,074, 0,0074 mg/mL). Naudojant gelfiltracines kolonėles Zeba™ Spin (7K MWCO) (žr. 2.2.11), ruošiamas 0,22 μM (2 mg/mL) koncentracijos dalelių mėginys 2× natrio fosfato ir citrato buferiniame tirpale (pH 6) su 300 mM NaCl ir 20 mM EDTA. VLP mėginys (0,22 μM) natrio fosfato ir citrato buferiniame tirpale lygiais tūriais maišomas su vandeniniais nizino tirpalais (220, 22 ir 2,2 μM). Taip gaunami VLP:nizino mišiniai, kurių moliniai santykiai yra 1:1000, 1:100 ir 1:10. Šiuose mišiniuose prieš filtravimą VLP molinė koncentracija yra 0,11 μM , o nizino – atitinkamai 110, 11 ir 1,1 μM . Paruošti VLP:nizino mišiniai inkubuojami lengvai purtant 16 val. 4 °C. Neįkapsuliuotas nizinas pašalinamas filtravimo būdu, naudojant koncentravimo kolonėles Pierce™, skirtas didesniems nei 100 kDa baltymams, remiantis gamintojo rekomendacijomis. Po filtravimo atliekamas papildomas dalelių plovimas 500 μL natrio fosfato ir citrato buferinio tirpalo (pH 6) su 150 mM NaCl ir 10 mM EDTA. Po koncentravimo sumažėjęs mėginių tūris atstatomas iki pradinio, naudojant tą patį natrio fosfato ir citrato buferinį tirpalą. Įkapsuliavimo vertinimui atliekamas gautų mėginių antibakterinio aktyvumo nustatymas (žr. 2.2.18).

2.2.18. Antibakterinio aktyvumo nustatymas

Antibakterinis mėginių aktyvumas vertinamas kaip gram-teigiamų bakterijų indikatorius naudojant *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ir *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 bakterijų kamienus. 20 μL analizuojamo mėginio užnešama ant agarizuotos LB terpės su paskleistomis *B. subtilis* ir *S. aureus* kultūromis, taip pat ant agarizuotos triptono-sojų terpės su inokuliuotomis *S. pyogenes* bakterijomis (2×10^7 ląst./lėkštelėje). Po 24 val. inkubacijos 37 °C temperatūroje išmatuojamos augimo slopinimo zonos. Iš viso atliekami 5 biologiniai pakartojimai ir apskaičiuojamas vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm\text{SN}$). Šis tyrimas atliktas Gamtos tyrimų centro Genetikos laboratorijos darbuotojų.

2.2.19. Žinduolių ląstelių transdukcija

Plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos ląstelės kultivuojamos T25 talpos induose 5 mL žinduolių kultivavimo terpės 37 °C 5 % CO_2 ir 95 %

drėgmės termostate S-Bt Smart Biotherm (Biosan, Latvija). Po 2–3 dienų pašalinama sena terpė, ląstelės plaunamos 5 mL 1× PBS tirpalo ir atkeliamos nuo auginimo talpos paviršiaus 0,5 mL disociacijos reagento TrypLE™ Express, inkubuojant 2,5 min. termostate. Po atkėlimo ląstelės resuspenduojamos 5 mL šviežios žinduolių kultivavimo terpės ir perkeliamos į naują T25 talpos kultivavimo indą atskiedus iki reikiamo ląstelių tankio.

Į 96 (MTT testui) arba 24 (fluorescencinei analizei) šulinėlių kultivavimo plokšteles pilamas reikiamas kiekis ląstelių kultivavimo terpėje (lentelė 2.2.18). Ląstelės kultivuojamos 16–20 val. tomis pačiomis sąlygomis. Pašalinama sena kultivavimo terpė ir užpilamas 1 mL (24 šulinėlių plokštei) arba 100 µL (96 šulinėlių plokštei) šviežios kultivavimo terpės su reikiama VLP mėginio koncentracija. Pradiniai VLP mėginiai ruošiami PBS tirpale. Ląstelių transdukcija dalelėmis atliekama 4, 24, 48 arba 72 val. (lentelė 2.2.19), inkubuojant tame pačiame termostate.

Lentelė 2.2.19. Laikas ir ląstelių skaičius, naudotas A549 linijos ląstelių transdukcijos tyrimui.

Transdukcijos trukmė	Ląstelių sk. šulinėliui
96 šulinėlių plokštelė (MTT testui)	
24 val.	5000
48 val.	2300
72 val.	1500
24 šulinėlių plokštelė (fluorescencinei analizei)	
Iki 4 val.	50 000
24 val.	30 000
48 val.	13 800
72 val.	6000

Ląstelių kultivavimui naudojant 24 šulinėlių plokšteles, prieš ląstelių perkėlimą į šulinėlius papildomai įdedami sterilūs dengiamieji mikroskopavimo stikliukai.

2.2.20. Žinduolių ląstelių fluorescencinė analizė ir gyvybingumo vertinimas

Dalelių patekimas į A549 ląsteles vertinamas atliekant mėginių fluorescencinės mikroskopijos analizę mikroskopu AX70 (Olympus, Japonija), naudojant 60× objektyvą su imersiniu aliejumi. Po transdukcijos iš 24 šulinėlių plokštelės pašalinama transdukcijos terpė ir ląstelės du kartus plaunamos 1 mL dPBS tirpalo. Ląstelės fiksuojamos 0,4 mL 3 % PFA tirpalu su 1 µg/mL branduolio lokalizacijos dažu Hoechst 33342 ir inkubuojama 20 min. 21 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos 1 mL dPBS tirpalo, tirpalas

nusiurbiamas ir pincetu išimamas dengiamasis mikroskopavimo stikliukas. Jis dedamas ant objektinio mikroskopavimo stikliuko, su prieš tai užteptu reagentu ProLong™ Diamond Antifade Mountant, skirtu ilgiau išsaugoti fluorescencijos signalą mikroskopuojamuose mėginiuose. Branduolių, nudažytų dažų Hoechst 33342, fluorescencijai stebėti naudojamas U-MWU filtras, o su mCherry sulietų dalelių – U-MWG. Vaizdai fotografuojami nespalvine kamera ORCA-spark (Hamamatsu, Japonija). Fluorescencinių nuotraukų paruošimui naudojama programinė įranga ImageJ v1.53t (Schneider *et al.*, 2012).

Mėginių poveikis A549 ląstelių santykiniam gyvybingumui nustatytas MTT testu. Jis pagrįstas geltonos spalvos MTT reagento redukcija iki violetinės spalvos produkto. Po transdukcijos iš 96 šulinėlių plokštelės pašalinama transdukcijos terpė ir ląstelės du kartus plaunamos 150 μ L dPBS tirpalo. Tirpalas nusiurbiamas, užpilama 100 μ L auginimo terpės su 0,5 mg/mL MTT reagento ir inkubuojama 4 val. 37 °C. Tirpalas pašalinamas ir susidarę kristalai tirpinami 100 μ L izopropanolio 10 min. Mėginių sugertis 565 nm bangos ilgyje išmatuojama plokštelių skaitytuvu Infinite M Nano (Tecan, Šveicarija). Santykinis ląstelių gyvybingumas apskaičiuojamas paveiktų ląstelių sugertį padalinant iš kontrolinių (neveiktų) ląstelių sugerties, prieš tai iš visų mėginių atėmus tuščių mėginių sugertį (foną). Iš viso atliekami 6 biologiniai pakartojimai ir apskaičiuojamas vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN). Skaičiavimai atliekami programine įranga Microsoft Excel.

2.2.21. Rezultatų statistinė analizė

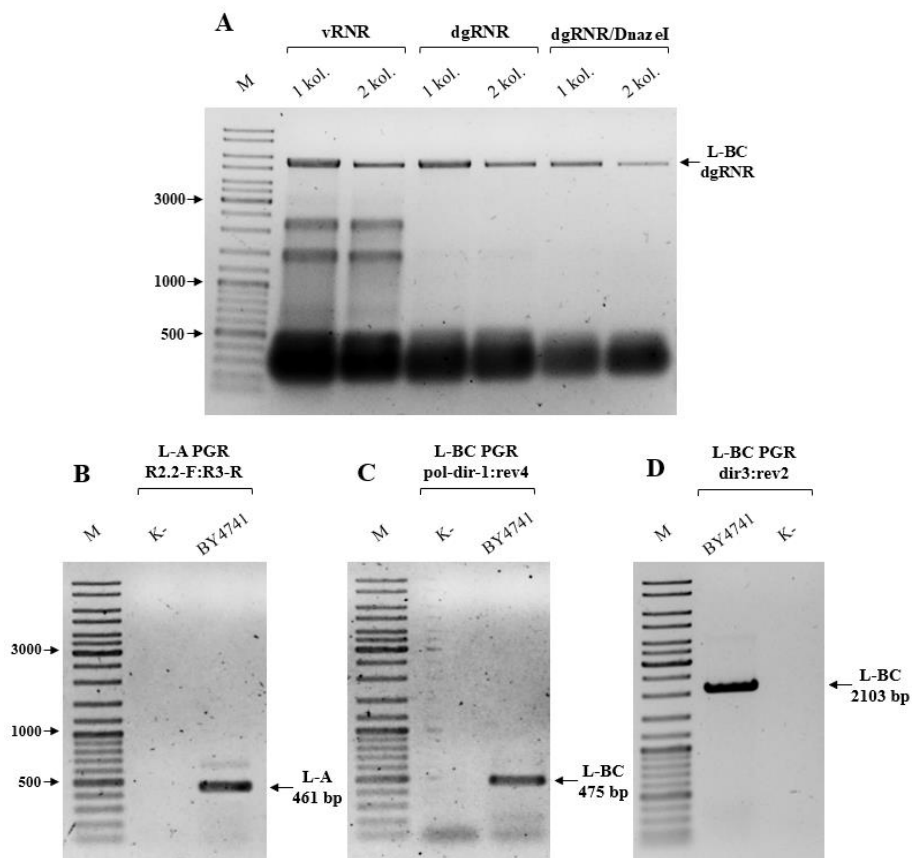
Statistinis rezultatų reikšmingumas vertinamas naudojant vienusį ANOVA metodą, taikant Tukey daugialypio palyginimo testą ir yra pateikiamas kaip nurodyta: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****). Statistinė analizė atliekama naudojant programinę įrangą GraphPad Prism v.8.0.1 (www.graphpad.com).

3. REZULTATAI

Šio darbo metu tirtos *S. cerevisiae* viruso L-BC-1 Gag baltymo formuojamų į virusus panašių dalelių savybės ir pritaikymo galimybės. Skyriuje pateikti rezultatai, apimantys raiškos vektorių su virusiniais genais kūrimą, dalelių sintezę bakterijose *E. coli* bei mielėse *S. cerevisiae*, jų gryninimą ir vizualizavimą bei dalelių stabilumo skirtingose sąlygose tyrimus. Nustačius dalelių savybes, įvertintos jų įkapsuliavimo galimybės bei poveikis žinduolių ląstelėms. Darbai atlikti Vilniaus universiteto Biomokslų instituto Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje.

3.1. Raiškos vektorių konstravimas

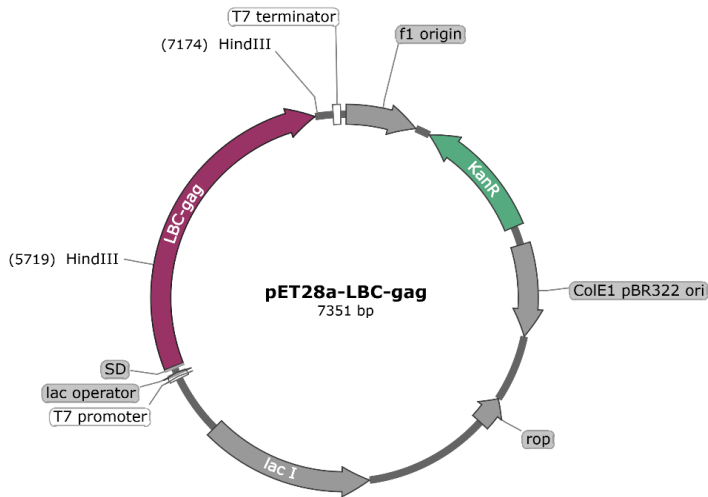
Raiškos vektorių konstravimui reikalingas L-BC viruso GAG genas padaugintas PGR metodu iš mielių *S. cerevisiae* BY4741 kamieno. Šiame kamieno, kaip ir daugelyje kitų, randami abiejų tipų natyvūs L-A bei L-BC virusai (Ramírez-Garrastacho ir Esteban, 2011). Kadangi šie virusai turi dgRNR genomą (~4,6 kb), pradžioje atliktas vRNR išskyrimas iš BY4741 kamieno biomasės. Iš vRNR frakcijos išgryninta dgRNR buvo paveikta DNazėI, kad būtų pašalinami bet kokie genominės DNR likučiai (3.1.1 pav. A). Atvirkštinės transkripcijos būdu, naudojant L-A-1 bei L-BC virusų *POL* genų sritims specifinius pradmenis ir DNazėI paveiktą dgRNR kaip matricą, susintetinta kDNR, kuri padauginta PGR metodu. Atlikus gautų produktų analizę 1 % agaroziniame gelyje BY4741 kamieno nustatyti abu virusai, L-A-1 (461 bp produktas) (3.1.1 pav. B) bei L-BC (475 bp produktas) (3.1.1 pav. C). Naudojant pilnam L-BC GAG genui specifinius pradmenis ir tą pačią matricą, atvirkštinės transkripcijos bei PGR metodais susintetintas pilno ilgio GAG geno fragmentas (1–697 a. r., 2094 bp), reikalingas plazmidžių konstravimui (3.1.1 pav. D). Naudojant pradmenis GAG geno 5' gale įterpta *Esp3I* restrikcijos endonukleazės atpažinimo seka, todėl galutinis GAG geno fragmento dydis pailgėjo 9 nukleotidais (2103 bp).



Pav. 3.1.1. Natyvių L-A-1 ir L-BC virusų nustatymas *S. cerevisiae* BY4741 kamienne ir Gag baltymą koduojančio geno padauginimas. (A) Iš BY4741 kamieno dviejų pavienių kolonijų išskirta vRNR frakcija, iš kurios išgryninta dgRNR ir veikiant DNazė pašalinta genomine DNR. (B) L-A-1 ir (C) L-BC virusų identifikavimas atvirkštinės transkripcijos ir PGR metodais, naudojant L-A-1 ir L-BC virusų *POL* genams specifinius pradmenis, atitinkamai R2.2-F:R3-R bei pol-dir-1:rev4, bei DnazeI paveiktą dgRNR kaip matricą. (D) Pilno ilgio L-BC GAG geno sintezė atvirkštinės transkripcijos ir PGR metodais, naudojant L-BC viruso visam GAG genui specifinius pradmenis dir3:rev2 ir tą pačią matricą. K- – PGR produktas, gautas į reakcijos mišinį įdėjus atvirkštinės transkripcijos produktą, bet nenaudojant atvirkštinės transkriptazės fermento (neigiama kontrolė). M – DNR molekulinės masės standartas GeneRuler™ DNA Ladder Mix.

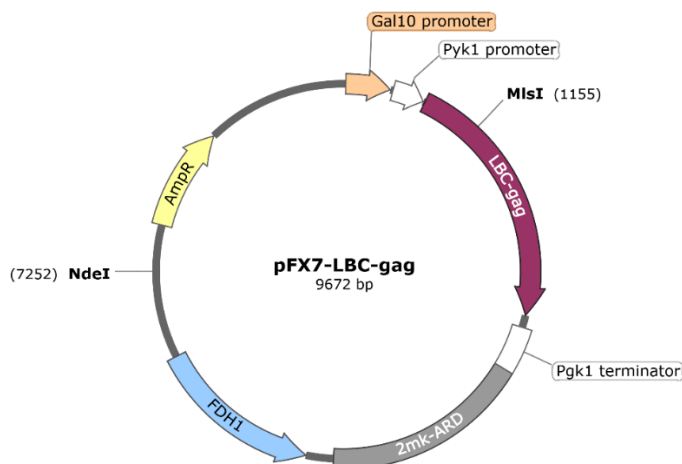
PGR būdu padaugintas pilno ilgio GAG geno fragmentas (2103 bp) hidrolizuotas Esp3I restrikcijos endonukleaze, suformuojant lipnų galą 5' gale, išgrynintas iš agarozinio gelio ir fosforilintas. Fragmentas įterptas į defosforilintą bakterijų indukuojamos raiškos vektorių pET28a, hidrolizuotą NcoI bei Ecl136II restrikcijos endonukleazėmis. Gautas bakterijų raiškos vektorių pET28a-L-BC-gag (3.1.2 pav.). Kolonija su pET28a vektoriuje teisingai įterptu GAG genu atrinkta atliekant išskirtos plazmidinės DNR

hidrolizę HindIII restrikcijos endonukleaze (hidrolizės vietos nurodytos 3.1.2 pav.).



Pav. 3.1.2. Bakterijų raiškos vektoriaus pET28a-L-BC-gag schema. Vektorius turi IPTG indukuojamą T7 promotorių, *lac* operatorių, *lac* represorių (*lac I*), ribosomų prisijungimo sritį (SD), L-BC GAG geno, koduojančio pagrindinį L-BC viruso kapsidės baltymą Gag, fragmentą, bei T7 terminatorių. Vektorius turi dvi DNR replikacijos pradžios sekas – bakteriofagų (f1) ORI DNR ir bakterijų (ColE1 pBR322) ORI DNR sekas. Vektoriaus atrankos žymenys: Kan^R genas, suteikiantis bakterijoms atsparumą kanamicinui.

To paties pilno ilgio GAG geno fragmento (3.1.1 pav. D) lipnūs galai užpildyti, fragmentas išgrynintas iš agarozinio gelio ir įterptas į defosfosforilintą mielių indukuojamos raiškos vektorių pFX7, hidrolizuotą BglII restrikcijos endonukleaze. Gautas mielių raiškos vektorius pFX7-L-BC-gag (3.1.3 pav.). Kolonija su pFX7 vektoriuje teisingai įterptu GAG genu atrinkta atliekant išskirtos plazmidinės DNR hidrolizę MlsI ir NdeI restrikcijos endonukleazėmis (hidrolizės vietos nurodytos 3.1.3 pav.).

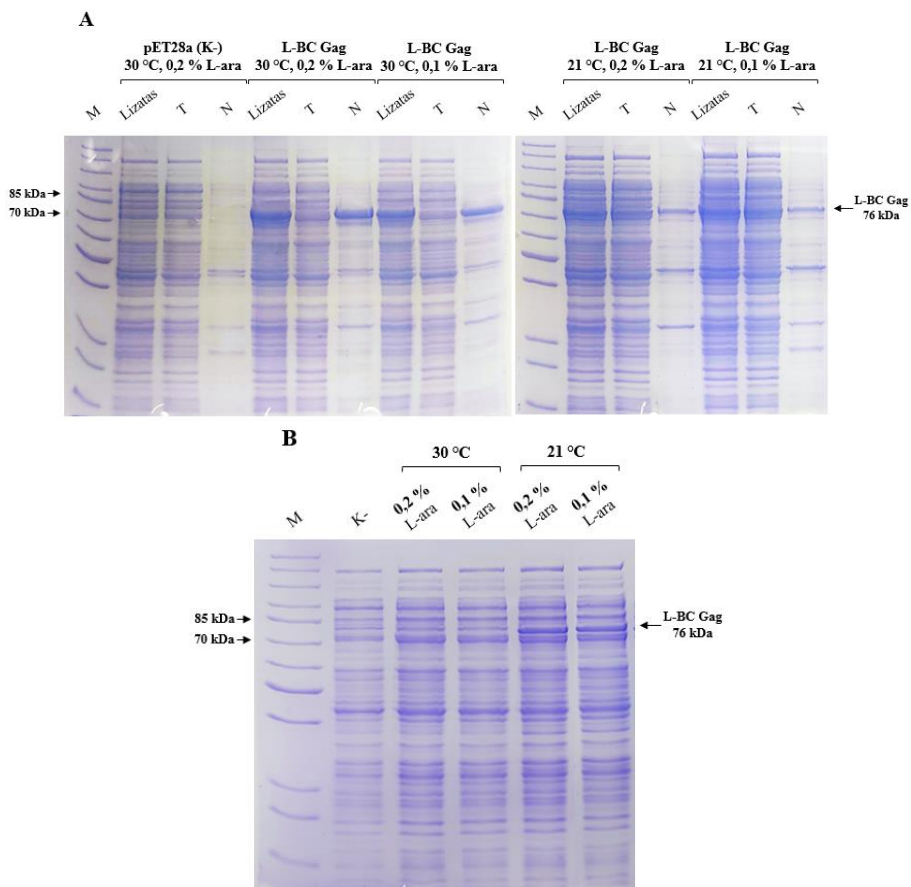


Pav. 3.1.3. Mielių raiškos vektoriaus pFX7-L-BC-gag schema. Vektorius turi galaktoze indukuojamą *GAL10* promotorių, *PYK1* geno, koduojančio piruvatkinazę, promotoriaus fragmentą, L-BC GAG geno, koduojančio pagrindinį L-BC viruso kapsidės baltymą Gag, fragmentą, bei *PGK1* terminatorių. Vektorius turi dvi DNR replikacijos pradžios sekas: mielių 2 μ plazmidės ORF ir bakterijų ORI DNR fragmentą. Vektoriaus atrankos žymenys: mielių *Candida maltosa* *FDH1* genas, koduojantis formaldehido dehidrogenazę ir suteikiantis mielėms atsparumą formaldehidui, bei Amp^R genas.

Sukonstruoti rekombinantinio L-BC Gag baltymo raiškos vektoriai pET28a-L-BC-gag ir pFX7-L-BC-gag padauginėti bakterijų *E. coli* DH10B kamienne. Atlikta į vektorius įterpto GAG geno sekoskaita ir gautos sekos analizuotos naudojant programinę įrangą Vector NTI Advance v11.0 – mutacijų nenustatyta.

3.2. Gag baltymo sintezė bakterijose ir mielėse

Transformavus *E. coli* BL21-AI kamieną raiškos vektoriumi pET28a-L-BC-gag, atliktas Gag baltymo (~76 kDa) sintezės optimizavimas. Sinezė atlikta 4 val. esant skirtingoms temperatūroms ir keičiant vieno iš induktoriaus, L-arabinozės, kiekį indukciniėje terpėje. Antrojo induktoriaus IPTG koncentracija terpėje buvo fiksuota (0,1 mM). Pradiniai induktorių kiekiai pasirinkti remiantis literatūra (Serrano *et al.*, 2021). Surinkta bakterijų biomasė suardyta ultragarsiniu homogenizatoriumi ir centrifuguojant atskirta tirpi bei netirpi baltymų frakcijos. Netirpių baltymų frakcija suspenduota ardymo buferiniame tirpale, kurio tūris atitiko tirpių baltymų frakcijos tūrį. Vienodi tūriai gautų baltyminių mėginių analizuoti SDS-PAGE (3.2.1 pav.).

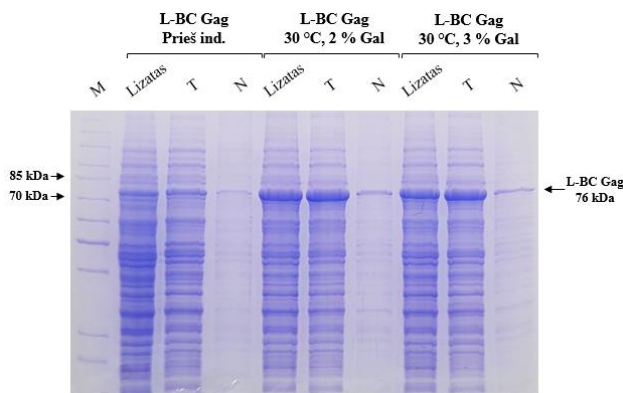


Pav. 3.2.1. *E. coli* BL21-AI kamiene susintetinto Gag baltymo tirpumo analizė poliakriamidiniame gelyje. (A) Gag baltymo tirpumo nustatymas, sintezę atliekant skirtingose temperatūrose (30 °C, 21 °C) ir naudojant skirtingus induktoriaus L-arabinozės (L-ara) kiekius (0,2 %, 0,1 %). (B) Tirpaus Gag baltymo kiekio palyginimas, sintezę atliekant skirtingomis sąlygomis. K- – baltymų frakcijos, gautos iš bakterijų, transformuotų pET28a vektoriumi (neigiama kontrolė). L-BC Gag – baltymų frakcijos, gautos iš bakterijų, transformuotų pET28a-L-BC-gag vektoriumi. Lizatas – bendra baltymų frakcija, gauta po biomasės suardymo. T – tirpių baltymų frakcija. N – netirpių baltymų frakcija. M – baltymų molekulinės masės standartas PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Nustatyta, kad Gag baltymo sintezę atliekant bakterijose 4 val. 30 °C temperatūroje, esant 0,1–0,2 % L-arabinozės ir 0,1 mM IPTG kiekiui indukcinėje terpėje, sintetinas netirpus Gag baltymas. Sinezę atliekant žemesnėje 21 °C (kambario) temperatūroje Gag baltymas sintetinas tiek tirpioje, tiek netirpioje formose (3.2.1 pav. A). Palyginus skirtingomis sąlygomis gauto tirpaus Gag baltymo kiekį matoma, kad jis nepriklauso nuo L-arabinozės kiekio, todėl tolimesniems tyrimams pasirinktas mažesnis (0,1 %) L-arabinozės kiekis indukcinėje terpėje (3.2.1 pav. B). Kadangi gautas

pakankamas kiekis tirpaus Gag baltymo, IPTG kiekis indukcinėje terpėje neoptimizuotas.

Raiškos vektoriumi pFX7-L-BC-gag transformavus *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] kamieną, Gag baltymo sintezė atlikta 20 val. 30 °C temperatūroje, naudojant standartinę 3 % (Gedvilaite *et al.*, 2000; Plečkaitytė *et al.*, 2011; Nainys *et al.* 2014; Špakova *et al.*, 2019) arba mažesnę 2 % galaktozės koncentraciją indukcinėje terpėje. Surinkta mielių biomasė suardyta stiklo rutuliukais ir centrifuguojant atskirta tirpi bei netirpi baltymų frakcijos. Netirpių baltymų frakcija suspenduota ardymo buferiniame tirpale, kurio tūris atitiko tirpių baltymų frakcijos tūrį. Vienodi tūriai gautų baltyminių mėginių analizuoti SDS-PAGE (3.2.2 pav.).



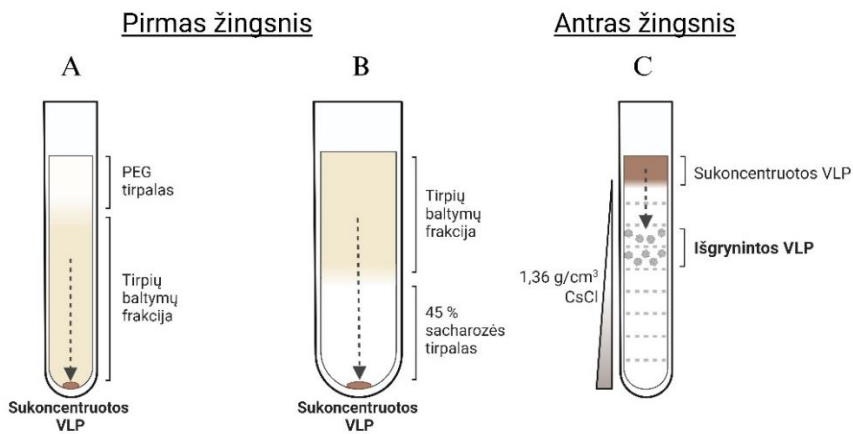
Pav. 3.2.2. *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] kamiene susintetinto Gag baltymo tirpumo analizė poliakrilamidiniame gelyje. Gag baltymo tirpumui nustatyti sintezė atlikta 30 °C temperatūroje, naudojant skirtingus induktoriaus galaktozės kiekius (2, 3 %). L-BC Gag – baltymų frakcijos, gautos iš mielių, transformuotų pFX7-L-BC-gag vektoriumi. Lizatas – bendra baltymų frakcija gauta po biomasės suardymo. T – tirpių baltymų frakcija. N – netirpių baltymų frakcija. M – baltymų molekulinės masės standartas PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Atlikta baltyminių mėginių analizė rodo, kad sintezę atliekant mielėse 20 val. 30 °C temperatūroje, į indukcinę terpę pridėjus 2 arba 3 % galaktozės, sėkmingai sintetinamas didelis tirpaus L-BC Gag baltymo kiekis. Esminiai skirtumai, naudojant mažesnę ar didesnę galaktozės kiekį, nenustatyti, todėl tolimesniems tyrimams pasirinkta mažesnė (2 %) galaktozės koncentracija indukcinėje terpėje.

3.3. Gag baltymo formuojamų dalelių gryninimas

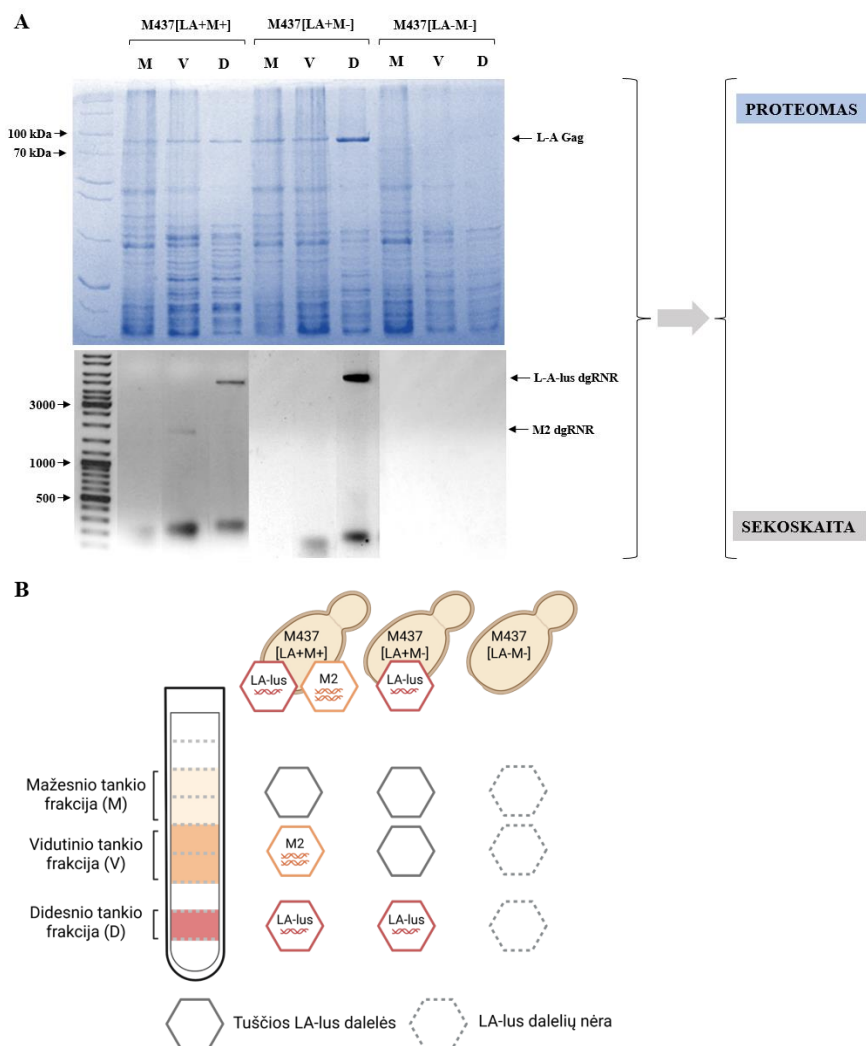
Virusinės kilmės baltymo formuojamų dalelių gryninimo metodas pradžioje optimizuotas tiriant kito mielių *S. cerevisiae* viruso L-A-lus bei M2 palydovo ryšį su ląstelės šeimininkės baltymų metabolizmu (Lukša *et al.*, 2022). Tam

pasirinkti trys *S. cerevisiae* M437 kamienai: M437[LA+M+], turintis L-A-lus virusą ir M2 palydovą; M437[LA+M-], turintis tik L-A-lus virusą; ir M437[LA-M-], kuriame šių virusų nėra (Lukša *et al.*, 2017). Užauginta biomasė suardyta stiklo rutuliukais ir atskirta tirpių baltymų frakcija. Pirmame gryninimo etape atliktas virusinių dalelių išsodinimas iš tirpių baltymų frakcijos, naudojant PEG išsodinimo reagentą (žr. 2.2.10) (3.3.1 pav. A). Antrame gryninimo etape po centrifugavimo išsodintos dalelės nuo likusių priemaišų išgrynintos ultracentrifuguojant 1,36 g/cm³ tankio cezio chlorido tirpale (3.3.1 pav. C) (Lukša *et al.*, 2022).



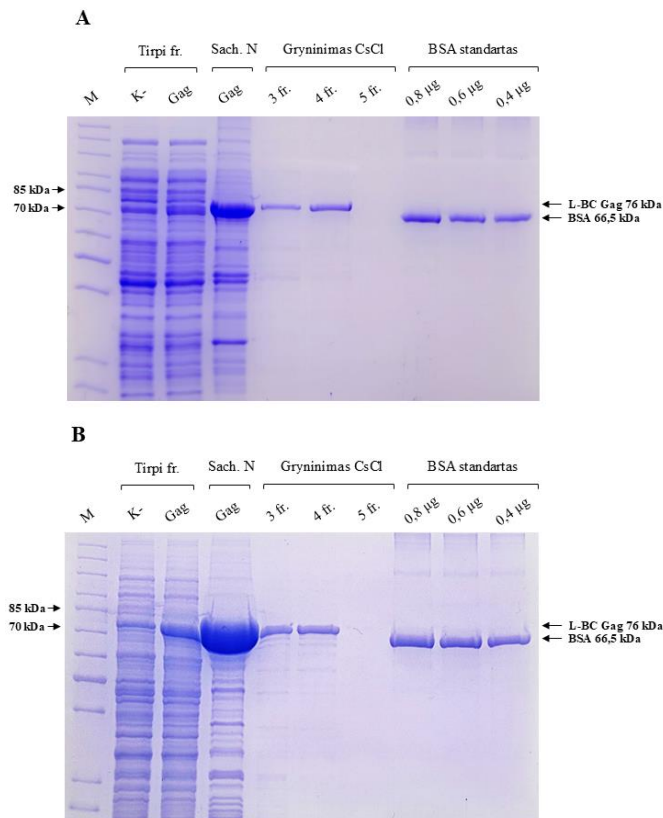
Pav. 3.3.1. Gag baltymo formuojamų VLP/virionų gryninimo schema. Pirmas gryninimo etapas: (A) Gag baltymo formuojamų VLP/virionų sukonzentravimas iš tirpių baltymų frakcijos naudojant PEG4000 išsodinimo reagentą arba (B) ultracentrifuguojant per 45 % sacharozės tirpalą. Antras gryninimo etapas: (C) sukonzentruotų dalelių atskyrimas nuo priemaišų ultracentrifuguojant 1,36 g/cm³ tankio cezio chlorido tirpale. Schema paruošta naudojant Biorender.

Po ultracentrifugavimo gautų mėginių analizė poliakrilamidiniame ir 1 % agaroziniame gelyje atskleidė, kad L-A-lus virusinės dalelės sėkmingai atskirtos pagal juose esantį dgRNR turinį (3.3.2 pav.) (Lukša *et al.*, 2022). Kaip ir tikėtasi, mėginiuose, gautuose iš virusų neturinčio kamieno M437[LA-M-], neidentifikuoti jokie virusiniai baltymai ar nukleorūgštys. L-A-lus virusą ir M2 palydovą turinčio kamieno M437[LA+M+] bei tik L-A-lus virusą turinčio kamieno M437[LA+M-] atvejais, po ultracentrifugavimo gautoje mažesnio tankio frakcijoje identifikuotos tuščios L-A-lus dalelės. Tik L-A-lus virusą turinčio kamieno M437[LA+M-] atveju vidutinio tankio frakcijoje taip pat identifikuotos tuščios dalelės, o L-A-lus virusą ir M2 palydovą turinčio M437[LA+M+] kamieno atveju – M2 palydovo RNR įkapsuliuotos dalelės. Didesnio tankio frakcijoje abiem atvejais gautos dalelės, įkapsuliuotos L-A-lus viruso genomu.



Pav. 3.3.2. L-A-lus ir M virusų baltymų ir nukleorūgščių nustatymas *S. cerevisiae* M437 kamienuose (modifikuota pagal Lukša *et al.*, 2022). (A) Po gryninimo surinktų frakcijų baltymų analizė poliakrilamidiniame ir nukleorūgščių analizė 1 % agaroziniame geliuose: L-A viruso kapsidės baltymas Gag identifiкуotas visose tirtose M437[LA+M+] ir M437[LA+M-] kamienų frakcijose, tačiau neidentifiкуotas nei vienoje iš tirtų M437[LA-M-] kamieno frakcijų; L-A-lus viruso dgRNR identifiкуota didesnio tankio frakcijose, gautose iš M437[LA+M+] ir M437[LA+M-] kamienų; M2 palydovo dgRNR identifiкуota vidutinio tankio frakcijoje, gautoje iš M437[LA+M+]. (B) Remiantis gautais duomenimis sudaryta po gryninimo gautų frakcijų schema: mažesnio tankio frakcija M, kurioje iš skirtingų kamienų gautose virusinėse dalelėse neidentifiкуota jokia dgRNR; vidutinio tankio frakcija V, kurioje dgRNR identifiкуota tik iš M437[LA+M+] kamieno gautose virusinėse dalelėse; didesnio tankio frakcija D, kurioje dgRNR identifiкуota tiek iš M437[LA+M+], tiek iš M437[LA+M-] kamieno gautose virusinėse dalelėse. Schema paruošta naudojant Biorender.

Kadangi šio tyrimo metu pavyko atskirti frakcijas su tuščiomis dalelėmis, arba kitaip VLP (frakcija M), nuo virionus turinčių frakcijų (frakcijos V ir D), šis metodas pritaikytas rekombinantinio L-BC Gag baltymo formuojamų VLP gryninimui. Visgi, norint turėti didesnio grynumo mėginius teko pirmąjį žingsnį tobulinti ir dalelių išsodinimui vietoj PEG išsodinimo reagento pasirinktas ultracentrifugavimas per 45 % sacharozės tirpalą (3.3.1 pav. B). Optimizavus tirpaus L-BC Gag baltymo sintezės sąlygas *E. coli* BL21-AI bei *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] kamienuose (žr. 3.2), užsiaugintas didesnis kiekis biomasės, atliktas ląstelių ardymas ir gryninimas. Gauti baltyminiai mėginiai analizuoti SDS-PAGE kartu su žinomo kiekio jaučio serumo albumino (BSA, angl. *bovine serum albumin*)) mėginiais (3.3.3 pav.).

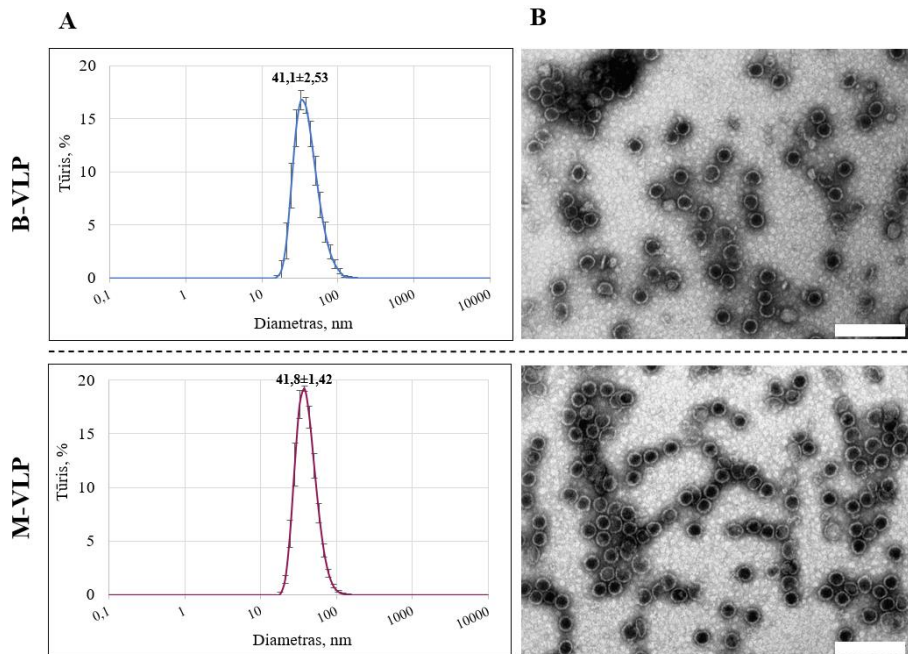


Pav. 3.3.3. Gag baltymo gryninimas iš *E. coli* BL21-AI (A) bei *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] (B) kamienų. Gag baltymo formuojamos dalelės iš tirpių baltymų frakcijos išsodintos ultracentrifuguojant per 45 % sacharozės tirpalą ir išgrynintos 1,36 g/cm³ tankio cezio chlorido tirpale. K- – baltymų frakcijos, gautos iš bakterijų ir mielių, transformuotų atitinkamai pET28a bei pFX7 vektoriumi (neigiama kontrolė). Gag – baltymų frakcijos, gautos iš bakterijų ir mielių, transformuotų atitinkamai pET28a- L-BC-gag bei pFX7-L-BC-gag vektoriumi. Sach. N – po išsodinimo per sacharozės tirpalą gauta nuosėdų frakcija. Gryninimas CsCl – frakcijos, gautos po dalelių gryninimo CsCl tirpale. BSA – žinomų kiekių jaučio serumo albuminas. M – baltymų molekulinės masės standartas PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Bakterijose ir mielėse susintetintas rekombinantinis Gag baltymas (apie 76 kDa) sėkmingai išsodintas iš tirpių baltymų frakcijos ultracentrifuguojant per 45 % sacharozės tirpalą ir papildomai išgrynintas per 1,36 g/cm³ tankio cezio chlorido tirpalą (3.3.3 pav.). Atliekant L-BC Gag mėginių ir L-A-lus mėginių palyginimą (žr. 3.3.2 pav.) matoma, kad pakeitus pirmąjį gryninimo žingsnį gaunami didesnio grynumo mėginiai. Kaip ir prieš tai mūsų atliktame tyrime su *S. cerevisiae* L-A-lus virusu bei M2 palydovu, po gryninimo cezio chlorido tirpale rekombinantino L-BC Gag baltymo formuojamos dalelės pasiskirstė mažesnio tankio 3 bei 4 frakcijose. Atlikus kelis biologinius pakartojimus, naudojant žinomų kiekių BSA (66,5 kDa) mėginius ir ImageJ v1.53t programinę įrangą (Schneider *et al.*, 2012), apskaičiuotos išgryninto Gag baltymo išeigos pagal šlapią biomasę. Iš bakterijų išgryninto Gag baltymo bendra išeiga 3 ir 4 frakcijose buvo 0,25±0,03 mg/g (n=4), o iš mielių išgryninto Gag baltymo išeiga buvo kelis kartus didesnė ir siekė 0,78±0,05 mg/g biomasės (n=3).

3.4. Gag baltymo gebėjimo formuoti daleles nustatymas

Sėkmingas Gag baltymo išsodinimas per 45 % sacharozės tirpalą, taikomą didelės molekulinės masės baltymų/baltyminių kompleksų sukonzentravimui, bei išgryninimas cezio chlorido tirpale, skirtame atskirti molekules pagal jų tankį, leidžia daryti prielaidą, kad bakterijose bei mielėse susintetintas rekombinantinis L-BC Gag baltymas formuoja VLP. Vis dėlto, dalelių formavimuisi įrodyti reikalingi papildomi tyrimai. Kadangi po gryninimo baltyminis mėginys yra buferiniame tirpale su cezio chloridu, kuris nėra suderinamas su tolimesniais tyrimais, atliktas cezio chlorido tirpalo pakeitimas į ardymui naudotą buferinį tirpalą (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) (žr. 2.2.11). Siekiant įvertinti Gag baltymo gebėjimą formuoti daleles, paruošti ardymo buferiniame tirpale mėginiai analizuoti Zetasizer μ V prietaisu, kuris, taikydamas DLS metodą, nustato vidutinį sferinių dalelių dydį tirpale, bei TEM, leidžiančiu vizualizuoti daleles (3.4.1 pav.).



Pav. 3.4.1. Iš bakterijų (B-VLP, viršutinė dalis) bei mielių (M-VLP, apatinė dalis) išgrynintų Gag baltymo formuojamų dalelių charakterizavimas. (A) Dalelių dydžio pasiskirstymas (pagal tūrio procentus) paruoštame Gag baltymo tirpale (0,5 mg/mL), nustatytas DLS metodu. Rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN). (B) Išgryninto Gag baltymo (0,1 mg/mL) formuojamų VLP TEM mikrografijos. Skalės dydis: 200 nm.

Atlikus DLS matavimus nustatyta, kad vidutinis dalelių dydis iš bakterijų išgrynintame Gag baltymo mėginyje (B-VLP) yra $41,1 \pm 2,53$ nm ($n=3$), o iš mielių (M-VLP) – $41,8 \pm 1,42$ nm ($n=3$) (3.4.1 pav. A). Abiejų mėginių TEM mikrografijose (3.4.1 pav. B) matomos panašaus į DLS metodu nustatyto skersmens (38–43 nm) tuščiavidurės simetriškos sferos formos dalelės, kurių dydis atitinka natyvių L-BC virionų dydį (38,5 nm) (Grybchuk *et al.*, 2022). Akivaizdžių skirtumų tarp vidutinio B-VLP ir M-VLP dydžio bei morfologijos nenustatyta. Mėginiuose taip pat stebima dalis atviros struktūros dalelių. Gautų mėginių analizė DLS ir TEM metodais patvirtino, kad bakterijose ir mielėse susintetintas rekombinantinis L-BC Gag baltymas formuoja į virusus panašias daleles.

3.5. Gag baltymo formuojamų dalelių stabilumo tyrimai

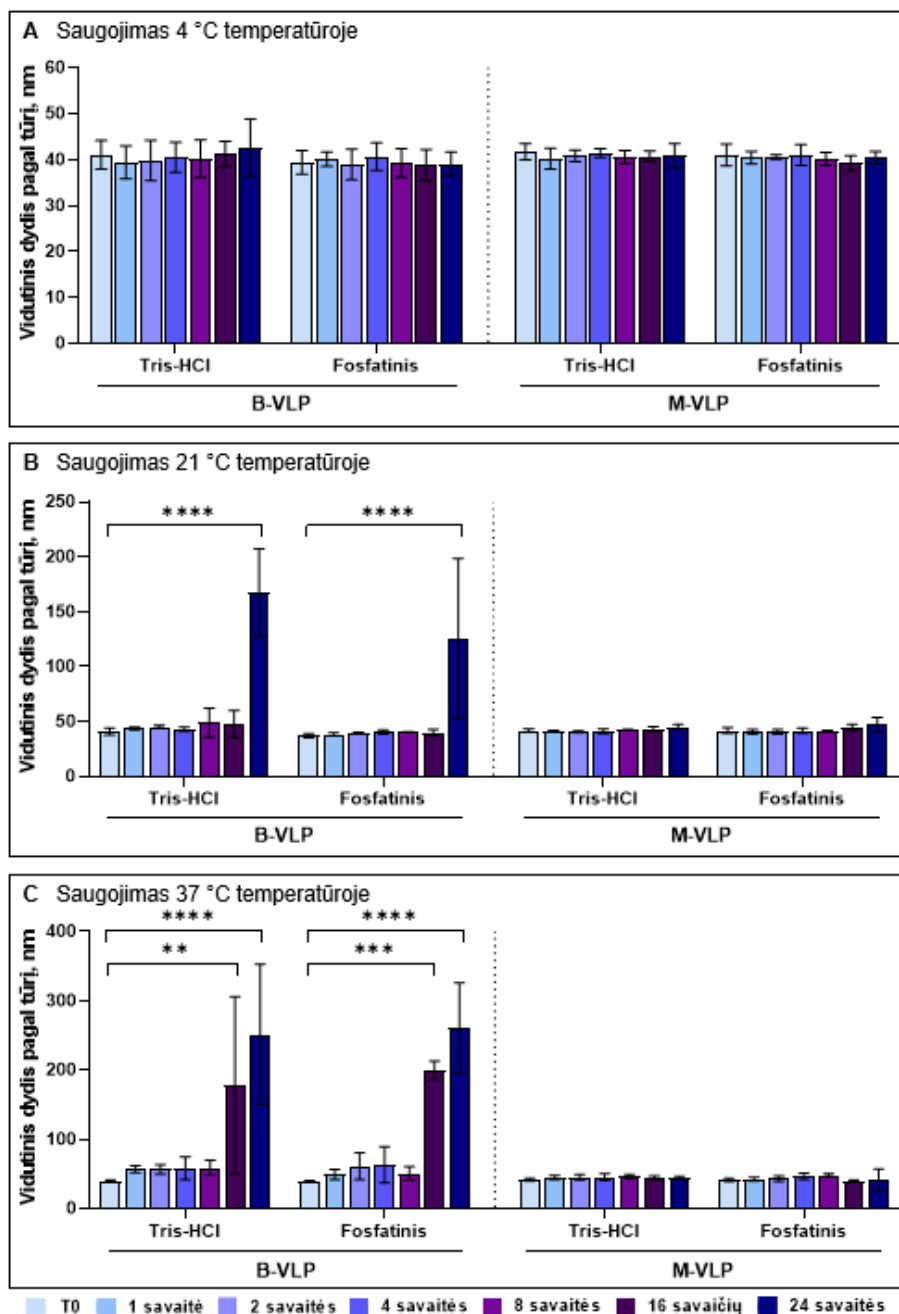
Į virusus panašių dalelių sintezei pasirinkta raiškos sistema gali turėti įtakos susintetintų dalelių savybėms, jų morfologijai ir stabilumui (Mejía-Méndez *et al.*, 2022). Kadangi L-BC Gag VLP sintezei buvo pasirinktos dvi skirtingos

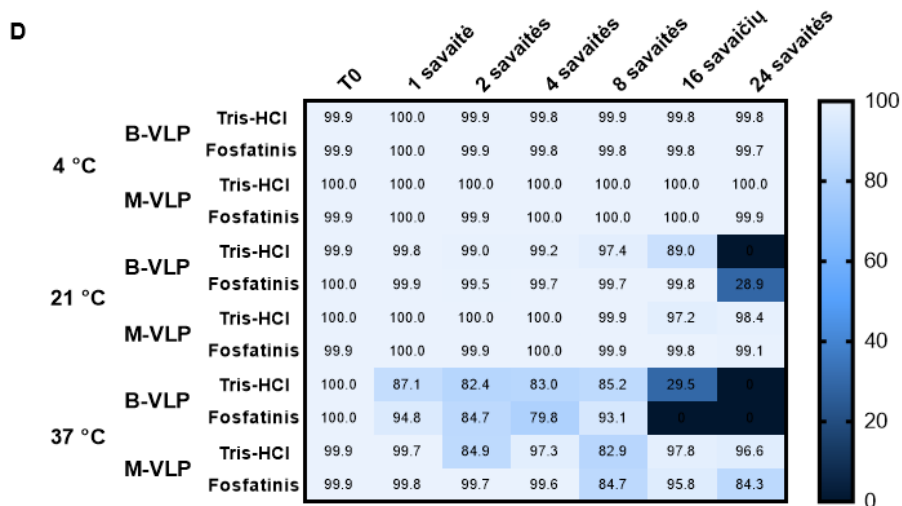
raiškos sistemos, atliktas bakterijose ir mielėse susintetintų dalelių dydžio stabilumo skirtingose sąlygose vertinimas ir palyginimas.

3.5.1. Gag baltymo formuojamų dalelių dydžio stabilumas

Siekiant įvertinti ir palyginti L-BC Gag formuojamų dalelių, susintetintų bakterijose ir mielėse, dydžio stabilumą, jos buvo laikomos skirtingomis sąlygomis ir tyrimo pradžioje bei po 1, 2, 4, 8, 16 ir 24 savaičių DLS prietaisu išmatuotas vidutinis dalelių dydis tirpale. Matavimų metu gaunama informacija ne tik apie tirpale esančių dalelių dydį, bet ir jų užimamą tūrį – kai tirpale yra tik tikslinio dydžio dalelės, mūsų atveju ~40 nm, jų užimamas tūris lygus 100 %, bet jeigu tirpale yra daugiau nei vieno dydžio dalelių, tikslinių dalelių užimamas tūris sumažėja (<100 %). Šie duomenys svarbūs stebint galimą dalelių disociacijos ar agregacijos proceso pradžią (Srivastava *et al.*, 2023), todėl rezultatuose pateikti ne tik vidutiniai dalelių dydžiai, bet ir tikslinių dalelių procentinis kiekis pagal užimamą tūrį tirpale. Dalelių dydžio vidurkis ir standartinis nuokrypis apskaičiuotas atlikus trijų biologinių pakarojimų matavimus, naudojant programinę įrangą GraphPad Prism v.8.0.1 (www.graphpad.com). Dalelių dydžių statistinis reikšmingumas įvertintas atlikus dalelių dydžių, išmatuotų po 1, 2, 4, 8, 16 ir 24 savaičių inkubacijos atitinkamomis sąlygomis, palyginimą su tyrimo pradžioje nustatytu dalelių dydžiu (žr. 2.2.21). Svarbu paminėti, kad grafikuose pateikiamas tirpale dominuojančių, t. y. didesnę tūrio dalį užimančių, dalelių vidutinis dydis.

Kadangi vienas iš tolimesnių tyrimo uždavinių buvo patikrinti, kaip L-BC Gag formuojamos dalelės veikia žinduolių ląsteles, įprastai kultivuojamas 37 °C temperatūroje, atliktas dalelių dydžio stabilumo palyginimas 37 °C, 21 °C (kambario) arba 4 °C temperatūroje (3.5.1.1 pav.). Dalelių gryninimui ir charakterizavimui naudotas Tris-HCl buferinis tirpalas gali turėti toksinį poveikį ląstelėms, todėl darbui su žinduolių ląstelėmis jis nėra tinkamas (Irvin *et al.*, 1981). Dėl šios priežasties B-VLP ir M-VLP dalelių dydžio stabilumas įvertintas jas saugant ne tik skirtingose temperatūrose, bet ir skirtinguose tirpaluose – Tris-HCl bei fosfatiniame buferiniame tirpale. Šio tyrimo metu pasirinkta naudoti tokias pat buferinių tirpalų sudedamąsias dalis ir pH, kaip ir dalelių gryninimui bei suspendavimui naudotame tirpale – pH 8, 150 mM NaCl ir 1 mM EDTA.



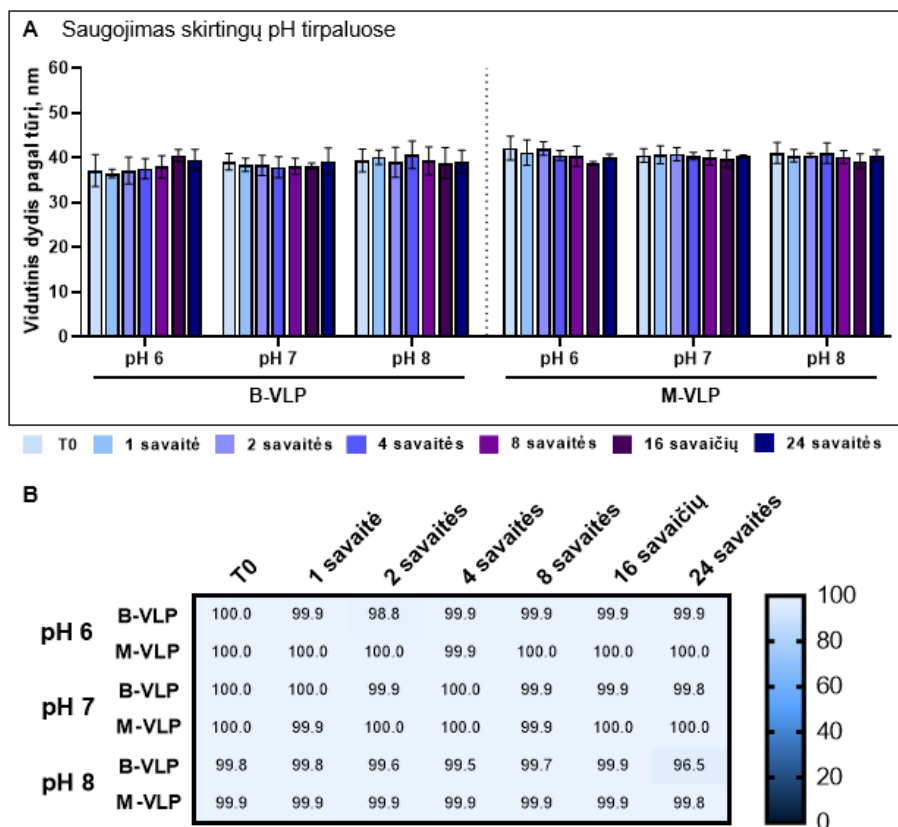


Pav. 3.5.1.1. Gag B-VLP ir M-VLP dydžio stabilumo ir užimamo tūrio priklausomybė nuo temperatūros ir saugojimui naudoto buferinio tirpalo. Vidutinio dalelių dydžio matavimai atlikti 24 savaitių eigoje, daleles saugant Tris-HCl ir fosfatiname buferiniuose tirpaluose, 4 °C (A), 21 °C (B) bei 37 °C (C) temperatūrose. (D) Tikslinių Gag formuojamų dalelių kiekis, įvertintas pagal užimamo tūrio procentus (n=3). Vidutinio dalelių dydžio matavimų rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu (±SN). Statistinis reikšmingumas yra pateiktas kaip nurodyta: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

Atlikti stabilumo tyrimai rodo, kad B-VLP ir M-VLP daleles saugant 4 °C temperatūroje (3.5.1.1 pav. A), nepriklausomai nuo dalelių saugojimui naudoto buferinio tirpalo (Tris-HCl ar fosfatinio), vidutinis dalelių dydis reikšmingai nekito ($p > 0,05$) visą 24 savaitių laikotarpį ir tirpale dominavo tikslinio dydžio Gag dalelės (99,7–100 %) (3.5.1.1 pav. D). Tiriamuoju laikotarpiu taip pat nefiksuotas reikšmingas M-VLP, saugomų 21 °C temperatūroje (3.5.1.1 pav. B), dydžio pokytis ($p > 0,05$) bei kitokio nei tikslinio dydžio dalelių atsiradimas tirpale ($> 97,2$ %) (3.5.1.1 pav. D). 21 °C temperatūroje saugomų B-VLP (3.5.1.1 pav. B) vidutinis dydis reikšmingai nekito 16 savaitių ($p > 0,05$), tačiau buvo stebimas tikslinio dydžio Gag dalelių užimamo tūrio Tris-HCl buferiniame tirpale sumažėjimas iki 89 % (3.5.1.1 pav. D). Reikšmingas B-VLP dydžio padidėjimas ($p \leq 0,0001$) nustatytas po 24 savaitių saugojimo 21 °C temperatūroje – Tris-HCl buferiniame tirpale tikslinio dydžio dalelių nefiksuota visai, o fosfatiname buferiniame tirpale jos sudarė tik 29 % tirpalo tūrio (3.5.1.1 pav. D). B-VLP inkubuojant 37 °C temperatūroje jau nuo pirmos savaitės stebėtas tikslinio dydžio dalelių užimamo tūrio sumažėjimas (79,8–93,1 %) (3.5.1.1 pav. D). Šioje temperatūroje inkubuojamų B-VLP dydis reikšmingai padidėjo tik po 16 savaitių (3.5.1.1 pav. C), abiejuose Tris-HCl ir fosfatiname buferiniuose

tirpaluose (atitinkamai $p \leq 0,01$ ir $p \leq 0,001$), kuriuose atitinkamai fiksuotas arba mažas tikslinio dydžio dalelių kiekis (30 %), arba jų nefiksuota visai (0 %) (3.5.1.1 pav. D). M-VLP pasižymėjo ilgesniu dydžio stabilumu 37 °C temperatūroje – dalelių dydis reikšmingai nepakito net ir po 24 savaičių inkubacijos ($p > 0,05$), nepriklausomai nuo buferinio tirpalo (3.5.1.1 pav. C). Vis dėlto, M-VLP dalelių užimamas tūris fosfatiniame buferiniame tirpale po 24 savaičių šiek tiek sumažėjo (84,3 %) (3.5.1.1 pav. D). Šio tyrimo metu nustatyta, kad M-VLP dydis nekinta ilgesnį laiką ir temperatūra jų dydžio stabilumui turi mažesnę poveikį nei B-VLP dalelėms. Reikšmingų skirtumų daleles saugant Tris-HCl ir fosfatiniame buferiniame tirpale nenustatyta ($p > 0,05$), todėl tolimesniems tyrimams pasirinktas fosfatinis buferinis tirpalas. Dėl dalelių polinkio agreguotis aukštesnėje temperatūroje, toliau jos inkubuotos tik 4 °C temperatūroje.

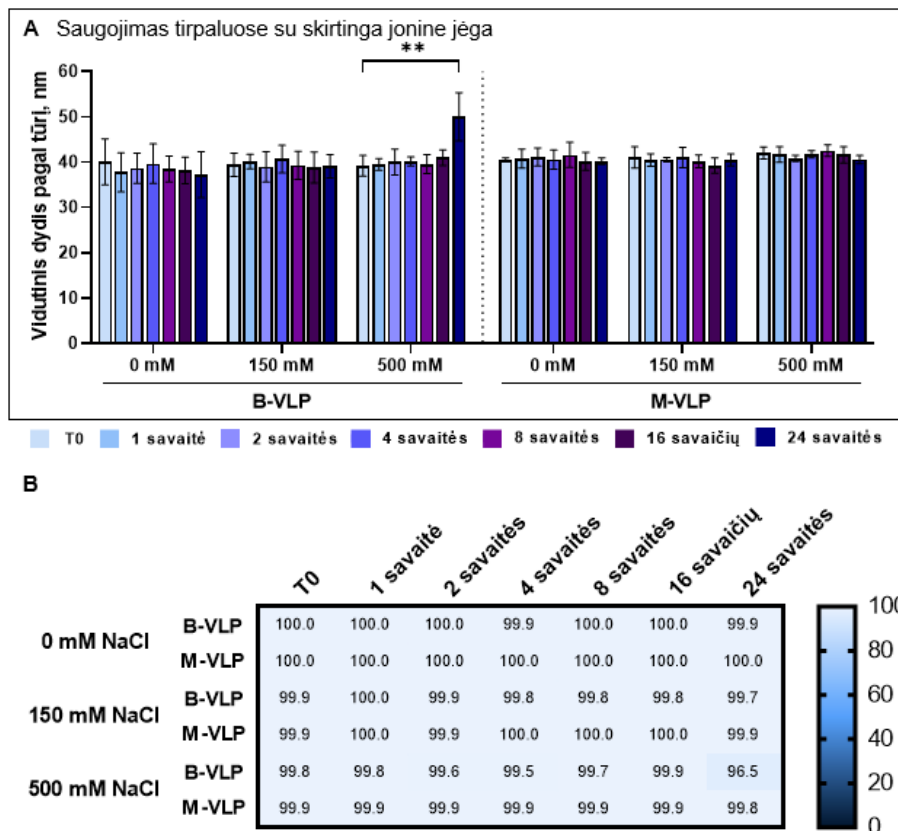
Tyrimai, atlikti su kitomis VLP rodo, kad buferinio tirpalo pH taip pat gali turėti įtakos dalelių dydžio stabilumui (Al-Ghobashy *et al.*, 2017; Le ir Müller, 2021). Temperatūros įtaka L-BC Gag dalelių dydžiui nustatyta jas inkubuojant pH 8 tirpaluose, tačiau tyrimams su žinduolių ląstelėmis aktualesnis neutralus pH, o vienam iš numatytų įkapsuliavimo tyrimų reikalingas ir kiek rūgštesnis pH 6. Siekiant nustatyti pH įtaką L-BC Gag dalelių dydžio stabilumui, B-VLP ir M-VLP dalelės buvo saugomos tą patį 24 savaičių laikotarpį 4 °C fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose su 150 mM NaCl ir 1 mM EDTA, kurių pH yra 6, 7 arba 8 (3.5.1.2 pav. A). Nepriklausomai nuo fosfatinio buferinio tirpalo pH, viso tyrimo metu reikšmingų B-VLP ir M-VLP dydžio pokyčių nenustatyta ($p > 0,05$) ir tikslinio dydžio dalelių kiekis tirpale žymiai nekito ($> 96,5$ %), (3.5.1.2 pav. B).



Pav. 3.5.1.2. Gag B-VLP ir M-VLP dydžio stabilumo ir užimamo tūrio priklausomybė nuo saugojimui naudoto fosfatinio buferinio tirpalo pH. (A) Vidutinio dalelių dydžio matavimai atlikti 24 savaitės eigoje, daleles saugant 4 °C temperatūroje fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose, kurių pH yra 6, 7 ir 8. (B) Tikslinių Gag formuojamų dalelių kiekis, įvertintas pagal užimamo tūrio procentus (n=3). Vidutinio dalelių dydžio matavimų rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu (±SN). Statistinis reikšmingumas yra pateiktas kaip nurodyta: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

Esant žemai joninei jėgai, ScV-L-A virusas praranda stabilumą ir savo dgRNR, tačiau duomenų apie joninės jėgos poveikį ScV-L-BC virusui nėra (Fujimura ir Wickner, 1988). Tokie tyrimai svarbūs tolimesniam dalelių panaudojimui, pavyzdžiui, siekiant pritaikyti joninės jėgos sumažinimo metodą dalelių disociacijai. Joninės jėgos įtaka L-BC Gag formuojamų dalelių stabilumui įvertinta B-VLP ir M-VLP daleles saugant 24 savaites 4 °C fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose (pH 8) su 1 mM EDTA, be NaCl, turinčiame vidutinę 150 mM arba didesnę 500 mM NaCl koncentraciją (3.5.1.3 pav. A). Gauti rezultatai rodo, kad, nepriklausomai nuo NaCl koncentracijos fosfatiniame buferiniame tirpale, M-VLP dalelių dydis reikšmingai nekito visą tiriamąjį laikotarpį ($p > 0,05$). B-VLP atveju

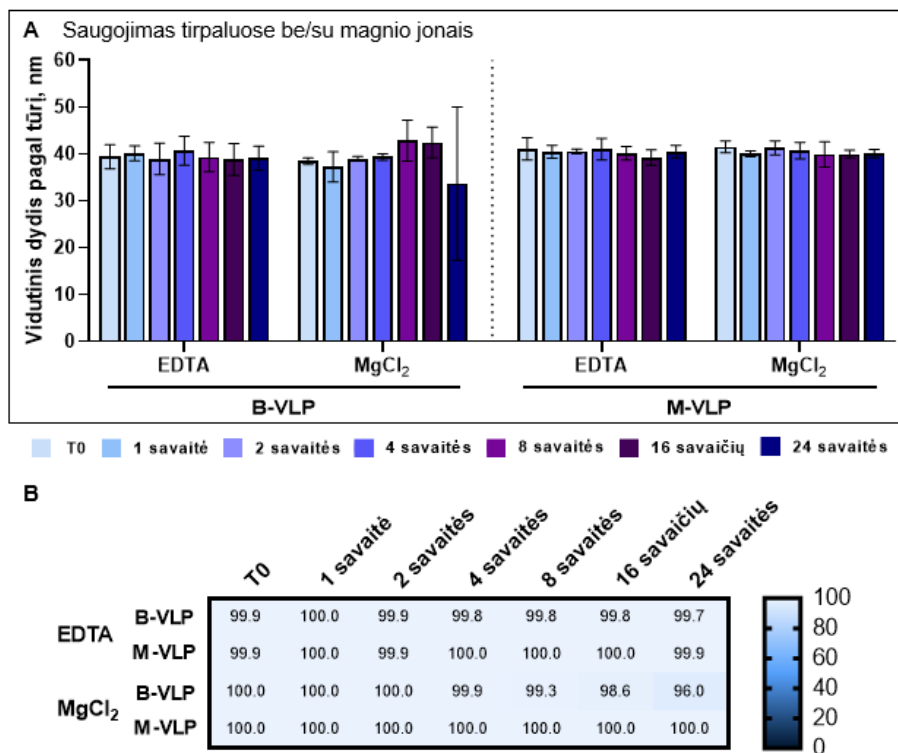
reikšmingas dalelių dydžio padidėjimas ($p \leq 0,01$) nustatytas tik po 24 savaičių, daleles inkubuojant fosfatiniame buferiniame tirpale su 500 mM NaCl. Kitomis sąlygomis visą 24 savaičių laikotarpį B-VLP dalelių dydis reikšmingai nekito ($p > 0,05$). Tiek B-VLP, tiek M-VLP atveju tikslinio dydžio dalelių užimamas tūris tirpale žymiai nekito ($>96,5\%$) (3.5.1.3 pav. B).



Pav. 3.5.1.3. Gag B-VLP ir M-VLP dydžio stabilumo ir užimamo tūrio priklausomybė nuo saugojimui naudoto fosfatinio buferinio tirpalo joninės jėgos. (A) Vidutinio dalelių dydžio matavimai atlikti 24 savaičių eigoje, daleles saugant 4 °C temperatūroje fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose be NaCl, su 150 arba 500 mM NaCl. (B) Tikslinių Gag formuojamų dalelių kiekis, įvertintas pagal užimamo tūrio procentus ($n=3$). Vidutinio dalelių dydžio matavimų rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN). Statistinis reikšmingumas yra pateiktas kaip nurodyta: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

Literatūroje aprašoma, kad magnio jonai gali stabilizuoti viruso kapsidę ir jų pašalinimas iš tirpalo gali susilpninti kapsidės baltymų sąveikas ir inicijuoti kapsidžių struktūros praradimą (Bond *et al.*, 2020). Magnio jonų įtaka L-BC Gag formuojamų dalelių stabilumui įvertinta B-VLP ir M-VLP daleles saugant 24 savaites 4 °C fosfatiniame buferiniame tirpale (pH 8) su

150 mM NaCl, papildytame 10 mM EDTA arba MgCl_2 (3.5.1.4 pav. A). Gauti rezultatai rodo, kad magnio jonų buvimas fosfatiniame buferiniame tirpale arba jų pašalinimas neturėjo reikšmingo poveikio ($p>0,05$) L-BC Gag formuojamų dalelių stabilumui 24 savaitių laikotarpyje ir tikslinio dydžio dalelių kiekis tirpale žymiai nekito ($>96\%$) (3.5.1.4 pav. B).



Pav. 3.5.1.4. Gag B-VLP ir M-VLP dydžio stabilumo ir užimamo tūrio priklausomybė nuo magnio jonų buvimo saugojimui naudotame fosfatiniame buferiniame tirpale. Vidutinio dalelių dydžio matavimai atlikti 24 savaitės eigoje, daleles saugant 4 °C temperatūroje fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose su 10 mM EDTA arba MgCl_2 . (B) Tikslinių Gag formuojamų dalelių kiekis, įvertintas pagal užimamo tūrio procentus ($n=3$). Vidutinio dalelių dydžio matavimų rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm\text{SN}$). Statistinis reikšmingumas yra pateiktas kaip nurodyta: $p\leq 0,05$ (*), $p\leq 0,01$ (**), $p\leq 0,001$ (***), $p\leq 0,0001$ (****).

Atlikti dalelių dydžio stabilumo tyrimai rodo, kad esant skirtingoms NaCl koncentracijoms (0, 150, 500 mM), fosfatinio buferinio tirpalo pH (6, 7, 8) bei pašalinus ar pridėjus magnio jonų (10 mM EDTA arba MgCl_2) Gag formuojamų dalelių dydis išlieka stabilus net iki 24 savaitės.

3.5.2. Gag baltymo formuojamų dalelių stabilumo vertinimas TSA metodu

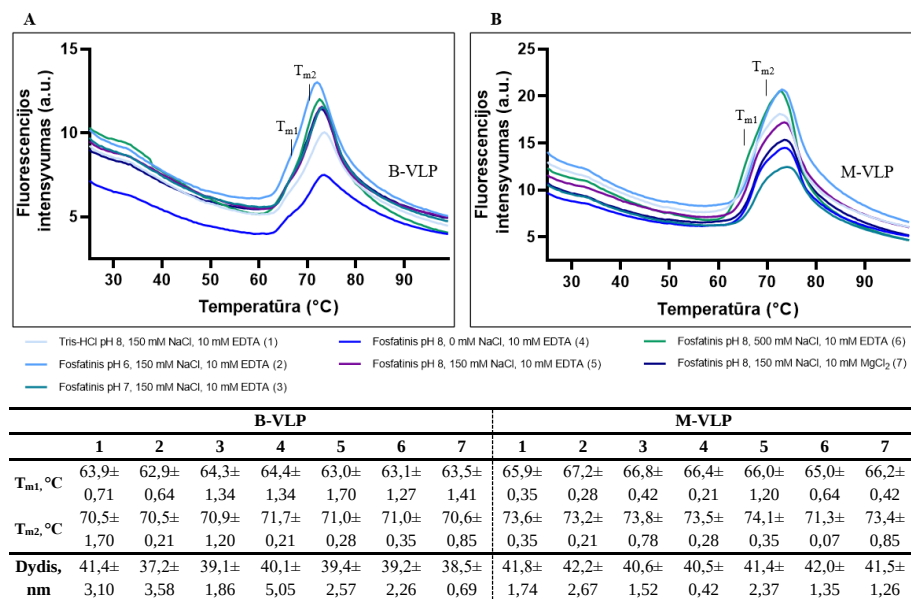
Skirtingų temperatūrų, NaCl koncentracijos, magnio jonų bei buferinio tirpalo pH poveikis L-BC Gag formuojamų dalelių stabilumui papildomai tirtas terminio poslinkio metodu (TSA). Šiame metode baltymų agregacijai ir denatūracijai nustatyti naudojamas ANS fluorescencinis dažas, kuris dideliu afiniškumu jungiasi su baltymų hidrofobiniu paviršiumi, atsiveriančiu baltymui denatūruojant, todėl stebimas fluorescencijos padidėjimas (Ota *et al.*, 2021). Dalelių, esančių skirtinguose tirpaluose, ir ANS mišinio temperatūra buvo didinama po 1 °C per minutę nuo 25 iki 99 °C ir išmatuotas reporterinis signalas kiekviename etape. Mėginių lydymosi temperatūros (T_m) apskaičiuotos iš gautų fluorescencijos intensyvumo duomenų, naudojant programinės įrangos įrankį Thermott (Gedgaudas *et al.*, 2022). Dalelių lydymosi temperatūrų ir dydžių vidurkis bei standartinis nuokrypis apskaičiuotas atlikus trijų biologinių pakartojimų matavimus, naudojant programinę įrangą Microsoft Excel. Dalelių lydymosi temperatūrų ir dydžių statistinis reikšmingumas įvertintas atlikus rezultatų, gautų su skirtingo tipo dalelėmis, arba rezultatų, gautų su dalelėmis, esančiomis skirtinguose tirpaluose, palyginimą (žr. 2.2.21).

Pradžioje TSA metodu vertintas dalelių, esančių ilgalaikio dalelių dydžio stabilumo tyrimams naudotuose tirpaluose, stabilumas: standartiniame ardymo buferiniame tirpale (100 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) (1), fosfatiniuose buferiniuose tirpaluose, kurių pH 6, 7 bei 8 (150 mM NaCl, 1 mM EDTA) (atitinkamai 2, 3 ir 4), fosfatiniame buferiniame tirpale be NaCl (pH 8, 1 mM EDTA) (5) bei su 500 mM NaCl (pH 8, 1 mM EDTA) (6), taip pat fosfatiniame buferiniame tirpale, papildytame 10 mM $MgCl_2$ (pH 8, 150 mM NaCl) (7) (3.5.2.1 pav.). Nepriklausomai nuo buferinio tirpalo sudėties, abiejų tipų Gag dalelių mėginių fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros grafikuose matomi du terminiai poslinkiai – pirmoji smailė su mažesniu fluorescencijos intensyvumu, dalinai persidengia su antrosios smailės maksimumu. Nustatyta, kad B-VLP pirmoji lydymosi temperatūra (T_{m1}) yra 62,9–64,4 °C, o antroji (T_{m2}) – 70,5–71,7 °C (3.5.2.1 pav. A). M-VLP atveju pirmoji ir antroji lydymosi temperatūros atitinkamai yra 65,0–67,2 °C ir 71,3–74,1 °C (3.5.2.1 pav. B).

Atlikus B-VLP ir M-VLP lydymosi temperatūrų palyginimą, reikšminga dalelių tipo įtaka lydymosi temperatūroms nenustatyta ($p>0,05$). Visgi, matoma tendencija, kad M-VLP būdingos keliais laipsniais aukštesnės lydymosi temperatūros. Buferinio tirpalo sudėties įtaka lydymosi temperatūroms nustatyta tik M-VLP, esančioms fosfatiniame buferiniame

tirpale su 500 mM NaCl – jų T_{m2} buvo reikšmingai mažesnė ($p \leq 0,05$) už kituose buferiniuose tirpaluose esančių dalelių T_{m2} .

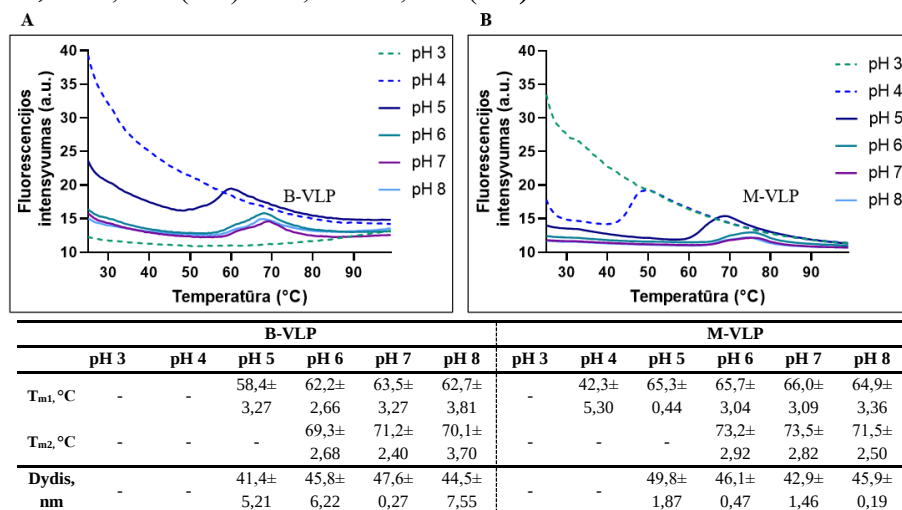
Siekiant išsiaiškinti, kodėl Gag dalelėms būdingas dviem etapais vykstantis struktūros praradimas, DLS prietaisu išmatuotas vidutinis dalelių dydis TSA tyrimui paruoštuose buferiniuose tirpaluose prieš temperatūrinį poveikį, t. y. 25 °C temperatūroje. Nustatyta, kad tirpaluose vyravo pilnos 37,2–42,2 nm dydžio dalelės, kurių dydis tarpusavyje reikšmingai nesiskyrė, nepriklausomai nuo buferinio tirpalo sudėties ar dalelių tipo ($p > 0,05$) (3.5.2.1 pav. lentelės).



Pav. 3.5.2.1. Temperatūrinis Gag B-VLP (A) ir M-VLP (B), esančių ilgalaikio dalelių dydžio stabilumo tyrimams naudotuose tirpaluose, stabilumas. Fluorescencijos intensyvumai gauti didinant mišinį su ANS dažu temperatūrą nuo 25 iki 99 °C ir išmatuojant reporterinį signalą. Lentelėje pateiktos apskaičiuotos dalelių lydymosi temperatūros T_{m1} ir T_{m2} bei tyrimo pradžioje išmatuoti vidutiniai dalelių dydžiai. Rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN). a. u. – santykiniai vienetai (angl. *arbitrary units*).

Atliekant dalelių stabilumo tyrimus pH 6–8 tirpaluose, reikšminga pH įtaka vidutiniam dalelių dydžiui ir lydymosi temperatūroms nebuvo nustatyta ($p > 0,05$), todėl TSA metodu papildomai įvertintas dalelių stabilumas platesniame pH intervale nuo 3 iki 8, naudojant natrio fosfato ir citrato buferinio tirpalo sistemą (3.5.2.2 pav.). Buferiniame tirpale, kurio pH yra 3, Gag dalelėms nenustatytas joks terminis perėjimas. B-VLP taip pat neturėjo terminio perėjimo pH 4 tirpale, o M-VLP šiame pH nustatytas vienas terminis perėjimas, iš kurio apskaičiuota 42,3 °C lydymosi temperatūra. Esant pH 5,

B-VLP ir M-VLP dalelėms nustatytas vienas terminis perėjimas ir atitinkamai apskaičiuota 58,4 ir 65,3 °C lydymosi temperatūra. Du terminiai perėjimai natrio fosfato ir citrato buferiniuose tirpaluose esančioms Gag dalelėms nustatyti tik nuo pH 6. pH intervale nuo 6 iki 8, Gag dalelių temperatūrinis stabilumas buvo panašus: M-VLP dalelių mėginiams apskaičiuotos 64,9–65,7 °C (T_{m1}) ir 71,5–73,5 °C (T_{m2}) lydymosi temperatūros, o B-VLP – 62,2–63,5 °C (T_{m1}) ir 69,3°C–71,2 °C (T_{m2}).



Pav. 3.5.2.2. Temperatūrinis Gag B-VLP (A) ir M-VLP (B), esančių pH 3–8 natrio fosfato ir citrato buferiniuose tirpaluose, stabilumas. Fluorescencijos intensyvumai gauti didinant mišinių su ANS dažų temperatūrą nuo 25 iki 99 °C ir išmatuojant reporterinį signalą. Lentelėje pateiktos apskaičiuotos dalelių lydymosi temperatūros T_{m1} ir T_{m2} bei tyrimo pradžioje išmatuoti vidutiniai dalelių dydžiai. Rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN). a. u. – santykiniai vienetai (angl. *arbitrary units*).

Reikšmingų skirtumų tarp Gag dalelių, esančių natrio fosfato ir citrato buferiniuose tirpaluose, kurių pH yra 5, 6, 7 bei 8, lydymosi temperatūrų nenustatyta, nepriklausomai nuo dalelių tipo ar tirpalo pH ($p > 0,05$). Reikšmingas skirtumas nustatytas tik M-VLP, esančioms pH 4 tirpale – jų lydymosi temperatūra buvo reikšmingai mažesnė už kituose pH nustatytas dalelių lydymosi temperatūras ($p \leq 0,0001$). Nors pH 5–8 intervale reikšmingų skirtumų tarp dalelių lydymosi temperatūrų nenustatyta ($p > 0,05$), stebima ta pati tendencija kaip ir dydžio stabilumo tyrimams naudotuose tirpaluose – B-VLP dalelėms būdingos vienu ar keliais laipsniais mažesnės lydymosi temperatūros nei M-VLP, o pH 4 tirpale B-VLP dalelėms iš viso nenustatytas joks terminis perėjimas, kuriame M-VLP turėjo vieną terminį perėjimą.

Mėginių DLS analizė atskleidė, kad tyrimo pradžioje (25 °C temperatūroje) pH 3 ir 4 tirpaluose nebuvo apibrėžto dydžio dalelių. Šie

rezultatai sutampa su TSA rezultatais ir rodo, kad rūgštinio pH aplinkoje Gag baltymas neformuoja dalelių ir galimai yra denatūravęs. Nors pH 5 tirpale TSA metodu nustatyta tik viena lydymosi temperatūra, DLS prietaisu šiuose mėginiuose nustatytos pilnos 41,4–49,8 nm dydžio dalelės. Panašaus dydžio (42,9–47,6 nm) dalelės aptiktos ir pH 6–8 tirpaluose. Kaip ir TSA atveju, nepriklausomai nuo pH ar dalelių tipo reikšmingų skirtumų tarp dalelių dydžių nenustatyta ($p > 0,05$).

3.5.3. Gag baltymo formuojamų dalelių disociacijos tyrimai

Vienas iš VLP įkapsuliavimo metodų yra dalelių disociacijos (angl. *disassembly*) ir atgalinio dalelių formavimo (angl. *reassembly*) kartu su norimu įkapsuliuoti kroviniu metodas (He *et al.*, 2022). Tiriant L-BC Gag formuojamų dalelių dydžio ir terminį stabilumą nenustatytos sąlygos, kuriomis jos disocijuotų, todėl atliktas papildomas tyrimas, kurio metu išbandyti įvairūs reagentai ir pH, galintys inicijuoti dalelių disociacijos procesą. Gag formuojamos dalelės paruoštuose tirpaluose laikytos per naktį 4 °C temperatūroje ir išmatuotas vidutinis dalelių dydis tirpale (3.5.3.1 lentelė).

Lentelė 3.5.3.1. Gag B-VLP ir M-VLP disociacijos sąlygų nustatymas. Dalelės per naktį inkubuotos skirtinguose tirpaluose 4 °C temperatūroje ir DLS prietaisu išmatuotas vidutinis dalelių dydis. Rezultatai pateikti kaip trijų techninių pakartojimų vidurkis.

Nr.	Tirpalas	Priedo konc.	Vidutinis dydis, nm	
			B-VLP	M-VLP
K	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl (kontrolinis mėginys)	-	39,3	44,4
1	50 mM Tris-HCl pH 8 + β ME	5 %	47,1	47,6
2		10 %	0,68	38,1
3	50 mM Tris-HCl pH 8 + DTT	20 mM	40,6	38,8
4		50 mM	39,9	43,5
5	Vanduo + NaOH	1 mM	44,2	40,3
6		3 mM	43,5	40,4
7		10 mM	21,5	13,8
8	50 mM Tris-HCl pH 8 + karbamidas	1 M	35,3	42,4
9		2 M	13,3	41,3
10		3 M	15,5	18,0
11		4 M	15,4	17,2
12	50 mM Tris-HCl pH 8 + NaCl	1 M	43,8	43,9
13		2 M	49,6	53,3

Tiriant HPV-11 viruso VLP nustatyta, kad net 90 % dalelių disocijuoja jas veikiant 5 % β ME tirpalu su 150 mM NaCl arba veikiant karbonatiniu buferiniu tirpalu, kurio pH yra 9,6 (McCarthy *et al.*, 1998). Kitame tyrime

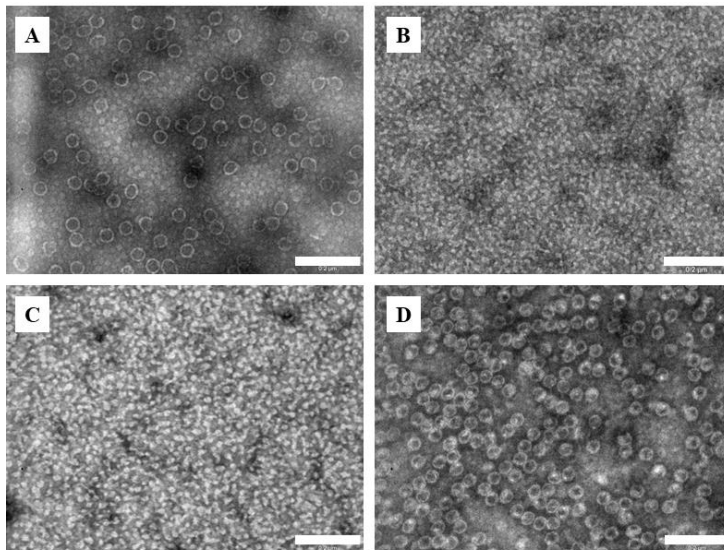
nustatyta, kad šių dalelių disociacija gali būti atliekama veikiant 2 mM kito redukuojančio reagento DTT (Mach *et al.*, 2006). Mūsų atliktame tyrime nustatyta, kad 5% β ME koncentracija 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale neinicijavo Gag dalelių disociacijos. Palyginti su kontroliniu mėginiu (3.5.3 lentelė Nr. K), 5 % β ME paveiktų dalelių dydis šiek tiek padidėjo (47,1–47,6 nm) (3.5.3 lentelė Nr. 1). Padidinus β ME koncentraciją tirpale iki 10 %, vidutinis dalelių dydis B-VLP mėginyje sumažėjo net iki 0,68 nm, o M-VLP dalelių dydis nepakito (38,1 nm) (3.5.3 lentelė Nr. 2). Siekiant nustatyti DTT poveikį Gag dalelėms išbandyta 20 mM DTT koncentracija 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale, tačiau net po 16 valandų poveikio dalelių dydis nepakito (38,8–40,6 nm) (3.5.3 lentelė Nr. 3). Net esant 50 mM DTT koncentracijai dalelių dydis išliko stabilus (39,9–43,5 nm) (3.5.3 lentelė Nr. 4).

Norint nustatyti, ar Gag dalelės gali disocijuoti šarminiame tirpale, į vandeninį dalelių tirpalą pridėti skirtingi NaOH kiekiai ir tokiu būdu gauti pH 11, 11,5 ir 12 tirpalai. Nustatyta, kad esant pH 11 ir 11,5 Gag dalelių dydis nekito (40,3–43,5 nm), tačiau pH 12 tirpale tiek B-VLP, tiek M-VLP dalelių dydis sumažėjo iki 13,8–21,5 nm (3.5.3 lentelė Nr. 5–8). Gag dalelių disociacijai taip pat išbandytas karbamidas, plačiai naudojamas įvairaus tipo VLP disociacijai (Fang *et al.*, 2015; Le ir Müller, 2021). Atlikus dalelių inkubaciją 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale su 1–4 M karbamido nustatyta, kad M-VLP dalelių dydis sumažėjo esant 3 M karbamido koncentracijai tirpale (18 nm), o B-VLP – 2 M karbamido (13,3 nm) (3.5.3 lentelė Nr. 9–12).

Atlikti Gag dalelių dydžio stabilumo tyrimai rodo, kad esant 0–500 mM NaCl koncentracijai tirpale dalelių dydis išlieka stabilus ilgą laiką, tačiau didesnės joninės jėgos poveikis šioms dalelėms nebuvo tirtas. Tyrimai, atlikti su CCMV dalelėmis rodo, kad joninės jėgos padidinimas gali inicijuoti VLP disociaciją – šios dalelės prarado savo integralumą tirpale, turinčiame 0,9 M NaCl ir 1 mM DTT (Lavelle *et al.*, 2007). Nustatyta, kad esant 1 M NaCl koncentracijai 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale Gag dalelių dydis nekinta, o 2 M NaCl koncentracijos tirpale stebėtas Gag dalelių dydžio padidėjimas iki 49,6–53,3 nm (3.5.3 lentelė Nr. 13 ir 14).

Kadangi esant šarminiam pH 12 arba veikiant karbamidu nustatytas Gag dalelių dydžio sumažėjimas, siekiant patvirtinti dalelių disociaciją, atlikta M-VLP mėginių TEM analizė (3.5.3 pav.). M-VLP, esančių kontroliniame ardymo buferiniame tirpale, mikrofotijose nustatytos 40–45 nm dydžio simetriškos sferos formos dalelės bei nedidelė dalis atviros struktūros dalelių (3.5.3 pav. A). Panašaus dydžio ir morfologijos dalelės identifikuotos 2 M NaCl tirpale (38–43 nm) (3.5.3 pav. D). Dalelių mėginio, inkubuoto pH 12 tirpale, mikrofotijose matomos gana simetriškos morfologiškai panašios 12–

19 nm dydžio struktūros, kurių dydis artimas DLS matavimų metu gautam dydžiui (3.5.3 pav. B). Kadangi šiame mėginyje VLP nebuvo nustatytos, galima teigti, kad dalelių disociacija įvyko. Panašaus dydžio (12–22 nm) ir morfologijos struktūros identifikuotos ir 3 M karbamidu paveiktame M-VLP mėginyje (3.5.3 pav. C).



Pav. 3.5.3. Iš mielių išgrynintų Gag VLP disociacijos vertinimas TEM metodu. Analizuoti M-VLP mėginiai po 16 valandų inkubacijos (A) ardymo buferiniame tirpale; (B) pH 12 vandeniniame tirpale; (C) 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale su 3 M karbamido; (D) 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale su 2 M NaCl. Nurodyta skalė: 200 nm.

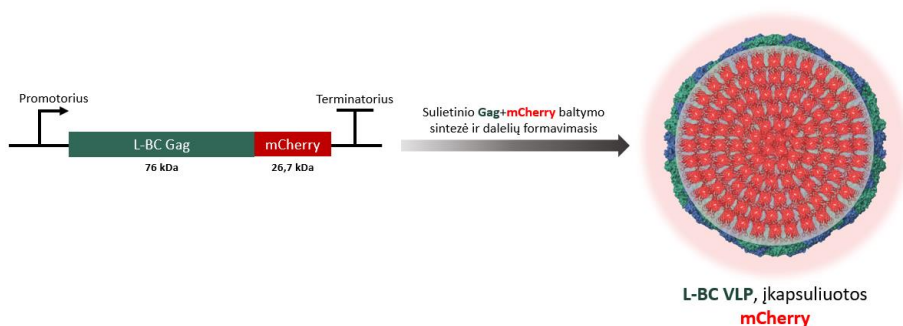
Atlikus įvairiais reagentais ir pH paveiktų dalelių analizę DLS ir TEM metodais nustatyta, kad Gag dalelių struktūra suardoma pH 12 vandeniniame-NaOH tirpale arba 50 mM Tris-HCl pH 8 tirpale su 2–3 M karbamido. Kaip ir ilgalaikio dalelių dydžio bei temperatūrinio stabilumo tyrimuose, stebima, kad B-VLP dalelės yra jautresnės aplinkos sąlygoms, kadangi jos disociavo esant mažesnei karbamido koncentracijai. Kadangi po disociacijos gautų struktūrų dydis buvo tik kelis kartus mažesnis nei VLP, tikėtina, kad dalelės disociavo ne į kapsidę formuojančius monomerus, bet į didesnes struktūras, pavyzdžiui, dekamerus. Toks rezultatas gali būti pranašus, kadangi ateityje šis procesas bus taikomas įvairių junginių įkapsuliavimo tyrimuose – dalelių atgalinis formavimas iš didesnių struktūrų gali būti efektyvesnis nei iš į monomerus disociavusių dalelių.

3.6. Gag baltymo formuojamų dalelių įkapsuliavimo tyrimai

Nustačius, kad L-BC Gag baltymo formuojamos dalelės išlieka stabilios ilgą laiką įvairiomis tirtomis sąlygomis, įvertintos šių dalelių pernašos galimybės. Viena pagrindinių ir svarbiausių nanonešiklių savybių, be dalelių dydžio, jų stabilumo ir dispersiškumo, yra gebėjimas įkapsuliuoti įvairias medžiagas, jas apsaugoti ir atpalaiduoti reikiamoje vietoje (Alshawwa *et al.*, 2022; Elumalai *et al.*, 2024). Gag dalelių įkapsuliavimo galimybės nustatytos genų suliejimo bei pasyvios difuzijos metodais.

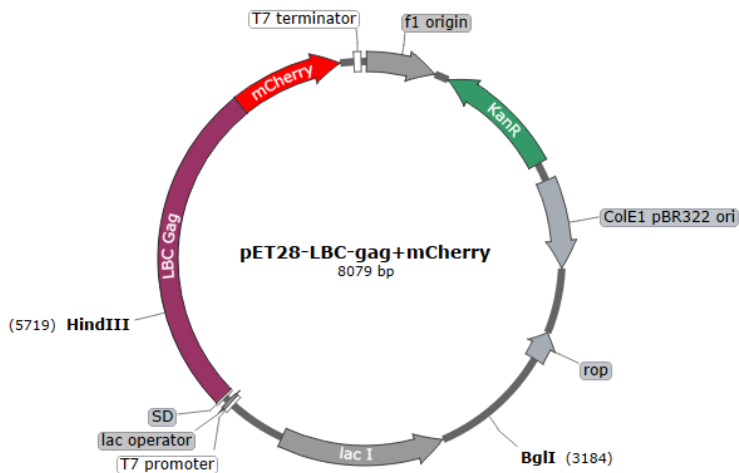
3.6.1. Fluorescuojančio baltymo mCherry įkapsuliavimas genų suliejimo metodu

L-BC Gag formuojamų dalelių įkapsuliavimui pasirinktas raudonai fluorescuojantis baltymas mCherry. Kadangi Gag VLP atveju dalelė yra formuojama iš 120 baltymo vienetų, genų inžinerijos būdu priliejančiam mCherry baltymą koduojantį geną prie GAG, į dalelę turėtų būti supakuojama 120 mCherry molekulių (3.6.1.1 pav.).



Pav. 3.6.1.1. Raudonai fluorescuojančio baltymo mCherry įkapsuliavimas į L-BC Gag VLP (PDB 7QWX) genų suliejimo būdu. Schema paruošta naudojant Biorender

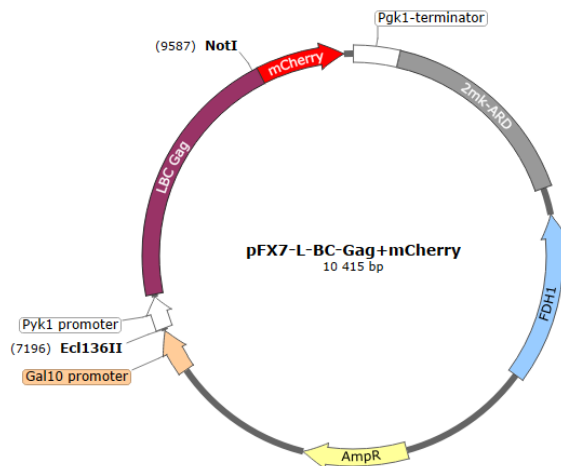
Sulietinio Gag+mCherry baltymo raiškos vektorių konstravimui panaudota laboratorijos kolegų anksčiau sukonstruota pYAK3-L-BC-gag+mCherry plazmidė (nepublikuota, Gerda Skinderytė). Iš šios plazmidės mCherry baltymą koduojantis geno fragmentas hidrolizuotas EcoRI ir XhoI restrikcijos endonukleazėmis, išskirtas iš agarozinio gelio ir įklonuotas į tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis hidrolizuotą bakterijų raiškos vektorių pET28a-LBC-gag. Gautas bakterijų raiškos vektorius pET28a-L-BC-gag+mCherry (3.6.1.2 pav.).



Pav. 3.6.1.2. Bakterijų raiškos vektoriaus pET28a-L-BC-gag+mCherry schema. Vektorius turi IPTG indukuojamą T7 promotorių, *lac* operatorių, *lac* represorių, ribosomų prisijungimo sritį (SD), sulietinį L-BC viruso Gag ir fluorescuojančio mCherry baltymo (Gag+mCherry) koduojančio geno fragmentą bei T7 terminatorių. Vektorius turi dvi DNR replikacijos pradžios sekas - bakteriofagų (f1) ORI DNR ir bakterijų (ColE1 pBR322) ORI DNR sekas. Vektoriaus atrankos žymenys: Kan^R genas, suteikiantis bakterijoms atsparumą kanamicinui

Mielių raiškos vektorius pFX7-L-BC-gag hidrolizuotas BglII restrikcijos endonukleaze, atliktas lipnių galų užpildymas ir defosforilinimas. mCherry baltymą koduojančio geno fragmentas hidrolizuotas BcuI ir BshTI restrikcijos endonukleazėmis iš pYAK3-L-BC-gag+mCherry plazmidės, atliktas lipnių galų užpildymas ir fragmentas įklonuotas į paruoštą mielių raiškos vektorių pFX7-L-BC-gag.

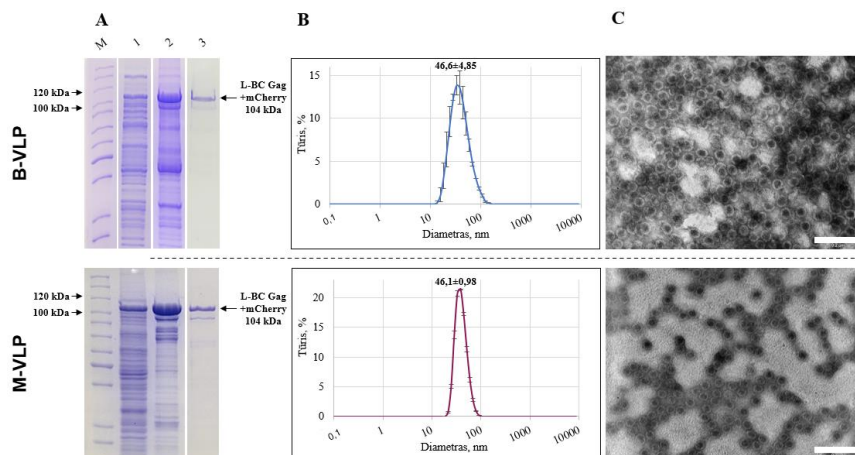
Gautas mielių raiškos vektorius pFX7-L-BC-gag+mCherry (3.6.1.3 pav.). Kolonijos su pET28a ir pFX7 vektoriuose įterptu sulietinį Gag+mCherry baltymą koduojančiu genu atrinktos naudojant HindIII ir BglII arba Ecl136II ir NotI restrikcijos endonukleazes (hidrolizės vietos nurodytos 3.6.1.2 ir 3.6.1.3 pav.). Sukonstruoti sulietinio Gag+mCherry baltymo raiškos vektoriai padauginti bakterijų *E. coli* DH10B kamiene. Atlikta į vektorius įterptu sulietinį Gag+mCherry baltymą koduojančio geno sekoskaita ir gautos sekos analizuotos naudojant programinę įrangą Vector NTI Advance v11.0 – mutacijų nenustatyta.



Pav. 3.6.1.3. Mielių raiškos vektoriaus pFX7-L-BC-Gag+mCherry schema. Vektorius turi galaktoze indukuojamą *GAL10* promotorių, *PYK1* geno, koduojančio piruvatkinazę, promotoriaus fragmentą, sulietinį L-BC viruso Gag ir fluorescuojančio mCherry baltymo (Gag+mCherry) koduojančio geno fragmentą bei *PGK1* terminatorių. Vektorius turi dvi DNR replikacijos pradžios sekas: mielių 2 μ plazmidės ARS ir bakterijų ORI DNR fragmentą. Vektoriaus atrankos žymenys: mielių *Candida maltosa* *FDH1* genas, suteikiantis mielėms atsparumą formaldehidui, bei Amp^R genas.

Sulietinio Gag+mCherry (104 kDa) baltymo sintezė atlikta *E. coli* BL21-AI bei *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] kamienuose, optimizuotomis Gag baltymui sąlygomis. Surinkta bakterijų ir mielių biomasė suardyta, centrifuguojant atskirta tirpių baltymų frakcija, kuri analizuota SDS-PAGE (3.6.1.4 pav. A, 1 takelis).

Nustatyta, kad tiek bakterijose, tiek mielėse sintetinamas tirpus sulietinis Gag+mCherry baltymas. Šio baltymo gryninimas atliktas Gag VLP gryninimui pritaikytu metodu – iš tirpių baltymų frakcijos dalelės išsodintos ultracentrifuguojant per 45 % sacharozės tirpalą ir atliktas papildomas gryninimas 1,36 g/cm³ tankio cezio chlorido tirpale (3.6.1.4 pav. A, 2 ir 3 takelis). Kadangi Gag baltymo formuojamų dalelių molekulinė masė yra 76 kDa×120=9,12 MDa, o Gag+mCherry – 104 kDa×120=16,8 MDa, sulietinio Gag+mCherry baltymo formuojamos dalelės pasiskirstė vidutinio tankio 5 frakcijoje. Pakeitus cezio chlorido tirpalą į ardymo buferinį tirpalą, DLS ir TEM metodais patvirtintas savaiminis sulietinio Gag+mCherry baltymo susirinkimas į daleles. DLS metodu nustatyta, kad vidutinis iš bakterijų išgrynintų Gag+mCherry formuojamų dalelių dydis yra 46,6±4,85, o iš mielių – 46,1±0,98 nm (3.6.1.4 pav. B).

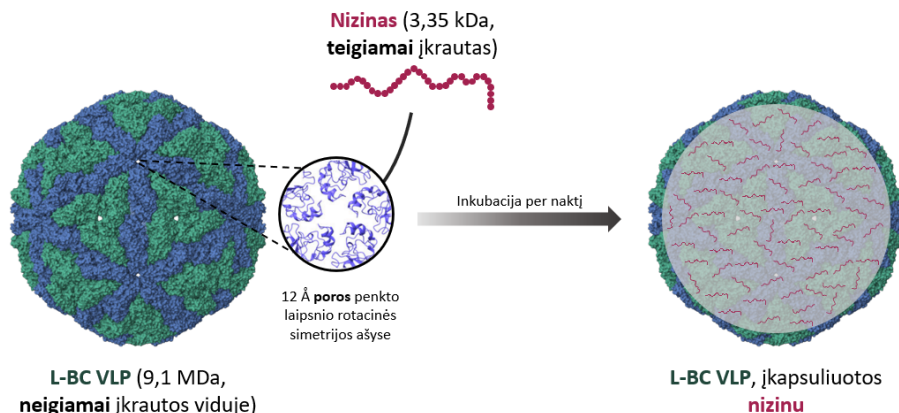


Pav. 3.6.1.4. Iš *E. coli* BL21-AI (B-VLP) bei *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] (M-VLP) kamienų išgryninto sulietinio Gag+mCherry baltymo formuojamų dalelių charakterizavimas. (A) Dalelės iš tirpių baltymų frakcijos (1 takelis) išsodintos ultracentrifuguojant per 45 % sacharozės tirpalą (2 takelis) ir išgrynintos 1,36 g/cm³ tankio cezio chlorido tirpale (3 takelis). M – baltymų molekulinės masės standartas PageRuler™ Unstained Protein Ladder. (B) Dalelių dydžio pasiskirstymas (pagal tūrio procentus) paruoštame sulietinio Gag+mCherry baltymo tirpale (0,5 mg/mL), nustatytas DLS metodu. Rezultatai pateikti kaip trijų biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu (±SN). (C) Išgryninto sulietinio Gag+mCherry baltymo (0,1 mg/mL) formuojamų VLP TEM mikrografijos. Skalės dydis: 200 nm.

Analizuojant TEM mikrografijas nustatyta, kad Gag+mCherry VLP dydis atitinka Gag VLP dydį, tačiau joms būdinga kiek pailgesnė forma (3.6.1.4 pav. C). Genų suliejimo metodu į Gag daleles sėkmingai įkapsuliuotas didelis raudonai fluorescuojančio mCherry baltymo kiekis, nesukeliant esminių pokyčių dalelių struktūroje.

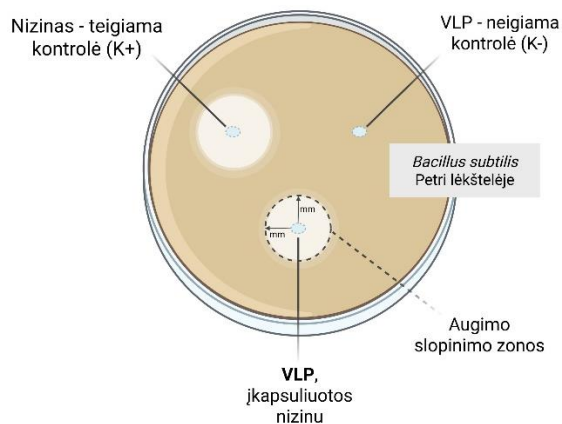
3.6.2. Antimikrobinio peptido nizino Z įkapsuliavimas pasyvios difuzijos metodu

L-BC Gag formuojamų dalelių įkapsuliavimui pasyvios difuzijos būdu pasirinktas mažos molekulinės masės (3,35 kDa) antimikrobinis peptidas nizinas Z (3.6.2.1 pav.). Jis priklauso bakteriocinams, kurie naudojami maisto kokybės gerinimui, apsaugai nuo patogeninių bakterijų ir potencialiai veikia kaip antivirusinės bei priešvėžinės medžiagos (Jančiū ir Gorgieva, 2021). Kadangi nizinas yra įkrautas teigiamai (Jančiū ir Gorgieva, 2021), jis buvo puikus kandidatas įkapsuliavimui į neigiamai įkrautą L-BC kapsidžių vidų (Grybchuk *et al.*, 2022).



Pav. 3.6.2.1. Antimikrobinio peptido nizino Z įkapsuliavimas į L-BC Gag VLP (PDB 7QWX) pasyvos difuzijos per kapsidės poras būdu. Schema paruošta naudojant Biorender.

Įkapsuliavimas atliktas naudojant skirtingus iš bakterijų bei mielių išgrynintų dalelių ir nizino molekulinis santykius: 1:1000, 1:100 arba 1:10 (žr. 2.2.17). Tokiu būdu paruošti mėginiai, kuriuose prieš filtravimą galutinė dalelių molinė koncentracija buvo 0,11 μM , o nizino atitinkamai 110, 11 arba 1,1 μM . Paruošti dalelių ir nizino mišiniai inkubuoti per naktį 4 $^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Mėginiai filtruoti naudojant Pierce koncentravimo kolonėles, skirtas baltymams, kurių molekulinė masė didesnė už 100 kDa. Kadangi vienos L-BC VLP dydis yra 9,1 MDa, o nizino – 3,35 kDa, nufiltruojamas tik į daleles neįkapsuliuotas nizinas. Po filtravimo atliktas papildomas mėginių plovimas. Buvo paruošti ir kontroliniai mėginiai: neigiama dalelių kontrolė, turinti tokia pačią 0,11 μM L-BC VLP koncentraciją, kaip ir paruoštuose mišiniuose, tačiau neturinti nizino, bei teigiamos kontrolės, turinčios tokias pačias 110, 11 ir 1,1 μM nizino koncentracijas, kaip ir paruoštuose mišiniuose, tačiau neturinčios dalelių. Kontroliniai mėginiai inkubuoti tomis pačiomis sąlygomis, tačiau jie nefiltruoti. Antibakterinis paruoštų mėginių poveikis prieš gram-teigiamas *B. subtilis*, *S. pyogenes* ir *S. aureus* bakterijas tirtas agar-difuziniu metodu (žr. 2.2.18) (3.6.2.2 pav.).



Pav. 3.6.2.2. Mėginių antibakterinio aktyvumo nustatymas agar-difuziniu metodu. Ant bakterijų užlašinama 20 μL analizuojamo mėginio ir po 24 val. inkubacijos 37 °C išmatuojamos augimo slopinimo zonų dydis (mm). Schema sudaryta naudojant *Biorender*.

Kaip ir buvo tikėtasi, L-BC VLP (neigiama kontrolė) neslopino nei vienos iš tirtų bakterijų rūšių augimo (3.6.2 lentelė). Į daleles neįkapsuliuotas nufiltruotas nizinas pasižymėjo kiek mažesniu antimikrobiniu aktyvumu, palyginti su teigiamomis nizinio kontrolėmis. Šie rezultatai leidžia manyti, kad į daleles įkapsuliuota bent dalis nizinio. Įkapsuliavimui naudojant 0,11 μM VLP ir 110 μM nizinio (1:1000 molekulinį dalelių:nizinio santykį), antibakterinis nizinu įkapsuliuotų dalelių aktyvumas nustatytas visoms tirtoms bakterijų rūšims, tačiau priklausomai nuo bakterijų rūšies aktyvumas buvo apie 27–43 % mažesnis, palyginti su teigiamomis nizinio kontrolėmis. Nizinu įkapsuliuotos dalelės, paruoštos naudojant 0,11 μM VLP ir 11 μM nizinio (1:100 molekulinį dalelių:nizinio santykį), slopino *B. subtilis* ir *S. pyogenes* bakterijų augimą, bet ne *S. aureus*. Įkapsuliavimui naudojant 0,11 μM VLP ir 1,1 μM nizinio (1:10 molekulinį dalelių:nizinio santykį) antibakterinis nizinu įkapsuliuotų dalelių aktyvumas nenustatytas nei ant vienos iš tirtų bakterijų – galimai šis santykis yra per mažas efektyviam nizinio įkapsuliavimui į daleles. Esminių skirtumų, nizinio įkapsuliavimui naudojant skirtingo tipo L-BC VLP, nenustatyta. Didžiausiu jautrumu paruoštiems mėginiams pasižymėjo *S. pyogenes* bakterijos.

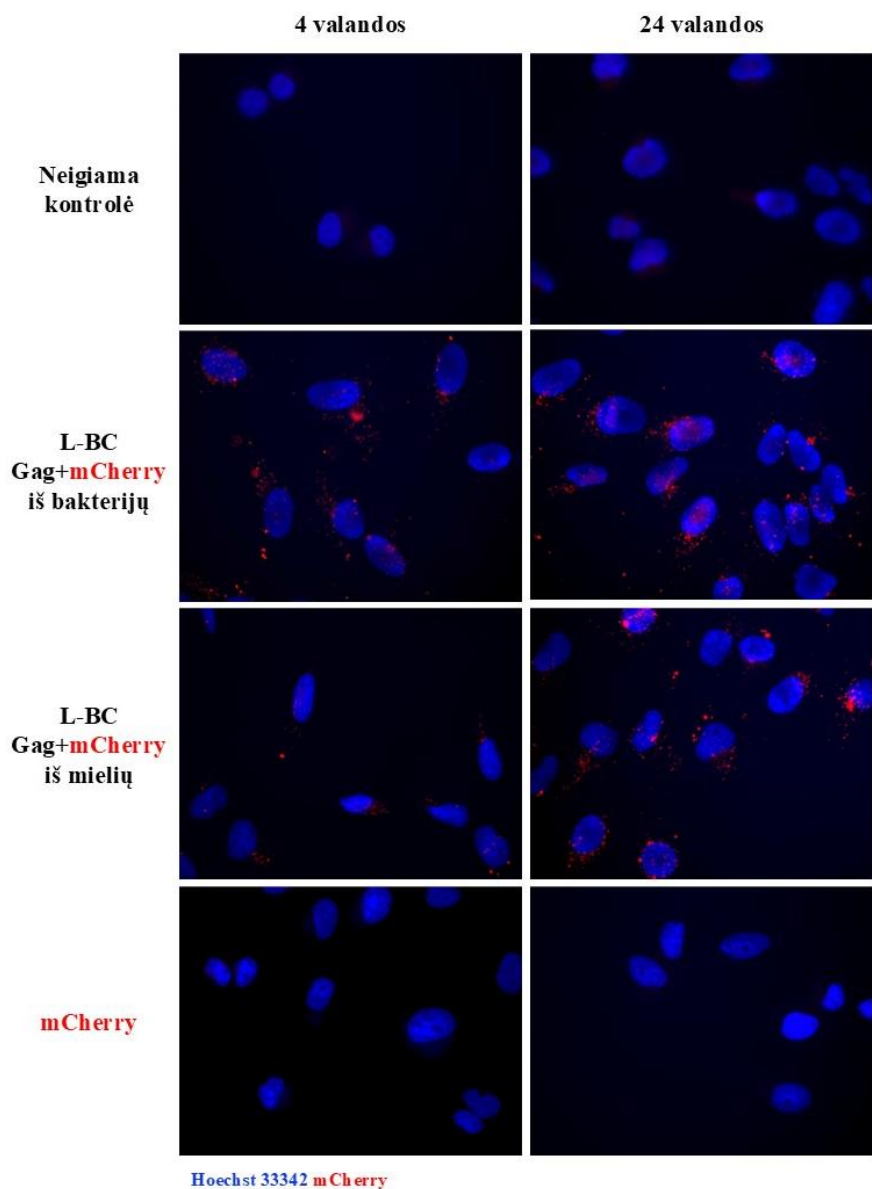
Lentelė 3.6.2. Mėginių antibakterinis aktyvumas prieš *B. subtilis*, *S. pyogenes* ir *S. aureus* bakterijas, įvertintas išmatuojant augimo slopinimo zonas (mm). Prie augimo slopinimo zonų nurodyta „N“ reiškia, kad mėginys bakterijų augimo neslopino. Rezultatai pateikti kaip penkių biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN).

Mėginys	Molinė konc. prieš filtravimą (μ M)		Augimo slopinimo zonos, mm		
	VLP	Nizino	<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Iš bakterijų išgrynintų dalelių įkapsuliavimas nizinu					
Gag B-VLP (neigiama kontrolė)	0,11	0	N	N	N
Nizinas (teigiama kontrolė)	0	110 11 1,1	12,8 $\pm$ 0,3 9,7 $\pm$ 0,3 8,2 $\pm$ 0,3	21,3 $\pm$ 0,3 13,5 $\pm$ 0,9 9,3 $\pm$ 0,6	10,2 $\pm$ 0,3 8,0 $\pm$ 0,3 N
Nizinu įkapsuliuotos B-VLP	0,11	110 11 1,1	9,3 $\pm$ 0,3 6,2 $\pm$ 0,3 N	12,2 $\pm$ 0,8 10,3 $\pm$ 0,6 N	6,7 $\pm$ 0,3 N N
Neįkapsuliuotas nizinas	-		13,3 $\pm$ 0,3 5,9 $\pm$ 0,5 N	19,5 $\pm$ 0,5 9,8 $\pm$ 0,3 N	8,7 $\pm$ 0,3 N N
Iš mielių išgrynintų dalelių įkapsuliavimas nizinu					
Gag M-VLP (neigiama kontrolė)	0,11	0	N	N	N
Nizinas (teigiama kontrolė)	0	110 11 1,1	13,0 $\pm$ 0,4 9,9 $\pm$ 0,2 8,1 $\pm$ 0,2	20,4 $\pm$ 1,3 13,9 $\pm$ 1,2 9,7 $\pm$ 0,7	10,3 $\pm$ 0,4 8,2 $\pm$ 0,3 N
Nizinu įkapsuliuotos M-VLP	0,11	110 11 1,1	9,0 $\pm$ 0,8 8,1 $\pm$ 0,2 N	11,9 $\pm$ 0,5 10,2 $\pm$ 0,4 N	6,2 $\pm$ 1,1 N N
Neįkapsuliuotas nizinas	-		12,2 $\pm$ 0,3 8,3 $\pm$ 0,4 N	19,9 $\pm$ 0,7 10,2 $\pm$ 0,4 N	9,6 $\pm$ 0,4 N N

Atlikti tyrimai rodo, kad pasyvi difuzija per kapsidėje esančias poras yra tinkamas metodas Gag dalelių įkapsuliavimui – nizinu įkapsuliuotos dalelės pasižymėjo antibakteriniu aktyvumu prieš *B. subtilis*, *S. pyogenes* ir *S. aureus* bakterijas.

3.7. Žinduolių ląstelių transdukcija Gag dalelėmis

Norint L-BC Gag formuojamas daleles pritaikyti nanodalelėmis paremtoje pernašoje, svarbu įvertinti jų gebėjimą patekti į žinduolių ląsteles. Šių dalelių patekimas į ląsteles įvertintas naudojant raudonai fluorescuojančiu mCherry baltymu įkapsuliuotas Gag daleles (žr. 3.6.1), leidžiančias jas stebėti fluorescenciniu mikroskopu. Šiame tyrime naudota 50 pM dalelių koncentracija žinduolių ląstelių kultivavimo terpėje, anksčiau optimizuota su kitų mielių virusų kilmės dalelėmis (nepublikuota, Joris Juška). Kultivavimo terpėje suspenduotos dalelės inkubuotos su plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos ląstelėmis 4 arba 24 val. 37 °C temperatūroje. Atliktas ląstelių plovimas, kurio metu pašalintos į ląsteles nepatekusios dalelės, ir ląstelės fiksuotos PFA tirpalu su branduolio lokalizacijos dažu Hoechst 33342. Paruoši mėginiai analizuoti fluorescenciniu mikroskopu AX70 (Olympus, Japonija) (3.7.1 pav.). Galutinės fluorescencijos nuotraukos paruoštos programine įranga ImageJ v1.53t (Schneider *et al.*, 2012).

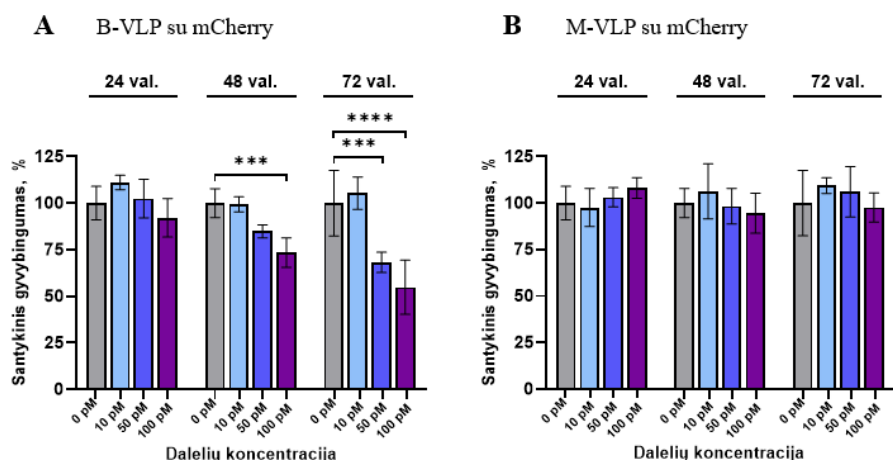


Pav 3.7.1. Plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos ląstelių analizė fluorescenciniu mikroskopu. A549 linijos ląstelės inkubuotos kultivavimo terpėje, neturinčioje dalelių (neigiama kontrolė), turinčioje 50 pM mCherry įkapsuliuotų Gag dalelių koncentraciją arba 50 pM mCherry baltymo koncentraciją, 4 (kairėje) arba 24 (dešinėje) valandas.

Kontroliniame neveiktų ląstelių mėginyje tiek po 4, tiek po 24 valandų stebima tik branduolių, nudažytų Hoechst 33342 dažu, fluorescencija. Tokie patys rezultatai matomi ir ląstelių, inkubuotų su laisvu mCherry baltymu, mėginiuose. Su mCherry įkapsuliuotomis Gag dalelėmis inkubuotose

ląstelėse jau po 4 val. matomas silpnas mCherry fluorescencijos signalas, netolygiai pasklidęs po ląstelių citoplazmą, kurio intensyvumas po 24 val. šiek tiek padidėjo. Šie rezultatai rodo, kad abiejų tipų dalelės pateko į A549 linijos ląsteles, nenaudojant papildomų transdukcijos reagentų.

Patvirtinus dalelių patekimą į ląsteles, nustatytas šių dalelių poveikis plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos ląstelių gyvybingumui. Šiam tyrimui pasirinktos trys mCherry įkapsuliuotų Gag dalelių koncentracijos: 50 pM, kuri naudota nustatant dalelių patekimą į ląsteles, bei mažesnė (10 pM) ir didesnė (100 pM) dalelių koncentracijos. A549 linijos ląstelės su dalelėmis inkubuotos 24, 48 ir 72 val. ir MTT testu įvertintas santykinis ląstelių gyvybingumas (3.7.2 pav.). Santykinio gyvybingumo vidurkis ir standartinis nuokrypis apskaičiuotas atlikus 6 biologinių pakartojimų matavimus, naudojant programinę įrangą GraphPad Prism v.8.0.1. Santykinio gyvybingumo statistinis reikšmingumas įvertintas atliekant veiktų (10, 50 arba 100 pM) ir neveiktų (0 pM) ląstelių santykinio gyvybingumo palyginimą (žr. 2.2.21).



Pav. 3.7.2. Santykinis plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos ląstelių gyvybingumas. Ląstelės inkubuotos kultivavimo terpėje, turinčioje 10, 50 arba 100 pM mCherry įkapsuliuotų Gag dalelių koncentraciją, 24, 48 arba 72 valandas. Santykinis gyvybingumas įvertintas kontrolinės (neveiktos) grupės atžvilgiu. Santykiniai gyvybingumai pateikti kaip šešių biologinių pakartojimų vidurkis su standartiniu nuokrypiu ($\pm$ SN). Statistinis reikšmingumas yra pateiktas kaip nurodyta: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***), $p \leq 0,0001$ (****).

Nustatyta, kad nei viena iš tirtų iš mielių išgrynintų mCherry įkapsuliuotų Gag dalelių koncentracijų (10, 50, 100 pM) reikšmingai nesumažino A549 linijos ląstelių santykinio gyvybingumo, nepriklausomai nuo inkubacijai naudoto laiko (24, 48, 72 val.) ($p > 0,05$) (3.7.2 pav. B). Ląsteles inkubuojant

su iš bakterijų išgrynintomis dalelėmis, pirmąją parą santykinis ląstelių gyvybingumas reikšmingai nekito (3.7.2 pav. A). Reikšmingas ląstelių santykinio gyvybingumo sumažėjimas iki 73 % ($p \leq 0,001$) nustatytas po 48 val. inkubacijos, esant 100 pM iš bakterijų išgrynintų dalelių koncentracijai terpėje. Po 72 val. inkubacijos, esant 100 pM dalelių koncentracijai terpėje, ląstelių santykinis gyvybingumas sumažėjo net iki 55 % ($p \leq 0,0001$), o esant mažesnei 50 pM koncentracijai – iki 68 % ($p \leq 0,001$). Remiantis šiais rezultatais, tik iš bakterijų išgrynintos dalelės reikšmingai sumažino A549 linijos ląstelių gyvybingumą.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe atlikta *S. cerevisiae* L-BC-1 viruso pagrindinio kapsidės baltymo Gag sintezė. Natyvių ScV-L-A virionų formavimuisi būtinas Gag baltymo N-acetilinis, tačiau ScV-L-BC virusui ši po-transliacinė modifikacija nereikalinga (Wesolowski ir Wickner, 1984). Dėl šios priežasties L-BC-1 viruso kapsidės baltymo Gag sintezei pasirinktos ne tik natyvaus L-BC-1 viruso šeimininkės mielės *S. cerevisiae*, bet ir bakterijos *E. coli*. Gag baltymo sintezei bakterijose pasirinktas BL21-AI kamienas, neturintis *lon* proteazės ir išorinės membranos proteazės OmpT, todėl jam būdinga sumažinta sintetinių heterologinių baltymų degradacija. Šiame kamieno *araBAD* operono *araB* lokuse įterptas T7 RNR polimerazės genas (*T7 RNAP*), kurio raiška reguliuojama *araBAD* promotoriumi ir indukuojama L-arabinoze (Bhawsinghka *et al.*, 2020). Pasirinkto bakterijų raiškos vektoriaus pET28a veikimas paremtas IPTG, pašalinančiu *lac* represorių nuo *lac* operono ir leidžiančiu T7 RNR polimerazei inicijuoti genų raišką (Dubendorff *et al.*, 1991; Shilling *et al.*, 2020). Gag baltymo sintezei mielėse pasirinktas BY4741[LA-LBC-] kamienas, neturintis natyvių L-A ir L-BC virusų, kurie trukdytų dalelių gryninimo procesui (laboratorijos kolekcija, nepublikuota). Pasirinktame mielių raiškos vektoriuje pFX7 įterpto geno raiška reguliuojama hibridiniu promotoriumi *GAL10-PYK1* ir indukuojama galaktoze (Sasnauskas *et al.*, 1999). Tokiu būdu sukurtos atitinkamai dviem (IPTG ir L-arabinoze) arba vienu priedu (galaktoze) indukuojamos Gag baltymo sintezės bakterijose ir mielėse sistemos, leidžiančios tiksliau reguliuoti tikslinio baltymo sintezę ir gauti didesnius jo kiekius (Fitz *et al.*, 2018). Optimizavus tirpaus Gag baltymo sintezės sąlygas, susintetintas Gag baltymas išgrynintas naudojant kitame mūsų tyrime taikytą dalelių gryninimo protokolą (Lukša *et al.*, 2022), pakeitus pirmąjį gryninimo žingsnį. Nustatyta, kad Gag baltymo išeiga bakterijose buvo kelis kartus mažesnė nei mielėse (atitinkamai apie 0,25 ir 0,78 mg/g). Taip pat buvo pastebėta, kad bakterijas transformavus plazmide pET28a-L-BC-gag sulėtėjo jų augimas. Tai gali reikšti, kad L-BC Gag baltymas yra toksiškas bakterijoms, tačiau toliau šis efektas netirtas, kadangi gautas tinkamas kiekis tirpaus Gag baltymo. Mielėse susintetinto Gag baltymo išeiga buvo palyginama į kitų VLP baltymų, kurių sintezei taip pat naudotas pFX7 raiškos vektorius: bakteriofago vB_EcoS_NBD2 uodegėlės baltymo gauta $0,85 \pm 0,33$ mg/g išeiga (Špakova *et al.*, 2019), o žmogaus poliomaviruso HPyVs VP1 baltymo – 0,42–1,05 mg/g (Norkiene *et al.*, 2015). Pokyčių mielių ląstelių augime jas transformavus pFX7-L-BC-gag plazmide nebuvo pastebėta.

Sėkmingas bakterijose ir mielėse susintetinto Gag baltymo susirinkimas į daleles patvirtintas DLS ir TEM metodais. DLS yra paprastas ir greitas metodas, paremtas dalelių šiluminiu (Brauno) judėjimu tirpale, susijusiu su hidrodinaminiu sferinių dalelių skersmeniu (Raval *et al.*, 2019). Šis metodas plačiai taikomas VLP dydžiui, agregacijai ir stabilumui nustatyti įvairiomis sąlygomis (Spice *et al.*, 2020; Al-Ghobashy *et al.*, 2017; Ausar *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2014). DLS metodas suteikia informacijos tik apie vidutinį dalelių dydį tirpale, todėl morfologinei dalelių analizei pasirinktas papildomas metodas TEM. Tiek iš bakterijų, tiek mielių išgryninto Gag baltymo mėginiuose nustatytos apie 38–43 nm dydžio simetriškos sferos formos dalelės, kurių dydis atitiko krio-EM mikroskopijos būdu nustatytą natyvaus L-BC-1 viruso dydį (38,5 nm) (Grybchuk *et al.*, 2022).

Nustačius, kad DLS metodas yra tinkamas Gag formuojamų dalelių dydžio matavimams, jis panaudotas nustatant buferinių tirpalų, jų pH, joninės jėgos, magnio jonų bei saugojimo temperatūros įtaką ilgalaikiam dalelių dydžio stabilumui. Net mažų agregatų kiekio nustatymas tirpale yra svarbus, kadangi tai gali padidinti bendrą agregacijos greitį dalelių saugojimo metu (Al-Ghobashy *et al.*, 2017). Iš mielių išgrynintų dalelių dydžių stabilumui temperatūra įtakos neturėjo – jų dydis reikšmingai nekito visą 24 savaitių laikotarpį, nepriklausomai nuo saugojimui naudotos temperatūros (4, 21 ar 37 °C). Bakterijose susintetintų dalelių dydis visą 24 savaitių laikotarpį reikšmingai nekito 4 °C temperatūroje, o 21 ir 37 °C temperatūroje dalelės atitinkamai po 24 ir 16 savaitių agregavo. Esant aukštesnei aplinkos temperatūrai vidiniame baltymų sluoksnyje padidėja hidrofobinių sąveikų kiekis, lemiantis agregaciją, todėl įprastai VLP dydis žemesnėse temperatūrose nekinta ilgesnį laiką (Xu *et al.*, 2014). Mažesnė temperatūros įtaka mielėse susintetintų dalelių stabilumui gali būti susijusi su raiškos sistemų skirtumais (žr. 1.3.2) bei faktu, kad mielės yra natūralus natyvaus L-BC-1 viruso šeimininkas (Ribas ir Wickner, 1996; Schmitt ir Breinig, 2002). Palyginti su HIV-1 voko baltymo ir Noroviruso GII-4 kapsidės baltymo VLP, kurios 23–24 °C temperatūroje PBS tirpale išliko stabilios tik iki 7 dienų (Huhti *et al.*, 2010; Aguado-Garcia *et al.*, 2022), abiejų tipų Gag dalelės pasižymėjo ilgalaikiu dydžio stabilumu.

Dalelių saugojimui naudojamo tirpalo pH bei jame esančios druskos veikia paviršinį VLP krūvį ir jų hidrofobiškumą, todėl šie veiksniai, kaip ir temperatūra, daro įtaką dalelių dydžio stabilumui. Dėl šios priežasties iš skirtingų virusinių baltymų sudarytų dalelių stabilumui optimalios sąlygos gali skirtis: CCMV dalelėms optimalus pH 5, rotaviruso – rūgštinis pH, o 2-serotipo adeno-asocijuoto viruso – šarminis pH 9 (Le ir Müller, 2021).

Ekstraląstelinės fazės neturintys grybų virusai, įskaitant L-BC, randami citozolyje, kurio pH yra neutralus (Ghabrial *et al.*, 2015). Nustatyta, kad rekombinantinio Gag baltymo formuojamoms dalelėms optimali neutralaus pH aplinka – jų dydis pH intervale nuo 6 iki 8 reikšmingai nekito visą 24 savaitių laikotarpį, nepriklausomai nuo dalelių tipo. Iš mielių išgrynintų dalelių dydžio stabilumui tiriamuoju laikotarpiu įtakos neturėjo ir tirta joninė aplinka (0–500 mM). Iš bakterijų išgrynintų dalelių dydis reikšmingai nekito esant žemai arba vidutinei NaCl koncentracijai buferiniame tirpale, tačiau esant 500 mM NaCl koncentracijai, šių dalelių dydis po 24 savaitių padidėjo apie 10 nm. Panašus dalelių dydžio padidėjimas stebėtas ir su šunų parvoviruso VLP (Xu *et al.*, 2014). Toks dalelių dydžio padidėjimas gali būti stebimas dėl dalelių pereinamosios būsenos arba kitaip vadinamo išsipūtimo iniciacijos (Bond *et al.*, 2020). Dalelių išsipūtimas gali įvykti dėl porų, esančių 3-čio laipsnio rotacinės simetrijos ašyse, atsiradimo ar jų padidėjimo (Segovia-González *et al.*, 2023). RCNMV viruso tyrimų metu pademonstruota, kad 200 mM EDTA arba Ca^{2+} jonų koncentracija tirpale nedaro įtakos jų dydžiui, tačiau atitinkamai lemia 11-13 Å dydžio kapsidės porų atsivėrimą arba užsivėrimą (Loo *et al.*, 2008). Poros natyvaus L-BC viruso kapsidėje identifiкуotos esant 10 mM MgCl_2 koncentracijai tirpale (Grybchuk *et al.*, 2022). Vis dėl to, tokios koncentracijos magnio jonų arba divalenčių jonų chelatoriaus EDTA įtaka Gag dalelių dydžio stabilumui tiriamuoju laikotarpiu nenustatyta.

Norint geriau suprasti veiksnius, darančius įtaką Gag dalelių stabilumui, atliktas dalelių stabilumo įvertinimas TSA metodu, kurio metu įvertintos jų lydymosi temperatūros. Nustatyta, kad pH intervale nuo 6 iki 8, Gag dalelėms būdingos dvi lydymosi temperatūros, kurios tarpusavyje skiriasi per 6–8 °C. Dviejų etapų terminis perėjimas nustatytas ir saldžiųjų bulvių plunksinės (angl. *Sweet potato feathery mottle virus*) bei švelnios demėtligės (angl. *Sweet potato mild mottle virus*) virusų, 2-tipo galvijų enteroviruso ir arklių rinio A viruso dalelėms. Šių dalelių dvi lydymosi temperatūros atitinkamai sietos su (1) dalelių disociacija į kapsidės monomerus ir (2) kapsidės subvienetų denatūracija (Walter *et al.*, 2012; Chase *et al.*, 2023). Norvalko viruso VLP atveju dvi dalelių lydymosi temperatūros sietos su dviejų dalelės formuojančio baltymo VP1 domenų denatūracija (Ausar *et al.*, 2006). Tiriant natyvaus L-BC viruso struktūrą nustatyta, kad šio viruso susirinkimas galimai vyksta keliais etapais – pradžioje susidaro asimetrinis Gag baltymo dimeras, tada penki tokie dimerai susijungia į dekamerą, o galiausiai iš dvylikos dekamerų susirenka pilna viruso kapsidė. Toks mechanizmas pasiūlytas todėl, kad tirpale rasta dalis atvirų kapsidžių, kurioms trūko vieno iš dvylikos dekamerų

(Grybchuk *et al.*, 2022). Remiantis mūsų atliktais tyrimais, manome, kad dvi Gag dalelės būdingos lydymosi temperatūros taip gali būti susijusios su VLP disociacija į atskiras daleles sudarančias struktūras (dekameras ar pavienius kapsidės baltymus) bei galutinę kapsidės baltymo denatūraciją. Mėginiuose, paruoštuose stipriai rūgštiniame pH 3, nebuvo nustatyta jokių apibrėžto dydžio struktūrų ar lydymosi temperatūrų, todėl galima manyti, kad šiame pH kapsidės baltymas jau buvo visiškai denatūravęs. Nors pH 4 tirpale taip pat nebuvo aptikta dalelių, iš mielių išgrynintoms dalelėms nustatyta viena lydymosi temperatūra – tikėtina, kad ji atitinką galutinę kapsidės baltymo denatūraciją. pH intervale nuo 6 iki 8 nustatytos dvi lydymosi temperatūros bei stebėtos įprasto dydžio dalelės, todėl galima daryti prielaidą, kad pirmoji lydymosi temperatūra atitinka dalelių disociaciją, o antroji – galutinę kapsidės denatūraciją. Šis mechanizmas taip pat galėtų paaiškinti, kodėl esant pH 5 nustatyta tik viena lydymosi temperatūra, nors stebėtos įprasto dydžio dalelės. Tikėtina, kad pH 5 tirpale disociacija jau buvo prasidėjusi, todėl jos signalas (atitinkantis pirmąją intensyvumo smailę) buvo silpnas ir visiškai persidengė su kapsidės baltymo denatūracijos signalu (atitinkančiu antrąją smailę), kitaip nei pH 6–8 atveju, kur stebimas dalinis signalų persidengimas. Šie rezultatai taip pat dar kartą patvirtino, kad Gag dalelių stabilumui optimali neutralaus pH aplinka.

Dalelių disociacija ir atgalinis formavimas padeda atsikratyti ląstelės-šeimininkės baltymų ir kitų molekulių, kurios į daleles patenka savaiminio susirinkimo metu (Nooraei *et al.*, 2021). Naudojant šį metodą į dalelių vidų galima patalpinti norimą krovinį, kuris negali būti konjuguojamas su virusinės kilmės baltymais genų suliejimo būdu ar netelpa per kapsidės poras (Wijesundara *et al.*, 2022). Siekiant ateityje tokį metodą pritaikyti Gag dalelių įkapsuliavimui, ištirtos įvairios sąlygos, galinčios inicijuoti VLP disociaciją. Pavyzdžiui, HPV VLP disociacijai naudojamas 5 % β ME ar 2 mM DTT tirpalas (McCarthy *et al.*, 1998; Mach *et al.*, 2006). Laukinio tipo šimpanzių virusas 40 praranda savo efektyvumą ir integralumą šarminiame pH ($\geq 10,7$). Nustatyta, kad šio viruso disociacija prasideda nuo dalelių išsipūtimo ir geno praradimo per susiformavusias poras, po kurio seka kapsidžių susitraukimas ir pilna disociacija į subvienetus (Asor *et al.*, 2020). Tam tikrais atvejais joninės jėgos padidinimas, o ne jos sumažinimas taip pat gali sukelti dalelių disociaciją (Lavelle *et al.*, 2007). Hepatito B šerdies baltymo formuojamų dalelių disociacija atliekama 2,5 M karbamido tirpale, tuo tarpu bakteriofago Q β disociacijai reikalinga net 6 M karbamido koncentracija bei maža joninė jėga (Le ir Müller, 2021). L-BC Gag dalelių atveju disociacija įvyko pH 12 tirpale arba į neutralaus pH buferinį tirpalą pridėjus karbamido.

Iš bakterijų išgrynintos Gag dalelės disocijavo esant 2 M, o iš mielių išgrynintos dalelės – 3 M karbamido koncentracijai tirpale. Abiejų tipų dalelės disocijavo į 12–22 nm dydžio struktūras. Remiantis nustatyto struktūrų dydžiu ir prieš tai minėtu L-BC virionams būdingu formavimosi mechanizmu, tikėtina, kad Gag dalelės disocijavo ne į kapsidę formuojančius monomerus, tačiau į didesnio dydžio struktūras, pavyzdžiui, dekamerus. Įdomu tai, kad iš bakterijų išgrynintas Gag daleles paveikus 10 % β ME, DLS metodu mėginyje buvo nustatytos daug mažesnės, net 1 nm nesiekiančios, struktūros. Literatūroje nurodoma, kad tokie maži dydžiai DLS prietaisu gali būti užfiksuoti tirpale esant didelio dydžio netirpiems agregatams, kurių prietaisas išmatuoti negali (Jerajani *et al.*, 2022). Kita galima priežastis, dėl kurios buvo nustatytos tokios mažos struktūros, yra tai, kad esant 10 % β ME koncentracijai tirpale dalelės galėjo disocijuoti ne į dekamerus, tačiau į kapsidę formuojančius Gag baltymo monomerus.

Ištyrus įvairių sąlygų įtaką Gag dalelių dydžiui ir temperatūriniam stabilumui, įvertintos šių dalelių įkapsuliavimo galimybės. Fluorescuojančių baltymų įkapsuliavimas į VLP vidų arba jų pateikimas dalelių išorėje yra vienas iš būdų, naudojamų VLP patekimo į žinduolių ląsteles stebėjimui. Įprastai fluorescuojanti molekulė prie dalelę formuojančio baltymo prijungiama kovalentiškai, pasitelkiant genų inžineriją (Shirbaghae *et al.*, 2016). Tokiu būdu molekulė prijungiama prie kiekvieno dalelę formuojančio vieneto, todėl tokia struktūra gali prarasti savaiminio susirinkimo savybę arba dėl neteisingo baltymo susilankstymo gali būti prarandamas jo tirpumas (Tariq *et al.*, 2022). Genų suliejimo strategija sėkmingai panaudota fluorescuojančių baltymų įkapsuliavimui į bakteriofago P22, adeno-asocijuoto viruso bei HSV daleles (O'Neil *et al.*, 2012; Lux *et al.*, 2005; Hoque *et al.*, 2005). Pritaikius šį metodą Gag baltymui, bakterijose *E. coli* ir mielėse *S. cerevisiae* sėkmingai susintetintas sulietinis Gag+mCherry baltymas, kuris formavo keliais nm didesnes ir kiek mažiau simetriškas daleles, palyginti su Gag. DLS matavimų metu nustatytas didesnis mCherry įkapsuliuotų Gag VLP dydis galėjo būti gautas būtent dėl jų mažesnio simetriškumo, kadangi šiuo metodu nustatomas sferinių dalelių skersmuo. Genų suliejimo būdu į Gag daleles įkapsuliuotas net apie ¼ visos dalelės masės sudarantis baltyminis krovinys, nesukeliant esminių pokyčių dalelių struktūroje. Fluorescuojančio mCherry baltymo įkapsuliavimas į daleles ne tik palengvino gryninimo procesą, bet ir leido jas panaudoti tiriant Gag dalelių patekimą į žinduolių ląsteles. Gag dalelių įkapsuliavimui išbandytas ir kitas metodas – pasyvi difuzija. L-BC viruso kapsidėje, kaip ir daugelyje kitų dgRNR virusų, 5-to ir 3-čio laipsnio rotacinės simetrijos ašyse randamos atitinkamai 9 bei 12 Å

skersmens poros, o tarp kapsidės baltymų – nuo 4 iki 7 nm pločio plyšiai (Grybchuk *et al.*, 2022). Kapsidėje esančių porų konformacija gali keistis keičiant buferinio tirpalo sudėtį – jos gali didėti ar mažėti, taip kontroliuojant patenkančių ir/ar išeinančių molekulių judėjimą. Pasitelkiant kapsidėje esančias poras, gali būti atliekamas mažų per poras telpančių junginių įkapsuliavimas į VLP vidų (Chung *et al.*, 2020). L-BC Gag dalelių įkapsuliavimui pasirinkome apie 3 kDa dydžio antimikrobinį peptidą nizinę Z (Jančič ir Gorgjeva, 2021). Šis peptidas pasirinktas ne tik dėl savo mažos molekulinės masės, bet ir dėl teigiamo krūvio, kadangi L-BC kapsidės vidus yra įkrautas neigiamai – priešingas įkapsuliuojamo krovinio ir kapsidės vidinis krūvis gali padidinti sėkmingo įkapsuliavimo tikimybę (McNeale *et al.*, 2022). Atlikus gautų mėginių antibakterinio aktyvumo vertinimą prieš *B. subtilis*, *S. pyogenes* bei *S. aureus* bakterijas nustatyta, kad nizinas pateko į Gag dalelių vidų ir šis procesas buvo grįžtamas – dalelės gebėjo atpalaiduoti įkapsuliuotą nizinę ir slopinti tirtų bakterijų augimą. Sėkmingas fluorescuojančio mCherry baltymo ir antimikrobinio peptido nizino įkapsuliavimas į Gag daleles rodo, kad šios dalelės pasižymi universaliais įkapsuliavimo galimybėmis.

Siekiant nustatyti ar Gag baltymo formuojamos dalelės gali būti pritaikytos pernašai, įvertintas jų gebėjimas patekti į žinduolių ląsteles ir nustatytas jų poveikis ląstelių gyvybingumui. Gag dalelių patekimas į žinduolių ląsteles pademonstruotas pasitelkus mCherry įkapsuliuotas daleles. Dalelėse esančio mCherry baltymo fluorescencija plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos ląstelėse buvo stebima jau po 4 valandų inkubacijos. Kadangi ląstelėse buvo stebimas netolygus taškinis mCherry fluorescencijos signalo pasiskirstymas, manoma, kad dalelės po patekimo į ląsteles galėjo likti sutelktos endosomose. Dalelių susitelkimas endosomose stebėtas ir su bakteriofago Q β dalelėmis, įkapsuliuotomis žaliai fluorescuojančiu GFP baltymu (Hagge *et al.*, 2023). Įprastai, dalelėms patekus į endosomas jos nukreipiamos į lizosomas degradacijai, taip sumažinant dalelėse pernešamo krovinio kiekį, bioprieinamumą ir terapinį efektą. Todėl kuriant pernašos nanodalelėmis sistemą svarbu užtikrinti, kad nanonešiklis ištrūktų iš endosomų prieš degradaciją (Hagge *et al.*, 2023). Kita vertus, literatūroje aprašoma, kad nanonešiklio nukreipimas į endolizosomas gali būti efektyvus krovinio pristatymo būdas. Parodyta, kad prie CPMV išorinio paviršiaus kovalentiškai prijungus doksorubiciną, tokios dalelės buvo endocituojamos HeLa ląstelių. Patekusios į endolizosomas dalelės dėl rūgštinės aplinkos disociavosi, o atpalaiduotas doksorubicinas ištrūko iš endolizosomų ir sukėlė citotoksinį poveikį ląstelėms. Maža dozė tokių

CPMV-DOX dalelių (1,45 μ M doksorubicino) pasižymėjo geresniu doksorubicino efektyvumu nei laisvas doksorubicinas. Tyrimo autoriai mano, kad dalelės geba doksorubiciną paskirstyti tolygiau ir efektyviau (Aljabali *et al.*, 2013). Panašus efektas stebėtas ir su DAPI įkapsuliuotomis CPMV. Šiame tyrime DAPI įkapsuliuotas pasyvios difuzijos būdu, o ne kovalentiškai, kaip doksorubicino atveju. Nustatyta, kad branduolyje DAPI buvo aptinkamas jau po 60 minučių (Yildiz *et al.*, 2013). Taigi, galvojant apie tolimesnį dalelių pritaikymą svarbu įvertinti, ar jos gebės disocijuoti rūgštinėje aplinkoje. Lizosomoms, į kurias gali būti nukreipiamos dalelės, būdingas rūgštinis pH (4,5–5) (Zeng *et al.*, 2020), tačiau mūsų atlikti tyrimai rodo, kad esant pH 5 Gag formuojamos dalelės išlieka stabilios, todėl lizosomose jos galimai nedisocijuotų ir neatpalaiduotų krovinių, kaip kad CPMV dalelės. Tai paaiškintų, kodėl net po 24 valandų ląstelių inkubacijos su dalelėmis, mCherry baltymo fluorescencijos signalas tolygiai nepasklido po ląstelės citoplazmą. Šių hipotezių patvirtinimui ar paneigimui reikalingas mCherry fluorescencijos signalo stebėjimas ląstelėse platesniame laiko intervale. Jeigu vis dėlto Gag dalelės į citoplazmą nepatektų, kaip alternatyvą būtų galima panaudoti kontroliuojamą krovinių atpalaidavimą lizosomose, panaudojus rūgščiai jautrias jungtis. Toks būdas pritaikytas PhMV VLP – į daleles cheminės konjugacijos būdu įkapsuliuotas 6-maleimidkaproilhidrazono doksorubicinas. Kadangi hidrazino jungtis yra jautri švelniai rūgštiniam pH, esančiam vėžinių ląstelių ir endosomų bei lizosomų aplinkoje, doksorubicinas atpalaiduojamas net neįvykus dalelių disociacijai (Hu ir Steinmetz, 2020). Kitas būdas panaudoti Gag daleles junginių pernašai galėtų būti pasitelkti pabėgimo iš endosomų metodą. Hagge ir jos kolegos sukūrė tioliams jautrų maleimido jungiklį, sujungiantį gerai žinomą į mitochondrijas nukreipiantį lipofilinį trifenilfosfonio katijoną (angl. *triphenylphosphonium cation*, TPP) su baltyminiu Q β VLP paviršiumi. Dėl savo lipofilinės ir katijoninės prigimties TPP suardo endosominę membraną ir taip nulemia VLP pabėgimą iš endosomų. Tokiai dalelei patekus į citozolį glutationas reaguoja su tioliams jautriu maleimido jungikliu, pašalina TPP nuo dalelių ir taip sustabdo jų judėjimą į mitochondrijas ir dalelės lieka citozolyje. Pademonstruotas tokio metodo sėkmingas pritaikymas GFP pernašai *in vitro* bei mažo ultravioletinėje šviesoje raudonai fluorescuojančio baltymo pernašai *in vivo*, stebint tolygų fluorescencijos signalą atitinkamai A549 linijos ląstelėse bei BALB/c pelių plaučių epitelinėse ląstelėse (Hagge *et al.*, 2023). Tokių funkcionalizavimo metodų poreikis Gag dalelėms bus apsvarstytas ateityje. Tiriant VLP pritaikymą junginių pernašai dažnai susiduriama su nepageidautinu dalelių imunogeniškumu, todėl ateityje reiktų patikrinti, ar Gag dalelės nesukelia

imuninio atsako, galinčio apriboti jų pritaikymą kuriant nanodalelėmis paremtą pernašos sistemą. Dažnu atveju imunogeniškumas gali būti gan lengvai išvengiamas daleles papildomai padengiant PEG (Yildiz *et al.*, 2013). Įvertinus A549 linijos ląstelių, inkubuotų su mCherry įkapsuliuotomis Gag dalelėmis, santykinį gyvybingumą nustatyta, kad citotoksiniu poveikiu ląstelėms pasižymėjo tik iš bakterijų išgrynintos dalelės. Vienas esminių gram-neigiamų bakterijų, įskaitant *E. coli*, ląstelių sienelių komponentų yra lipopolisacharidai (Bonhomme *et al.*, 2024). Kadangi bakterijų lipopolisacharidai yra endotoksinais, esant jų priemaišoms dalelių preparate gali būti stebimas citotoksinis poveikis ląstelėms. Siekiant atsikratyti tokių priemaišų, gauti mėginiai gali būti veikiami detergentais arba gali būti naudojami papildomi gryninimo metodai, pavyzdžiui, chromatografija (Le ir Müller, 2021). Kadangi mielėse susintetintos dalelės reikšmingai nesumažino santykinio ląstelių gyvybingumo, galimai jos būtų tinkamesnės efektyviai tikslinių junginių pernašai į žinduolių ląsteles.

IŠVADOS

1. Bakterijų *E. coli* ir mielių *S. cerevisiae* indukuojamos raiškos sistemos yra tinkamos L-BC-1 viruso kapsidės baltymo Gag formuojamų į virusus panašių dalelių generavimui.
2. Gag baltymo formuojamų dalelių dydis išlieka stabilus bent 24 savaites, daleles inkubuojant 4 °C temperatūroje. 21 ir 37 °C temperatūroje inkubuojamų dalelių dydžio stabilumas priklauso nuo dalelių sintezės sistemos: bakterijose susintetintos dalelės ilgalaikio saugojimo metu linkusios agreguotis.
3. Gag baltymo formuojamos dalelės praranda integralumą pH 12 tirpale arba karbamido koncentracijai neutralaus pH tirpale pasiekus 2–3 M.
4. Didinant Gag baltymo formuojamų dalelių aplinkos temperatūrą, stebimas dviejų pakopų dalelių struktūros praradimas.
5. Genų suliejimo būdas yra tinkamas mCherry baltymo įkapsuliavimui į Gag baltymo formuojamas daleles. Į dalelių vidų pasyvios difuzijos būdu įkapsuliuotas nizinis Z suteikia dalelėms antibakterinį aktyvumą.
6. mCherry įkapsuliuotos Gag baltymo formuojamos dalelės patenka į plaučių karcinomos epitelinio audinio A549 linijos žinduolių ląsteles jau po 4 valandų inkubacijos. Citotoksinis poveikis šioms ląstelėms pasizymi tik iš bakterijų išgrynintos dalelės.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aanei, I. L., ElSohly, A. M., Farkas, M. E., Netirojjanakul, C., Regan, M., Taylor Murphy, S., O'Neil, J. P., Seo, Y., Francis, M. B. (2016). Biodistribution of antibody-MS2 viral capsid conjugates in breast cancer models. *Mol Pharm*, 13(11), 3764–3772. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00566.
2. Aanei, I. L., Glasgow, J. E., Capehart, S. L., Francis, M. B. (2018). Encapsulation of negatively charged cargo in MS2 viral capsids. *Methods Mol Biol*, 1776, 303–317. doi:10.1007/978-1-4939-7808-3_21.
3. Al-Ghobashy, M. A., Mostafa, M. M., Abed, H. S., Fathalla, F. A., Salem, M. Y. (2017). Correlation between dynamic light scattering and size exclusion high performance liquid chromatography for monitoring the effect of pH on stability of biopharmaceuticals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1060, 1–9. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.05.029.
4. Aljabali, A. A., Shukla, S., Lomonossoff, G. P., Steinmetz, N. F., Evans, D. J. (2013). CPMV-DOX delivers. *Mol Pharm*, 10(1), 3–10. doi: 10.1021/mp3002057.
5. Alshawwa, S. Z., Kassem, A. A., Farid, R. M., Mostafa, S. K., Labib, G. S. (2022). Nanocarrier drug delivery systems: characterization, limitations, future perspectives and implementation of artificial intelligence. *Pharmaceutics*, 14(4), 883. doi: 10.3390/pharmaceutics 14040883.
6. Antos, J. M., Truttmann, M. C., Ploegh, H. L. (2016). Recent advances in sortase-catalyzed ligation methodology. *Curr Opin Struct Biol*, 38, 111–118. doi: 10.1016/j.sbi.2016.05.021.
7. Apostolopoulos, V., Chavda, V. P. (2024). Subunit protein-based vaccines In *Developments in Immunology, Advanced Vaccination Technologies for Infectious and Chronic Diseases*, Academic Press, 51–62. doi: 10.1016/B978-0-443-18564-9.00011-4.
8. Arias, L. S., Pessan, J. P., Vieira, A. P. M., Lima, T. M. T., Delbem, A. C. B., Monteiro, D. R. (2018). Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A perspective on synthesis, drugs, antimicrobial activity, and toxicity. *Antibiotics (Basel)*, 7(2), 46. doi: 10.3390/antibiotics 7020046.
9. Armero-Gimenez, J., Wilbers, R., Schots, A., Williams, C., Finner, R. (2023). Rapid screening and scaled manufacture of immunogenic virus-like particles in a tobacco BY-2 cell-free protein synthesis system. *Front Immunol*, 14, 1088852. doi: 10.3389/fimmu.2023.1088852.
10. Ashley, C. E., Carnes, E. C., Phillips, G. K., Durfee, P. N., Buley, M. D., Lino, C. A., Padilla, D. P., Phillips, B., Carter, M. B., Willman, C. L., Brinker, C. J., Caldeira, J. do C., Chackerian, B., Wharton, W., Peabody, D. S. (2011). Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage

- MS2 virus-like particles. *ACS Nano*, 5(7), 5729–5745. doi: 10.1021/nn201397z.
11. Balke, I., Zeltins, A. (2019). Use of plant viruses and virus-like particles for the creation of novel vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*, 145, 119–129. doi: 10.1016/j.addr.2018.08.007.
 12. Bhatti, R., Shakeel, H., Malik, K., Qasim, M., Khan, M. A., Ahmed, N., Jabeen, S. (2022). Inorganic nanoparticles: Toxic effects, mechanisms of cytotoxicity and phytochemical interactions. *Adv Pharm Bull*, 12(4), 757–762. doi: 10.34172/apb.2022.077.
 13. Bhawsinghka, N., Glenn, K. F., Schaaper, R. M. (2020). Complete Genome sequence of *Escherichia coli* BL21-AI. *Microbiol Resour Announc*, 9(10), e00009–20. doi: 10.1128/MRA.00009-20.
 14. Bianchini, G., Gianni L. (2014). The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. *Lancet Oncol*, 15, e58–e68. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70477-7.
 15. Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-based medicines: A review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm Res*, 33(10), 373–387. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5.
 16. Bond, K. M., Lykтей, N. A., Tsvetkova, I. B., Dragnea, B., Jarrold, M. F. (2020). Disassembly intermediates of the brome mosaic virus identified by charge detection mass spectrometry. *J Phys Chem B*, 124(11), 2124–2131. doi: 10.1021/acs.jpcc.0c00008.
 17. Bonhomme, D., Cavaillon, J-M., Werts, C. (2024). The dangerous liaisons in innate immunity involving recombinant proteins and endotoxins: Examples from the literature and the *Leptospira* field. *J Biol Chem*, 300(1), 105506. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105506.
 18. Borel, F., Konstantinova, P., Jansen, P. L. (2012). Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 56(6), 1371–1383. doi: 10.1016/j.jhep.2011.11.026.
 19. Bostian, K. A., Hopper, J. E., Rogers, D. T., Tipper, D. J. (1980). Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell*, 19(2), 403–414. doi: 10.1016/0092-8674(80)90514-0.
 20. Bright, R. A., Carter, D. M., Daniluk, S., Toapanta, F. R., Ahmad, A., Gavrillov, V., Massare, M., Pushko, P., Mytle, N., Rowe, T., Smith, G., Ross, T. M. (2007). Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*, 25(19), 3871–3878. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.01.106.
 21. Brune, K. D., Leneghan, D. B., Brian, I. J., Ishizuka, A. S., Bachmann, M. F., Draper, S. J., Biswas, S., Howarth, M. (2016). Plug-and-display: Decoration of virus-like particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci Rep*, 6, 19234. doi: 10.1038/srep19234.

22. Bundy, B. C., Franciszkowicz, M. J., Swartz, J. R. (2008). *Escherichia coli*-based cell-free synthesis of virus-like particles. *Biotechnol Bioeng*, 100(1), 28–37. doi: 10.1002/bit.21716.
23. Bundy, B. C., Swartz, J. R. (2011). Efficient disulfide bond formation in virus-like particles. *J Biotechnol*, 154(4), 230–239. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.04.011.
24. Burnett, M. J. B., Burnett, A. C. (2020). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2), 121–132. doi: 10.1002/ppp3.10073.
25. Burova, E., Ioffe, E. (2005). Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: Methods and implications. *Gene Ther*, 12(Suppl.1), S5–S17. doi: 10.1038/sj.gt.3302611.
26. Cai, H., Shukla, S., Steinmetz, N. F. (2020). The antitumor efficacy of CpG oligonucleotides is improved by encapsulation in plant virus-like particles. *Adv Funct Mater*, 30(15), 1908743. doi: 10.1002/adfm.201908743.
27. Cappella, A., Durham, S. R. (2012). Allergen immunotherapy for allergic respiratory diseases. *Hum Vaccin Immunother*, 8(10), 1499–1512. doi: 10.4161/hv.21629.
28. Caravan P. (2006). Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium-based MRI contrast agents. *Chem Soc Rev*, 35(6), 512–523. doi: 10.1039/b510982p.
29. Castón, J. R., Trus, B. L., Booy, F. P., Wickner, R. B., Wall, J. S., Steven, A. C. (1997). Structure of L-A virus: A specialized compartment for the transcription and replication of double-stranded RNA. *J Cell Biol*, 138(5), 975–985. doi: 10.1083/jcb.138.5.975.
30. Cervera, L., Gòdia, F., Tarrés-Freixas, F., Aguilar-Gurrieri, C., Carrillo, J., Blanco, J., Gutiérrez-Granados, S. (2019). Production of HIV-1-based virus-like particles for vaccination: achievements and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(18), 7367–7384. doi: 10.1007/s00253-019-10038-3.
31. Chen, Q., Lai, H. (2013). Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 9(1), 26–49. doi: 10.4161/hv.22218.
32. Chen, X. S., Casini, G., Harrison, S. C., Garcea, R. L. (2001). Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol*, 307(1), 173–182. doi: 10.1006/jmbi.2000.4464.
33. Chen, Y., Zhang, Y., Quan, C., Luo, J., Yang, Y., Yu, M., et al. (2015). Aggregation and antigenicity of virus like particle in salt solution-A case study with hepatitis B surface antigen. *Vaccine*, 33(35), 4300–4306. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.03.078
34. Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. (2012). *Saccharomyces* Genome Database: The genomics resource of

- budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 40, D700–D705. doi: 10.1093/nar/gkr1029.
35. Cheung, R. C., Ng, T. B., Wong, J. H., Chan, W. Y. (2015). Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*, 13(8), 5156–5186. doi: 10.3390/md13085156.
 36. Chung, Y. H., Cai, H., Steinmetz, N. F. (2020). Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 156, 214–235. doi: 10.1016/j.addr.2020.06.024.
 37. Comas-Garcia, M., Colunga-Saucedo, M., Rosales-Mendoza, S. (2020). The role of virus-like particles in medical biotechnology. *Mol Pharm*, 17, 4407–4420. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00828.
 38. Conti, L., Bolli, E., Di Lorenzo, A., Franceschi, V., Macchi, F., Riccardo, F., Ruiu, R., Russo, L., Quaglino, E., Donofrio, G., Cavallo, F. (2020). Immunotargeting of the xCT cystine/glutamate antiporter potentiates the efficacy of HER2-targeted immunotherapies in breast cancer. *Cancer Immunol Res*, 8(8), 1039–1053. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0082.
 39. Cortes-Perez, N. G., Kharrat, P., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L. G. (2009). Heterologous production of human papillomavirus type-16 L1 protein by a lactic acid bacterium. *BMC Res Notes*, 2, 167. doi: 10.1186/1756-0500-2-167.
 40. Dai, S., Wang, H., Deng, F. (2018). Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *J Immunol Sci*, 2(2), 36–41. doi:10.29245/2578-3009/2018/2.1118.
 41. Deshayes, C., Gosselin-Grenet, A. S., Ogliastro, M., Lapied, B., Apaire-Marchais, V. (2022). Can virus-like particles be used as synergistic agent in pest management? *Viruses*, 14(5), 943. doi:10.3390/v14050943.
 42. Destito, G., Yeh, R., Rae, C. S., Finn, M. G., Manchester, M. (2007). Folic acid-mediated targeting of cowpea mosaic virus particles to tumor cells. *Chem Biol*, 14(10), 1152–1162. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.08.015.
 43. Ding, X., Liu, D., Booth, G., Gao, W., Lu Y. (2018). Virus-like particle engineering: from rational design to versatile applications. *Biotechnol J*, 13(5), e1700324. doi: 10.1002/biot.201700324.
 44. Dinman, J. D., Icho, T., Wickner, R. B. (1991). A -1 ribosomal frameshift in a double-stranded RNA virus of yeast forms a gag-pol fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(1), 174–178. doi: 10.1073/pnas.88.1.174.
 45. Dinman, J. D., Wickner, R. B. (1992). Ribosomal frameshifting efficiency and gag/gag-pol ratio are critical for yeast M1 double-stranded RNA virus propagation. *J Virol*, 66(6), 3669–3676. doi: 10.1128/JVI.66.6.3669-3676.1992.
 46. Donaldson, B., Al-Barwani, F., Young, V., Scullion, S., Ward, V., Young, S. (2015). Virus-like particles, a versatile subunit vaccine platform. In *Subunit Vaccine Delivery (Advances in Delivery Science and Technology)*, Springer ,159–180. doi: 10.1007/978-1-4939-1417-3_9.

47. Drinnenberg, I. A., Fink, G. R. ir Bartel, D. P. (2011). Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. *Science*, 333(6049), 1592. doi: 10.1126/science.1209575.
48. Dubendorff, J. W., Studier, F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Biol*, 219(1), 45–59. doi: 10.1016/0022-2836(91)90856-2. PMID: 1902522.
49. Eliodório, K. P., Cunha, G. C. de G. E., Müller, C., Lucaroni, A. C., Giudici, R., Walker, G. M., Alves, S. L., Basso, T. O. (2019). Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. *Adv Appl Microbiol*, 109, 61–119. doi: 10.1016/bs.aambs.2019.10.002.
50. Elumalai, K., Srinivasan, S., Shanmugam, A. (2024). Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomedical Technology*, 5, 109–122. doi: 10.1016/j.bmt.2023.09.001.
51. Erazo-Oliveras, A., Muthukrishnan, N., Baker, R., Wang, T. Y., Pellois, J. P. (2012). Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. *Pharmaceuticals (Basel)*, 5(11), 1177–1209. doi: 10.3390/ph5111177.
52. Esteban, R., Wickner, R. B. (1986). Three different M1 RNA-containing viruslike particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol Cell Biol*, 6(5), 1552–1561. doi: 10.1128/mcb.6.5.1552-1561.1986.
53. Esteban, R., Wickner, R. B. (1988). A deletion mutant of L-A double-stranded RNA replicates like M1 double-stranded RNA. *J Virol*, 62(4), 1278–1285. doi: 10.1128/JVI.62.4.1278-1285.1988.
54. Farkas, M. E., Aanei, I. L., Behrens, C. R., Tong, G. J., Murphy, S. T., O'Neil, J. P., Francis, M. B. (2013). PET Imaging and biodistribution of chemically modified bacteriophage MS2. *Mol Pharm*, 10(1), 69–76. doi: 10.1021/mp3003754.
55. Fernandes, F., Dias-Teixeira, M., Delerue-Matos, C., Grosso, C. (2021). Critical review of lipid-based nanoparticles as carriers of neuroprotective drugs and extracts. *Nanomaterials (Basel)*, 11(3), 563. doi: 10.3390/nano11030563.
56. Fernandes, F., Teixeira, A. P., Carinhas, N., Carrondo, M. J., Alves, P. M. (2013). Insect cells as a production platform of complex virus-like particles. *Expert Rev Vaccines*, 12(2), 225–236. doi: 10.1586/erv.12.153.
57. Field, L. J., Bobek, L. A., Brennan, V. E., Reilly, J. D., Bruenn, J. A. (1982). There are at least two yeast viral double-stranded RNAs of the same size: an explanation for viral exclusion. *Cell*, 31(1), 193–200. doi: 10.1016/0092-8674(82)90419-6.
58. Fisk, D. G., Ball, C. A., Dolinski, K., Engel, S. R., Hong, E. L., Issel-Tarver, L., Schwartz, K., Sethuraman, A., Botstein, D., Cherry, J. M.

- (2006). *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: A working hypothesis. *Yeast*, 23, 857–865. doi: 10.1002/yea.1400.
59. Fitz, E., Wanka, F., Seiboth, B. (2018). The promoter toolbox for recombinant gene expression in *Trichoderma reesei*. *Front Bioeng Biotechnol*, 6, 135. doi: 10.3389/fbioe.2018.00135.
 60. Freivalds, J., Dislers, A., Ose, V., Pumpens, P., Tars, K., Kazaks, A. (2011). Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 75(2), 218–224. doi: 10.1016/j.pep.2010.09.010.
 61. French, T., Roy, P. (1990). Synthesis of bluetongue virus (BTV) core-like particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J Virol*, 64(4), 1530–1536. doi: 10.1128/JVI.64.4.1530-1536.1990.
 62. Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L. (2017). Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnol*, 39, 174–180. doi: 10.1016/j.nbt.2017.07.010.
 63. Fujimura, T., Esteban, R. (2011). Cap-snatching mechanism in yeast L-A double-stranded RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(43), 17667–17671. doi: 10.1073/pnas.1111900108.
 64. Fujimura, T., Esteban, R. (2013). Cap snatching in yeast L-BC double-stranded RNA totivirus. *J Biol Chem*, 288(33), 23716–23724. doi: 10.1074/jbc.M113.490953.
 65. Fujimura, T., Wickner, R. B. (1988). Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *In vitro* conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form. *J Biol Chem*, 263(1), 454–460. doi: 10.1016/S0021-9258(19)57414-2.
 66. Fitcher, A. B. (1988). The 2 μ m circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 4(1), 27–40. doi: 10.1002/yea.320040104.
 67. Galaway, F. A., Stockley, P. G. (2013). MS2 virus-like particles: a robust, semisynthetic targeted drug delivery platform. *Mol Pharm*, 10(1), 59–68. doi: 10.1021/mp3003368.
 68. Gambhir, S. S. (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer*, 2(9), 683–693. doi: 10.1038/nrc882.
 69. Garg, A., Quartino, A., Li, J., Jin, J., Wada, D. R., Li, H., Cortés, J., McNally, V., Ross, G., Visich, J., Lum, B. (2014). Population pharmacokinetic and covariate analysis of pertuzumab, a HER2-targeted monoclonal antibody, and evaluation of a fixed, non-weight-based dose in patients with a variety of solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 74(4), 819–829. doi: 10.1007/s00280-014-2560-3.
 70. Gedgaudas, M., Baronas, D., Kazlauskas, E., Petrauskas, V., and Matulis, D. (2022). Thermott: a comprehensive online tool for protein-ligand binding constant determination. *Drug Discov Today*, 27(8):2076–2079. doi: 10.1016/j.drudis.2022.05.008.

71. Gedvilaite, A., Frömmel, C., Sasnauskas, K., Micheel, B., Ozel, M., Behrsing, O., Staniulis, J., Jandrig, B., Scherneck, S., Ulrich, R. (2000). Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology*, 273(1), 21–35. doi: 10.1006/viro.2000.0392.
72. Ghabrial, S. A. (1998). Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes*, 16(1), 119–131. doi: 10.1023/a:1007966229595.
73. Gillitzer, E., Suci, P., Young, M., Douglas, T. (2006). Controlled ligand display on a symmetrical protein-cage architecture through mixed assembly. *Small*, 2(8–9), 962–966. doi: 10.1002/smll.200500433.
74. Gillitzer, E., Willits, D., Young, M., Douglas, T. (2002). Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation. *Chem Comm*, (20), 2390–2391. doi:10.1039/b207853h.
75. Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567. doi: 10.1126/science.274.5287.546.
76. Gourdelier, M., Swain, J., Arone, C. (2022). Optimized production and fluorescent labeling of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Sci Rep*, 12, 14651. doi: 10.1038/s41598-022-18681-z.
77. Goverdhan, S., Puntel, M., Xiong, W., Zirger, J. M., Barcia, C., Curtin, J. F., Soffer, E. B., Mondkar, S., King, G. D., Hu, J., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Greengold, D. S., Lowenstein, P. R., Castro, M. G. (2005). Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges. *Mol Ther*, 12(2), 189–211. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.03.022.
78. Grgacic, E. V., Anderson, D. A. (2006). Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*, 40(1), 60–65. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.07.018.
79. Gronchi, N., De Bernardini, N., Cripwell, R. A., Treu, L., Campanaro, S., Basaglia, M., Foulquié-Moreno, M. R., Thevelein, J. M., Van Zyl, W. H., Favaro, L., Casella, S. (2022). Natural *Saccharomyces cerevisiae* strain reveals peculiar genomic traits for starch-to-bioethanol production: the design of an amylolytic consolidated bioprocessing yeast. *Front Microbiol*, 12, 768562. doi: 10.3389/fmicb.2021.768562.
80. Grunewald, W., Bury, J., Inzé, D. (2013). Biotechnology: Thirty years of transgenic plants. *Nature*, 497(7447), 40. doi:10.1038/497040a.
81. Grybchuk, D., Procházková, M., Füzik, T., Konovalovas, A., Serva, S., Yurchenko, V., Plevka, P. (2022). Structures of L-BC virus and its open particle provide insight into Totivirus capsid assembly. *Commun Biol*, 5(1), 847. doi: 10.1038/s42003-022-03793-z.

82. Guglielmi, K. M., McDonald, S. M., Patton, J. T. (2010). Mechanism of intraparticle synthesis of the rotavirus double-stranded RNA Genome. *J Biol Chem*, 285(24), 18123-18128. doi: 10.1074/jbc.R110.117671.
83. Gupta, R., Arora, K., Roy, S. S., Joseph, A., Rastogi, R., Arora, N. M., Kundu, P. K. (2023). Platforms, advances, and technical challenges in virus-like particles-based vaccines. *Front Immunol*, 14, 1123805. doi: 10.3389/fimmu.2023.1123805.
84. Hagge, L., Shahrivarkevishahi, A., Al-Kharji, N., Chen, Z., Brohlin, O., Trashi, I., Tumac, A., Castro, F., Adlooru, A., Lee, H., Firouzi, H., Cornelius, S., De Nisco, N., Gassensmith, J. (2023). Intracellular delivery of virus-like particles using a sheddable linker. *J Mater Chem B*, 11, 7126. doi: 10.1039/D3TB00696D.
85. Hajebi, S., Yousefiasl, S., Rahimmanesh, I., Dahim, A., Ahmadi, S., Kadumudi, F. B., Rahgozar, N., Amani, S., Kumar, A., Kamrani, E., Rabiee, M., Borzacchiello, A., Wang, X., Rabiee, N., Dolatshahi-Pirouz, A., Makvandi, P. (2022). Genetically engineered viral vectors and organic-based non-viral nanocarriers for drug delivery applications. *Adv Healthc Mater*, 11(20), e2201583. doi: 10.1002/adhm.202201583.
86. Hashmi, M. P., Koester, T. M. (2018). Applications of synthetically Produced Materials in Clinical Medicine, In *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*, Elsevier, 1(3), 161–176. doi: 10.1016/B978-0-12-803581-8.10258-9.
87. Hassine, I. H., M'hadheb, M. B., Almalki, M. A., Gharbi, J. (2024). Virus-like particles as powerful vaccination strategy against human viruses. *Rev Med Virol*, 34(1), e2498. doi: 10.1002/rmv.2498.
88. He, J., Yu, L., Lin, X., Liu, X., Zhang, Y., Yang, F., Deng, W. (2022). Virus-like particles as nanocarriers for intracellular delivery of biomolecules and compounds. *Viruses*, 14(9), 1905. doi: 10.3390/v14091905.
89. Herbert, F. C., Brohlin, O., Galbraith, T., Benjamin, C., Reyes, C. A., Luzuriaga, M. A., Shahrivarkevishahi, A., Gassensmith, J. J. (2020). Supramolecular encapsulation of small-ultra red fluorescent proteins in virus-like nanoparticles for non-invasive *in vivo* imaging agents. *Bioconjug Chem*, 31(5), 1529–1536. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00190.
90. Hinnen, A., Hicks, J. B., Fink, G. R. (1978). Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75(4), 1929–1933. doi: 10.1073/pnas.75.4.1929.
91. Hirschberg, S., Bauer, H., Kamhieh-Milz, J., Ringel, F., Harms, C., Eddin, O. K., Pruß, A., Hanack, K., Schulze-Forster, K. (2022). SARS-CoV-2 virus-like particles (VLPs) specifically detect humoral immune reactions in an ELISA-based platform. *Antibodies (Basel)*, 11(4), 76. doi: 10.3390/antib11040076.
92. Hirschman, J. E., Balakrishnan, R., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hong, E. L., Livstone, M. S.,

- Nash, R. ir kiti. (2006). Genome snapshot: A new resource at the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) presenting an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nucleic Acids Res*, 34, D442–D445. doi: 10.1093/nar/gkj117.
93. Hogue, I. B., Bosse, J. B., Engel, E. A., Scherer, J., Hu, J. R., Del Rio, T., Enquist, L. W. (2015). Fluorescent protein approaches in alpha herpesvirus research. *Viruses*, 7(11), 5933–5961. doi: 10.3390/v7112915.
 94. Horne, R. W., Nagington, J. (1959). Electron microscope studies of the development. *J Mol Biol*, 1(4–5), 333–338. doi: 10.1016/S0022-2836(59)80015-2.
 95. Hough, B., Steenkamp, E., Wingfield, B., Read, D. (2023). Fungal viruses unveiled: A Ccmprehensive review of mycoviruses. *Viruses*, 15(5), 1202. doi: 10.3390/v15051202.
 96. Hovlid, M. L., Steinmetz, N. F., Laufer, B., Lau, J. L., Kuzelka, J., Wang, Q., Hyypiä, T., Nemerow, G. R., Kessler, H., Manchester, M., Finn, M. G. (2012). Guiding plant virus particles to integrin-displaying cells. *Nanoscale*, 4(12), 3698–705. doi: 10.1039/c2nr30571b.
 97. Hu, H., Masarapu, H., Gu, Y., Zhang, Y., Yu, X., Steinmetz, N. F. (2019). Physalis mottle virus-like nanoparticles for targeted cancer imaging. *ACS Appl Mater Interfaces*, 11(20), 18213–18223. doi: 10.1021/acsami.9b03956.
 98. Hu, H., Steinmetz, N. F. (2020). Doxorubicin-loaded physalis mottle virus particles function as a pH-responsive prodrug enabling cancer therapy. *Biotechnol J*, 15(12), e2000077. doi: 10.1002/biot.202000077.
 99. Huang, X., Wang, X., Zhang, J., Xia, N., Zhao, Q. (2017). *Escherichia coli*-derived virus-like particles in vaccine development. *NPJ Vaccines*, 2(1), 1–9. doi: 10.1038/s41541-017-0006-8.
 100. Huang, Z., LePore, K., Elkin, G., Thanavala, Y., Mason, H. S. (2008). High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnol J*, 6(2), 202–209. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00316.x.
 101. Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., Le Mercier, P. (2011). ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res*, 39(Database issue), D576–582. doi: 10.1093/nar/gkq901.
 102. Icho, T., Wickner, R. B. (1989). The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J Biol Chem*, 264(12), 6716–6723. doi: 10.1016/S0021-9258(18)83488-3.
 103. Ikwaagwu, B., Tullman-Ercek, D. (2022). Virus-like particles for drug delivery: a review of methods and applications. *Curr Opin Biotechnol*, 78, 102785. doi: 10.1016/j.copbio.2022.102785.
 104. Irvin, R. T., MacAlister, T. J., Costerton, J. W. (1981). Tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer modification of *Escherichia*

- coli* outer membrane permeability. *J Bacteriol*, 145(3), 1397–403. doi: 10.1128/jb.145.3.1397-1403.1981.
105. Jančič, U., Gorgieva, S. (2021). Bromelain and nisin: the natural antimicrobials with high potential in biomedicine. *Pharmaceutics*, 14(1), 76. doi: 10.3390/pharmaceutics14010076.
 106. Jarvis, D. L. (2009). Baculovirus–Insect Cell Expression Systems. *Methods Enzymol*, 463, 191–222. doi: 10.1016/s0076-6879(09)63014-7.
 107. Jeong, H., Seong, B. L. (2017). Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections. *J Microbiol*, 55(3), 220–230. doi: 10.1007/s12275-017-7058-3.
 108. Jerajani, K., Wan, Y., Hickey, J. M., Kumru, O. S., Sharma, N., Pullagurla, S. R., Ogun, O., Mapari, S., Whitaker, N., Brendle, S., Christensen, N. D., Batwal, S., Mahedvi, M., Rao, H., Dogar, V., Chandrasekharan, R., Shaligram, U., Joshi, S. B., Volkin, D. B. (2022). Analytical and preformulation characterization studies of human papillomavirus virus-like particles to enable quadrivalent multi-dose vaccine formulation development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 111(11), 2983–2997. doi: 10.1016/j.xphs.2022.07.019.
 109. Jiang, T., Jin, K., Liu, X., Pang, Z. (2017). Nanoparticles for tumor targeting. In *Biopolymer-Based Composites*, Woodhead Publishing, 221–267. doi: 10.1016/B978-0-08-101914-6.00008-9.
 110. Kalnciema, I., Skrastina, D., Ose, V., Pumpens, P., Zeltins, A. (2012). Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol Biotechnol*, 52(2), 129–139. doi: 10.1007/s12033-011-9480-9.
 111. Kang, S., Lander, G. C., Johnson, J. E., Prevelige, P. E. (2008). Development of bacteriophage p22 as a platform for molecular display: genetic and chemical modifications of the procapsid exterior surface. *Chembiochem*, 9(4), 514–518. doi: 10.1002/cbic.200700555.
 112. Khambhati, K., Bhattacharjee, G., Gohil, N., Braddick, D., Kulkarni, V., Singh, V. (2019). Exploring the potential of cell-free protein synthesis for extending the abilities of biological systems. *Front Bioeng Biotechnol*, 7, 248. doi: 10.3389/fbioe.2019.00248
 113. Khan, K. H. (2013). Gene expression in mammalian cells and its applications. *Adv Pharm Bull*, 3(2), 257–263. doi: 10.5681/apb.2013.042.
 114. Kim, H. J., Kim, H. J. (2017). Yeast as an expression system for producing virus-like particles: what factors do we need to consider? *Lett Appl Microbiol*, 64(2), 111–123. doi: 10.1111/lam.12695.
 115. Kim, K. R., Lee, A. S., Kim, S. M., Heo, H. R., Kim, C. S. (2023). Virus-like nanoparticles as a theranostic platform for cancer. *Front Bioeng Biotechnol*, 10, 1106767. doi: 10.3389/fbioe.2022.1106767.
 116. Kim, T. K., Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*, 397(8), 3173–3178. doi: 10.1007/s00216-010-3821-6.

117. Kirnbauer, R., Hubbert, N. L., Wheeler, C. M., Becker, T. M., Lowy, D. R., Schiller, J. T. (1994). A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst*, 86(7), 494–499. doi: 10.1093/jnci/86.7.494.
118. Konovalovas, A., Serviene E., Serva, S. (2016). Genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae* double-stranded RNA virus L-A-28. *Genome Announc*, 4(3), e00549-16. doi: 10.1128/genomeA.00549-16.
119. Kozak, M., Hu, J. (2023). The integrated consideration of vaccine platforms, adjuvants, and delivery routes for successful vaccine development. *Vaccines (Basel)*, 11(3), 695. doi: 10.3390/vaccines11030695.
120. Krenger, P. S., Josi, R., Sobczak, J., Velazquez, T. L. C., Balke, I., Skinner, M. A., Kramer, M. F., Scott, C. J. W., Hewings, S., Heath, M. D., Zeltins, A., Bachmann, M. F. (2024). Influence of antigen density and TLR ligands on preclinical efficacy of a VLP-based vaccine against peanut allergy. *Allergy*, 79(1), 184–199. doi: 10.1111/all.15897.
121. Kyriakidis, N. C., López-Cortés, A., González, E. V., Grimaldos, A. B., Prado, E. O. (2021). SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *NPJ Vaccines*, 6(1), 28. doi: 10.1038/s41541-021-00292-w.
122. Lavelle, L., Michel, J. P., Gingery, M. (2007). The disassembly, reassembly and stability of CCMV protein capsids. *J. Virol. Methods*, 146(1–2), 311–316. doi: 10.1016/j.jviromet.2007.07.
123. Lawrence, J. E., and G. F. Steward. (2010). Purification of viruses by centrifugation. In *Manual of Aquatic Viral Ecology*, ASLO, 166–181. doi: 10.17504/protocols.io.d2v8e5.
124. Le Bouvier, G. L., Schwerdt, C. E., Schaffer, F. L. (1957). Specific precipitates in agar with purified poliovirus. *Virology*, 4(3), 590–593. doi:10.1016/0042-6822(57)90088-0.
125. Le, D. T., Müller, K. M. (2021). *In vitro* assembly of virus-like particles and their applications. *Life (Basel)*, 11(4), 334. doi: 10.3390/life11040334.
126. Leitner, W. W., Ying, H., Restifo, N. P. (1999). DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 18(9–10), 765–777. doi: 10.1016/s0264-410x(99)00271-6.
127. Leyland-Jones, B. (2001). Dose Scheduling–Herceptin®. *Oncology*, 61(Suppl. 2), 31–36, doi: 10.1159/000055399.
128. Li, M., Du, C., Guo, N., Teng, Y., Meng, X., Sun, H., Li, S., Yu, P., Galons, H. (2019). Composition design and medical application of liposomes. *Eur J Med Chem*, 164, 640–653. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.007.
129. Li, T. C., Takeda, N., Kato, K., Nilsson, J., Xing, L., Haag, L., Cheng, R. H., Miyamura, T. (2003). Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant

- baculoviruses. *Virology*, 311(1), 115–124. doi: 10.1016/s0042-6822(03)00141-7.
130. Liu, F., Wu, X., Li, L., Liu, Z., Wang, Z. (2013). Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: successes and challenges. *Protein Expr Purif*, 90(2), 104–116. doi: 10.1016/j.pep.2013.05.009.
 131. Liu, P., Chen, G., Zhang, J. (2022). A Review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives. *Molecules*, 27(4), 1372. doi: 10.3390/molecules27041372.
 132. Lockney, D. M., Guenther, R. N., Loo, L., Overton, W., Antonelli, R., Clark, J., Hu, M., Luft, C., Lommel, S. A., Franzen, S. (2011). The Red clover necrotic mosaic virus capsid as a multifunctional cell targeting plant viral nanoparticle. *Bioconjug Chem*, 22(1), 67–73. doi: 10.1021/bc100361z.
 133. Loo, L., Guenther, R. H., Lommel, S. A., Franzen, S. (2008). Infusion of dye molecules into Red clover necrotic mosaic virus. *Chem Commun (Camb)*, 1, 88–90. doi: 10.1039/b714748a.
 134. Lua, L. H., Connors, N. K., Sainsbury, F., Chuan, Y. P., Wibowo, N., Middelberg, A. P. (2014). Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol Bioeng*, 111(3), 425–440. doi: 10.1002/bit.25159.
 135. Lukša, J., Celitan, E., Servienė, E., Serva, S. (2022). Association of ScV-LA virus with host protein metabolism determined by proteomics analysis and cognate RNA sequencing. *Viruses*, 14(11), 2345. doi: 10.3390/v14112345.
 136. Lukša, J., Ravoitytė, B., Konovalovas, A., Aitmanaitė, L., Butenko, A., Yurchenko, V., Serva, S., Servienė, E. (2017). Different metabolic pathways are involved in response of *Saccharomyces cerevisiae* to L-A and M viruses. *Toxins*, 9(8), 233. doi:10.3390/toxins9080233.
 137. Luque, D., Mata, C. P., Suzuki, N., Ghabrial, S. A., Castón, J. R. (2018). Capsid structure of dsRNA fungal viruses. *Viruses*, 10(9), 481. doi: 10.3390/v10090481.
 138. Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D. M., Finke, S., Hallek, M., Büning, H. (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. *J Virol*, 79(18), 11776–11787. doi: 10.1128/JVI.79.18.11776-11787.2005.
 139. Mach, H., Volkin, D. B., Troutman, R. D., Wang, B., Luo, Z., Jansen, K. U., Shi, L. (2006). Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs). *J Pharm Sci*, 95(10), 2195–2206. doi: 10.1002/jps.20696.
 140. Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev*, 10(3), 369–400. doi: 10.1128/CMR.10.3.369.

141. Marsian, J., Lomonossoff, G. P. (2016). Molecular pharming - VLPs made in plants. *Curr Opin Biotechnol*, 37, 201–206. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.007.
142. Martens, T. F., Remaut, K., Demeester, J., De Smedt, S. C., Braeckmans, K. (2014). Intracellular delivery of nanomaterials: how to catch endosomal escape in the act. *Nano Today*, 9(3), 344–364. doi: 10.1016/j.nantod.2014.04.011.
143. Masarudin, M. J., Cutts, S. M., Evison, B. J., Phillips, D. R., Pigram, P. J. (2015). Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [(14)C]-doxorubicin. *Nanotechnol Sci Appl*, 8, 67–80. doi:10.2147/NSA.S112716.
144. Mason, H. S., Lam, D. M., Arntzen, C. J. (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(24), 11745–11749. doi: 10.1073/pnas.89.24.11745.
145. McCabe, P. M., Pfeiffer, P., Van Alfen, N. K. (1999). The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol*, 7(9), 377–381. doi: 10.1016/S0966-842X(99)01568-1.
146. McCarthy, M. P., White, W. I., Palmer-Hill, F., Koenig, S., Suzich, J. A. (1998). Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 virus-like particles *in vitro*. *J Virol*, 72(1), 32–41. doi: 10.1128/JVI.72.1.32-41.1998.
147. McNeale, D., Dashti, N., Cheah, L. C., Sainsbury, F. (2023). Protein cargo encapsulation by virus-like particles: strategies and applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 15(3), e1869. doi:10.1002/wnan.1869.
148. Mejía-Méndez, J. L., Vazquez-Duhalt, R., Hernández, L. R., Sánchez-Arreola, E., Bach, H. (2022). Virus-like particles: fundamentals and biomedical applications. *Int J Mol Sci*, 23(15), 8579. doi: 10.3390/ijms23158579.
149. Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*, 20(2), 101–124. doi: 10.1038/s41573-020-0090-8.
150. Mohd Azhar, S. H., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Mohd Faik, A. A., Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochem Biophys Rep*, 10, 52–61. doi: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.
151. Morenweiser, R. (2005). Downstream processing of viral vectors and vaccines. *Gene Ther*, 12(Suppl.1), S103–S110. doi: 10.1038/sj.gt.3302624.
152. Motsa, B. B., Stahelin, R. V. (2021). Lipid-protein interactions in virus assembly and budding from the host cell plasma membrane. *Biochem Soc Trans*, 49(4), 1633–1641. doi: 10.1042/BST20200854.

153. Nainys, J., Lasickiene, R., Petraityte-Burneikiene, R., Dabrisius, J., Lelesius, R., Sereika, V., Zvirbliene, A., Sasnauskas, K., Gedvilaite, A. (2014). Generation in yeast of recombinant virus-like particles of porcine circovirus type 2 capsid protein and their use for a serologic assay and development of monoclonal antibodies. *BMC Biotechnol*, 14, 100. doi: 10.1186/s12896-014-0100-1.
154. Naitow, H., Tang, J., Canady, M., Wickner, R. B., Johnson, J. E. (2002). L-A virus at 3.4 Å resolution reveals particle architecture and mRNA decapping mechanism. *Nat Struct Biol*, (10), 725–728. doi: 10.1038/nsb844.
155. Naskalska, A., Pyrc, K. (2015). Virus like particles as immunogens and universal nanocarriers. *Polish J Microbiol*, 64(1), 3–13. doi: 10.33073/pjm-2015-001.
156. Nicolas, J., Mura, S., Brambilla, D., Mackiewicz, N., Couvreur, P. (2013). Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery. *Chem Soc Rev*, 42(3), 1147–235. doi: 10.1039/c2cs35265f.
157. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J Nanobiotechnology*, 19(1), 59. doi: 10.1186/s12951-021-00806-7.
158. Nuñez-Rivera, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez-Hernandez, A. G., Vazquez-Duhalt, R., Cadena-Nava, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein J Nanotechnol*, 11, 372–382. doi: 10.3762/bjnano.11.28.
159. O'Neil, A., Prevelige, P. E., Basu, G., Douglas, T. (2012). Coconfinement of fluorescent proteins: spatially enforced communication of GFP and mCherry encapsulated within the P22 capsid. *Biomacromolecules*, 13(12), 3902–3907. doi: 10.1021/bm301347x.
160. Okamoto, K., Ferreira, R. J., Larsson, D. S. D., Maja, F. R. N. C., Isawa, H., Sawabe, K., Murata, K., Hajdu, J., Iwasaki, K., Kasson, P. M., Miyazaki, N. (2020). Acquired functional capsid structures in metazoan totivirus-like dsRNA virus. *Structure*, 28(8), 888–896.e3. doi: 10.1016/j.str.2020.04.016.
161. Oropesa, R., Ramos, J. R., Falcón, V., Felipe, A. (2013). Characterization of virus-like particles by atomic force microscopy in ambient conditions. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*, 4(2), 025007. doi:10.1088/2043-6262/4/2/025007.
162. Ota, C., Tanaka, S. I., Takano, K. (2021). Revisiting the rate-limiting step of the ANS-protein binding at the protein surface and inside the hydrophobic cavity. *Molecules*, 26(2), 420. doi: 10.3390/molecules26020420.

163. Palladini, A., Thrane, S., Janitzek, C. M., Pihl, J., Clemmensen, S. B., de Jongh, W. A., Clausen, T. M., Nicoletti, G., Landuzzi, L., Penichet, M. L., Balboni, T., Ianzano, M. L., Giusti, V., Theander, T. G., Nielsen, M. A., Salanti, A., Lollini, P. L., Nanni, P., Sander, A. F. (2018). Virus-like particle display of HER2 induces potent anti-cancer responses. *Oncoimmunology*, 7(3), e1408749. doi: 10.1080/2162402X.2017.1408749.
164. Palmberger, D., Wilson, I. B., Berger, I., Grabherr, R., Rendic, D. (2012). SweetBac: a new approach for the production of mammalianised glycoproteins in insect cells. *PLoS One*, 7(4), e34226. doi: 10.1371/journal.pone.0034226.
165. Pan, J., Dong, L., Lin, L., Ochoa, W. F., Sinkovits, R. S., Havens, W. M., Nibert, M. L., Baker, T. S., Ghabrial, S. A., Tao, Y. J. (2009). Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(11), 4225–4230. doi: 10.1073/pnas.0812071106
166. Pan, Y., Zhang, Y., Jia, T., Zhang, K., Li, J., Wang, L. (2012). Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles. *FEBS J*, 279(7), 1198–208. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08512.x.
167. Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol*, 6(1), 1–31. doi: 10.3934/microbiol.2020001.
168. Park, C. M., Lopinski, J. D., Masuda, J., Tzeng, T. H., Bruenn, J. A. (1996). A second double-stranded RNA virus from yeast. *Virology*, 216(2), 451–454. doi: 10.1006/viro.1996.0083.
169. Patel, M. C., Patkar, K. K., Basu, A., Mohandas, K. M., Mukhopadhyaya, R. (2009). Production of immunogenic human papillomavirus-16 major capsid protein derived virus like particles. *Indian J Med Res*, 130(3), 213–218.
170. Pease, L. F. 3rd, Lipin, D. I., Tsai, D. H., Zachariah, M. R., Lua, L. H., Tarlov, M. J., Middelberg, A. P. (2009). Quantitative characterization of virus-like particles by asymmetrical flow field flow fractionation, electrospray differential mobility analysis, and transmission electron microscopy. *Biotechnol Bioeng*, 102(3), 845–855. doi: 10.1002/bit.22085.
171. Peruri, V., Bhattacharya, S., Rathore, A. S. (2024). Reversed phase high performance liquid chromatography for monitoring type-16 human papilloma virus like particles. *J. Chromatogr. A*, 5(5), 100107. doi: 10.1016/j.jcoa.2023.100107.
172. Phelps, J. P., Dao, P., Jin, H., Rasochova, L. (2007). Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*. *J Biotechnol*, 128(2), 290–296. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.10.005.

173. Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., Mattanovich, D. (2005). Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol*, 31(3), 245–259. doi: 10.1385/MB:31:3:245.
174. Qian, C., Liu, X., Xu, Q., Wang, Z., Chen, J., Li, T., Zheng, Q., Yu, H., Gu, Y., Li, S., Xia, N. (2020). Recent progress on the versatility of virus-like particles. *Vaccines (Basel)*, 8(1), 139. doi: 10.3390/vaccines 8010139.
175. Qin, F., Xia, F., Chen, H., Cui, B., Feng, Y., Zhang, P., Chen, J., Luo, M. (2021). A guide to nucleic acid vaccines in the prevention and treatment of infectious diseases and cancers: From basic principles to current applications. *Front Cell Dev Biol*, 9, 633776. doi: 10.3389/fcell.2021. 633776.
176. Ramírez, M., Velázquez, R., López-Piñero, A., Martínez, A. (2021). Genome features of a new double-stranded RNA helper virus (LBCbarr) from wine *Torulaspora delbrueckii* killer strains. *Int J Mol Sci*, 22, 13492. doi: 10.3390/ijms222413492.
177. Reddington, S. C., Howarth, M. (2015). Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Curr Opin Chem Biol*, 29, 94–99. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.10.002.
178. Rodríguez-Cousiño, N., Esteban, R. (2017). Relationships and evolution of double-stranded RNA totiviruses of yeasts enferred from analysis of L-A-2 and L-BC variants in wine yeast strain populations. *Appl Environ Microbiol*, 83, e02991-16. doi: 10.1128/AEM.02991-16.
179. Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., Esteban, R. (2013). L-A-lus, a new variant of the L-A totivirus found in wine yeasts with Klus killer toxin-encoding Mlus double-stranded RNA: possible role of killer toxin-encoding satellite RNAs in the evolution of their helper viruses. *Appl Environ Microbiol*. 79(15), 4661–4674. doi: 10.1128/AEM.00500-13.
180. Rodríguez-Cousiño, N., Gómez, P., Esteban, R. (2017). Variation and distribution of L-A helper totiviruses in *Saccharomyces sensu stricto* yeasts producing different killer toxins. *Toxins (Basel)*, 9(10), 313. doi: 10.3390/toxins9100313.
181. Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Appl Environ Microbiol*, 77(5), 1822–1832. doi: 10.1128/AEM.02501-10.
182. Rodríguez-Limas, W. A., Sekar, K., Tyo, K. E. (2013). Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol*, 24(6), 1089–93. doi: 10.1016/j.copbio.2013.02.008.
183. Rogel, A., Benvenisti, L., Sela, I., Edelbaum, O., Tanne, E., Shachar, Y., Zanberg, Y., Gontmakher, T., Khayat, E., Stram, Y. (2003). Vaccination with *E. coli* recombinant empty viral particles of infectious bursal disease

- virus (IBDV) confer protection. *Virus Genes*, 27(2), 169–175. doi: 10.1023/a:1025780611356.
184. Rohovie, M. J., Nagasawa, M., Swartz, J. R. (2017). Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioeng Transl Med*, 2(1), 43–57. doi: 10.1002/btm2.10049.
 185. Rolih, V., Caldeira, J., Bolli, E., Salameh, A., Conti, L., Barutello, G., Riccardo, F., Magri, J., Lamolinara, A., Parra, K., Valenzuela, P., Francia, G., Iezzi, M., Pericle, F., Cavallo, F. (2020). Development of a VLP-based vaccine displaying an xCT extracellular domain for the treatment of metastatic breast cancer. *Cancers (Basel)*, 12(6), 1492. doi: 10.3390/cancers12061492.
 186. Rosano, G. L., Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
 187. Rybicki, E. P. (2010). Plant-made vaccines for humans and animals. *Plant Biotechnol J*, 8(5), 620–637. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00507.x.
 188. Sakuragi, S., Goto, T., Sano, K., Morikawa, Y. (2002). HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12), 7956–7961.
 189. Santi, L., Huang, Z., Mason, H. (2006). Virus-like particles production in green plants. *Methods*, 40(1), 66–76. doi: 10.1016/j.ymeth.2006.05.020.
 190. Santos, G. M. C. D., Alves, C. R., Pinto, M. A., Amado Leon, L. A., Souza-Silva, F. (2021). Detection of antibodies against hepatitis A virus (HAV) by a surface plasmon resonance (SPR) biosensor: A new diagnosis tool based on the major HAV capsid protein VP1 (SPR-HAVP1). *Sensors (Basel)*, 21(9), 3167. doi: 10.3390/s21093167.
 191. Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S. E., Hajibagheri, M. A., Finch, J., Crawford, L., Tommasino, M. (1995). Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology*, 206(1), 126–35. doi: 10.1016/s0042-6822(95)80027-1.
 192. Sasnauskas, K., Buzaitė, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Krüger, D. H., Ulrich, R. (1999). Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem*, 380, 381–386. doi: 10.1515/BC.1999.050.
 193. Schmitt, M. J., Becker, B. (2021). Viral killer toxins. *Encyclopedia of Virology*, 534–543. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.21280-6.
 194. Schmitt, M. J., Breinig, F. (2002). The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev*, 26(3), 257–276. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x.
 195. Schmitt, M. J., Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and selfprotection. *Nat Rev Microbiol*, 4(3), 212–221. doi: 10.1038/nrmicro 1347.

196. Schmitt, M. J., Schernikau, G. (1997). Construction of a cDNA-based K1/K2/K28 triple killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technol Biotechnol*, 35, 281–285.
197. Schmitt, M. J., Tipper, D. J. (1992). Genetic analysis of maintenance and expression of L and M double-stranded RNAs from yeast killer virus K28. *Yeast*, 8(5), 373–384. doi: 10.1002/yea.320080505
198. Schmitz, N., Dietmeier, K., Bauer, M., Maudrich, M., Utzinger, S., Muntwiler, S., Saudan, P., Bachmann, M. F. (2009). Displaying Fel d1 on virus-like particles prevents reactogenicity despite greatly enhanced immunogenicity: a novel therapy for cat allergy. *J Exp Med*, 206(9), 1941–1955. doi: 10.1084/jem.20090199.
199. Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 671–675. doi: 10.1038/nmeth.2089.
200. Scotti, N., Rybicki, E. P. (2013). Virus-like particles produced in plants as potential vaccines. *Expert Rev Vaccines*, 12(2), 211–224. doi: 10.1586/erv.12.
201. Segovia-González, X. F., Villagrana-Escareño, M. V., Ríos-Ramírez, M., de la Cruz, V. S., Mejía-Hernández, J. N., Cuellar-Camacho, J. L., Patrón-Soberano, A., Sportsman, R., Ruiz-García, J. (2023). An observation of a very high swelling of bromovirus members at specific ionic strengths and pH. *Viruses*, 15(10), 2046. doi: 10.3390/v15102046.
202. Serrano, Y., Brito, S. M., Pimienta, E., Falero, A., Marrero, K. (2021). Soluble production of a full-length human papillomavirus type 16 L1 protein by *Escherichia coli*. *Rev Bionatura*, 6(2), 1684–1691. doi: 10.21931/RB/2021.06.02.4.
203. Shan, W., Zhang, D., Wu, Y., Lv, X., Hu, B., Zhou, X., Ye, S., Bi, S., Ren, L., Zhang, X. (2018). Modularized peptides modified HBc virus-like particles for encapsulation and tumor-targeted delivery of doxorubicin. *Nanomedicine*, 14(3), 725–734. doi: 10.1016/j.nano.2017.12.002.
204. Sherman, M. B., Guenther, R. H., Tama, F., Sit, T. L., Brooks, C. L., Mikhailov, A. M., Orlova, E. V., Baker, T. S., Lommel, S. A. (2006). Removal of divalent cations induces structural transitions in red clover necrotic mosaic virus, revealing a potential mechanism for RNA release. *J Virol*, 80(21), 10395–10406. doi: 10.1128/JVI.01137-06.
205. Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Commun Biol*, 3(1), 214. doi: 10.1038/s42003-020-0939-8.
206. Shirbaghaee, Z., Bolhassani, A. (2016). Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers*, 105(3), 113–132. doi: 10.1002/bip.22759.
207. Shukla, S., Steinmetz, N. F. (2015). Virus-based nanomaterials as positron emission tomography and magnetic resonance contrast agents:

- from technology development to translational medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 7(5), 708–721. doi: 10.1002/wnan.1335.
208. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235(4785), 177–182. doi: 10.1126/science.3798106.
 209. Sobczak, J. M., Krenger, P. S., Storni, F., Mohsen, M. O., Balke, I., Reseviča, G., Heath, M. D., Carreno Velazquez, T. L., Kramer, M. F., Scott, C. J. W., Skinner, M. A., Zeltiņš, A., Kündig, T. M., Vogel, M., & Bachmann, M. F. (2023). The next generation virus-like particle platform for the treatment of peanut allergy. *Allergy*, 78(7), 1980–1996. doi:10.1111/all.15704.
 210. Sommer, S. S., Wickner, R. B. (1982). Yeast L dsRNA consists of at least three distinct RNAs; evidence that the non-Mendelian genes [HOK], [NEX] and [EXL] are on one of these dsRNAs. *Cell*, 31(2 Pt 1), 429–441. doi: 10.1016/0092-8674(82)90136-2.
 211. Špakova, A., Šimoliūnas, E., Batiuškaitė, R., Pajeda, S., Meškys, R., Petraitytė-Burneikienė, R. (2019). Self-Assembly of tail tube protein of bacteriophage vB_EcoS_NBD2 into extremely long polytubes in *E. coli* and *S. cerevisiae*. *Viruses*, 11(3), 208. doi: 10.3390/v11030208.
 212. Spice, A. J., Aw, R., Bracewell, D. G., Polizzi, K. M. (2020). Synthesis and assembly of hepatitis B virus-like particles in a *Pichia pastoris* cell-free system. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 72. doi: 10.3389/fbioe.2020.00072.
 213. Srivastava, V., Nand, K. N., Ahmad, A., Kumar, R. (2023). Yeast-based virus-like particles as an emerging platform for vaccine development and delivery. *Vaccines (Basel)*, 11(2), 479. doi: 10.3390/vaccines11020479.
 214. Stewart, G. G. (2014). SACCHAROMYCES|*Saccharomyces cerevisiae*. In book *Encyclopedia of Food Microbiology*, Academic Press, 2, 309–315. doi: 10.1016/b978-0-12-384730-0.00292-5.
 215. Sullivan, E., Sung, P. Y., Wu, W., Berry, N., Kempster, S., Ferguson, D., Almond, N., Jones, I. M., Roy, P. (2022). SARS-CoV-2 Virus-like particles produced by a single recombinant baculovirus generate anti-S antibody and protect against variant challenge. *Viruses*, 14(5), 914. doi: 10.3390/v14050914.
 216. Taghizadeh, M. S., Niazi, A., Afsharifar, A. (2024). Virus-like particles (VLPs): A promising platform for combating against Newcastle disease virus. *Vaccine X*, 16, 100440. doi: 10.1016/j.jvax.2024.100440.
 217. Tariq, H., Batool, S., Asif, S., Ali, M., Abbasi, B. H. (2022). Virus-like particles: revolutionary platforms for developing vaccines against emerging infectious diseases. *Front Microbiol.* 12, 790121. doi: 10.3389/fmicb.2021.790121.

218. Taylor, D. J., Ballinger, M. J., Bowman, S. M., Bruenn, J. A. (2013). Virus-host co-evolution under a modified nuclear genetic code. *PeerJ*, 1, e50. doi: 10.7717/peerj.50.
219. Tercero, J. C., Dinman, J. D., Wickner, R. B. (1993). Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus. *J Bacteriol*, 175(10), 3192–3194. doi: 10.1128/jb.175.10.3192-3194.1993.
220. Tercero, J. C., Riles, L. E., Wickner, R. B. (1992). Localized mutagenesis and evidence for post-transcriptional regulation of MAK3. A putative N-acetyltransferase required for double-stranded RNA virus propagation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 267(28), 20270–20276.
221. Tercero, J. C., Wickner, R. B. (1992). MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of the L-A gag NH2 terminus is necessary for virus particle assembly. *J Biol Chem*, 267(28), 20277–20281. doi: 10.1128/jb.175.10.3192-3194.1993.
222. Thérien, A., Bédard, M., Carignan, D., Rioux, G., Gauthier-Landry, L., Laliberté-Gagné, M. È., Bolduc, M., Savard, P., Leclerc, D. (2017). A versatile papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform based on sortase-mediated antigen coupling. *J Nanobiotechnology*, 15(1), 54. doi: 10.1186/s12951-017-0289-y.
223. Thuenemann, E. C., Le, D. H. T., Lomonossoff, G. P., Steinmetz, N. F. (2021). Bluetongue virus particles as nanoreactors for enzyme delivery and cancer therapy. *Mol Pharm*, 18(3), 1150–1156. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c01053.
224. Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., Lesterhuis, W. J. (2022). Cancer chemotherapy: Insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front. Oncol*, 12, 960317. doi: 10.3389/fonc.2022.960317.
225. Tutunji, L. F. (2023). Liposomes as drug delivery systems. *Biomed J Sci & Tech Res*, 52(2), 43460–43468. doi: 10.26717/BJSTR.2023.52.008213.
226. Vendrell-Mir, P., Perroud, P. F., Haas, F. B., Meyberg, R., Charlot, F., Rensing, S. A., Nogué, F., Casacuberta, J. M. (2021). A vertically transmitted amalgavirus is present in certain accessions of the bryophyte *Physcomitrium patens*. *Plant J*, 108(6):1786–1797. doi: 10.1111/tpj.15545.
227. Vicente, T., Roldão, A., Peixoto, C., Carrondo, M. J., Alves, P. M. (2011). Large-scale production and purification of VLP-based vaccines. *J Invertebr Pathol*, 107(Suppl), S42–S48. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.004.
228. Vieira, H. L., Estêvão, C., Roldão, A., Peixoto, C. C., Sousa, M. F., Cruz, P. E., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M. (2005). Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J Biotechnol*, 120(1), 72–82. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.03.026.

229. Vijayraghavan, S., Kozmin, S. G., Strobe, P. K., Skelly, D. A., Magwene, P. M., Dietrich, F. S., McCusker, J. H. (2023). RNA viruses, M satellites, chromosomal killer genes, and killer/nonkiller phenotypes in the 100-genomes *S. cerevisiae* strains. *G3 (Bethesda)*, 13(10), jkad167. doi: 10.1093/g3journal/jkad167.
230. Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., Park, H. (2019). Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Front Chem*, 7, 167. doi: 10.3389/fchem.2019.00167.
231. Wang, G., Jia, T., Xu, X., Chang, L., Zhang, R., Fu, Y., Li, Y., Yang, X., Zhang, K., Lin, G., Han, Y., Li, J. (2016). Novel miR-122 delivery system based on MS2 virus like particle surface displaying cell-penetrating peptide TAT for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(37), 59402–59416. doi: 10.18632/oncotarget.10681.
232. Wang, J., Potocny, A. M., Rosenthal, J., Day, E. S. (2019). Gold nanoshell-linear tetrapyrrole conjugates for near infrared-activated dual photodynamic and photothermal therapies. *ACS Omega*, 5(1), 926–940. doi: 10.1021/acsomega.9b04150.
233. Weerachatanukul, W., Kiatmetha, P., Raksat, P., Boonkua, S., Thongsum, O., Jariyapong, P., Chotwiwatthanakun, C., Ounjai, P., Metlagel, Z. (2022). Viral capsid change upon encapsulation of double-stranded DNA into an infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus-like particle. *Viruses*, 15(1), 110. doi: 10.3390/v15010110.
234. Wesolowski, M., Wickner, R. B. (1984). Two new double-stranded RNA molecules showing non-mendelian inheritance and heat inducibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 4(1), 181–187. doi: 10.1128/mcb.4.1.181-187.1984.
235. Wickner, R. B. (1986). Double-stranded RNA replication in yeast: The killer system. *Annu Rev Biochem*, 55(1), 373–395. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.
236. Wickner, R. B. (1992). Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Microbiol*, 46(1), 347–375. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.002023.
237. Wickner, R. B. (1996a). Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, 60(1), 250–265. doi: 10.1128/mr.60.1.250-265.1996.
238. Wickner, R. B. (1996b). Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 30(1), 109–139. doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.109.
239. Wickner, R. B., Fujimura, T., Esteban, R. (2013). Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Virus Res*, 86, 1–36. doi: 10.1016/B978-0-12-394315-6.00001-5.
240. Wickner, R. B., Ghabrial, S. A., Nibert, M. L., Patterson, J. L., Wang, C. C. (2012). Family *Totiviridae*. Part II: the viruses. In *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, 639–650. doi: 10.1016/B978-0-12-384684-6.00052-5.

241. Wijesundara, Y. H., Herbert, F. C., Kumari, S., Howlett, T., Koirala, S., Trashi, O., Trashi, I., Al-Kharji, N. M., Gassensmith, J. J. (2022). Rip it, stitch it, click it: A Chemist's guide to VLP manipulation. *Virology*, 577, 105–123. doi: 10.1016/j.virol.2022.10.008.
242. Wu, Z., Chen, K., Yildiz, I., Dirksen, A., Fischer, R., Dawson, P. E., Steinmetz, N. F. (2012). Development of viral nanoparticles for efficient intracellular delivery. *Nanoscale*, 4(11), 3567–3576. doi: 10.1039/c2nr30366c.
243. Xu, R., Shi, M., Li, J., Song, P., Li, N. (2020). Construction of SARS-CoV-2 virus-like particles by mammalian expression system. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 862. doi: 10.3389/fbioe.2020.00862.
244. Yan, D., Wei, Y. Q., Guo, H. C., Sun, S. Q. (2015). The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(24), 10415–10432. doi: 10.1007/s00253-015-7000-8.
245. Yang, L., Song, Y., Li, X., Huang, X., Liu, J., Ding, H., Zhu, P., Zhou, P. (2012). HIV-1 virus-like particles produced by stably transfected *Drosophila* S2 cells: a desirable vaccine component. *J Virol*, 86(14), 7662–7676. doi: 10.1128/JVI.07164-11.
246. Yildiz, I., Lee, K. L., Chen, K., Shukla, S., Steinmetz, N. F. (2013). Infusion of imaging and therapeutic molecules into the plant virus-based carrier cowpea mosaic virus: cargo-loading and delivery. *J Control Release*, 172(2), 568–578. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.023.
247. Yusuf, A., Almotairy, A. R. Z., Henidi, H., Alshehri, O. Y., Aldughaim, M. S. (2023). Nanoparticles as drug delivery systems: A review of the implication of nanoparticles' physicochemical properties on responses in biological systems. *Polymers (Basel)*, 15(7), 1596. doi: 10.3390/polym15071596.
248. Zeltins A. (2013). Construction and characterization of virus-like particles: a review. *Mol Biotechnol*, 53(1), 92–107. doi: 10.1007/s12033-012-9598-4.
249. Zeng, J., Shirihai, O. S., Grinstaff, M. W. (2020). Modulating lysosomal pH: a molecular and nanoscale materials design perspective. *J Life Sci (Westlake Village)*, 2(4), 25–37. doi: 10.36069/jols/20201204.
250. Zhang, L., Xu, W., Ma, X., Sun, X., Fan, J., Wang, Y. (2023). Virus-like particles as antiviral vaccine: mechanism, design, and application. *Biotechnol Bioproc Eng*, 28, 1–16. doi:10.1007/s12257-022-0107-8.
251. Zhang, S., Yong, L. K., Li, D., Cubas, R., Chen, C., Yao, Q. (2013). Mesothelin virus-like particle immunization controls pancreatic cancer growth through CD8⁺ T cell induction and reduction in the frequency of CD4⁺ foxp3⁺ ICOS⁺ regulatory T cells. *PLoS One*, 8(7), e68303. doi: 10.1371/journal.pone.0068303.
252. Zhao, Q., Chen, W., Chen, Y., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, Z. (2011). Self-assembled virus-like particles from rotavirus structural protein VP6 for targeted drug delivery. *Bioconjug Chem*, 22(3), 346–352. doi: 10.1021/bc1002532.

253. Zhao, Q., Potter, C. S., Carragher, B., Lander, G., Sworen, J., Towne, V., Abraham, D., Duncan, P., Washabaugh, M. W., Sitrin, R. D. (2014). Characterization of virus-like particles in GARDASIL® by cryo transmission electron microscopy. *Hum Vaccin Immunother*, 10(3), 734–739. doi: 10.4161/hv.27316.
254. Zhao, Z., Simms, A., Steinmetz, N. F. (2022). Cisplatin-loaded tobacco mosaic virus for ovarian cancer treatment. *Biomacromolecules*, 23(10), 4379–4387. doi: 10.1021/acs.biomac.2c00831.
255. Zitzmann, J., Weidner, T., Czermak, P. (2017). Optimized expression of the antimicrobial protein Gloverin from *Galleria mellonella* using stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Cytotechnology*, 69(2), 371–389. doi: 10.1007/s10616-017-0068-5.

SUMMARY

LIST OF ABBREVIATIONS

ANS: 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid
B-VLPs: virus-like particles purified from bacteria
CPMV: cowpea mosaic virus
DLS: dynamic light scattering
DOX: doxorubicin
FTSA: fluorescent thermal shift assay
HPV: human papillomavirus
IPTG: isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside
PEG: polyethylene glycol
PMSF: phenylmethanesulfonylfluoride
SDS-PAGE: sodium dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
TEM: transmission electron microscopy
TPP: triphenyl phosphonium cation
VLP: virus-like particle
Y-VLPs: virus-like particles purified from yeast

INTRODUCTION

Classical therapies are often not only temporary but also, they cause severe side effects. Targeted delivery is one of the most promising, and at the same time the most challenging, techniques that can improve the treatment of many diseases. Using this approach, higher concentrations of therapeutic drug reach the specific site, lowering the chance of adverse effects while increasing the effectiveness of the treatment. A variety of nanoparticles are used for the delivery of therapeutic drugs, including liposomal, polymeric or metal nanoparticles. Due to the disadvantages of these particles, like instability, immunogenicity or toxicity (Rohovie *et al.*, 2017), focus on protein-based nanoparticles, such as virus-like particles (VLPs), has increased over the years. A search of the commonly used term “virus-like particles” in the Google Scholar search engine yielded 83 000 publications in 2024 alone, indicating the high importance of VLPs technology. Proteins from various viruses are studied to create particles with most desirable properties for application in nanoparticle-based delivery.

Unlike native viruses, VLPs possess no genetic material and therefore are considered non-infectious. Using passive diffusion, genetic engineering, chemical conjugations or controlled assembly of capsid proteins, molecules

of both biological and synthetic origin can be inserted into the interior or outer surface of VLPs (Chung *et al.*, 2020; McNeale *et al.*, 2023). Incorporation of appropriate ligands into the VLPs allows the particles to reach the targeted site and control release of the cargo (Ikwuagwu *et al.*, 2022). The structural diversity of VLPs, different options for functionalisation and the wide choice of synthesis systems make them appealing for application in different fields (Tariq *et al.*, 2022; Deshayes *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023).

VLP-based vaccines are developed using particles derived from the proteins of human pathogenic viruses, such as human papillomaviruses, influenza, hepatitis B and E, and coronaviruses, whose components elicit strong cellular and humoral responses (Tariq *et al.*, 2022). However, for VLP-based targeted delivery systems, immunogenicity is prohibited, since host cell defence mechanisms might induce particle degradation and early release of the cargo (Dai *et al.*, 2018; He *et al.*, 2022). It is important to ensure the stability of such particles, as aggregation of VLPs is a common problem affecting the immunogenicity and antigenicity of the particles (Chen *et al.*, 2015; Srivastava *et al.*, 2023; Masarudin *et al.*, 2015). For these reasons, particles of different origins are being investigated to develop an efficient nanoparticle-based delivery system.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the best-studied organisms that is generally recognised as safe (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA) in the USA and have qualified presumption of safety (QPS) status in Europe, therefore is widely used in the production of native and recombinant products (Gronchi *et al.*, 2022). Two types of totiviruses, L-A and L-BC, are found in most *S. cerevisiae* strains (Ribas and Wickner, 1996; Schmitt and Breinig, 2002). L-BC viruses have a double-stranded RNA (dsRNA) genome that encodes the major capsid protein Gag and the RNA-dependent RNA polymerase Pol (Park *et al.*, 1996). The dsRNA genome of L-BC viruses is packaged in a 38.5 nm icosahedral symmetry capsid consisting of 120 Gag monomers, several of which are fused to Pol protein (Grybchuk *et al.*, 2022). To date, only the structural properties of totiviruses and their function in yeast cells have been investigated. In this work, potential application of the L-BC-1 virus-derived nanoparticles for the development of VLP-based delivery system was evaluated.

The aim of this study:

To assess the stability and encapsulation capacity of nanoparticles formed from the major capsid protein Gag of the *Saccharomyces cerevisiae* L-BC-1 virus, with the aim of their application in the development of delivery systems.

The main tasks:

1. To synthesize *S. cerevisiae* virus L-BC-1 capsid protein Gag in *E. coli* and *S. cerevisiae* expression systems and evaluate its capability to form virus-like particles.
2. To investigate and compare the size stability of the particles formed from Gag protein synthesized in bacteria and yeast in different conditions.
3. To investigate and compare the thermal stability of the particles formed from Gag protein synthesized in bacteria and yeast.
4. To evaluate the encapsulation capabilities of Gag-formed particles by gene fusion and passive diffusion methods.
5. To determine the ability of Gag-formed particles to enter lung carcinoma epithelial tissue A549 line mammalian cells and their effect on cell viability.

SCIENTIFIC NOVELTY

Targeted delivery systems can help to prevent side effects that are associated with traditional methods, used for treatment of cancer and other diseases. To develop such systems, various types of nanoparticles are used, including virus-like particles of different origins.

In this work, L-BC-1 virus found in *S. cerevisiae* yeasts was chosen for the synthesis of virus-like particles. Recombinant L-BC-1 virus capsid protein Gag was synthesised in bacteria *Escherichia coli* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the first time. Gag protein successfully formed symmetrical spherical particles in the size of ~40 nm in both bacterial and yeast cells. Using dynamic light scattering, transmission electron microscopy and thermal shift assays, size and thermal stability of Gag-formed particles was evaluated. Long-term particle size stability studies have shown that the size of Gag-formed particles remain stable for up to 24 weeks in buffers with different pH, ionic strength, and other additives. It was demonstrated that long-term size stability of the particles purified from bacteria depends on the temperature used for storage – at higher temperatures aggregation of the particles was observed. It was found that Gag-formed particles dissociate when exposed to highly alkaline pH or urea. Thermal stability studies have shown that, as the temperature increases the loss of Gag-formed particle structure occurs in two stages. This study also revealed that Gag-formed particles lose their stability not only at highly alkaline but also at acidic pH environment.

In this work, successful encapsulation of two different compounds into Gag-formed particles was demonstrated. Gag-formed particles with antibacterial activity were obtained by passive diffusion of the antimicrobial peptide nisin Z into the particles. Using gene fusion method, an equimolar to Gag protein amount of red fluorescent mCherry protein was encapsulated into the particles without affecting the ability of the fusion protein to self-assemble into the particles. Such particles were used to demonstrate the entry of Gag-formed particles into mammalian cells without the use of transfection reagents. It was found that only the particles purified from bacteria exert cytotoxic effect on mammalian cells, whereas the particles purified from yeast have no such effect.

Since only the native L-BC-1 virus has been investigated so far, research on the Gag-formed particle size and thermal stability, as well as evaluation of their encapsulation and delivery features, provides new insights into the properties of L-BC-1 virus and its potential application in biotechnology.

STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. The L-BC-1 virus capsid protein Gag synthesized in bacteria and yeast forms virus like particles.
2. Gag-formed particles have long-term size stability, that depends on synthesis system and temperature used for the storage.
3. Gag-formed particles disassemble at highly alkaline pH or by being exposed to urea.
4. The loss of Gag-formed particle structure occurs in two phases as temperature increases.
5. Gene fusion and passive diffusion methods are suitable for encapsulation of Gag-formed particles.
6. Gag-formed particles enter A549 line mammalian cells without the need of additional affect and their impact on relative cell viability depends on particle synthesis system.

MATERIALS AND METHODS

Strains and cell lines

In this work, *E. coli* DH10B strain was used for the plasmid cloning (*F*– *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX*74 *recA1* *endA1* *araD*139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* λ – *rpsL*(*Str*^R) *nupG*) (Invitrogen) and BL21-AI strain was used for the protein synthesis (*F*- *ompT* *hsdSB* (*rB*-*mB*-)

gal dcm araB::T7RNAPtetA) (Invitrogen). For the cloning of L-BC-1 virus GAG gene, protein synthesis and yeast metabolism studies *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*, *ScV-LA-1*, *ScV-LBC-1*), BY4741[LA-LBC-] (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*, *ScV-LA-1-0*, Δ *ScV-LBC-1*) and M437[LA+M+] (*ScV-LA-lus*, *M-2*), M437[LA+M-] (*ScV-LA-lus*, *M-2-0*), M437[LA-M-] (*ScV-LA-lus-0*, *M-2-0*) strains were used (laboratory collection). The human lung carcinoma epithelial tissue cell line A549 was provided by Dr. J. Skerniškytė.

Construction of expression vectors

All enzymes, molecular mass standards, and kits for DNA manipulations were purchased from Thermo Fisher Scientific Baltics (Lithuania) and utilized following the manufacturer's recommendations. Oligonucleotides were obtained from Metabion (Germany).

For the extraction of the native L-BC-1 virus (further named as L-BC) genomic dsRNA (UniProt number U01060) from *S. cerevisiae* strain BY4741 previously published method was used (Lukša *et al.*, 2017). A cDNA of full-length L-BC virus GAG gene with Esp3I recognition sequence at the 5' terminus (2103 bp) was synthesized from DnaseI-treated dsRNA template by reverse transcription using RevertAid reverse transcriptase followed by PCR performed by Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. For these reactions, L-BC-dir-3 (5'-CCGTCTCACAT**GT**CTCTCTGTAAATTCATTAC-3') and L-BC-rev-2 (5'-**CT**ATTCTATATCCGGTGGGAAG-3') oligonucleotide primers were used. ATG and termination codons are indicated in bold.

For the synthesis of L-BC Gag protein in bacteria, obtained PCR product was digested with Esp3I restriction endonuclease and inserted by T4 DNA ligase into the NcoI- and Ecl136II-digested vector pET28a under the control of T7 promoter (Shilling *et al.*, 2020). For the synthesis of L-BC Gag protein in yeast, the same Esp3I-digested PCR product was blunted using Klenow fragment and inserted into BglII-digested and blunted pFX7 vector under the control of hybrid GAL10-PYK1 promoter (Sasnauskas *et al.*, 1999).

For the synthesis of L-BC Gag and mCherry fusion protein in bacteria, previously in our laboratory constructed pYAK3-L-BC-Gag+mCherry plasmid (Gerda Skinderytė, unpublished) was hydrolysed with EcoRI and XhoI restriction endonucleases. Using T4 DNA ligase mCherry protein coding gene was inserted into pET28a-L-BC-Gag vector that was hydrolysed with the same endonucleases. For the synthesis of L-BC Gag and mCherry fusion protein in yeast pYAK-L-BC-Gag+mCherry plasmid was digested with BcuI and BshTI restriction endonucleases. Fusion protein Gag+mCherry

coding gene was blunted and inserted into the BglII-digested and blunted pFX7 vector.

All resulting expression vectors (pET28a-L-BC-Gag and -Gag+mCherry; pFX7-L-BC-Gag and -Gag+mCherry) were cloned in *E. coli* DH10B strain and absence of mutations in *GAG* and *GAG+mCHERRY* genes was verified by DNA sequencing.

Synthesis and purification of recombinant Gag and Gag+mCherry proteins

For the synthesis of recombinant Gag and Gag+mCherry proteins in bacteria, *E. coli* BL21-AI strain and constructed pET28a-based plasmids were used. Selection of transformants was carried out on the Luria-Bertani (LB) (1% tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract) agar plates (2% agar) supplemented with 50 µg/ml kanamycin. Transformed colonies were cultivated in 600 ml LB medium supplemented with 50 µg/ml kanamycin at 37°C until the OD₆₀₀ reached 0.6-0.8. Synthesis of proteins was induced by adding 0.1% (w/v) L-arabinose and 0.1 mM isopropyl-β-d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) into the culture. Induction was carried out for 4 h at 21°C. Then bacterial cells were harvested by centrifugation at 5000×g for 10 min at 4°C and frozen at -20°C if purification was carried out later. The obtained biomass was resuspended in 10 volumes (w/v) of lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) with 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). For the lysis of the cells, suspension was sonicated on ice at 40% amplitude 5-7 times for 30 s, with 30 s breaks between the sonications using a Vibra-cell VCX-130 ultrasonic processor (Sonics and Materials, USA). After centrifugation at 15000×g for 15 min at 4°C obtained soluble protein fraction was diluted with the same lysis buffer to 15 ml.

For the synthesis of Gag and Gag+mCherry proteins in yeast, *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] strain and constructed pFX7 plasmids that has a gene responsible for the resistance to formaldehyde were used. Selection of yeast transformants was carried out on the YPD (2% peptone, 1% yeast extract, 2% glucose) agar plates (2% agar) supplemented with 0.024% formaldehyde. Transformed colonies were cultivated in 250 ml YPD medium supplemented with 0.012% formaldehyde for 18-24 h at 30°C. For the induction of protein synthesis YPD medium was changed into the same volume of YPG induction medium (2% peptone, 1% yeast extract, 2% galactose) supplemented with 0.012% formaldehyde. Induction was carried out for 16-18 h at 30°C. Then yeast cells were harvested by centrifugation at 1000×g for 10 min at 4°C and frozen at -20°C if purification was carried out later. The obtained biomass was

resuspended in 2 volumes of the same lysis buffer (w/v) with 1 mM PMSF. Cells were disrupted by vortexing with double amount of 212–300 μm diameter glass beads (Roth, Germany) (w/w), ten times for 30 s with 30 s rests of the sample on ice using Vortex-Genie 2 shaker (Scientific Industries, USA). Soluble protein fraction was obtained by centrifugation at $1000\times g$ for 10 min followed by centrifugation at $15000\times g$ for 15 min at 4°C .

For the studies of the relationship between yeast viruses and the host cell metabolism, the polyethylene glycol (PEG) precipitation method was used. 0.25 volume (v/v) of PEG precipitation reagent (25 % PEG4000, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 2.5 M NaCl, 10 mM EDTA) was added to the soluble protein fraction and incubated for 30 min on ice. The particles were concentrated by centrifugation at $15000\times g$ for 10 min at 4°C and resuspended in 0.6 volume (v/v) of PEG wash solution (5 % PEG4000, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 3 M NaCl, 10 mM EDTA). After washing, samples were centrifugated at $15000\times g$ for 5 min at 4°C , supernatant was removed and concentrated particles were resuspended in 220 μl of lysis buffer.

For the concentration of the synthesized Gag-formed particles from the soluble protein fraction, it was diluted to 15 ml with lysis buffer and transferred on 15 ml of 45% (w/v) sucrose solution in lysis buffer. The particles were concentrated by ultracentrifugation at $76000\times g$ for 16-18 hours at 4°C using MSE MS60 ultracentrifuge (Sanyo, Japan) with TST 28.38 rotor (Kontron, Germany). The resulting pellet was resuspended in 300 μl lysis buffer.

Resuspended particles were transferred on 2.4 ml of 1.36 g/cm^3 density CsCl solution in lysis buffer. Additional purification was carried out by ultracentrifugation at $75000\times g$ for 24 hours at 4°C using the same ultracentrifuge with TST 60.4 rotor (Kontron, Germany). After the ultracentrifugation, total of nine fractions were collected and analysed in SDS-PAGE. To change the solution containing the particles, 0.5 ml volume Zeba spin 7K MWCO columns (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) pre-equilibrated with desired buffer or other solution were used, following the manufacturer's recommendations.

SDS-PAGE analysis

The Mini PROTEAN® Tetra Cell vertical mini gel electrophoresis system (Biorad, USA) and EV265 electric current source (Consort, Belgium) were used to separate the protein samples in polyacrylamide gel, consisting of 5.6 % concentrating and 10.8 % fractionating gel layers, in $1\times$ Tris-Gly-SDS electrophoresis buffer (25 mM Tris, 0.192 M glycine, 0.1 % SDS, pH 8.3).

Samples were prepared in reducing sample buffer (313 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.05% bromophenol blue, 50% glycerol, 0.06% β ME) and heated for 10 min at 95°C. Staining with 0.125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Roth, Germany) in 50% isopropanol and 10% acetic acid solution was used for the visualization of proteins. Protein concentrations from gels were calculated using ImageJ v1.53t software (Schneider *et al.*, 2012).

Dynamic Light Scattering assay

The hydrodynamic diameter of the particles in the solutions was evaluated by dynamic light scattering (DLS) assay using Zetasizer μ V instrument (Malvern Panalytical, UK) with 4 mW HeNe laser (633 nm). The intensity of the scattered light was measured at 22°C temperature with an angle of 90° using 2 μ l volume quartz batch cuvette ZMV1002 (Malvern Panalytical, UK). Obtained data was converted using Malvern Zetasizer v8.02 software (<https://www.malvernpanalytical.com/en>). Protein concentration in the samples was 0.4-0.6 mg/ml. Measurements were performed in triplicates with a 30 sec equilibration time between samples. Graphs of medium particle sizes were generated using GraphPad Prism v.8.0.1 software (www.graphpad.com).

Transmission Electron Microscopy imaging

3 μ l of the VLP sample, with a protein concentration of 0.1-0.2 mg/ml, were applied on carbon-coated copper grids (Agar Scientific, UK). After 1 minute grid was dried using filter paper, washed with 3 μ l of sterile water for 10 seconds and again dried with filter paper. 3 μ l of 2% uranyl acetate water solution was used to stain the sample. After 10 seconds uranyl acetate was dried using filter paper and the grid was additionally air-dried for 1 minute before putting it into the grid box. Electron microscopy of the samples was performed using a Morgagni 268 (D) (FEI, Netherlands) or TalosTM L120C (Thermo Fisher Scientific) transmission electron microscope. To determine the sizes of the structures in the micrographs, ImageJ v1.53t software was used (Schneider *et al.*, 2012).

Thermal Shift Assay

Thermal stability of the samples was evaluated by thermal shift assay (TSA), using Rotor-Gene Q real-time PCR cycler (Qiagen, Germany). VLP samples were prepared with a protein concentration of 0.4 mg/ml. 0.2 μ l of 10 mM 1-anilino-8-naphthalene-sulfonic acid (ANS) stock solution in 100% dimethyl sulfoxide was added to 10 μ l of the sample. Temperature of prepared mixtures was raised by 1°C every minute from 25°C to 99°C and the reported signal was measured at each step. The fluorescence excitation and detection

wavelengths were 365 and 460 nm, respectively. Obtained fluorescence intensity curves were used to determine the melting points (T_m) of the samples using Thermott software tool (Gedgaudas *et al.*, 2022). Plots of fluorescence intensity versus temperature were generated using GraphPad Prism v.8.0.1 software (www.graphpad.com).

Nisin encapsulation into Gag-formed VLPs

For the encapsulation experiment three different molar concentrations of nisin Z (Handary, Belgium) aqueous solutions were prepared: 220 μ M (0.74 mg/ml), 22 μ M (0.074 mg/ml) and 2.2 μ M (0.0074 mg/ml). Gag-formed VLPs were prepared at molar concentration of 0.22 μ M (2 mg/ml) in 2 $\times$ citrate-phosphate buffer (pH 6) with 300 mM NaCl and 20 mM EDTA using 0.5 ml volume Zeba spin 7K MWCO columns (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), following the manufacturer's recommendations. Particle solutions were mixed by equal volumes with prepared nisin water solutions (220, 22 and 2.2 μ M). Thus VLP:nisin mixtures with molar ratios of 1:1000, 1:100 and 1:10 (or 0.11 μ M for the particles and 110, 11 and 1.1 μ M for nisin, respectively) were prepared. For the passive diffusion of nisin through the pores of the particles, VLP:nisin mixtures were incubated at 4°C for 16 h with gentle shaking. Non-encapsulated nisin was filtered from the samples using Pierce™ Protein Concentrators, 100 kDa cut-off™ ultrafiltration columns (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), following the manufacturer's recommendations. Samples were additionally washed with 500 μ l of 1 $\times$ citrate-phosphate buffer (pH 6) with 150 mM NaCl and 10 mM EDTA. After filtration reduced volume of the samples was adjusted to the initial volume using the same buffer.

Agar-diffusion assay was used to determine whether nisin was successfully encapsulated into the particles. *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 strains were used as gram-positive bacterial indicators for the evaluation of the antibacterial activity of prepared samples. 20 μ l of the samples were spotted onto LB agar plates seeded with *B. subtilis* and *S. aureus* cultures, and onto Tryptic soy agar medium (1.7% peptone from casein, 0.3% peptone from soymeal, 0.25% glucose, 0.5% NaCl, 0.25% K_2HPO_4 , 2% agar, pH 7.3) inoculated with *S. pyogenes* cells (2×10^7 cells/plate). After incubation at 37°C for 24 h, the growth inhibition zones were measured. A total of 5 biological replicates were evaluated and the mean with standard deviation ($\pm$ SD) was calculated. This experiment was performed in Nature Research Centre (NRC) by staff members of the Genetics Laboratory.

Studies with mammalian cells

Lung carcinoma epithelial tissue A549 line cells were grown in T25 culture flasks with 5 ml of mammalian culture medium (DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin-streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Lithuania)) at 37°C, 5% CO₂ and 95% humidity in S-Bt Smart Biotherm thermostat (Biosan, Latvia). For the cell passaging, old culture medium was removed, and the cells were washed with 5 ml of 1×PBS solution (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Cells were detached using 0.5 ml of TrypLE™ Express dissociation reagent (Thermo Fisher Scientific, Lithuania) by incubating for 2.5 min at the same conditions. The required number of A549 cells (Table 2) was transferred into 24 (for fluorescence assay) or 96 (for MTT assay) well culture plates and cultivated for 16-20 h at the same conditions. For the cell cultivation in 24-well plates cover slips were added into the wells before the seeding. To transduce the cells with L-BC VLPs, old medium was removed and 1 ml (for 24-well plate) or 100 µl (for 96-well plate) of freshly prepared mammalian culture medium with required concentration of L-BC VLPs was added. Cells were incubated with the particles for 4, 24, 48 or 72 h at the same conditions.

Table 1. Time and number of cells used for the A549 line cell transduction experiment.

Time of transduction	Cells per well
96-well plate (for MTT assay)	
24 h	5000
48 h	2300
72 h	1500
24-well plate (for fluorescence assay)	
4 h	50 000
24 h	30 000
48 h	13 800
72 h	6000

To determine if Gag-formed VLPs had entered A549 line cells, fluorescence imaging of the cells was carried out. Fluorescence imaging of the samples was accomplished using AX70 microscope (Olympus, Japan) with 60× objective with immersion oil. After transduction, old medium was removed from 24-well plates and cells were washed two times with 1 ml of dPBS solution (0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.1 mM KH₂PO₄, pH 7.4). For the fixation of the cells, 0.4 ml of PFA solution (3 % PFA, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) with 1 µg/ml of Hoechst 33342 nuclear localisation dye (Thermo

Fisher Scientific, Lithuania) was added and samples were incubated for 20 min at 21°C. After incubation, cells were washed with 1 ml of dPBS solution. The cover slips were carefully taken out the wells using tweezers and put on microscope slides with previously applied ProLong™ Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, Lithuania), that protects fluorescent dyes and protein from fading. For the imaging of Hoechst 33342 stained nucleus and mCherry protein, U-MWU and U-MWG filters were used, respectively. Images were taken using monochrome ORCA-spark camera (Hamamatsu, Japan). Fluorescence images were prepared using ImageJ v1.53t software (Schneider *et al.*, 2012).

Relative viability of transduced A549 cells was evaluated using MTT assay. After transduction, old medium was removed from 96-well plates and cells were washed two times with 150 µl of dPBS solution. Then, 0.1 ml of culture medium with 0.5 mg/ml MTT reagent (Merck, Germany) was added to the wells and incubated for 4 h at 37°C. After incubation, medium with MTT was removed and formazan crystals were solubilized in 100 µl isopropanol for 10 min at 21°C. Infinite M Nano (Tecan, Switzerland) instrument was used to measure the OD₅₆₅ values of the samples. Relative viability of the cells was calculated by subtracting the OD₅₆₅ value of the background (blank samples) from treated and non-treated cells and then OD₅₆₅ value of treated cells was divided by the value of non-treated cells. A total of 6 biological replicates was performed and the mean with standard deviation ($\pm$ SN) was calculated using Microsoft Excel software.

Statistical analysis

Statistical differences among groups were obtained by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple pairwise comparison test, with statistical significance marked as follows: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v.8.0.1 software (www.graphpad.com).

RESULTS

Synthesis and characterization of L-BC Gag virus-like particles

Full-length L-BC virus GAG gene fragment was cloned from *S. cerevisiae* BY4741 strain and ligated into two inducible expression vectors: pET28a (Shilling *et al.*, 2020) and pFX7 (Sasnauskas *et al.*, 1999), used for protein synthesis in bacteria and yeast, respectively. Ligation products were cloned in bacteria *E. coli* DH10B strain. For the selection of colonies with right pET28-

L-BC-gag and pFX7-L-BC-gag plasmids restriction analysis was carried out. Absence of mutations in the GAG gene was confirmed by DNA sequencing. For the synthesis of L-BC Gag protein in bacteria, pET28a-L-BC-gag plasmid was transformed into *E. coli* BL21-AI strain (Bhawsinghka *et al.*, 2020). For Gag protein synthesis in yeast, pFX7-L-BC-gag plasmid was transformed into *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] strain (laboratory collection, unpublished). After the soluble protein optimization procedures, purification of L-BC Gag protein from bacteria and yeast cells was performed. The purification of virus-like particles was initially optimized by investigating the relationship between *S. cerevisiae* L-A-lus virus and M2 satellite and their host cell metabolism (Lukša *et al.*, 2022). In that work, sedimentation of VLPs from total soluble protein fraction was carried out by using PEG precipitation reagent and particles were additionally purified by ultracentrifugation in 1.36 g/cm³ density CsCl solution in lysis buffer (Figure 1A-1 and 3). Using this strategy, L-A-lus viral particles were successfully separated by their dsRNA content (Figure 1B).

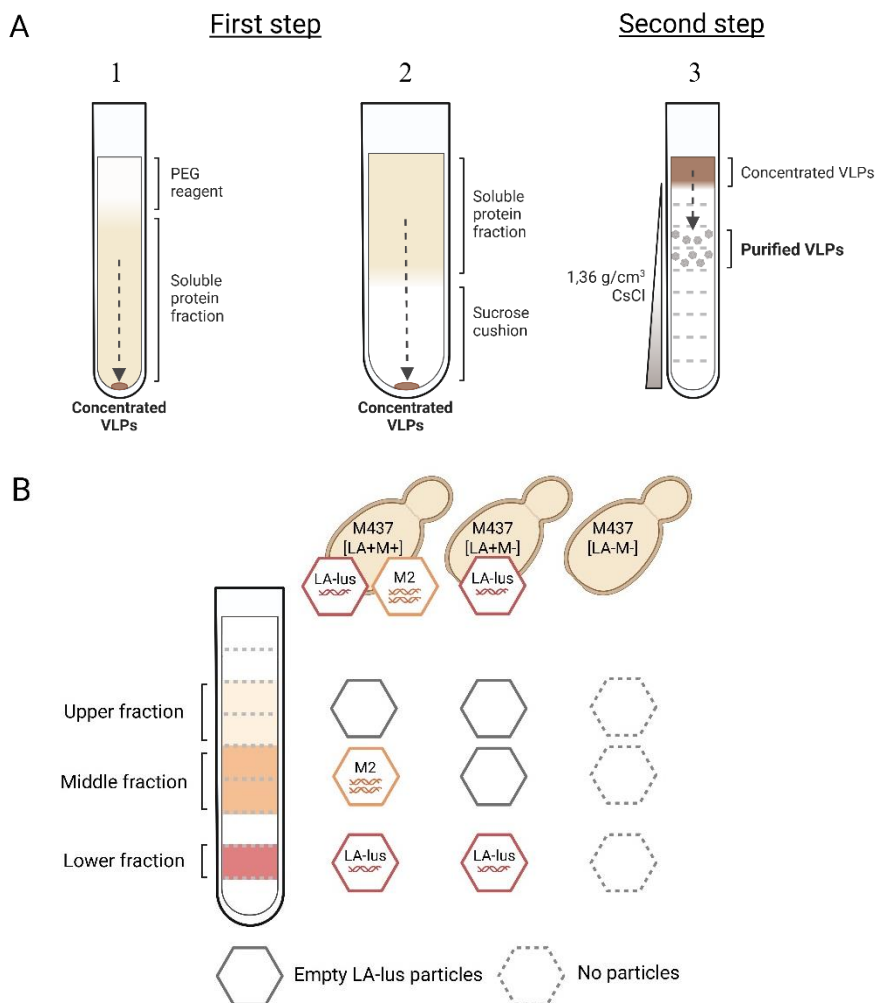


Figure 1. Purification of Gag-formed virions/virus-like particles. (A) First step of the purification: (1) concentration of virions or virus-like particles from soluble protein fraction using PEG precipitation reagent or (2) by ultracentrifugation through sucrose cushion; second step (3) – additional purification of concentrated particles by ultracentrifugation through CsCl solution. (B) Fractions obtained after purification of native L-A-lus virus and M2 satellite from different *S. cerevisiae* M437 strains: upper fraction, in which no dsRNA was identified in viral particles obtained from different strains; middle fraction, in which dsRNA was identified only in viral particles obtained from strain M437[LA+M+]; lower fraction, in which dsRNA was identified in viral particles from both strains M437[LA+M+] and M437[LA+M-]. Schemes were prepared using *Biorender* based on Lukša *et al.*, 2022.

Since we were able to separate the fractions of empty particles, also referred to virus-like particles, from the virions containing fractions, we applied this strategy for the purification of recombinant L-BC Gag-formed VLPs. However, because of the purity problems, sedimentation of the particles using

PEG precipitation reagent was changed to ultracentrifugation through sucrose cushion (Figure 1A-2). Samples obtained in different purification steps were analysed in SDS-PAGE (Figure 2).

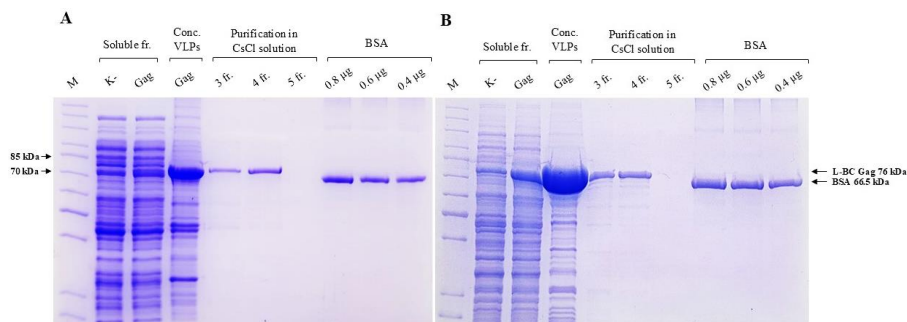


Figure 2. Purification of Gag protein from (A) *E. coli* BL21-AI and (B) *S. cerevisiae* BY4741 [LA-LBC-] strains. Gag-formed particles were concentrated from the soluble protein fraction by ultracentrifugation through 45% sucrose cushion and purified in 1.36 g/cm³ density CsCl solution. K- – soluble protein fraction, obtained after induction and disruption of the cells transformed with pET28a (for bacteria) and pFX7 (for yeast) plasmids (negative control). Gag – soluble protein fractions, obtained after induction and disruption of the cells transformed with pET28a-L-BC-gag (for bacteria) and pFX7-L-BC-gag (for yeast) plasmids. Conc. VLPs – precipitate obtained after ultracentrifugation through sucrose cushion. Purification in CsCl solution – fractions obtained after purification of concentrated particles in CsCl solution. BSA – different concentrations of BSA protein. M – protein molecular mass standard PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Recombinant Gag protein (~76 kDa) was successfully concentrated from the soluble protein fractions of bacteria and yeast lysates by ultracentrifugation through sucrose cushion and additionally purified in CsCl solution. As in our previous study with L-A-lus and M2 viruses (Figure 1B), empty virus-like particles, formed from recombinant Gag protein, distributed in upper 3rd and 4th fractions. The total yield of purified Gag protein was evaluated by densitometric analysis of several biological replicates and known amounts of BSA protein (66.5 kDa) using ImageJ v1.53t software (Schneider *et al.*, 2012). Total yield of Gag protein from wet biomass in two purified fractions was 0.25 ± 0.03 mg/g (n=4) for *E. coli* and for *S. cerevisiae* the yield was several times higher and reached 0.78 ± 0.05 mg/g (n=3).

To validate the formation of Gag-formed VLPs and evaluate the size of the obtained particles, DLS and transmission electron microscopy (TEM) methods were employed. According to DLS measurements, the average Gag particle size in the samples purified from bacteria (B-VLPs) and yeast (Y-VLPs) were 41.1 ± 2.53 and 41.8 ± 1.42 nm, respectively (Figure 3A).

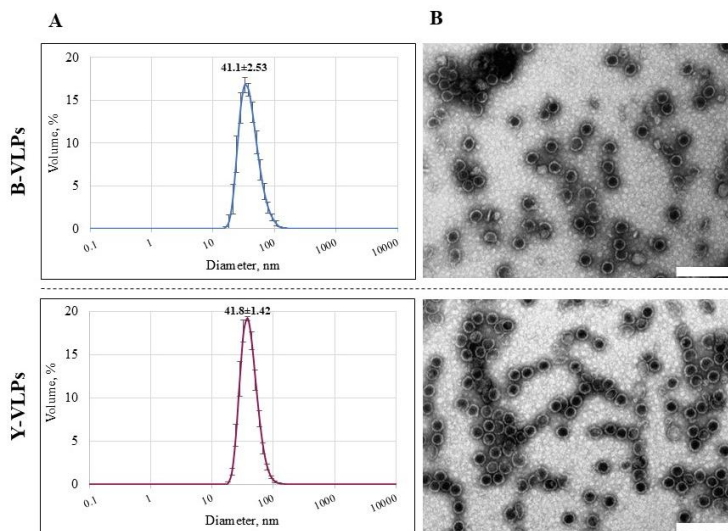


Figure 3. Evaluation of the size and morphology of the Gag-formed VLPs purified from bacteria (B-VLPs, upper part) and yeast (Y-VLPs, lower part). (A) Distribution of the particle sizes (by percentage of volume) in the purified Gag protein samples (0.5 mg/ml) obtained by DLS. Results are presented as the mean of three independent replicates with standard deviation. (B) TEM micrographs of the purified Gag protein (0.1 mg/ml). Scale-bar size: 200 nm.

Symmetrical spherical particles with the diameter of 38-43 nm were identified in TEM micrographs of Gag protein purified from both bacteria and yeast (Figure 3B). The size of these particles was comparable with the size of native L-BC virus (38.5 nm) (Grybchuk *et al.*, 2022). No obvious differences in size and morphology were observed between the samples of B- and Y-VLPs. Analysis of the samples by DLS and TEM confirmed that recombinant L-BC Gag protein synthesized in bacteria and yeast forms virus-like particles.

Particle size stability evaluation by DLS

It is known that the synthesis system of VLPs can impact their properties, morphology and stability (Mejía-Méndez *et al.*, 2022). To compare the stability of L-BC Gag-formed VLPs purified from bacteria and yeast we incubated them for 24 weeks in different storage conditions and solutions and measured the average particle size at the start of the study and after 1, 2, 4, 8, 16 and 24 weeks using DLS method. The statistical significance of particle size was evaluated by comparing the sizes measured after 1, 2, 4, 8, 16, and 24 weeks of incubation with the initial particle size.

Since one of the further objectives of this study was to test how these particles affect the viability of mammalian cells, we compared the stability of Gag-formed VLPs stored at 37°C, used for the cultivation of mammalian cells,

21 °C (room temperature) and 4°C. This experiment was carried out in Tris-HCl buffer, used for purification and initial particle storage, or phosphate buffer, that is more suitable for further experiments with mammalian cells. Buffers used in this study had the same properties as lysis buffer – pH 8, 150 mM NaCl and 1 mM EDTA.

Particles stored at 4°C had no significant change in the size over a 24-week period regardless of the buffer used for the storage and the particle type ($p>0.05$) (Figure 4A). Same results were obtained during the storage of Y-VLPs at 21°C or 37°C. In contrast, significant change in size ($p\leq0.0001$) of B-VLPs was observed after 24 weeks of incubation at 21°C in both buffers, indicating the aggregation of VLPs (Figure 4B). During the storage of B-VLPs in 37°C, their size significantly increased after 16 weeks of storage in both buffers ($p\leq0.01$ for Tris and $p\leq0.001$ for phosphate buffer). Based on these findings, Y-VLPs demonstrated longer size stability properties than B-VLPs and temperature affected only the size stability of the particles purified from bacteria. Since no significant differences between storage of the particles in Tris or phosphate buffer were found, phosphate buffer was chosen for further size stability studies. Because of the aggregation of the particles purified from bacteria at higher temperatures, further particles were stored only at 4°C.

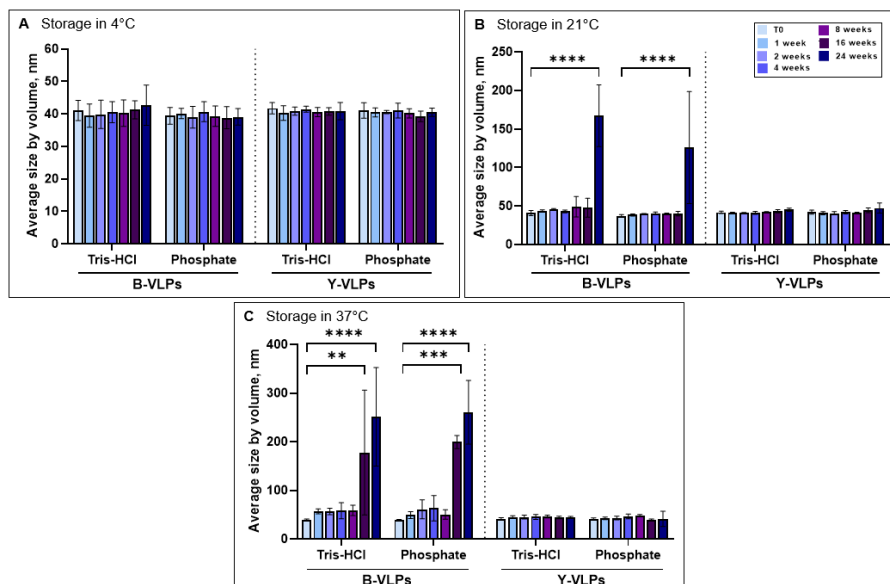


Figure 4. Effect of storage temperature and buffer composition on the size stability of Gag-based VLPs purified from bacteria and yeast. Average particle size was measured by DLS instrument, incubating the particles at 4°C (A), 21°C (B) and 37°C (C) in Tris or phosphate buffers up to 24 weeks. Results are presented as mean of average particle sizes (n=3) with standard deviation ($\pm$ SD). Statistical significance marked as follows: $p\leq0.05$ (*), $p\leq0.01$ (**), $p\leq0.001$ (***), $p\leq0.0001$ (****).

Studies with other VLPs show that buffers pH, ionic strength and removal of bivalent ions also can affect stability of the particles (Al-Ghobashy *et al.*, 2017; Bond *et al.*, 2020; Le and Müller, 2021). Three pH values (6, 7 and 8), three concentrations of NaCl (0, 150 and 500 mM) and one concentration (10 mM) of EDTA or $MgCl_2$ in phosphate buffer were used to evaluate the impact of these factors on the stability of Gag VLPs. Gag-formed particles remained stable for 24 weeks at all mentioned conditions, except for the particles purified from bacteria, stored in buffer with 500 mM NaCl – significant increase in size was observed after 24 weeks ($p \leq 0.01$) (Figure 5).

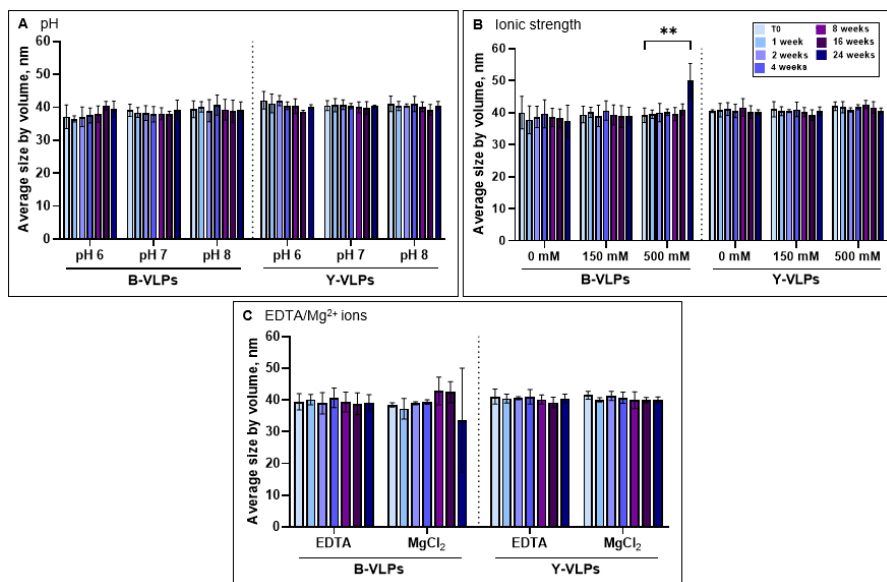


Figure 5. Effect of phosphate buffer pH (A), absence of Mg^{2+} ions (B), and ionic strength (C) on the size stability of Gag-based VLPs purified from bacteria and yeast. Average particle size was measured by DLS instrument, incubating the particles at 4°C up to 24 weeks. Results are presented as mean of average particle sizes ($n=3$) with standard deviation ($\pm SD$). Statistical significance marked as follows: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

Particle stability evaluation by TSA

A thermal shift assay (TSA) was used to gain a better understanding of how temperature, pH, ionic strength and magnesium ions affect the stability of L-BC Gag-formed VLPs. Aggregation and denaturation of the proteins were determined by adding an 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (ANS) fluorescent dye to the samples, which binds to the hydrophobic surface of proteins with high affinity and causes a rise in fluorescence (Ota *et al.*, 2021). Temperature of the prepared samples was raised from 25 to 99°C and reporter signal was measured at each step. The statistical significance of the melting

temperatures and sizes was assessed by comparing the results obtained for different types of the particles and the particles, stored in different solutions. Firstly, we evaluated thermal stability of Gag-formed VLPs in the solutions used for long-term stability studies (Figure 6). Regardless of the composition of the buffer, both types of Gag particles had two thermal transitions, where the maximum of the second peak partially overlapped with the first peak with a lower fluorescence signal. It was calculated, that first and second melting temperature of B-VLPs was 62.9-64.4°C (T_{m1}) and 70.5-71.7°C (T_{m2}) (Figure 6A). Melting temperatures of Y-VLPs were a few degrees higher compared to B-VLPs – 65.0-67.2°C (T_{m1}) and 71.3-74.1°C (T_{m2}) (Figure 6B). Although no significant difference was found between melting temperatures of B- and Y-VLPs ($p>0.05$), slightly higher temperatures of Y-VLPs correspond to our previous stability results, where at higher temperatures B-VLPs were more likely to aggregate than Y-VLPs. No significant differences were found between melting temperatures of Gag-formed particles, prepared in different buffers ($p>0.05$). To understand the origin of two thermal transitions, the average size of the particles was measured before increasing the temperature (at 25°C). Particles with the average size of 37.2-42.2 nm with no significant differences in size were identified in all samples ($p>0.05$) (Figure 6 tables).

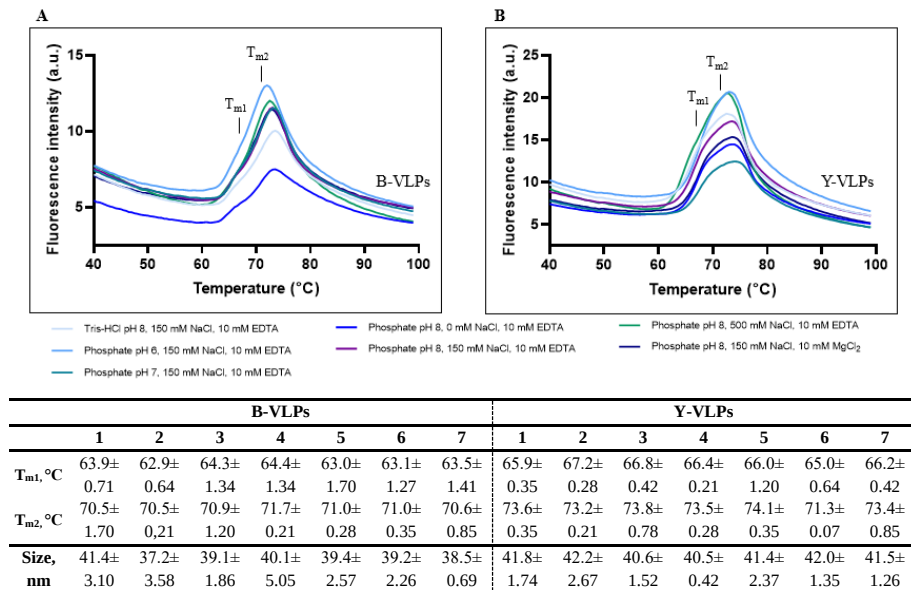


Figure 6. Stability of Gag-formed VLPs purified from bacteria (A) and yeast (B) prepared in buffers used for long-term size stability studies. Fluorescence intensity was obtained by increasing the temperature of mixtures with ANS dye from 25 to 99°C and measuring reporter signal at each step. Calculated melting points T_{m1} and T_{m2} and the average size of the particles measured by DLS at 25°C are presented in the table. Results are presented as mean ($n=3$) with standard deviation ($\pm$ SD). a.u. – arbitrary units.

Since no significant change in the size of Gag-formed particles was found at pH 6-8 during long-term size stability studies, stability of Gag particles was evaluated by TSA in wider range of pH (3-8), using citrate-phosphate buffer system (Figure 7). At pH 3, no thermal transitions were detected in the samples. B-VLPs also had no thermal transition at pH 4, while Y-VLPs had one thermal transition at this pH with melting temperature of 42.3°C. At pH 5, both types of Gag particles had one thermal transition: melting temperature of B-VLPs and Y-VLPs was 58.4°C and 65.3°C, respectively. Two thermal transitions of Gag particles were detected only when pH reached 6. In the pH range of 6 to 8, the thermal stability of Gag particles was similar, with melting temperatures of 62.2-63.5°C (T_{m1}) and 69.3-71.2°C (T_{m2}) for B-VLPs and 64.9-65.7°C (T_{m1}), 71.5-73.5°C (T_{m2}) for Y-VLPs. No significant difference in melting temperatures of Gag particles were found at pH 5-8 ($p>0.05$), however melting temperature of Y-VLPs at pH 4 was significantly lower than the others ($p\leq 0.0001$).

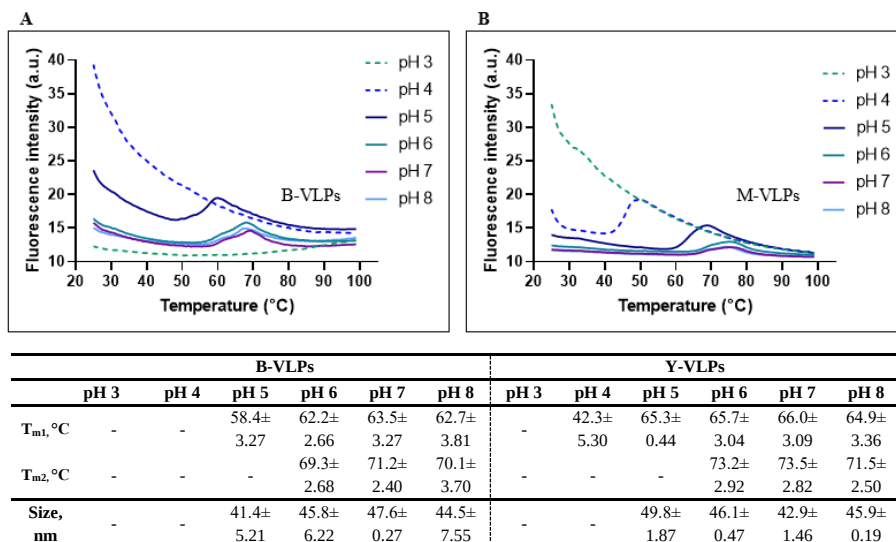


Figure 7. Stability of Gag-formed VLPs purified from bacteria (A) and yeast (B) prepared in citrate-phosphate buffers at pH 3-8. Fluorescence intensity was obtained by increasing the temperature of mixtures with ANS dye from 25 to 99°C and measuring reporter signal at each step. Calculated melting points T_{m1} and T_{m2} and the average size of the particles measured by DLS at 25°C are presented in the table. Results are presented as mean ($n=3$) with standard deviation ($\pm$ SD). a.u. – arbitrary units.

At pH 3 and 4 no intact particles were detected. These results support the data obtained by TSA and confirm that Gag protein is not stable at highly acidic pH. Even though Gag-formed particles had only one melting point at pH 5, particles were still intact, with an average size of 41.4-49.8 nm. As expected,

at pH 6-8 intact particles were detected, the size of which was 42.9-47.6 nm. No significant differences were found between average size of Gag particles, regardless of the particle type or pH of the solution ($p>0.05$).

Disassembly of L-BC Gag-formed VLPs

One of the methods used for the encapsulation of VLPs is disassembly and reassembly of the particles with the desired cargo (He *et al.*, 2022). Since particle stability studies did not reveal the conditions that initiate the disassembly of Gag particles, additional experiment was carried out. Particles were incubated in different solutions at 4°C overnight and the average size of the particles was measured by DLS (Table 3).

Table 2. Conditions tested for the disassembly of Gag-formed particles. The average size of Gag particles was measured with DLS instrument. Results are presented as mean of three technical replicates.

Nr.	Solution	Additive conc.	Average size, nm	
			B-VLPs	Y-VLPs
C	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl (Control sample)	-	39.3	44.4
1	50 mM Tris-HCl pH 8 + β ME	5 %	47.1	47.6
2		10 %	0.68	38.1
3	50 mM Tris-HCl pH 8 + DTT	20 mM	40.6	38.8
4		50 mM	39.9	43.5
5	Water+ NaOH	1 mM	44.2	40.3
6		3 mM	43.5	40.4
7		10 mM	21.5	13.8
8	50 mM Tris-HCl pH 8 + Urea	1 M	35.3	42.4
9		2 M	13.3	41.3
10		3 M	15.5	18.0
11		4 M	15.4	17.2
12	50 mM Tris-HCl pH 8 + NaCl	1 M	43.8	43.9
13		2 M	49.6	53.3

It was shown with human papilloma virus (HPV) particles, that they can be dissociated by treating them with 5% of β ME, 2 mM DTT or by incubating them in carbonate buffer with a pH of 9.6 (McCarthy *et al.*, 1998; Mach *et al.*, 2006). However, 5% of β ME did not initiate the disassembly of Gag particles (Table 3-1). Compared to control (Table 3-C), average size of 5% β ME-treated Gag particles slightly increased. When β ME concentration in the solution has been increased to 10%, average size of B-VLPs decreased to 0.68 nm, however average size of Y-VLPs remained stable (Table 3-2). The average size of Gag particles did not change even when 50 mM of DTT was

added to the solution (Table 3-4). To adjust the pH, different amounts of NaOH (1-10 mM) were added to Gag particle in water solutions. At pH 11.0-11.5, size of Gag particles remained stable (40.3-44.2 nm) (Table 3-5 and 6), however when pH reached 12, both B- and Y-VLPs dissociated into 13.8-21.5 nm structures (Table 3-7). We also tested 4 different concentrations of urea, used for disassembly of many VLPs (Fang *et al.*, 2015; Le and Muller, 2021). Dissociation of B-VLPs was achieved using 2 M urea solution (Table 3-9), whereas Y-VLPs dissociated in 3 M urea solution (Table 3-10). Structures in the size of 13.3-18.0 nm were obtained after urea-induced particle disassembly. In some cases, high ionic strength also can induce disassembly of VLPs (Lavelle *et al.*, 2007), yet only a slight increase in the size of Gag particles was observed in 2 M NaCl solution (Table 3-13).

Since reduced size of Gag particles were observed at alkaline pH and upon treatment with urea, Y-VLPs samples were examined by TEM to confirm particle dissociation (Figure 8). Micrographs of the particles treated with 10 mM NaOH (pH 12), or 3 M urea revealed structures ranging from 12 to 22 nm, in good agreement with the DLS measurements (Figure 8-B and C). Identified structures are morphologically similar and quite symmetrical. In comparison, intact symmetrical spherical particles with similar size of 38-45 nm were identified in standard lysis buffer or 2 M NaCl solution (Figure 8-A and D). Also, small proportion of partially open particles was observed.

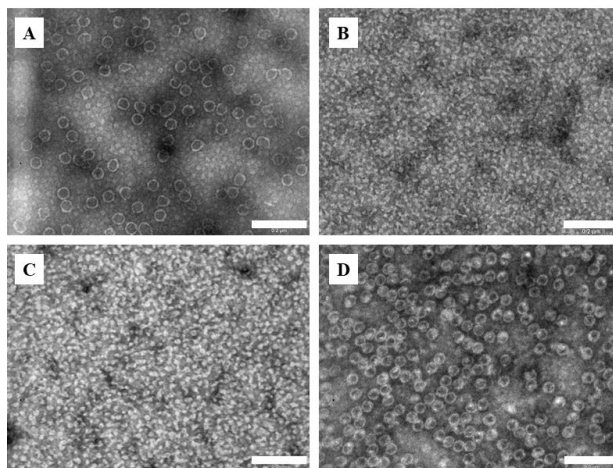


Figure 8. TEM micrographs of Gag-formed Y-VLPs after overnight incubation with different reagents. Particles were incubated in (A) lysis buffer (positive control), (B) water with 10 mM NaOH, (C) 50 mM Tris-HCl pH 8 with 3 M Urea, (D) 50 mM Tris-HCl pH 8 with 2 M NaCl. Scale-bar size: 200 nm.

Analysis of particles treated with various reagents and pH revealed that the structure of Gag particles was disrupted in aqueous NaOH solution at pH 12

or in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 2–3 M urea. Since the size of the dissociation products was only a few times smaller than intact VLPs, it is likely that the particles did not dissociate into capsid-forming monomers, but rather into larger structures, such as decamers. This outcome may be advantageous, as dissociation will be used in future for encapsulation studies – reassembly of particles from larger substructures may be more efficient than from monomers.

Encapsulation of L-BC Gag-formed VLPs

In addition to the particle size, stability and dispersibility, other important properties of nanocarriers are their ability to encapsulate various materials, protect and release them in the right location (Alshawwa *et al.*, 2022; Elumalai *et al.*, 2024). For the initial encapsulation studies, red fluorescent protein mCherry was fused to the C-terminus of the Gag protein (Figure 9). Using this method, fluorescent molecule is covalently attached to each of the 120 particle-forming Gag proteins.

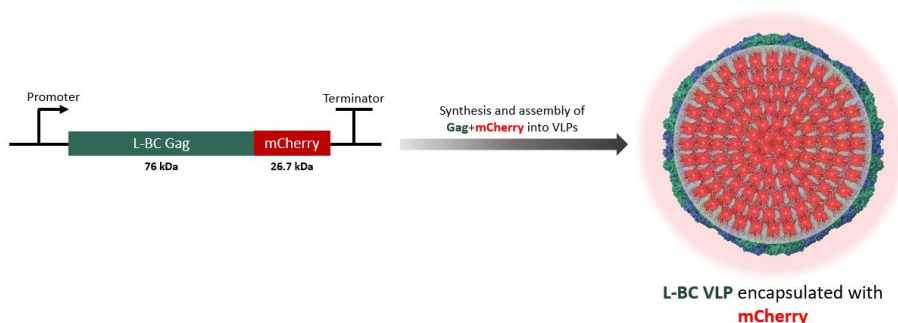


Figure 9. Encapsulation of fluorescent mCherry protein into L-BC Gag VLP (PDB 7QWX) by gene fusion method. Scheme was prepared using Biorender.

For the synthesis of Gag+mCherry fusion protein, the same expression vectors (pET28a and pFX7), strains (BL21-AI and BY4741[LA-LBC⁺]) and induction conditions as for Gag protein were used. SDS-PAGE analysis of soluble protein fractions obtained after lysis of the cells confirmed the synthesis of soluble Gag+mCherry fusion protein (~104 kDa) in both expression systems (Figure 10-A, 1 lane). Same as Gag-formed particles, Gag+mCherry particles were concentrated by ultracentrifugation through sucrose cushion (Figure 10-A, lane 2) and purified in CsCl solution (Figure 10-A, lane 3). DLS and TEM analysis of purified samples confirmed the successful assembly of Gag+mCherry fusion protein into VLPs with the size of 46.1-46.6 nm (Figure 10-B). Compared to Gag particles, structure of the Gag+mCherry-formed particles was a bit less symmetrical (Figure 10-C).

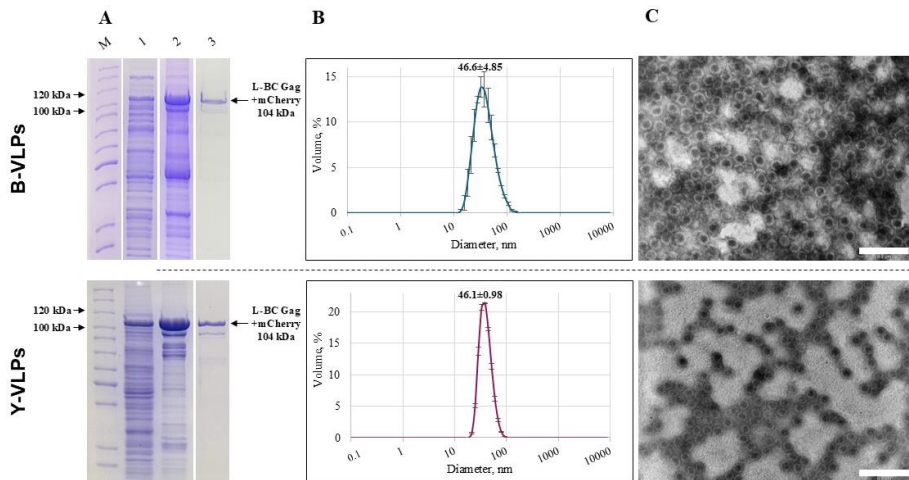


Figure 10. Purification and characterization of Gag+mCherry VLPs from *E. coli* BL21-AI (B-VLPs, upper part) and *S. cerevisiae* BY4741[LA-LBC-] (Y-VLPs, lower part). The particles were concentrated from the soluble protein fraction by ultracentrifugation through 45% sucrose cushion and purified in 1.36 g/cm³ density CsCl solution. (A) SDS-PAGE analysis of the samples. Lane 1 – soluble protein fractions, obtained after induction and disruption of the cells transformed with pET28a-L-BC-gag+mCherry (for bacteria) and pFX7-L-BC-gag+mCherry (for yeast) plasmids. Lane 2 – precipitate obtained after ultracentrifugation through sucrose cushion. Lane 3 – fraction obtained after purification in CsCl. M – protein molecular mass standard PageRuler™ Unstained Protein Ladder. (B) Distribution of the particle sizes (by percentage of volume) in the samples (0.5 mg/ml) was obtained by DLS. Results are presented as mean of three independent replicates with standard deviation. (C) TEM micrographs of the purified Gag+mCherry protein (0.1 mg/ml). Scale-bar size: 200 nm.

A positively charged antimicrobial peptide nisin Z with low molecular weight of 3.35 kDa was chosen for the encapsulation into negatively charged L-BC Gag VLPs by passive diffusion (Figure 11).

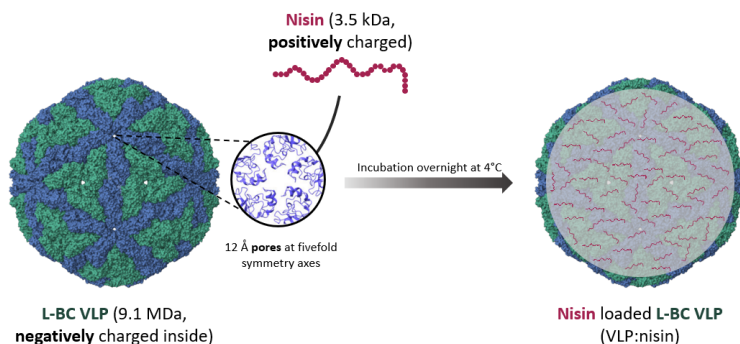


Figure 11. Encapsulation of antimicrobial peptide nisin Z into L-BC Gag VLP (PDB 7QWX) by passive diffusion through capsid pores. Scheme was prepared using Biorender.

For the encapsulation process, 1:1000, 1:100, 1:10 VLP and nisin molar ratios were used. The final concentration of the VLPs before filtration was 0.11 μM, and for nisin – 110, 11 or 1.1 μM, respectively. Mixtures were incubated

overnight at 4°C. After passive diffusion of nisin into the inner cavity of L-BC VLPs, non-encapsulated nisin was filtered and washed from the samples. Negative particle control (0.11 µM) and positive controls of nisin (110, 11 and 1.1 µM) were also prepared without filtration. To determine if the encapsulation process was successful, antimicrobial activity of the prepared samples was tested against the *B. subtilis*, *S. pyogenes* and *S. aureus* bacteria using agar-diffusion assay (Table 5).

Table 3. Antibacterial activity of the samples against *B. subtilis*, *S. pyogenes* and *S. Aureus* bacteria determined by measuring the bacteria growth inhibition zones (mm). N indicated in the column of the growth inhibition zones means that growth was not inhibited. Results are presented as mean of five independent replicates with standard deviation.

Sample	Molar conc. before filtration (µM)		Growth inhibition zones, mm		
	VLP	Nisin	<i>B. subtilis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Experiment with B-VLPs samples					
B-VLPs (negative control)	0.11	0	N	N	N
Nisin (positive control)	0	110	12.8±0.3	21.3±0.3	10.2±0.3
		11	9.7±0.3	13.5±0.9	8.0±0.3
		1.1	8.2±0.3	9.3±0.6	N
Nisin- encapsulated B-VLP	0.11	110	9.3±0.3	12.2±0.8	6.7±0.3
		11	6.2±0.3	10.3±0.6	N
		1.1	N	N	N
Non- encapsulated nisin	-		13.3±0.3	19.5±0.5	8.7±0.3
			5.9±0.5	9.8±0.3	N
			N	N	N
Experiment with Y-VLPs samples					
Y-VLPs (negative control)	0.11	0	N	N	N
Nisin (positive control)	0	110	13.0±0.4	20.4±1.3	10.3±0.4
		11	9.9±0.2	13.9±1.2	8.2±0.3
		1.1	8.1±0.2	9.7±0.7	N
Nisin- encapsulated Y-VLP	0.11	110	9.0±0.8	11.9±0.5	6.2±1.1
		11	8.1±0.2	10.2±0.4	N
		1.1	N	N	N
Non- encapsulated nisin	-		12.2±0.3	19.9±0.7	9.6±0.4
			8.3±0.4	10.2±0.4	N
			N	N	N

As expected, Gag particles (negative control) did not inhibit the growth of any tested bacterial strains. Non-encapsulated nisin had a slightly lower antimicrobial activity compared to free nisin – these results suggest that some amount of nisin was encapsulated into Gag particles. Gag particles that were encapsulated with nisin using the highest molar ratio (1:1000), inhibited growth of all tested bacterial strains. These samples had about 27-43% lower antibacterial activity compared to free nisin (positive control). Using the lowest molar ratio (1:10) for the encapsulation no inhibitory effect was found. Using the 1:100 molar ratio for the encapsulation process, prepared particles showed antimicrobial activity only on *B. subtilis* and *S. pyogenes* bacteria. *S. pyogenes* bacteria were most sensitive for tested samples. In general, effectiveness of encapsulation process was similar for both, B- and Y-VLPs.

Entry of L-BC Gag-formed VLPs into mammalian cells

To determine the potential of Gag particles to enter the mammalian cells, particles encapsulated with fluorescent mCherry protein were used. Lung carcinoma epithelial tissue A549 line cells were incubated with 50 pM concentration of mCherry-encapsulated Gag particles for 4 or 24 hours. After incubation, samples were analysed using Olympus AX70 fluorescence microscope (Figure 12).

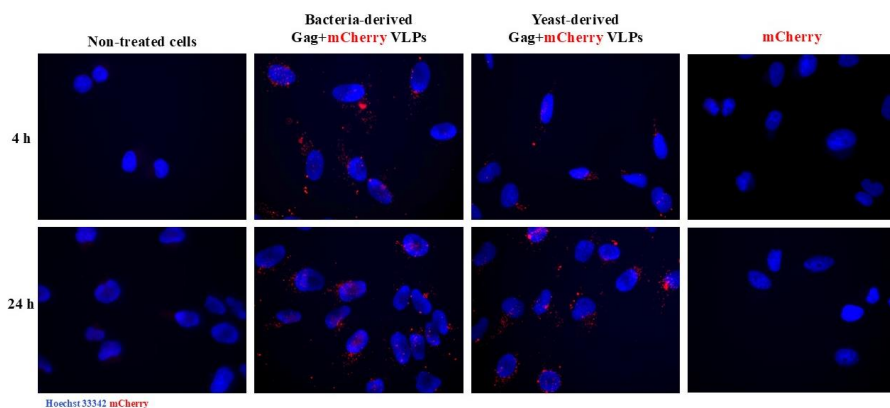


Figure 12. Fluorescence imaging of lung carcinoma epithelial tissue A549 line cells. A549 line cells were incubated in the mammalian culture medium without the particles (non-treated cells), with 50 pM concentration of mCherry-encapsulated Gag particles purified from bacteria and yeast or mCherry protein, for 4 (upper part) or 24 (lower part) hours.

After 4 or 24 hours of incubation, only nucleus stained with Hoechst 33342 dye fluorescence is visible in the non-treated A549 line cells. Same results were obtained with A549 line cells, that were incubated with free mCherry protein. In contrast, in A549 line cells incubated for 4 hours with mCherry-encapsulated Gag particles purified from either bacteria or yeast, unevenly

distributed fluorescence of mCherry protein can be seen. These results suggest that both types of Gag particles entered the A549 line cells.

After the entry of mCherry-encapsulated Gag particles into the mammalian cells was confirmed, their effect to relative viability of A549 line cells was evaluated. Three concentrations of the particles were tested: 50 pM, that was used for the fluorescence imaging, lower concentration of 10 pM, and a higher concentration of 100 pM. A549 line cells were incubated with the particles for 24, 48 and 72 hours and relative viability of the non-treated and treated cells was evaluated by MTT assay (Figure 13). The statistical significance of the change in relative viability was assessed by comparing the relative viability of treated (10, 50 or 100 pM) and untreated (0 pM) cells. The statistical significance of relative viability was assessed by comparing the relative viability of treated cells (10, 50, or 100 pM) and untreated cells (0 pM).

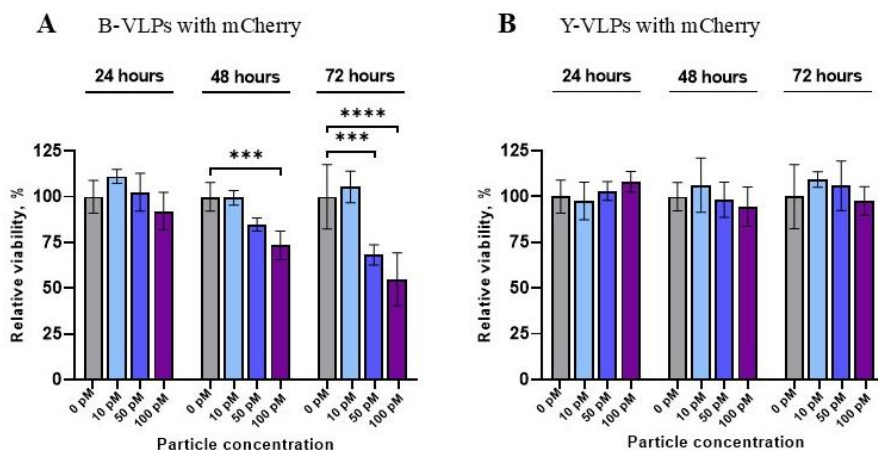


Figure 13. Relative viability of lung carcinoma epithelial tissue A549 line cells. The cells were incubated in mammalian culture medium supplemented with 0, 10, 50 and 100 pM concentrations of mCherry encapsulated Gag particles, for 24, 48 and 72 hours. Results are presented as mean of six independent replicates with standard deviation.

None of the tested concentrations (10, 50, 100 pM) of mCherry-encapsulated Gag particles purified from yeast significantly reduced the viability of A549 line cells ($p > 0.05$). In the case of the particles purified from bacteria, a 100 pM concentration of the particles significantly reduced ($p \leq 0.001$) the relative cell viability to 73% after 48 hours of incubation. After 72 hours of incubation, the relative cell viability was significantly reduced to 68% at 50 pM ($p \leq 0.001$) and even to 55% at 100 pM ($p \leq 0.0001$) particle concentration. According to these results, only the particles purified from bacteria exert a cytotoxic effect on A549 line cells, whereas the particles purified from yeast only slightly affect the relative cell viability.

DISCUSSION

In this work, synthesis of recombinant *S. cerevisiae* L-BC-1 virus major capsid protein Gag was carried out. It is known that unlike for ScV-L-A virus, N-acetylation of major capsid protein of Gag is not essential for the formation ScV-L-BC virions (Wesolowski and Wickner, 1984). For this reason, not only yeast but also bacteria were chosen for the synthesis of Gag protein. The development of inducible expression systems led to successful synthesis and self-assembly of Gag protein into VLPs in both, *E. coli* and *S. cerevisiae* cells. The yield of purified Gag protein synthesized in *E. coli* was several folds less compared to *S. cerevisiae* (0.25 and 0.78 mg/g, respectively). It was also noticed that synthesis of Gag protein had a growth inhibitory effect on *E. coli* cells. The yield of Gag protein in *S. cerevisiae* cells was comparable to the yield of other viral proteins encoded in the same pFX7 expression vector but with higher concentration of galactose in the induction medium – the yield of tail tube protein of bacteriophage vB_EcoS_NBD2 and human polyomavirus HPyVs-derived VP1 protein was 0.85 ± 0.33 mg/g (Špakova *et al.*, 2019) and 0.42-1.05 mg/g (Norkiene *et al.*, 2015), respectively. No toxic effect of L-BC Gag synthesis was observed in *S. cerevisiae* cells.

Assembly of recombinant Gag protein into virus-like particles was confirmed using DLS and TEM methods. DLS is simple and relatively fast method widely used to evaluate the size and aggregation of VLPs (Spice *et al.*, 2020; Al-Ghobashy *et al.*, 2017; Ausar *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2014). For morphological analysis of the particles, other methods like TEM are usually employed, therefore, both methods were used to verify formation of Gag VLPs. It was found that Gag protein successfully forms symmetrical spherical particles in the size of 38-43 nm in bacteria and yeast. Size of Gag VLPs was comparable to the size of native L-BC-1 virus (38.5 nm), determined by cryo-electron microscopy (Grybchuk *et al.*, 2022).

DLS method was also used to determine the influence of buffers pH, ionic strength, presence of magnesium ions, as well as storage temperature on the long-term size stability of Gag VLPs. Identification of small amounts of aggregates is important since it can increase the overall aggregation rate during the storage (Al-Ghobashy *et al.*, 2017). It was demonstrated that the storage temperature had no influence on the size stability of the particles purified from yeast as it did not change during 24-week period, regardless of the used temperature (4, 21 or 37°C). In comparison, the particles purified from bacteria aggregated after 16 weeks of storage at 37°C and after 24 weeks of storage at 21°C. At higher temperatures, number of hydrophobic

interactions in the inner protein layer of VLPs increase and it leads to aggregation, therefore at lower temperatures size of VLPs remains stable for longer periods of time (Xu *et al.*, 2014). Lower influence of storage temperature on the particles purified from yeast may be related to the differences of used expression systems or the fact that yeasts are natural host of native L-BC-1 virus (Ribas and Wickner, 1996; Schmitt and Breinig, 2002). Compared to human immunodeficiency virus-1 envelope protein and norovirus GII-4 capsid protein VLPs, that were stable only for 7 days when incubated at 23-24°C, Gag particles exhibit long size stability (Huhti *et al.*, 2010; Aguado-Garcia *et al.*, 2022). The pH and the salts in the storage solution affect the surface charge and hydrophobicity of the VLPs and therefore they also impact the size stability of the particles. For this reason, the optimal conditions for the particles of different origins may differ: the optimal pH for CCMV particles is 5, for rotavirus – acidic pH, and for adeno-associated virus serotype 2 – alkaline pH 9 (Le and Müller, 2021). Extracellular phase-lacking fungal viruses, including L-BC-1, are usually found in cytosol where pH is neutral (Ghabrial *et al.*, 2015). As expected, neutral pH was optimal for Gag VLPs – their size did not significantly change over 24-week period in the pH range of 6 to 8. During the experiment, the size stability of the particles purified from yeast was also not affected by the ionic strength (0-500 mM). In comparison, size of the particles purified from bacteria did not significantly change at low or medium NaCl concentrations, however the size of the particles stored in 500 mM NaCl solution increased by about 10 nm after 24 weeks. A similar increase in the particle size was observed with canine parvovirus (Xu *et al.*, 2014). Such increase in the size can be seen when particle swelling or so-called transition state is initiated (Bond *et al.*, 2020). Particle swelling can be caused by the appearance or enlargement of the capsid pores (Segovia-González *et al.*, 2023). It has been demonstrated with red clover necrotic mosaic virus, that the concentration of 200 mM EDTA or Ca^{2+} ions in the solution does not affect the size of the particles but initiates the opening or closing of capsid pores (Loo *et al.*, 2008). For the native L-BC-1 virus, capsid pores have been identified in the presence of 10 mM MgCl_2 in the solution (Grybchuk *et al.*, 2022). However, no significant effect on the size stability of Gag particles of such concentration of magnesium ions or EDTA was observed during the 24-week period.

To better understand the factors influencing the stability of L-BC particles, additional stability studies of Gag-formed particles has been carried out by evaluating the melting points of the particles by TSA. It was demonstrated that in the pH range from 6 to 8, Gag particles feature two melting points, which

differ from each other by 6-8°C. Two-step thermal transition was also observed with sweet potato feathery mottle and mild mottle viruses, type-2 bovine enterovirus and equine rhinitis A virus particles. The two melting points of these particles have been associated with (1) dissociation of the particles into capsid monomers and (2) unfolding of capsid protein (Walter *et al.*, 2012; Chase *et al.*, 2023). In case of Norwalk virus, two melting points of the particles were associated with the unfolding of two particle-forming protein VP1 domains (Ausar *et al.*, 2006). It was suggested that assembly of native L-BC virus occurs in several steps: (a) formation of an asymmetric Gag protein dimer, (b) decamer formation by five dimers, and finally (c) full viral capsid assembly from twelve decamers (Grybchuk *et al.*, 2022). Based on our findings, we suggest that two melting temperatures of Gag particles are also related to VLP dissociation into individual particle-forming structures (decamers or monomers of capsid protein) and the final unfolding of the capsid protein. At strongly acidic pH 3, no defined-size structures or melting points were detected, suggesting that the capsid protein was already fully unfolded. Although no particles were detected in the pH 4 solution either, a single melting temperature was observed for particles purified from yeast, which likely corresponds to the unfolding of the capsid protein. In the pH range of 6 to 8, two melting temperatures and full particles were identified. This suggests that the first melting point corresponds to particle dissociation, while the second reflects the unfolding of the capsid protein. This mechanism may also explain why only a single melting temperature was detected at pH 5, despite the presence of particles. It is likely that dissociation had already started at pH 5, resulting in a weaker dissociation signal (corresponding to the first intensity peak) that completely overlapped with the signal of the capsid protein unfolding (second peak), unlike in the pH 6–8 range, where only partial overlap of signals was observed. These results also confirm that a neutral pH environment is optimal for Gag particles.

The disassembly and re-assembly of VLPs allows to get rid of host cell proteins and other molecules, that enters the particles during the self-assembly (Nooraei *et al.*, 2021). This method is widely used for the encapsulation of desired cargos, that cannot be conjugated to viral proteins by gene fusion, or they do not fit through the pores of the capsid (Wijesundara *et al.*, 2022). To apply this approach in the future for the encapsulation of L-BC Gag-formed particles, various conditions that can initiate the dissociation of VLPs were tested. For example, disassembly of HPV VLPs can be achieved in 5% β ME or 2 mM DTT solution (McCarthy *et al.*, 1998; Mach *et al.*, 2006). Wild-type chimpanzee virus 40 loses its efficiency and dissociates at alkaline pH (≥ 10.7)

(Asor *et al.*, 2020). In some cases, increase of ionic strength also leads to the disassembly of VLPs (Lavelle *et al.*, 2007). The disassembly of particles formed from the hepatitis B core protein can be carried out in 2.5 M urea solution, whereas the bacteriophage Q β particles dissociate in buffer with low ionic strength and 6 M of urea (Le and Müller, 2021). In the case of L-BC Gag particles, successful dissociation of the particles into 12-22 nm structures was achieved at alkaline pH 12 or by adding urea. Gag particles purified from bacteria disassembled at 2 M urea concentration, whereas the disassembly of the particles purified from yeast was achieved at 3 M urea concentration. Based on the size of these structures and the previously described assembly mechanism of L-BC virions, it is likely that the Gag particles dissociated not into monomers, but rather into larger structures, such as decamers. Interestingly, when Gag particles purified from bacteria were treated with 10 % β ME, structures below 1 nm were identified by DLS method. According to the literature, such small sizes can be obtained when the solution contains large insoluble aggregates that cannot be measured by the DLS instrument (Jerajani *et al.*, 2022). Another possible explanation for the detection of such small structures is that at 10% β ME concentration, the particles may have dissociated not into decamers, but into Gag protein monomers.

Encapsulation of fluorescence proteins into VLPs or their attachment to the particle exterior is usually achieved by covalent linking to every capsid-forming unit (Shirbaghae *et al.*, 2016). Such strategy was successfully used for the encapsulation of fluorescence proteins into bacteriophage P22, adeno-associated virus and human simplex virus-like particles (O'Neil *et al.*, 2012; Lux *et al.*, 2005; Hoque *et al.*, 2005). To evaluate the encapsulation capabilities of L-BC Gag particles, Gag was fused with red fluorescent protein mCherry and such fusion protein was synthesized in *E. coli* and *S. cerevisiae* cells. It was demonstrated, that Gag+mCherry fusion protein successfully formed particles, that were several nm larger and slightly less symmetrical, compared to Gag particles. Since DLS method measures the average size of spherical particles, less symmetrical structure of Gag+mCherry particles may have affected DLS measurements. Using gene fusion, protein load of up to 1/4 of the total particle mass was successfully encapsulated into Gag particles, without causing any major changes in the particle structure. Such particles not only made the purification process much easier but also allowed to use them for the studies with mammalian cells. Encouraged by the successful encapsulation of mCherry, we also tested another encapsulation method: passive diffusion. Like most of fungal virus, the L-BC viral capsid contains 9 and 12 Å pores at 5- and 3-fold symmetry axes, and 4-7 nm wide gaps between

capsid proteins (Grybchuk *et al.*, 2022). The size of these pores can be altered by changing the composition of the buffer solution, thus controlling the movement of the molecules entering or leaving the capsid. Such pores can be used to encapsulate small molecules into VLPs (Chung *et al.*, 2020). For the encapsulation of L-BC VLPs, we chose positively charged antimicrobial peptide nisin Z with low molecular weight of ~3 kDa (Jančič and Gorgjeva, 2021). This peptide was chosen based on its size and charge, since the interior of L-BC particles is negatively charged (Grybchuk *et al.*, 2022). Possible ionic interactions between the negatively charged interior of capsid and positively charged nisin can increase the possibility of successful encapsulation (McNeale *et al.*, 2022). Evaluation of the antibacterial activity of prepared samples against *B. subtilis*, *S. pyogenes* and *S. aureus* demonstrated that nisin was successfully encapsulated into Gag particles and that the process was reversible, since the particles were able to release encapsulated nisin and inhibit the growth of tested bacteria. Successful encapsulation of fluorescent mCherry protein and antimicrobial peptide nisin into L-BC Gag particles demonstrates the versatile encapsulation capabilities of these particles.

To determine the potential of L-BC VLPs to be used as nanocarrier system, their ability to enter mammalian cells and effect on cell viability was evaluated. Entry of Gag particles into mammalian cells was demonstrated using mCherry encapsulated Gag particles. Fluorescence of the mCherry protein encapsulated in the particles was observed in lung carcinoma epithelial tissue A549 line cells after 4 hours of incubation. Since an uneven distribution of the mCherry fluorescence signal was observed, we assume that after entering the cells, particles remained concentrated in the endosomes. Same results were obtained with bacteriophage Q β particles encapsulated with GFP protein (Hagge *et al.*, 2023). Usually, once the particles enter the endosomes, they are directed to lysosomes for degradation, thus reducing the amount, bioavailability and therapeutic effect of the carried cargo. Therefore, it is important to ensure that nanocarrier escapes the endosomes before degradation to develop an efficient nanocarrier system (Hagge *et al.*, 2023). On the other hand, targeting of nanocarrier to endolysosomes can be an effective method for the delivery of the cargo, as it was shown with cowpea mosaic virus (CPMV) particles that had doxorubicin (DOX) covalently attached to their exterior. These particles were endocytosed by HeLa cells and dissociated by the acidic environment in the endolysosomes, thus releasing DOX from the particles that had cytotoxic effect on cells. A low dose of CPMV-DOX particles (1.45 μ M of doxorubicin) was more efficient compared to free doxorubicin – authors suggest that particles distribute doxorubicin

more evenly and efficiently (Aljabali *et al.*, 2013). Similar effect was observed with CPMV particles, that were encapsulated with DAPI by passive diffusion method. DAPI was detected in the nucleus of the cells after 60 minutes of incubation (Yildiz *et al.*, 2013). Thus, it is important to evaluate whether the generated particles will be able to dissociate in acidic environment. Lysosomes have an acidic pH (4.5-5) (Zeng *et al.*, 2020), however our studies showed that at pH 5, Gag-formed particles remain stable. These results suggest that Gag particles would not dissociate in lysosomes as CPMV particles do. This would explain why even after 24 hours of incubation with the cells, fluorescence signal of the encapsulated mCherry protein did not spread evenly throughout the cytoplasm of the cell. To confirm or deny this hypothesis, observation of the mCherry fluorescence signal in the cells during longer period of time is required. If, however, Gag particles would not enter the cytoplasm, as an alternative, controlled release of the cargo in lysosomes using acid-sensitive linkers could be used. For example, 6-maleimidocaproylhydrazine doxorubicin was encapsulated into physalis mottle virus-like particles by chemical conjugation – since the hydrazine bond is sensitive to the mild acidic cancer and acidic environment in endosomes and lysosomes, doxorubicin is released even without particle dissociation (Hu and Steinmetz, 2020). Other methods, such as endosomal escape also can be used. Hagge and her colleagues developed a thiol-sensitive maleimide linker, that connects a well-known mitochondria-targeting lipophilic triphenyl phosphonium cation (TPP) with the surface of Q β VLPs. Due to its lipophilic and cationic nature, TPP disrupts the endosomal membrane and causes the escape of VLPs from endosomes. When such particle enters the cytosol, glutathione reacts with the thiol-sensitive maleimide linker and removes TPP from the particle. Thus, particle stops its movement towards mitochondria, leaving the particle in the cytosol (Hagge *et al.*, 2023). Successful application of this approach was used to transfer GFP *in vitro* and small ultra-red fluorescence protein *in vivo*, by observing an even distribution of fluorescence signal in A549 line cells and BALB/c mouse lung epithelial cells, respectively (Hagge *et al.*, 2023). The need of such functionalisation techniques for Gag particles will be considered in the future. Undesirable immunogenicity of the particles also should be evaluated in the future. In many cases, immunogenicity can be quite easily avoided by additional coating of the particles with PEG (Yildiz *et al.*, 2013). Evaluation of relative viability of particle-treated A549 line cells demonstrated that only the particles purified from bacteria exert a cytotoxic effect on cells. One of the essential cell wall components of gram-negative bacteria, including *E. coli*, is

lipopolysaccharides (Bonhomme *et al.*, 2024). As bacterial lipopolysaccharides are endotoxins, their presence in the particle samples may lead to cytotoxic effects. Such impurities can be removed by treating the particles with detergents or using additional purification methods, for example, chromatography (Le and Müller, 2021). Since the particles purified from yeast did not significantly reduce the relative cell viability, they may be more suitable for efficient cargo delivery into mammalian cells.

CONCLUSIONS

1. The inducible expression systems of bacteria *E. coli* and yeast *S. cerevisiae* are suitable for the generation of the particles formed from L-BC-1 virus capsid protein Gag.
2. The size of Gag-formed particles remains stable for at least 24 weeks when incubated at 4 °C. The stability of particles incubated at 21°C and 37 °C depends on the origin of the particles: the particles purified from bacteria tend to aggregate during the long-term storage.
3. Gag-formed particles lose their structural integrity at pH 12 or when the concentration of urea in a neutral solution reaches 2-3 M.
4. A two-step loss of Gag-formed particle structure is observed as the temperature of the particle environment increases.
5. Gene fusion is a suitable method for the encapsulation of red fluorescent protein mCherry into Gag-formed particles. Nisin Z, encapsulated into Gag-formed particles by passive diffusion, confers antibacterial activity to the particles.
6. mCherry encapsulated Gag particles enter lung carcinoma epithelial tissue A549 line mammalian cells after 4 hours of incubation. Only the particles purified from bacteria have cytotoxic effect on the cells.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

1. Lukša J., **Celitan E.**, Servienė E., Serva S. (2022). Association of ScV-LA virus with host protein metabolism determined by proteomics analysis and cognate RNA sequencing. *Viruses*, 14(11), 2345. doi: 10.3390/v14112345.
2. **Celitan, E.**, Stanevičienė, R., Servienė, E., Serva, S. (2024). Highly stable *Saccharomyces cerevisiae* L-BC capsids with versatile packing potential. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1456453. doi: 10.3389/fbioe.2024.1456453.

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

1. Krastinaite, I., **Celitan, E.**, Serva, S. (2022). Optimization of recombinant L-BC Gag protein synthesis in *S. cerevisiae*. *International Conference of Life Sciences, The COINS 2022, February 28–March 3, 2022: book of abstracts*, 34.
2. **Celitan., E.**, Serva, S. (2022). Synthesis and assembly of *Saccharomyces cerevisiae* L-BC virus-like particles. *FEBS3+ Conference of Estonian, Latvian and Lithuanian Biochemical Societies, Estonia, Tallin, June 15–17, 2022: abstract book*, 84–85.
3. Vaišaitė, K., **Celitan, E.**, Serva, S. (2023). Synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* L-BC virus-like particles in *Escherichia coli*. *International conference for students of physics and natural sciences, Open Readings 2023, April 18–21, 2023: the abstract book*, 307.
4. Vaišaitė, K., Serva, S., **Celitan, E.** (2023). Stability of *S. cerevisiae* L-BC virus-like particles purified from heterologous host. *International Conference of Life Sciences The COINS 2023, April 24–27, 2023, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, 133.
5. **Celitan, E.**; Stanevičienė, R.; Servienė, E.; Saulius, S. (2023). Yeast virus-like particles as a potential nanodelivery system. *International Conference of the Lithuanian Biochemical Society, „Biochemistry Targeting Diseases“, June 28–30, 2023, Taujenai, Lithuania: programme and abstract book*, 53.
6. **Celitan, E.**; Servienė, E.; Serva, S. (2023). Production and stability evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* L-BC virus-like particles. *10th Congress of European Microbiologists, FEMS 2023, July 9–13, 2023, Hamburg, Germany: abstract book*, 374.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Vardas Pavardė Enrika Celitan
El. paštas: enrika.celitan@gmc.vu.lt
Darbo adresas: Biochemijos ir molekulinės biologijos katedra,
Biomokslų institutas, Gyvybės mokslų centras,
Vilniaus Universitetas, Saulėtekio al. 7, LT-10257

IŠSILAVINIMAS:

2013–2017: Bioinžinerijos **bakalauro laipsnis** Fundamentinių mokslų fakultete, Vilniaus Gedimino Technikos Universitete

2017–2019: Nanobiotechnologijų **magistro laipsnis** Fundamentinių mokslų fakultete, Vilniaus Gedimino Technikos Universitete

2019–2023: Biochemijos **doktorantūros studijos** Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje, Biomokslų institute, Gyvybės mokslų centre, Vilniaus Universitete

PROFESINĖ PATIRTIS:

2016–2019: Laboratorijos asistentė, Chemijos ir bioinžinerijos katedra, VGTU

2020–2023: Jaunesnioji laborantė, Gyvybės mokslų centras, VU

2021: Specialistė projekte, VU

2022–2023: Projekto ekspertė, VU

2024–2025: Jaunesnioji asistentė, VU

2023–dabar: Laborantė, Gyvybės mokslų centras, VU

2023–dabar: Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Gyvybės mokslų centras, VU

2025–dabar: Lektorė, Gyvybės mokslų centras, VU

Su disertacija nesusijusios publikacijos:

1. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Sereikaitė, J. (2021). An optimization procedure for preparing aqueous CAR/HP-CD aggregate dispersions. *Molecules*, 26, 7562. doi: 10.3390/molecules26247562.
2. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Kavleiskaja, T., Sereikaitė, J. (2022). β -Carotene-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes coated with pectin. *Food Hydrocolloids*, 133, 107990. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107990.
3. **Celitan, E.**, Žilinskas, A., Sereikaitė, J. (2022). Screening of some vegetables for the biotransformation of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-diol diacetate. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 45–50. doi: 10.1080/17518253.2021.2018505.

Su disertacija nesusijusios konferencijos:

1. Sereikaitė, J., Gruškienė, R., **Celitan, E.**, Krivorotova, T. (2018). β -Carotene loaded three-component particles for food fortification. *Journal of biotechnology*, 280S, S55.

2. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Sereikaitė, J. (2018). β -Carotene loaded three-component particles: preparation and stability. *XVth International conference of the Lithuanian Biochemical Society, Dubingiai, June 26–29, 2018: the programme and abstract book*, 23–24.
3. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Krivorotova, T., Sereikaitė, J. (2019). Stability of water soluble β -carotene-loaded nanoparticles. *EuroFoodChem XX Conference, Portugal, June 17–19, 2019: Book of Abstracts*, 213.
4. Sereikaitė, J., **Celitan, E.**, Žilinskas, A. (2019). Vegetables as biocatalysts in the stereoselective biotransformation of racemic bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-diol diacetate. *Journal of biotechnology*, 305S, S84.
5. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Krivorotova, T., Sereikaitė, J. (2019). Antioxidant activity of β -carotene loaded three-component particles. *Baltic Polymer Symposium 2019, Vilnius, Lithuania, September 18–20, 2019: programme and proceedings*, 89.
6. Vaišaitė, K., **Celitan, E.**, Stanevičienė, R., Servienė, E., Serva, S. (2024). Stability and cargo encapsulation of L-A1 VLPs purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *International Conference of Life Sciences The COINS 2024, April 15–17, 2024, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, 39.
7. Plakytė, L., **Celitan, E.**, Serva, S. (2024). Synthesis and thermal stability of *Torulaspora delbureckii* TDV1 virus-like particles. *International Conference of Life Sciences The COINS 2024, April 15–17, 2024, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, 35.
8. Vaišaitė, K., **Celitan, E.**, Serva, S. (2024). Stability of L-A1 virus-like particles purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *International conference for students of physics and natural sciences, Open Readings 2024, April 23–26, 2024: the abstract book*, 389.
9. Plakytė, L., **Celitan, E.**, Serva, S. (2025). Disassembly of TDV1 virus-like particles. *International Conference of Life Sciences The COINS 2025, March 17–20, 2025, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, E16.

Grantai:

Trumpalaikių tyrimų sveikatos ir švietimo bei ugdymo srityse projektas “Sistema virusų sklaidos kontrolei ir ekstremalių situacijų valdymui COVID-19 epidemijos sąlygomis”. Nr. S-DNR-20-2. Projekto specialistė.

Lietuvos mokslų tarybos projektas „Palengvintos bioaktyvių junginių pernašos sistema universaliam biomedicininiam pritaikymui”. Nr. S-MIP-23-28. Jaunesnioji mokslo darbuotoja.

Vadovavimas studentams:

Indrė Krastinaitytė, Genetikos bakalauras (2022); Kamilė Vaišaitė, Biochemijos bakalauras (2024); Laura Plakytė, Molekulinės biologijos bakalauras (2024); Rugilė Sirvydytė, Molekulinės biologijos bakalauras (2024).

CURRICULUM VITAE

Name Surname Enrika Celitan
Email address: enrika.celitan@gmc.vu.lt
Work address: Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Institute of Biosciences, Life Sciences Center,
Vilnius University, Sauletekio av. 7, LT-10257

EDUCATION:

2013-2017: **Bachelor's degree** in Bioengineering, Faculty of Fundamental Sciences, Vilnius Gediminas Technical University

2017-2019: **Master's degree** in Nanobiotechnology, Faculty of Fundamental Sciences, Vilnius Gediminas Technical University

2019-2023: **Doctoral studies** in Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Biosciences, Life Sciences Center, Vilnius University

PROFESSIONAL EXPERIENCE:

2016-2019: Laboratory assistant, Department of Chemistry and Bioengineering, VGTU

2020-2023: Junior laboratory technician, Life Sciences Center, VU

2021: Project specialist, VU

2022-2023: Project expert, VU

2024-2025: Junior assistant, VU

2023–to date: Laboratory technician, Life Sciences Center, VU

2023–to date: Junior researcher, Life Sciences Center, VU

2025–to day: Lector, Life Sciences Center, VU

Publications unrelated to the dissertation:

1. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Sereikaitė, J. (2021). An Optimization procedure for preparing aqueous CAR/HP-CD aggregate dispersions. *Molecules*, 26, 7562. doi: 10.3390/molecules26247562.
2. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Kavleiskaja, T., Sereikaitė, J. (2022). β -Carotene-2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexes coated with pectin. *Food Hydrocolloids*, 133, 107990. doi: 10.1016/j.foodhyd.2022.107990.
3. **Celitan, E.**, Žilinskas, A., Sereikaitė, J. (2022). Screening of some vegetables for the biotransformation of bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-diol diacetate. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 45-50. doi: 10.1080/17518253.2021.2018505.

Conferences unrelated to the dissertation:

1. Sereikaitė, J., Gruškienė, R., **Celitan, E.**, Krivorotova, T. (2018). β -Carotene loaded three-component particles for food fortification. *Journal of biotechnology*, 280S, S55.

2. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Sereikaitė, J. (2018). β -Carotene loaded three-component particles: preparation and stability. *XVth International conference of the Lithuanian Biochemical Society, Dubingiai, June 26-29, 2018: the programme and abstract book*, 23–24.
3. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Krivorotova, T., Sereikaitė, J. (2019). Stability of water soluble β -carotene-loaded nanoparticles. *EuroFoodChem XX Conference, Portugal, June 17-19, 2019: Book of Abstracts*, 213.
4. Sereikaitė, J., **Celitan, E.**, Žilinskas, A. (2019). Vegetables as biocatalysts in the stereoselective biotransformation of racemic bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-diol diacetate. *Journal of biotechnology*, 305S, S84.
5. **Celitan, E.**, Gruškienė, R., Krivorotova, T., Sereikaitė, J. (2019). Antioxidant activity of β -carotene loaded three-component particles. *Baltic Polymer Symposium 2019, Vilnius, Lithuania, September 18-20, 2019: programme and proceedings*, 89.
6. Vaišaitė, K., **Celitan, E.**, Stanevičienė, R., Servienė, E., Serva, S. (2024). Stability and cargo encapsulation of L-A1 VLPs purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *International Conference of Life Sciences The COINS 2024, April 15-17, 2024, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, 39.
7. Plakytė, L., **Celitan, E.**, Serva, S. (2024). Synthesis and thermal stability of *Torulaspora delbureckii* TDV1 virus-like particles. *International Conference of Life Sciences The COINS 2024, April 15-17, 2024, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, 35.
8. Vaišaitė, K., **Celitan, E.**, Serva, S. (2024). Stability of L-A1 virus-like particles purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *International conference for students of physics and natural sciences, Open Readings 2024, April 23-26, 2024: the abstract book*, 389.
9. Plakytė, L., **Celitan, E.**, Serva, S. (2025). Disassembly of TDV1 virus-like particles. *International Conference of Life Sciences The COINS 2025, March 17-20, 2025, Vilnius, Lithuania: book of abstracts*, E16.

Grants:

Short-term research in health and education project “System for virus spread control and extreme situation management during COVID-19 epidemics”. Nr. S-DNR-20-2. Project specialist.

Research Council of Lithuania project “Facilitated delivery of bioactive compounds: versatile toolkit for biomedical applications“. No. S-MIP-23-28. Junior Researcher.

Supervision of students:

Indrė Krastinaitė, bachelor's degree in Genetics (2022); Kamilė Vaišaitė, bachelor's degree in Biochemistry (2024); Laura Plakytė, bachelor's degree in Molecular biology (2024); Rugilė Sirvydytė, bachelor's degree in Molecular biology (2024).

PADĖKA

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo vadovui prof. dr. Sauliui Servai už suteiktą galimybę atlikti mokslinius tyrimus, neįkainojamas įžvalgas, diskusijas ir visokeriopą pagalbą ruošiant disertaciją.

Dėkoju dr. Aleksandrui Konovalovui už vertingas idėjas bei pagalbą visų doktorantūros studijų metu. Esu dėkinga visam laboratorijos kolektyvui už šiltą bendravimą, naudingus patarimus ir motyvaciją. Didelis ačiū visoms mano buvusioms ir esamoms studentėms, kurios leido generuoti naujas idėjas ir skatino tobulėti.

Nuoširdi padėka kolegoms Tomui Liveikiui, Laimai Čepulytei ir Elvinai Valatkaitei – už nuoširdų bendravimą, gerą nuotaiką bei vertingus patarimus.

Taip pat reiškiu padėką visai Biochemijos ir molekulinės biologijos katedrai už draugišką atmosferą ir galimybę atlikti tyrimus.

Esu dėkinga dr. Justui Lazutkai už kantrybę ir profesionalumą mokant dirbti su transmisiniu elektroniniu mikroskopu bei suteiktą pagalbą iškilus klausimams. Dėkoju dr. Astai Zubrienei už suteiktą pagalbą atliekant terminio poslinkio tyrimą. Dėkoju Redai Pocevičiūtei už pagalbą naudojantis Zetasizer prietaisu.

Už prasmingą bendradarbiavimą dėkoju dr. Elenai Servienei ir visam GTC Genetikos laboratorijos kolektyvui.

Ačiū dr. Živilei Strazdaitei-Žielienei bei dr. Rasai Petraitytei-Burneikienei už jų patarimus ir įžvalgas, padėjusias tobulinti disertacijos turinį.

Galiausiai nuoširdžiai dėkoju savo draugams, sesei ir tėvams – jūsų palaikymas man buvo nepaprastai svarbus viso šio kelio metu. Iš visos širdies dėkoju savo sužadėtiniui Andriui už jo meilę, tikėjimą manimi ir nuolatinį skatinimą tobulėti.

Enrika



Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.