

JONAS RAFAEL SIQUEIRA RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE *VIRUS-LIKE PARTICLES* DE NoV
PRODUZIDAS EM PLANTAS



**Monografia apresentada ao Instituto
de Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como pré-requisito para a
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2020

**Trabalho realizado no Departamento de
Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo
de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora
Drª Tatiana Domitrovic**

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

RR484c Ribeiro, Jonas Rafael Siqueira
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE VIRUS-LIKE PARTICLES
DE Nudaurelia capensis Omega Virus PRODUZIDAS EM
PLANTAS / Jonas Rafael Siqueira Ribeiro. -- Rio de
Janeiro, 2020.
77 f.

Orientadora: Tatiana Domitrovic.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2020.

1. Virus-like particle. 2. Nudaurelia capensis
omega virus. 3. Expressão heteróloga. 4. Nicotiana
benthamiana. 5. Biotecnologia. I. Domitrovic,
Tatiana , orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: Jonas Rafael Siqueira Ribeiro
DRE: 116055462

BANCA EXAMINADORA: Prof^a Dr^a. Juliana Reis Cortines (Presidente)
 Prof^a Dr^a. Theo Luiz Ferraz de Souza
 Prof^a Dr^a. Mônica Santos de Freitas
 Prof^a Dr^a. Luciana Jesus da Costa (Suplente)

Titulo da Monografia: “CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE VIRUS-LIKE PARTICLES DE N_oV PRODUZIDAS EM PLANTAS”

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/skt-edms-rpa>
 Data e hora de início: 10 de dezembro de 2020 às 15:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, .10.... de ..dezembro..... de 2020.

NOTA	Banca Examinadora:
<u>10</u>	Prof ^a Dr ^a . Juliana Reis Cortines
<u>10</u>	Prof ^a Dr ^a . Theo Luiz Ferraz de Souza
<u>10</u>	Prof ^a Dr ^a . Mônica Santos de Freitas
<u>-</u>	Prof ^a Dr ^a . Luciana Jesus da Costa

Presidente da banca _____ *(Assinatura)* _____
 Prof^a Dr^a. Juliana Reis Cortines

Aluno: _____ *(Assinatura)* _____
 Jonas Rafael Siqueira Ribeiro

Orientador: _____ *(Assinatura)* _____
 Prof^a Dr^a. Tatiana Donatovic

**Coordenador
de TCC** _____ *(Assinatura)* _____
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

DEDICATÓRIA

A meus queridos pais Jane de Siqueira e Rafael Ribeiro, que sempre me apoiaram e deram suporte para minhas escolhas pessoais. Aos meus amados irmãos Natália Ribeiro e Jean Ribeiro, pelos momentos de alegria e diversão por todos esses anos. A minha namorada Dayanne Dias pelo conforto e carinho dos dias em que estivemos juntos. Ao meu primo João Vitor de Siqueira, por caminhar comigo nessa estrada da biologia, pela amizade sincera e companheirismo. Aos meus fieis amigos Júlio Martins, Helder Alves e Guilherme Martins, pelas confraternizações durante as vindas do Rio à São José dos Campos. Aos meus queridos amigos do laboratório, Andréia Santino e Matheus Cavalcante, que me ajudaram e me apoiaram durante os momentos difíceis. A minha orientadora Tatiana Domitrovic, pelos votos de confiança e por acreditar em mim. A todos que fizeram parte de alguma forma nessa minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento FAPERJ e CNPq pelo financiamento que permitiram a realização deste trabalho. Aos professores doutores Maite Vaslim, Eleonora Kurtenbach e Ronaldo Mohana pelo acesso as facilidades laboratorias que fizeram este trabalho possível. Aos doutores Roger Castells-Graells e George Lomossonoff pela colaboração durante a realização da pesquisa. A professora doutora Tatiana Domitrovic pelos conhecimentos compartilhados durante os 4 anos de realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARN – Ácido ribonucleico.

ADN – Ácido desoxirribonucleico.

VLPs – *Virus-like particles*.

AcMNPV – *Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus*.

RT-PCR – *Real-time Polymerase chain reaction*.

RPM – *Rotations per minute*.

pH – Potencial de Hidrogênio

kDa – *Kilo Daltons*.

α – Alfa.

β – Beta.

γ – Gama.

\AA – *Angstrons*.

ADN-T – Ácido desoxirribonucleico de Transferência.

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência.

N ω V – *Nudaurelia capensis Omega Virus*.

Sulfo B – Sulforrodamina B.

CMV – *Cauliflower Mosaic Virus*.

UTR – *Untranslated Region*.

RESUMO

JONAS RAFAEL SIQUEIRA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE VIRUS-LIKE PARTICLES DE NωV
PRODUZIDAS EM PLANTAS**

Orientadora: Tatiana Domitrovic

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

As partículas virais podem ser vistas como nanomáquinas altamente eficientes, capazes de encapsular o genoma, escapar do sistema imunológico, se anexar a células suscetíveis, e liberar o genoma e outros conteúdos da partícula no meio intracelular. Todos esses recursos podem ser aplicados à nanotecnologia, inspirando sistemas inovadores de entrega de ácido nucleico / drogas ou de apresentação de antígenos. Nós exploramos o uso de VLPs derivadas de um vírus de inseto não envelopado, *Nudaurelia capensis Omega Virus* (NωV), como nanopartícula capaz de carregar pequenas drogas. As VLPs de NωV contam com um peptídeo lítico capaz de penetrar eficientemente nas membranas celulares, evitando a via endocítica que muitas vezes dificulta a entrega de drogas ou genes. As VLPs de NωV apresentam as mesmas características biofísicas funcionais do vírion e são geradas por meio da expressão heteróloga da proteína do capsídeo em células de *Spodoptera frugiperda* usando um vetor de baculovírus. Recentemente, novos vetores de expressão em plantas permitem a produção de proteínas heterólogas com alto rendimento de forma simplificada e econômica, o que facilitaria uma futura aplicação de NωV como nanopartícula. O objetivo desse trabalho é produzir VLPs de NωV em *Nicotiana benthamiana* e caracterizar a sua maturação e atividade lítica. O gene da proteína de capsídeo de NωV foi克隆ado no vetor de expressão pEAQHT de *Nicotiana benthamiana* que combina um forte promotor para a produção do gene recombinante para a expressão da proteína p19 para supressão da resposta de ARN interferente da planta. Bactérias *Agrobacterium tumefaciens* foram transformadas com o vetor recombinante e utilizadas para agroinfiltração de folhas de *N. benthamiana*. Após 4 dias, as folhas agroinfiltradas foram colhidas, pesadas e trituradas em tampão de purificação. O extrato da folha filtrado foi ultracentrifugado contra gradiente contínuo de sacarose para isolamento das partículas. A análise do material por SDS-PAGE revelou uma banda pura de 70 kDa, o peso molecular esperado da proteína do capsídeo NωV. Além disso, as VLPs NωV derivadas de plantas mostraram maturação e propriedades líticas semelhantes às VLPs derivadas de insetos. Nosso trabalho confirmou a eficiência da expressão de NωV VLP em *N. benthamiana* usando o vetor pEAQHT e abre caminho para que outras partículas recombinantes de vírus eucarióticos sejam produzidas usando a mesma tecnologia.

Palavras-chave: Expressão heteróloga, *Virus-like particle*, *Nudaurelia capensis omega virus*, biotecnologia, expressão *in planta*, *Nicotiana benthamiana*.

ABSTRACT

JONAS RAFAEL SIQUEIRA RIBEIRO

**FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF N_ωV VIRUS-LIKE PARTICLES
PRODUCED IN PLANTS**

Orientadora: Tatiana Domitrovic

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Viral particles can be seen as highly efficient nanomachines, capable of encapsulating the genome, escaping the immune system, attaching themselves to susceptible cells, and releasing the genome and other particle contents into the intracellular medium. All of these resources can be applied to nanotechnology, inspiring innovative nucleic acid / drug delivery systems or antigen presentation. We explored the use of VLPs derived from a non-enveloped insect virus, *Nudaurelia capensis Omega Virus* (N_ωV), as a nanoparticle capable of carrying small drugs. N_ωV VLPs have a lytic peptide capable of efficiently penetrating cell membranes, avoiding the endocytic pathway that often hinders the delivery of drugs or genes. The N_ωV VLPs have the same functional biophysical characteristics as the virion and are generated by heterologous expression of the capsid protein in *Spodoptera frugiperda* cells using a baculovirus vector. Recently, new expression vectors in plants allow the production of heterologous proteins with high yield in a simplified and economical way, which would facilitate a future application of N_ωV as a nanoparticle. The aim of this work is to produce N_ωV VLPs in *Nicotiana benthamiana* and characterize their maturation and lytic activity. The N_ωV capsid protein gene was cloned into the *Nicotiana benthamiana* pEAQHT expression vector that combines a strong promoter for the production of the recombinant gene for the expression of the p19 protein to suppress the plant's interfering RNA response. *Agrobacterium tumefaciens* bacteria were transformed with the recombinant vector and used for agro-infiltration of *N. benthamiana* leaves. After 4 days, the agro-filtered leaves were harvested, weighed and crushed in purification buffer. The filtered leaf extract was µLtracentrifuged against a continuous sucrose gradient to isolate the particles. The analysis of the material by SDS-PAGE revealed a pure band of 70 kDa, the expected molecular weight of the N_ωV capsid protein. In addition, N_ωV plant-derived VLPs showed maturation and lytic properties similar to insect-derived VLPs. Our work confirmed the efficiency of N_ωV VLP expression in *N. benthamiana* using the vector pEAQHT and opens the way for other eukaryotic virus recombinant particles to be produced using the same technology.

Keywords: Heterologous expression, Virus-like particle, *Nudaurelia capensis omega virus*, biotechnology, expression in *planta*, *Nicotiana benthamiana*.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Nudaurelia capensis Omega Virus (NoV) e suas Virus-like particles</i>	1
1.2	<i>Virus-like particles</i> como biomaterias e suas aplicações biotecnológicas: carreamento de drogas e genes com interesse terapêutico, sondas fluorescentes e vacinas.	4
1.3	Sistema de expressão transiente pEAQHT em <i>Nicotiana benthamiana</i> para expressão de NoV.....	6
2	JUSTIFICATIVA.....	9
3	OBJETIVOS.....	10
4	MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1	Expressão transiente em planta utilizando sistema pEAQHT em <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404	11
4.3	Processo de purificação das <i>Virus-like particles</i>	13
4.4	Caracterização do estado de maturação das VLPs de NoV: Purificação da partícula	14
4.6	Ensaio de disruptão de membranas lipídicas: preparação dos lipossomas contendo corante fluorescente.....	15
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5.2	Visualização da proteína do capsídeo por eletroforese em gel e caracterização das propriedades funcionais da partícula	18
5.3	Visualização da maturação em pH 5	19
5.4	Análise da atividade lítica contra membranas das VLP de NoV produzidas em planta....	19
6	CONCLUSÕES.....	21
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
8	ANEXO 1	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Nudaurelia capensis Omega Virus (NoV) e suas Virus-like particles*

O *Nudaurelia capensis Omega Virus*, ou NoV, é um vírus pertencente à família *Alphatetraviridae* e gênero *Omegatetravirus* (Agrawal e Johnson, 1992). Os membros desse gênero são todos vírus não-envelopados que infectam insetos da ordem *Lepidoptera*, conhecidos popularmente como borboletas e mariposas. Os tetravírus têm um capsídeo icosaédrico de simetria T=4, de diâmetro entre 35 e 40 nm e possuem um genoma bipartido composto por duas moléculas de ácido ribonucleico (ARN) fita simples (fs) de senso positivo (+). O ARN1 expressa uma poliproteína, contendo proteínas não-estruturais e o ARN2 codifica para duas proteínas estruturais, a proteína alfa (α) e a p17, devido ao tamanho molecular 17 kDa (Agrawal e Johnson, 1992). A proteína α forma o capsídeo viral e a p17 possui papel no empacotamento do ARN para dentro do vírus (Zhou *et al*, 2008; Mendes *et al*, 2015).

NoV foi isolado pela primeira vez de uma lagarta da mariposa *Nudaurelia cytharea capensis*, natural da África do Sul, que sofria coinfecção com outros vírus da família *Alphatetraviridae* (Hendry *et al*, 1984). Inicialmente, o isolamento desse vírus foi motivado pela possibilidade de aplicá-lo no controle biológico de lagartas (Christian *et al*, 2005). Os primeiros estudos de caracterização eram feitos através dos vírus obtidos diretamente das lagartas infectadas, entretanto, os estudos de infecciosidade e patologia do vírus foram limitados pela ausência de uma linhagem de cultura de células susceptível e permissiva ao *virion* (virião) (Moore, 1991). Pouco se sabe a respeito do ciclo de infecção do vírus na natureza. Estudos da histopatologia com larvas infectadas com vírus da família *Alphatetraviridae* identificaram tropismo tecido-específico para o intestino-médio desses animais, já que esse foi o único tecido infectado (Grace e Mercer, 1965 *apud* Miller, 1998). A ingestão de alimentos contaminados com fezes contendo o vírus, supostamente causa a infecção de novos indivíduos. A penetração ocorre no intestino médio e novos vírus são liberados na parte final do intestino, junto às fezes, e assim o ciclo continua.

Amostras de *virions* purificados de lagarta foram utilizadas para obtenção dos primeiros modelos de estrutura cristalográfica de partículas de Tetravírus (Cavarelli *et al*, 1991). A estrutura do NoV foi determinada em 1996 com resolução de 2.8 Å e revelou um tipo de estrutura de capsídeo até então inédita, composta por 240 unidades da proteína do capsídeo arranjadas com quasi-simetria T=4 com 410 Å de diâmetro (Munshi *et al*, 1996). Além disso, a proteína do capsídeo alfa (70 kDa) se apresentava clivada no seu C-terminal, entre os aminoácidos N570 (Asparagina 570) e F571 (Fenilalanina 571) gerando uma proteína principal denominada beta (β), com 62 kDa, e o peptídeo gama (γ), com 8 kDa, localizado no interior da partícula (Figura 2A). Esse arranjo, sugeriu que os tetravírus sofrem um processo de maturação durante a montagem das partículas.

Os estudos estruturais impulsionaram o desenvolvimento de um sistema de produção de VLPs (*Virus-like particles* ou Partículas parecidas com vírus) de NoV. Foi desenvolvido um sistema de expressão em eucariotos utilizando células de inseto, onde a proteína do capsídeo pudesse sofrer as modificações pós-traducionais mais próximas às que ocorrem durante a infecção no hospedeiro original. O sistema de expressão por *baculovirus* foi empregado para esse propósito (Agrawal e Johnson, 1992; McKinney *et al*, 1994). Este

método baseia-se na construção de um baculovírus recombinante contendo a ORF (*Open Reading Frame* ou Quadro Aberto de Leitura) da proteína alfa de N_oV sob controle do promotor viral forte de Poliedrina (Figura 1). O processo de geração do baculovírus recombinante é feito em bactérias *E. coli* DH10bacTM portando um plasmídeo que contém o genoma de baculovírus (bacmid). O bacmid recombinante é gerado por recombinação homóloga entre um plasmídeo acessório (*pFastBac*TM), contendo o gene de interesse. O processo é seguido pela purificação do bacmid recombinante e transfecção em células de inseto *Sf21*. O produto da transfecção são baculovírus infecciosos contendo o gene heterólogo. Os baculovírus recombinantes são então utilizados para infectar novas células e produzir a proteína de interesse durante seu ciclo de replicação (Figura 1).

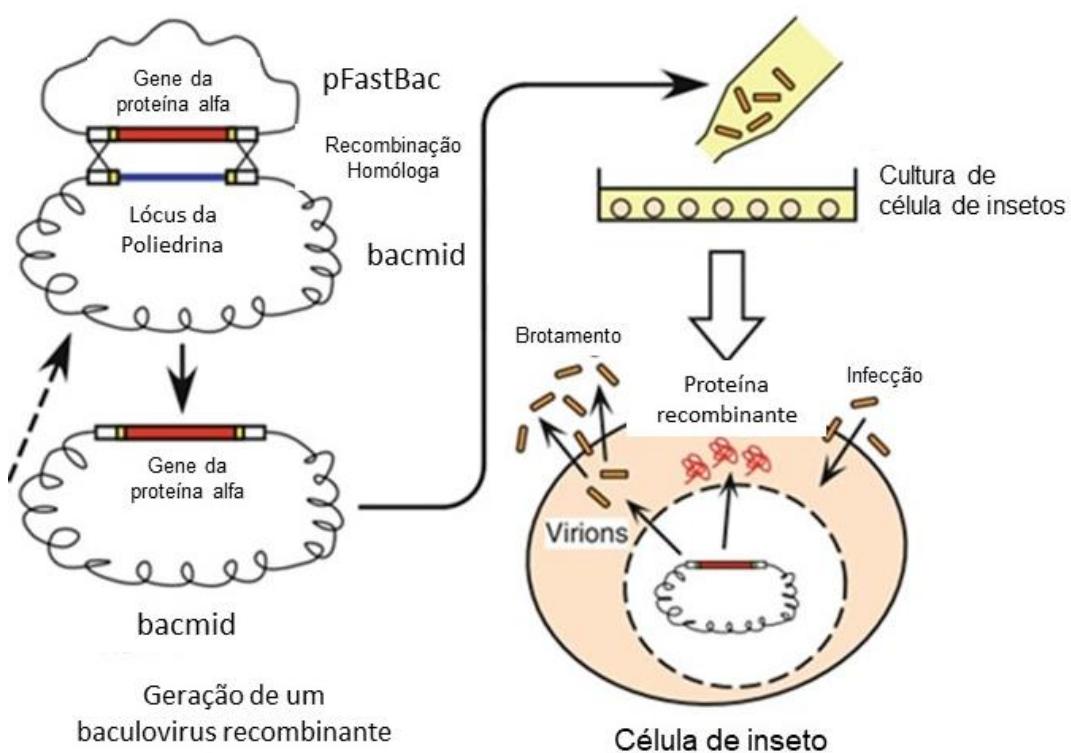


Figura 1- Sistema de expressão heterólogo em células de inseto através de baculovírus recombinante. O gene da proteína alfa de N_oV é inserido no plasmídeo *pFastBac*TM in vitro através de enzimas de restrição e ADN ligase. Após transformação de *E. coli* DH10BacTM, ocorre, recombinação homóloga entre o plasmídeo *pFastBac* e plasmídeo contendo clone infeccioso de baculovírus (bacmid), o que gera um *bacmid* contendo a proteína alfa recombinante sob o promotor viral de Poliedrina. Em seguida, é feita a purificação de *bacmid* e transfecção em cultura de células de inseto. Dentro das células, a expressão do *bacmid* dá origem a baculovírus infecciosos capazes de expressar a proteína do capsídeo de N_oV. (Adaptado de Yamagi, 2011).

As VLPs de N_oV são purificadas do sobrenadante das células de inseto, encapsulam ARN celular e mostraram ser estruturalmente idênticas ao *virion* (Munshi *et al*, 1996). Com as VLPs foi possível caracterizar o processo de maturação de N_oV, que se tornou um sistema modelo para o estudo de transições estruturais de vírus ARN não envelopados (Domitrovic *et al*, 2013).

Os estudos com VLPs mostraram que a partícula de N_oV purificada em tampão com pH = 7,6 está em um estado metaestável conhecido como pró-capsídeo (Figura 2). O pró-capsídeo é maior que o capsídeo maduro e mais poroso, com diâmetro de 480 Å. Esse estado pode ser explicado pela repulsão eletrostática entre as subunidades proteicas, já que os contatos entre as subunidades são enriquecidos em aminoácidos carregados negativamente. Uma vez que o pró-capsídeo é exposto ao pH ácido (< 5), ocorre a neutralização das cargas negativas entre as subunidades induzindo uma transição estrutural para um capsídeo mais compacto e facetado com diâmetro de 410 Å. A transição estrutural leva a ativação do sítio catalítico de cada subunidade, que sofre então uma autoclivagem entre os resíduos Asparagina 570 (N570) e Fenilalanina 571 (F571), resultando na proteína beta e o peptídeo gama, conforme foi observado inicialmente nas estruturas do vírion selvagem. (Canady *et al*, 2000). Após a clivagem de todas as proteínas alfa presentes no capsídeo, a partícula está completamente madura. A clivagem de 50% das subunidades ocorre em 30 minutos, mas a clivagem completa leva até 3 dias para ser concluída. Estudos posteriores mostraram que o peptídeo gama é capaz de perfurar membranas de lipossomos compostos de fosfolipídios. A atividade lítica de VLPs de N_oV é dependente da maturação da partícula e só ocorre em pH > 7. Esse fenômeno se deve, provavelmente a aumento da dinâmica molecular que leva a exposição do peptídeo facilitada pela repulsão entre as subunidades em pH acima de 7,6 (Figura 2B). A partícula fica em seu estado mais poroso por volta de pH 9,0 e o peptídeo gama, uma vez que foi clivado durante o processo de maturação, pode alcançar o meio exterior (Domitrovic *et al*, 2012).

A alta estabilidade das VLPs de N_oV, aliadas à sua capacidade lítica sugerem que essas partículas podem ter aplicação biotecnológica para o encapsulamento e entrega de drogas.

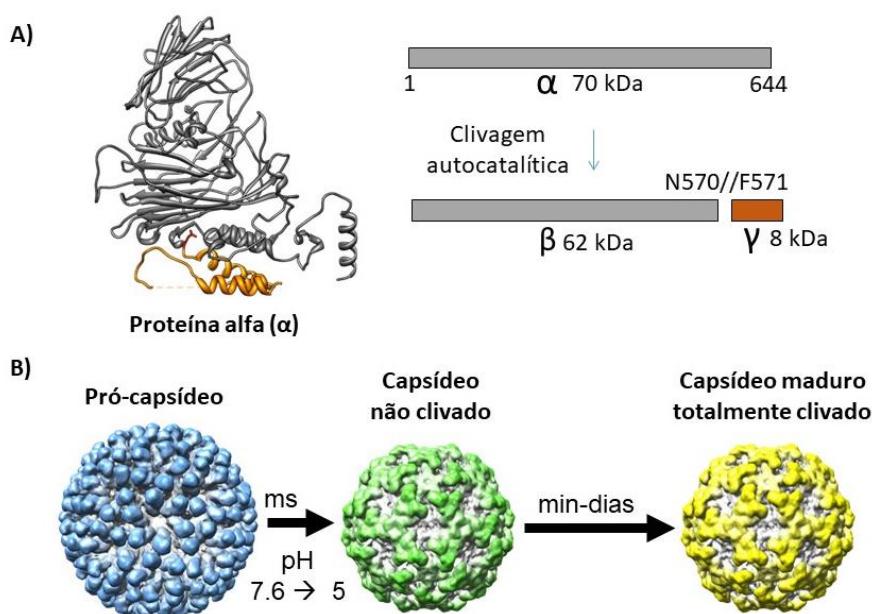


Figura 2 – Clivagem autocatalítica de N_oV e transição estrutural durante a maturação viral A) A estrutura tridimensional da proteína alfa (70 kDa) do capsídeo indicando o sítio de clivagem entre os aminoácidos N570 e F571. A autoclivagem gera a proteína beta (62 kDa) e o peptídeo gama (8 kDa). B) Transição estrutural do pró-capsídeo para capsídeo maduro induzida por pH ácido (< 5). No pró-capsídeo, que tem 480 Å de diâmetro, as subunidades estão mais afastadas uma das outras.

1.2 *Virus-like particles* como biomaterias e suas aplicações biotecnológicas: carreamento de drogas e genes com interesse terapêutico, sondas fluorescentes e vacinas.

As VLPs são complexos proteicos multiméricos compostos por proteínas estruturais virais que podem se montar espontaneamente quando expressas em sistemas recombinantes. Essas estruturas imitam a arquitetura estrutural dos vírus, mas não encapsulam o genoma viral completo já que essa molécula não está disponível no sistema de clonagem, sendo, portanto, não infectivas (Mohsen *et al.*, 2017). Entretanto, elas podem empacotar outras moléculas de ARN das células onde foram expressas como ARN mensageiro (*mRNA*), ARN micro (*miRNA*) e ARN interferente pequeno (*siRNA*), podendo internalizá-los durante a montagem ou por mecanismos próprios de empacotamento (Legendre e Fastrez, 2005; Mendes *et al.*, 2015). O capsídeo protege bem seu conteúdo interno do ambiente externo e, devido à sua biocompatibilidade e função evolutiva, passa facilmente por barreiras fisiológicas levando o seu conteúdo interno para dentro das células por meio da penetração de membranas celulares. Essas características acrescidas de estratégias de modificação, tais como edição gênica e ancoragem molecular por conjugação no capsídeo, facilitam o encapsulamento de pequenos fármacos, empacotamento de genes e podem até direcionar o reconhecimento do capsídeo para células específicas de um organismo, fazendo das VLPs ferramentas biotecnológicas promissoras (Chung, Cai e Steinmetz, 2020; Koudelka *et al.*, 2015).

O capsídeo proteico tem papel fundamental na aplicação biotecnológica das *Virus-like particles*. Muitos capsídeos são montados a partir de múltiplas proteínas idênticas produzidas por um único gene. Isso torna o uso de capsídeos virais uma possibilidade atraente para produção de vacinas e partículas carreadoras de genes e fármacos. Proteínas são biocompatíveis e biodegradáveis, isso significa baixa toxicidade e rejeição pelo organismo do hospedeiro. Enquanto que nanopartículas sintéticas podem causar efeitos colaterais diversos dependendo de suas propriedades químicas e formatos espaciais, principalmente se tratando de metais e polímeros (Li *et al.*, 2012).

VLPs derivadas de partículas não-envelopadas, como é o caso do N_oV, têm resistência e estabilidade maior no ambiente, comparada às partículas envelopadas, e reduzem consideravelmente a degradação química e física do conteúdo interno. Essa propriedade auxilia a passagem das nanopartículas pelo corpo até o sítio específico onde o conteúdo interno deve chegar, intacto ou com o mínimo de perdas possíveis, possibilitando a sua utilização em *drug delivery* (carreamento de drogas). O transporte de pequenos fármacos, encapsulados ou ancorados à superfície da VLP, diminui a concentração do medicamento e os efeitos colaterais, tendo em vista à concentração desses fármacos em relação às doses tomadas por um indivíduo em tratamento. As VLPs podem ser utilizadas em *imaging probes* (sodas para imageamento), através da associação com moléculas bioluminescentes, como por exemplo a *GFP* (*Green Fluorescent Protein* ou Proteína Verde Fluorescente), para visualização médica *in vivo* através de sondas fluorescentes sem a necessidade de procedimentos invasivos (Chung, Cai e Steinmetz, 2020; Koudelka *et al.*, 2015). Por fim, *Virus-like particles* são utilizadas para o desenvolvimento de vacinas, utilizando a própria VLP como antígeno ou utilizando-a para entrega de genes ou outros imunogênicos, já que devido ao seu tamanho nanométrico e forma icosaédrica, podem ser capturadas facilmente por células apresentadoras de antígeno, tais como células dendríticas e fagócitos, apresentando-as às células T, iniciando o processo imunogênico. O ARN e ADN encontrados no interior da partícula também podem ser identificados por *Toll-*

like receptors (Receptores do tipo Toll) em células apresentadoras de antígeno e podem ativar resposta imune adaptativa através da indução de citosinas (Karin, Fiering e Steinmetz, 2016).

A vacina recombinante do vírus da Hepatite B (HBV) foi desenvolvida por volta de 1980, aprovada pelo *Food and Drugs Administration* (FDA, ou Administração de Alimentos e Medicamentos) dos Estados Unidos da América em 1986 e ainda é utilizada no mundo todo. A primeira vacina comercial baseada em VLP, aumentou a capacidade de imunogenizar pessoas antes desprotegidas, auxiliando diversas regiões com alta incidência de casos de Hepatite B (Roldão *et al.*, 2010; Mohsen *et al.*, 2017).

Outra vacina, dessa vez contra o *Human Papillomavirus* (Papilomavírus Humano), também é produzida através da expressão heteróloga das proteínas L1 ou L2 do capsídeo do HPV. Disponível pelo FDA desde 2006, as proteínas L1 e L2 heterólogas sofrem automontagem e se estruturam em uma VLP, não infecciosa, mas altamente imunogênica, com proteção de longa duração (Wang e Roden, 2013). Sendo o HPV o vírus responsável por cerca de 5% de todo os casos de câncer em seres humanos e principal causador de câncer cervical e de orofaringe (CDC U.S.A, 2020), é importante que haja uma vacina eficiente contra os vários tipos de HPV e de baixo risco aos vacinados. A expectativa para os próximos anos é de queda dos casos de câncer relacionados ao HPV para crianças de 6 a 15 anos, como observado na Inglaterra que zerou o número de casos (*Public Health England*, 2020), devido a vacinação em alta escala das crianças nesta faixa etária.

Dentre as possibilidades descritas acima, os capsídeos de bacteriófagos, vírus animais e vírus de plantas já demonstraram ser capazes de carrear pequenos fármacos e genes para o interior das células hospedeiras. Assim, esse estudo foca em viabilizar a utilização de uma nova *Virus-like particle* como forma de melhorar o direcionamento de fármaco e reduzir os efeitos colaterais de terapias quimioterápicas (Roldão *et al.*, 2011).

Entre essas VLPs, destacam-se os vírus de planta como o *Cowpea Mosaic Virus* (CPMV ou Vírus do Mosaico do Feijão-de-Corda). O CPMV é um vírus icosaédrico não-envelopado de 30 nm de diâmetro, de genoma de ARNfs +, é formado por 120 cópias de duas proteínas do seu capsídeo. (Lizotte *et al.*, 2016). Sua VLP é formada através de agroinfiltração de *Nicotiana benthamiana* via *Agrobacterium tumefaciens* recombinante. Sua aplicação como nanopartícula se deve à utilização da VLP em vacinações contra alguns tipos de câncer e pela ligação de pequenos fármacos como a Doxorrubicina, uma droga antitumoral na superfície do capsídeo em *drug delivery*. (Aljabali *et al.*, 2013; Lizotte *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2019). O *Cowpea Chlorotic Mottle Virus* (CCMV ou Vírus da Mancha Clorótica do Feijão-de-Corda), outro exemplo de vírus de planta, tem simetria T=3 e é não-envelopado de genoma ARNfs +. Suas VLPs são geradas em sistema heterólogo de bactéria ou planta (Yazdani *et al.*, 2019; Villagrana-Escareño *et al.*, 2019). A VLP do CCMV foi capaz de se ligar, através de modificações nas suas subunidades, em doxorrubicina, em ácido fólico, um constituinte do glicocálix, e moléculas fluorescentes utilizadas em mecanismos de visualização *in vivo*. (Barwal *et al.*, 2016). Outra VLP bastante utilizada é a derivada do bacteriófago M13, um vírus filamentoso de 65 Å formado por 2700 cópias da proteína P8 de genoma ADNfs + circular, normalmente expresso em células de *Escherichia coli* (Warner *et al.*, 2013). A grande área de superfície do vírus permite a ligação e ancoragem de polímeros para direcionamento sítio-específico e encapsulamento de drogas (Li *et al.*, 2009). Isso é possível, através do alongamento das proteínas na superfície da partícula, adicionando sequências específicas de amino ácidos em

seu C-terminal, podendo aumentar a solubilidade do M13 para facilitar a adição de moléculas solúveis como a biotina, uma proteína fluorescente (Pande, Szewczyk e Grover, 2010 *apud* Karimi *et al*, 2016).

Uma das questões que limitam a utilização de VLPs é o seu mecanismo de captação pelas células alvo. Quando em contato com células de animais, VLPs são captadas por endocitose. Vírus derivados de plantas e bactérias são desprovidos de mecanismos intrínsecos capazes de lisar as membranas das vesículas endocíticas, já que esse não é seu mecanismo natural de penetração. Como consequência, as partículas e seu conteúdo são degradados com prejuízo à sua atividade carreadora (Rohovie, Nagasawa e Swartz, 2016).

Nesse contexto, a atividade lítica do peptídeo gama de N_oV (Domitrovic *et al*, 2012) poderia proporcionar a entrada ativa da partícula pela membrana plasmática ou o escape das vesículas endocíticas. De fato, já foi demonstrado que o peptídeo gama de N_oV proporciona a entrada de moléculas de *Quantum dots* (Pontos quânticos) de forma independente de endocitose (Safi *et al*, 2017).

Como visto anteriormente, VLPs podem ser produzidas em quase todos os sistemas expressão, desde bactérias, passando por leveduras, plantas e animais. Esses sistemas variam em custo e dificuldade de manejo. A expressão heteróloga das VLPs de N_oV é feita de forma eficiente em cultura de células de inseto através de vetores de baculovírus (Agrawal e Johnson, 1992, Domitrovic, Matsui e Johnson, 2012). Porém, visando uma possível aplicação tecnológica dessas partículas, seria interessante desenvolver um sistema de expressão mais simples e economicamente viável.

1.3 Sistema de expressão transiente pEAQHT em *Nicotiana benthamiana* para expressão de N_oV

O sistema de expressão de proteínas heterólogas em plantas foi desenvolvido como alternativa para a expressão em células animais. Em termos de custo e manutenção, as plantas são mais vantajosas e atrativas tanto para abordagens industriais quanto para acadêmicas (Sainsbury e Lomonossoff, 2008). Plantas produzem altos níveis de biomassa através de seu metabolismo autotrófico pelo uso de materiais baratos e fáceis de obter, como terra e água. Além disso, exigem pouco cuidado e manutenção se comparado a cultivo celulares e modelos vivos animais, baixando o custo final para expressão de proteínas. (Ma, Drake e Christou, 2003). As plantas *Nicotiana spp.* são historicamente utilizadas como modelo para sistemas de expressão por que são de fácil cultivo e adquirem elevados índices de biomassa em pouco tempo, também se permitem a transferência e expressão de transgenes por agroinfiltração em larga escala (Ghag *et al*, 2016; Ma, Drake e Christou, 2003; Saberianfar *et al*, 2015).

Expressão em cél. inseto (Baculovírus)	VS	Expressão transiente em Plantas (Plasmídeo)
<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de produção – longo; • Capacidade de produção – médio; • Custo Geral – alto; • Risco de contaminação – vírus, príons e DNA oncogênico para humanos; • Qualidade – muito alta; • Glicosilação – próxima à célula de inseto; 		<ul style="list-style-type: none"> • Tempo de produção – longo; • Capacidade de produção – alta • Custo Geral – baixo; • Risco de contaminação – muito baixo. Não patogênico para humanos; • Qualidade – alta; • Glicosilação – pouco glicosilado;

Figura 3 – Tabela de comparação entre os sistemas de produção de VLPs de NwV – À esquerda, tabela listando vantagens e desvantagens do sistema de expressão em células de inseto, utilizando o vetor de baculovírus recombinante. À direita, tabela com as vantagens e desvantagens utilizando expressão transiente em *N. benthamiana* utilizando o plasmídeo pEAQ-HT.

Para a expressão heteróloga em plantas, é possível utilizar bactérias com capacidade de transferência de genes como por exemplo a *Agrobacterium tumefaciens*. As *Agrobacterium spp.* são capazes de introduzir um fragmento de ADN no núcleo de plantas monocotiledôneas. Essas bactérias possuem o plasmídeo Ti que contém um fragmento conhecido como ADN-T (Ácido Desoxirribonucleico de Transferência) contendo genes de virulência. A bactéria produz várias cópias desse fragmento que são transferidos para o núcleo das células das plantas. Após a incorporação do ADN-T em seu genoma as células de planta são capazes de expressar moléculas que beneficiem o crescimento da bactéria e do hospedeiro (Leite e Carneiro, 2013). Entretanto, há algumas desvantagens na utilização de cepas selvagem de *A. tumefaciens* em biotecnologia, pois esses organismos têm genes para indução de tumores durante a infecção. Assim, nas cepas utilizadas para aplicação biotecnológica, esses genes são silenciados ou nocauteados. O ADN-T em *A. tumefaciens* do sistema pEAQ-HT também foi modificado para facilitar a introdução de sequência de interesse e incorporado em plasmídeos binários que possibilitam a transformação e replicação do plasmídeo em *E. coli* e *A. tumefaciens* (Kapila *et al*, 1996). Parte do ADN-T modificado não se integra no genoma da planta, continua presente durante algum tempo no núcleo e pode ser rapidamente transcrito e traduzido, esse tipo de expressão é chamada expressão transiente. Comparada com a expressão estável que necessitaria da integração do ADN-T ao genoma para depois começar a transcrição e tradução, a transiente torna-se vantajosa quando se trata de rapidez e eficiência (Kapila *et al*, 1996).

No entanto, a expressão do gene heterólogos em plantas frequentemente apresenta baixos rendimentos. Isso acontece por que a expressão do gene exógeno é rapidamente suprimida pelos mecanismos de silenciamento gênico de plantas, que levam à degradação ADN exógenos e evitam a replicação de patógenos virais. Assim, para maximizar o rendimento da expressão de genes recombinantes foi desenvolvido um vetor ADN-T com sequências regulatórias da expressão baseada em vírus de plantas (Sainsbury, Thuenemann e Lomonossoff, 2009). O vetor chamado pEAQHT consiste de um plasmídeo que contém o promotor 35s do *Cauliflower Mosaic Virus*, a porção não-codificante 5'UTR (*Untranslated Region* ou Região

não-traduzida) do ARN2 do *Cowpea Mosaic Virus* (CMV) com uma mutação HT (*Hypertranslatable* ou Hiper-traduzida) que apresenta melhora das taxas de expressão e por fim a porção 3'UTR do ARN2 do CMV. Outras porções do plasmídeo também contém a região da origem de replicação, o ADN-T, um gene de resistência a Canamicina e também a proteína p19, que ajuda na supressão do silenciamento gênico inerente à proteção das plantas contra a replicação de agentes virais (Sainsbury, Thuenemann e Lomonossoff, 2009).

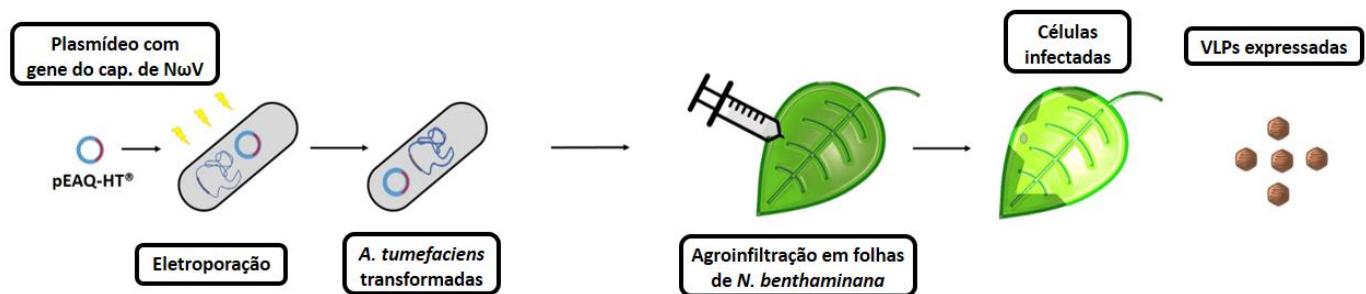


Figura 4 – Esquema da plataforma de expressão heteróloga em planta utilizando o plasmídeo pEAQ-HT – O gene da proteína alfa de NwV é inserido no plasmídeo *pEAQ-HT* *in vitro* através de enzimas de restrição e ADN ligase. Após transformação da *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo *pEAQ-HT* recombinante, é realizada a agroinfiltração em folhas jovens de plantas *Nicotiana benthamiana*. 3 a 7 dias depois da agroinfiltração, as folhas agroinfiltradas podem ser colhidas e purificadas para obtenção das VLPs.

2 JUSTIFICATIVA

Após anos de pesquisa e desenvolvimento no estudo da virologia, fomos capazes de entender parte dos mecanismos básicos das infecções por vírus, a estrutura física e o processo de montagem de diferentes partículas virais. Esses conhecimentos permitem-nos desenvolver novas abordagens baseadas em partículas virais para o avanço da biotecnologia e nanomedicina. Assim, os vírus podem ser utilizados para nosso benefício, melhorando as atuais terapias médicas, aumentando a efetividade e reduzindo os efeitos colaterais de medicamentos e terapias (Yildiz, Shukla e Steinmetz, 2011).

A maioria dos vírus têm características de nanocarreadores, pois a partícula precisa levar o material genético carreado pelo capsídeo para dentro das células dos hospedeiros. Os milhões de anos de evolução lapidaram as partículas virais como nanomáquinas capazes de se automontar, penetrar membranas plasmáticas, liberar seu material genético e gerar novas partículas. Essas características fazem dos vírus, partículas promissoras para o carreamento de fármacos. Diferente das VLPs derivadas de bacteriófago ou planta, VLPs de N_oV possuem um sistema intrínseco de interação e penetração de membranas que pode levar a captação das partículas de forma independente da via endocítica.

A utilização de linhagens celulares para expressão de proteínas heterólogas ainda é um processo dispendioso e laborioso. É necessário cuidado em relação à passagem das células, além de gastos com meios de cultura, estufas para manutenção da temperatura e uso de antibióticos para evitar contaminações. A utilização de um modelo vivo facilita o trabalho, tendo em vista que se diminui os gastos com a maioria dos equipamentos e dispensa a constante manutenção das células. O uso de plantas como modelo vivo para expressão heteróloga resolve a grande maioria dos dilemas anteriores e é menos dispendioso. (Kapila *et al*, 1996).

3 OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Estabelecer o modelo de expressão heteróloga da proteína do capsídeo de *Nudaurelia capensis Omega Virus* do sistema de expressão pEAQ através de agroinfiltração por *Agrobacterium tumefaciens* em plantas *Nicotiana benthamiana*.
- Caracterizar a cinética de maturação, bem como avaliar a atividade lítica das VLPs produzidas em planta em comparação com as VLPs produzidas em células de inseto *Spodoptera frugiperda*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Expressão transiente em planta utilizando sistema pEAQHT em *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

A etapa de agroinfiltração é lenta e procedural. A primeira parte baseia-se no cultivo da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contendo o plasmídeo pEAQ-HT, através do flanqueamento pelos sítios de restrição AgeI e XhoI, onde o gene da proteína do capsídeo de N_oV se encontra inserida (Sainsbury *et al*, 2008). Além de uma sequência de consenso Kozak (TAACA) no início da sequência de codificação para produzir VLPs de N_oV-pEAQ-HT otimizados para expressão em *Nicotiana benthamiana* (Castells-Graells, 2019). O vetor recombinante pEAQHT contendo o gene da proteína alfa de N_oV foi introduzido na cepa LBA4404 da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* através de eletroporação e foram mantidas em estoque concentradas em 10 µg/mL (Figura 5), congeladas à -80 °C (Thuenemann *et al*, 2013). As colônias foram selecionadas através de cultura em placa com o meio de cultura rico *Luria Bertani* (LB) com os antibióticos Canamicina e Rifampicina (50 µg/mL). Em seguida, fizemos o pré-inóculo em 10 mL de meio de cultura LB líquido com adição de 10 µL de Canamicina e 10 µL de Rifampicina ambas à 50 µg/mL, por fim, adicionamos 100 µL de *A. tumefaciens* transformada e selecionada do pré-inóculo, anteriormente congelado. A cultura ficou na incubadora agitadora de um dia para o outro, a 28 °C em 180 rotações por minuto (rpm). No dia seguinte, são preparados dois *Erlenmeyers* com 200 mL de meio LB líquido, com 200 µL de Canamicina, 200 µL de Rifampicina e 200 µL de *A. tumefaciens* da cultura que cresceu durante a noite. Os *Erlenmeyers* foram mantidos na estufa de 1 a 2 dias, a 28 °C, 180 rpm até que uma das culturas atingisse OD_{600nm} maior ou igual a 2. Distribuímos, então, o volume do *Erlenmeyer* selecionado em Tubos *Falcon*, e centrifugamos a 4.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente, foi feito o descarte do sobrenadante e resuspenderemos o precipitado em tampão MMA ((10mM MES (2-[N -morpholino]ethanesulfonic acid) pH 5,6 e 100µM Acetoseringona (3'5'-dimethoxy-4' hydroxyacetophenone)), para agroinfiltração, de forma que a densidade óptica final fique igual a 0,4. Por fim, adicionamos 100uM de Acetoseringona para induzir a virulência de *A. tumefaciens* e deixamos a solução em repouso por volta de 0,5 a 3 horas em temperatura ambiente (Saxena *et al*, 2016).

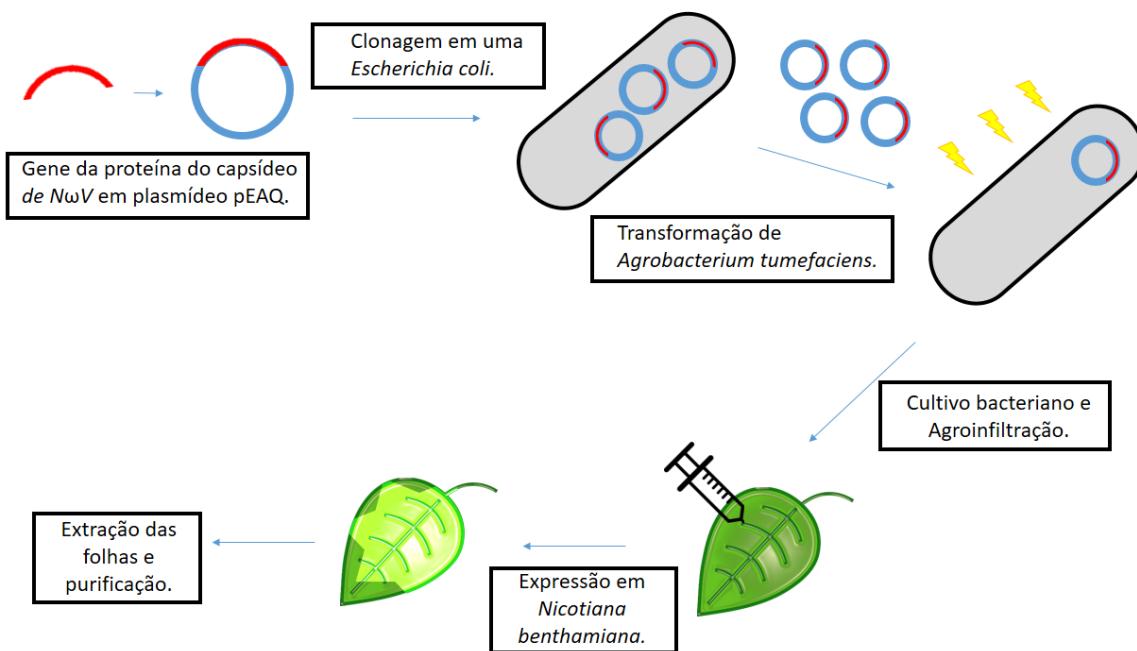


Figura 5 – Esquema geral da plataforma de expressão heteróloga em planta utilizando o plasmídeo pEAQ-HT – O gene da proteína alfa de NwV é inserido no plasmídeo *pEAQ-HT* *in vitro* através de enzimas de restrição e ADN ligase. Após transformação da *Agrobacterium tumefaciens* com o plasmídeo *pEAQ-HT* recombinante, é realizada a agroinfiltração em folhas jovens de plantas *Nicotiana benthamiana*. 3 a 7 dias depois da agroinfiltração, as folhas agroinfiltradas podem ser colhidas e purificadas para obtenção das VLPs.

4.2 Cultivo de *Nicotiana benthamiana*

As plantas da espécie *Nicotiana benthamiana* foram cultivadas em uma casa de vegetação com temperatura regulada para 26°C, com exposição à luz natural, por um período de 4 a 6 semanas, tempo no qual as plantas adquirem massa e tamanho suficiente para serem agroinfiltradas. O cultivo começa com vasos semeadeiras, onde são semeadas por toda a superfície do vaso contendo terra e vermiculita, um tipo de mineral que auxilia a aeração e permeabilidade do solo, em uma fração de 3 de terra para 1 de vermiculita. As mudas foram regadas 3 vezes por semana, da germinação até o nascimento da primeira folha verdadeira em cada planta (Figura 1), fase em que a muda já tem raízes fortes o suficiente para ser retirada da semeadeira, por volta da terceira semana. Nesse momento, as mudas são transplantadas para outro vaso, sendo removidas pela raiz com delicadeza e transferidas para um pequeno buraco feito na terra de um novo vaso. A terra é então acomodada em torno da raiz da muda para que o local fique compacto e bem firme, outra muda também é transplantada ao seu lado, separadas por cerca de 4 centímetros e, por fim, são regadas. Esse procedimento é repetido para todos os vasos, acomodando 2 plantas em cada.

Cada vaso foi regado 3 vezes por semana durante 3 semanas até que as folhas tivessem uma superfície grande o suficiente para a agroinfiltração e antes das plantas emitirem os botões florais. Geralmente, as plantas *N. benthamiana* iniciavam o florescimento durante a sexta semana, fato evidenciado pelo aparecimento do botão floral (Figura 6). O florescimento foi evitado a todo custo, pois as plantas aumentam consideravelmente sua resistência contra patógenos através dos ARNs interferentes, o que dificulta a replicação de genomas baseados em ARN, por silenciamento gênico (Ádám *et al*, 2018). Estando as plantas com tamanho suficiente e ainda sem sinais de florescimento, começam-se os preparos para a agroinfiltração.



Figura 6 – Esquema procedural de plantação e agroinfiltração de plantas adultas da espécie *Nicotiana benthamiana* – A) Botões florais aparecendo, por volta da 7 semana de vida. B) Plantas adultas com folhas grandes o suficiente para agroinfiltração. C) Folha jovem com marcas de agroinfiltração.

Para aumentar a eficiência da agroinfiltração da proteína heteróloga, o procedimento é feito no início ou no final do dia, quando os estômatos estão mais abertos. Fizemos as agroinfiltrações no final da tarde, por volta das 18h. A infiltração de folhas de *N. benthamiana* foi feita através de pequenos furos, através de agulha de seringa, nas 3 folhas mais jovens de cada planta. Cada folha recebeu cerca de 2 mL de tampão MMA contendo a agrobactéria e a aplicação foi feita utilizando uma seringa, de insulina (1 mL), sem agulha com o auxílio do dedo, como um suporte na base da folha. Esses passos foram repetidos até que o espaço intracelular de cada folha fosse completamente preenchido. Após 3 a 7 dias as folhas agroinfiltradas foram coletadas utilizando uma tesoura, em seguida, foram pesadas, separadas de 10 em 10 gramas e congeladas em -80 °C.

4.3 Processo de purificação das *Virus-like particles*

As folhas, sejam elas congeladas ou frescas, foram trituradas através do uso de um liquidificador. Para ajudar nesse processo, utilizamos tampão Tris pH 7,6 50 mM (HCl – 250 mM NaCl) gelado, para preservar o capsídeo proteico. Utilizando 80 mL de Tris pH 7,6 trituramos as folhas em pulsos de 10 segundos, para não aumentar demais a temperatura, ao final do processo filtramos os resíduos grandes utilizando um tecido *voil* superfino ou gaze de algodão dobrado em 3 – 4 camadas. Em seguida, adicionamos NP40 0,1% para auxiliar a separação das partículas recombinantes de membranas lipídicas, depois, fizemos a primeira centrifugação em tubos 22a2 a 10,000 rpm por 15 minutos, 4 °C (40 mL cada). Coletamos o sobrenadante e, posteriormente, filtramos o líquido através de um filtro a vácuo com membrana de poros com 0,45 um de diâmetro.

Para a ultracentrifugação do filtrado, utilizamos 10 mL de colchão 30% de sacarose no fundo do tubo com a ajuda de uma cânula, logo depois, foram ultracentrifugados 40 mL do filtrado em tubos 45ti a 32,000 rpm, a 10 °C durante 3h30. No final, retiramos o sobrenadante e deixamos o *pellet* em suspensão, durante a noite, com 400 µL de tampão Tris pH 7,6. No dia seguinte, ressuspendemos o tampão com o volume deixado anteriormente e, depois, adicionamos o volume em um tubo de microcentrífuga e centrifugamos a 5,000 rpm, 10 °C durante 15 minutos para separar dos agregados insolúveis. Agora, preparamos as amostras para

serem ultracentrifugadas em um gradiente contínuo de sacarose. Recolhemos o sobrenadante e o adicionamos no topo de um tubo de ultracentrifugação contendo um gradiente de sacarose de 10 a 40%. A ultracentrifugação foi feita SW40 a 40,000 rpm, 10 °C por 1h30. Para o gradiente de sacarose 10 e 40%, preparamos 50mM Tris, 250mM NaCl, 5mM NaN₃ em pH 7,6. Utilizando um tubo SW40, metade do conteúdo foi preenchido com a solução de sacarose 40%, seguido de adição da solução de 10% de sacarose no fundo do tubo, utilizando uma cânula. O gradiente contínuo foi feito utilizando uma Biocomp Gradient Master™ com configuração personalizada com os seguintes padrões: Tubo SW40, cap em short (curto), soluto em sucrose (sacarose), e gradiente em 10-40% wv.

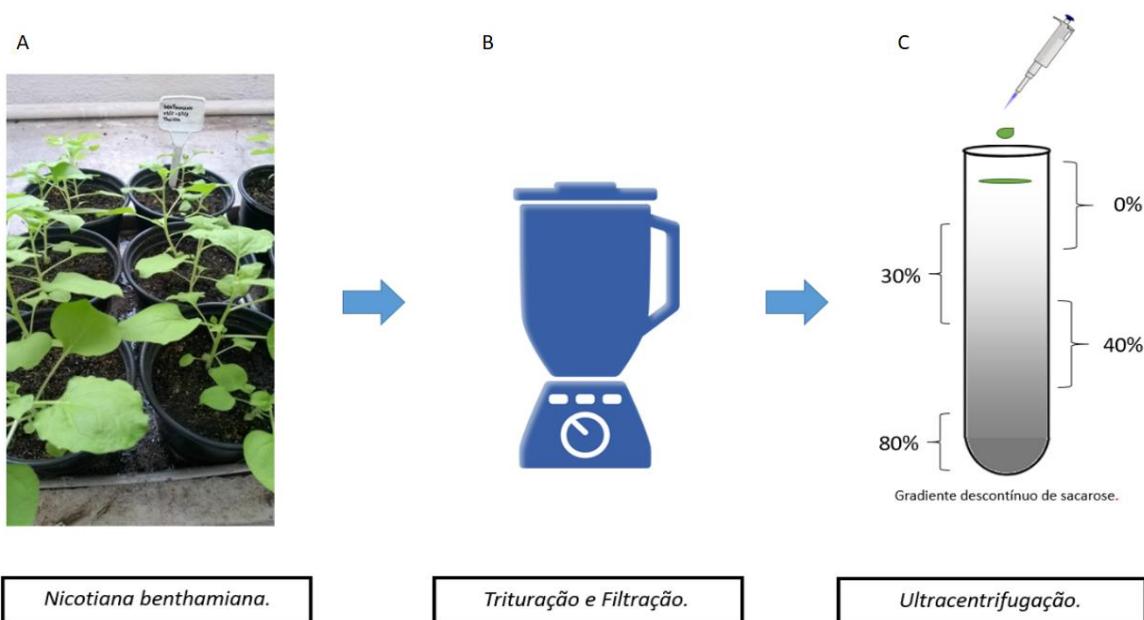


Figura 7 – Esquema do processamento das folhas para purificação das VLPs em planta – A) Plantas adultas de *Nicotiana benthamiana* com cerca de 2 semanas pós-transplante. B) Processo de Trituração é feito utilizando um liquidificador, junto de tampão Tris pH 7,6. C) Figura demonstrativa do gradiente contínuo de sacarose, utilizado para isolar as partículas por densidade.

4.4 Caracterização do estado de maturação das VLPs de NoV: Purificação da partícula

Logo após as purificações, foi feito a caracterização e detecção da proteína do capsídeo de NoV. Para isso, utilizarmos a eletroforese em gel desnaturante da amostra, em comparação com um padrão molecular para determinar o tamanho molecular das possíveis proteínas presentes. O SDS-PAGE de 10% foi dividido em duas partes, o gel de separação foi feito com Tris 1,5 M pH 8,8, Acrilamida/Bisacrilamida 30%, Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, Água, Tetrametiletilenodiamina (TEMED) e Persulfato de amônio (APS). Já o gel stacking, foi utilizado para posicionar as amostras no mesmo nível antes de começar a corrida, e foi feito utilizando as mesmas soluções, exceto o tampão Tris, que esteve em pH 6,8 0,5M e a Acrilamida/Bisacrilamida com 40%. Após a polimerização dos géis, montamos o sistema de eletroforese, utilizando tampão de corrida 10% com 0,1% de SDS. As amostras foram

misturadas com tampão de amostra para proteínas, e fervidas a 95 °C por 5 minutos para desnaturar as proteínas. Por fim, fizemos em seguida a corrida em 150 V por cerca de 1h30. Finalmente, retiramos o gel cuidadosamente e corado com *Coomassie blue* coloidal.

4.5 Cinética de maturação da VLP de N_ωV

Conforme visto anteriormente, o *Nudaurelia capensis Omega Virus* possui um processo intrínseco de maturação viral dependente de pH. O ensaio a seguir foi feito visando mimetizar a cinética de maturação, supostamente sucedida durante a saída do vírus, pós-infecção, das células do intestino-final das lagartas. As partículas de pró-capsídeo produzidas em planta foram incubadas em pH 5,0, condição que dispara o processo de autoclivagem das proteínas alfa causando a separação entre a proteína beta e o peptídeo gama. Alíquotas das partículas foram rapidamente misturadas em tampão de amostra e congeladas em nitrogênio líquido, nos tempos de 3, 15, 30, 45 e 60 minutos, 2h, 4h e 24h, para serem analisadas através de eletroforese tipo *SDS-PAGE*.

4.6 Ensaio de disruptão de membranas lipídicas: preparação dos lipossomas contendo corante fluorescente

Foram preparados lipossomas DOPC (*1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine*) dissolvidos em clorofórmio, através de deposição em fundo de tubos de ensaio que foram secados com gás nitrogênio em formato de lamelas, por meio de rotações circulares, com subsequente vedação com *teflon*. Os tubos de ensaio secaram durante a noite em um recipiente à vácuo. No dia seguinte, reidratamos as lamelas lipídicas com 1000 µL do corante fluorescente Sulforodamina B (100 mM) em tampão HEPES (50 mM) em pH 7,0, em 1 mg / mL. Os tubos contendo as lamelas de DOPC foram hidratadas com Sulfo B em HEPES foram expostos à um agitador circular, seguido de congelamento em N₂ líquido para forçar o formato circular e formar lipossomas. Três ciclos de agitação e congelamentos com nitrogênio líquido foram feitos. Para selecionar lipossomas de tamanho padronizados, utilizamos um extrusor, com filtro de membrana de policarbonato de 0,1 nm. Após isso, utilizamos uma coluna de cromatografia por exclusão de tamanho PD-10 para separar a Sulfo B livre dos lipossomas. Os lipossomas contendo o corante fluorescente Sulforodamina B foram diluídos em tampão pH 7,6, para alcançar 1 mg / mL, e foram incubados com volumes crescentes de capsídeos completamente maduros de VLP de N_ωV (1 mg / mL). A emissão de fluorescência (585 nm de emissão, 535 nm de excitação) foi medida através de um fluorímetro. A liberação do corante foi calculada em relação ao aumento da fluorescência obtido pela adição do detergente Triton X-100 (10%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Processo de purificação das VLPs de NωV em *Nicotiana benthamiana*

Visando produzir as *Virus-like particles* de NωV em *N. benthamiana*, foi preciso mudar o vetor de expressão e ajustar o método de purificação. A sequência de NωV originalmente clonada no vetor de baculovírus teve seus códons otimizados para expressão em plantas através do vetor pEAQHT. Em comparação às células de inseto, a purificação de plantas gera uma quantidade maior de detritos provenientes dos tecidos da folha. O objetivo geral da purificação foi eliminar os grandes detritos e moléculas contaminantes, separando as VLPs das demais moléculas por densidade. Para isso, foram utilizados liquidificadores, detergentes, ultracentrifugações seguidas de coagem por tecidos ultrafinos, filtragem através de filtros 0.45 à vácuo, ultracentrifugações em colchão e gradiente de sacarose e, por fim, limpeza da sacarose.

No tubo contendo o colchão de sacarose 30% (Figura 8A), ainda é possível observar pelos tons marrons e verdes a contaminação com clorofila. Entretanto, na parte inferior do tubo onde estava o colhão, há um *pellet* (pelota) compacto (seta vermelha) que se assemelha aos *pellets* encontrados em purificações de VLPs de NωV em células de inseto. Em seguida, o *pellet* foi isolado e ressuspensionado em tampão Tris pH 7,6 e foi levado à outra ultracentrifugação, desta vez em um gradiente contínuo de sacarose (Figura 8B). Em algumas purificações obtivemos uma banda opalescente, com posição semelhante à observada com VLPs derivadas de células de inseto. Esse resultado sugeriu que provavelmente há *Virus-like particles* de NωV nessa purificação. Em algumas purificações obtivemos como produto final, duas bandas opalescentes (Figura 8C), algo nunca antes visto em purificações em células de inseto. Como as partículas se deslocam no gradiente contínuo de sacarose de acordo com sua densidade, consideramos ser provável que nessa purificação havia dois grupos de partículas com densidades diferentes. Este resultado nos levou a pensar que uma banda pudesse ser composta por procapsídeo e a outra por capsídeos maduros.

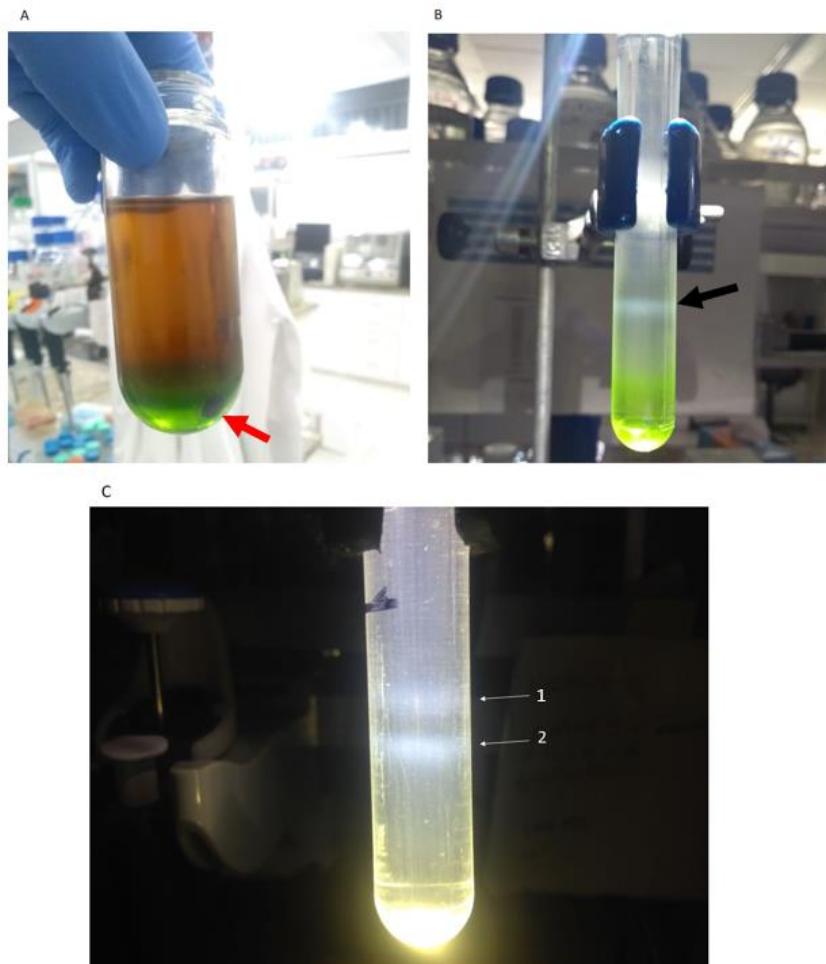


Figura 8 – Demonstração dos procedimentos de purificação utilizando gradientes de sacarose – A) Colchão de sacarose utilizado para separar grandes pedaços das células da planta de resíduos de baixa densidade (seta vermelha), que conseguem ultrapassar um colchão de 30% de sacarose. **B)** Gradiente de sacarose de 10 a 40% utilizado para separar as VLPs por densidade, essas estão visíveis através de uma banda opalescente (seta preta), proveniente de um feixe de luz incidido sobre o tubo. **C)** Gradiente de sacarose de 10 a 40% utilizado para separar as VLPs por densidade, essas estão visíveis através de duas bandas opalescentes (setas brancas 1 e 2), proveniente de um feixe de luz incidido sobre o tubo.

5.2 Visualização da proteína do capsídeo por eletroforese em gel e caracterização das propriedades funcionais da partícula

Após os procedimentos de purificação da partícula, foram feitas análises para determinar se as partículas contidas na banda opalescente eram mesmo *Virus-like particles* produzidas em *Nicotiana benthamiana* e, se elas, apresentam as mesmas propriedades moleculares como tamanho molecular e estado de maturação das partículas produzidas em células de inseto.

Através do *SDS-PAGE* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil-Sulfato de Sódio), é possível estimar o peso molecular das proteínas e o estado de maturação da partícula guiando-se pela migração do padrão de peso molecular (Figura 9) e utilizando a partícula recombinante produzida em células de inseto *Sf21* como controle. A proteína alfa possui peso molecular de 70 kDa, porém, ao sofrer a clivagem autocatalítica durante o processo de maturação converte-se em uma proteína com 62 kDa, chamada beta, e um peptídeo de 8 kDa chamado gama (Figura 9, coluna 3). Não é possível observar o peptídeo gama devido à espessura da malha do gel, que está em 10% e, portanto, não é ideal para a separação de pequenos peptídeos. A banda com peso molecular próximo à 72 kDa, com tamanho semelhante ao controle, por volta de 70 kDa (Figura 9, coluna 1), proveniente da seta 1 (Figura 8C), indicam que há expressão de VLPs de N_oV em *N. benthamiana* e que a purificação foi eficiente. Além disso, é possível observar um processo de maturação durante a expressão em insetos, evidenciado pela aparição das moléculas alfa e beta na mesma coluna (Figura 9, coluna 3). Já a seta com o 2 (Figura 8C), indica as partículas completamente maduras (Figura 9, coluna 2). Observamos, também, grandes proteínas por volta de 130 kDa, com um tamanho molecular de alfa e beta dobrado, podendo significar dímeros desses peptídeos.

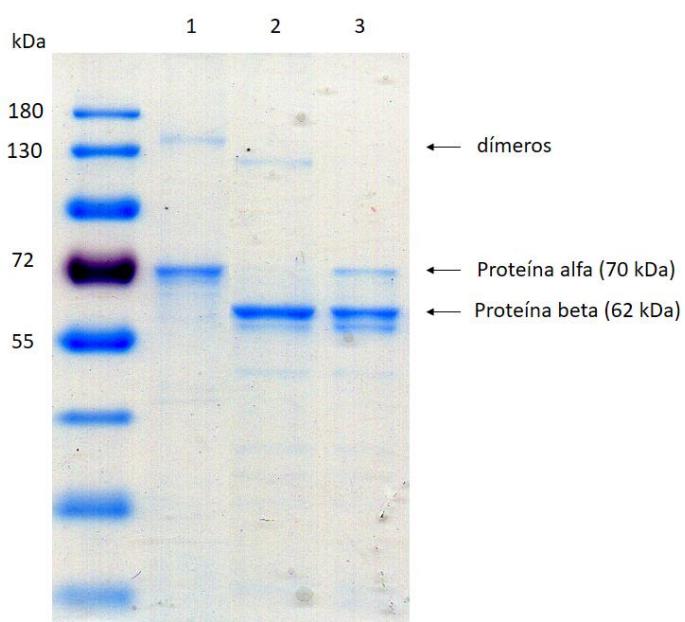


Figura 9 – SDS-PAGE analisando as VLPs produzidas em planta em comparação às de células de inseto – Os lisados de folhas foram submetidos a duas etapas de ultracentrifugação contra gradiente de sacarose. As bandas opalentes resultantes foram analisadas por *SDS-PAGE*. O gel foi corado com azul de Coomassie e mostra VLPs de capsídeo (62 kDa) e procapsídeo (70 kDa) produzidas em *N. benthamiana* (colunas 1 e 2) em comparação com as produzidas em células de inseto (*Spodoptera frugiperda*; coluna 1). Gama (8 kDa) não pôde ser visualizado na malha de gel 10%.

5.3 Visualização da maturação em pH 5

A maturação viral é um processo fundamental para a infecção do *Nudaurelia capensis omega virus*. Fizemos um experimento para verificar a maturação ao longo do tempo, utilizando um pH ácido como gatilho para a compactação da partícula, que leva à clivagem autocatalítica das proteínas alfa em beta e gama. A verificação do processo maturação é importante para avaliar se a VLP produzida em *N. benthamiana* tem as mesmas propriedades das VLPs produzidas em células de insetos.

Através da análise por SDS-PAGE, podemos observar claramente a maturação e consequente clivagem da proteína alfa em beta ao longo do tempo de forma gradual e quase completa ao final de dois dias. O gráfico de comparação das cinéticas de maturação (Figura 10B), seguindo a clivagem da proteína alfa em beta e gama, nos mostra uma leve diferença entre as cinéticas das VLPs produzidas em planta (em verde) e inseto (azul). A cinética se mostra eficiente, clivando cerca de 50% das subunidades em menos de duas horas, fato esperado dado os estudos anteriores com as VLPs de NoV em *Spodoptera frugiperda*. Parte da diferença na dinâmica molecular entre as duas partículas pode ter explicação nos dímeros de proteína presentes no topo do gel (Figura 10A). Esses são supostos dímeros de alfa e beta no topo do gel, por volta de 130 kDa. A dimerização de alfa e beta pode atrapalhar a velocidade com que as partículas se maturam, podendo explicar a diferença de cinética entre VLPs de planta e inseto.

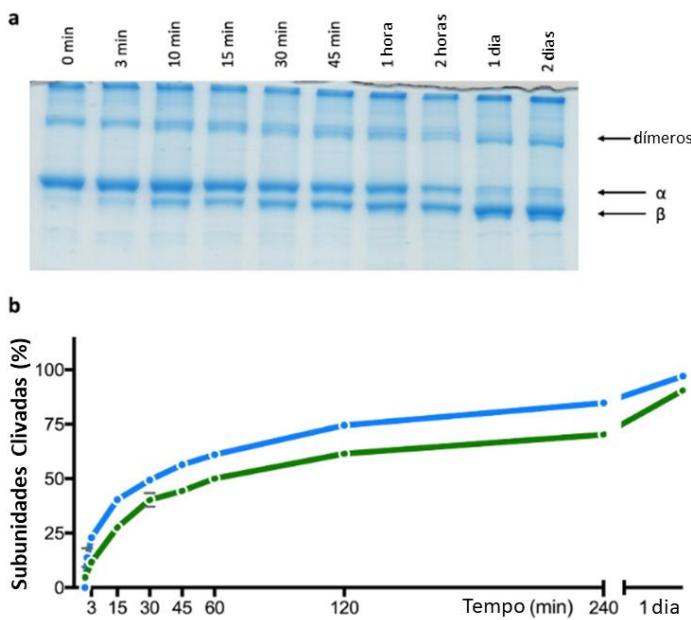


Figura 10 – Análise da clivagem autocatalítica das VLPs produzidas em plantas e células de inseto durante o processo de maturação – A) SDS-PAGE de procapsídeo de planta encubados a pH 5,0, em diferentes tempos. B) Comparação da cinética de clivagem das subunidades alfa em beta e gama, de VLPs de NoV de plantas (verde) e células de inseto (azul), utilizando analise de densitometria das bandas do SDS-PAGE.

5.4 Análise da atividade lítica contra membranas das VLP de NoV produzidas em planta.

Seguindo com a análise das propriedades físico-químicas de nossa partícula produzida em planta, a próxima etapa experimental foi verificar a atividade lítica associada à maturação viral, anteriormente observada nas VLPs produzidas em células de inseto. Apenas após a

clivagem de alfa em beta e gama é que foi possível observar atividade lítica do capsídeo de N_oV. O peptídeo gama foi verificado como a molécula relacionado diretamente à lise de membranas (Domitrovic *et al*, 2012). Verificar a atividade lítica contra membrana nos permite garantir parte do processo fundamental tanto estruturalmente quanto para a aplicação biotecnológica em células animais.

No primeiro gráfico, a exposição das partículas já maturadas variando de acordo com o pH do ambiente. As partículas recombinantes produzidas em plantas comparadas com partículas produzidas em inseto, possuem atividade lítica levemente superior conforme o pH do ambiente aumenta (Figura 11a), seguindo o perfil de lise da partícula controle. O segundo ensaio mostra a cinética da atividade lítica das partículas maduras em pH de 7,5, onde a disruptão de membrana é eficiente. As *Virus-like particles* produzidas em plantas, em laranja (Figura 11b), possuem um perfil de atividade lítica onde cerca de 50% dos lipossomos já foram lisados nos primeiros 10 minutos. Supõe-se, então, que a disruptão ocorre rapidamente assim como visto nos demais estudos (Domitrovic *et al*, 2012; Domitrovic *et al*, 2013; Castells-Graells *et al*, 2020). Comparando a disruptão de membranas dose-dependente, é possível observar que a cinética de lise em plantas (*NbN_oV*) é mais rápida do que a de inseto (*SfN_oV*), ambas em 20 µg / mL quanto em 2 µg / mL (Figura 11b). Essa diferença de velocidade na cinética de lise de membranas pode ter reflexo de diferenças nas propriedades dinâmicas da partícula, como dímero de alfa e beta, que podem estar a alterar o rearranjo da estrutura quaternária das proteínas.

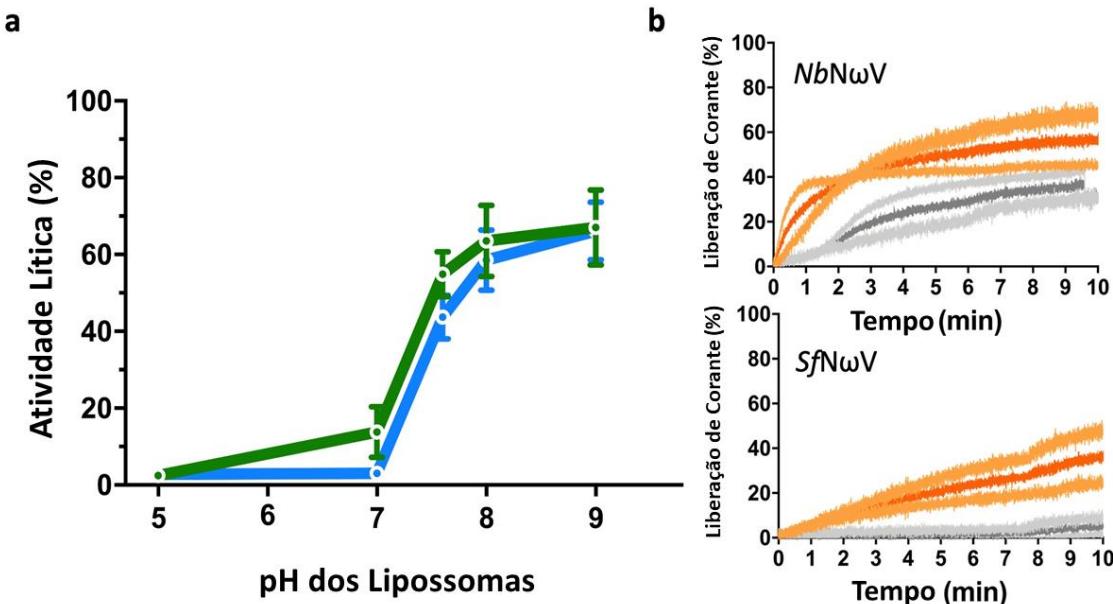


Figura 11 – Comparação entre as atividades líticas contra membrana das VLPs de NoV produzidas em plantas e células de inseto – A) Lipossomas contendo Sulforodamina-B foram diluídos em tampões de pH 5, 7, 8 e 9 e incubados com cápsides maduras de VLP N_oV (1 mg / mL) de inseto (azul) e planta (verde). B) Os lipossomas, contendo o corante fluorescente aprisionado Sulforodamina B, em tampão de pH 7,6 foram tratados com volumes crescentes de capsídeos maduros de VLP N_oV a 20 µg / mL (laranja) e 2 µg / mL (cinza). A liberação de corante foi calculada em relação ao aumento na fluorescência obtido pela adição de Triton X-100 (10%).

6 CONCLUSÕES

O trabalho aqui apresentado demonstra que é possível a expressão em plantas de *Virus-like particles* de um vírus animal e que, a partícula em questão, apresenta características físico-químicas e biológicas semelhantes às VLPs produzidas em células de inseto. A purificação das partículas recombinantes expressadas em *Nicotiana benthamiana* apresentaram algumas diferenças em detrimento daquelas produzidas em inseto, a maioria referente à velocidade nas cinéticas de maturação e lise de membranas.

A maturação *in vivo*, observamos em SDS-PAGE que parte das proteínas alfa das partículas, mesmo que seu estado de maturação fosse preservado por tampão alcalino, já estavam clivadas em beta e gama. As VLPs produzidas em inseto podem ser purificadas totalmente em seu estado metaestável de procapsídeo, onde todas as subunidades proteicas estão em proteína alfa. Esse fato intrigou a nós e nossos colaboradores do John Innes Centre, na Inglaterra, que analisaram a expressão das proteínas alfa nos dias que seguem pós agroinfilação. Conforme os dias vão passando, a cinética de maturação aumenta e, é possível, que as proteínas encontrem um pH ácido, em alguma parte das células das folhas como vacúolo ou apoplasto. (Martiniere *et al* 2013; 2016 apud Castells-Graelss *et al*, 2020).

Outro fato observado foi o aparecimento de dímeros da proteína alfa durante a expressão em planta ou em algum momento do processo de purificação. Novamente, durante da expressão das partículas recombinantes de N_ωV em inseto não era observado bandas proteicas, em SDS-PAGE, por volta de 140 kDa no *SDS-PAGE*. Cogitamos que esses dímeros poderiam estar sendo formados por pontes-dissulfeto resistentes às condições do tampão de amostra. Fizemos experimentos na tentativa de quebrá-las, usando diferentes agentes redutores, mas nenhuma das tentativas foi bem sucedida. Revisando a literatura, nós podemos observar que algumas proteínas transgênicas sofriam esse processo quando expressadas em plantas. Existem alguns ácidos fenólicos produzidos pelas plantas que podem interligar proteínas através de ligação covalente, como é o caso das quinonas e, é possível, que esses dímeros tenham sido ligados por esse tipo de moléculas (Shu, Lorentzen e Davies, 2019).

No decorrer do desenvolvimento do trabalho, continuamos a análise físico-química das *Virus-like particles*. Em insetos, as VLPs eram purificadas e passavam por um processo de maturação *in vitro*, através do contato com tampão em pH 5,0. Nossas VLPs produzidas em planta também eram expostas à pH 5,0 para que todos as subunidades fossem clivadas e a partícula estivesse totalmente em seu estado maduro. Os ensaios de cinética de maturação demonstraram que as partículas produzidas em *Nicotiana benthamiana* possuem sua funcionalidade biológica semelhante às VLPs produzidas em inseto, conseguem passar corretamente do estado pró-capsídeo para capsídeo maduro, fato importante para os ensaios que envolvem a lise de membranas e sua biofuncionalidade como partícula viral. Os experimentos envolvendo a lise de lipossomas evidenciou que a maturação seguida de contato com membranas lipídicas em pH alcalino foi, cineticamente, muito semelhante às partículas produzidas em insetos e comprovou a funcionalidade biológica da partícula, capaz de lisar e possivelmente entrar em células.

De maneira geral, a VLP de N_ωV produzida em planta demonstrou-se uma candidata de vírus animal à aplicação biotecnológica. A passagem de um sistema em cultura celular para um sistema vegetal alterou pouco as características estruturais da partícula, isto é, sua montagem, arranjo tridimensional como capsídeo montado, maturação e lise de membranas. Os

dímeros encontrados podem ser contornados pela produção em grande escala, já que, o sistema vegetal supera o celular na questão dispendiosa, sendo muito mais barato e fácil de produzir.

As partículas foram caracterizadas tridimensionalmente em alta resolução por Crio-microscopia eletrônica de raios X (paper em Anexo 1), através de 21.395 imagens das partículas maturas, reconstruindo uma imagem 3D de 2.7 Å. Os dados demonstram que as VLPs de N_ωV produzidas em *N. benthamiana* são indistinguíveis dos *virions* e das produzidas em células de inseto, com um desvio médio dos átomos de carbono α de 0.461 Å. Além disso, foi observado que as estruturas tridimensionais pouco diferem das VLPs de planta para inseto, fato que explica como as partículas purificadas de planta se montam espontaneamente e sofrem processo de maturação de forma eficiente como as de células de inseto.

Facilitando o processo de produção e purificação, aliados à produção em planta que reduz possíveis contaminantes das células animais, são promissoras para a aplicação biotecnológica como partícula carreadora de genes ou pequenos fármacos, como várias outras VLPs já estão sendo estudadas neste sentido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, D.K. e Johnson, J.E. (1992). Sequence and analysis of the capsid protein of *Nudaurelia capensis* ω virus, an insect virus with T = 4 icosahedral symmetry. *Virology* 190.2, 806-814.
- Aljabali, A. A., Shukla, S., Lomonossoff, G. P., Steinmetz, N. F., Evans, D. J. (2013). CPMV-DOX delivers. *Molecular Pharmaceutics*, 10(1), 3-10.
- Bonifert G, Folkes L, Gmeiner C, Dachs G, Spadiut O. Recombinant horseradish peroxidase variants for targeted cancer treatment. *Cancer Med.* 2016 Jun;5(6):1194-203. doi: 10.1002/cam4.668. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26990592; PMCID: PMC4924378.
- Canady, M.A., Tihova M., Hanzlik T.N., Johnson J.E. e Yeager M. (2000). Large conformational changes in the maturation of a simple RNA virus, *Nudaurelia capensis* ω virus (NωV). *Journal of Molecular Biology* 299.3, 573-584.
- Castells-Graells, R. (2019). Viruses in motion: maturation of an insect virus-like particle – a nanomachine. Tese de Doutorado (Ph.D Thesis). University of East Anglia.
- Castells-Graells, R., Ribeiro, J.R.S., Domitrovic, T., Hesketh, E.L., Scarf, C.A., Johnson, J.E., Ranson, N.A., Lawson, M.D. e Lomonossoff, G.P. (2020/2021). Virus-like particles expressed in plants can undergo an intricate maturation process. Artigo ainda não publicado.
- Cavarelli, J., Bomu, W., Liljas, L., Kim, S., Minor, W., Munshi, S., Muchmore, S., Schmidt, T., Johnson, J., e Hendry, A.D. (1991). Crystallization and preliminary structure analysis of an insect virus with t = 4 quasi-symmetry: *Nudaurelia capensis* ω virus. *Acta Crystallographica B* 54, 23-29.
- CDC (2020). Center for Disease Control and Prevention. Governo dos Estados Unidos da America. HPV-Associated Cancer Statistics. Disponível em <https://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/>. Acesso em 18/11/2020.
- Chen, Q e Lai, H. (2013). Plant-derived virus-like particles as vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutic* 9.1, 26-49.
- Christian, P.D., Murray, D., Powell, R., Hopkinson, J., Gibb, N.N. e Hanzlik, T.N. (2005). Effective control of a field population of *Helicoverpa armigera* by using the small RNA virus *Helicoverpa armigera* stunt virus (Tetraviridae: Omegatetravirus). *Journal of Economic Entomology* 98.6, 1839–1847.
- Chung, Y. H., Cai, H. e Steinmetz, N. F. (2020). Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- DePorter S.M. e McNaughton, B.R. Engineered M13 bacteriophage nanocarriers for intracellular delivery of exogenous proteins to human prostate cancer cells. *Bioconjug Chem.* 2014 Sep 17;25(9):1620-5. doi: 10.1021/bc500339k. Epub 2014 Aug 20. PMID: 25134017.
- Doerschuk, P.C., Gong, Y., Xu, N., Domitrovic, T., Johnson, J.E. (2016). Virus particle dynamics derived from CryoEM studies. *Current Opinion in Virology* 18, 57-63.
- Domitrovic, T., Matsui, T. e Johnson, J.E. (2012). Dissecting Quasi-Equivalence in Nonenveloped Viruses: Membrane Disruption Is Promoted by Lytic Peptides Released from Subunit Pentamers, Not Hexamers. *Journal of Virology* 86, 9976-9982.
- Domitrovic, T., Movahed, N., Bothner, B., Matsui, T., Wang, Q., Doerschuk, P.C. e Johnson, J.E. (2013). Virus Assembly and Maturation: Auto-Regulation through Allosteric Molecular Switches. *Journal of Molecular Biology* 425.9, 1488-1496.
- Gabizon, A., Martin, F. (1997). Polyethylene glycol-coated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 54.4, 15-21.
- Ghag, S.B., Adki, V.S., Ganapathi, T.R. e Bapat, V.A. (2016). Heterologous protein production in plant systems. *GM Crops & Food* 10.3.
- Gordon K.H.J. e Hanzlik T.N. (1998). Tetravirus. In: *The Insect Viruses*. Miller, L.K, Ball, L.A., eds (New York: Springer US), pp. 416-427.

- Invitrogen, Live Technologies. (2015). Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System.
- Kapila, J., Rycke, R.D., Montagu, M.V., Angenon, G. (1997). An agrobacterium-mediated transient gene intact leaves expression system. *Plant Science* 122.1, 101-108.
- Karimi M, Mirshekari H, Moosavi Basri SM, Bahrami S, Moghoofei M, Hamblin MR. Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Nov 15;106(Pt A):45-62. doi: 10.1016/j.addr.2016.03.003. Epub 2016 Mar 17. PMID: 26994592; PMCID: PMC5026880.
- Koudelka, K. J., Pitek, A. S., Manchester, M. e Steinmetz, N. F. (2015). Virus-Based Nanoparticles as Versatile Nanomachines. *Annual Review of Virology*. 2(1), 379-401.
- Legendre, D. e Fastrez, J. (2005). Production in *Saccharomyces cerevisiae* of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs. *Journal of Biotechnology* 117, 183-194.
- Leite, T. H. e Carneiro, A. A. (2013). Transformação genética de milho via Agrobacterium tumefaciens. Seminário de iniciação científica, 5.
- Li, X., Wang, L., Fan, Y., Feng, Q., Cui, F. (2012) Biocompatibility and Toxicity of Nanoparticles and Nanotubes. *Journal of Nanomaterials*, 2012.
- Lizotte, P. H., Wen, A. M., Sheen, M. R., Fields, J., Rojanasopondist, P., Steinmetz, N. F., Fiering, S. (2016). In situ vaccination with cowpea mosaic virus nanoparticles suppresses metastatic cancer. *Nature Nanotechnology*, 11(3), 295-303.
- Ma, J.K., Drake P.M. e Christou P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* 4, 794–805.
- Masarapu, H., Patel, B.K., Chariou, P., Hu, H., Gulati, N.M., Carpenter, B.L., Ghiladi, R.A., Shukla, S. e Steinmetz, N.F. (2017). Physalis Mottle Virus-Like Particles as Nanocarriers for Imaging Reagents and Drugs. *Biomacromolecules* 18.12, 4141-4153.
- Mateu, M.G. (2016). Assembly, Engineering and Applications of Virus-Based Protein Nanoparticles. In: Protein-based Engineered Nanostructures. Cortajarena, A.L. e Grove, T.Z., eds (Springer, Cham), pp 83-120.
- McKinney, B.R. (1994). Production and crystallization of virus-like particles assembled in a heterologous protein expression system. *Acta Crystallographica D50*, 351-354.
- Mendes, A., Vlok, M., Short, J.R., Matsui, T. e Dorrington, R.A. (2015). An encapsidated viral protein and its role in RNA packaging by a non-enveloped animal RNA virus. *Virology* 476, 323-333.
- Mohsen, M.O., Zha, L., Cabral-Miranda, G., Bachmann, M.F. (2017). Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminary of Immunology*, 34, 123-132.
- Moore, N.F. (1991). The Nudaurelia b family of insect viruses. In: *Viruses of Invertebrates*. Kurstak, E., eds (New York: Routledge), pp. 277-285.
- Munshi, S., Liljas, L., Cavarelli, J., Bomu, W., McKinney, B., Reddy, V. e Johnson, J.E. (1996). The 2.8 Å Structure of a T= 4 Animal Virus and its Implications for Membrane Translocation of RNA. *Journal of Molecular Biology* 261.1, 1-10.
- Pande J., Szewczyk M.M, Grover A.K. Phage display: concept, innovations, applications and future. *Biotechnol Adv.* 2010 Nov-Dec;28(6):849-58. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.004. Epub 2010 Jul 23. PMID: 20659548.
- Public Health England (2020). Governo da Inglaterra. Surveillance of type-specific HPV in sexually active young females in England, to end 2018. Londres, 13p. Disponível em: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/858872/hpr02_20_HPV_2018.pdf. Acesso em 18/11/2020.
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10.4, 853-858.

- Rohovie, M.J., Nagasawa, M. e Swartz, J.R. (2017). Virus-like particles: Next-generation nanoparticles for targeted therapeutic delivery. *Bioengineering & Translational Medicine* 2.1, 43-57.
- Roldão, A., Mellado, M.C.M., Castilho, L.R., Carrondo, M.J.T., e Alves, P.M. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 9:10, 1149-1176.
- Roldão, A., Silva, A.C., Mellado, M.C.M., Alves, P.M. e Carrondo, M.J.T. (2011). Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology: Fundamentals and Applications. *Comprehensive Biotechnology* 1, 625-649.
- Saberianfar, R., Joensuu, J.J., Conley, A.J. e Menassa, R. Protein body formation in leaves of Nicotiana benthamiana: a concentration-dependent mechanism influenced by the presence of fusion tags. *Plant Biotechnology Journal* 13.7, 927-937.
- Sainsbury, F. e Lomonosoff G.P. (2008). Extremely High-Level and Rapid Transient Protein Production in Plants without the Use of Viral Replication. *Plant Physiology* 148.3, 1212-1218.
- Saxena, P., Thuenemann, E.C., Sainsbury, F. e Lomonosoff, G.P. (2016). Virus-Derived Vectors for the Expression of Multiple Proteins in Plants. In: *Recombinant Proteins from Plants*. MacDonald, J., Kolotilin, I. e Menassa, R., eds (New York: Humana Press), pp 39-54.
- Shan, W., Zhang, D., Wu, Y., Lv, X., Hu, B., Zhou, X., Ye, S., Bi, S., Ren, L. e Zhang, X. (2018). Modularized peptides modified HBc virus-like particles for encapsulation and tumor-targeted delivery of doxorubicin. *Nanomedicine* 14.3, 725-734.
- Shanks, M. e Lomonosoff, G.P. (2000). Co-expression of the capsid proteins of Cowpea mosaic virus in insect cells leads to the formation of virus-like particles. *Journal of General Virology* 81.12, 3093-3097.
- Shu N, Lorentzen LG, Davies MJ. Reaction of quinones with proteins: Kinetics of adduct formation, effects on enzymatic activity and protein structure, and potential reversibility of modifications. *Free Radic Biol Med*. 2019.
- Speth, P.A., van Hoesel, Q.G. e Haanen, C. (1988). Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clinical Pharmacokinetics* 15.1, 15-31.
- Thuenemann, E.C., Lenzi, P., Love, A.J., Taliinsky, M., Bécares, M., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Zahmanova, G.G., Minkov, I.N., Matić, S., Noris, E., Meyers, A., Hattingh, A., Rybicki, E.P., Kiselev, O.I., Ravin, N.V., Eldarov, M.A., Skryabin, K.G. e Lomonosoff, G.P. (2013). The Use of Transient Expression Systems for the Rapid Production of Virus-like Particles in Plants. *Current Pharmaceutical Design* 19.13, 5564-5573.
- Veesler, D e Johnson, J.E. (2012). Virus Maturation. *Annual Review of Biophysics* 41, 473-496.
- Wang, J.W. e Roden, R.B. (2013). Virus-like particles for the prevention of human papillomavirus-associated malignancies. *Expert Review of Vaccines*, 12(2), 129-141.
- Warner CM, Barker N, Lee SW, Perkins EJ. M13 bacteriophage production for large-scale applications. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014 Oct;37(10):2067-72. doi: 10.1007/s00449-014-1184-7. Epub 2014 Apr 13. PMID: 24728964.
- Yamaji, H. Production of Antibody Fragments Using the Baculovirus. (2011). *Insect Cell System*.
- Yan, D., Teng, Z., Sun, S., Jiang, S., Dong, H., Gao, Y., Wei, Y., Qin, W., Liu, X., Yin, H. e Guo, H. (2017). Foot-and-mouth disease virus-like particles as integrin-based drug delivery system achieve targeting anti-tumor efficacy. *Nanomedicine* 13.3, 1061-1070.
- Yazdani, R., Shams-Bakhsh, M., Hassani-Mehraban, A., Arab, S.S., Thelen, N., Thiry, M., Crommen, J., Fillet, M., Jacobs, N., Brans, A. e Servais, A.C. (2019). Production and characterization of virus-like particles of grapevine fanleaf virus presenting L2 epitope of human papillomavirus minor capsid protein. *BMC Biotechnology*, 19.
- Yildiz, I., Shukla, S. e Steinmetz N.F. (2011). Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 22.6, 901, 908.

- Zeng, Q., Wen, H., Wen, Q., Chen, X., Wang, Y., Xuan, W., Liang, J. e Wan, S. (2013). Cucumber mosaic virus as drug delivery vehicle for doxorubicin. *Biomaterials* 34.19, 4632-4642.
- Zheng, Y., Lee, P. W., Wang, C., Thomas, L. D., Stewart, P.L., Steinmetz, N.F., Pokorski, J.K. (2019). Freeze-Drying To Produce Efficacious CPMV Virus-like Particles. *Nano Letters*, 19(3), 2099-2105.
- Zhou, L., Zheng, Y., Jiang, H., Zhou, W., Lin, M., Han, Y., Cao, X., Zhang, J. e Hu, Y. (2008). RNA-binding properties of *Dendrolimus punctatus* tetravirus p17 protein. *Virus Research*, 138.1 e 138.2, 1-6.

8 ANEXO 1

Plant-expressed virus-like particles reveal the intricate maturation process of a eukaryotic virus

Roger Castells-Graells¹, Jonas R. S. Ribeiro², Tatiana Domitrovic², Emma L. Hesketh³, Charlotte A. Scarff³, John E. Johnson⁴, Neil A. Ranson³, David M. Lawson¹, George P. Lomonossoff¹

¹Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney NR4 7UH, UK

², Virology Department, Instituto de Microbiologia Paulo de Goes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

³Astbury Centre for Structural Molecular Biology, School of Molecular & Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, UK

⁴Department of Integrative Structural and Computational Biology, The Scripps Research Institute, 10550 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037, USA

Abstract

Many virus capsids undergo exquisitely choreographed maturation processes in their host cells to produce infectious virions, and these remain poorly understood. As a tool for studying virus maturation, we transiently expressed the capsid protein of the insect virus *Nudaurelia capensis* omega virus (NwV) in *Nicotiana benthamiana* and were able to purify both immature procapsids and mature capsids from infiltrated leaves by varying the expression time. Cryo-EM analysis of the plant-produced procapsids and mature capsids to 6.6 Å and 2.7 Å resolution, respectively, reveals that in addition to large scale rigid body motions, internal regions of the subunits are extensively remodelled during maturation, creating the active site required for autocatalytic cleavage and infectivity. The mature particles are biologically active in terms of their ability to lyse membranes and have a structure that is essentially identical to authentic virus. The ability to faithfully recapitulate and visualize a complex maturation process in plants, including the autocatalytic cleavage of the capsid protein, has revealed exciting new insights into the process.

Introduction

Maturation is a critical part of replication cycle of all animal and bacterial viruses studied to date and is required for the production of infectious virions. The outlines of maturation have been determined for retroviruses¹, flaviviruses², herpesvirus³ and a variety of other viruses, but detailed mechanistic studies have not been reported. The maturation of particles of the insect virus, *Nudaurelia capensis* omega virus (NwV), has been studied extensively *in vitro*. As a result, the virus is now an exemplar for maturation processes⁴. NwV belongs to the *Alphatetraviridae*, a family of insect viruses

with non-enveloped $T=4$ capsids that infect a single order of insects, the Lepidoptera^{5,6}. NwV has a single-stranded positive-sense, bipartite RNA genome consisting of RNA-1 (~5.3 kb), that encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), and RNA-2 (~2.5 kb), that encodes the 70 kDa α capsid protein⁷. When the coat protein of NwV is expressed in insect cells, it assembles into stable intermediate VLPs (known as the procapsid), 48 nm in diameter, that are porous at neutral pH (pH 7.6)⁸. These particles undergo a maturation process when they are exposed to acidic conditions (pH 5.0) *in vitro*. This involves large-scale subunit reorganization and an autocatalytic cleavage of the α capsid protein between residues Asn570 and Phe571 to give two polypeptides, β and γ , of 62- and 8-kDa, respectively, that remain as part of the mature particle (Fig. S1). The resulting mature particles are 42 nm in diameter, and they are morphologically indistinguishable from the authentic virus⁹. Lowering the pH of a procapsid preparation from 7.6 to 5.0 results in rapid, large-scale, conformational changes of the subunits and maturation¹⁰, however, intermediate capsid states can be detected at pH values maintained between 7.6 and 5.0¹¹. These conformational changes are reversible at elevated pH if no more than 10% of the subunits have been cleaved or in the mutant Asn570Thr, which is incapable of effecting the cleavage^{11,12}.

The γ peptide acts as a lytic peptide, providing an effective mechanism to breach a membrane and allowing non-enveloped animal viruses to enter cells¹³. Experiments using liposomes loaded with a self-quenching dye, and NwV VLPs at different stages in the maturation (pH 7.6 to 5.0); have shown that the maximum lytic activity occurs at alkaline pH (pH 7.5 and above) and that it is necessary for the γ peptide to be released for this activity^{14,15}. Therefore, procapsid VLPs, in which the α peptide is not cleaved, do not lyse liposomes¹⁵. This pH-dependent functionality of the

lytic peptide is believed to correlate with the uptake of virus particles under the alkaline conditions of the insect gut¹⁶.

Though comparison of the structures of procapsids and capsids produced by expression in insect cells and subsequent *in vitro* maturation have been very revealing, they have led to only an understanding of the gross structural changes that accompany the process. Furthermore, they rely on the assumption that maturation by reducing pH follows an identical pathway to that which occurs within cells. While this is reasonable, given that structures of capsids matured *in vitro* are indistinguishable from authentic virions isolated from infected insects, it is possible that the pathway may be different within cells. However, maturation of capsids within insect cells has not been observed rendering *in vivo* studies impossible in this system.

Plants are a highly effective system for producing virus-like particles (VLPs)^{17–22}. In most instances, expression of the coat protein subunits alone results in the assembly of VLPs; however, in the case of members of the order *Picornavirales*, where coat protein cleavage is required for particle assembly, co-expression of a virus-encoded protease is also required^{19,21}. To date, the resulting purified VLPs have been mature, static structures, which closely resemble the original virion both in structure and immunogenicity.

To explore whether plant-based systems can be used to visualize the molecular details of the maturation processes, we transiently expressed the coat protein subunit of NwV and show that the cleavage associated with maturation occurs within the cells. It proved possible to purify both procapsids and capsids from leaf tissue by varying the time at which the VLPs were extracted. Using cryo-EM, we solved the structure of the procapsids and capsids to 6.6 Å and 2.7 Å resolution, respectively, and showed that the plant-produced mature capsids have the ability to lyse liposomes and are

essentially identical in structure to authentic virus. Comparison of the structures of the plant-produced procapsids and capsids revealed that, in addition to large scale rigid body motions, internal regions of the subunits are extensively remodelled during maturation, creating the active site required for autocatalytic cleavage and infectivity.

Results

Expression and purification of NwV VLPs in plants.

The NwV WT coat protein gene, codon-optimized for *N. benthamiana*, was inserted into plasmid pEAQ-HT²³ to give plasmid pEAQ-HT-NwV-WT. Expression of coat protein was monitored by infiltrating leaves of *N. benthamiana* with suspensions of *A. tumefaciens* harbouring pEAQ-HT-NwV-WT followed by the collection of leaf disks various days post-infiltration (dpi). Western blot analysis of total protein extracts using a polyclonal antibody specific for the NwV coat protein showed that expression of the 70 kDa full-length coat protein (α protein) was first detected at 2 dpi (Fig. 1a). By 3 to 4 dpi a lower molecular weight band of about 62 kDa, consistent with the size of the β protein, appeared suggesting that the full-length NwV coat protein undergoes processing over time within the plant tissue. Additionally, higher molecular weight bands of around 150 kDa were observed in the extracts from later time points, suggestive of the formation of dimers, whether covalently linked or just SDS-resistant, of the coat protein. The identity of these putative dimers was subsequently confirmed by mass spectrometry of tryptic digests of the purified proteins.

To confirm that VLPs are, indeed, produced in plant cells, thin sections were prepared from leaves 8 days after infiltration with either pEAQ-HT (empty vector) or pEAQ-HT-NwV-WT and examined by TEM. Large numbers of particles, characteristic of NwV VLPs, could be seen in the cytoplasm of cells from leaves infiltrated with pEAQ-

HT-NwV-WT (Fig. 1c, d) but not in cells from tissue infiltrated with the empty vector (Fig. 1b). This, coupled with the time-dependent cleavage of the α protein, indicates that the expressed NwV coat protein subunits assemble into procapsids that are able to mature within plant cells.

To characterise the particles produced in plants, VLPs were extracted at pH 7.6 either 3-4 dpi to maximise the level of procapsids²⁴ or at 8 dpi to isolate mature capsids. Both types of capsid particle were purified by centrifugation through continuous gradients (10 - 40% (w/v) sucrose for procapsids, and 10 - 50% (w/v) Optiprep for mature capsids), and the protein content of the fractions was analysed by SDS-PAGE (Fig. S2). Fractions containing the uncleaved α protein and the cleaved β protein were pooled separately to give samples of purified procapsids and capsids, respectively. Visualisation by negative stain TEM showed that the purified procapsids had a diameter of ~48 nm and appeared porous due to penetration of stain within their cores and were heterogenous (Fig. 1e), while the mature capsids were compact and impermeable to stain, with a diameter of ~42 nm (Fig. 1f). These morphologies are similar to those observed for the equivalent NwV VLPs produced in insect cells¹². For both procapsids and mature capsids, the yield of VLPs was in the range 0.1 - 0.25 mg of purified protein per gram of fresh weight infiltrated leaf tissue.

Functional properties of plant-produced NwV VLPs.

To determine whether the α protein in plant-produced procapsids can undergo the autocatalytic cleavage associated with maturation *in vitro*, the pH of a suspension was rapidly reduced from pH 7.6 to pH 5.0 and the extent of α protein cleavage monitored by SDS-PAGE (Fig 2a). This showed that cleavage occurred with a half-life of 45 to 60 minutes, compared with a half-life of 30 minutes for a sample of procapsids

produced in insect cells that was analysed in parallel (Fig. 2b), the latter result being consistent with that reported previously²⁵. Coat protein dimers also shifted in size, indicating that the dimerization does not inhibit cleavage (Fig. 2a). As autocatalysis depends on the precise positioning of amino acids to a fraction of an Ångstrom²⁶, this finding demonstrates the fidelity of NwV VLP assembly in plants.

To assess the functionality of the γ peptide released during the pH-induced maturation of plant-produced procapsids *in vitro*, samples were mixed with DOPC liposome preparations at pH values from 5.0 to 9.0. As a control, VLPs produced in insect cells matured at pH 5.0 were analysed in parallel. These membrane disruption assays demonstrated that mature VLPs from both plants and insect cells, have similar lytic activity at alkaline pH (Fig. 3a). However, the plant-produced NwV VLPs had a slightly higher initial rate of liposome lysis than the insect-cell produced particles (Fig. 3b).

Structure analysis of NwV VLPs.

NwV procapsids purified from plants were analysed by cryo-electron microscopy. The particles were structurally heterogeneous, with many being broken or distorted (Figs. 1e and S3a), thereby limiting the resolution of the subsequent reconstruction. However, at 6.6 Å, the plant-produced procapsid model is the highest resolution structure of the NwV procapsid currently available (Fig. 4a, c); the previously published NwV procapsid structure being at only 28 Å resolution⁹.

The more robust capsid VLPs (Figs. 2f and S3b) enabled a 3D reconstruction at 2.7 Å resolution, the highest resolution structure available for NwV (Fig. 4b, d). Comparison with the 2.8 Å resolution crystal structure from authentic virions (PDB 1OHF) revealed that the virion and plant-expressed VLP capsids are virtually

indistinguishable, with an rmsd in C α atoms of 0.461 Å between asymmetric units (ASU; based on 2,256 aligned residues). Thus, this capsid structure demonstrates that NwV VLPs produced in plants must initially assemble in a way that facilitates the authentic maturation pathway, and that plant-based expression systems are therefore able to support the complex maturation pathways of animal viruses.

Figure 5 shows the density of the procapsid (a) and capsid (b) rendered in colors that depict the 4 subunits in the icosahedral asymmetric unit; A (blue), clustered around the icosahedral 5-fold axes and B (red), C (green) and D (yellow) clustered around the quasi-3-fold axes. Figure 5 c and d show the change in density (viewed from inside the particle) between procapsid (c) and capsid (d) at the quasi-2-fold axes that relate an A, B, C trimer to the D, D, D trimer.

The model derived from the procapsid density was initially based on the rigid body fit of the jellyroll and Ig domains (residues 117-532) into the envelope of density that clearly defined their positions and orientations in all four subunits within the icosahedral asymmetric unit. The N-terminal residues (44-116) and C-terminal residues (533-644) were modelled with approximate reference to the equivalent residues clearly defined in the capsid. The modelling was aided by the equivalence of the density in the terminal regions in all four subunits of the procapsid, which is not the case in the capsid (Figure 6). Treating the four subunit models as equivalent reduced the parameters and improved the confidence in the final coordinates.

Discussion

The present study demonstrates that it is possible to recapitulate the complex maturation process involved in the production of NwV VLPs in plants. While plants

have previously been used to make capsids of viruses which require processing of the precursor protein by a viral protease, such as cowpea mosaic virus and poliovirus^{19,21}, the production of a VLP that can undergo large-scale structural rearrangements and effect a precise autoproteolytic cleavage has not previously been demonstrated in plants, and so the results described here for NwV are unique.

When the NwV coat protein was expressed in plants, cleavage of the α protein increased with the time that the particles remained in the plant. These results were unexpected since insect cell expression results exclusively in the production of procapsids, containing the uncleaved α protein, when VLPs are purified at pH 7.6^{8,9}, with cleavage only occurring upon acidification *in vitro*. The autocatalytic cleavage of nonenveloped virus coat proteins has usually evolved to occur in the extracellular environment, avoiding the generation of membrane-disruptive peptides inside the already-infected host cell²⁷. The *in planta* maturation observed here could arise from acidification of the environment over time. Although the pH of the plant cytoplasm is believed to be around 7.5, other compartments, such as the apoplast and vacuole, are more acidic^{28,29}. Thus, tissue senescence could result in acidification of the environment where the VLPs accumulate. However, alternative explanations, such as an altered concentration of RNA in plant-expressed VLPs triggering maturation cannot be ruled out, as such a role for RNA has been found in the closely related tetravirus, *Helicoverpa armigera* stunt virus (HasV)³⁰.

Although the *in vitro* maturation and liposome lysis experiments demonstrate the biological functionality of plant-produced NwV VLPs, some differences in the kinetics of both processes are apparent. The rate and efficiency of autocatalytic cleavage were both lower than found with those made in insect cells. By contrast, plant-derived particles have slightly higher initial lytic activity than insect produced VLPs.

These differences could be a consequence of differences in the dynamic properties of the particles produced in the two systems. One plausible cause of such changes could be the coat protein dimers that are present only in plant-derived particles; these could affect the efficiency of the quaternary rearrangements which accompany maturation.

We were able solve the structure of plant-produced procapsids to 6.6 Å resolution and the structure of mature capsids to 2.7 Å resolution allowing comparison of the structures before and after maturation. The most dramatic aspect of the transition from procapsid to capsid is the ~30 Å translation-rotation of the subunits from a maximum radius 240 Å to the capsid radius of 210 Å. Due to the 6.6 Å resolution of the procapsid density and the remarkable correspondence when the density of the four subunit volumes was superimposed, in the refinement procedure we enforced structural equivalence on the four procapsid subunit models in the icosahedral asymmetric unit. The 2.7 Å resolution of the capsid allowed subunit models to be constructed and refined independently with no symmetry constraints within the icosahedral asymmetric unit. Figure 7 depicts the large-scale transitions graphically with selected amino acids lying close to the geometric centres of the Ig, jellyroll and helical domains of the procapsid and capsid states and the vectors connecting these equivalent residues. Upon first inspection, the variations in vector lengths for the different subunit pairs suggest that the domains move relative to one another and along different trajectories depending on the subunit type. However, a superposition of the four capsid subunit types onto the procapsid subunit (not shown) reveals that equivalent marker atoms correspond closely in position. This shows that the relative placement of the three domains is essentially static and therefore the differences in the trajectory lengths between the subunit pairs mostly reflect different combinations of

rigid body translations and rotations of the subunits rather than conformational rearrangements.

Regardless of the model interpretation in the procapsid, it is striking that the interior density in regions that must be occupied by the N and C terminal regions, is virtually identical in all four subunits in the icosahedral asymmetric unit (Figure 6). This is not the case in the capsid, demonstrating that subunits transition from being equivalent prior to assembly to being virtually equivalent in the initial procapsid assembly product to being non-equivalent in the capsid. This requires that, in addition to the large rigid body motions described above, the N and C-terminal regions that comprise the inner helical domain refold into different conformations despite having identical amino acid sequences. The refolding has two consequences obvious in the capsid structure. First, the active site for the autocatalytic cleavage is formed in all subunits when the catalytic residue Glu 103 moves some 16 Å to function as a base for the formation of a cyclic imide and cleavage between residues Asn570 and Phe571 (Figures 8 and S1). Since all of the residues required for the cleavage are on the same polypeptide chain and cleavage does not occur in the procapsid, a refolding mechanism is the only way to create the active site. Second, residues 600-644 form extended helices in only the C and D subunits where they function as a switch to promote the flat contacts between the C and D subunits related by quasi-2-fold axes and also to stabilize the particle (Figure 5). Indeed, the majority of the large structural rearrangements in the helical domains occur at the periphery where they interface with neighbouring subunits or form the inner surface of the particle. The procapsid structure provides new insights into the refolding required to achieve maturation and cleavage. Although much more detailed, the overall description above supports the account by Canady et al⁹ comparing the procapsid structure (based on rigid body fitting of four

capsid subunit models into the procapsid 28 Å cryo-EM density) and the mature virus structure. They proposed that the basic units of procapsid assembly are weakly interacting solution dimers that associate into weakly interacting trimers to form the fragile, spherical, procapsid structure of 240 virtually identical quasi-equivalent subunits. The fragility of the procapsid at neutral pH due to electrostatic repulsions, but it is primed to mature into the infectious virion at pH 5.0. During maturation, the subunits differentiate into tight trimers (the dominant morphological feature on the capsid surface) stabilized by the associated maturation cleavage. The newly determined procapsid structure reported here has allowed the molecular details of this process to be revealed. The stability of intermediates at different pH values suggests that the two-state system described here can be elaborated into a “movie” with the frames determined by the structures at different pH values.

Materials & Methods

Plasmids

The sequence encoding the NwV α coat protein Genbank MT875167, was codon optimized for *Nicotiana benthamiana* and synthesized by GeneArt (Life Technologies) with the flanking restriction sites AgeI and Xhol and a Kozak consensus sequence (TAACA) at the start of the coding sequence³¹. The gene was cloned into an AgeI/Xhol-digested pEAQ-HT plasmid²³ to produce pEAQ-HT-NwV. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 were transformed with the construct by electroporation and bacterial suspension were infiltrated into plants as previously described^{22,24}. For the production of NwV α coat protein in insect cells, a pFastBac vector harbouring the NwV sequence (Genbank MT875167) was used with the Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (Invitrogen), as previously described¹⁵.

Preparation and visualisation of leaf sections

Infiltrated leaves were cut into 1 mm² fragments and fixed overnight in a solution of 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate, pH 7.3. Subsequent treatment was carried out as described by Meshcheriakova and Lomonossoff (2019)³².

Small-scale protein extraction

Tissue agroinfiltrated with pEAQ-HT-N ω V-WT was harvested at various days post-infiltration and samples of approximately 110-130 mg of fresh weigh material were immediately frozen in liquid nitrogen and then stored at -80 °C. The frozen leaf disks were ground and the powdered tissue was mixed with 200 μ l of extraction buffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7.6) + 100 μ l of 4x NuPAGE LDS sample buffer (Invitrogen) containing β -mercaptoethanol (3:1 ratio) and immediately heated to 100°C for 20 minutes. The samples were centrifuged at 16,000 \times g for 30 minutes and the supernatant analysed on SDS-PAGE gels.

Particle purification

Leaves of *N. benthamiana* agroinfiltrated with pEAQ-HT-N ω V were homogenised in two and a half volumes of extraction buffer (50 mM Tris, 250 mM NaCl, pH 7.6) using a waring blender. The crude extract was filtered through two layers of Miracloth (Millipore) and then centrifuged at 15,000 \times g for 20 minutes at 11 °C. To purify procapsids, the supernatant was centrifuged through a 30% (w/v) sucrose cushion prepared in the same buffer as described by Peyret (2015)³³. The resuspended pellets were clarified at 12,000 \times g for 30 minutes at 11 °C and the supernatant was ultracentrifuged through 10-40% (w/v) continuous sucrose gradients. To purify mature

capsids the clarified extracts were directly centrifuged through 10–50% (w/v) Optiprep gradients. In both cases the gradients were prepared in extraction buffer. Gradient fractions containing either procapsids or mature capsids were identified by SDS-PAGE, pooled and the samples further purified and concentrated using centrifugal filters (Amicon®, Merck) with a molecular weight cut-off (MWCO) of 100 kDa. The concentrated VLPs were stored in the fridge at 4 °C.

Purification of NwV VLPs produced in insect cells was performed as previously described¹⁵.

SDS-PAGE and western blot analysis

Protein extracts were analysed by electrophoresis on 4-12% (w/v) NuPAGE Bis-Tris gels (Life Technologies). The gels were either stained with Instant Blue (Expedeon) or the proteins transferred to nitrocellulose membranes for western blot analysis. Specific proteins were detected using an NwV polyclonal antibody raised in rabbits followed by detection with a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase and developed using the chemiluminescent substrate Immobilon Western (Millipore).

Transmission electron microscopy of negatively stained particles

Grids for negative staining were generated by applying 3 µl of sample (~0.1 to 1 mg/ml) on to carbon-coated 400 mesh copper grids (EM Resolutions). Prior to applying the sample, grids were glow-discharged for 20 seconds at 10 mA (Leica EM ACE200). Excess liquid was removed, and the grid was stained with 2% (w/v) uranyl acetate for 30 seconds. Grids were viewed using a FEI Tecnai G2 20 TWIN or FEI Talos 200C

TEM (FEI UK Ltd) at 200 kV and imaged using either an AMT XR-60 or OneView 4k x 4k digital camera (Gatan).

Autocatalytic cleavage assays

One volume of NwV procapsids suspended in 10 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, pH 7.6 was mixed with 9 volumes of 100 mM NaOAc, 250 mM NaCl, pH 5.0. The reactions were incubated at room temperature and stopped by adding protein loading buffer and immediately freezing the mixture with liquid nitrogen. The SDS-PAGE analysis was used to quantify cleavage by densitometry analysis of the stained gels as previously described²⁵.

Membrane disruption assays

Liposomes composed of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Avanti Polar Lipids, Inc.) and containing sulforhodamine B (SulfoB; Invitrogen/Molecular Probes), a fluorescent dye, were prepared as previously described³⁴. For the membrane disruption assays, the liposome suspensions in 10 mM HEPES buffer (pH 7.0) were diluted 100 X in the assay buffers: 100 mM Tris, 250 mM NaCl (adjusted to pH 7.5 – 9.5) or 100 mM sodium acetate, 250 mM NaCl (adjusted to pH 5.0 – 7.0). The initial fluorescence intensity of the liposome suspension was measured with a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian), with an excitation wavelength of 535 nm and an emission wavelength of 585 nm. When the reading was stable, the NwV procapsids or capsids were added to the liposome suspension to the required final concentration and incubated for 5 to 20 min at room temperature. During the incubation, the fluorescence intensity variations were recorded. Finally, Triton X-100 was added to the liposome suspension to a final concentration of 0.1% (v/v) to determine 100% dye release. The analysis of the data was performed as previously described¹⁵.

Cryo-electron microscopy

Cryo-EM grids were prepared by applying 3 µl of sample (~0.2 to 0.4 mg/ml) to 400 mesh copper grids with a supporting carbon lacey film (Agar Scientific, UK) held on an automatic plunge freezer (Vitrobot Mk IV). The lacey carbon was coated with an ultra-thin carbon support film, less than 3 nm thick (Agar Scientific, UK). Prior to applying the sample, grids were glow-discharged for 30 seconds (easiGlow, Ted Pella). The samples were vitrified by flash-freezing in liquid ethane, cooled by liquid nitrogen.

Data were collected on an FEI Titan Krios EM at 300 kV (Astbury Biostructure Laboratory, University of Leeds). The exposures were recorded using the EPU automated acquisition software on a FEI Falcon III direct electron detector. Micrographs were collected at a resolution of 1.065 Å/pixel. Movie stacks were motion-corrected and dose-weighed using MOTIONCOR2³⁵ (Fig. S3). CTF estimation was performed using GCTF³⁶ and particles were picked using RELION^{37,38}. The autopicking was performed using 2D templates generated after an initial run without reference templates (Laplacian). Subsequent data processing was carried out using the RELION 2.1/3.0 pipeline^{37–39} (Figs. S3 and S4) with the imposition of icosahedral symmetry for the 3D reconstructions. The capsid model was generated first, starting from the previously published crystal structure of the authentic virus (PDB entry 1OHF)^{40,41}. The asymmetric unit (ASU), comprised of four protein chains, was rigid body fitted to the sharpened map in Chimera⁴². To expedite computation, for the subsequent steps, the ASU was visualised, manipulated and refined in the context of its eight nearest symmetry copies, denoted ASU8 (Fig. S5), and maps were cropped to cover just ASU8 with a 15 Å border using phenix.map_box⁴³. The model was edited using COOT⁴⁴ with reference to unsharpened and sharpened maps and refined using

phenix.real_space_refine⁴³ against the latter. An updated ASU8 was generated from the central ASU after each refinement job. Validation of the final model was performed on the full capsid using Molprobity⁴⁵ and EMRinger⁴⁶ through the Phenix interface⁴⁷. The final capsid model was used as the starting point for generating the model of the procapsid using a similar protocol. After sharpening in Relion, the resolution of the procapsid reconstruction was estimated to be 7.1 Å. However, after density modification with phenix.resolve_cryo_em⁴⁸ this increased to 6.6 Å, giving a concomitant improvement in the map quality, especially in regions where the structure was less well defined. Nevertheless, at this resolution, there was no discernible difference between the density for the subunits, thus non-crystallographic symmetry constraints were imposed to facilitate refinement, which was performed against the density improved map; Ramachandran restraints were also used. A summary of data collection, processing and analysis is given in Table S1. Structural figures were prepared using Chimera⁴² and ChimeraX⁴⁹.

Acknowledgments

The authors thank Elaine Barclay and Kim Findlay for TEM training and assistance with TEM sample preparation, Maite Vaslin de Freitas Silva for supplying plants and reagents in Brazil and Tsutomu Matsui for discussions on the biophysics of NuV. We thank Matt Byrne and Tom Dendooven for helpful discussions about cryo-EM data processing. At the John Innes Centre, this work was supported by the United Kingdom Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) Synthetic Biology Research Center “OpenPlant” award (BB/L014130/1), the Institute Strategic Programme Grant “Molecules from Nature – Enhanced Research Capacity” (BBS/E/J/000PR9794), a capital grant award (BBSRC) to establish Cryo-EM capability

at the John Innes Centre and the John Innes Foundation. The experiments done at Universidade Federal do Rio de Janeiro were supported by Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico, CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, FAPERJ. The ThermoFisher Titan Krios microscopes were funded by the University of Leeds (UoL ABSL award) and Wellcome Trust (108466/Z/15/Z).

Author contributions

R.C-G, J.R.S.R., E.L.H., C.A.S. and D.M.L. carried out the experiments and analysed data. G.P.L., J.E.J., T.D. and N.A.R. conceived and directed the project. All authors contributed to the writing and editing of the manuscript.

Competing interest statement

G.P.L. declares that he is a named inventor on granted patent WO 29087391 A1 which describes the HyperTrans expression system and associated pEAQ vectors used in this manuscript.

References

1. Pornillos, O. & Ganser-Pornillos, B. K. Maturation of retroviruses. *Current Opinion in Virology* **36**, 47–55 (2019).
2. Sirohi, D. & Kuhn, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *The Journal of Infectious Diseases* **216**, S935–S944 (2017).
3. Heymann, J. B., Conway, J. F. & Steven, A. C. Molecular dynamics of protein complexes from four-dimensional cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **147**, 291–301 (2004).
4. Kearney, B. & Johnson, J. Assembly and Maturation of a T = 4 Quasi-Equivalent Virus Is Guided by Electrostatic and Mechanical Forces. *Viruses* **6**, 3348–3362 (2014).

5. Hanzlik, T. N. & Gordon, K. H. J. The Tetraviridae. in *Advances in Virus Research* (eds. Maramorosch, K., Murphy, F. A. & Shatkin, A. J.) vol. 48 101–168 (Academic Press, 1997).
6. Speir, J. A. & Johnson, J. E. Tetraviruses. in *Encyclopedia of Virology* 27–37 (Oxford: Elsevier, 2008).
7. Agrawal, D. K. & Johnson, J. E. Sequence and analysis of the capsid protein of *Nudaurelia capensis* ω virus, an insect virus with $T = 4$ icosahedral symmetry. *Virology* **190**, 806–814 (1992).
8. Agrawal, D. K. & Johnson, J. E. Assembly of the $T = 4$ *Nudaurelia capensis* ω virus capsid protein, post-translational cleavage, and specific encapsidation of its mRNA in a baculovirus expression system. *Virology* **207**, 89–97 (1995).
9. Canady, M. A., Tihova, M., Hanzlik, T. N., Johnson, J. E. & Yeager, M. Large conformational changes in the maturation of a simple RNA virus, *Nudaurelia capensis* ω virus (NωV). *Journal of Molecular Biology* **299**, 573–584 (2000).
10. Matsui, T., Tsuruta, H. & Johnson, J. E. Balanced Electrostatic and Structural Forces Guide the Large Conformational Change Associated with Maturation of $T = 4$ Virus. *Biophysical Journal* **98**, 1337–1343 (2010).
11. Canady, M. A., Tsuruta, H. & Johnson, J. E. Analysis of rapid, large-scale protein quaternary structural changes: time-resolved X-ray solution scattering of *Nudaurelia capensis* ω virus (NωV) maturation. *Journal of Molecular Biology* **311**, 803–814 (2001).
12. Taylor, D. J., Krishna, N. K., Canady, M. A., Schneemann, A. & Johnson, J. E. Large-scale, pH-dependent, quaternary structure changes in an RNA virus capsid are reversible in the absence of subunit autoproteolysis. *Journal of Virology* **76**, 9972–9980 (2002).
13. Banerjee, M. & Johnson, J. E. Activation, exposure and penetration of virally encoded, membrane-active polypeptides during non-enveloped virus entry. *Current Protein & Peptide Science* **9**, 16–27 (2008).
14. Domitrovic, T. *et al.* Virus assembly and maturation: Auto-regulation through allosteric molecular switches. *Journal of Molecular Biology* **425**, 1488–1496 (2013).
15. Domitrovic, T., Matsui, T. & Johnson, J. E. Dissecting Quasi-Equivalence in Nonenveloped Viruses: Membrane Disruption Is Promoted by Lytic Peptides Released from Subunit Pentamers, Not Hexamers. *J Virol* **86**, 9976–9982 (2012).
16. Dow, J. pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.* **172**, 355 (1992).
17. Byrne, M. J. *et al.* Combining Transient Expression and Cryo-EM to Obtain High-Resolution Structures of Luteovirid Particles. *Structure* **27**, 1761–1770.e3 (2019).

18. Castells-Graells, R., Lomonossoff, G. P. & Saunders, K. Production of Mosaic Turnip Crinkle Virus-Like Particles Derived by Coinfiltration of Wild-Type and Modified Forms of Virus Coat Protein in Plants. in *Virus-Derived Nanoparticles for Advanced Technologies: Methods and Protocols* (eds. Wege, C. & Lomonossoff, G. P.) 3–17 (Springer New York, 2018). doi:10.1007/978-1-4939-7808-3_1.
19. Marsian, J. *et al.* Plant-made polio type 3 stabilized VLPs—a candidate synthetic polio vaccine. *Nature Communications* **8**, 245 (2017).
20. Marsian, J. *et al.* Plant-Made Nervous Necrosis Virus-Like Particles Protect Fish Against Disease. *Frontiers in Plant Science* **10**, 880 (2019).
21. Saunders, K., Sainsbury, F. & Lomonossoff, G. P. Efficient generation of cowpea mosaicvirus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants. *Virology* **393**, 329–337 (2009).
22. Thuenemann, E. C., Meyers, A. E., Verwey, J., Rybicki, E. P. & Lomonossoff, G. P. A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: assembly of protective bluetongue virus-like particles. *Plant Biotechnology Journal* **11**, 839–846 (2013).
23. Sainsbury, F., Thuenemann, E. C. & Lomonossoff, G. P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 682–693 (2009).
24. Berardi, A., Castells-Graells, R. & Lomonossoff, G. P. High stability of plant-expressed virus-like particles of an insect virus in artificial gastric and intestinal fluids. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **155**, 103–111 (2020).
25. Matsui, T., Lander, G. & Johnson, J. E. Characterization of large conformational changes and autoproteolysis in the maturation of a T=4 virus capsid. *Journal of Virology* **83**, 1126–1134 (2009).
26. Zlotnick, A. *et al.* Capsid assembly in a family of animal viruses primes an autoproteolytic maturation that depends on a single aspartic acid residue. *J Biol Chem* **269**, 13680–13684 (1994).
27. Veesler, D. & Johnson, J. E. Virus maturation. *Annu. Rev. Biophys.* **41**, 473–496 (2012).
28. Martinière, A. *et al.* In Vivo Intracellular pH Measurements in Tobacco and Arabidopsis Reveal an Unexpected pH Gradient in the Endomembrane System[W]. *Plant Cell* **25**, 4028–4043 (2013).
29. Martinière, A. *et al.* Uncovering pH at both sides of the root plasma membrane interface using noninvasive imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 6488–6493 (2018).
30. Penkler, D. L. *et al.* Binding and entry of a non-enveloped T=4 insect RNA virus is triggered by alkaline pH. *Virology* **498**, 277–287 (2016).

31. Castells-Graells, R. Viruses in motion: maturation of an insect virus-like particle – a nanomachine. (University of East Anglia - John Innes Centre, 2019).
32. Meshcheriakova, Y. & Lomonossoff, G. P. Amino acids at the exposed C-terminus of the S coat protein of cowpea mosaic virus play different roles in particle formation and viral systemic movement. *J Gen Virol* **100**, 1165–1170 (2019).
33. Peyret, H. A protocol for the gentle purification of virus-like particles produced in plants. *Journal of Virological Methods* **225**, 59–63 (2015).
34. Odegard, A. L. *et al.* Low Endocytic pH and Capsid Protein Autocleavage Are Critical Components of Flock House Virus Cell Entry. *J Virol* **83**, 8628–8637 (2009).
35. Zheng, S. Q. *et al.* MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nature Methods* **14**, 331–332 (2017).
36. Zhang, K. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *Journal of Structural Biology* **193**, 1–12 (2016).
37. Scheres, S. H. W. RELION: Implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology* **180**, 519–530 (2012).
38. Zivanov, J. *et al.* New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife* **7**, e42166 (2018).
39. Kimanius, D., Forsberg, B. O., Scheres, S. H. & Lindahl, E. Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2. *eLife* **5**, e18722 (2016).
40. Helgstrand, C., Munshi, S., Johnson, J. E. & Liljas, L. The refined structure of Nudaurelia capensis ω Virus reveals control elements for a T = 4 capsid maturation. *Virology* **318**, 192–203 (2004).
41. Munshi, S. *et al.* The 2.8 Å structure of a T=4 Animal virus and its implications for membrane translocation of RNA. *Journal of Molecular Biology* **261**, 1–10 (1996).
42. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605–1612 (2004).
43. Afonine, P. V. *et al.* Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* **74**, 531–544 (2018).
44. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **66**, 486–501 (2010).
45. Williams, C. J. *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science* **27**, 293–315 (2018).

46. Barad, B. A. *et al.* EMRinger: side chain–directed model and map validation for 3D cryo-electron microscopy. *Nature Methods* **12**, 943–946 (2015).
47. Afonine, P. V. *et al.* New tools for the analysis and validation of cryo-EM maps and atomic models. *Acta Cryst D* **74**, 814–840 (2018).
48. Terwilliger, T. C., Ludtke, S. J., Read, R. J., Adams, P. D. & Afonine, P. V. Improvement of cryo-EM maps by density modification. *Nature Methods* **17**, 923–927 (2020).
49. Goddard, T. D. *et al.* UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis: UCSF ChimeraX Visualization System. *Protein Science* **27**, 14–25 (2018).
50. Taylor, D. J. Folding and particle assembly are disrupted by single-point mutations near the autocatalytic cleavage site of Nudaurelia capensis virus capsid protein. *Protein Science* **14**, 401–408 (2005).
51. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. Asparagine peptide lyases: A seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 38321–38328 (2011).

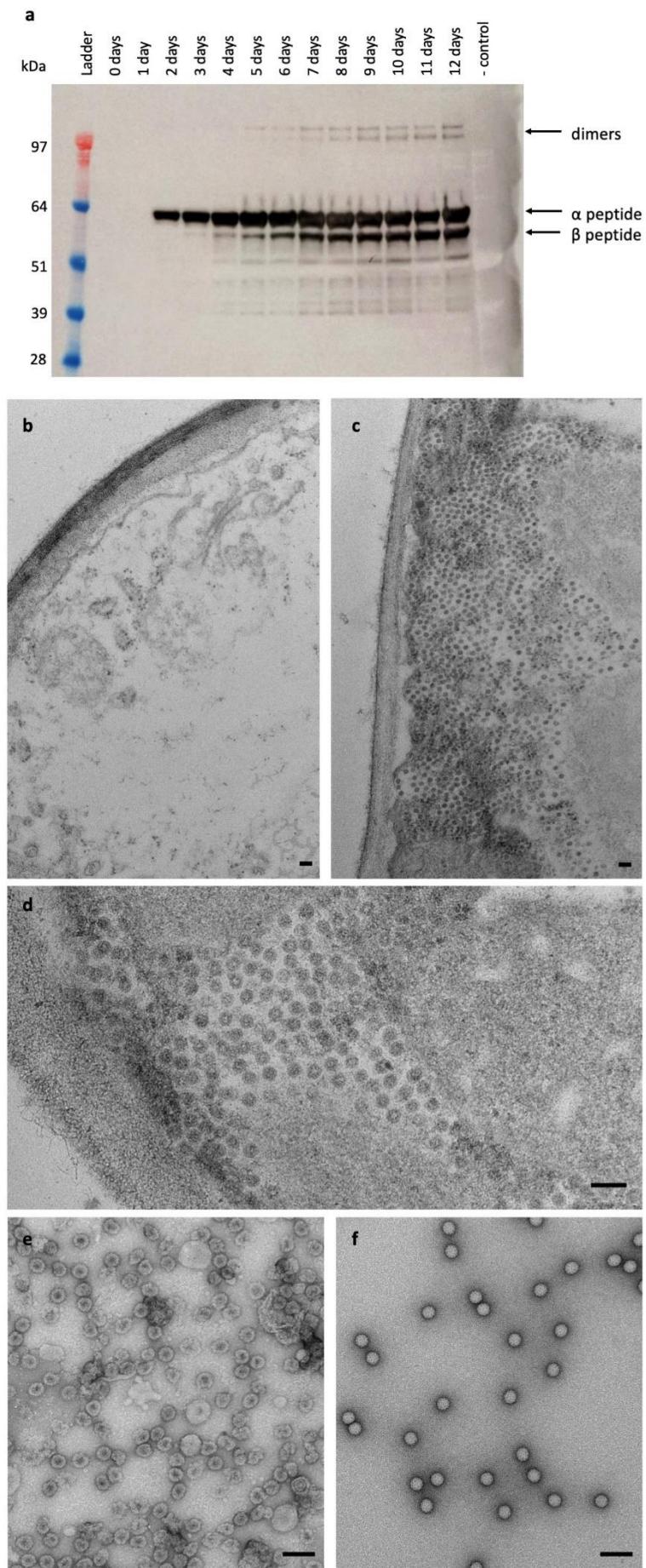


Figure 1: Expression of NwV coat protein in *N. benthamiana*. **(a)** Western blot of samples collected 0 to 12 dpi from leaves infiltrated with pEAQ-HT-NwV-WT. The negative control (- control) was from leaf material infiltrated with the pEAQ-HT (empty vector). The protein was detected using a polyclonal antibody for the NwV coat protein. The positions of the uncleaved (α) and cleaved (β) versions of the coat protein are indicated, as are the positions of the dimeric forms. Ladder = SeeBlue Plus 2 pre-stained protein standards. **(b)-(d)** Electron micrographs of thin sections of leaves 3 dpi with pEAQ-HT (b) or pEAQ-HT-NwV-WT at two different magnifications (c, d). All the leaf sections were counter-stained with uranyl acetate and lead citrate. **(e-f)** Electron micrographs of purified procapsids (e) and capsids (f) negatively stained with uranyl acetate. For all micrographs the scale bar = 100 nm.

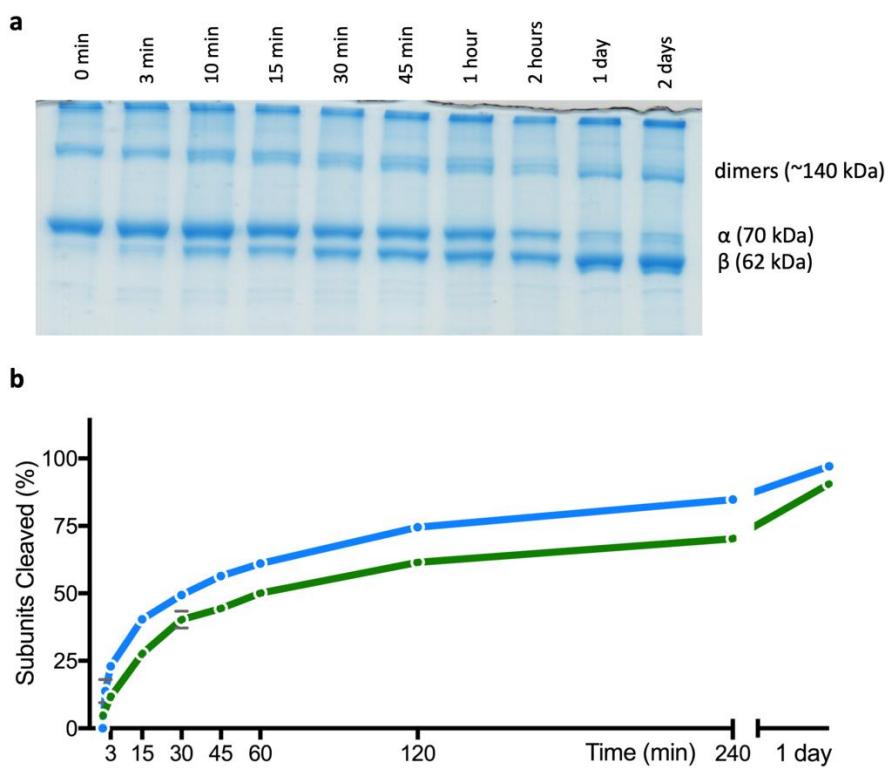


Figure 2: Autocatalytic cleavage analysis. **(a)** SDS-PAGE analysis of plant-produced procapsids incubated for different times at pH 5.0. The positions of the uncleaved α protein and the autoprocessed β protein are indicated as are the dimeric forms. **(b)** Comparison of the kinetics of cleavage of NwV procapsids from plants (green line) and insect cells (blue line). The fraction of subunits cleaved was determined by band densitometry of the stained gel image using the software ImageJ. A square of fixed size was used to delimit the gel area containing α and β proteins. Each time point was measured individually, and the program retrieved the density of each protein band. The sum of α and β signals corresponded to 100%. Therefore, the extent of cleavage corresponds to the percentage of β density in relation to the total density of each time point.

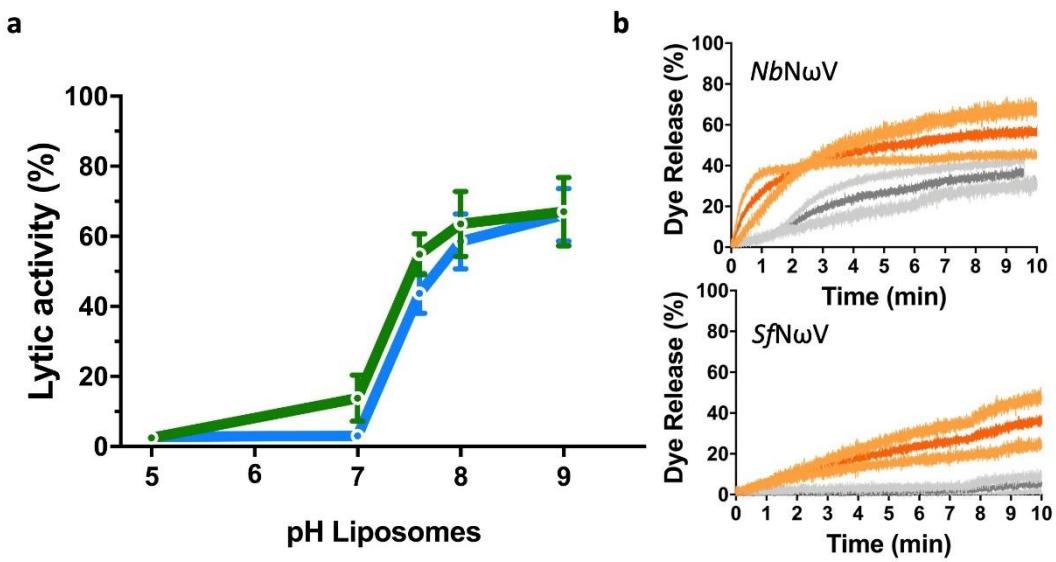


Figure 3: Membrane lytic activity of NwV VLPs produced in plants and insect cells. **(a)** Lytic activity of mature NwV VLPs expressed in plants (green line) and insect cells (blue line) against DOPC liposomes under different pH conditions (from 5.0 to 9.0). End point values were measured after 10-minute incubations with liposome preparations. Standard deviations from at least two experiments are shown as error bars. **(b)** Initial kinetics of liposome dye release at pH 7.6 induced by mature NwV VLPs produced in plants (top panel) or insect cells (bottom panel). In each case, two NwV VLP concentrations were tested, 2 µg / mL (grey lines) and 20 µg / mL (orange lines). Standard deviations from at least two experiments are shown as dashed thin lines.

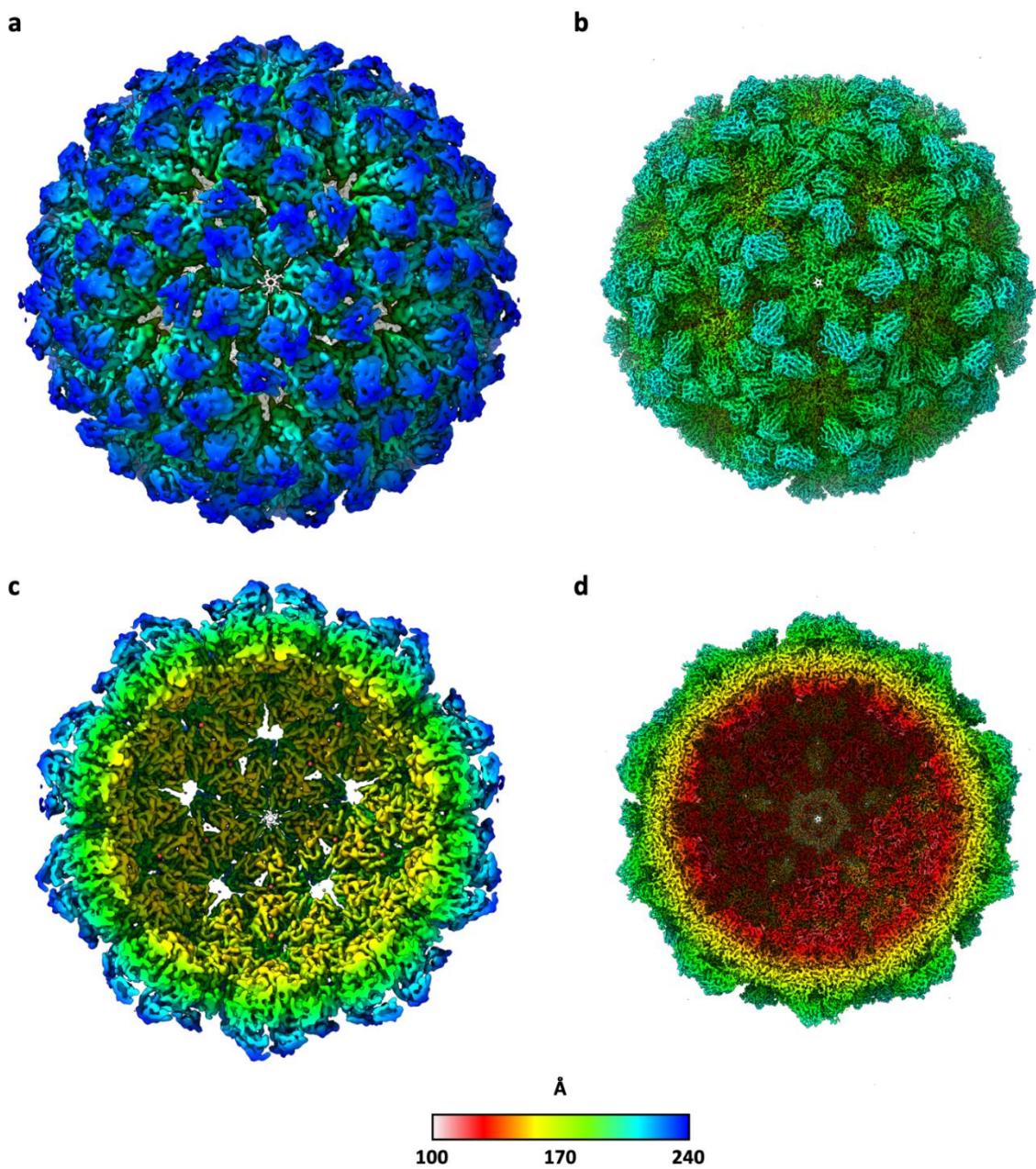


Figure 4: Radially coloured cryo-EM reconstructions of NwV VLPs highlighting the degree of compaction on transitioning from the procapsid to the capsid. Full and cutaway views of the procapsid reconstruction at 6.6 Å resolution (**a** and **c**, respectively), and for the capsid at 2.7 Å resolution (**b** and **d**, respectively) are shown as viewed down the icosahedral five-fold axis. The surfaces are coloured with respect to the distance from the centre of each particle according to the key below.

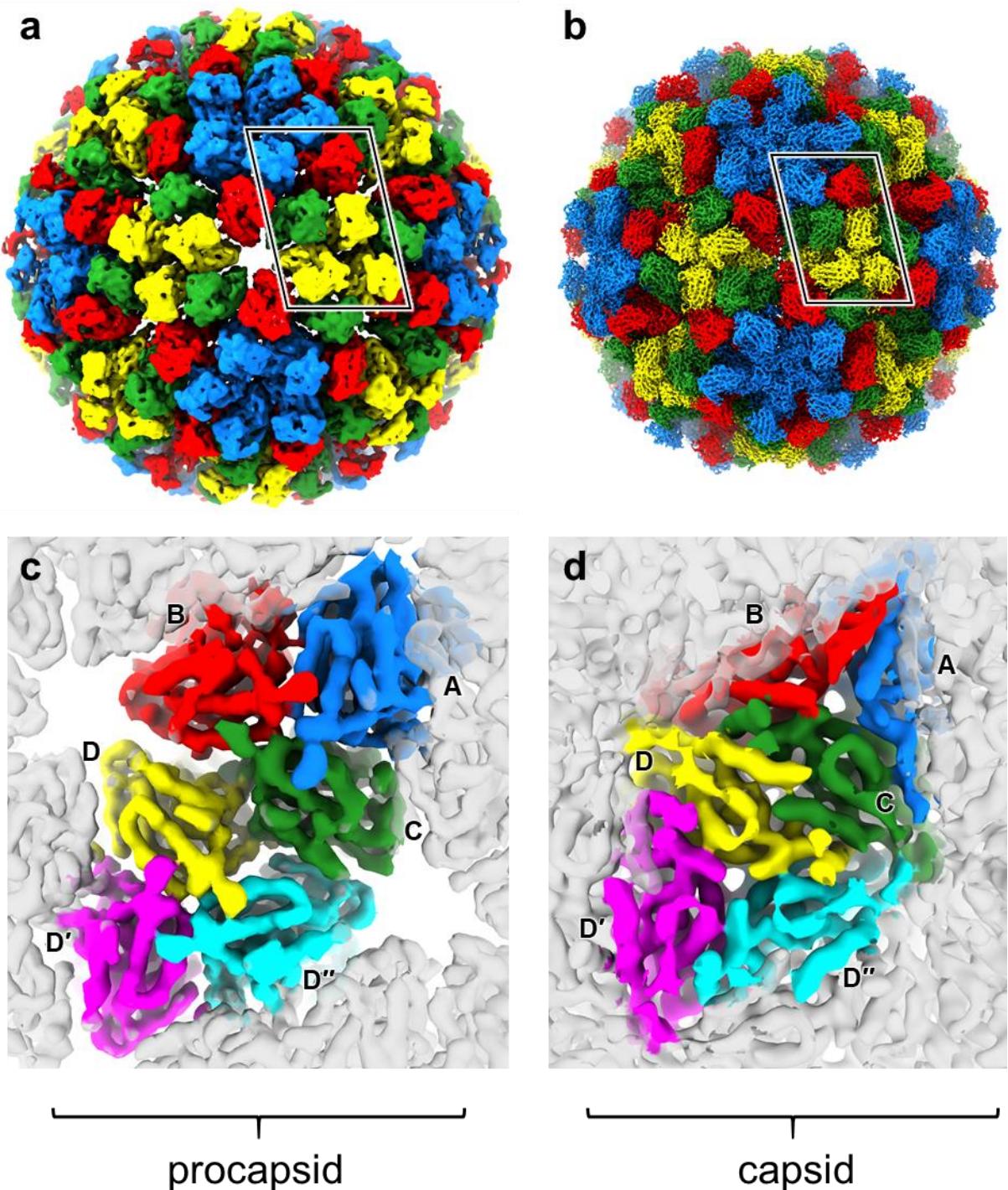


Figure 5: Cryo-EM reconstructions of NwV VLPs highlighting the quaternary structures. Reconstructions of (a) the procapsid at 6.6 Å resolution and (b) the capsid at 2.7 Å resolution as viewed down the icosahedral two-fold axis. The density associated with four 70 kDa subunits that comprise the icosahedral asymmetric unit are coloured: A – blue, B – red, C – green and D – yellow. The highlighted region is shown below as viewed from the core of the particle for (c) the procapsid and (d) the capsid. The density for the rest of the particle is shown in semi-transparent grey. For ease of comparison the capsid density has been down-sampled to 6.6 Å resolution in panel d. In both the lower panels, subunits A-C are arranged around a quasi-three-fold axis and three copies of subunit D are arranged around the

icosahedral three-fold axis (D – yellow; D' - magenta; D" - cyan; N.B. these are all yellow in panels a and b – different colours are used here to clearly define the densities associated with each subunit). Since icosahedral symmetry was imposed during reconstruction, the density associated with the three D-type subunits will be identical within each map. It is clear from these comparisons that the symmetry is very strong around the quasi-three-fold axis (A-C) in the procapsid, but is broken in the capsid. Indeed, the subunit conformations and arrangements around the two types of three-fold axes are closely similar for the procapsid (A-C vs. D-D"). Additionally, these views highlight the porous packing seen in the procapsid relative to the highly compact arrangement of subunits in the capsid.

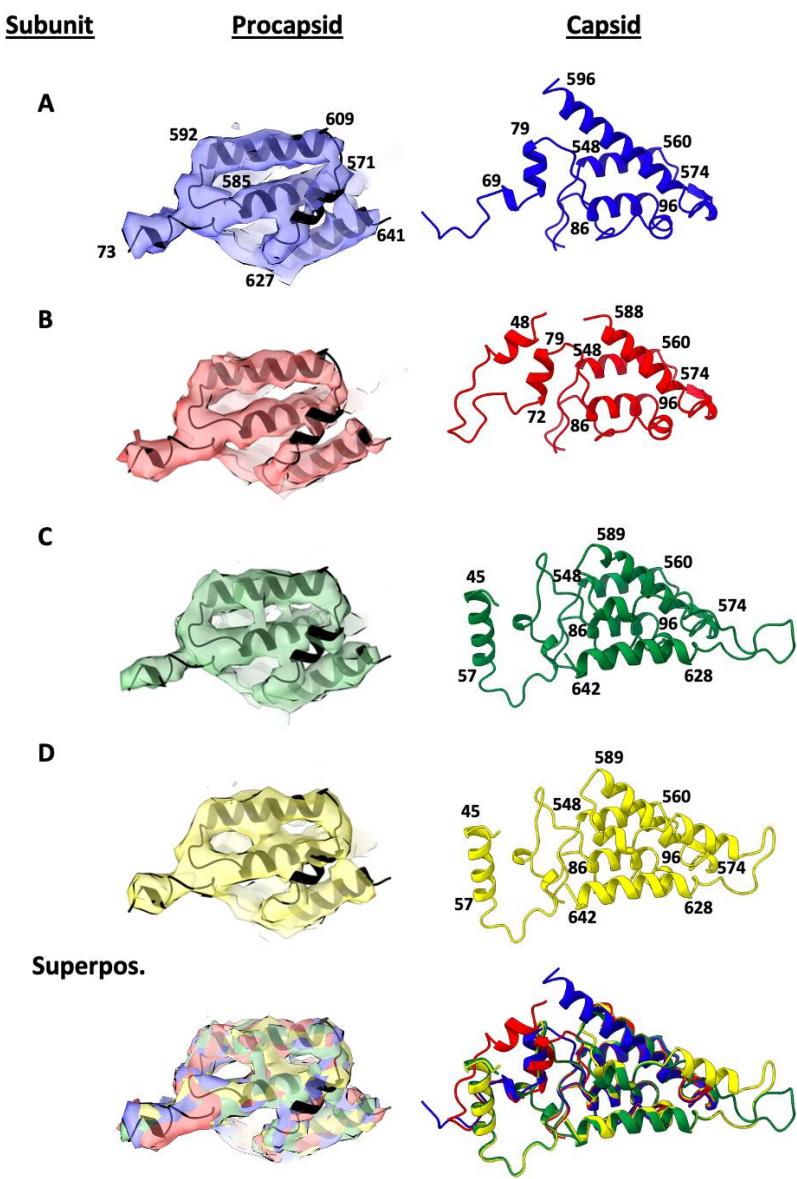


Figure 6. Internal helical domains of procapsid and capsid subunits in one icosahedral asymmetric unit. Left: Procapsid cryo-EM density (6.6 Å resolution) and model for the internal helical domain (N-terminal and gamma peptide) of subunits A, B, C, D all viewed in the same orientation. The model of the internal helical domain (in black), refined as an identical rigid body for all four subunits, precisely fits the unique cryo-EM densities for the four subunits. Superposition of the four densities and models (bottom left) demonstrates the closely similar structures in this region of the procapsid. Right: Refined capsid models (2.7 Å resolution) of the internal helical domain in each of the four subunits and their superposition (bottom) reveals large differences from each other and the procapsid demonstrating substantial refolding of these sequences during maturation.

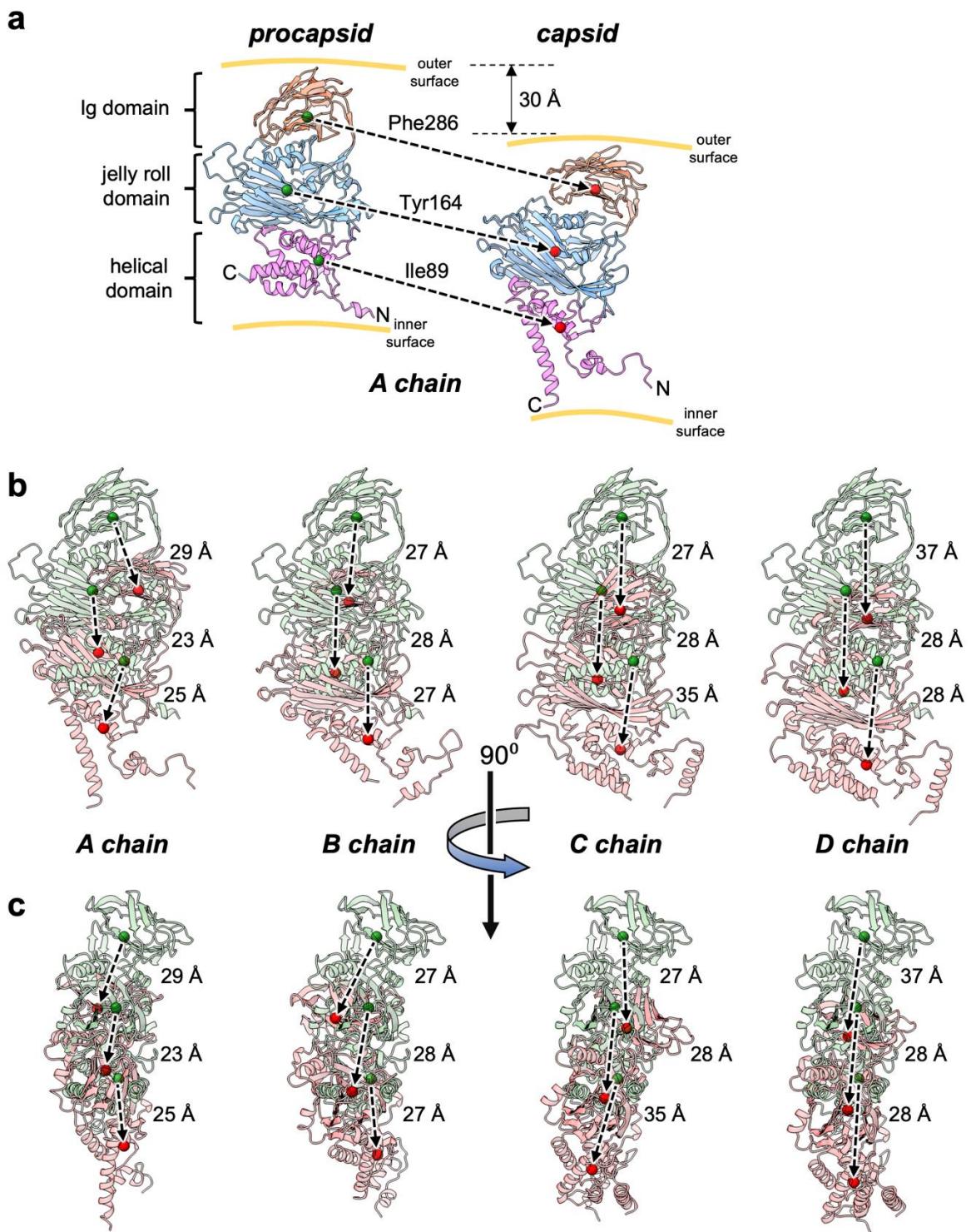


Figure 7: Trajectories of subunit motions on maturation from procapsid to capsid. In addition to the significant refolding of the helical domain during capsid maturation, the NwV subunits are translated through space by approximately 30 Å as the protein coat contracts from a diameter of roughly 480 Å to 420 Å. To track the domain movements, we have defined three marker atoms that correspond to the Ca atoms of equivalent residues in each subunit that lie close to the geometric centres of the three domains.

(a) The protein backbone is shown as a semi-transparent cartoon and the marker atoms are shown as solid spheres (procapsid = green; capsid = red) with the three domains distinguished by different colours. For clarity in panel **(a)** only, the procapsid and capsid positions (for chain A only) have been separated horizontally, whereas in all the other panels their true relative positions are shown after superposition of the full procapsid and capsid icosahedra. For ease of comparison, in each of panels **(b)** and **(c)**, the subunit pairs have been oriented with respect to the same procapsid subunit view, with procapsid and capsid cartoons distinguished by green and red colouration, respectively. The trajectories of the marker atoms are indicated by dashed arrows. The large structural rearrangements in the helical domains occur mostly at the periphery where they interface with neighboring subunits or form the inner surface of the particle; the core of this domain (including the marker atom) is essentially unchanged. Furthermore, superposition of all the capsid subunits onto the procapsid subunit reveals that equivalent marker atoms overlap closely. This indicates that the relative placement of the three domains remains effectively unchanged and therefore the differences in the trajectory lengths between the subunit pairs mostly reflect different combinations of rigid body translations and rotations of the subunits rather than conformational rearrangements.

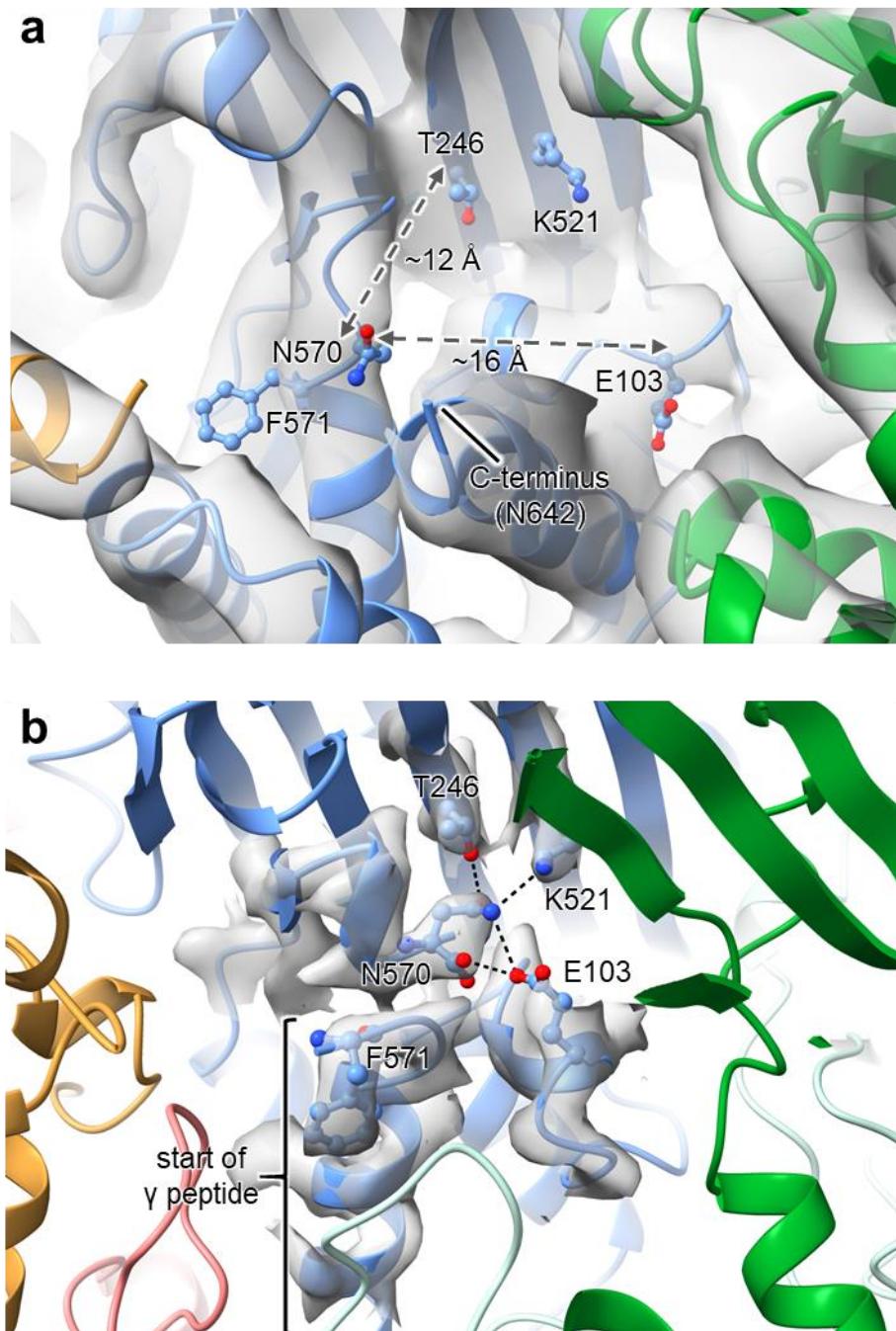


Figure 8: Structural remodelling at the NwV autocatalytic cleavage site. Close-up views of the cleavage site regions in the (a) procapsid and (b) capsid models revealing how disparate the key catalytic residues, Asn570 and Glu103, are in the procapsid as compared to their juxtaposition in the capsid following cleavage of the γ peptide (important residues are shown in ball-and-stick representation). For both models, the site in the A subunit is shown, which is coloured light blue, with neighbouring subunits depicted in different colours. Also shown are the density maps for the procapsid (6.6 Å resolution) and for the capsid (2.7 Å resolution), although for the latter, only the density associated with the highlighted residues is shown for clarity. Note that due to the low resolution of the procapsid reconstruction, the modelling of atomic coordinates is only approximate, especially for the protein side chains for which there is frequently little to no density.

Supplementary Information

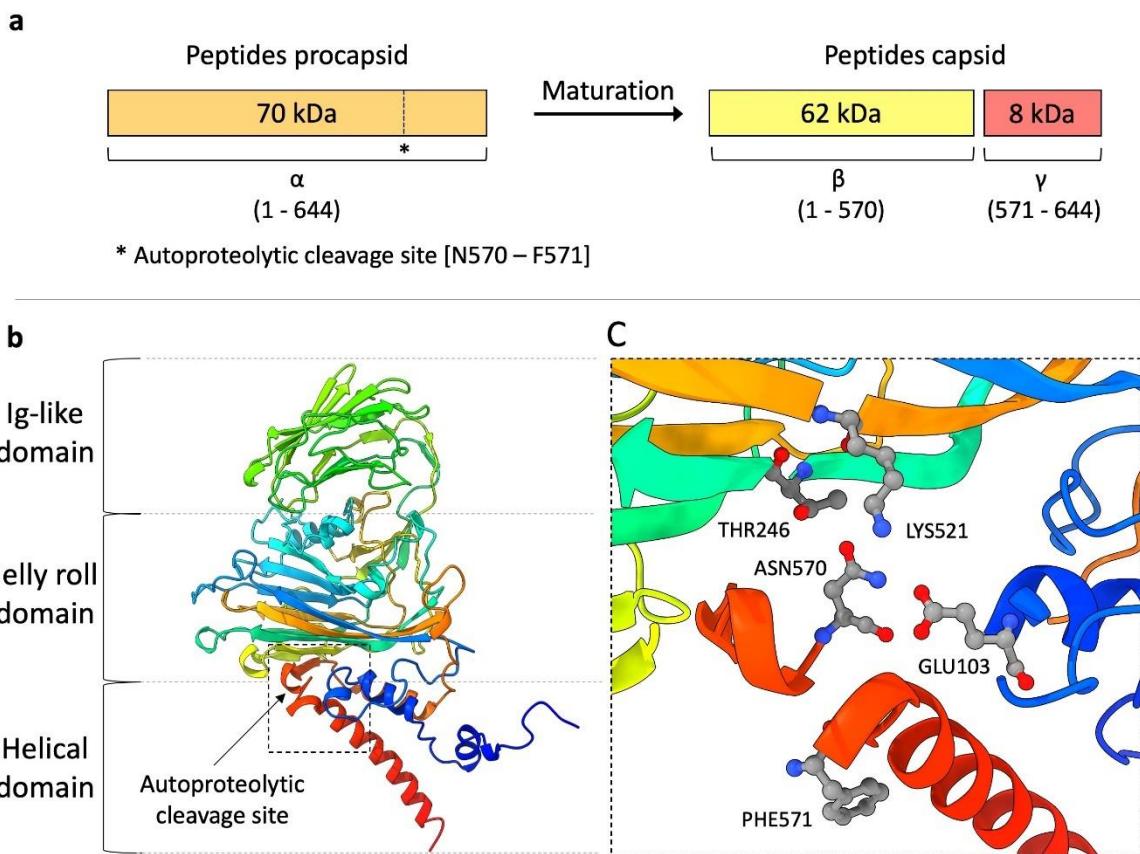


Figure S1: NwV maturation. (a) **Cleavage of the coat protein during maturation.** Schematic representation of the α protein and the cleavage site between residues N570 and F571. The subunit cleavage starts at pH 5.5 and generates the β peptide, that maintains the structure of the virus, and the γ peptide, which stays in contact with the capsid and is able to lyse cell membranes. (b) Ribbon representation of NwV capsid coat protein and autoproteolytic cleavage site showing a side view of the A subunit. The rainbow colouring of the protein starts with blue at the N-terminus and ends with red at the C-terminus and the three domains within the subunit are indicated. (c) Cleavage site for processing of the α protein. To form the cleavage site, Glu103 and Thr246 or Lys521 form hydrogen bonds with the side chain of Asn570 to move it to the optimal location for autoproteolytic cleavage⁵⁰. In the active site, the catalytic dyad consists of Asn570 and Glu103. This type of proteolytic enzyme is classified as an asparagine peptide lyase⁵¹. Structure obtained from PDB entry 1OHF^{40,41}. Images generated using ChimeraX⁴⁹.

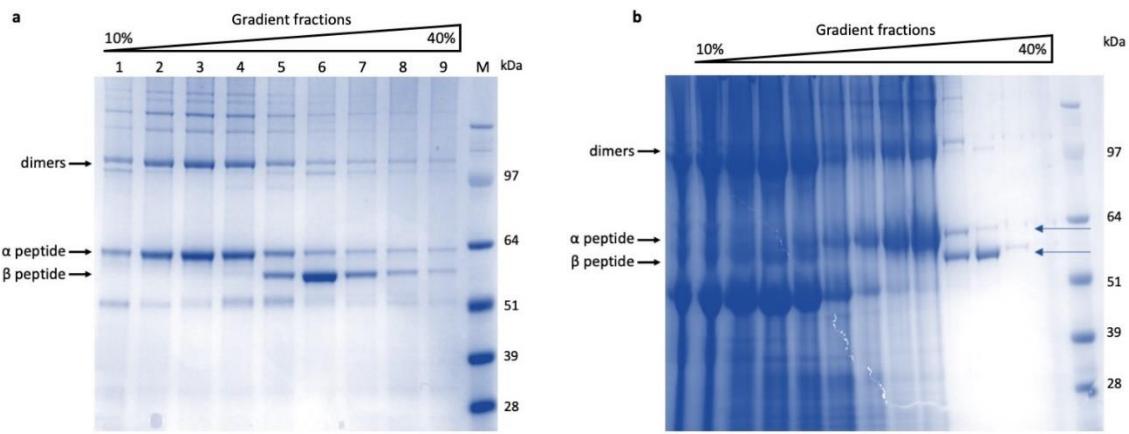


Figure S2: Sucrose (a) and (b) Optiprep gradients of VLPs extracted from plants.

Samples from the fractionated gradients were analysed by SDS-PAGE and fractions containing procapsids (a) and capsids (b) pooled. In (b), although the gradient was 10-50% Optiprep, only the fractions from 10-40% were analysed by SDS-PAGE

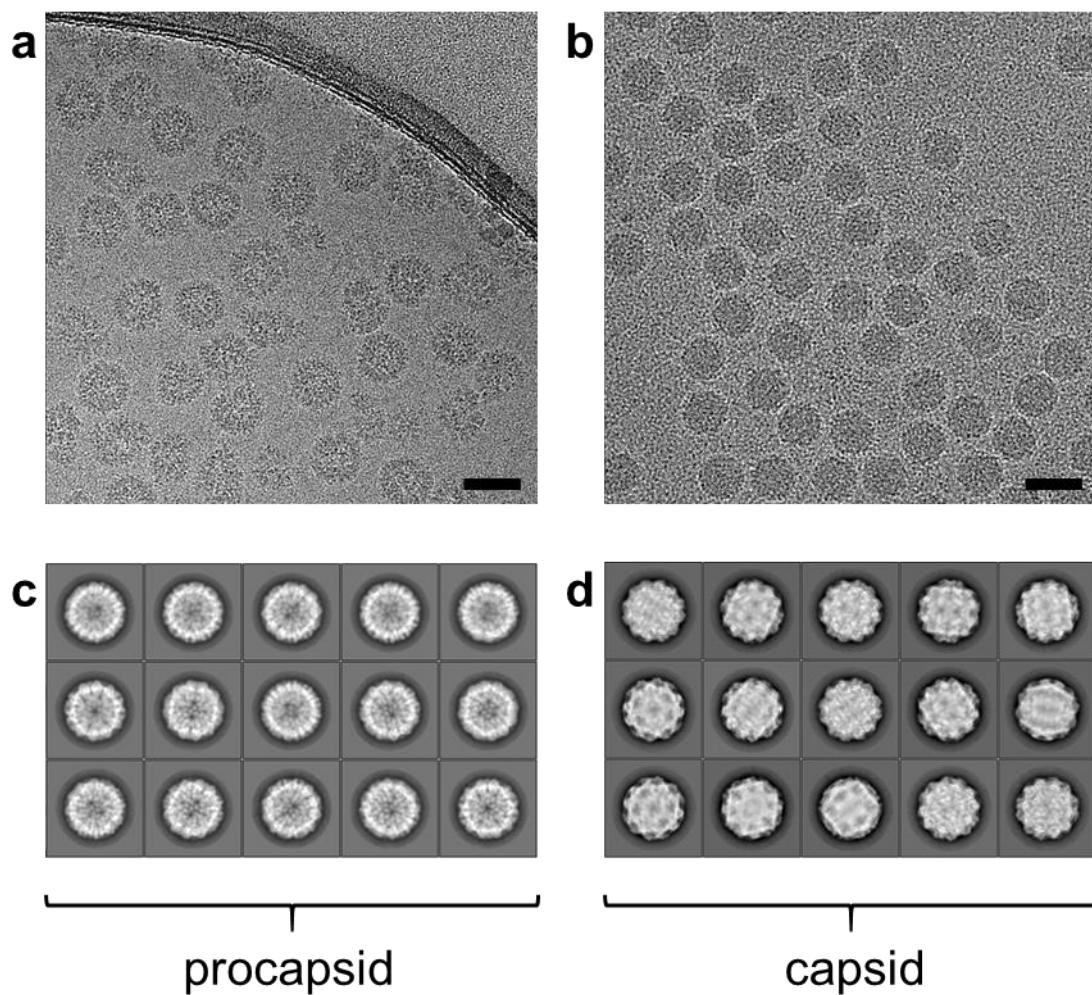


Figure S3: Cryo-EM data collection and processing. Motion-corrected movies (MOTIONCOR2) showing **(a)** procapsid and **(b)** capsid particles imaged in vitreous ice. Note that many of the procapsid particles are broken or deformed thereby significantly reducing the number of useable particles for reconstruction. The scale bar = 50 nm. 2D class averages (Relion) from the **(c)** procapsid and **(d)** capsid datasets (not to same scale).

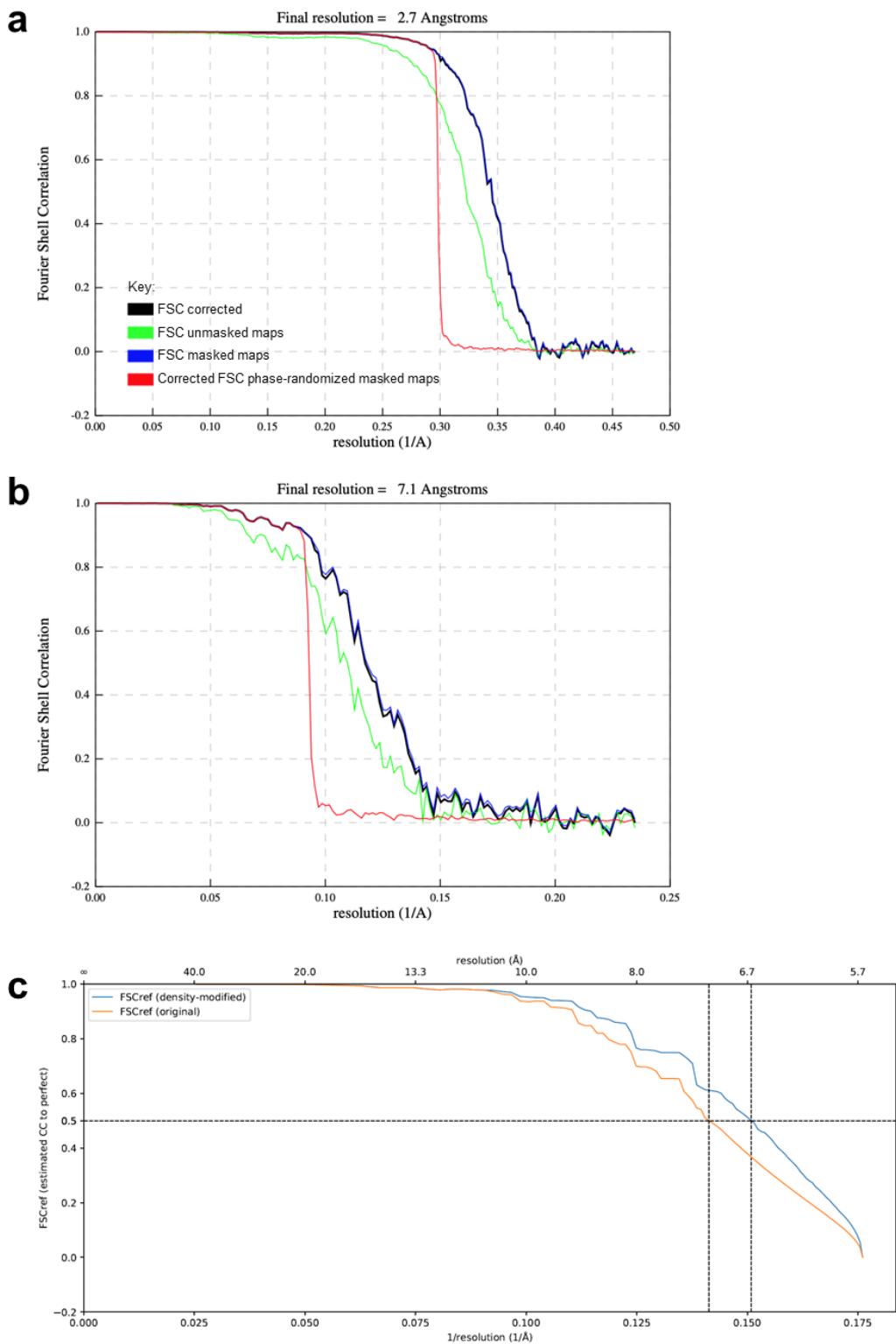


Figure S4: Cryo-EM reconstruction resolution estimation. Fourier Shell Correlation curves generated in the postprocessing step of Relion for **(a)** capsid and **(b)** procapsid reconstructions. The final resolutions were assessed using $\text{FSC} = 0.143$. The resolution of the latter was subsequently increased to 6.6 Å through density improvement as indicated by the FSC curves shown in **(c)** (see Methods).

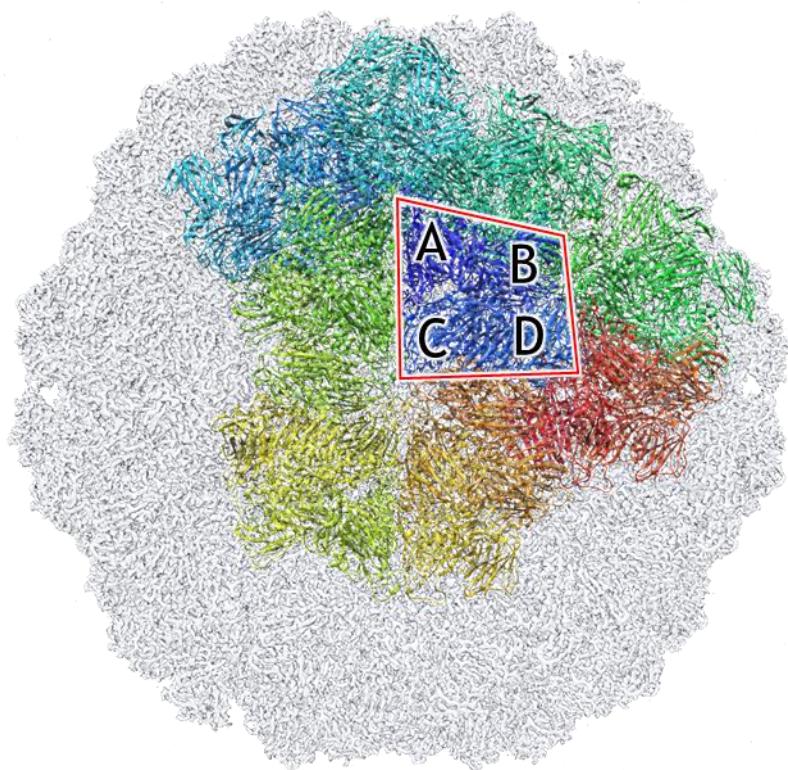


Figure S5: Cryo-EM model building and refinement. For convenience, rather than working with the full capsid or procapsid for visualization, model building and refinement, a subsection of the particle was defined as the asymmetric unit (ASU; outlined in red with subunits labelled) plus its eight nearest symmetry copies, denoted ASU8. Here ASU8 for the capsid is shown in ribbon representation (with each copy of the ASU in a different colour) in the context of the full sharpened map depicted in semi-transparent grey. Maps were cropped to ASU8 plus a 15 Å border, which significantly reduced the file size for the capsid map from 824 MB to only 48 MB and gave a corresponding reduction in the time taken for refinement jobs.

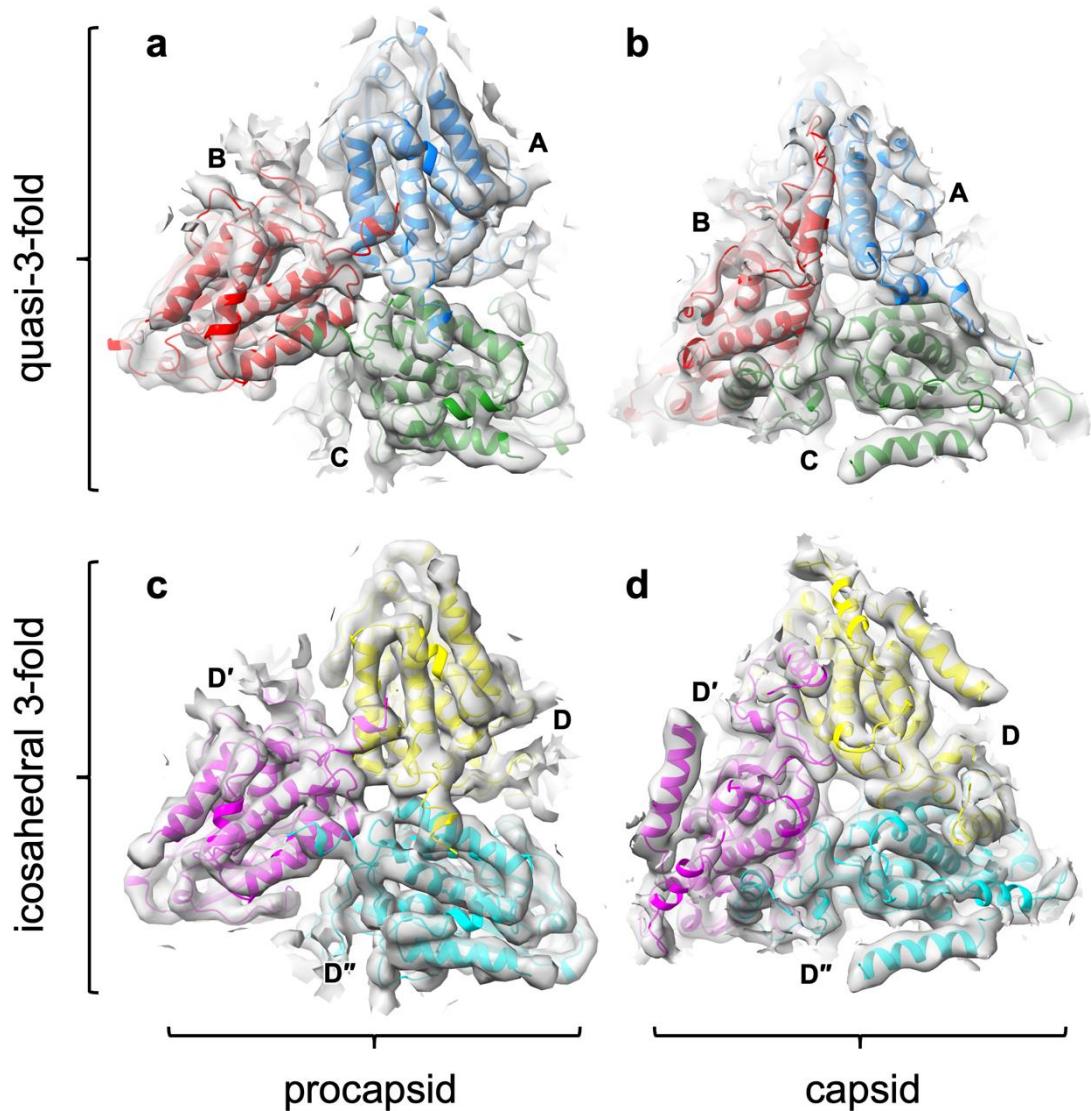


Figure S6: Comparisons of cryo-EM densities around the quasi-three-fold and icosahedral three-fold axes of capsid and procapsid reconstructions. Densities and fitted models around the quasi-three-fold axes for (a) the capsid and (b) the procapsid, and the icosahedral three-fold axes for (c) the procapsid and (d) the capsid as viewed from the inside. The subunit colouring scheme mirrors that used for the densities shown in Fig. 5 and again the capsid density has been down-sampled to 6.6 Å resolution. The three-folds have been aligned to facilitate comparison. It is clear that the subunit structure and arrangement are very similar for both axes in the procapsid, whilst they are distinctly different for the capsid. Nevertheless, there is some similarity between A and B and between C and D in the capsid (actually easier to compare C with D'; see the rmsd values reported in Table S2).

Table S1. Summary of cryo-EM data collection, processing and analysis

Data set	Procapsid	Capsid
Data collection and processing		
Microscope	Titan Krios	Titan Krios
Detector (mode)	Falcon III (integrating)	Falcon III (integrating)
Magnification	75,000 x	75,000 x
Magnified pixel size (Å)	1.065	1.065
Voltage (kV)	300	300
Total dose (e/Å ²)	72.0	79.5
Defocus range (μm)	-0.7 to -2.7	-0.8 to -3.0
Movies collected	8,554	2,788
Particle images	5,426	21,395
Symmetry imposed	Icosahedral (I1)	Icosahedral (I1)
FSC threshold	0.143	0.143
Map resolution (Å)	6.63	2.72
Map resolution range (Å)	5.66 – 13.33	2.64 – 3.77
Refinement		
Initial model used (PDB code)	7ANM	1OHF
Map sharpening <i>B</i> factor (Å ²)	-452.2	-125.0
Model composition (ASU)	Chains A, B, C, D	Chains A, B, C, D
Non-hydrogen atoms	17,464	17,518
Protein residues	2,288	2,290
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.005	0.006
Bond angles (°)	1.02	1.04
Validation		
EMRinger score	N/A*	5.1
Molprobity score	2.93	1.59
Clashscore	22.45	4.06
Poor rotamers (%)	9.68	2.08
Ramachandran plot:		
Favoured (%)	95.2	97.1
Allowed (%)	4.8	2.9
Disallowed (%)	0.0	0.0
Ramachandran Z-score	1.02 ± 0.02	1.36 ± 0.02
Fit to map (CC _{mask})	0.74	0.88
Accession codes		
EMDB (maps)	11911	11830
PDB (model)	7ATA	7ANM
EMPIAR (dataset)	10555	10560

*The EMRinger score uses the density around side-chains to evaluate the fit of the protein backbone. At a resolution of 6.6 Å there is no discernible side-chain density and thus the EMRinger score is meaningless.

Table S2. Structural comparisons

Rmsd (Å)		capsid				procapsid
	subunit	A	B	C	D	A
capsid	A	0	0.559 (527)	0.756 (500)	0.978 (501)	1.560 (415)
	B		0	0.753 (500)	0.924 (503)	1.616 (465)
	C			0	0.668 (591)	1.831 (473)
	D				0	2.149 (474)
procapsid	A					0

Rmsd values for pairwise superpositions of subunits from the NwV capsid and procapsid structures. For the latter, non-crystallographic symmetry constraints were imposed during refinement; thus all subunits are equivalent and only A is shown. The values in brackets indicate the numbers of residues that were aligned.