

Mea Nevanranta

DNA-ORIGAMI-NANORAKENTEIDEN KÄYTTÖ LÄÄKEAINEKULJETUKSESSA

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta
Tarkastaja: Elina Vuorimaa-Laukkanen
06/2022

TIIVISTELMÄ

Mea Nevanranta: DNA-origami-nanorakenteet lääkeainekuljetuksessa
DNA-origami-nanostructures for drug delivery
Kandidaatintyö
Tampereen yliopisto
Matemaattisten aineiden DI-opettajankoulutus
06/2022

Yksi lääketieteen suurimpia haasteita on lääkeaineiden kontrolloitu kuljetus kohteena oleviin soluihin ja kudoksiin. Lääkeainehoidoissa itse lääkeaineen lisäksi kuljetin on merkittävässä roolissa. Kuljettimen avulla voidaan muun muassa kontrolloida lääkeaineen kulkeutumista ja vapautumista. Nykyisin käytössä olevilta lääkeainekuljettimilta puuttuu kuitenkin usein tärkeitä ominaisuuksia, kuten biologinen yhteensopivuus ja tarpeeksi tarkka kohdentuminen. Ratkaisua näihin ongelmiin on lähdetty etsimään DNA-molekyylistä rakentuvista nanorakenteista, DNA-origameista.

Tässä työssä tarkastellaan DNA-origami-nanorakenteita, niiden rakennetta ja ominaisuuksia sekä etuja ja haasteita lääkeainekuljetuksessa. Tavoite on selvittää, mitä DNA-origamit ovat, miten niitä voidaan hyödyntää lääkeainekuljetuksessa ja arvioida niiden potentiaalia lääkeainekuljettimina. Työssä käytettiin aineistona aiheesta löytyvää kirjallisuutta ja tehtiin tutkimuksiin pohjautuvia julkaisuja.

DNA-origamit ovat nanorakenteita, joiden perusrakenteessa pitkä yksijuosteinen DNA saadaan taittamaan haluttuihin muotoihin lyhyiden yksijuosteisten DNA-säikeiden avulla. Erilaisia ja erikokoisia 2D- ja 3D-rakenteita saadaan yhdistelemällä pienempiä rakenteita. Tämä ohjelmitavuudeksi kutsuttu ominaisuus on yksi DNA-origamien merkittävimmistä eduista. Ohjelmitavuuden ansiosta DNA-origamin ominaisuudet ovat helposti muokattavissa ja hallittavissa. Yleensä DNA-nanorakenteet saadaan aikaan itsejärjestäytymiseksi kutsutun prosessin avulla. Toinen merkittävä etu on yhteensopivuus solujen kanssa DNA:n biologisen alkuperän vuoksi. Nämä ominaisuudet tekevät siitä potentiaalisen kehityskohteen erityisesti syöpähoitoihin.

Tähän mennessä tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että DNA-origameihin pohjautuvat lääkeainekuljetussysteemit eivät aiheuta haittavaikutuksia ja ne ovat helposti muokattavissa. Tutkimuksia DNA-origameista on tehty *in vitro* sekä hiirillä *in vivo*. DNA-origameihin liittyy kuitenkin vielä ratkaisemattomia haasteita, joista merkittävimminä voidaan pitää immunogeenisyyttä, mahdollisimman tarkkaa kohdentamista sekä rakenteen stabiilisuutta. Tämän tutkielman perusteella voidaan todeta DNA-origameissa olevan paljon potentiaalia lääkeainekuljettimiksi, erityisesti niiden poikkeuksellisten ominaisuuksien vuoksi. Turvallinen ja tehokas DNA-origamien käyttö vaatii kuitenkin vielä lisää tutkimusta ja kehittämistä, varsinkin juuri mainittujen haasteiden osalta. Tutkimusta on siis tehtävä paljon erityisesti *in vivo*, jotta voidaan olla varmoja niiden toimivuudesta ihmiskehossa.

Avainsanat: DNA-molekyyli, DNA-origamit, lääkeainekuljetus, ohjelmitavuus, syöpähoitot

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck –ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. DNA-ORIGAMI-NANORAKENTEET	3
2.1 DNA:n rakenne	3
2.2 DNA-origamit	4
3. KÄYTTÖ LÄÄKEAINEKULJETUKSESSA	10
3.1 Lääkeaineen lataaminen	10
3.2 Kuljetus kohdesoluun	11
3.3 Lääkeaineen vapautus ja kuljettimen hajotus	13
3.4 Haasteita	14
4. DNA-ORIGAMIEN MERKITYS SYÖPÄHOIDOSSA	16
5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	19
LÄHTEET	21

LYHENTEET JA MERKINNÄT

A	engl. adenine, adeniini
AFM	engl. atomic force microscopy, atomivoimamikroskooppi
C	engl. cytosine, sytosiini
CME	engl. clathrin-mediated endocytosis, klatriinivälitteinen endosytoosi
CvME	engl. caveolae-mediated endocytosis, kaveolivälitteinen endosytoosi
DLS	engl. dynamic light scattering, dynaaminen valosironta
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, deoksiribonukleiinihappo
DNaasi	engl.
DON	engl. DNA origami nanostructure, DNA-origami-nanorakenne
DOX	engl. doxorubicin, doksorubisiini
G	engl. guanine, guaniini
<i>in vitro</i>	elävän organismin ulkopuolella tehtävä tutkimus
<i>in vivo</i>	elävässä elimistössä tehtävä tutkimus
MPS	engl. mononuclear phagocyte system, mononukleaarinen fagosyyttijärjestelmä
RNA	engl. ribonucleic acid, ribonukleiinihappo
siRNA	engl. engl. small interfering RNA, pieni häiritsevä RNA
ssDNA	engl. single-stranded DNA, yksijuosteinen DNA
T	engl. thymine, tyymiini

1. JOHDANTO

Lääkeaineet ovat aineita, jotka vuorovaikuttavat kohdesolun kanssa. Vuorovaikutus saa aikaan soluprosessien vahvistumisen tai estymisen, edellyttäen että soluun on päässyt riittävästi lääkeainetta. [1 s. 3] Lääkehoidon päätavoite on hidastaa tai estää infektioiden, tulehdusten ja loukkaantumisten vaikutukset sekä torjua mahdollisia geneettisiä alttiuksia tietyille sairauksille. Lääkeaineita hyödynnetään myös korvaavina aineina, kuten hormonihoidossa. Joskus lääkehoito on myös suunnattu torjumaan vahingollisten solujen kasvua, kuten syöpähoitossa. [1] Lääkeainekuljetuksesta hyötyvät miljardit ihmiset (ja eläimet) ympäri maailmaa.

Yksi lääketieteen suurimmista haasteista on lääkeaineiden kontrolloitu kuljetus kohteena oleville soluille ja kudoksille. Biomateriaaleista valmistettujen kuljettimien käyttäminen ei paranna huonon lääkkeen toimintaa, mutta hyvän lääkkeen tarkkuutta ja toimintaa voidaan edistää käyttämällä hyvin suunniteltua lääkeainekuljetinta. Ihanteellinen lääkeainekuljetin maksimoi tavoitellun hoitovaikutuksen samalla kun se minimoi mahdolliset haittavaikutukset. [2]. Liposomit, hiilinanoputket, solunulkoiset vesikkelit ja lipidinanopartikkelit ovat esimerkkejä erilaisista nanopartikkeleista, joita on kehitetty tähän tarkoitukseen [3]. Näistä lupaavista edistysaskelista huolimatta nykyisiltä nanokuljettimilta puuttuu usein tärkeitä ominaisuuksia, kuten geometrinen homogeenisyys, biologinen yhteensopivuus ja onnistuva kohdentaminen. Tästä aiheutuu tarve suuremmille lääkeaineannoksille, joka puolestaan kasvattaa haittavaikutusten mahdollisuutta. Siksi onkin tarpeen kehittää yhä parempia nanokuljettimia, joilla on suotuisat ja ennen kaikkea hallittavissa olevat ominaisuudet. Näin voidaan parantaa lääkeaineiden selektiivisyyttä ja tehokkuutta ja siten hoitojen turvallisuutta. [2,4]

Yksi potentiaalinen kehityskohde on kaikkien eliöiden soluista löytyvä, geneettisen tiedon sisältävä DNA-molekyyli. Kahden viime vuosikymmenen aikana DNA:n potentiaali ohjelmoitavana nanomateriaalina eikä geneettisen tiedon kantajana on herättänyt huomattavaa kiinnostusta ja saanut DNA-nanoteknologian alan syntymään ja kasvamaan. [2,5,6] DNA-origami on nanorakenne, jossa pitkät yksijuosteiset DNA-molekyylit saadaan taittumaan mielivaltaisiin 2D- ja 3D-rakenteisiin lyhyiden katkaistuiden DNA-säikeiden avulla. Lääkeaine voidaan kiinnittää näihin rakenteisiin, ja tuloksena on DNA-juosteen avulla rakennettuja lääkeainekuljettimia. Näin päästään hyödyntämään DNA:n luontaisia ominaisuuksia, kuten rakenteellista monipuolisuutta, ohjelmoitavuutta, biologista yhteensopivuutta ja biohajoavuutta. [2,5]

Kohdennettu lääkeainekuljetus on yksi tärkeä tekniikka syöpähoitoissa. Kemoterapian avulla lääkeaineet voidaan nanokuljettimien avulla kuljettaa suoraan syöpäsoluihin, jolloin hoidon tehokkuus paranee ja haitalliset sivuvaikutukset vähenevät. [8] DNA-origamitekniikka mahdollistaa poikkeuksellisia ominaisuuksia DNA-nanorakenteille, kuten funktionaalisten ryhmien kiinnittämisen ja rakenteen muodon hallitsemisen [5,8]. Nämä sekä DNA-origamien muut ominaisuudet tekevät siitä kiinnostavan uuden välineen syövän hoitoon ja diagnosoimiseen [5].

Tässä kandidaatintutkielmassa tutustutaan DNA-origameihin sekä niiden käyttöön lääkeainekuljetuksessa, erityisesti syöpähoidoissa. Tavoitteena on selvittää mitä ovat DNA-origami-nanorakenteet ja miten niitä voidaan hyödyntää lääkeainekuljetuksessa. Työn toisessa luvussa käydään läpi DNA:n rakenne, DNA-origamien rakenne ja niiden valmistus, ominaisuudet ja karakterisointi. Tutkielman kolmannessa luvussa käsitellään lääkeaineen lataamista DNA-origamiin, lääkeaineen kuljetusta ja vapautusta sekä kuljettimen hajoitusta ja DNA-nanoteknologiaan liittyviä haasteita. Neljännessä luvussa kerrotaan DNA-origamien käytöstä ja merkityksestä syöpähoidoissa. Luvussa 5 esitetään DNA-origamien ja niiden lääkeainekuljetuskäytön keskeisimmät asiat ja pohditaan niiden soveltuvuutta lääkeainekuljettimiksi.

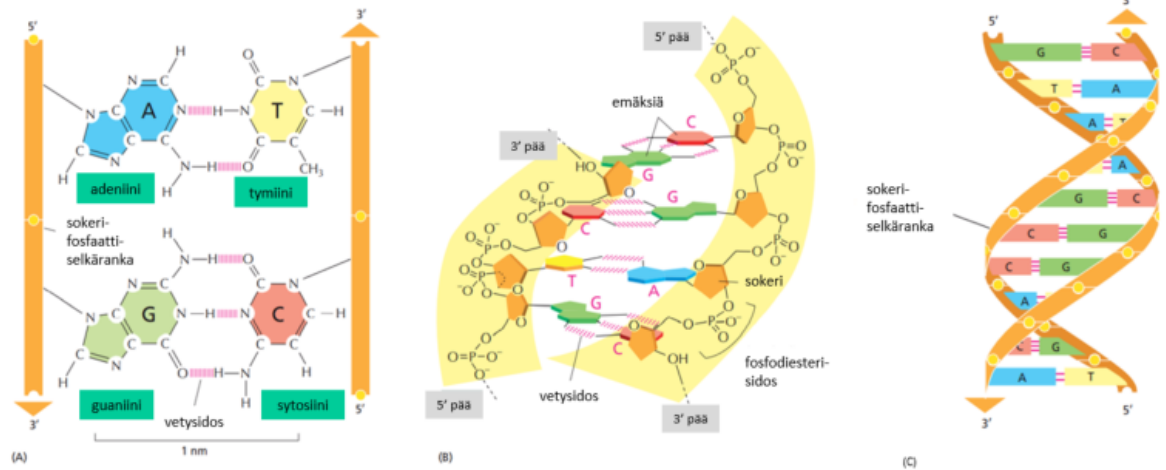
2. DNA-ORIGAMI-NANORAKENTEET

DNA on tunnettu sisältämästään geneettisestä informaatiosta. Tämä informaatio on tallennettuna koodiksi DNA-molekyylien nukleotidisekvensseihin. [9] Tämän lisäksi DNA-molekyyliä on mahdollista hyödyntää erilaisten 2D- ja 3D-nanorakenteiden valmistuksessa DNA:ssa esiintyvien vuorovaikutusten ansiosta. Paul Rothmundin vuonna 2006 kehittämät DNA-origamit ovat mahdollistaneet laajan 2D-rakennevalikoiman rakentamisen, johon kuuluu muun muassa suorakulmiot, kolmiot, hymyilevät kasvot ja viisisakaraiset tähdet. [10,11]

2.1 DNA:n rakenne

Deoksiribonukleiinihappomolekyyli (DNA) koostuu kahdesta pitkästä polynukleotidiketjusta ja jokainen ketju rakentuu neljästä erilaisesta nukleotidista. Nukleotidi on siis DNA-juosteen rakenneosa, joka koostuu kovalenttisesti toisiinsa liittyneistä sokeri-, fosfaatti- ja emäsosista. DNA:ssa esiintyvä sokeri on deoksiriboosi ja mahdollisia emäksiä on neljä: adeniini (A), guaniini (G), sytosiini (C) ja tymiini (T). Kuvassa 1 on esitetty DNA:n rakenne. Fosfaatti- ja sokeriosat liittyvät toisiinsa kovalenttisilla sidoksilla muodostaen juosteen selkärangan. Juoste muodostuu nukleotidien välisten kovalenttisten sidosten avulla. Selkärangan sokeriosiin kiinnittyneet emäkset ulottuvat ulos juosteen selkärangasta, ja näin ne pystyvät vuorovaikuttamaan toisen juosteen emäsosien kanssa. DNA-molekyyli koostuu kahdesta polynukleotidijuosteesta, jotka pysyvät yhdessä emäsparien välillä olevien vetysidosten vuoksi (kuva 1). DNA-molekyyli on kiertynyt kuvan 1C mukaisesti kaksoiskierteeksi. Kahden yksittäisen juosteen kiertymistä kaksoiskierteeksi kutsutaan hybridisaatioksi. [9 s. 173, 177]

Emäsmolekyylien muodon ja kemiallisen rakenteen vuoksi vetysidoksia muodostuu vain A:n ja T:n sekä G:n ja C:n välille. Nämä emäsparit pääsevät tarpeeksi lähelle toisiaan vetysidoksen muodostumista varten ilman, että ne aiheuttavat häiriöitä kaksoiskierteen rakenteeseen. Kaksirenkainen puriiniemäs (A ja G) pariutuu yksirenkaisen pyrimidiiniemäksen (C ja T) kanssa. A:n ja T:n välille muodostuu kaksi vetysidosta ja G:n ja C:n välille kolme. Puriini-pyrimidiinipareja kutsutaan vastinemäspareiksi. Emäkset pystyvät pariutumaan näin vain, kun juosteet ovat vastakkaisuuntaiset. DNA-juosteen emäsosat ja niiden väliset kemialliset sidokset ovat nähtävissä kuvassa 1A. Kuvassa 1B havainnollistetaan sokerifosfaattiosien liittymistä toisiinsa sokerin 3'-hydroksyyli-ryhmän (-OH) ja 5'-fosfaattiosan (-OPO₃) kautta fosfodiesterisidoksella. Tämä sitoutuminen tekee DNA-juosteesta polaarisen, sillä 3'-pään sokerirenkaan 3'-hiili sisältää OH-ryhmän ja 5'-pään sokerirenkaan 5'-hiileen on sitoutunut fosfaattiryhmä. Jokainen fosfaattiryhmä sisältää negatiivisesti varautuneen happiatomin. Nämä toistuvat fosfaattiryhmät tekevät DNA-juosteesta negatiivisesti varautuneen. [9 s. 177, 178]



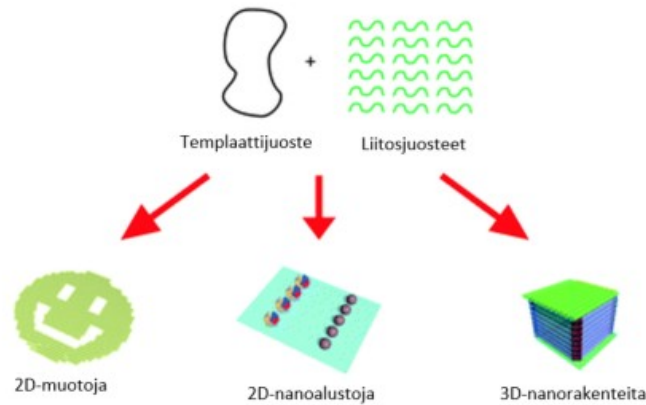
Kuva 1. DNA-juosteen rakenne. DNA:ssa esiintyy neljä emästä, jotka pariutuvat emäspariperiaatteen mukaisesti (A). DNA-juosteen selkärangassa sokeri- ja fosfaattisoat liittyvät toisiinsa kovalenttisilla fosfodiesterisidoksilla (B). Kahden DNA-juosteen hybridisaatio (C). Muokattu lähteestä [9].

Geneettinen informaatio on koodattuna DNA-juosteen nukleotidien emäsjärjestykseen eli sekvenssiin. Jokainen emäs —A, C, T, tai G— voidaan ajatella kirjaimena nelikirjaimisissa aakkoissa, jota käytetään biologisten viestien lukemiseen. Eliöt eroavat toisistaan DNA-molekyyliensä erilaisten nukleotidisekvenssien johdosta. [9 s. 178]

2.2 DNA-origamit

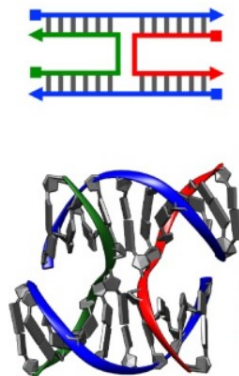
Vaikka DNA:n kykyä koodata geneettistä informaatiota on tutkittu hyvin laajasti, rakenteellinen DNA-nanoteknologia ei keskity DNA:n biologisiin ominaisuuksiin, vaan sen käyttöön rakennusmateriaalina nanokokoisissa rakenteissa. Emäspariperiaatteen mukainen pariutuminen mahdollistaa haluttujen rakenteiden muodostamisen. [5,6]

DNA-origami-nanorakenteet (engl. DNA origami nanostructure, DON) muodostetaan yleensä ympyrän muotoisesta pitkästä yksijuosteisesta DNA-molekyylistä, joka on tyypillisesti peräisin M13mp18-bakteriofagin genomista. Tämä DNA-templaatti (engl. scaffold) saadaan laskostumaan suuremmiksi 2D- ja 3D-rakenteiksi liitosjuosteiden (engl. staple strands) avulla (kuva 2). Liitosjuosteet ovat lyhyitä yksijuosteisia DNA-oligonukleotideja (engl. single-stranded DNA, ssDNA), joiden nukleotidisekvenssit ovat komplementaariset templaattissa esiintyville sekvensseille. [2,6,12] DNA-origamista voidaan valmistaa mielivaltaisia 2D-nanorakenteita, nanokokoisia alustoja nanomateriaalien kiinnittämistä varten ja 3D-nanorakenteita, kuten onttoja monitahokkaita (kuva 2) [11,12].



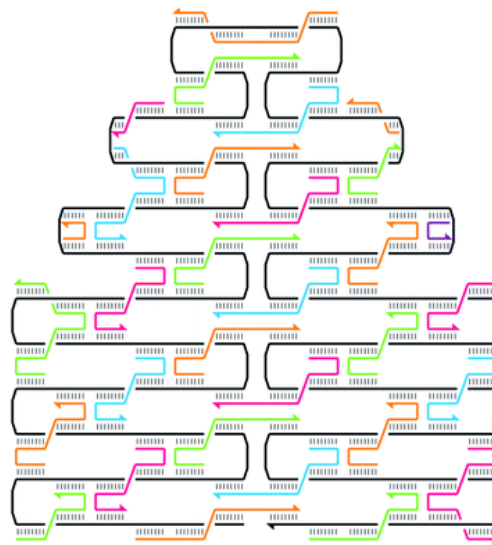
Kuva 2. DNA-origamin perusosina toimivat yksijuosteinen pitkä templaattijuoste ja lyhyet liitosjuosteet. Niiden avulla voidaan muodostaa erilaisia rakenteita, kuten 2D-rakenteita ja -nanokokoisia alustoja ja 3D-rakenteita. Kuva muokattu lähteestä [11].

DNA-origamia voidaan tietyssä mielessä pitää suurena yhdistelmänä erilaisia liitosrakenteita, joista tunnetuimpia ovat Holliday-liitos (engl. Holliday junction) ja DX-liitos (engl. DX motif) [11]. Luonnossa DNA:lla esiintyy joitakin tällaisia monimutkaisia rakenteita, kuten juuri mainittu Holliday-liitos, sillä se on geneettisen rekombinaation välituote. Holliday-liitos koostuu neljästä DNA-juosteesta, jotka yhdistyvät rakenteen keskipisteessä ja hybridisoituvat vierekkäisten juosteiden kanssa. Luonnossa nämä risteymät ovat liikkuvia, joka tarkoittaa sekvensseille mahdollisuutta siirtyä säikeestä toiseen. Nadrian Seeman et al. suunnitteli ensimmäisenä Holliday-liitoksesta version, jossa sekvenssit eivät vaihda paikkaa eli liitos on liikkumaton. Tämä mahdollistaa Holliday-liitoksien käytön DNA-origamien rakennusosana. Kuvassa 4 on esitetty yksinkertaiset 2D- ja 3D -mallit yksittäisestä Holliday-liitoksesta, joka tyypillisesti löytyy DNA-origamien rakenteesta. [4,6]



Kuva 3. Holliday-liitoksen 2D- ja 3D-esitykset. Kuva muokattu lähteestä [6].

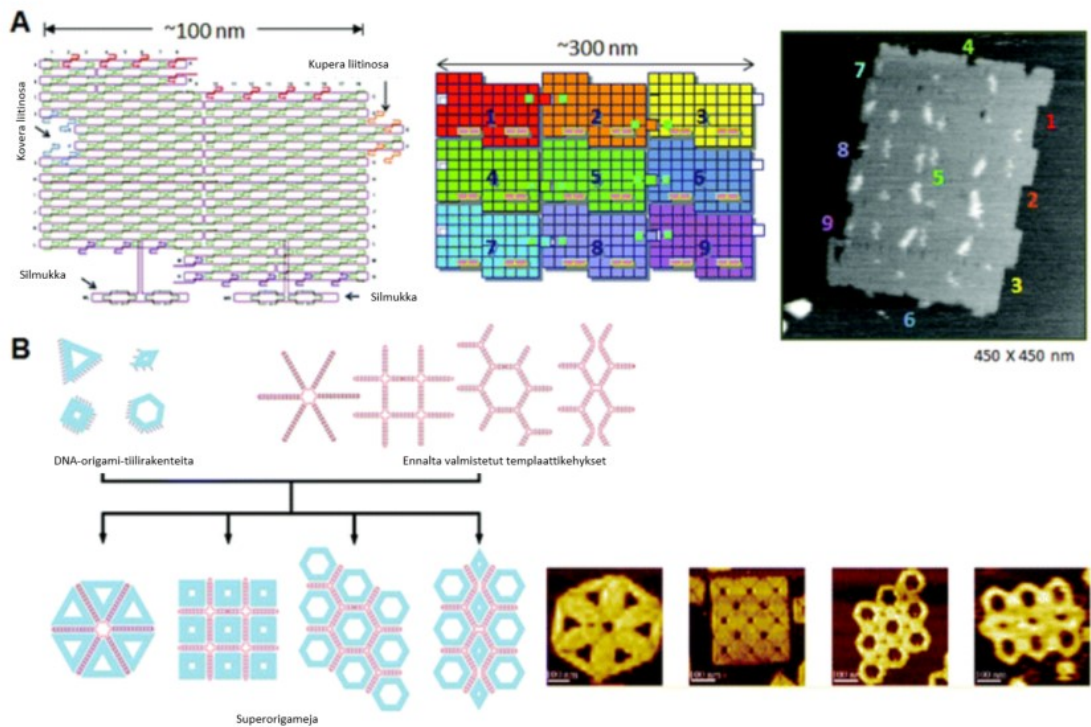
Merkittävin DNA-origameissa käytetty liitos on kaksinkertainen liitos, DX, jossa kaksi rinnakkaista DNA-kaksoiskierrettä risteävät kahdessa kohdassa juosteita [6,11]. Yhdistämällä kaksi Holliday-liitosta voidaan muodostaa DX-liitos, joka lisää merkittävästi DNA-nanorakenteiden jäykkyyttä ja on siksi ollut keskeinen rakennusosa monissa itsejärjestäytyvissä ja templaattijuosteesta rakentuvissa DNA-origameissa [6,13]. Tällaisissa rakenteissa DNA-templaatti saadaan laskostettua haluttuun muotoon synteettisillä ssDNA-säikeillä eli liitosjuosteilla. Ne ovat pituudeltaan noin 30-50 nukleotidiä ja ne ovat suunniteltu sitoutumaan templaattissa esiintyvien emästen kanssa niin, että templaatti saadaan taittumaan ennalta suunniteltuun muotoon. [6] DNA-origamissa käytetään yli 200 erilaista liitosjuostetta ja tyypillisesti 7249-nukletodia pitkä DNA-templaattia [10,11]. Kuvasta 5 nähdään kuinka DNA-origamin perusrakenteessa pitkä templaattijuoste kulkee mutkitellen koko rakenteen läpi ja lyhyet liitosjuosteet pitävät templaatin vierekkäiset osat yhdessä.



Kuva 4. Kuvassa mustana juosteena esitetty templaattijuoste taittuu suunniteltuihin muotoihin lyhyiden, kuvassa värikkäinä esitettyjen, liitosjuosteiden avulla. Näin muodostuu DNA-origamin perusrakenne. Kuva muokattu lähteestä [11].

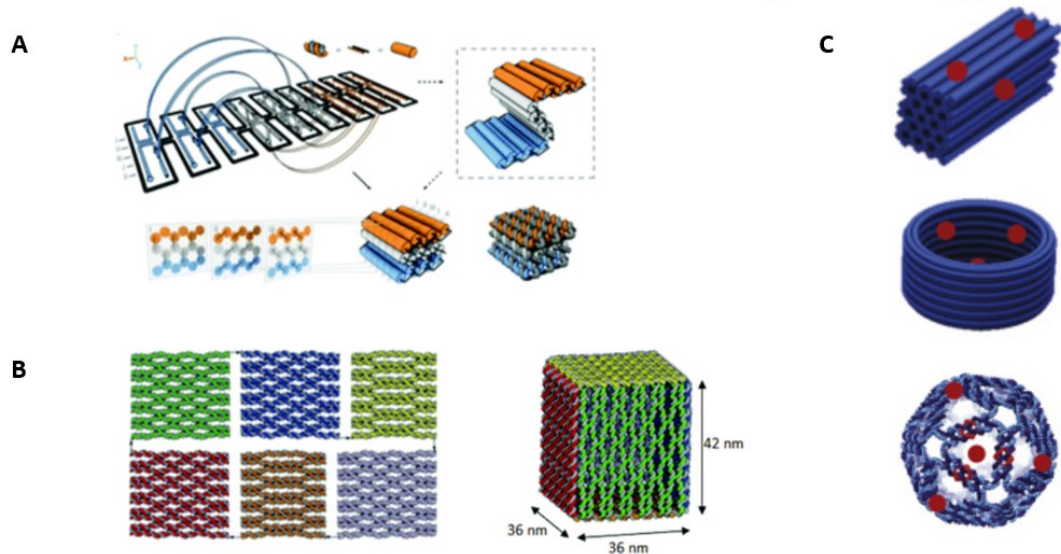
Käytännössä DNA-origamin valmistusprosessissa hyödynnetään suhteellisen yksinkertaista itsejärjestäytymiseen perustuvaa menetelmää [2,6]. DNA-templaatti ja liitosjuosteet, joiden sekvenssit ovat valmistettu halutun rakenteen mukaan, sekoitetaan keskenään, seos kuumennetaan ja sitten jäädytetään hitaasti (hehkutus). Prosessin aikana liitosjuosteet sitoutuvat templaattijuosteen kanssa emäspariperiaatteen mukaisesti. Näin muodostuu ennalta suunniteltu rakenne itsejärjestäytymisen avulla. [6,12] Muodostuneet rakenteet ovat kooltaan noin 100 nm. Yksi keino rakentaa suurempia DNA-nanorakenteita on yhdistää yksittäisiä tiilimäisiä DNA-origami-rakenteita. [14] Näissä rakenteissa esiintyvien koverien ja kuperien liitinosien (engl. concave and convex connectors) avulla saadaan DNA-origami-tiilet liittymään toisiin, liitinosiltaan sopiviin tiilirakenteisiin [10]. Kuvassa 6A on ensin esitetty yksi 100 nm kokoinen DNA-tiilirakenne, josta löytyy liitinosia. Seuraavassa kohdassa yhdeksän tällaista tiilirakennetta ovat liitinosiensa avulla liittyneet yhteen muodostaen suuremman DNA-rakenteen. Tämä rakenne on kuvattu oikeanpuoleisimpaan kuvaan atomivoimamikroskoopin (engl. atomic force microscopy, AFM) avulla [10].

Liitinosien lisäksi suurempia DNA-origameja voidaan rakentaa tarttumakohtien (engl. sticky points) avulla. Kuvassa 6B nähdään jokaisessa yksittäisessä DNA-tiilessä tarttumakohtia. Ne vuorovaikuttavat valmiiden templaattikehysten kanssa muodostaen niin kutsuttuja super-origameja. [14] Kuvassa 6B näkyy myös atomivoimamikroskoopin avulla otettuja kuvia kyseisistä rakenteista. Atomivoimamikroskoopin avulla voidaan siis kuvata ja karakterisoida erilaisia DNA-origamirakenteita [3,10]. Toinen tapa karakterisoida DNA-origameja ja niiden kokoa on dynaaminen valosironta (engl. dynamic light scattering, DLS) [6].



Kuva 5. DNA:n itsejärjestäytyminen isommiksi rakenteiksi kahdella tapaa: yksittäiset tiilirakenteet liittyvät liitinosien avulla suuremmiksi rakenteiksi (A) ja DNA-origami-tiilirakenteet liittyvät valmiisiin templaattikehyksiin tarttumakohtien avulla (B). Kuva muokattu lähteestä [10].

3D-rakenteita voidaan muodostaa laajentamalla 2D-DNA-origamisysteemejä. Siihen on kehitetty kaksi tapaa, joista toinen on kaksijuosteisen DNA:n niputtaminen. Siinä vierekkäisten DNA-kaksoiskierteiden paikkaa ohjataan siltarakenteilla (engl. crossover) (kuva 6A). Toinen tapa on 2D-origamiosien taittaminen 3D-rakenteiksi yhteenliitöntäsaikoiden (engl. interconnection strands) avulla (kuva 6B). [10,11] 3D-rakenteet voivat olla kiinteitä, onttoja tai rautalankamallisia (kuva 6C) [2].



Kuva 6. 3D-DNA-nanorakenteiden muodostuminen: kaksijuosteisen DNA:n niputtaminen siltarakenteilla (A) ja 2D-DNA-origamien taittaminen 3D-rakenteiksi yhteenliittäjäsaikeiden avulla (B). Mahdolliset 3D-rakenteet: kiinteä, ontto ja raitalankarakenne (C). Kuva muokattu lähteistä [10] ja [2].

DNA-origameja voidaan rakentaa juuri sen kokoisiksi, mitä lääkeainekuljetuksessa tarvitaan. Lääkeainekuljettimille optimaalinen koko vaihtelee 20 nanometristä yhden mikrometrin kokoluokkaan. [2] Itse DNA-kaksoiskierre on halkaisijaltaan 2–2,5 nanometriä [7]. Tietyn lääkeainekuljettimen optimaalinen koko riippuu kuljetetusta lääkeaineesta, kohteena olevasta solutyypistä, anostelureitistä ja toivotusta vaikutuksesta. DNA-origamien koko ja geometria ovat keskeisessä osassa kuljettimen suunnittelussa. Ne vaikuttavat DNA-origamin leviämiseen ja hajoamiseen, kykyyn ohittaa erilaisia biologisia esteitä, solun sisälle pääsemiseen ja lääkeaineiden lataamistapoihin. [2,4]

Lääkeainekuljettimien ja kuljetettujen lääkkeiden täytyy olla stabiileja fysiologisessa ympäristössä, jotta lääkeaine pystytään kuljettamaan tehokkaasti suunniteltuun paikkaan. DNA-origamien stabiilisuus mahdollistaakin niiden soveltamisen biolääketieteeseen. [2] DNA:ta hajotetaan soluissa yleensä nukleasientsyymien toimesta. DNA-origamirakenteet ovat kuitenkin tyypillisesti kestävämpiä entsyymattista hajotusta vastaan kuin monet muut nanokuljettimet. On nimittäin kehitetty erilaisia tapoja muokata DNA:ta stabiilimmaksi. Esimerkiksi lukitut nukleinihapot (engl. locked nucleic acid), jotka ovat RNA-johdannaisia ja sisältävät kovalenttisia sidoksia ribosiselkärangassaan, sitoutuvat DNA:han rajoittaen yksittäisten juosteiden joustavuutta ja kasvattavat näin DNA-nanorakenteen stabiilisuutta. [6] DNA-origamirakenteiden negatiivista pintavarausta voidaan muunnella erilaisilla pinnoitteilla (engl. surface coatings) ja näin vaikuttaa soluissa tapahtuviin vuorovaikutuksiin. DON-valmisteissa käytettyjä pintamolekyylejä ovat esimerkiksi viruskapsidiproteiinit ja kationiset polymeerit. [2,3] Patrick Halley et al. osoittivat DNA-rakenteen kolmiulotteisen muodon myös vaikuttavan rakenteen stabiilisuuteen [8].

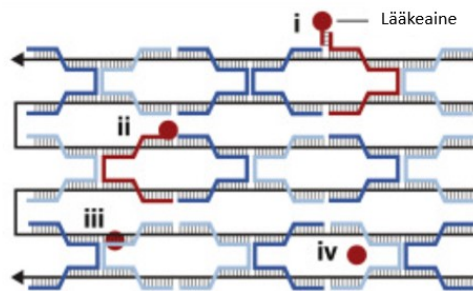
Hyvin spesifit vuorovaikutukset komplementaaristen DNA-juosteiden välillä ovat perusta DNA-origameille ja niiden ohjelmoitavuudelle. DNA:n käyttö mahdollistaa siis melkein kaiken muotoisten ja kokoisten rakenteiden valmistuksen. Näin on mahdollista vaikuttaa lääkeainekuljetukseen ja kuljettimen toimintaan enemmän kuin perinteisillä nanomateriaaleilla. [2,6,15] Jo mainittujen ominaisuuksien lisäksi DNA-origameilla on paljon muitakin piirteitä, jotka tekevät niistä vieläkin lupaavamman nanomateriaalin. DNA-origameja voidaan esimerkiksi suunnitella reagoimaan erilaisiin ulkoisiin ärsykkeisiin, kuten pH:n muutoksiin. DNA on myös biologisesti yhteensopiva ja biohajoava, sillä kaikista soluista löytyy DNA:ta ja solut ovat kehittäneet toimintoja sen hajottamiseksi. [3,15]

3. KÄYTTÖ LÄÄKEAINEKULJETUKSESSA

Lääkeainekuljetuksessa käytettyjen nanomateriaalien tärkeitä ominaisuuksia ovat muun muassa kuljettimen koko, geometria, varaus, stabiilisuus, hajoaminen ja lääkeaineen lataaminen. [2] DNA-nanorakenteet ovat biologisesti yhteensopivia, niiden pintaa pystytään käsittelemään ja rakenteiden kokoa, muotoa ja pintakemiaa hallitsemaan. [7] Nämä ominaisuudet tekevät DNA-origameista helposti muokattavia ja sopivia lääkeainekuljetukseen [2,7].

3.1 Lääkeaineen lataaminen

Lääkeainekuljettimien tulee sisältää riittävästi lääkeainetta, jotka pystytään lataamaan ja vapauttamaan hallitusti. Kuljetettavan lääkeaineen lataaminen riippuu lääkeaineen ominaisuuksista, DNA-origamin tyypistä ja tarpeesta säilyttää lääkkeen aktiivisuus vapautuksen jälkeen. [2] Pienet molekyylit, kuten antrasykliinit ja metallikompleksit, voidaan sijoittaa DNA-kaksoiskierteen juosteiden väliin (kuva 7 iii), missä ne pysyvät DNA:n emästen kanssa muodostuneiden vuorovaikutusten ansiosta. [2,7] Tällöin täytyy kuitenkin huolehtia siitä, ettei laskostunut DNA-rakenne häiriinny tai muutu epästabiilimmaksi. [2]



Kuva 7. SsDNA-funktionalisoitu lääkeaine kiinnitetään DNA-origamissa: laajennettuun liitosjuosteeseen (i), suoraan konjugoimalla liitosjuostetta (ii), interkaloidulla DNA:n kaksoiskierteeseen (iii) tai kapseloinnin avulla (iv). Kuva muokattu lähteestä [2].

Tyypillisesti lääkeaineen lataaminen toteutetaan kovalenttisesti konjugoimalla lääkeaineet lyhyiden DNA-oligonukleotidien kanssa, joiden emäsjärjestys on komplementaarinen DNA-origamissa esiintyvälle kiinnityskohdalle. [7] Esimerkiksi kuljetettavat nukleiinihapot, kuten häiritsevä RNA (engl. interfering RNA, siRNA), voidaan ladata liitosjuosteisiin tai suoraan hybridisoimalla komplementaariseen juosteeseen (kuva 7 ii). Suuremmat biomolekyylit voidaan liittää liitosjuosteista tehtyihin tarttumajuosteisiin (kuva 7 i). Lääkeaine voidaan myös sulkea 3D-DNA-origamien sisälle (kuva 7 iv). Näin lääkeaine on paremmin suojassa biologiselta hajotukselta ja sen bioaktiivisuus kasvaa. Tällä tavalla suuremmat biomolekyylit, kuten entsyymit, voidaan liittää DON-laatikon puo-likkaisiin, jotka voidaan sitten yhdistää kokonaiseksi laatikoksi komplementaaristen liitossäikeiden

avulla (engl. complementary linker strands). Myös DNA-origami-nanorakenteita stabiloivia pinoitteita voidaan hyödyntää lääkeaineen kiinnityksessä. Lääkeaineita voidaan esimerkiksi konjugoida peptidipinoitteiden reaktiivisiin osiin. [2]

3.2 Kuljetus kohdesoluun

Yksi haaste DNA-nanorakenteiden käytössä on tarkoituksettomat vuorovaikutukset immuunipuolustuksen kanssa. Verenkierrrossa DNA-nanokuljettimet sekä muut nanopartikkelit kohtaavat mononukleaarisen fagosyyttijärjestelmän (MPS). [2] MPS koostuu erilaisista syöjäsoluista ja se vastaa verenkierrrossa kiertävien nanopartikkeleiden eristämisestä. Eristäminen alkaa opsonisaatiolla, jolloin plasmaproteiinit eli opsonit sitoutuvat nanopartikkeleihin, ja näin MPS solut pystyvät tunnistamaan ne. Opsonisaatio johtaa usein nanopartikkeleiden hajottamiseen. [16] DNA-nanokuljettimet ovat erityisen alttiita opsonien sitoutumiselle, sillä monilla opsooneilla on positiivinen varaus ja siitä johtuva luonnollinen vetovoima DNA:ta kohtaan. Opsonien sitoutuminen ei ainoastaan kasvata opsonisaation riskiä ja DNA:n hajotusta, vaan se voi myös heikentää kuljettimen pinnalla olevien ligandien vuorovaikutusta kohdesolujen kanssa. [3]

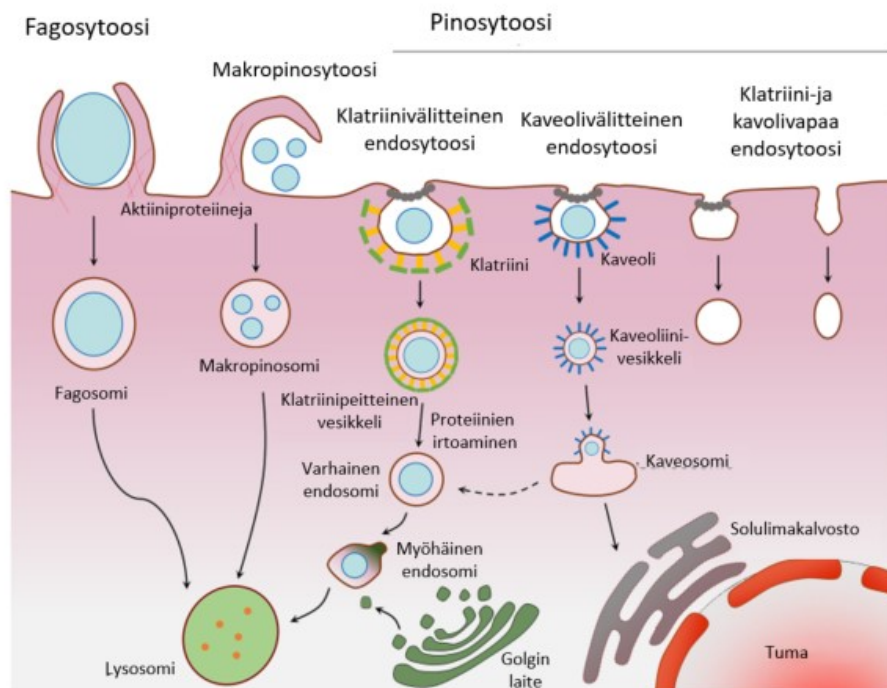
MPS:n lisäksi DNA-nanokuljettimet voivat laukaista toisen luontaisen immuunipuolustusmekanismin useimmissa soluissa esiintyvien, vierasta DNA:ta havaitsemaan tarkoitettujen endogeenisten reseptoreiden toimesta. [3] Eksogeeninen ja solun sisäinen DNA voivat molemmat laukaista nämä sensorit ja siksi tarvitaan erilaisia strategioita minimoimaan immuunijärjestelmän aktivoitumista. On esimerkiksi osoitettu, että lipidien käyttö DNA-origamien pinnoitteissa vähentää immuunivastetta. [2] Verestä ja plasmasta löytyvät nukleasientsyymit hajottavat myös luontaisesti DNA:ta, kuten mainittu luvussa 2.2. Kuitenkin DNA-nanorakenteet ovat stabiilimpia nukleaseja sisältävässä fysikaalisessa ympäristössä, kuin DNA-oligonukleotidit [15].

Lääkeaineen toimittamiselle yksi tärkeä edellytys on sen kuljetuksen kohdentaminen oikeisiin soluihin [4]. Lääkkeen selektiivisyyttä voidaan lisätä muokkaamalla lääkkeiden kuljettajat suosimaan pääsyä tiettyihin solutyyppeihin [2]. DNA-nanoteknologia mahdollistaa sellaisten rakenteiden valmistamisen, joihin voidaan lisätä funktionaalisia ryhmiä solujen tunnistamista varten [4]. DNA-valmisteiden aktiivinen kohdentaminen tapahtuu lähinnä liittämällä rakenteisiin aptameerejä tai solun pinnan tunnistavia reseptoriligandeja [2]. Aptameerit ovat yksijuosteisia oligonukleotideja, jotka voivat spesifisesti sitoutua erilaisiin kohdemolekyyleihin kolmiulotteisen komplementaarisen rakenteensa vuoksi [17]. Aptameerisekvenssit voidaan helposti sisällyttää liitosjuosteiden rakenteisiin tai ne voidaan konjugoida DNA-nanorakenteen pinnalle. Kohdentamisessa voidaan vaihtoehtoisesti hyödyntää myös peptidipinoitteita. Niiden avulla voidaan liittää funktionaalisia biomolekyylejä DNA-origamiin. Myös DNA-origamien koon ja geometrian tarkalla suunnittelulla voidaan saada ne kohdentamaan kasvainsoluihin passiivisesti. [2]

DNA-nanokuljettimien selvittyä kohdesolujensa luo, seuraava biologinen este on solukalvo. Useiden lääkeaineiden tulee päästä sisään kohdesoluun toimittaakseen vaikuttavan aineen oikeaan paikkaan. [2] DNA:n ja solukalvon negatiivisten varausten vuoksi niiden välillä esiintyy hylkimisvuorovaikutusta. Tämän takia DNA-nanorakenteiden passiivinen kulkeutuminen solukalvon läpi

on epätodennäköistä. [4] DNA:n anioninen ja hydrofiilinen luonne estää yksijuosteisen sekä kaksoisjuosteisen DNA:n pääsyn soluun, mutta DNA-nanorakenteet pääsevät helposti solun sisään endosyyttistä reittiä pitkin. [2] Yleisesti endosytoosi voidaan jakaa kahteen reittiin: fagosytoosiin ja pinosytoosiin. Fagosytoosissa solun sisään otetaan yli 250 nanometrin kokoisia partikkeleita ja pinosytoosissa nestettä ja pienempiä molekyyliä. Nisäkkäissä fagosytoosi toimii lähinnä puolustusmekanismina vieraita kappaleita vastaan. Sitä tapahtuu vain tietyillä solutyypeillä, kuten makrofageilla, neutrofiileilla ja monosyyteillä. Pinosytoosia taas tapahtuu kaikissa solutyypeissä, ja se voidaan jakaa makropinosytoosiin ja reseptorivälitteiseen pinosytoosiin. Endosyyttisen reitin määräytyminen riippuu suuresti nanorakenteen koosta. Koon lisäksi DNA-rakenteen muoto ja 3D-järjestäytyminen ovat tärkeitä tekijöitä sujuvan solun sisään pääsyn kannalta. [4]

Fagosytoosissa ligandien ja reseptorien välisten vuorovaikutusten avulla tunnistetaan suuria makromolekyyliä, jotka kurotaan aktiiniproteiinien avulla soluun sisään kuvan 8 mukaisesti. Niin kuin fagosytoosi, makropinosytoosi on myös aktiivivälitteinen endosyyttinen prosessi. [4] Toisin kuin fagosytoosi, se on ei-selektiivinen prosessi, jossa solukalvo kuroo sisäänsä nestettä ja pienempiä partikkeleita vesikkeleiksi, joita kutsutaan makropinosomeiksi. Makropinosytoosi mahdollistaa makromolekyylien otton sellaiseen soluun, jolla fagosytoosi ei ole mahdollinen eivätkä molekyylit pystyisi kulkeutumaan muita endosyyttisiä reittejä pitkin. [18] Myöhemmin makropinosomit yhdistyvät lysosomien kanssa ja hajoavat [4].



Kuva 8. Nanorakenteiden pääsy soluun endosyyttisiä reittejä pitkin. Yli 250 nanometrin kokoiset makromolekyylit pääsevät soluihin fagosytoosilla, ja pienemmät nanokokoiset rakenteet pinosytoosilla, joka voidaan jakaa makropinosytoosiin, klatriini- ja kaveolivälitteiseen endosytoosiin (reseptorivälitteinen) ja reseptorivapaaseen endosytoosiin. Muokattu lähteestä [4].

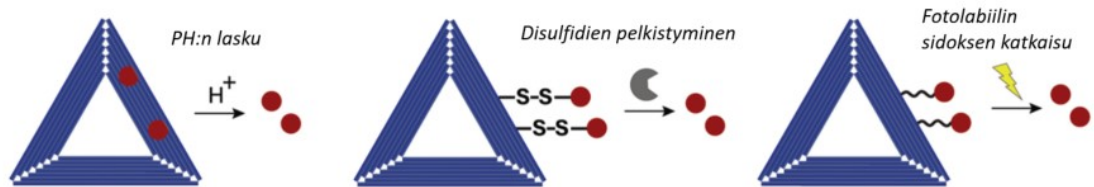
Reseptorivälitteistä endosytoosia on kahdenlaista. Klatriinivälitteinen endosytoosi (engl. clathrin-mediated endocytosis, CME) on merkittävin tapa ottaa soluun sisälle solun ulkoisia nanokokoisia materiaaleja, kuten DNA-nanorakenteita. Solun pinnalla olevat reseptorit tunnistavat nanomateriaalin pinnan ligandeja, jolloin solukalvo taipuu ja muodostuva solun sisäinen vesikkeli peittyy klatriiniproteiineilla (kuva 8). Solun sisällä vesikkelin proteiinit irtoavat sen pinnalta ja vesikkeli muuttuu varhaiseksi endosomiksi. Esilysosomaalinen endosomi yhdistyy varhaisen endosomin kanssa muodostaen myöhäisen endosomin ja kypsyen lysosomiksi, jossa endosomi ja sen sisältö hajotetaan. Myös reseptorivapaa CME on yksi tapa ottaa nanomateriaaleja soluun. Siinä solut tunnistavat kuljettimet epäselektiivisesti hydrofiilisten ja elektrostaattisten vuorovaikutusten avulla. Se on kuitenkin huomattavasti hitaampi reitti reseptorivälitteiseen verrattuna. Nopean ja tarkan lääkeaineen kuljetuksen kannalta on siis tärkeää suunnitella nanokuljettajien pinnalle tunnistusta helpottavia ligandeja. Sen lisäksi kuljettimien täytyy pystyä pääsemään pois aikaisesta endosomista nopeasti, jotta ne välttävät lysosomissa tapahtuvan hajotuksen ja pystyvät toimittamaan lääkeaineen kohteena olevaan soluelimeen. [4]

Kaveolivälitteinen endosytoosi (engl. caveolae-mediated endocytosis, CvME) on toinen reseptoriin riippuvan pinosytoosin muoto. Solun pinnalla olevat reseptorit tunnistavat tietyt ligandit, jotka käynnistävät vesikkelin kuroutumisen samaan tapaan kuin klatriinivälitteisessä endosytoosissa. Kaveoliiniproteiinit peittävät solun sisään muodostuvaa kaveoliinivesikkeliä. [4] Solukalvolta irronneet kaveolit muodostavat kaveosomiksi kutsutun rakenteen, joka muuttuu varhaiseksi endosomiksi tai kulkeutuu solukalvostolle ja siitä eteenpäin kuvan 8 mukaisesti [4,19]. Näiden reittien lisäksi on olemassa myös pieniä lipidilauttoja, jotka voivat muodostua minkä tahansa solun sisäpuolelle ja yhdistyä erilaisiin endosyyttisiin vesikkeleihin. Tällaiset klatriini- ja kaveoliriippumattomat pinosytoosireitit ovat toistaiseksi vielä aika tuntemattomia ja vaativat lisää tutkimusta. [4]

3.3 Lääkeaineen vapautus ja kuljettimen hajotus

Solun sisällä DNA-nanokuljettimien täytyy pystyä vapauttamaan lääkeaine soluun, jotta se pääsee vaikuttamaan halutulla tavalla. Tämä vaatii usein kuljettimen poistumista endosyyttiseltä reitiltä sytoplasmaan eli solulimaan. [3] Lääkeaineen irtautuminen DNA-origami-nanorakenteesta voidaan saada aikaan jollain ulkoisella ärsykkeellä tai ympäristön muutoksella, kuten pH:n laskulla, disulfidien pelkistymisellä ja fotolabiilien sidosten katkaisulla (kuva 9). Ympäristön pH:n lasku aiheuttaa joidenkin lääkeaineiden vapautumisen DNA-origamista. Monet tutkimukset keskittyvätkin juuri tähän tapaan vapauttaa lääkeaine, sillä kasvainsolujen pH-arvo on matalampi kuin normaaleilla soluilla. Disulfidididosten avulla kiinnitetyt lääkeaineet voidaan taas saada irtoamaan sidosten pelkistyessä. Nämä pelkistymiseen reagoivat DNA-origamit voivat edistää vapautusta kasvainsoluissa, sillä niissä pelkistymisaktiivisuus on yleensä korkeampi. Myös valoon reagoivat DNA-origamit ovat yksi kehityskohde. Lääkeaineet voidaan kiinnittää niihin fotolabiileilla sidoksilla, eli sidoksilla, jotka pystytään katkaisemaan valon avulla. [2,15] Näiden lisäksi tutkitaan ja kehitetään monenlaisia muitakin tapoja saada lääkeaine vapautumaan DNA-origameista. Esimerkiksi vuorovaikutus soluista löytyvän ATP- eli adenosini trifosfaattimolekyylin kanssa voi saada

aikaan lääkkeen vapautumisen DNA-rakenteesta. Myös tietyt antigeenit ja entsyymit sekä lämpötilan muutokset voivat olla tulevaisuudessa tapoja saada vapautuminen tapahtumaan. [15] On hyvä huomata, että näitä strategioita on testattu vain laboratorioympäristössä. Kyky parantaa lääkeainekuljetuksen selektiivisyyttä jää siis tulevaisuuteen vielä tutkittavaksi. [2,15]



Kuva 9. Lääkeaine voidaan vapauttaa DNA-origamista ulkoisen laukaisimen tai ympäristön muutoksen avulla, kuten pH:n lasku, disulfidididosten pelkistyminen ja fotolabiilin sidoksen katkaisu. Kuva muokattu lähteestä [2].

Solussa DNA-origamit lopulta hajotetaan yleensä endosyyttisillä reiteillä, vaikka stabiloivia pinnoitteita olisi käytetty. Tämäkin voi olla tehokas tapa vapauttaa DNA-nanorakenteista lääkeaineita, jotka voivat sitten myöhemmin vapautua endosomeista. [2] Kuten aiemmin käsitelty, klatriinivälitteisessä endosytoosissa DNA-nanorakenteet muodostavat vesikkelin solun sisään, josta lopulta muodostuu lysosomi, missä endosymaalinen hajotus tapahtuu. Itse DNA-origamin osien hajotus tapahtuu soluista löytyvien DNAasi-entsyymien eli deksiribonukleaasien toimesta. Kuitenkin hajotuksen paikka ja aika riippuvat kuljettimen soluun pääsyreitistä. Kun lääkeaine on vapautunut kuljettimesta monet nanomateriaalit saattavat vastustaa nukleaasien toimesta tapahtuvaa hajotusta. Tämä voi johtaa soluissa epätoivottuun kuljettimen kerääntymiseen. Koska DNA kuitenkin hajoaa luonnollisesti nukleaasien toimesta, DNA-origamit saadaan hajoamaan soluissa muita nanomateriaaleja helpommin. [4]

Usein lääkeaineen kulkeutuminen oikeaan paikkaan solun sisällä vaatii poispääsyn endosyyttiseltä reitiltä. On jo löydettykin tapoja vapauttaa DNA-origami tältä reitiltä, esimerkiksi kaveolivälitteinen endosytoosi. Myös esimerkiksi DNA-rakenteen pinnoittaminen tumaan ohjaavilla signaalintipeptideillä voi saada rakenteen kulkeutumaan solun tumaan. Nanokokaisen neulan avulla on myös mahdollista injektoida DNA-origami suoraan solun sytosoliin. [4]

3.4 Haasteita

Viimeisen 35 vuoden kuluessa DNA-nanoteknologia on alana edistynyt valtavasti ja paljon erilaisia lääketieteellisiä sovelluksia on kehitetty [8]. Tautien molekulaarisista ominaisuuksista ja nanopartikkeleiden käyttäytymisestä *in vivo* saadaan koko ajan lisää tietoa. Sen johdosta tulevaisuudessa todennäköisesti nanopartikkeleita voidaan räätälöidä tarjoamaan turvallista, tehokasta ja yksilöllistä hoitoa potilaille. Tämän saavuttamiseksi DNA-nanokuljettimien täytyy selättää tietyt haasteet, kuten biologisten esteiden ohitus ja rakenteen stabiilisuus. [3]

DNA-origamien stabiilisuus fysiologisessa ympäristössä on yksi tärkeimmistä kriteereistä, jotka on otettava huomioon [8]. Nanopartikkeleiden koko, muoto ja pintamuokkaus ovat merkittäviä tekijöitä niiden kykyyn toimia *in vivo*, mutta rakenteellinen pysyvyys kulkeutumisen aikana pitäisi pystyä takaamaan. On osoitettu, että korkean varaustiheyden omaavat DNA-nanorakenteet ovat vähemmän stabiileja ja hajoavat soluväliaineessa alhaisen ionilujuuden vuoksi. Näyttäisi siis siltä, että DNAasien toimesta tapahtuva entsyymaattinen hajotus koetaan tähän verrattuna pienemmäksi haasteeksi. Nämä havainnot ohjaavat tulevaisuuden tutkimusta parantamaan DNA-nanokuljettimien stabiilisuutta *in vivo* vähentämällä DNA-kierteiden luonnollisia hylkimisvuorovaikutuksia. [3] On jo saatukin tuloksia, jotka osoittavat DNA-nanokuljettimien voivan selviytyä tarpeeksi kauan päästäkseen kohteeseensa ja suorittaakseen tehtävänsä. Esimerkiksi Steven Perault ja William Shih osoittivat hiirillä tehdyssä tutkimuksessaan, että DNA-origamin peittäminen lipidikalvolla kasvatti sen puoliintumisaikaa moninkertaisesti. [8,20]

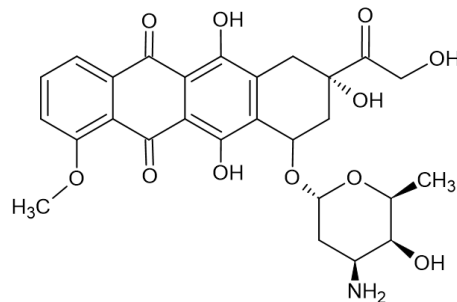
Elävistä eliöistä löytyvän DNA-biomolekyylin ei pitäisi aiheuttaa mitään sytotoksisia eli soluille haitallisia vaikutuksia. Kuitenkin erilaisia farmakologisia tutkimuksia ja kokeita elävissä eläimissä tarvitaan vielä lisää. On tärkeää tutkia DNA-origamien käyttöä ja mahdollista pitkäaikaista sytotoksisuutta tulevaisuudessa kliinisissä tutkimuksissa. [8] Ylipäänsä kuljettimen mittojen kasvaessa ja rakenteen monimutkaistuessa virheiden ja epätoivottujen vaikutusten mahdollisuus kasvaa. Mahdollisten vikojen löytäminen ja ratkaiseminen onkin tärkeää turvallisen käytön takaamiseksi. [6] Yksi suuri haaste DNA-nanorakenteiden käytössä on luvussa 3.2 mainitut tarkoituksettomat vuorovaikutukset immuunipuolustuksen kanssa. Kaikista kehon biologisista haasteista suurin kuitenkin näyttäisi olevan lääkeaineen poispääsy endosyyttiseltä reitiltä. Tämä oletus perustuu siRNA-tutkimuksiin, joissa epäonnistunut poistuminen endosyyttiseltä reitiltä on suurin syy siihen, miksi siRNA-pohjaiset lääkehoidot eivät ole vielä päässeet kaupalliseen käyttöön huolimatta laajasta tutkimustyöstä. [3] Lääkeaineen poispääsy endosyyttiseltä reitiltä on osa onnistunutta kohdentamista. Onnistuneessa kohdentamisessa on myös tärkeää saada kuljetin ja lääkeaine kulkeutumaan oikeisiin kudoksiin ja soluihin. DNA-origamien pinnan muokkaaminen on yksi mahdollinen tapa siihen. On osoitettu, että esimerkiksi viruksen kapsidiproteiinien liittäminen DNA-origamin pinnalle tehosti sen pääsyä soluun. Tutkimuksia selektiivisyydestä ja spesifisyydestä tulee siis jatkaa, sillä ne ovat hyvin tärkeitä tekijöitä lääkeainekuljetuksessa. [8]

Suurin osa DNA-origameihin liittyvästä tutkimustyöstä on suoritettu *in vitro* [3]. Tulevaisuudessa voidaan siis odottaa DON-välitteisen lääkeainekuljetuksen siirtyvän yhä enemmän *in vivo* -tutkimusten puolelle. Tutkimukset keskittyvät kontrolloituun lääkeaineen lataamiseen ja vapauttamiseen, kuin myös DNA-origamien kulkeutumiseen ja hajoamiseen. [2] Spesifisyys ja selektiivisyyden parantaminen ovat myös suuressa roolissa [8]. Ylipäänsä mahdollisuus käyttää DNA-origameja lääkeainekuljettimena riippuu niiden toiminnasta *in vivo*. Siihen liittyvän lisääntyvän ymmärryksen myötä DON-teknologia voi varmasti vakiinnuttaa paikkansa lääkeainekuljetinsuunnittelussa. Seuraavien vuosikymmenten aikana voidaan luultavasti valjastaa niitä massatuotantoon ja jatkaa siitä kohti klinisiä tutkimusvaiheita. [2]

4. DNA-ORIGAMIEN MERKITYS SYÖPÄHOI- DOSSA

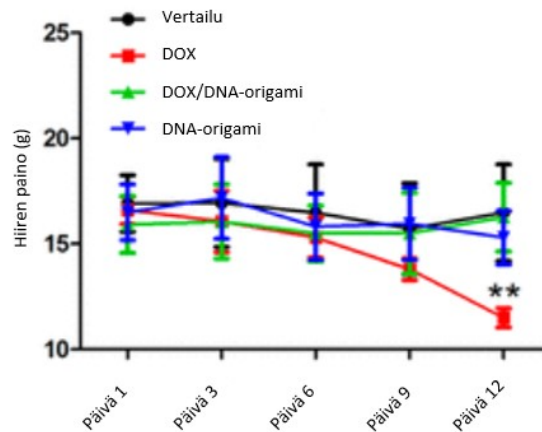
Syöpä on yksi merkittävimmistä sairastuvuuden ja kuoleman aiheuttajista maailmanlaajuisesti. Miljoonia tapauksia ilmoitetaan vuosittain. Syöpään on olemassa erilaisia hoitokeinoja, joista jokaisella on omat etunsa ja sivuvaikutuksensa. [21] Viime vuosina nanolääketiede on synnyttänyt paljon kiinnostusta syövän yhtenä hoitokeinona. Erityisesti DNA-nanorakenteiden ominaisuudet, kuten hallittavissa oleva koko, muoto ja pintakemia, biologinen yhteensopivuus ja mahdollisuus monipuoliseen muokkaamiseen, tekevät siitä ideaalisen työkalun syövän diagnosoimiseen ja hoitamiseen. [5] Muutamat kokeilut ovat osoittaneet DNA-nanorakenteiden ominaisuuksien esimerkiksi parantavan kemoterapian tehokkuutta ja vähentävän haitallisia sivuvaikutuksia [5,8].

DNA-origameihin on viime vuosien aikana liitetty ja testattu erilaisia lääkeaineita, kuten antrasykliinejä, entsyymejä, proteiineja ja pieniä molekyyliä. Valtaosa tutkimuksista kuitenkin keskittyy doksorubisiin (DOX) liittämiseen DNA-nanorakenteisiin. [2,22] DOX on lääkeaine, jota käytetään paljon syöpähoitona kemoterapiassa, sillä se aiheuttaa soluissa DNA-vaurioita ja solukuoleman. Se aiheuttaa kuitenkin samalla paljon vakavia haittavaikutuksia, joten sen käyttöön perustuvia hoitoja kehitetään jatkuvasti. DNA:n käyttö DOX:in kuljetuksessa saattaa olla yksi tulevaisuuden keino parantaa näitä hoitoja. [2,23] DON-DOX-kompleksit luodaan helposti interkaloiden DOX-molekyyli G-C-emäsparien väliin tai DNA:n matalaan uurteeseen A-T-rikkaille alueille. [2,22] DOX:issa esiintyvä daunosiinisokeri mahdollistaa sitoutumisen DNA-molekyylin matalaan uurteeseen ja tetraasiinirengasosa taas interkalaation DNA-molekyylin emäsparien väliin (kuva 10) [23]. DON-DOX-kompleksi on hyvin stabiili fysiologisessa pH:ssa [5]. Tutkimukset luvussa 3.3 mainitusta pH:n laskun myötä tapahtuvasta lääkeaineen vapautumisesta keskittyvät paljon nimenomaan DOX:in nopeaan vapautumiseen pH:n laskiessa [2]. Esimerkiksi Heini Ijäs et al. tutkimuksessaan karakterisoivat spektroskopian avulla DOX:in lataamista ja vapautumista DNA-origamista. He osoittivat DOX:in latautuvan yhtä nopeasti kokeessa käytettyihin erilaisiin DNA-origameihin, mutta DOX:in vapautumisen nopeus riippui DNA-origamin rakenteesta ja DOX:in esiintyvyydestä rakenteessa. [22]



Kuva 10. Doksorubisiinin kemiallinen rakenne. Muokattu lähteestä [22].

DNA-origamin turvallisuus on yksi tärkeä tarkastelun kohde DNA:han pohjautuvassa lääkeainekehityksessä. Esimerkiksi Qian Zhang et al. ovat teettäneet kokeita tutkiakseen DNA-nanorakenteiden turvallisuutta. Yhdessä hiirillä teettämistään kokeista he osoittivat, että doksorubisiinia sisältävät kolmionmuotoiset DNA-nanorakenteet pienensivät hiirellä esiintyvän kasvaimen kokoa, vaikka hiiren paino ei pudonnut, toisin kuin siinä ryhmässä, jossa hiiriä hoidettiin ilman DNA-origamia kuljettimena. Kuvassa 10 on esitetty kokeessa käytettyjen hiirten painojen muutokset ajan funktiona. Kokeessa hiiret saivat joko hoidon suolaliuksella (vertailuryhmä), pelkällä doksorubisiinilla, pelkällä DNA-origamilla tai DOX-DNA-origamin yhdisteellä. Kuvaajasta huomataan, että DNA-origami yksinään ei vaikuttanut hiirten painoon. Verratessa pelkällä doksorubisiinilla ja DNA-origamiin kiinnitettyllä doksorubisiinilla hoidettuja hiiriä nähdään, että doksorubisiini aiheutti merkittävää painon putoamista vain silloin, kun sitä käytettiin ilman DNA-origamia kuljettimena. Tämä osoittaa siis doksorubisiinilla ladattujen DNA-nanokuljettimien aiheuttaneen vähemmän haittavaikutuksia (tässä tapauksessa tutkittua painon putoamista) ja näin olleen vähemmän myrkyllisiä kuin puhdas doksorubisiini. [24]



Kuva 11. Kasvaimen omaavien hiirten paino erilaisten hoitojen aikana ajan funktiona. Virhepalkit edustavat kolmen erillisen kokeen keskiarvon keskivirhettä. Muokattu lähteestä [24].

Kustannuksien osalta näyttäisi siltä, että DNA-origamien käyttäminen olisi edullisempaa kuin nykyisten hoitomuotojen. Olettaen, että ihmiskehon pinta-ala on arviolta $1,62 \text{ m}^2$, yhden hoitosyklin aikana DOX:ia tarvitaan noin 122 mg , joka liukoisessa muodossa maksaa noin 200 euroa . Tämä määrä tarvitsee arviolta 450 mg DON-kuljettimia. Niiden laajamittainen tuotanto voidaan suorittaa arviolta $0,18 \text{ euroa}$ milligrammaa kohden, jolloin yhden hoitosyklin aikana tarvittavien DNA-origamien hinnaksi jää noin 80 euroa . Vertailun vuoksi mainittakoon, että nykyisten liposomaalisten kuljettimien hinta DOX-hoitosykliä kohden on noin 4500 euroa . Tästä huomataan, etteivät materiaalikustannukset ole rajoittava tekijä DON-valmisteiden käyttöönotolle, vaikkakin monimutkaisten DNA-origami-lääkeainekompleksien valmistaminen on äsken mainittua esimerkkiä kalliimpaa ja työläämpää. [2]

Doksorubisiinin ja muiden antrasykliinien kuljetuksen lisäksi DNA-origamien avulla voidaan mahdollistaa ja kehittää muitakin syövän hoitomuotoja. Epäorgaaniset nanomateriaalit, kuten metallit

ja metalliyhdisteet, ovat osoittaneet potentiaalia ja lukuisia etuja syövän hoidossa. Tällaisia nanomateriaaleja on mahdollista yhdistää DNA-origameihin, joten kehitystä tämän saralta voidaan varmasti odottaa. [5] Myös fotodynaaminen syöpähoito voi olla mahdollista tulevaisuudessa DNA-origamien avulla. Kun DNA-nanorakenteeseen yhdistetään lääkeaine fotolabiililla silloittamisella, se saadaan vapautumaan, kuten luvussa 3.3 mainittu, valon vaikutuksen avulla. [2] Yhä useammat tutkimukset raportoivat myös geeninsiirron tehokkuudesta syöpähoidoissa. Useimmissa ihmiseltä löytyvistä kasvainsoluissa on tapahtunut antionkogeenin p53 mutaatio. Siksi p53-geeniä ilmentävän plasmidin kuljetuksesta soluihin on tullut laajalti käytetty menetelmä geeniterapiassa. DNA-nanoteknologian viimeaikainen kehitys on mahdollistanut tiettyjen geenien kuljetuksen kasvainsoluihin. Tämä vaikuttaa olevan parempi lähestymistapa kuin ylimääräisiä sekvenssejä sisältävät bakteeriperäisten plasmidien kuljetussysteemit. [5]

Suurin osa tutkimuksista keskittyy parantamaan eri lääkeaineiden hoitavaa vaikutusta. Vain muutammat tutkimukset ovat osoittaneet, että DNA-rakenteet eivät ole myrkyllisiä *in vivo* ja/tai *in vitro*. Tällainen tutkimus on niin rajallista, ettei se riitä DNA-nanorakenteiden hyväksymiseen lääketieteellisyydessä, vaan lisää tutkimusta farmakologiasta, toksikologiasta, sivuvaikutuksista ja erilaisten DNA-nanorakenteiden lääkkeiden yhteisvaikutuksista tarvitaan. [5] Lähitulevaisuudessa voidaan odottaa pyrkimyksiä päästä yksimielisesti sellaiseen DON-rakenteeseen, joka voidaan ottaa kaupalliseen käyttöön kuljetusalustaksi DOX-hoidoissa [2].

5. YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän tutkielman tarkoituksena oli tutustua DNA-origameihin ja niiden käyttöön lääkeainekuljetuksessa. Työssä selvitettiin, miten DNA-origamit rakentuvat ja minkälaisia ominaisuuksia niillä on. Työssä esiteltiin DNA-origamien käyttöä lääkeainekuljetuksen eri vaiheissa sekä tutustuttiin niihin liittyviin vielä ratkaisemattomiin ongelmakohtiin. Lopuksi tarkasteltiin niiden merkitystä ja käyttöä syöpähoidoissa. Kaikki tarkastelu tehtiin aiheeseen liittyvän kirjallisuuden pohjalta.

DNA-origamit ovat DNA-molekyylin pohjautuvia nanokokoisia rakenteita. DNA-juosteen emästen välillä esiintyvät spesifit vuorovaikutukset mahdollistavat erimuotoisten ja erikokoisten rakenteiden valmistamisen. DNA-origamin perusrakenteessa pitkä templaattijuoste taipuu lyhyiden liitosjuosteiden avulla ennalta suunniteltuihin muotoihin. Kyseinen ohjelmitavuudeksi kutsuttu ominaisuus on yksi DNA-origamien merkittävimmistä eduista. Se mahdollistaa rakenteen tarkan suunnittelemisen käyttötarkoituksen mukaan. Toinen merkittävä ominaisuus on DNA:n biologinen yhteensopivuus solujen kanssa. Lääkeainekuljettimien rakentaminen soluista luonnostaan löytyvästä molekyylisestä vähentää esimerkiksi sytotoksisuutta ja kuljettimen kerääntymistä soluihin. DNA-origamit voidaan suunnitella myös reagoimaan ulkoisiin ärsykkeisiin, joka helpottaa lääkeaineen vapauttamista. Näin mahdollistuu kuljetuksen tarkempi suunnittelu ja lääkkeiden parempi kohdentaminen.

Lääkeaine kiinnitetään DNA-origamiin hyödyntämällä DNA:ssa esiintyviä vuorovaikutuksia tai sulkemalla se rakenteen sisään. Verenkierron mukana kulkeutuessaan DNA-origamit saattavat aiheuttaa vasteen immuunipuolustuksessa, kuten mononukleaarisen fagosyyttijärjestelmän aktivoitumisen. Kuten jo johdannossa todettiin, selektiivisyys eli kulkeutuminen kohdesoluihin on merkittävässä roolissa turvallisessa ja tehokkaassa lääkeainekuljetuksessa. DNA-origamien kohdentaminen oikeisiin soluihin tapahtuu muokkaamalla rakenteen kokoa, muotoa ja pintakemiaa, esimerkiksi liittämällä siihen kohdesolun tunnistavia reseptoriligandeja. DNA-origami pääsee soluun endosyyttistä reittiä pitkin, yleisimmin klatriinivälitteisesti. Lääkeaineen vapautuminen DNA-nanorakenteesta tapahtuu solun sisällä. Vapautuminen tapahtuu yleensä ulkoisen laukaisimen tai ympäristön muutoksen ansiosta, esimerkiksi valon vaikutuksesta tai pH:n laskiessa. Lopulta DNA-origamit hajotetaan endosyyttisillä reiteillä ja DNA-juosteen osat nukleotideiksi nukleasientsyymien toimesta. Joskus kuitenkin lääkeaineen vapautuminen vaatii DNA-origamin poistumista endosyyttiseltä reitiltä solulimaan, jolloin se hajotetaan kokonaan nukleasien toimesta.

DNA-origamit ovat myös kiinnostusta herättävä uusi materiaali syöpähoitojen kehityksessä. Syöpähoidoissa merkittävä haaste on hoidoista aiheutuvat haittavaikutukset. DNA-origamin hallittavissa olevat ominaisuudet sekä biologinen yhteensopivuus tekevät siitä potentiaalisen kehityskohteen lääkeainekuljettimiksi syöpähoitoihin. Paljon on jo tutkittu kemoterapiassa usein käytetyn lääkkeen, doksorubisiinin, kuljetusta DNA-origamien avulla. Näissä tutkimuksissa on esimerkiksi kartoitettu DNA-origami-DOX-kompleksin aiheuttamia mahdollisia haittavaikutuksia, ja tähän

mennessä vaikuttaakin siltä, ettei niitä juuri ole. Doksorubisiinin ja muiden antrasykliinien kuljetamisen lisäksi DNA-origami voi mahdollistaa muunlaistenkin syöpähoitojen kehityksen, kuten fotodynaamisen hoidon ja geeniterapian.

DNA-origami-nanorakenteisiin liittyy vielä kuitenkin monia ratkaisemattomia haasteita. Merkittävimminä kehityskohteina voidaan pitää rakenteen stabiilisuutta ja kuljettimen mahdollisimman tarkkaa kohdentamista. Lääkeaineen tarkka kohdentaminen sisältää haasteen vapauttaa DNA-origami solun sisällä endosyyttiseltä reitiltä. Lääkeainekuljetuksessa jatkuva kehityskohde on myös työssä käsitellyt tarkoituksettomat vuorovaikutukset immuunipuolustuksen kanssa. Tärkeää on myös huomata, että DNA-origami-nanorakenteisiin liittyviä tutkimuksia on tehty lähinnä *in vitro*. Elävä eliö ja ennen kaikkea ihmiskeho on niin monimutkainen kokonaisuus, että *in vivo* -tutkimukset herättävät varmasti lisää kysymyksiä ja huomioita. Niitä tutkimuksia tarvitaan siis vielä paljon, ennen kuin DON-valmisteiden voidaan todeta olevan toimivia ja turvallisia kaupalliseen käyttöön. Yhteenvetona voidaan siis todeta, että DNA-origamien yksilölliset ja monipuoliset ominaisuudet tekevät siitä lupaavan nanorakenteen tulevaisuuden lääketieteellisille sovelluksille. Lisätutkimusta kuitenkin tarvitaan vielä, erityisesti *in vivo*.

LÄHTEET

- [1] Siepmann J, Siegel RA, Rathbone MJ. *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*. 1st ed. 2012. New York, NY : Springer US : Imprint: Springer; 2012.
- [2] Weiden J, Bastings MMC. DNA origami nanostructures for controlled therapeutic drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2021;52:101411. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.101411>.
- [3] Okholm AH, Kjems J. DNA nanovehicles and the biological barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016;106:183–91. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.024>.
- [4] Hu Q, Li H, Wang L, Gu H, Fan C. DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems. *Chem Rev* 2019;119:6459–506. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00663>.
- [5] Sun Q, Han Y, Yang Y, de la Fuente JM, Cui D, Wang X. Application of DNA nanostructures in cancer therapy. *Applied Materials Today* 2020;21:100861. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100861>.
- [6] Johnson JA, Dehankar A, Robbins A, Kabtiyal P, Jergens E, Ho Lee K, et al. The path towards functional nanoparticle-DNA origami composites. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2019;138:153–209. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2019.06.003>.
- [7] Anastassacos F. *Towards the Therapeutic Application of DNA origami*. Doctoral dissertation. Harvard Univeristy, 2019.
- [8] Udomprasert A, Kangsamaksin T. DNA origami applications in cancer therapy. *Cancer Science* 2017;108:1535–43. <https://doi.org/10.1111/cas.13290>.
- [9] Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Essential Cell Biology*. 4. Garland Science; 2014.
- [10] Endo M, Yang Y, Sugiyama H. DNA origami technology for biomaterials applications. *Biomater Sci* 2013;1:347–60. <https://doi.org/10.1039/C2BM00154C>.
- [11] Kuzuya A, Komiyama M. DNA origami: Fold, stick, and beyond. *Nanoscale* 2010;2:309–21. <https://doi.org/10.1039/B9NR00246D>.
- [12] Endo M, Sugiyama H. DNA Origami Nanomachines. *Molecules* 2018;23. <https://doi.org/10.3390/molecules23071766>.
- [13] Jung W-H, Chen E, Veneziano R, Gaitanaros S, Chen Y. Stretching DNA origami: effect of nicks and Holliday junctions on the axial stiffness. *Nucleic Acids Research* 2020;48:12407–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa985>.
- [14] Zhao Z, Liu Y, Yan H. Organizing DNA Origami Tiles into Larger Structures Using Preformed Scaffold Frames. *Nano Lett* 2011;11:2997–3002. <https://doi.org/10.1021/nl201603a>.
- [15] Wang T, Liu Y, Wu Q, Lou B, Liu Z. DNA nanostructures for stimuli-responsive drug delivery. *Smart Materials in Medicine* 2022;3:66–84. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2021.12.003>.
- [16] dos Santos SN, Rezende Dos Reis SR, Pires LP, Helal-Neto E, Sancenón F, Barja-Fidalgo TC, et al. Avoiding the mononuclear phagocyte system using human albumin for mesoporous

- silica nanoparticle system. *Microporous and Mesoporous Materials* 2017;251:181–9. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2017.06.005>.
- [17] Feng X, Zhu Y, Wang F, Guo T, Dou X, Lin M, et al. The Aptamer Functionalized Nanocomposite Used for Prostate Cancer Diagnosis and Therapy. *Journal of Nanomaterials* 2022;2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9946357>.
- [18] Sousa de Almeida M, Susnik E, Drasler B, Taladriz-Blanco P, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. *Chem Soc Rev* 2021;50:5397–434. <https://doi.org/10.1039/D0CS01127D>.
- [19] Solunetti: Kaveolit endosytoosissa 2006. https://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/kaveolivalit-teinen_endosytoosi/2/ (accessed March 28, 2022).
- [20] Perrault SD, Shih WM. Virus-Inspired Membrane Encapsulation of DNA Nanostructures To Achieve In Vivo Stability. *ACS Nano* 2014;8:5132–40. <https://doi.org/10.1021/nn5011914>.
- [21] Abbas M, Baig MMFA, Zhang Y, Yang Y-S, Wu S, Hu Y, et al. A DNA-based nanocarrier for efficient cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2021;11:330–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.005>.
- [22] Ijäs H, Shen B, Heuer-Jungemann A, Keller A, Kostainen MA, Liedl T, et al. Unraveling the interaction between doxorubicin and DNA origami nanostructures for customizable chemotherapeutic drug release. *Nucleic Acids Research* 2021;49:3048–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab097>.
- [23] Stuart CH, Horita DA, Thomas MJ, Salsbury FR Jr, Lively MO, Gmeiner WH. Site-specific DNA-doxorubicin conjugates display enhanced cytotoxicity to breast cancer cells. *Bioconjug Chem* 2014;25:406–13. <https://doi.org/10.1021/bc4005427>.
- [24] Zhang Q, Jiang Q, Li N, Dai L, Liu Q, Song L, et al. DNA Origami as an In Vivo Drug Delivery Vehicle for Cancer Therapy. *ACS Nano* 2014;8:6633–43. <https://doi.org/10.1021/nn502058j>.