

Lääkkeiden kohdistaminen DNA-origameilla

Kandidaatintutkielma, 26.1.2020

Tekijä:

HEINI JÄRVINEN

Ohjaaja:

JUSSI TOPPARI (JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, FYSIIKAN
LAITOS)



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO
FYSIIKAN LAITOS

© 2020 Heini Järvinen

Julkaisu on tekijänoikeussäännösten alainen. Teosta voi lukea ja tulostaa henkilökohtaista käyttöä varten. Käyttö kaupallisiin tarkoituksiin on kielletty. This publication is copyrighted. You may download, display and print it for Your own personal use. Commercial use is prohibited.

Tiivistelmä

Järvinen, Heini
Lääkkeiden kohdistaminen DNA-origameilla
LuK-tutkielma
Fysiikan laitos, Jyväskylän yliopisto, 2020, 54 sivua

Tutkielmassa käsitellään lääkkeiden aktiivista kohdistamista ja kuljettamista DNA-origameja hyödyntävillä nanorakenteilla. DNA-nanoteknologia hyödyntää nanorakenteiden itsejärjestäytymistä kyetäkseen vaikuttamaan näissä mittakaavoissa esiintyviin reaktioihin ja tapahtumiin. DNA-molekyylien avulla on mahdollista muodostaa lääkkeiden kuljettimia, jotka kykenevät kiertämään tai korjaamaan muiden kuljettimien yleisiä, epätoivottuja ominaisuuksia, lisäämään lääkkeiden kohdentumista tiettyihin kudoksiin ja vähentämään lääkkeiden epäonnistuneesta kohdentamisesta aiheutuneita sivuvaikutuksia. DNA-nanoteknologiaan ja -origameihin perustuvat sovellukset ovat osoittaneet lukuisia hyödyllisiä, biologisiin ympäristöihin soveltuvia ominaisuuksia, joilla voidaan mahdollisesti ratkaista joitakin lääketieteen ja nykyisten kuljettimien keskeisimpiä ongelmia. Tutkielmassa perehdytään ja analysoidaan tieteenalan kohtamia merkittävimpiä haasteita ja esitetään mahdollisia ratkaisuja näiden haasteiden ylittämiseksi.

Avainsanat: DNA-origami, lääkkeiden kohdistaminen, DNA-nanoteknologia, lääkkeiden kuljetus.

Abstract

Järvinen, Heini

Drug targeting using DNA-origami nanostructures

Bachelor's thesis

Department of Physics, University of Jyväskylä, 2020, 54 pages.

This thesis discusses the usage of DNA-origami for efficient and active drug targeting. DNA-nanotechnology utilizes the power of active self-assembly to influence events and reactions happening at the nanoscale. Using DNA-molecules, it is possible to create drug transporting vehicles that prevent the unwanted properties of drugs, increase the amount of drugs that reach the target tissue and reduce the amount of off-target effects. DNA-based transporters have demonstrated some superior properties compared to the existing drug carrier molecules. The most significant challenges and problems of the field are analyzed and discussed in this thesis. Some of the possible solutions to these problems are also introduced.

Keywords: DNA-origami, drug targeting, DNA-nanotechnology, drug delivery.

Esipuhe

Suuret kiitokset Jussi Topparille tutkielman ohjaamisesta. Tutkielma ei olisi ikinä valmistunut ilman hänen kannustavaa asennettaan, ystävällistä luonnettaan ja tarkkaavaisia kommenttejaan. Haluan kiittää myös kaikkia muita kandidaatintyön kehittämisessä ja tarkastamisessa auttaneita henkilöitä. Kaikenlainen palaute on ollut kirjoitustyölle ja henkilökohtaiselle kehitykselleni tärkeää ja tervetullutta, ja on sitä myös tämän tutkielman julkaisemisen jälkeen. DNA-origamien ja lääkkeiden kohdistamisen maailmaan on ollut mielenkiintoista ja palkitsevaa uppoutua eikä sen tutkiskeleminen tule päättymään tähän. Tulen tutkielman rakentamisen myötä jatkamaan aiheeseen tutustumista ja sen seuraamista myös tulevaisuudessa kasvavalla mielenkiinnolla. Aiheeseen tutustuminen ja kirjallisuuskatsauksen laatiminen on ollut itselleni suuri ilo, mutta sitäkin suurempi ilo on tämän työn ja tutkielman päättäminen hyvillä mielin. Kiitokset vielä kaikille, jotka ovat tukeneet ja auttaneet minua kandidaatintutkielmani ja sitä edeltävien opintojeni kanssa. Tätä tutkintoa ei olisi ikinä saavutettu ilman teidän kaikkien panosta.

Jyväskylässä 26. tammikuuta 2020

Heini Järvinen

Sisältö

| | |
|--|-----------|
| Tiivistelmä | 3 |
| Abstract | 5 |
| Esipuhe | 7 |
| 1 Johdanto | 11 |
| 2 DNA-origamit | 13 |
| 2.1 DNA-nanoteknologia ja nanorakenteiden historia | 13 |
| 2.2 DNA-origamien ominaisuudet | 19 |
| 3 Lääkkeiden kohdistaminen | 23 |
| 3.1 Kuljettimet | 23 |
| 3.2 Älykäs kohdistaminen | 27 |
| 3.2.1 Passiivinen kuljetus | 27 |
| 3.2.2 Aktiivinen kuljetus | 28 |
| 4 DNA-origamien haasteet | 33 |
| 4.1 Tekniset haasteet | 33 |
| 4.2 Biologiset haasteet | 38 |
| 5 Päätäntö | 41 |
| Lähteet | 42 |

1 Johdanto

DNA-nanoteknologia on verrattain uusi tieteenala, joka hyödyntää DNA-molekyylien ominaisuuksia nanokokoisten rakenteiden muodostamisessa [1, 2]. Erityistä huomiota alalla ovat saaneet DNA-origamit niiden lukuisten käyttömahdollisuuksien ja monipuolisen muokattavuuden vuoksi. Monipuolisella muokattavuudella viitataan mahdollisuuksiin liittää erilaisia molekyyliä ja muita nanorakenteita DNA-origameihin. Japanilaisesta paperintaittelutekniikasta lähtöisin oleva analoginen nimitys *DNA-origami* juontaa juurensa molempien tekniikoiden taustalla olevaan ideaan, DNA:n tapauksessa yksiulotteisen materiaalin taittelemisesta, kaksi- tai kolmiulotteiseksi rakenteeksi. DNA-origamien perusideana on ohjata pitkien, yksittäisten DNA-juosteiden (*eng. scaffold strand*) laskostumista sadoilla, lyhyemmällä juosteilla eli oligonukleotideilla (*eng. staple strand*), jotka vastaavat osittain pidemmän juosteen emäsjärjestystä [3]. Koska nämä rakenteet perustuvat DNA-molekyylien itsejärjestäytymiseen ja Watson–Crick-emäspariutumisen spesifisyyteen, DNA:sta on mahdollista muodostaa ääretön määrä erimuotoisia ja -kokoisia DNA-rakenteita. Tästä syystä DNA-origameille onkin löydetty useita potentiaalisia sovelluskohteita esimerkiksi foniikan, plasmoniikan, bioelektroniikan ja lääketieteen aloilta [1, 2]. Tässä tutkielmassa keskitytään erityisesti DNA-origamien mahdollisuuksiin lääkkeiden aktiivista kuljetusta ja kohdistusta edistävinä rakenteina, sillä niillä on potentiaalia ratkaista joitakin nykylääketieteen keskeisimpiä haasteita [4–6].

DNA on nanomittakaavassa toimiva molekyyli, minkä vuoksi sen avulla voidaan vaikuttaa nanoskaalan tapahtumiin ja prosesseihin. Vastaavaa kontrollointikykyä nanomittakaavassa ei ole pystytty saavuttamaan ennen DNA-nanorakenteita. Tämän vuoksi tehokkaiden menetelmien kehittäminen nanorakenteiden valmistamiseksi ja materiaalien hinnan laskemiseksi tulee olemaan äärimmäisen tärkeää kohdistetun lääketieteen kehityksen kannalta [7]. Lisäksi lääketieteen sovellukset tulevat vaatimaan lisätutkimuksia ja ratkaisuja kehosta aiheutuvien biologisten esteiden ylittämiseksi. Koska ala on vielä varsin varhaisessa vaiheessa, tutkielma keskittyy DNA-origamien käyttöönottoa hidastavien tekijöiden tarkasteluun ja mahdollisiin ratkaisuihin.

Tutkielman rakenne koostuu aiheeseen johdattelevasta teoriaosasta eli luvuista 2

ja 3, sekä haasteita esittelevästä tulososiosta eli luvusta 4. Tutkielman teorialuvut käsittelevät tiiviisti tutkielman kahta pääaihetta. Luvussa 2 käsitellään DNA-origamien taustalla olevaa teoriaa sekä alan syntyhistoriaa. Lisäksi luvussa syvennytään pohtimaan DNA-origamien tuomia vahvuuksia ja ominaisuuksia muihin nanorakenteisiin ja menetelmiin verrattuna. Luvussa 3 tutustutaan tutkielman toiseen pääaiheeseen eli lääkkeiden kohdistamiseen. Luku keskittyy DNA-origamien käyttöön lääkkeiden kohdistamisessa ja läpikäymään alan termistöä. Lisäksi luvussa esitellään DNA-origamien tärkeimmät hyödyt ja edut verrattuna muihin lääkkeiden kuljetuksessa käytettyihin kuljettimiin. Myös tämä luku noudattaa rakennetta, millä pyritään havainnollistamaan alan kehityksen kulkua ja sen nykyistä tasoa. Tutkielmassa nostetaan esille joitakin alan keskeisimpiä tutkimuksia ja niiden tuloksia. Tutkielman luvussa 4 tarkastellaan lähemmin DNA-origamien keskeisimpiä teknisiä ja biologisia haasteita sekä ratkaisuehdotuksia näiden esteiden ylittämiseksi. Luku esittelee tutkielman keskeisimmät tulokset ja päätelmät, jotka on muodostettu analysoimalla monipuolisesti alan ajankohtaisia julkaisuja. Päätännössä kootaan tutkielman tärkeimmät tulokset ja pohditaan sen mahdollisia puutteita.

2 DNA-origamit

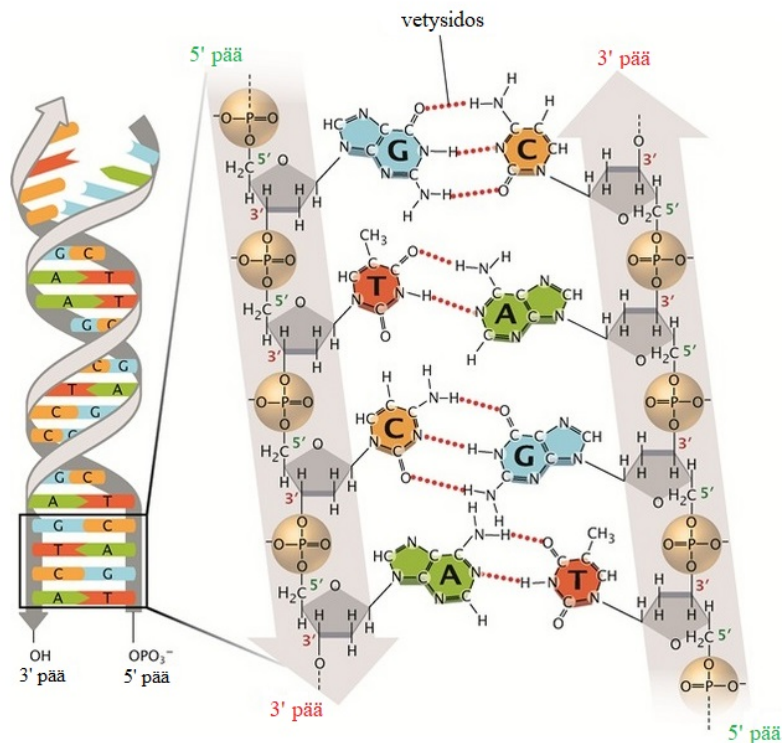
Tässä luvussa käsitellään DNA-origamien taustalla olevaa teoriaa sekä esitellään niiden ominaisuuksia muihin nanomittakaavan menetelmiin ja nanorakenteisiin verrattuna. Alaluvussa 2.1 tutustutaan DNA-nanoteknologian sekä DNA-origamien alkuperään ja historiaan. Alaluvussa 2.2 perehdytään DNA-origamien olennaisimpiin ominaisuuksiin ja etuihin muihin menetelmiin ja DNA-nanorakenteisiin verrattuna. Tutkielman teoriaosa esittelee kokonaisuudessaan tutkielman takana piileviä tärkeimpiä motivaatioita ja kiinnostuksenkohteita.

2.1 DNA-nanoteknologia ja nanorakenteiden historia

Yksi rakenteellisen DNA-nanoteknologian tärkeimmistä tavoitteista on saavuttaa materian täydellinen nanomittakaavan tilallinen ja ajallinen hallinta. Tällä tarkoitetaan nanorakenteen ja sen osien paikan sekä muodon täydellistä kontrollointia 3D-avaruudessa sekä ajassa. DNA-nanoteknologia on erityisesti kehittynyt luomaan *alhaalta-ylös* -lähestymistapaan (*eng. bottom-up*) perustuvia menetelmiä ja tekniikoita, joilla voidaan hallita ja vaikuttaa nanokokoisen materian rakenteeseen. Ennen alan syntyä materian rakennetta pyrittiin kontrolloimaan lähinnä *ylhäältä-alas* -lähestymistapoja (*eng. top-down*) hyödyntämällä, josta hyvänä esimerkkinä toimii tietokoneiden komponenttien koon pienentyminen. On kuitenkin olemassa selvät rajat sille, kuinka paljon näitä komponentteja saadaan enää pienennettyä nanoskaalassa esiintyvien jännitehäviöiden ja kvantti-ilmiöiden yleistymisen takia [7]. Tästä syystä vaihtoehtoisten menetelmien kehittäminen on jatkuvan kehityksen kannalta tärkeää.

DNA eli deoksiribonukleaasihappo toimii luonnon geneettisenä materiaalina siirtäen biologista informaatiota sukupolvelta toiselle. DNA esiintyy solujen kromosomeissa kaksijuosteisena kaksoiskierteenä (*eng. double stranded DNA helix, dsDNA*), jonka juosteet kulkevat rakenteessa eri suuntiin. DNA:n on mahdollista esiintyä myös yksijuosteisessa muodossaan (*eng. single stranded DNA, ssDNA*), jota hyödynnetään usein DNA-nanorakenteissa. DNA:ta kutsutaan polynukleotidiksi, sillä se koostuu nukleotideiksi kutsutuista monomeerisistä yksiköistä. Kukin nukleotidi koostuu

deoksiriboosi-sokerista, fosfaatiryhmästä sekä yhdestä neljästä mahdollisesta emäksestä. DNA juosteiden suunta määritetään sen selkärangan deoksiriboosi-sokerien ja fosfaattiryhmien asennosta. Fosfaattiryhmät sitoutuvat sokereihin fosfodiesterisidoksilla joko sokerin kolmannen tai viidennen hiiliatomin kohdalla. Sidoksen paikka määrittää DNA-juosteen pään, joko 3'- tai 5'-pääksi, mitä käytetään DNA-juosteen suunnan määrittämisessä. DNA-juosteiden emäsjärjestys koodaa lopulta proteiinien aminohappojärjestyksen. Neljästä emäksestä ainoastaan adenosini (A) ja tymiini (T) tai sytosiini (C) ja guaniini (G) voivat vetysitoutua keskenään Watson–Crick-emäspariperiaatteen mukaisesti. Watson ja Crick määrittivät DNA:n kaksoiskierteen rakenteen vuonna 1953 [8]. Kaksijuosteisen DNA:n rakennetta havainnollistetaan kuviossa 1.



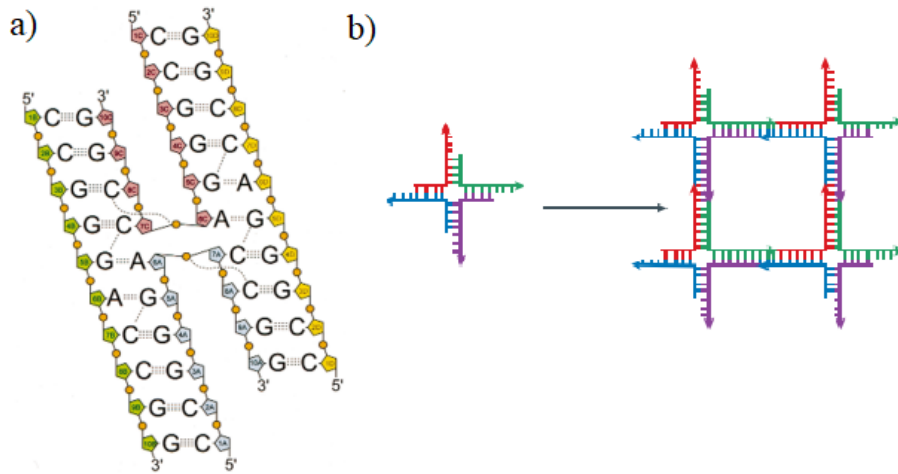
Kuvio 1. Kaksijuosteisen DNA:n neljän nukleotidin pituisen juosteen kemiallinen rakenne [9]. Sytosiini (C) ja guaniini (G) muodostavat keskenään kolme vetysidosta. Adenosini (A) ja tymiini (T) taas muodostavat kaksi vetysidosta toistensa välille. Harmaalla nuolella osoitetaan DNA:n sokerifosfaatti-selkärangan rakenne ja suunta. Alkuperäisestä lähteestä otettua kuvaa on muokattu suomentamalla sen tekstit.

DNA-nanoteknologian perustajana pidetään amerikkalaista Nadrian C. Seemanian

hänen 1980-luvun alkupuolella julkaisemansa tutkimuksen johdosta [10]. Tutkimuksessaan Seeman osoitti, että DNA-juosteet voivat muodostaa keskenään haarautuneita rakenteita elollisissa eliöissä tavatun lineaarisen DNA:n asemasta. Hän osoitti, että haarautuvien DNA-rakenteiden muodostumista voidaan ohjata suunnittelemalla DNA-sekvenssejä eli emäsparijärjestyksiä siten, että emäspariutumista tapahtuu vain tietyissä kohdissa DNA-juostetta. Komplementaaristen emäsparien lineaarisen järjestyksen kadotessa katoaa myös DNA-rakenteiden lineaarisuus. Toisin sanoen, DNA:sta on mahdollista muodostaa suorista juosteista eroavia rakenteita minimoimalla niiden sekvenssien symmetrisyys. Seemanin rakenteiden inspiraation lähteenä toimivat elollisessa luonnossa esiintyvät Holliday-liitokset. Meioosin aikana tapahtuvan geenivaihdunnan alkaessa vastinkromosomien kromatidit voivat muodostaa keskenään yhtymäkohtia, joita kutsutaan kiasmoiksi [11]. Kiasmaa seuraavassa geenivaihdunnassa syntyy Holliday-liitoksiksi kutsuttuja tetraedraalisia rakenteita. Näissä rakenteissa neljä yksittäistä juostetta ovat emäspariutuneet ristikkäin toistensa kanssa, kuten on näytetty kuviossa 2a [11]. Seemanin rakenteet ovat staattisia, emäsparijärjestykseltään muuttumattomia versioita Holliday-liitoksista, jotka säilyttävät stabiilin luonteensa niin kauan kuin ympäristön olosuhteet säilyvät DNA:n itsejärjestäytyvyydelle suotuisina. Yksittäinen Seemanin rakenne muodostuu neljästä kuudentoista emäsparin pituisesta juosteesta. Nämä juosteet muodostavat sopivissa olosuhteissa toistensa kanssa neljästä sakarasta koostuvia ristejä, joita havainnollistetaan kuviossa 2b [10].

Seeman keksi myös tavan yhdistää nelijuosteiset rakenneyksiköt toisiinsa jättämällä kunkin juosteen päähän muutaman emäksen pituisen osan, jonka vastinpari löytyy ainoastaan toisesta vastaavasta yksiköstä [10]. Näiden niin kutsuttujen ”tahmeiden päiden” (*eng. sticky end*) avulla Seemanin haarautuneet rakenteet voidaan yhdistää kuviossa 2b esitetyiksi suuremmiksi verkostoiksi. Seemanin rakenteiden kehittämisen alkuperäinen motivaatio oli halu järjestellä proteiineja kolmiulotteisiksi kristalleiksi, jotta niiden rakennetta voitaisiin tutkia tarkemmin käyttäen röntgenkristallografiaa (*eng. X-ray crystallography*). Seemanin rakenteet inspiroivat lukuisten oligonukleotideista koostuvien rakenteiden ja sovellusten eksponentiaalisen tutkimisen seuraavina vuosikymmeninä [2, 12, 13].

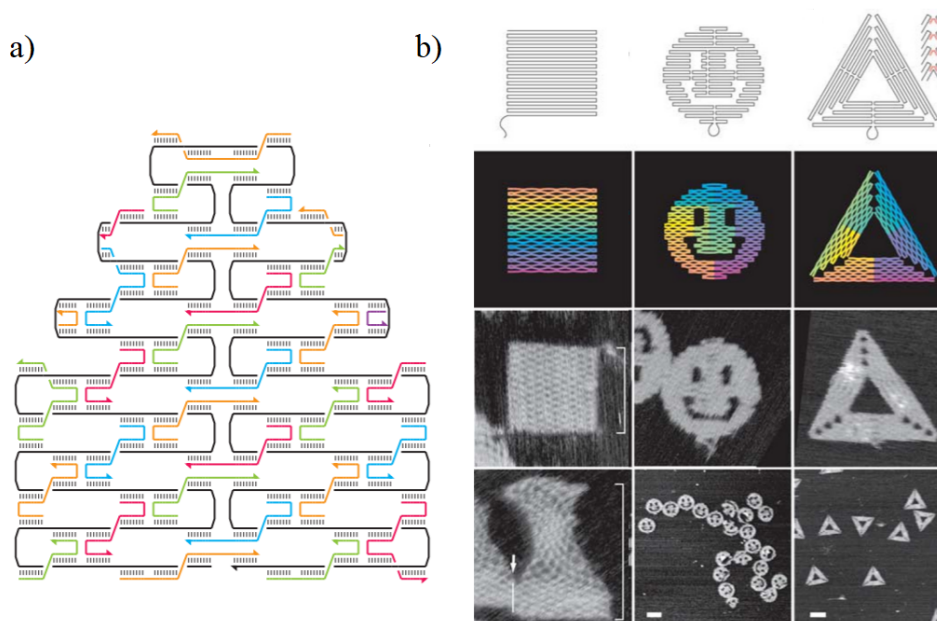
Paul W. K. Rothemund esitteli DNA-origamit tiedeyhteisölle tutkimusartikkelissaan vuonna 2006 [3]. Tutkimuksessa Rothemund laskosti 7249:n nukleotidin pituisia DNA-juosteita, jotka oli saatu M13mp18-bakteriofaagin genomista. DNA-origamien



Kuvio 2. Seemanin neljästä yksittäisestä juosteesta rakentuvan DNA-rakenteen ja meiosisin aikana esiintyvän Holliday-liitoksen rakenteet. a) Meiosisin geenien-vaihdunnan aikana syntyvä Holliday-liitos, joka toimi Seemanin rakenteiden inspiraation lähteenä [11]. b) Yksittäinen Seemanin suunnittelema neljästä yksijuosteisesta DNA:sta muodostuva rakenneyksikkö [1]. Jokaisen juosteen päässä olevan pariutumattoman osan emäsjärjestys on komplementaarinen vastaavan rakenneyksikön toisella puolella olevalle päälle, jolloin yksiköistä voidaan muodostaa suurempia DNA-verkostoja [10].

laskostumisperiaatetta esitellään tarkemmin kuviossa 3a. Kuviossa 3b esitetyistä Rothemundin laskostetuista 2D-rakenteista mieleenpainuvuin on luultavammin keskivirin hymiö [3]. Lopulliset rakenteet olivat halkaisijoiltaan noin 100 nm ja jokaisen juosteen laskostamiseen käytettiin noin kahtasataa erilaista, syntetistä oligonukleotidia [3]. Kutakin pitkää juostetta sitovaa oligonukleotidia voidaan ajatella 6 nm:n suuruisena pikselinä, joista voidaan rakentaa mikä tahansa haluttu kuvio [3]. Myös DNA-origameista on mahdollista muodostaa Seemanin rakenteiden kaltaisia verkostoja lisäämällä tahmeita päitä – pariutumattomia sekvenssejä – kunkin juosteen alkuun ja loppuun [14, 15]. Neliönmuotoisista tasomaisista DNA-origami -laatoista (*eng. tiles*) voidaan niitä yhdistelemällä rakentaa huomattavasti alkuperäisiä yksiköitä suurempia kaksiulotteisia pintoja, joita voidaan soveltaa esimerkiksi erilaisten reaktioiden tapahtuma-alustana [16–18].

Ennen Rothemundin tutkimusta oli julkaistu myös toinen DNA-origami -menetelmä muistuttava, samaa ideologiaa hyödyntävä rakenne. Vuonna 2004 William M. Shih *et al.* raportoivat DNA-origami -menetelmää vastaavan idean 1669 nukleotidia pitkän DNA-juosteen sitomisesta viidellä oligonukleotidilla DNA:sta muodostetuksi

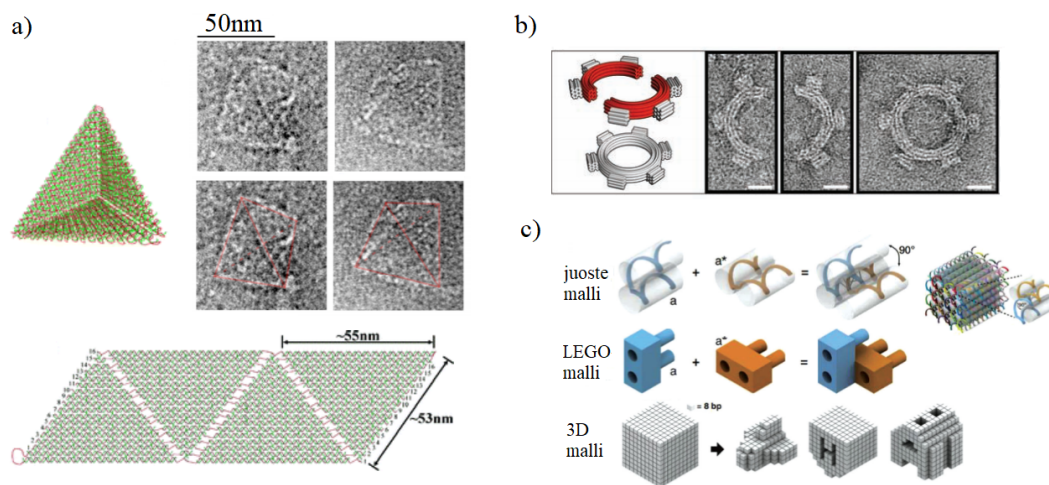


Kuvio 3. DNA-origamien rakenne Rothemundin tutkimuksesta [3]. a) DNA-origamit koostuvat yhdestä pitkästä DNA-juosteesta (musta juoste) ja lukuisista oligonukleotideista (värilliset juosteet), jotka sitovat pitkän juosteen haluttuun muotoon emäspariutumisen sääntöjä noudattaen. b) Esimerkkejä Rothemundin toteuttamista DNA-origameista. Ylimmissä kuvissa esitellään pitkien juosteiden suunnitellut reitit. Toiseksi ylimpiin kuviin on lisätty oligonukleotidien vaikutus pitkien juosteiden rakenteeseen. Punainen väri kuvaa nukleotidien indekseistä ensimmäistä ja violetti viimeistä. Viimeisillä riveillä on atomivoimamikroskooppilla (AFM) otettuja kuvia toteutetuista rakenteista. Neliön AFM-kuvassa esiintyvät hakasulkeet kuvaavat venymättömän ja tiimalasin muotoon venyneen rakenteen kokoeroja. Hymiön ja kolmion AFM-kuvan mittakaava on 100 nm.

oktaedriksi [19]. Muodostetun juosterakenteen reunat oli yhdistetty kuuden Seemanin haarautuneen oligonukleotideista koostuvan rakenteen avulla lopulliseksi kolmiulotteiseksi oktaedriksi [19]. Oktaedria voidaan pitää varhaisena, yksinkertaisena esias- teena Rothemundin kaksiulotteisista DNA-origameista sekä myöhemmin ilmestyvistä kolmiulotteisista rakenteista.

DNA-origamien keksiminen mahdollisti monin kerroin monimutkaisempien ja suurempien rakenteiden suunnittelun ja siten kompleksisuuden lisääntymisen mah- dollisten rakenteiden toteutuksessa. Kolme vuotta Rothemundin alkuperäisen artik- kelin ilmestymisen jälkeen kaksiulotteisista, tasomaisista DNA-origameista saatiin muodostettua yksinkertaisia, onttoja 3D-nanorakenteita [2]. Näitä rakenteita olivat esimerkiksi tetraedri ja kuutio [20, 21]. Kuutio-rakenteen yksi seinä toimi kuin lukol- linen laatikon kansi, jonka avautumista voitiin säädellä [21]. Tetraedrin rakennetta

esitellään kuviossa 4a. Samana vuonna myös Shih *et al.* onnistuivat rakentamaan hunajakakennoiksi kutsuttuja umpinaisia, kolmiulotteisia nanorakenteita hyödyntämällä kehittämäänsä caDNAo-tietokoneohjelmaa [22, 23]. Ohjelman kehittäminen yksinkertaisti huomattavasti DNA-origamien ja niiden oligonukleotidien emäsjärjestyksen suunnitteluprosessia sekä helpotti erilaisten rakenneominaisuuksien, kuten tahmeiden päiden ja stabiilien haarautumien suunnittelua [12]. Myös muita vastaavia DNA-origamien suunnittelualustoja on kehitetty, joista caDNAo vastaa 2D-origamien suunnitteluun aikaisemmin käytettyä alustaa on nimeltään SARSE [24].



Kuvio 4. Kolmiulotteisia DNA-origameja. a) Ontto, kolmiulotteinen DNA-origami -tetraedri [20]. Lämpäiselektronimikroskoopilla (*eng. Transmission Electron Microscope, TEM*) otettujen kuvien mittakaava on 50 nm. b) Kaareva, ratasta muistuttava kolmiulotteinen DNA-origami -rakenne [25]. TEM-kuvien mittakaava on 20 nm. c) DNA-origami -tiilien toimintaperiaate [26]. Ylimmällä rivillä esitellään malli DNA-juosteiden sitoutumisesta erilaisissa tiilissä. Keskimmaisella rivillä sama malli LEGO:jen avulla havainnollistettuna. 3D-malli esittelee lopullisten kolmiulotteisten rakenteiden koontimahdollisuuksia.

Suunnittelualustoja seurasivat DNA-origamien kaarevuuden mahdollistava menetelmä, joka perustuu nukleotidien lisäämiseen tai poistamiseen pitkää juostetta ohjaavien oligonukleotidien emäsjärjestyksestä [25]. Kuviossa 4b esitellään kaareva, ratasta muistuttava DNA-origami. Myös kolmiulotteisia DNA-origameja voidaan yhdistää tahmeiden päiden avulla. Kuten kuvioista 4c nähdään, DNA-origami-tiiliksi (*eng. bricks*) kutsutut rakenneyksiköt voivat toisiinsa sitoutumalla muodostaa itseään suurempia kolmiulotteisia superrakenteita [26]. Vuonna 2013 Yan *et al.* kehittivät uudenlaisen lähestymistavan vastaavanlaisten DNA-origami-verkoston

luomiseen, jossa ristikkomainen juoste voidaan stabiloida nelikäteisillä haarautuneilla oligonukleotideilla (*eng. four-arm junctions*) [27]. Samaa strategiaa on sovellettu myös asymmetristen rakenteiden muodostamiseen, jossa käytetään useampihaaraisia oligonukleotideja rakenteiden monimuotoisuuden lisäämiseksi [28, 29]. Nykypäivänä 2D- ja 3D-origamien suunnitteluprosessi on täysin automatisoitu algoritmeilla kuten DAEDALUS ja vHelix [30–32].

Rothemundin tutkimuksen ilmestymisen jälkeen DNA-nanoteknologian kehitys on ollut nopeaa. Tämä on osoitus siitä, että DNA-nanoteknologia nähdään potentiaalisena alana mahdollistamaan tulevaisuuden teknologisia kehityskaskeita [2]. Myös RNA-nanoteknologia kehittyi DNA-nanoteknologian mukana, mutta tässä tutkielmassa keskitytään käsittelemään lähinnä DNA-origamien sovelluksia. DNA-origamien sovelluksia käsitellään tarkemmin luvussa 3.

2.2 DNA-origamien ominaisuudet

DNA-origamien monipuoliset ominaisuudet juontavat juurensa mikromaailmassa esiintyvistä voimista ja vuorovaikutuksista. DNA-nanoteknologia perustuu kooltaan 1 – 100 nm olevien rakenteiden muodostamiseen [5]. Näissä kokoluokissa makromaailmassa vallitsevat vuorovaikutukset ja voimat, kuten Newtonin liikelait ja gravitaatio, jäävät merkityksettömiksi. Sen sijaan nanotasolla vallitsevat lähinnä sähkömagneettiset vuorovaikutukset ja kvanttimekaaniset-ilmiot. Nanokokoisen materiaalin elektroniset, kemialliset, optiset tai fyysiset ominaisuudet voivat muuttua koon tai muodon vaikutuksesta, sillä kaikki perustuu atomien ja molekyylien välisiin vuorovaikutuksiin sekä niiden tavoittelemiin termodynaamisiin energian minimeihin. Nanotasolla rakenteiden pinta-ala suhteessa kappaleen tilavuuteen kasvaa huomattavasti. Mitä enemmän pinta-alaa rakenteella on, sitä enemmän siihen on mahdollista liittää erilaisia atomeja tai molekyyliä ja sitä suurempi on rakenteen funktionaalinen tiheys tilavuuteen nähden. Pinta-tilavuus suhteesta johtuen myös tehotiheys ja operointitaajuus kasvavat rakenteiden koon pienentyessä.

DNA-molekyylien rakenne ja niitä stabilisoivat vuorovaikutukset ovat nykypäivänä erittäin hyvin tunnettuja. DNA on kaksoiskierteenä esiintyvä biopolymeeri, jonka rakenne perustuu Watson–Crick-emäspariutumiseen eli emästen väliseen vetysitoutumiseen. Vetysidosten lisäksi DNA:n rakennetta stabiloivat pääasiassa aromaattisten renkaiden välillä esiintyvät π - π -vuorovaikutukset sekä DNA:n eri osien välillä ilmenevät hydrofobiset ja -fiiliset vuorovaikutukset. DNA on materiaalina tarkka ja

ennustettava. Siihen voidaan liittää myös lukuisia erilaisia atomeja ja molekyyliä eli ligandeja kovalenttisten sidosten ja heikkojen vuorovaikutusten avulla. Kovalenttisten sidosten lisäksi ligandeja voidaan liittää DNA-juosteisiin interkalaation, enkapsulaation, biotiini-avidini-, DNA-proteiini- sekä aptameereihin perustuvien vuorovaikutusten avulla [5]. Elektrostaattisilla vuorovaikutuksilla DNA-juosteisiin on mahdollista liittää myös metallisia nanorakenteita [33]. Erityisesti, DNA:han on mahdollista liittää erilaisia fluoresoivia väriaineita, jotka mahdollistavat näiden nanokokoisten rakenteiden ja materiaalien sekä niiden toimintojen seuraamisen erilaisilla kuvantamismenetelmillä [12].

DNA on materiaalina erittäin monikäyttöinen sen monipuolisen muokattavuuden ansiosta. Rakenteiden funktionalisoiminen erilaisilla ligandeilla ja superrakenteiden muodostaminen tahmeiden päiden avulla mahdollistaa esimerkiksi luonnossa solutasolla esiintyvän kinematiikan ja dynaamisten toimintojen suorittamisen. Lääketiede perustuu vahvasti nanotasolla toimivien molekyylien välisiin vuorovaikutuksiin ja viestintään. Erityisesti lääketieteen näkökulmasta katsottuna DNA-origameilta voidaan odottaa uusia ratkaisuja alan keskeisimpiin ongelmiin ja haasteisiin. Koska DNA on elävien olentojen soluissa luonnostaan esiintyvä molekyyli, sen voidaan olettaa soveltuvan hyvin lääketieteellisiin tarkoituksiin epätoksiseinä ja biohajojavana molekyylinä [34]. DNA-rakenne on mahdollista funktionalisoida esimerkiksi kohdistamaan toimintansa tiettyyn kudokseen tai solun osaan kiinnittämällä siihen reseptoreiden sitomia ligandeja. Rakenteiden kohdistamiseen tutustutaan tarkemmin luvussa 3. Koska DNA on kaikkialla elollisessa luonnossa esiintyvä molekyyli, sen voidaan uskoa tuovan ratkaisukeinoja moniin epäorgaanisten ja orgaanisten lääkkeiden kuljettimien tuomiin sytotoksisuuden ongelmiin, joita käsitellään tarkemmin alaluvussa 3.1. DNA-origamit ovat osoittaneet suurta potentiaalia älykkäiksi lääkkeiden kuljettajiksi, joita käsitellään tarkemmin alaluvussa 3.2. Lääkkeiden kuljettamisen biologisiin ja teknisiin haasteisiin tutustutaan tarkemmin luvussa 4.

Rakenteiden funktionalisoiminen ligandeilla tuo DNA-origameille lukuisia käyttömahdollisuuksia esimerkiksi erilaisina rakennus- tai reaktioalustoina, dynaamisina nanopartikkeleina tai muita molekyyliä kuljettavina ja stabiloivina rakenteina [2]. DNA-origamit toimivat käyttäjäkohtaisesti ohjelmoitavina työkaluina, joilla on mahdollista vaikuttaa nanotason tapahtumiin ja reaktioihin. Näitä tapahtumia on mahdollista seurata erilaisilla kuvantamismenetelmillä ja näin varmistaa toivotun funktion onnistuminen. Oligonukleotidimenetelmään verrattuna DNA-origameja

voidaan suunnitella täysin automatisoidusti erilaisilla tietokoneohjelmilla. DNA-rakenteiden synteesi origami-menetelmällä lisää valmiiden rakenteiden houkuttelevia ominaisuuksia muodon, jouston, koon ja moduuleista koostuvien kinemaattisten rakenteiden ominaisuuksien tarkalla hallinnalla. Kaikki nämä monipuoliset ominaisuudet ja käyttötavat antavat DNA-origameille etuja muihin vastaaviin alhaalta-ylös-lähestymistapoihin verrattuna. DNA-origamien vahvuus on etenkin niiden monipuolisessa muokattavuudessa ja lääketieteen kannalta niiden biologisessa alkuperässä.

3 Lääkkeiden kohdistaminen

Vaikka pienimolekyyliset lääkeaineet omaavat terapeutillisiä ja lääkinnällisiä ominaisuuksia, ne voivat monissa tapauksissa aiheuttaa epätoivottuja sivuvaikutuksia sekä solujen sytotoksisuutta [5]. Sivuvaikutuksia käsitellään tarkemmin alaluvussa 3.1. Lisäksi alaluvussa esitellään nykyisten kuljettimien luonnetta sekä määritellään ideaalisen kuljettimen tärkeimmät ominaisuudet ja verrataan näitä DNA-origami-menetelmän vahvuuksiin. Myös lääkeaineiden huono vesiliukoisuus voi usein toimia toivotun farmakologisen vasteen esteenä [35]. Kehittyneempien proteiineja ja nukleinihappoja hyödyntävien lääkkeiden korkea hinta sekä huono biologisten esteiden läpäisykyky tuovat lisähaasteita näiden hoitokeinojen laajamittaiselle käyttöönotolle [5]. Tästä syystä on tärkeää kehittää aktiivisia, kohdistettuja systeemejä ja menetelmiä lääkeaineiden kuljettamiseksi vaikutusalueellensa. Näitä systeemejä ja niiden ideologiaa käsitellään tarkemmin alaluvussa 3.2. Lisäksi alaluvussa tutustutaan lääkeaineiden kontrolloituun vapauttamiseen kuljettimista sekä synergeettisiin kuljetustekniikoihin. Näillä viitataan monista lääkeaineista koostuviin systeemeihin, joiden vapautuminen perustuu loogisiin laskutoimituksiin.

3.1 Kuljettimet

Lääkkeiden tehokkuutta parannetaan erilaisilla lääkkeisiin sitoutuneilla kuljettimilla. Kuljettimet kykenevät parantamaan lääkkeiden ominaisuuksia vaikuttamalla niiden lääkitsemistehokkuuteen. Osa nykyisistä kuljettimista aiheuttaa hyvien ominaisuuksien lisäksi epätoivottuja sivuvaikutuksia. Paljaiden lääkeaineiden kuljettaminen ja kohdistaminen kehossa on hoitojen tehokkuuden ja sivuvaikutusten esiintymisen kannalta edelleen haastavaa. Pahimmissa tapauksissa paljaat lääkeaineet voivat kohdistamattomina aiheuttaa solujen sytotoksisuutta, joka voi lopulta johtaa ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin tai sattumanvaraiseen solukuolemaan eli nekroosiin. Lääkeaineiden tehokkuutta verottavat myös niiden huonot liukoisuusominaisuudet, kestättömyys kemiallista ja entsymaattista hajotusta vastaan sekä vaikeudet biologisten esteiden läpäisemisessä [12]. Näiden esteiden ylittämiseksi on

kehitetty erilaisia lääkkeiden kuljetusjärjestelmiä, jotka käyttävät hyväkseen synteettisiä tai luonnollisia, biologisia jäljitteleviä kuljettimia fysiokemiallisten rajoitteiden sivuuttamiseksi [36, 37]. Luonnollisista kuljetusjärjestelmistä hyvänä esimerkkinä toimivat viruksia ja punaisia verisoluja jäljittelevät kuljettimet [38]. Synteettisiin kuljetusjärjestelmiin taas kuuluvat esimerkiksi liposomeja tai polymeerisiä partikkeleita hyödyntävät kuljettimet [39, 40].

Synteettiset, keinotekoisia nanomateriaaleja hyödyntävät kuljettimet voidaan jakaa kahteen luokkaan: orgaanisiin ja epäorgaanisiin kuljettimiin [5]. Etenkin orgaanisia kuljettimia on tutkittu ja kehitetty paljon. Useita niistä on kaupallisesti saatavilla käytettäväksi laboratorioissa tai otettu käyttöön ja hyväksytty kliinisiin kokeisiin Yhdysvaltojen elintarvikehallinnon (*Food and Drug Administration, FDA*) toimesta [41, 42]. Orgaanisten kuljettimien on todettu pidentävän lääkkeiden puoliintumisaikaa *in vivo*, lisäävän niiden vesiliukoisuutta ja parantavan niiden tunkeutumiskykyä solujen sisään [5]. Termillä *in vivo* viitataan elävissä organismeissa, solujen sisällä suoritettuihin tutkimuksiin. *In vitro* taas viittaa solujen ulkopuolella koeputkessa tai lasimaljalla tehtyihin kokeisiin. Useat orgaaniset kuljettimet ovat luonnostaan sytotoksisia niiden karakterististen piirteiden kuten kationisten pintavarausten vuoksi [43]. Orgaanisia kuljettimia on vaikea koota hierarkisesti suuremmiksi rakenteiksi niiden osien heterogeenisyyden takia. Lisäksi lääkemolekyylit lisätään kuljettimiin usein epäspesifisesti heikentäen niiden tehokkuutta fysiologisissa olosuhteissa kuten veren seerumissa [44].

Myös epäorgaanisista kuljettimista on monia laajasti tutkittuja esimerkkejä, kuten kultananopartikkelit, mesohuokoiset (*eng. mesoporous*) piidioksidi-nanopartikkelit ja hiilinanomateriaalit, kuten hiilinanoputket ja grafeeni-levyt [45–47]. Epäorgaanisten kuljettimien yleinen vahvuus on niiden geometrian tarkassa kontrolloinnissa, sillä esimerkiksi partikkelin koko voi vaikuttaa solukalvon läpäisemiskykyyn [48]. Joitakin epäorgaanisia kuljettimia käytetään apuna myös kuvantamisessa, mikä mahdollistaa lääkeaineiden samanaikaisen seurantaominaisuuden kuljettamisen ohella [49–51]. Jotkin epäorgaanisissa materiaaleissa käytetyistä alkuaineista ovat kuitenkin myrkyllisiä, mikä nostattaa huolta kuljettimien turvallisuudesta [52, 53]. Lisäksi epäorgaanisten materiaalien hajottaminen kehossa on usein vaikeaa, minkä vuoksi näistä materiaaleista valmistettujen kuljettimien kerääntyminen tiettyihin sisäelimiin voi aiheuttaa uusia ongelmia [54].

Vaikka monenlaisia kuljetusjärjestelmiä onkin jo olemassa, ideaalisen kuljettimen

kehittäminen on edelleen tärkeä lääketieteellinen päämäärä. Ideaalisen kuljettimen tulisi kyetä säilyttämään kuljettamansa molekyylin lääkitsemistehokkuus ja suojaamaan sitä kemialliselta sekä entsyymaattiselta hajotukselta. Kuljettimen tulisi voida muuttaa tai peittää lääkeaineen epätoivottuja ominaisuuksia ja sen käytöstä johtuvia sivuvaikutuksia. Näitä ominaisuuksia voivat olla esimerkiksi lääkeaineen toksisuus, immunologisen vasteen aiheuttaminen tai liukoisuuskyky [5]. Lääkeaineet kohtaavat kehossa lukuisia esteitä ennen ja jälkeen kohderakenteeseensa tai vaikutusalueellensa pääsyä. Ideaalisen kuljettimen tulisi mahdollistaa lääkeaineen kuljetus elävissä eliöissä esiintyvien biologisten esteiden, kuten epiteeli- ja endoteelikudosten sekä solukalvojen läpi. Ideaalisen kuljettimen tulisi myös sisältää synergeettisen terapian mahdollisuus eli keinot monen lääkeaineen samanaikaiseen kuljetukseen. Lisäksi ideaalisen kuljettimen tulisi sisältää älykkään kuljetuksen tunnusmerkkejä, kuten lääkkeen kohdistettu ja kontrolloitu vapautuminen, lääkeaineen ja sen toimintojen sekä tehokkuuden reaaliaikainen seuranta [5]. Lääkkeiden älykästä kohdistamista käsitellään tarkemmin alaluvussa 3.2.

DNA-molekyylit ovat selkärankansa fosfaattien vuoksi negatiivisesti varautuneita samoin kuin solujen fosfolipideistä muodostuvat solukalvot. Näiden varausten vuoksi solukalvot ovat täysin läpäisemättömiä DNA-juosteille. Nukleiinihappojen kuljettamiseksi soluihin molekyylien varaukset tulee kumota joillakin positiivisesti varautuneilla molekyyyleillä, kuten kationisilla polymeereilla. Mikkilä *et al.* päällystivät DNA-origameja viruksen kapsidin proteiineilla, joiden positiivisesti varautuneet N-terminaalit (aminohapon aminoryhmä) neutralisoivat origamirakenteiden negatiivisen varauksen ja tehostivat rakenteiden kulkeutumista soluihin [55]. On kuitenkin huomattu, että jotkin rakenteelliset DNA-nanopartikkelit kykenevät läpäisemään solukalvon vaikeuksitta, toisin kuin lineaariset vastineensa [56]. Esimerkiksi Mao *et al.* onnistuivat kuljettamaan foolihapolla päällystettyjä DNA-nanoputkia kohdesoluihinsa [34]. Samankaltaisia tuloksia on saatu myös tetraedrin muotoisilla DNA-nanorakenteilla ilman minkäänlaisten ligandien tai muiden molekyylien apua [57, 58]. Nämä ja vastaavat tutkimustulokset antavat ymmärtää, että tietyn geometrian omaavat puhtaat DNA-nanopartikkelit kykenevät tunkeutumaan solujen sisään ilman varausta neutralisoivia apumolekyyylejä.

Rakenteiden koon ja muodon tiedetään vaikuttavan solujen sisäänottoreitteihin [48, 59–61]. DNA-rakenteiden käyttämistä solun sisäänottoreiteistä ei ole vielä täydellistä varmuutta, sillä niiden mekanismit eivät ole vielä täysin tunnettuja [12].

Solun sisäänottoreitit voidaan jakaa endosytoottisiin reitteihin ja ei-endosytoottisiin reitteihin, joista ensimmäiseen ryhmään kuuluvat mm. fagosytoosi, makropinosytoosi, lipidilautta-, klatriini- ja kaveoli-avusteiset endosytoosireitit [62]. Eräät tulokset viittasivat tetraedristen DNA-nanorakenteiden tunkeutuvan soluihin kaveolien ja mikrotubulusten avustamien endosytoosireittien kautta [63]. DNA-nanonauhojen sisäänottoreittejä inhibiittorien avulla tutkinut ryhmä taas ilmoitti rakenteiden käyttävän lähinnä klatriini- ja lipidilautta-avusteisia endosytoosireittejä [64].

Jo mainittujen kuljetusominaisuuksien lisäksi DNA-origamien on todettu olevan huomattavasti stabiilimpia fysiologisissa olosuhteissa sekä hajotettujen solujen lysisäissä kuin natiivit, lineaariset DNA-juosteet [65, 66]. Esimerkiksi DNA-tetraedrit säilyivät suurimmaksi osaksi kokonaisina vielä 48 tuntia soluunoton jälkeen [57, 58]. Toisessa tutkimuksessa, Shen *et al.* osoittivat DNA-origamien selviävän solujen lysosomeissa 60 tuntia [67]. Tutkimuksissa on myös todettu DNA-origamien biologinen sopivuus lukuisissa solunsisäisissä *in vivo* sovelluksissa löytämättä viitteitä rakenteiden toksisuudesta [34]. Biologisen alkuperänsä vuoksi DNA-origamit voidaan hajottaa soluissa. Ne ovat siis luonnostaan biohajoavia rakenteita, eivätkä siten tuota epätoivottuja sivuvaikutuksia kerääntymällä soluihin ja elimiin. Tietyn koon ja muodon omaavien rakenteiden on myös todettu herättävän jonkinasteisen immuunipuolustuksen vasteen, jota voidaan mahdollisesti hyödyntää hoitokeinona monenlaisia sairauksia vastaan [68].

DNA-origameista on mahdollista muodostaa lukuisia erilaisia rakenteita, joiden muotoa, kokoa ja pinnan kemialla voidaan säädellä. Rakenteiden tarkka hallinta mahdollistaa niiden optimoinnin ideaalisten kuljetusrakenteiden löytämiseksi. Toisin kuin orgaanisten ja epäorgaanisten kuljettimien kanssa, DNA-origameihin on mahdollista lisätä lukuisia lääkemolekyylejä tarkasti määriteltyihin kohtiin. Toinen tapa hyödyntää DNA-nanorakenteita lääkkeiden kuljetuksessa on valmistaa DNA:sta onttoja säiliöitä, joissa lääkemolekyylejä voidaan kuljettaa. Samoin kuin virukset kuljettavat geneettistä materiaalia proteiinista valmistettujen kapsidien sisällä tätä kuljetustekniikkaa voitaisiin imitoida lääkkeiden kuljettamiseksi DNA:sta valmistetuilla ontoilla rakenteilla. Vastaavia kuljetusjärjestelmiä esitellään lisää alaluvussa 3.2.2.

3.2 Älykäs kohdistaminen

Yksi lääketieteen suurimmista haasteista on lääkeaineiden tehokas kuljetus haluttuun kohdekudokseen. Epäonnistuneen kohdistuksen tai kohdistamattomien lääkeaineiden keräytyminen terveisiin soluihin tai muihin epätoivottuihin elimiin ja kudoksiin voi aiheuttaa voimakkaiden lääkeaineiden tapauksissa vakavia sivuvaikutuksia ja tuhoja. Lääkkeiden kohdistamisen päätavoite on saada aikaan mahdollisimman tehokas lääkinnällinen tulos mahdollisimman vähällä määrällä sivuvaikutuksia ja solujen sytotoksisuutta. Tehokkaan kuljetuksen mittana voisi pitää kohdistamisen epäonnistumisesta johtuvien sivuvaikutusten esiintymisvoimakkuutta.

Lääkkeiden älykäs kohdistaminen haluttuun kohdekudokseen voidaan jakaa passiiviseen sekä aktiiviseen kuljetukseen [5]. Passiivinen kuljetus keskittyy lähinnä syöpäkasvaimien kasvuympäristön terveestä solukosta eroaviin ominaisuuksiin, joihin tutustutaan tarkemmin alaluvussa 3.2.1. Aktiivinen kuljetus taas perustuu lähinnä kuljettimien funktionalisoimiseen erilaisilla reseptoreja vastaavilla ligandeilla sekä lääkeaineiden kontrolloituun vapauttamiseen ympäristön antamien viestien mukaan. Lääkkeiden vapautumisen tulisi riippua useammasta kuin yhdestä ympäristön antamasta signaalista, jotta luotettavia diagnooseihin kykeneviä kuljettimia voidaan valmistaa. Loogisiin laskutoimituksiin kykeneviä älykkäitä lääkkeiden kuljetusjärjestelmiä käsitellään alaluvussa 3.2.2.

3.2.1 Passiivinen kuljetus

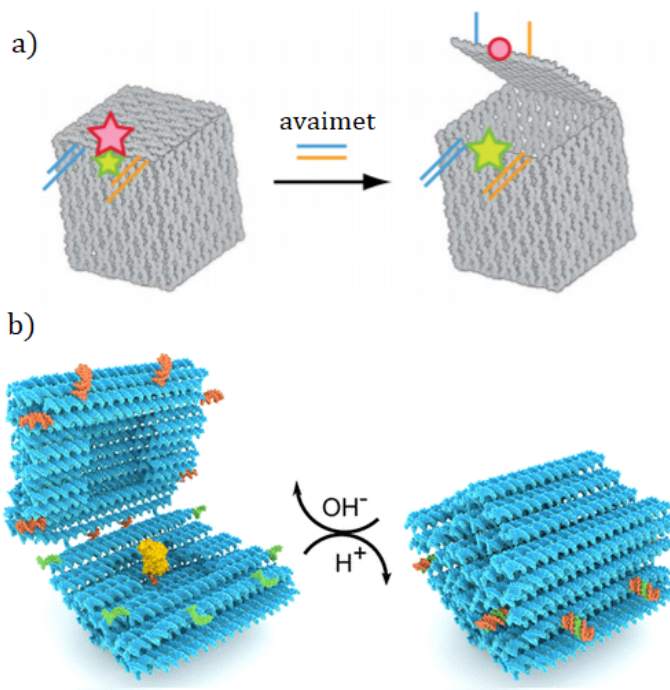
Lääkkeiden passiivisella kuljetuksella viitataan yleensä syöpäkasvaimien EPR-ilmiön (*eng. Enhanced Permeability and Retention -effect*) hyödyntämiseen [69–72]. Ilmiöstä johtuen tietynkokoiset rakenteet, kuten liposomit, nanopartikkelit ja makromolekyyliset lääkeaineet kerääntyvät joihinkin syöpäkudoksiin enemmän kuin normaaliin, terveeseen kudokseen [69–72]. Passiivinen kuljetus käyttää hyväkseen syöpäkudoksen poikkeavaa kudorakennetta. Kasvaimen kasvattamien verisuonistojen puutteelliset ja viallisesti linjatut endoteelisolut ja imusuoniston puute, johtavat tietynkokoisten nanorakenteiden ja muiden molekyylien kerääntymiseen syöpäkudokseen. Koska passiivinen kuljetus perustuu lääkemolekyylien koon ja muodon hallitsemiseen, yhdistettynä nanoteknologian työkalujen kanssa passiivisesta kuljetuksesta syntyi syöpävastaisen hoidon kulmakivi [69, 71]. Kliiniset kokeet ovat kuitenkin osoittaneet, että passiivinen kuljetusmenetelmä on luultua tehottomampi muihin vapaisiin

lääkkeen kuljetusjärjestelmiin verrattuna [69]. Passiivisen kuljetuksen tehokkuutta verottavat kasvaimen kudosten korkea paine (*eng. Interstitial Fluid Pressure, IFP*), verisuoniston epäsäännöllinen jakautuminen ja kasvaimen sisäisen verenkierron heikkous [69, 71]. Lisäksi EPR-ilmiön on huomattu eroavan ihmisten ja eläinten välillä tehdyissä kliinisissä kokeissa sekä tehoavan vain osalle kasvaintyypeistä [69]. Tästä johtuen EPR:ää tulisi hyödyntää ainoastaan tapauskohtaisesti.

3.2.2 Aktiivinen kuljetus

Aktiiviset kuljetusjärjestelmät keskittyvät lääkeaineiden kohdistamiseen erilaisten ligandien avulla, joita vastaava reseptori on kohdesolun sisällä tai sen ulkopuolella solun solukalvolla [5]. Ligandeiksi valitaan sellaisten kohdereseptorien vastinmolekyylejä, joita esiintyy kohdesoluissa suurina määrinä. Esimerkiksi foolihappoa vastaavat reseptorit ovat ylliedustettuina useiden kasvaimien solujen pinnalla, mikä tekee niistä hyviä kohderakenteita [73]. Ainutlaatuisten reseptorien suuri määrä kohdealueella varmistaa kohdentumisen vain haluttuun kohderyhmään terveiden solujen sijaan. Mitä tarkemmin lääkeaineet onnistutaan kohdistamaan sairaalle alueelle, sitä pienempiä määriä lääkettä voidaan käyttää. Kohdistamatonta lääkettä joudutaan usein käyttämään suurempia määriä, kuin olisi tarpeen. Tämä nostaa lääkkeiden hintoja lisäten sivuvaikutuksien esiintyvyyttä lääkeaineiden vaikuttaessa myös terveisiin soluihin. DNA-nanorakenteiden funktionalisoiminen erilaisilla ligandeilla on mahdollista alaluvussa 2.2 käsiteltyjen ominaisuuksien valossa. Koska nanorakenteiden kokoa, ligandien tarkkaa paikkaa, orientaatiota ja tiheyttä voidaan säädellä nanorakenteen pinnalla, DNA:sta kehitettyjen kuljetusjärjestelmien ominaisuuksia on mahdollista säädellä äärimmäisen tarkasti.

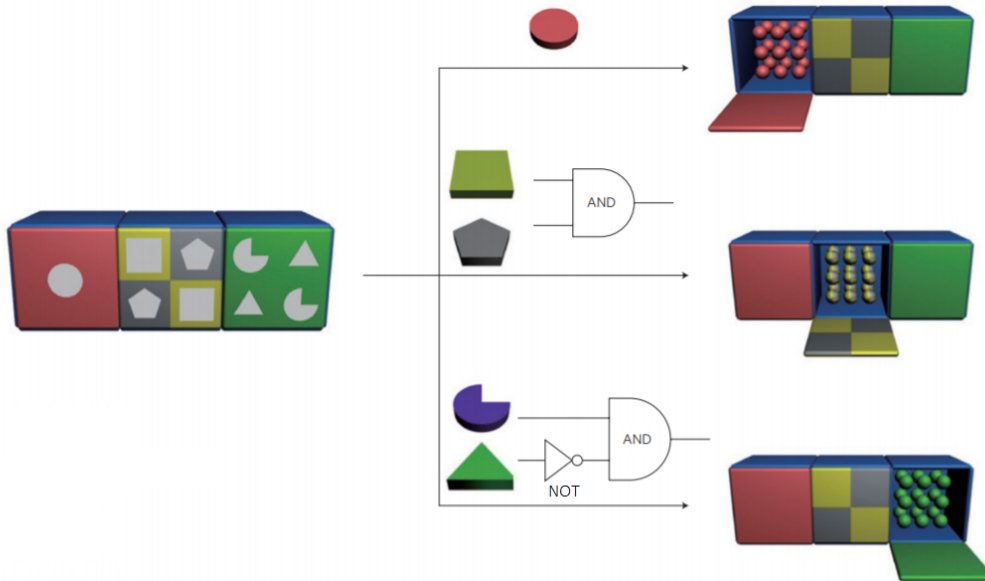
Älykkäiden kuljetusjärjestelmien tulisi reagoida ympäristönsä muutoksiin sen lähettämien signaalien mukaisesti. Hyvänä esimerkkinä ympäristön aktivoimasta systeemistä toimii alaluvussa 2.1 mainittu kannellinen ontto kuutio- tai laatikkorakenne. Rakenne reagoi ympäristöön lisättyjen aptameerien – tässä tapauksessa lyhyiden DNA-juosteiden – kanssa avaamalla tai sulkemalla kantensa [21]. Laatikon toimintamekanismi esitellään kuviossa 5a. Tutkimuksessa osoitettiin, että laatikkorakenne voidaan ohjelmoida avautumaan myös kahden erilaisen ympäristön signaalin vaikutuksesta, jolloin laatikko toimii kuten AND-logiikkaportti. Laatikko voidaan lisäksi ohjelmoida toimimaan OR-tyyppisesti asettamalla tietyillä aptameereilla avautuvat lukot kahteen laatikon seinään. NOT-tyyppiset portit voidaan toteuttaa ohjelmoimal-



Kuvio 5. Ympäristön signaaleihin reagoivat lääkkeiden kuljetinmallit. a) Laatikkorakenteen kansi avautuu, kun sen ympäristöön tuodaan lukkojuostetta vastaavat avainjuosteet [21]. Lukkojuosteiden toinen puoli on toista lyhyempi. Laatikon kansi avautuu, koska avainjuosteet ovat lukkojuosteiden toisen puolen kanssa yhtä pitkiä maksimoiden Watson–Crick-emäspariutumisen. b) Laatikkomallin perusideaa vastaava DNA-origami -kapseli, joka avautuu ympäristön pH-arvojen noustessa emäksisemmiksi [74]. Kapseli sulkeutuu ympäristöön lisättyjen H^+ -ionien eli hapon vaikutuksesta. Aikaisempi laatikkorakenne ei ainakaan sellaisenaan sovellu käytöntöön lääkeaineiden vuoto-ongelmien vuoksi. DNA-kapselin seinät ovat a)-kohdan rakenteeseen verrattuna paksummat, jotta lääkeaineet eivät pääse vuotamaan ulos DNA:n raoista.

la laatikon kansi myös sulkeutumaan erilaisten aptameerien tai muiden ympäristön signaalien vaikutuksesta [75]. Näillä kolmella logiikkaportilla on mahdollista muodostaa universaaliset NAND- ja NOR-portit, joilla voidaan toteuttaa monimutkaisiakin loogisia laskutoimituksia. Kukin laatikon sivuista on siis mahdollista ohjelmoida avautumaan tai pysymään suljettuna monimutkaisten oligonukleotideilla tehtävien laskutoimitusten perusteella. Nämä ympäristön signaaleina toimivat oligonukleotidit voisivat olla esimerkiksi luonnollisesti solutasolla esiintyviä RNA- tai mikro-RNA-juosteita [21]. Synergeettisellä kuljetuksella viitataan monen lääkeaineen samanaikaiseen kuljetukseen. Ohjelmoimalla monilokeroinen rakenne laatikkomallia vastaavalla lukkomenetelmällä, monia lääkeaineita voitaisiin ohjelmoida vapautumaan monimut-

kaisten loogisten laskutoimitusten seurauksena. Laatikkomallinen kuljetusjärjestelmä, jonka toimintaperiaate esitellään kuviossa 6, on yksinkertainen malli tulevaisuudessa kehitettävistä keinotekoisista immuunipuolustusjärjestelmistä. Nämä logiikkaporttien avulla toimivat järjestelmät voisivat lopulta kyetä jopa itsenäisten diagnoosien tekoon.



Kuvio 6. Yksinkertainen malli loogisiin laskutoimituksiin ja itsenäisiin diagnooseihin kykenevästä synteettisen immuunipuolustusjärjestelmän rakenneyksiköstä [7]. Monilokeroisen rakenteen seinät on suunniteltu avautumaan erilaisten ympäristön signaalien vaikutuksesta. Rakenteen vasemmanpuoleisin kansi avautuu ympyrän muotoisten signaalien läheisyydessä. Keskimäinen lokero avautuu ainoastaan, kun molemmat laatikon kannessa esiintyvistä signaaleista ovat läsnä. Lokero pysyy suljettuna siinäkin tapauksessa, että vain toista kannen signaaleista on lähettyvillä AND-portille tyypilliseen tapaan. Oikeanpuoleisin lääke vapautuu rakenteesta vain siinä tapauksessa, että kolmion muotoista signaalia ei havaita toisen signaalin kuitenkin esiintyessä rakenteen ympäristössä.

Laatikkomallin jälkeen on kehitetty muita samaa ideologiaa hyödyntäviä kuljetusjärjestelmiä. Eräs näistä on ympäristön pH:n muutoksiin reagoiva DNA-origami-kapseli, joka esitellään kuviossa 5b [74]. Kapselin sisällä olevaan onkaloon voidaan kiinnittää erilaisia lastimolekyylejä [74]. Tällaista systeemiä voitaisiin käyttää esimerkiksi pH-muutosten kartoittamiseen solun sisällä [76]. Pinsetti-mallisen DNA-rakenteen raportoitiin kykenevän reversiibelisti sitomaan ja vapauttamaan lastirakenteensa ja näin säätelemään kyseisen entsyymin aktivaatiota [77]. Lisäksi on muodostettu monisensorisia DNA-nanorakenteita sekä laatikkomallia ja pH-rakennetta

muistuttava DNA-nanorobotti, joilla voidaan suorittaa loogisia laskutoimituksia älykästä diagnosointia varten [78, 79].

Lääkkeiden vapautumista kuljetinrakenteistaan tulisi ajatella myös kineettisestä näkökulmasta. Lääkkeiden vapautumisen kuljetinrakenteistaan tulisi tapahtua tasaisesti ja lääkitsemismäärien pysyä vakaina hoidon alusta loppuun. Antrasykliinit ovat joukko syöpähoidoissa käytettyjä antibiootteja, jotka kykenevät interkaloitumaan kaksijuosteiseen DNA:han ja siten estämään makromolekyylien biosynteesin soluissa [2]. Yleisimpiä antrasykliineistä ovat dauno- ja doksorubisiini, jotka interkaloituvat DNA:han vähentämällä molekyylin torsionaalista jännitystä [80–82]. Doksorubisiinin kuljettaminen syöpäsoluihin DNA-origameilla johti lääkkeen tehokkaampaan kerääntymiseen muuten lääkkeelle resistenssiin syöpäkudokseen ja terveiden solujen vähenevään sytotoksisuuteen [83, 84]. Hogberg *et al.* osoittivat, että mukauttamalla DNA-rakenteiden kiertymisominaisuuksia oli mahdollista säädellä DNA:n lastauskapasiteettia ja doksorubisiinin vapautumista nanorakenteista [85]. Vastaavanlaisten systemien kehittäminen tulee olemaan tärkeää lääkeaineiden älykkään kuljetuksen ja kohdistamisen kannalta.

4 DNA-origamien haasteet

Kuten tutkielman johdannossa todettiin, rakenteellinen DNA-nanoteknologia on alana vielä kehityksensä alkuvaiheilla. On tärkeää huomata, että DNA-origami -menetelmän vahvuudet ja rajoitteet riippuvat usein sovelluksesta, johon menetelmää halutaan käyttää. Tästä syystä DNA-origamien haasteita tulisi aina käsitellä sovelluskohtaisesti. Haasteita analysoidaan tässä tutkielmassa ainoastaan lääkkeiden kohdistamisen näkökulmasta DNA-origameilla.

Tässä luvussa tutustutaan DNA-origami -menetelmän kohtaamiin teknisiin ja biologisiin haasteisiin. Tutkielman tarkoitus on selvittää, mitkä ovat suurimmat DNA-origami -menetelmää hidastavat ongelmat ja kehityksen kohteet. Alaluku 4.1 keskittyy menetelmän kohtaamien teknisten haasteiden käsittelyyn. Teknisillä haasteilla tarkoitetaan lähinnä DNA-origamien valmistamistuksessa esiintyviä ja käyttöönottoa hidastavia ongelmia, joiden ratkaisemiseen tutkimustyön tulisi keskittyä. Alaluvussa 4.2 taas tutustutaan DNA-origami -nanorakenteiden kohtaamiin biologisiin ongelmiin. Biologiset vaikeudet keskittyvät lähinnä kehon ja solujen puolustusmekanismien synnyttämiin haasteisiin.

4.1 Tekniset haasteet

Paremmen hallinnan ja toiminnallisuuden saavuttamiseksi tutkimustyön on tulevaisuudessa keskityttävä ratkaisemaan joitakin alan keskeisempiä ongelmia. Edistyneempien DNA-nanorakenteiden ja -systemien kehittäminen sovellusten käyttöönotto- tasolle vaatii etenkin teknisten ongelmien ratkaisuja. Teknisistä haasteista DNA-origamien kohdistamisen kehitykselle merkityksellisimmät ovat DNA:n korkea hinta verrattuna muihin materiaaleihin, rakenteiden koon ja kompleksisuuden lisääminen sekä väärin laskostuvien rakenteiden määrän vähentäminen [2, 7].

Tähän mennessä kehitetyt DNA-origamit ovat osoittaneet itsejärjestäytymisen tehokkuuden suunniteltujen nanorakenteiden muodostamisessa. Alaluvussa 2.1 mainittu M13mp13-bakteriofaagin genomi on DNA-origamien valmistuksessa yleisimmin käytetty taiteltava DNA-juoste. Sen avulla voidaan muodostaa massaltaan noin vii-

den megadaltonin suuruisia origameja, missä yksi dalton vastaa suuruudeltaan yhtä atomimassayksikköä [7]. Tyypilliset DNA-origamit ovat siis massaltaan noin kaksi kertaa ribosomin massan suuruisia. Origamien kokoa tulisi kasvattaa niiden kuljetuskapasiteetin lisäämiseksi. DNA-origamien massan kasvattaminen johtaa väistämättä myös rakenteiden kompleksisuuden kasvamiseen. Tämä on joidenkin sovellusten kehitykselle välttämätöntä. Luvun 3 lopussa mainittu keinotekoinen immuunipuolustusjärjestelmä on yksi esimerkki sovelluksesta, jonka kehittäminen vaatii DNA-origamien koon ja rakenteiden kompleksisuuden kasvattamista.

Rakenteiden kompleksisuuden kasvattamiselle keskeisimmät haasteet liittyvät etenkin synteettisten DNA-juosteiden korkeaan hintaan, pitkiin synteesiaikoihin ja virheellisesti laskostuvien rakenteiden määrään. Materiaalina käytettävän DNA:n korkea hinta verrattuna muihin vaihtoehtoihin estää monia pääsemästä käsiksi DNA-nanoteknologiaan. Kaupallisesti saatavilla olevat noin seitsemäntuhannen emäksen pituisia DNA-juosteita taittelevat oligonukleotidit maksavat tyypillisesti useita satoja dollareita [2, 4, 7]. Tämän lisäksi lisäkuluja aiheutuu taiteltavan juosteen hankinnasta, oligonukleotidien funktionalisoimisesta ja origamien puhdistusprosessista [2]. Taloudellisten synteessimenetelmien kehittäminen taiteltavan juosteen ja oligonukleotidien valmistamiseksi on keskeistä DNA-origamien laajemman käyttöönoton ja kehityksen aikaansaamiseksi. DNA-rakenteiden hintaa voitaisiin laskea esimerkiksi kehittämällä ja tehostamalla DNA-mikrosiruihin (*eng. DNA microarray*) perustuvia synteessimenetelmiä [86, 87]. Synteessimenetelmien kehittäminen voisi johtaa massaltaan yhden gigadaltonin kokoisten DNA-nanorakenteiden muodostamiseen noin tuhannen dollarin hinnalla [7]. Chao *et al.* ovat lisäksi kehittäneet RCA:han (*eng. rolling circle amplification, RCA*) perustuvan menetelmän DNA-nanorakenteiden valmistamiseksi ja hinnan laskemiseksi [88]. Dietz *et al.* ja Fan *et al.* taas raportoivat menetelmästä, jolla synteesiaikoja saadaan lyhennettyä tunneista minuutteihin lähes täydellisellä saantoprosentilla [89, 90].

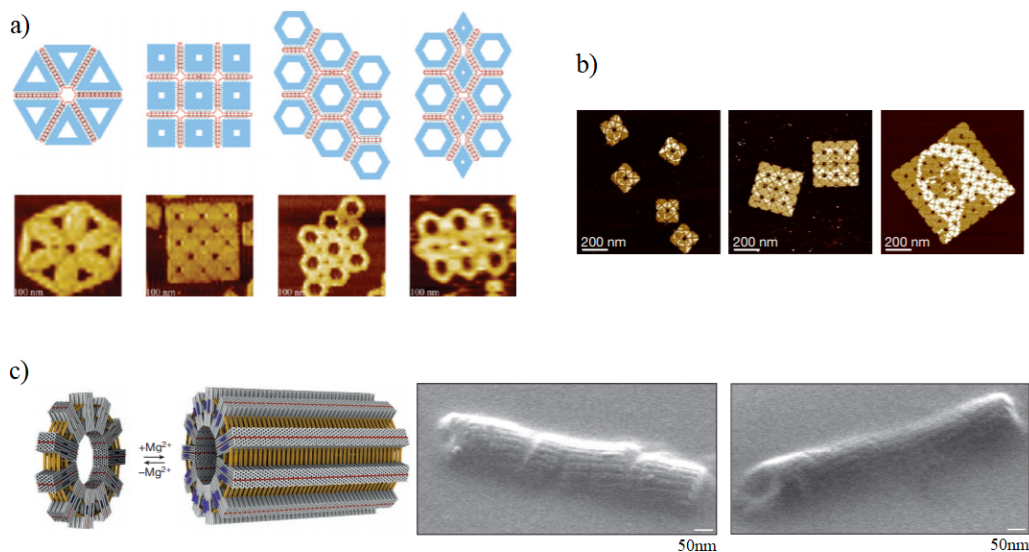
Tällä hetkellä puhdasta DNA-origameja sisältävää tuotetta valmistetaan grammoissa mitattavissa määrin [89, 91–93]. DNA-mikrosirutekniikkaan perustuvien synteessimenetelmien kehittäminen suurempien saantojen valmistamiseksi on kuitenkin haastavaa etenkin rakenteissa esiintyvien virheiden vuoksi [87]. Rakenteissa esiintyviä virheitä voitaisiin minimoida optimoimalla rakenteiden suunnitteluprosessi ja olosuhteet, joissa DNA-origameja kasataan [2]. Näiden haasteiden ratkaisemiseksi on jo kehitetty joitakin menetelmiä. Shih *et al.* kehittivät esimerkiksi agarosigeeliin pe-

rustuvan DNA-origamien puhdistusmenetelmän [94]. Lisäksi DNA-nanorakenteiden saantoa on onnistuttu parantamaan ultrasentrifugoinnin avulla [91]. Hinnan alentaminen ja juosteiden tehokas entsyymaattinen amplifikaatio voisivat mahdollistaa tuotteiden tuottamisen kilogrammojen mittoissa grammojen sijasta [7]. On myös ehdotettu, että DNA-origamien valmistaminen *in vivo* voisi ratkaista juosteiden tehokkaan valmistamisen ongelman [2]. Voigt *et al.* onnistuivat jo valmistamaan yksinkertaisia DNA-tiiliä elävissä bakteereissa [95]. Dietz *et al.* taas tuottivat DNA-origamien rakennusmateriaaleja bakteriofaagien avulla ja uskovat, että heidän menetelmänsä avulla DNA-origameja olisi mahdollista tuottaa kilogrammoissa mitattavissa määrin vain 0,18 euron hintaan milligrammalta [96]. Toimiessaan menetelmä mahdollistaisi DNA:n hinnan alenemisen kahdella tai kolmella kertaluokalla nykyiseen hintaluokkaan verrattuna [97].

Suurempia DNA-origameja voidaan teoriassa valmistaa joko kasvattamalla taiteltavan DNA-juosteen pituutta tai käyttämällä lukuisia uniikkeja DNA-sekvenssejä suurempien rakenteiden kokoamiseksi yksittäisistä paloista. DNA-origamien valmistaminen on tällä hetkellä erittäin riippuvainen M13mp13-sekvenssistä, joka rajoittaa rakenteiden kuljetuskapasiteettia ja niiden koon noin sataan nanometriin [2, 7]. On kuitenkin epätodennäköistä, että tämä kyseinen sekvenssi on optimaalinen kaikkien mahdollisten DNA-origamien korkeatasoiselle laskostumiselle. Tästä syystä tulisi kehittää vaihtoehtoisia, uniikkeja sekvenssejä ja juostekirjastoja tiettyjen geenierisen muotoisten rakenteiden optimaaliseen valmistukseen. Puolet tavanomaisen DNA-origamin materiaalista on taiteltavaa pitkää juostetta ja toinen puoli lyhyitä oligonukleotideja. Tavanomaisten DNA-origamien suurentaminen yhden gigadaltonin massaiseksi rakenteeksi vaatisi yli miljoonan emäsparin pituisen taiteltavan juosteen [7]. Muutamien miljoonien nukleotidien pituiset DNA-juosteet lähenevät jo suurempien bakteerien genomien pituutta. *Escherichia coli*:n genomi on esimerkiksi pituudeltaan noin 4,6 miljoonaa nukleotidia pitkä [98]. Näin pitkät DNA-juosteet ovat mekaanisesti hauraita ja niiden valmistaminen synteettisesti on vaikeaa, jos ei täysin mahdotonta [7]. Puond *et al.* raportoivat polymeerasiketjureaktioon (*eng. polymerase chain reaction, PCR*) perustuvan menetelmän taiteltavien juosteiden pituuden kasvattamiseksi [99]. Juosteiden pituudet vaihtelivat sadan ja kymmentuhannen emäsparin välillä. Muutamaa vuotta myöhemmin Zhang *et al.* pidensivät taiteltavan juosteen 26000:n emäspariin asymmetrisen, pitkäaikaisen PCR-menetelmän avulla [100]. Taiteltavan juosteen pituudet ovat kuitenkin näistä tuloksista huolimatta

kaukana miljoonista emäspareista.

Kuten luvussa 2 todettiin, yhdistämällä tavanomaisia DNA-origameja hierarkisesti toisiinsa voidaan muodostaa suurempia superrakenteita [101–103]. Hyödyntämällä DNA-superrakenteiden kuten DNA-laattojen ja -tiilien perusidea, voidaan mahdollisesti ratkaista DNA-origamien koon suurentamisen ongelma. Yksittäisten DNA-origamien eli *superlaattojen* liittymäkohtien suunnitteluprosessi tulee kuitenkin vielä optimoida superrakenteiden saannon parantamiseksi [104–106]. Superrakenteiden järjestäytyneisyyttä voidaan lisäksi vahvistaa superlaattojen välillä toimivien *superjuosteiden* avulla, jotka pyrkivät avustamaan superlaattojen keskinäistä järjestäytymistä [107]. Hierarkisia superrakenteita hyödyntämällä on hiljaitain muodostettu mikrometriä kokoisia kaksiulotteisia ja massaltaan gigadaltonin kokoisia kolmiulotteisia DNA-origameja [108–110]. Kaksi- ja kolmiulotteisia superrakenteita esitellään kuviossa 7. Vastaavan kaltaiset tutkimukset puhuvat menetelmän soveltuvuuden puolesta DNA-origamien koon suurentamiseksi.



Kuvio 7. Perinteisistä DNA-origameista koottuja superrakenteita. a) Erimuotoisista DNA-origami -laatoista muodostettuja 2D-superrakenteita [17]. Laattojen väliset superjuosteet yhdistävät origamit suuremmiksi rakenteiksi. Superrakenteiden AFM-kuvien mittakaava on 100 nm. b) DNA-origami -superrakenteiden avulla muodostettu kaksiulotteinen kuva Mona Lisa -maalauksesta [108]. AFM-kuvien mittakaava on 200 nm. c) Ratasmaisista DNA-origameista koottuja putkimaisia 3D-superrakenteita [110]. Heliumionimikroskoopilla otettujen kuvien mittakaava on 50 nm.

Suurempien nanorakenteiden rakentaminen tulee vaatimaan itsejärjestäytymisen

kinetiikan syvällistä ymmärtämistä ja tuntemista rakenteiden sisällä sekä niiden välillä [111–113]. Kompleksisten rakenteiden kinetiikan ymmärtäminen voi auttaa kehittämään esimerkiksi tehokkaammin laskostuvia rakenteita. Laskostumisen kinetiikan tutkimuksella viitataan esimerkiksi erilaisten oligonukleotidien sitoutumisjärjestyksen ja nopeuden määrittämiseen. Itsejärjestäytyvyyden parissa tehtävää tutkimustyötä hidastaa kunnollisten analysointityökalujen puute, joilla voitaisiin tutkia väärin laskostuvien rakenteiden määrää ja laatua [7]. Kompleksisissa rakenteissa tapahtuvien pienten laskostumisvirheiden määrittämiseksi tulisi kehittää virheitä suurentavia testirakenteita, jotta väärin laskostuvat rakenteet olisi helppo erottaa kuvantamislaitteilla [7]. Edellä mainittujen menetelmien kehittäminen tulee olemaan tärkeää laskostumisvirheiden vähentämiseksi kompleksisissa DNA-nanorakenteissa. Lisäksi on kehitettävä ymmärrystä nanorakenteiden muodon hallitsemisesta kaikissa kolmessa ulottuvuudessa. Rakenteiden ulkopuolelle jäävät peptidisilmukat voivat hienosäätää immunoglobuliinien eli vasta-aineiden lopullista kolmiulotteista rakennetta [7]. Vastaavanlaisia ulkopuolisia voimia voitaisiin hödyntää myös DNA-nanorakenteiden hienosäädössä.

Kuten alaluvussa 2.2 todettiin, DNA-nanorakenteita voidaan funktionalisoida lukuisilla erilaisilla ligandeilla. Koska DNA on kemiallisesti melko reaktiokyvyn molekyyli, tarvitaan yksinkertaisia ja tehokkaita menetelmiä ligandien kiinnittämiseksi DNA-origameihin [2]. DNA-nanorakenteiden tehokas funktionalisointi on haastavaa etenkin silloin, kun molekyylien tarkka paikka ja orientaatio on rakenteiden toiminnan kannalta tärkeää [7]. Nukleotideihin perustuva funktionalisointi luo ligandien kiinnittämiseksi hyvät lähtökohdat [114]. Muita menetelmiä kannattaa kuitenkin kehittää ja tutkia nukleotidimenetelmän korkean hinnan ja muiden vaikeuksien vuoksi [2, 7, 114]. Eri tyyppisten ligandien kiinnittäminen DNA-origameihin omaavat aina omat haasteensa. Etenkin proteiinilääkkeiden kiinnittäminen DNA-rakenteisiin voi aiheuttaa lääkkeen bioaktiivisuuden alenemisen tai kokonaisvaltaisen menettämisen [6, 7]. Tulevaisuudessa tulisi pyrkiä kehittämään tehokkaita menetelmiä kunkin ligandityypin täsmälliseen kiinnittämiseen DNA-nanorakenteisiin. Ligandit voidaan esimerkiksi kiinnittää nanorakenteisiin useasta kohdasta tai proteiinien tapauksessa molekyylien sterisiin jännitteisiin tukeutuvilla kolmiulotteisilla onkaloilla (*eng. 3D cavity*) [7].

DNA-nanorakenteiden teknisten haasteiden päihittämisessä auttaisi muiden alojen mielenkiinnon herättäminen niille hyödyllisiä sovelluksia kohtaan. Litografisia

pintoja olisi esimerkiksi mahdollista käyttää avuksi superrakenteiden osien järjestämisessä [115–118]. Litografisesti painettuja pintoja käytetään paljon puolijohteiden teollisessa tuotannossa. Osoittamalla DNA-nanoteknologisten sovellusten soveltuminen teolliseen tuotantoon voidaan herättää isojen teollisuusjättien huomio. Näin saadaan käyttöön muiden alojen varallisuus sekä resurssit teknologioiden kehittämistä varten. Teknisten haasteiden ratkaiseminen on tärkeää ylipäätään teknologian laajemmalle käyttönotolle. Yksinkertaisempia ja automatisoituja DNA-origamien suunnittelualustoja tulisi kehittää, jotta muut kuin tutkijat kykenisivät helposti suunnittelemaan omiin käyttötarkoituksiinsa sopivia DNA-origameja [2].

4.2 Biologiset haasteet

Solut ja niiden ympäristö muuttuvat kaiken aikaa kaukana termodynaamisesta tasapainosta. DNA-nanoteknologian päämäärä on suunnitella systeemejä, jotka vastaavat ja kykenevät haastamaan soluissa tavattavan aktiivisen itsejärjestäytymisen tehokkuuden. Tällä hetkellä DNA:han perustuvat systeemit ovat kuitenkin vielä yksinkertaisia, epävakaita fysiologisissa olosuhteissa ja useita kertaluokkia hitaampia kuin soluissa tavattavat vastineensa [7]. Eräs vaihtoehto systeemien toiminnan nopeuttamiseksi ja tehokkuuden parantamiseksi olisi tutkia muita energianlähteitä, kuten ATP:n hydrolyysia tai fotonien absorptiota [7]. Erityisen suosittu kohde erilaisia energianlähteitä hyödyntävästä DNA-origami -systeemistä on solun luonnollisia moottoriproteiineja – myosiinia, kinesiiniä ja dyneiiniä – muistuttava DNA-kävelijä (*eng. DNA walker*). Kävelijän on osoitettu kykenevän itsenäisesti kävelemään tiettyjä reittejä pitkin, kantamaan lasteja tai toimimaan rakenteita kokoavan liukuhihnan tavoin [119, 120].

Lääkkeiden tehokas annostelu on haastavaa etenkin tiettyjen kehossa kohdattavien kudostyyppien ja kehon sekä solujen puhdistusjärjestelmistä johtuvien esteiden takia. Lääkeaineita kuljettavien rakenteiden on ylitettävä nämä esteet päästäkseen tarpeeksi lähelle kohdettansa lääkkeen vapauttamista varten [121]. Lääkkeiden kuljettimien tehokkuutta verottavat rakenteiden rajallinen kyky läpäistä sydämen, verisuonien ja imusuoniston sisäpinnoilla oleva endoteelisolukerros, munuaisten filtraatio sekä kehon retikuloendotelialijärjestelmä eli immuunipuolustuksen solunsyöjät kuten makrofagit [121]. Nanokuljettimien tulee kyetä välttämään makrofagien puhdistusyrietykset elimissä kuten maksassa ja pernassa sekä läpäisemään tehokkaasti kohdekudoksensa endoteelisolukot. Vaikka muokkaamalla kuljettimien muotoa, kokoa ja pintaomi-

naisuuksia on mahdollista lisätä kuljettimien pysyvyyttä verenkierrossa, tämä ei pelkästään riitä kuljettimien tehokkaaseen kuljettamiseen endoteelikudoksen lävitse [121]. Optimaalisia rakenneominaisuuksia, joita kuljetusjärjestelmät vaatisivat säilyäkseen verenkierrossa mahdollisimman pitkään, ei myöskään tunneta tarkasti [7]. Rakenteiden koko vaikuttaa niiden kykyyn välttää kehon immuunipuolustuksen puhdistusyrietykset. Myös munuaisten toiminnalle on tyypillistä, että ne suodattavat verenkierrosta hitaammin suurempia hydrofiilisiä molekyylejä [122]. Proteiineihin perustuvia lääkeaineita voidaan suurentaa PEGylylaation avulla, missä proteiinin pintaan muodostetaan hydrofiilisiä polyetyleeniglykoleita (PEG) [122]. Shih ja Perrault vähensivät immuunipuolustuksen aktivaatiota kaksi suuruusluokkaa PEGylyloimalla DNA-origameja sisältävien viruskapsidien pinnat [123].

DNA-nanorakenteiden endosytoosiin perustuvat solun sisäänottoreitit ovat edelleen melko huonosti tunnettuja ja ymmärrettyjä. Vaikka DNA-origami -rakenteet kykenevät tunkeutumaan soluihin, niiden sisäänottotehokkuutta ja stabiilisuutta fyysiologisissa olosuhteissa tulee parantaa ennen käyttöä käytännön sovelluksissa. Kuten alaluvussa 3.1 mainittiin, näitä ominaisuuksia on pyritty parantamaan virusten inspiroimin menetelmin [55, 123]. Mikkilä *et al.* onnistuivat lisäämään kapsidi-proteiineilla päällystettyjen DNA-origamien sisäänottoa soluihin 13-kertaisesti verrattuna puhtaisiin origameihin [55]. Shih ja Perrault taas onnistuivat suojaamaan DNA-origameja nukleaasien hajotukselta ja nostamaan rakenteiden biosaatavuutta kertoimella 17 normaaleihin origameihin verrattuna [123]. Soluun tunkeutumiselle voivat aiheuttaa lisähaasteita myös lukuisat patologisten solujen lääkeaineita vastaan kehittämät resistenssikeinot [122]. DNA-rakenteet tarvitsevat lisäksi tavan karata endosytoosin aikana syntyvästä kalvorakkulasta, jota kutsutaan endosomiksi [62]. Endosomit ovat topologisia vastineita solun ulkopuolen olosuhteille, eivätkä siten salli solun sisäpuolen kohteiden tavoittamista ilman rakkulan hajottamista. Endosomit kehittyvät myöhemmin endolysosomeiksi, missä olosuhteet muuttuvat happamiksi. Biomolekyylit kuten proteiinit ja oligonukleotidit voivat inaktivoitua tai hajota liian happamissa olosuhteissa [122]. Solujen tumiin kohdistettujen lääkerakenteiden täytyy myös läpäistä tumaa suojaava tumakotelo [122]. Liang *et al.* osoittivat, että merkittävällä origamirakenteet tumaanohjaussignaaleilla (*eng. nuclear localization signals, NLS*), rakenteiden onnistui paeta lysosomeilta ja lokalisoitua solun tumaan [63]. Myös doksorubisiinilla käsitellyt DNA-origamit kykenivät välttämään lysosomaalisen happamoitumisen ja kulkeutumaan solun sisäisiin kohteisiin [83].

Seurauksena DNA-origamien biologisesta sopivuudesta, mahdollisuuksia niiden tuottamiseksi solujen oman geneettisen koneiston avulla on tutkittu. DNA-nanorakenteiden koodaaminen solujen sisällä poistaisi rakenteiden soluihin kuljettamisesta aiheutuvat haasteet. Kuten alaluvussa 3.1 todettiin, DNA-origami -rakenteet osoittavat huomattavaa stabiiliutta solujen lysaatissa ja nukleasientsyymien hajotusta vastaan [65, 66, 124]. Biorakenteellista DNA-nanoteknologiaa rajoittaa siis enemmän kyky koota ja laskostaa nanorakenteita *in vivo* olosuhteissa kuin lopullisten DNA-rakenteiden stabiilius [7]. On osoitettu, että yksijuosteisia DNA-nanorakenteita voidaan monistaa polymeerasientsyymien avulla *in vitro* ja *in vivo* [19, 125–127]. Lisätutkimuksia on kuitenkin tehtävä siitä, voidaanko kompleksisia rakenteita laskostaa tehokkaasti solujen sisällä. RNA-nanoteknologia voi osoittautua tehokkaammaksi työkaluksi rakenteiden monistamisessa solujen sisällä, mutta aiheetta ei käsitellä tässä tutkielmassa sen enempää.

5 Päätäntö

DNA-origamien on todettu tuovan joitakin ylivoimaisia etuja etenkin nukleiinihappoihin perustuvien lääkkeiden kuljettamisessa kehon kohdekudoksiin. Pieniin molekyyleihin ja proteiineihin perustuvat tutkimukset ovat lisäksi tuottaneet rohkaisevia tuloksia, vaikka ne vaativatkin vielä lisätutkimuksia sekä rakenteiden optimointia. DNA-nanoteknologian nuoruus tieteellisenä alana vaatii väistämättä joidenkin DNA-rakenteita koskevien ominaisuuksien ja vuorovaikutusten selvittämistä. Lisätietoja tarvitaan esimerkiksi DNA-nanorakenteiden käyttämistä endosytoosireiteistä, solunsäisen kuljetuksen tärkeimmistä mekanismeista, rakenteiden päätepisteistä soluissa sekä rakenteiden farmakokineettisistä ominaisuuksista – kiertoajoista verenkierrossa, levittämisestä kudoksiin, kehon aineenvaihdunnasta ja rakenteiden puhdistamisesta kehosta. Geometristen ominaisuuksien, pintavaarausten ja emäsjärjestyksien optimointi on tärkeää menetelmien tehostamiseksi. Lisätutkimuksia tarvitaan myös rakenteiden ominaisuuksien vaikutuksesta makrofagien välttämiseksi, endosomeilta karkaamiseksi, solunsäisten kohteiden saavuttamiseksi ja verenkierrosta nopeasti puhdistettavien rakennekeräytymien estämiseksi. Käytännölliset biolääketieteelliset sovellukset vaativat lisäksi suuria tuotantomääriä kompleksisia, virheettömiä rakenteita lääkkeiden kliinisiä kokeita varten. DNA-origamien laajempi käyttöönotto vaatii myös yksinkertaisempien valmistustapojen ja suunnitelualustojen kehitystä.

DNA-nanoteknologian kehitys voi johtaa joidenkin hylättyjen lääkevaihtoehtojen uudelleen harkitsemiseen DNA-origami -kuljettimien biosopivuuden ja muiden kapsulointiominaisuuksien johdosta. DNA-origami -rakenteita ei kuitenkaan vielä ole hyväksytty tutkittavaksi merkittäviin kliinisiin kokeisiin. Pääasiassa siksi, että DNA-nanorakenteissa esiintyvän geneettisen materiaalin epätodennäköisestä, mutta haitallisesta rekombinaation mahdollisuudesta genomien kanssa ei ole olemassa riittäviä tutkimuksia. Ottamalla huomioon ihmisen kehon ja sen toimintojen monimutkaisuus, muilla eliöillä suoritettut tutkimukset voivat ainoastaan antaa viitteitä mahdollisista vaikutuksista ihmisen kehossa. Huomioiden DNA-nanoteknologian nykyisen kehityksen taso, lisätutkimuksia on tehtävä vielä paljon. DNA-nanoteknologian alalla tehtävien tutkimusten määrän voidaan kuitenkin olettaa nousevan tiedon tar-

kentuessa ja lisääntyessä, muiden alojen sovellusten kehittyessä sekä niiden kysynnän kasvaessa.

Tähän tutkielmaan ei ollut mahdollista sisällyttää kaikkia mainitsemisen arvoisia julkaisuja niiden suuren määrän vuoksi. Aihetta on kuitenkin analysoitu monipuolisesti alalle oleellisten julkaisujen avulla kirjoittajan parhaan kyvyn mukaan. Tärkeimpinä tiedonlähteinä toimivat tieteenalan tuoreimmat, vertaisarvioidut review-artikkelit vuosilta 2011-2017. Uusimmat tutkielmassa käytetyt julkaisut ovat tutkimusartikkeleita, jotka on julkaistu alalle keskeisissä tieteellisissä lehdissä. Näiden tutkimusten valossa voidaan todeta, että alalta löytyy vielä paljon potentiaalia nykyisten rakenteiden tehostamiseksi. On myös todennäköistä, että alalta tullaan löytämään edelleen uusia sovellus- ja käyttömahdollisuuksia. Tulevaisuudessa kehitettäviltä DNA-nanorakenteilta odotetaan entistä älykkäämpiä, ideaalisia kuljettimia vastaavia menetelmiä lääkkeiden kuljetusta varten sekä entistä parempaa ymmärrystä nanotasolla tavattavien vuorovaikutusten ja ominaisuuksien säätelyyn.

Lähteet

- [1] N. C. Seeman ja H. F. Sleiman. ”DNA nanotechnology”. *Nature reviews materials* 3 (2018), s. 1–23. DOI: 10.1038/natrevmats.2017.68.
- [2] P. Wang *et al.* ”The beauty and utility of DNA origami”. *Chem* 2 (2017), s. 359–382. DOI: 10.1016/j.chempr.2017.02.009.
- [3] P. W. K. Rothemund. ”Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns”. *Nature International Journal of Science* 440 (2006), s. 297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
- [4] V. Linko, A. Ora ja M. Kostianen. ”DNA nanostructures as smart drug-delivery vehicles and molecular devices”. *Trends in biotechnology* 33 (2015), s. 586–594. DOI: 10.1016/j.tibtech.2015.08.001.
- [5] J. Li *et al.* ”Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures”. *Advanced Materials* 27 (2013), s. 4386–4396. DOI: 10.1002/adma.201300875.
- [6] J. Chao *et al.* ”Structural DNA nanotechnology for intelligent drug delivery”. *Nano-micro Small* 10 (2014), s. 4626–4635. DOI: 10.1002/smll.201401309.
- [7] A. V. Pinheiro *et al.* ”Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology”. *Nature Nanotechnology* 6 (2011), s. 763–772. DOI: 10.1038/NNANO.2011.187.
- [8] J. D. Watson ja F. H. C. Crick. ”The structure of DNA”. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 18 (1953), s. 123–131. DOI: 10.1101/SQB.1953.018.01.020.
- [9] L. A. Pray. ”Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick”. *Nature Education* 1 (2008), s. 100.
- [10] N. C. Seeman. ”Nucleic acid junctions and lattices”. *Elsevier Journal of Theoretical Biology* 99 (1982), s. 237–247. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.

- [11] M. Ortiz-Lombardía *et al.* "Crystal structure of a DNA Holliday junction". *Nature Structural Biology* 6 (1999), s. 913–917. DOI: 10.1038/13277.
- [12] C. Angell *et al.* "DNA nanotechnology for precise control over drug delivery and gene therapy". *Small DNA Nanotechnology* 12 (2016), s. 1117–1132. DOI: 10.1002/sm11.201502167.
- [13] V. Linko ja H. Dietz. "The enabled state of DNA nanotechnology". *Current Opinion in Biotechnology* 24 (2013), s. 555–561. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.02.001.
- [14] M. Mousavi-Khattat, A. Rafati ja P. Gill. "Fabrication of DNA nanotubes using origami-based nanostructures with sticky ends". *Journal of Nanostructure in Chemistry* 5 (2015), s. 177–183. DOI: 10.1007/s40097-015-0148-z.
- [15] W. Liu *et al.* "Crystalline Two-Dimensional DNA Origami Arrays". *Angewandte Chemie* 50 (2011), s. 264–267. DOI: 10.1002/anie.201005911.
- [16] Z. Zhao, H. Yan ja Y. Liu. "A Route to Scale Up DNA Origami Using DNA Tiles as Folding Staples". *Angewandte Chemie* 49 (2010), s. 1414–1417. DOI: 10.1002/anie.200906225.
- [17] Z. Zhao, H. Yan ja Y. Liu. "Organizing DNA Origami Tiles into Larger Structures Using Preformed Scaffold Frames". *Nano Letters* 11 (2011), s. 2997–3002. DOI: 10.1021/nl201603a.
- [18] N. V. Voigt *et al.* "Single-molecule chemical reactions on DNA origami". *Nature Nanotechnology* 5 (2010), s. 200–203. DOI: doi.org/10.1038/nnano.2010.5.
- [19] W. M. Shih, J. D. Quispe ja G. F. Joyce. "A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron". *Nature* 427 (2004), s. 618–621. DOI: 10.1038/nature02307.
- [20] Y. Ke *et al.* "Scaffolded DNA Origami of a DNA Tetrahedron Molecular Container". *Nano Letters* 9 (2009), s. 2445–2447. DOI: 10.1021/nl901165f.
- [21] E. S. Andersen *et al.* "Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid". *Nature* 459 (2009), s. 73–76. DOI: 10.1038/nature07971.
- [22] S. M. Douglas *et al.* "Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes". *Nature International Journal of Science* 459 (2009), s. 414–418. DOI: 10.1038/nature08016.

- [23] S. M. Douglas *et al.* "Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno". *Nucleic Acids Research* 37 (2009), s. 359–382. DOI: 10.1093/nar/gkp436.
- [24] E. S. Andersen *et al.* "Semiautomated improvement of RNA alignments". *RNA* 13 (2007), s. 1850–1859.
- [25] H. Dietz, S. M. Douglas ja W. M. Shih. "Folding DNA into Twisted and Curved Nanoscale Shapes". *Science* 325 (2009), s. 725–730. DOI: 10.1126/science.1174251.
- [26] Y. Ke *et al.* "Three-Dimensional Structures Self-Assembled from DNA Bricks". *Science* 338 (2012), s. 1177–1183. DOI: 10.1126/science.1227268.
- [27] D. Han *et al.* "DNA Gridiron Nanostructures Based on Four-Arm Junctions". *Science* 339 (2013), s. 1412–1415. DOI: 10.1126/science.1232252.
- [28] F. Zhang *et al.* "Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices". *Nature Nanotechnology* 10 (2015), s. 779–784. DOI: 10.1038/nnano.2015.162.
- [29] W. Wang *et al.* "Complex wireframe DNA nanostructures from simple building blocks". *Nature Communications* 10 (2019), s. 1–8. DOI: 10.1038/s41467-019-08647-7.
- [30] V. Linko ja M. A. Kostainen. "Automated design of DNA origami". *Nature biotechnology* 34 (2016), s. 826–827. DOI: 10.1038/nbt.3647.
- [31] H. Jun *et al.* "Automated sequence design of 2D wireframe DNA origami with honeycomb edges". *Nature communications* 10 (2019), s. 1–9. DOI: 10.1038/s41467-019-13457-y.
- [32] H. Jun *et al.* "Automated Sequence Design of 3D Polyhedral Wireframe DNA Origami with Honeycomb Edges". *ACS Nano* 13 (2019), s. 2083–2093. DOI: 10.1021/acsnano.8b08671.
- [33] H. Yang, K. L. Meter ja H. F. Sleiman. "DNA modified with metal complexes: Applications in the construction of higher order metal–DNA nanostructures". *Coordination Chemistry Reviews* 254 (2010), s. 2403–2415. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.02.026.
- [34] S. Ko *et al.* "DNA Nanotubes as Combinatorial Vehicles for Cellular Delivery". *Biomacromolecules* 9 (2008), s. 3039–3043. DOI: 10.1021/bm800479e.

- [35] K. T. Savjani, A. K. Gajjar ja J. K. Savjani. "Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques". *ISRN Pharmaceutics* 2012 (2012), s. 1–10. DOI: 10.5402/2012/195727.
- [36] R. Langer. "New methods of drug delivery". *Science* 249 (1990), s. 1527–1533. DOI: 10.1126/science.2218494.
- [37] R. Langer. "Drug delivery and targeting". *Nature* 392 (1998), s. 1–10.
- [38] J.-W. Yoo *et al.* "Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers". *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (2011), s. 521–535. DOI: 10.1038/nrd3499.
- [39] V. P. Torchilin. "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers". *Nature Reviews Drug Discovery* 4 (2005), s. 145–160. DOI: 10.1038/nrd1632.
- [40] O. Pillai ja R. Panchagnula. "Polymers in drug delivery". *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2001), s. 447–451. DOI: 10.1016/S1367-5931(00)00227-1.
- [41] J. Shi *et al.* "Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications". *Nano Letters* 10 (2010), s. 3223–3230. DOI: 10.1021/nl102184c.
- [42] V. J. Venditto ja F. C. S. Jr. "Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs!" *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (2013), s. 80–88. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.038.
- [43] H. Lv *et al.* "Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery". *Journal of Controlled Release* 114 (2006), s. 100–109. DOI: 10.1016/j.jconrel.2006.04.014.
- [44] O. Zelphati *et al.* "Effect of serum components on the physico-chemical properties of cationic lipid/oligonucleotide complexes and on their interactions with cells". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1390 (1998), s. 119–133. DOI: 10.1016/S0005-2760(97)00169-0.
- [45] B. Duncan, C. Kim ja V. M. Rotello. "Gold nanoparticle platforms as drug and biomacromolecule delivery systems". *Journal of Controlled Release* 148 (2010), s. 122–127. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.06.004.

- [46] J. L. Vivero-Escoto *et al.* "Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery". *Small* 6 (2010), s. 1952–1967. DOI: 10.1002/sm.11.200901789.
- [47] Z. Liu *et al.* "Carbon materials for drug delivery and cancer therapy". *Materials Today* 14 (2011), s. 316–323. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70161-4.
- [48] S. E. A. Gratton *et al.* "The effect of particle design on cellular internalization pathways". *PNAS* 105 (2008), s. 11613–11618. DOI: 10.1073/pnas.0801763105.
- [49] X. Michalet *et al.* "Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics". *Science* 307 (2005), s. 538–544. DOI: 10.1126/science.1104274.
- [50] B. Chertok *et al.* "Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors". *Biomaterials* 29 (2008), s. 487–496. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.08.050.
- [51] Y. He *et al.* "Ultrastable, Highly Fluorescent, and Water-Dispersed Silicon-Based Nanospheres as Cellular Probes". *Angewandte Chemie* 48 (2009), s. 128–132. DOI: 10.1002/anie.200802230.
- [52] N. Chen *et al.* "The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots". *Biomaterials* 33 (2012), s. 1238–1244. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.10.070.
- [53] A. Magrez *et al.* "Cellular Toxicity of Carbon-Based Nanomaterials". *Nano Letters* 6 (2006), s. 1121–1125. DOI: 10.1021/nl060162e.
- [54] W. H. D. Jong *et al.* "Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration". *Biomaterials* 29 (2008), s. 1912–1919. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.037.
- [55] J. Mikkilä *et al.* "Virus-Encapsulated DNA Origami Nanostructures for Cellular Delivery". *Nano Letters* 14 (2014), s. 2196–2200. DOI: 10.1021/nl500677j.
- [56] M. M. C. Bastings *et al.* "Modulation of the Cellular Uptake of DNA Origami through Control over Mass and Shape". *Nano Letters* 18 (2018), s. 3557–3564. DOI: 10.1021/acs.nanolett.8b00660.
- [57] A. S. Walsh *et al.* "DNA Cage Delivery to Mammalian Cells". *ACS Nano* 5 (2011), s. 5427–5432. DOI: 10.1021/nn2005574.

- [58] J. Li *et al.* "Self-Assembled Multivalent DNA Nanostructures for Noninvasive Intracellular Delivery of Immunostimulatory CpG Oligonucleotides". *ACS Nano* 5 (2011), s. 8783–8789. DOI: 10.1021/nn202774x.
- [59] S. Mitragotri. "In Drug Delivery, Shape Does Matter". *Pharmaceutical Research* 26 (2009), s. 232–234. DOI: 10.1007/s11095-008-9820-z.
- [60] Y. Geng *et al.* "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery". *Nature Nanotechnology* 2 (2007), s. 249–255. DOI: 10.1038/nnano.2007.70.
- [61] K. H. nd Huili Ma *et al.* "Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo". *ACS Nano* 6 (2012), s. 4483–4493. DOI: 10.1021/nn301282m.
- [62] S. Xiang *et al.* "Uptake mechanisms of non-viral gene delivery". *Journal of Controlled Release* 158 (2012), s. 371–378. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.09.093.
- [63] L. Liang *et al.* "Single-Particle Tracking and Modulation of Cell Entry Pathways of a Tetrahedral DNA Nanostructure in Live Cells". *Angewandte Chemie* 53 (2014), s. 7745–7750. DOI: 10.1002/anie.201403236.
- [64] G. Chen *et al.* "Enzymatic Synthesis of Periodic DNA Nanoribbons for Intracellular pH Sensing and Gene Silencing". *Journal of the American Chemical Society* 137 (2015), s. 3844–3851. DOI: 10.1021/ja512665z.
- [65] J.-W. Keum ja H. Bermudez. "Enhanced resistance of DNANanostructures to enzymatic digestion". *Chemical Communications* (2009), s. 7036–7038. DOI: 10.1039/B917661F.
- [66] Q. Mei *et al.* "Stability of DNA Origami Nanoarrays in Cell Lysate". *Nano Letters* 11 (2011), s. 1477–1482. DOI: 10.1021/nl1040836.
- [67] X. Shen *et al.* "Visualization of the intracellular location and stability of DNA origami with a label-free fluorescent probe". *Chemical Communications* 48 (2012), s. 11301–11303. DOI: 10.1039/c2cc36185j.
- [68] V. J. Schüller *et al.* "Cellular Immunostimulation by CpG-Sequence-Coated DNA Origami Structures". *ACS Nano* 5 (2011), s. 9696–9702. DOI: 10.1021/nn203161y.

- [69] J. W. Nichols ja Y. HanBae. "EPR: Evidence and fallacy". *Journal of Controlled Release* 190 (2014), s. 451–464. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.057.
- [70] H. Maeda. "Macromolecular therapeutics in cancer treatment: The EPR effect and beyond". *Journal of Controlled Release* 164 (2012), s. 138–144. DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.04.038.
- [71] K. Greish. "Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting". *Cancer Nanotechnology* 624 (2010), s. 25–37. DOI: 10.1007/978-1-60761-609-2_3.
- [72] A. K. Iyer *et al.* "Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting". *Drug Discovery Today* 11 (2006), s. 812–818. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.07.005.
- [73] J. B. A. Sudimack ja R. J. Lee. "Targeted drug delivery via the folate receptor". *Advanced Drug Delivery Reviews* 41 (2000), s. 147–162. DOI: 10.1016/S0169-409X(99)00062-9.
- [74] H. Ijäs *et al.* "Reconfigurable DNA Origami Nanocapsule for pH-Controlled Encapsulation and Display of Cargo". *ACS Nano* 13 (2019), s. 5959–5967. DOI: 10.1021/acsnano.9b01857.
- [75] R. M. Zadegan *et al.* "Construction of a 4 Zeptoliters Switchable 3D DNA Box Origami". *ACS Nano* 6 (2012), s. 10050–10053. DOI: 10.1021/nn303767b.
- [76] S. Modi *et al.* "A DNA nanomachine that maps spatial and temporal pH changes inside living cells". *Nature Nanotechnology* 4 (2009), s. 325–330. DOI: 10.1038/nnano.2009.83.
- [77] C. Zhou, Z. Yang ja D. Liu. "Reversible Regulation of Protein Binding Affinity by a DNA Machine". *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012), s. 1416–1418. DOI: 10.1021/ja209590u.
- [78] S. M. Douglas, I. Bachelet ja G. M. Church. "A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads". *Science* 335 (2012), s. 831–834. DOI: 10.1126/science.1214081.
- [79] H. Pei *et al.* "Reconfigurable Three-Dimensional DNA Nanostructures for the Construction of Intracellular Logic Sensors". *Angewandte Chemie* 51 (2012), s. 9020–9024. DOI: 10.1002/anie.201202356.

- [80] V. Bagalkot *et al.* "An Aptamer–Doxorubicin Physical Conjugate as a Novel Targeted Drug-Delivery Platform". *Angewandte Chemie* 45 (2006), s. 8149–8152. DOI: 10.1002/anie.200602251.
- [81] Z. Xiao *et al.* "DNA Self-Assembly of Targeted Near-Infrared-Responsive Gold Nanoparticles for Cancer Thermo-Chemotherapy". *Angewandte Chemie* 51 (2012), s. 11853–11857. DOI: 10.1002/anie.201204018.
- [82] P. D. Halley *et al.* "Daunorubicin-Loaded DNA Origami Nanostructures Circumvent Drug-Resistance Mechanisms in a Leukemia Model". *Small* 12 (2015), s. 308–320. DOI: 10.1002/smll.201502118.
- [83] Q. Jiang *et al.* "DNA Origami as a Carrier for Circumvention of Drug Resistance". *Journal of the American Chemical Society* 134 (2012), s. 13396–13403. DOI: 10.1021/ja304263n.
- [84] Q. Zhang *et al.* "DNA Origami as an In Vivo Drug Delivery Vehicle for Cancer Therapy". *ACS Nano* 8 (2014), s. 6633–6643. DOI: 10.1021/nn502058j.
- [85] Y.-X. Zhao *et al.* "DNA Origami Delivery System for Cancer Therapy with Tunable Release Properties". *ACS Nano* 6 (2012), s. 8684–8691. DOI: 10.1021/nn3022662.
- [86] J. Tian, K. Ma ja I. Saaem. "Advancing high-throughput gene synthesis technology". *Molecular Biosystems* 5 (2009), s. 714–722. DOI: 10.1039/B822268C.
- [87] S. Kosuri *et al.* "Scalable gene synthesis by selective amplification of DNA pools from high-fidelity microchips". *Nature Biotechnology* 28 (2010), s. 1295–1299. DOI: 10.1038/nbt.1716.
- [88] X. Ouyang *et al.* "Self-assembly of DNA-based drug delivery nanocarriers with rolling circle amplification". *Methods* 67 (2014), s. 198–204. DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.05.024.
- [89] J.-P. J. Sobczak *et al.* "Rapid Folding of DNA into Nanoscale Shapes at Constant Temperature". *Science* 338 (2012), s. 1458–1461. DOI: 10.1126/science.1229919.
- [90] Y. Fu *et al.* "Single-Step Rapid Assembly of DNA Origami Nanostructures for Addressable Nanoscale Bioreactors". *Journal of the American Chemical Society* 135 (2013), s. 696–702. DOI: 10.1021/ja3076692.

- [91] C. Lin, S. D. Perrault ja W. M. Shih. "Purification of DNA-origami nanostructures by rate-zonal centrifugation". *Nucleic acids research* 41 (2013). DOI: 10.1093/nar/gks1070.
- [92] E. Stahl *et al.* "Facile and Scalable Preparation of Pure and Dense DNA Origami Solutions". *Angewandte Chemie* 53 (2014), s. 12735–12740. DOI: 10.1002/anie.201405991.
- [93] B. Kick *et al.* "Efficient Production of Single-Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami". *Nano Letters* 15 (2015), s. 4672–4676. DOI: 10.1021/acs.nanolett.5b01461.
- [94] G. Bellot *et al.* "Recovery of intact DNA nanostructures after agarose gel-based separation". *Nature Methods* 8 (2011), s. 192–194. DOI: 10.1038/nmeth0311-192.
- [95] J. Elbaz, P. Yin ja C. A. Voigt. "Genetic encoding of DNA nanostructures and their self-assembly in living bacteria". *Nature Communications* 7 (2016). DOI: 10.1038/ncomms11179.
- [96] F. Praetorius *et al.* "Biotechnological mass production of DNA origami". *Nature* 552 (2017), s. 84–87. DOI: 10.1038/nature24650.
- [97] "Bigger and cheaper". *Nature Nanotechnology* 13 (2018). DOI: 10.1038/s41565-017-0054-2.
- [98] U. Bergthorsson ja H. Ochman. "Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *Escherichia coli*". *Journal of bacteriology* 177 (1995), s. 5784–5789. DOI: 10.1128/jb.177.20.5784-5789.1995.
- [99] E. Pound *et al.* "Polymerase Chain Reaction Based Scaffold Preparation for the Production of Thin, Branched DNA Origami Nanostructures of Arbitrary Sizes". *Nano Letters* 9 (2009), s. 4302–4305. DOI: 10.1021/nl902535q.
- [100] H. Zhang *et al.* "Folding super-sized DNA origami with scaffold strands from long-range PCR". *Chemical Communications* 48 (2012), s. 6405–6407. DOI: 10.1039/C2CC32204H.
- [101] Z. Li *et al.* "Molecular Behavior of DNA Origami in Higher-Order Self-Assembly". *Journal of the American Chemical Society* 132 (2010), s. 13545–13552. DOI: 10.1021/ja106292x.

- [102] W. Liu *et al.* "Crystalline Two-Dimensional DNA-Origami Arrays". *Angewandte Chemie* 50 (2011), s. 264–267. DOI: 10.1002/anie.201005911.
- [103] Z. Zhao, H. Yan ja Y. Liu. "A Route to Scale Up DNA Origami Using DNA Tiles as Folding Staples". *Angewandte Chemie* 49 (2010), s. 1414–1417. DOI: 10.1002/anie.200906225.
- [104] M. Endo *et al.* "Two-dimensional DNA origami assemblies using a four-way connector". *Chemical Communications* 47 (2011), s. 3213–3215. DOI: 10.1039/c0cc05306f.
- [105] A. Rajendran *et al.* "Programmed Two-Dimensional Self-Assembly of Multiple DNA Origami Jigsaw Pieces". *ACS Nano* 5 (2011), s. 665–671. DOI: 10.1021/nn1031627.
- [106] S. Woo ja P. W. K. Rothemund. "Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures". *Nature Chemistry* 3 (2011), s. 620–627. DOI: 10.1038/nchem.1070.
- [107] Z. Zhao, Y. Liu ja H. Yan. "Organizing DNA Origami Tiles into Larger Structures Using Preformed Scaffold Frames". *Nano Letters* 11 (2011), s. 2997–3002. DOI: 10.1021/nl201603a.
- [108] G. Tikhomirov, P. Petersen ja L. Qian. "Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns". *Nature* 552 (2017), s. 67–71. DOI: 10.1038/nature24655.
- [109] L. L. Ong *et al.* "Programmable self-assembly of three-dimensional nanostructures from 10,000 unique components". *Nature* 552 (2017), s. 72–77. DOI: 10.1038/nature24648.
- [110] K. F. Wagenbauer, C. Sigl ja H. Dietz. "Gigadalton-scale shape-programmable DNA assemblies". *Nature* 552 (2017), s. 78–83. DOI: 10.1038/nature24651.
- [111] B. Saccà *et al.* "High-Throughput, Real-Time Monitoring of the Self-Assembly of DNA Nanostructures by FRET Spectroscopy". *Angewandte Chemie* 47 (2008), s. 2135–2137. DOI: 10.1002/anie.200704836.
- [112] J. Nangreave, H. Yan ja Y. Liu. "Studies of Thermal Stability of Multivalent DNA Hybridization in a Nanostructured System". *Biophysical Journal* 97 (2009), s. 563–571. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.05.013.

- [113] J. Nangreave, H. Yan ja Y. Liu. "DNA Nanostructures as Models for Evaluating the Role of Enthalpy and Entropy in Polyvalent Binding". *Journal of the American chemical Society* 133 (2011), s. 4490–4497. DOI: 10.1021/ja1103298.
- [114] Y. Singh, P. Murat ja E. Defrancq. "Recent developments in oligonucleotide conjugation". *Chemical Society Reviews* 39 (2010), s. 2054–2070. DOI: 10.1039/b911431a.
- [115] R. J. Kershner *et al.* "Placement and orientation of individual DNA shapes on lithographically patterned surfaces". *Nature Nanotechnology* 4 (2009), s. 557–561. DOI: 10.1038/nnano.2009.220.
- [116] A. M. Hung *et al.* "Large-area spatially ordered arrays of gold nanoparticles directed by lithographically confined DNA origami". *Nature Nanotechnology* 5 (2010), s. 121–126. DOI: 10.1038/nnano.2009.450.
- [117] A. M. Hung, H. Noh ja J. N. Cha. "Recent advances in DNA-based directed assembly on surfaces". *Nanoscales* 2 (2010), s. 2530–2537. DOI: 10.1039/c0nr00430h.
- [118] B. Ding *et al.* "Interconnecting Gold Islands with DNA Origami Nanotubes". *Nano Letters* 10 (2010), s. 5065–5069. DOI: 10.1021/nl1033073.
- [119] H. Liu ja D. Liu. "DNA nanomachines and their functional evolution". *Chemical Communications* (2009), s. 2625–2636. DOI: 10.1039/b822719e.
- [120] M. von Delius ja D. A. Leigh. "Walking molecules". *Chemical Society Reviews* 40 (2011), s. 3656–3676. DOI: 10.1039/c1cs15005g.
- [121] A. Chrastina, K. A. Massey ja J. E. Schnitzer. "Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery". *Wiley Interdisciplinary Reviews* 3 (2011), s. 421–437. DOI: 10.1002/wnan.143.
- [122] J. A. Hubbell ja A. Chilkoti. "Nanomaterials for Drug Delivery". *Science* 337 (2012), s. 303–305. DOI: 10.1126/science.1219657.
- [123] S. D. Perrault ja W. M. Shih. "Virus-Inspired Membrane Encapsulation of DNA Nanostructures To Achieve In Vivo Stability". *ACS Nano* 8 (2014), s. 5132–5140. DOI: 10.1021/nm5011914.
- [124] C. E. Castro *et al.* "A primer to scaffolded DNA origami". *Nature Methods* 8 (2011), s. 221–229. DOI: 10.1038/nmeth.1570.

- [125] C. Lin *et al.* "Rolling Circle Enzymatic Replication of a Complex MultiCrossover DNA Nanostructure". *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007), s. 14475–14481. DOI: 10.1021/ja0760980.
- [126] C. Lin *et al.* "In vivo cloning of artificial DNA nanostructures". *PNAS* 105 (2008), s. 17626–17631. DOI: 10.1073/pnas.0805416105.
- [127] Z. Li *et al.* "A Replicable Tetrahedral Nanostructure Self-Assembled from a Single DNA Strand". *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009), s. 13093–13098. DOI: 10.1021/ja903768f.