

Aaro Viidanoja

PALLONUKLEIINIHAPOT GEENINSIIRROSSA

Kandidaatintyö
Tekniikan ja luonnontieteiden tiedekunta (ENS)
Tarkastaja: Elina Vuorimaa-Laukkanen
Elokuu 2022

TIIVISTELMÄ

Aaro Viidanoja: Pallonukleiinihapot geeninsiirrossa

Spherical nucleic acids in gene delivery

Kandidaatintyö

Tampereen yliopisto

Tekniikan ja luonnontieteiden TkK-tutkinto-ohjelma, ympäristö- ja energiatekniikka

Elokuu 2022

Geneettisten sairauksien hoito on haastavaa, koska niiden korjaaminen vaatisi solujen geenien toiminnan muuttamista. Geenit ovat kuitenkin suojassa solun sisässä, missä ne säätelevät solun toimintaa. Evoluution johdosta solu on kehittänyt monia suojamekanismeja estääkseen vieraiden geenien sisään pääsyn soluun, sillä pienetkin muutokset solun geneeissä ja toiminnassa voivat johtaa solun kuolemaan. Yksi näistä suojamekanismeista on solukalvo, joka ei päästä mitä tahansa lävitsensä. Se suojelee solua erityisesti vierasperäisiltä geneeilta, jotka voisivat muuttaa solun toimintaa. Geeninsiirto on tekniikka, jolla voidaan kuljettaa genejä ja muita aineita solukalvon lävitse solun sisään. Geeninsiirtomenetelmät voidaan jakaa biologisiin, fysikaalisiin ja kemiallisiin menetelmiin. Tässä työssä keskitytään yhteen kemialliseen geeninsiirtotekniikkaan, pallonukleiinihappoihin.

Pallonukleiinihapot muodostuvat kahdesta komponentista: nanopartikkeliytimeistä ja siihen sitoutuneesta tiheästä oligonuklotidivaipasta. Ydin voi olla mikä tahansa nanopartikkeli, ja se määrittää pallonukleiinihapon koon ja muodon. Pallonukleiinihappoja syntetisoidessa oligonukleotidejä adsorboituu ytimen pinnalle itsestään vain hyvin vähän. Suolakäsittely ja ultraäänen avulla oligonukleotidit sitoutuvat lähemmäksi toisiaan ytimen pinnalle, jolloin saadaan hyvin tiheä oligonukleotidivaippa. Syntetisoinnin jälkeen pallonukleiinihappoja voidaan karakterisoida monilla eri menetelmillä, kuten DLS-menetelmällä, elektroforeesilla sekä spektrofotometrisillä mittauksilla. Pallonukleiinihapot kulkeutuvat tehokkaasti solun sisään endosytoosilla tiheän oligonukleotidivaippansa ansiosta. Solun sisässä pallonukleiinihapot poistuvat endosytoosisissa syntyneestä endosomitista ja oligonukleotidivaippa vapauttaa geenit ja muut funktionaaliset ryhmät solulimaan, jolloin ne alkavat ilmentää itseään.

Vastaavien kemiallisten geeninsiirtomenetelmien vertailussa tärkeimmäksi ominaisuudeksi osoitettiin tehokas solusisäänotto. Vertailu osoitti, että pallonukleiinihapot pääsevät kaikkein tehokkaimmin solun sisään. Pallonukleiinihappoilla on runsaasti potentiaalia geeninsiirtomenetelmänä, mutta asia vaatii vielä tutkimusta optimaalisen ytimen ja funktionaalisten ryhmien löytämiseksi.

Avainsanat: geeninsiirto, pallonukleiinihappo, nanopartikkeli, oligonukleotidi

Tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -ohjelmalla.

SISÄLLYSLUETTELO

1.	Johdanto	1
2.	Pallonukleiinihapot	3
2.1	Pallonukleiinihappojen rakenne	3
2.2	Pallonukleiinihappojen syntetisointi	6
2.3	Pallonukleiinihappojen karakterisointi	8
3.	Toiminta solussa	13
3.1	Solun sisäänotto	13
3.2	Pallonukleiinihappojen toiminta solun sisässä	14
3.3	Immuunivaste ja sytotoksisuus	15
4.	Vertailua vastaavien kemiallisten geeninsiirtotekniikoiden kanssa	17
4.1	Muut kemialliset geeninsiirtotekniikat	17
4.2	Kemiallisten geeninsiirtomenetelmien vertailua	20
5.	Johtopäätökset	22
	Lähteet	24

LYHENTEET JA MERKINNÄT

AuNP	kultananopartikkeli
AuSNA	kultananopartikkeli pallonukleiinihappo
d_H	hydrodynaaminen halkaisija, halkaisija vedessä
DLS	dynaaminen valonsirontamenetelmä (engl. dynamic light scattering)
DNA	deoksiribonukleiinihappo (engl. deoxyribonucleic acid)
ds-	kaksisäikeinen (engl. double-stranded)
LNP	liposominanopartikkeli
LSNA	liposomi pallonukleiinihappo
miRNA	mikro-RNA
mRNA	lähetti-RNA, (engl. messenger RNA)
NP	nanopartikkeli
PAGE	polyakryyli geeli elektroforeesi
RNA	ribonukleiinihappo (engl. ribonucleic acid)
siRNA	pieni häiritsevä RNA (engl. small interfering RNA)
SNA	pallonukleiinihappo, (engl. spherical nucleic acid)
ss-	yksisäikeinen (engl. single-stranded)
ζ	zeta-potentiaali

1. JOHDANTO

Geenien mutaatioista tai häiriöistä johtuvat sairaudet ovat olleet jo pitkään monen tieteenalan tutkimuksen kohteena. Uusia hoitoja ja diagnosointikeinoja kehitellään ja tutkitaan jatkuvasti. Joidenkin sairauksien aiheuttajia voidaan tunnistaa jo suoraan geeneistä ja virheellisten geenien vaimentamiseen tai korjaamiseen on keksitty myös keinoja. Esimerkki yhdestä geenihäiriötilanteesta on mutaatio solun geenin kasvunsäätelyalueella. Tämä voi johtaa hallitsemattomaan solukasvuun eli kasvaimeen, ja pahalaatuudessa tapauksessa syöpään. Yksi tapa syövän kasvamisen estämiseksi olisi kuljettaa sairaaseen soluun geeni, joka estäisi tai rajoittaisi solun virheellisen kasvualuetta säätelevän kohdan toimintaa, jolloin myös kasvu pysähtyy tai hidastuu. Tähän liittyy kuitenkin useita haasteita, joista yksi on "korjaavan"geenin kuljettaminen kohdesolujen luo ja sisään. Solukalvo ylläpitää solun tasapainoa eli homeostasiaa. Solukalvon tehtävänä päästää haluttuja aineita sisään ja jättää muut aineet solun ulkopuolelle. Solu kokee kaikki ulkoiset geenit uhkana sen toiminnalle, koska ne voisivat muuttaa sen toimintaa eli se pyrkii pitämään ne ulkona. Geeninsiirto antaa vastauksia geenin kuljettamiseen liittyvään ongelmaan. [1, 2]

Geeninsiirrolla tarkoitetaan tekniikoita, joilla geenejä voidaan siirtää solun sisälle. Siirrettävät geenit voivat olla luonnollisia tai synteettisiä, ja ne ovat yleensä vieraita solun omille geeneille. Geeninsiirtomenetelmät voidaan jakaa biologisiin, fyysisiin ja kemiallisiin menetelmiin. Biologiset menetelmät käyttävät yleensä luonnollisia biologisia kuljettimia, joita ovat muun muassa virusvektorit ja bakteerit. Fyysiset menetelmät hyödyntävät erilaisia fysikaalisia voimia perimän siirtämiseksi solun sisään. Esimerkiksi elektroporaatio hyödyntää sähkövoimaa, mikroinjektiot hyödyntävät männän aiheuttaman paineen voimaa ja geenipyssyllä kirjaimellisesti ammutaan geeni solun sisälle. Kemialliset menetelmät taas hyödyntävät synteettisiä ja luonnollisia molekyyilejä geenin siirtämiseksi solukalvon läpi. Erilaisia kemiallisia menetelmiä ovat muun muassa liposomit, kalsiumfosfaatti ja erilaiset nanopartikkelikuljettimet. [2]

Tässä työssä keskitytään yhteen kemialliseen geeninsiirtomenetelmään, pallonukleiinihappoihin. Pallonukleiinihapot kuuluvat nanopartikkelikuljettimiin, sillä ne koostuvat nanopartikkeliytimeistä ja siihen kiinnittyneestä tiheästä oligonukleotidivaipasta [3]. Pallonukleiinihappoja on monia erilaisia, koska ytimet ja oligonukleotidivaipat voivat olla erilaisia, ja siten myös niiden ominaisuudet ja valmistusmenetelmät poikkeavat toisistaan. Pallonukleiinihappojen on todettu kulkeutuvan tehokkaasti solun sisään ja niillä on hyvin

pieni immuunivaste [4].

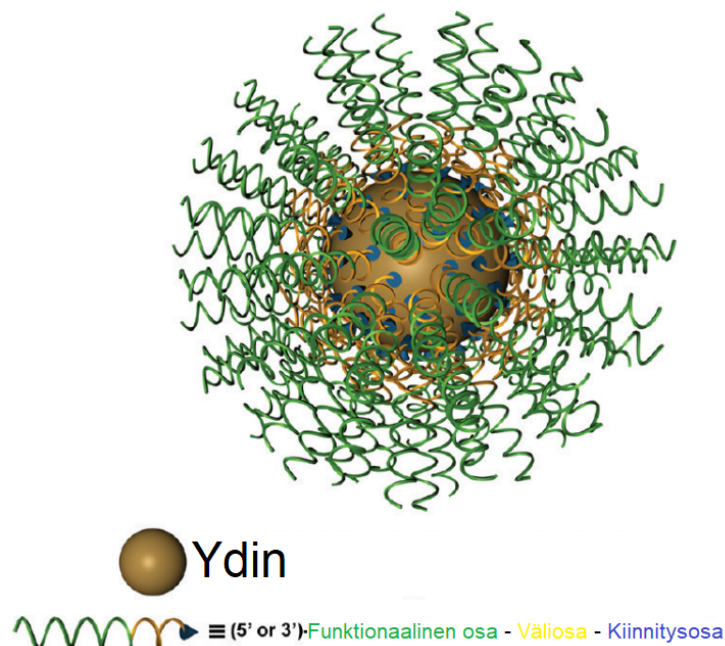
Työn tavoitteena on selvittää pallonukleiinihappojen rakennetta tarkemmin sekä miten niitä valmistetaan, miten ne toimivat solu ympäristössä ja kuinka merkittäviä ne ovat geeninsiirtomenetelmänä. Työn toisessa luvussa käydään läpi pallonukleiinihappojen perusrakenne sekä niiden syntetisointi- ja karakterisointimenetelmät ja käyttökohteet. Kolmannessa luvussa käydään läpi miten pallonukleiinihapot pääsevät solun sisään ja miten ne toimivat solun sisällä. Neljännessä luvussa pallonukleiinihappoa vertaillaan vastaaviin kemiallisiin geeninsiirtomenetelmiin. Työn viimeisessä luvussa kootaan työn johtopäätökset ja pohditaan, onko pallonukleiinihapolla merkittävää potentiaalia geeninsiirtomenetelmänä.

2. PALLONUKLEIINIhapot

Tässä luvussa esitetään pallonukleiinihappojen rakenne, sekä miten niitä syntetisoidaan ja karakterisoidaan. Lisäksi luvun lopussa käsitellään myös pallonukleiinihappojen käyttökohteita.

2.1 Pallonukleiinihappojen rakenne

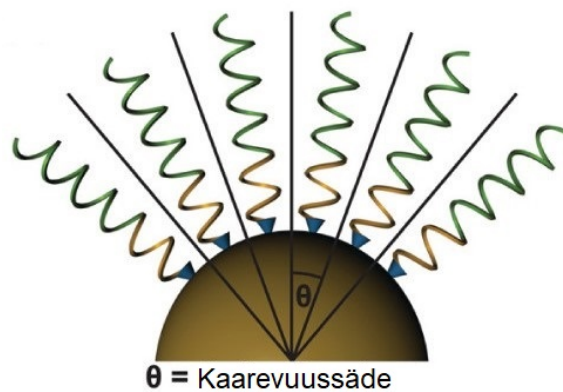
Pallonukleiinihapot (spherical nucleic acid, SNA) muodostuvat kahdesta komponentista: (1) nanopartikkeli ytimestä, jonka ympärille on kiinnitetty (2) tiiviisti pakkautunut oligonukleotidivaippa [5]. Kuvassa 2.1 on esitetty pallonukleiinihapon perusrakenne. Sisimpänä kullan värisenä näkyy ydin ja sen ympärillä sini-kelta-vihreänä oligonukleotidivaippa.



Kuva 2.1. Pallonukleiinihapon perusrakenne. Ytimen ympärillä olevat oligonukleotidit muodostuvat funktionaalisesta osasta (vihreä), väliosasta (keltainen) ja kiinnitysosasta (sininen). Kuva muokattu lähteestä [3].

Ydin määrittelee suoraan pallonukleiinihapon muodon, koon, fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet [3, 6]. Lisäksi ydin toimii rakennusaluksena oligonukleotidivaipalle ja sen

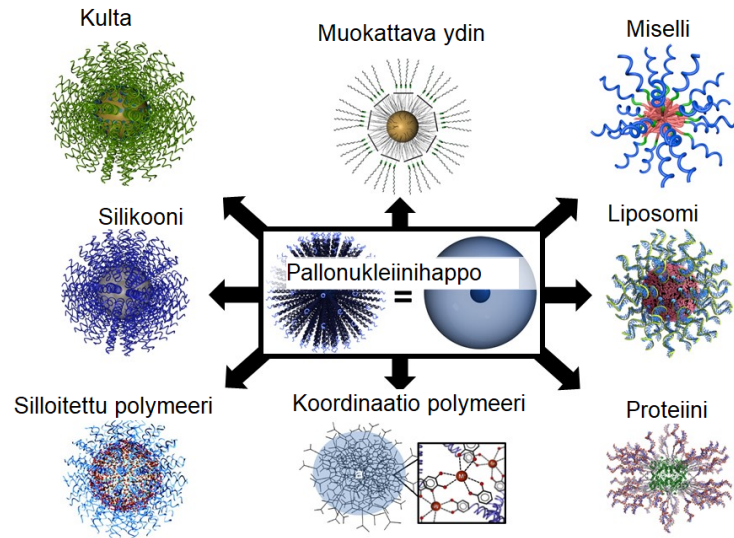
muoto ja koko vaikuttavat vaipan oligonukleotidien maksimitiheyteen. Pieni pallonmuotoinen ydin mahdollistaa maksimaalisen oligonukleotidivaippatiheyden. Pienempi koko mahdollistaa suuremman kaarvuussäteen, jolloin oligonukleotidit pääsevät sitoutumaan ytimeen lähemmäksi toisiaan. Tämä johtuu siitä, että oligonukleotidien funktionaalisilla osilla on enemmän tilaa, jolloin hylkivät voimat ovat pienemmät. Paloimaisille 10 nm halkaisijaltaan oleville kultananopartikkelytimille mahtuu noin $2,0 \times 10^{13}$ oligonukleotidia/cm², kun saman pinta-alan omaavalle tasomaiselle ytimelle mahtuu noin $5,8 \times 10^{12}$ oligonukleotidia/cm². [1, 3] Kuva 2.2 havainnollistaa kaarevuussäteen vaikutusta oligonukleotidien uloimpien osien tilan lisääntymiseen.



Kuva 2.2. Ytimen kaarevuussäde. Suurempi kaarevuussäde mahdollistaa suuremman tilan oligonukleotidien uloimmille osille. Kuva muokattu lähteestä [3]

Ydin voi olla mikä tahansa nanopartikkeli ja ne voidaan luokitella epäorgaanisiin ja orgaanisiin ytimiin. Epäorgaaniset ytimet ovat hyvin laajasti käytettyjä nanopartikkeleita pallonukleiinihappojen valmistuksessa. Yleisimpiä käytettyjä epäorgaanisia ytimiä ovat erilaiset metalliytimet (muun muassa kulta, hopea, platina, alumiini, palladium, kupari, koboltti, indium, nikkeli ja näiden erilaisia sekoituksia), metallioksidit ja erilaiset hiilivalmisteet (esimerkiksi fullereeni, nanoputket ja säikeet) [6, 7]. Näistä eniten lääketieteessä käytetty ja tutkittu on kultananopartikkeli (AuNP). Chad Mirkin tutkimusryhmineen esitti ensimmäisen pallonukleiinihapon vuonna 1996. Tämän pallonukleiinihapon ytimenä oli AuNP ja vaipan oligonukleotidit olivat yksisäikeisiä DNA pätkiä [8]. Vaikka epäorgaanisia metalliytimiä käytetään edelleen laajasti pallonukleiinihappojen valmistuksessa, ne ovat usein solulle myrkyllisiä eli sytotoksisia [9].

Tavoitteena olisi löytää ydin vaihtoehtoja, joilla olisi mahdollisimman minimaaliset haittavaikutukset ihmiskehossa. Epäorgaanisten ytimien myrkyllisyysriskistä johtuen biohajoavia ja bioyhenteensopivia orgaanisia ytimiä on myös kehitetty ja tutkittu. Erilaisia orgaanisia ytimiä ovat muun muassa liposomit, misellit, proteiinit, polymeerit (esimerkiksi poly(laktidiko-glykoli)happo eli PLGA [10]) sekä erilaiset makromolekyylit. [6] Kuvassa 2.3 on esitetty eri ytimisiä pallonukleiinihappoja. Kuva havainnollistaa erilaisten ytimien vaikutukset pallonukleiinihapon muotoon.



Kuva 2.3. Eri ytimisiä pallonukleiinihappoja. Vasemmalta oikealle, ylhäältä alas edeten: Kulta, Yleisiä ydintyyppejä, Miselli, Silikooni, keskellä pallonukleiinihappo, Liposomi, Silloitettu polymeeri, Koordinaatio polymeeri, proteiini. Kuva muokattu lähteestä [5].

Taulukossa 2.1 on esitetty muutama esimerkki epäorgaanisten ja orgaanisten ytimien eduista ja haasteista. Epäorgaanisia ytimiä yhdistää helppo syntetisointi, mutta ne ovat pitkäkestoisessa altistuksessa sytotoksisia. Orgaaniset ytimet ovat bioyhteensopivia, mutta ne eivät ole yhtä vakaita kuin epäorgaaniset ytimet.

Taulukko 2.1. Pallonukleiinihappoytimien etuja ja haasteita. Taulukko on muokattu lähteestä [6].

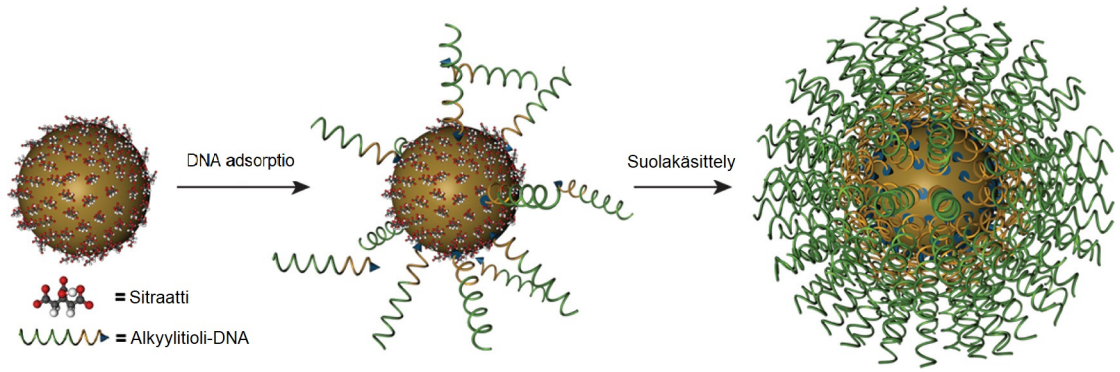
Ydintyyppi	Edut	Haasteet
Kulta	Helppo syntetisoida, halkaisijaa helppo säädellä, optiset ominaisuudet	Pitkäkestoisessa altistuksessa sytotoksinen, pieni immuunivaste
Hopea	Antimikrobiaaliset ominaisuudet, sähkönjohtaminen, optiset ominaisuudet	Pitkäkestoisessa altistuksessa sytotoksinen, pieni immuunivaste
Liposomi	Helppo valmistaa, bioyhteensopivuus, kemiallisesti helposti muokattavissa, pystyy kuljettamaan suuria määriä lääkainetta	Huono liukoisuus, epävakaa, hajoaa nopeasti
Proteiini	Biohajoavuus ja bioyhteensopivuus, kulkeutuu solunsisällä hyvin, monia eri syntetisointi tapoja	Hidas valmistaa suuria määriä, herkkä lämpötilamuutoksille
PLGA	Biohajoavuus ja bioyhteensopivuus, helppo valmistaa, käytössä kliinisesti lääkeaine kuljettimena	Aggregoituminen endosytoosissa

Oligonukleotidit voivat olla yksi- (single-stranded, etuliite ss-) tai kaksisäikeisiä (double-stranded, etuliite ds-) DNA:ta tai RNA:ta. Ne muodostuvat kuvan 2.1 mukaisesti kolmesta osasta: kiinnitysosasta, välisosasta ja funktionaalisesta osasta. Jokaisella osalla on tärkeitä ominaisuuksia pallonukleiinihapon toiminnan kannalta. Vaipan sisin osa on kiinnitysosa ja sen tärkeimpänä funktiona on liittää oligonukleotidi ytimeen. Esimerkiksi oligonukleotidit adsorboituvat AuNP:seen kiinni kemisorptiolla eli tällöin sidostyyppi niiden välillä on kovalenttinen S–Au-sidos [11]. Väliosan tarkoituksena on estää vierekkäisten oligonukleotidien aggregaatiota. Oikeiden väliosien avulla voidaan parantaa vaipan joustavuutta, vakautta ja maksimaalista oligonukleotidi tiheyttä. [6] Mitä tiheämmin oligonukleotidit ovat pakkautuneet, sitä enemmän soluun voidaan viedä geenejä ja muita funktionaalisia ryhmiä. Ulkoisin osa oligonukleotideista on funktionaalinen osa, johon voidaan liittää siirrettäviä geenejä ja muita funktionaalisia ryhmiä, joita ovat esimerkiksi väriaineet, sammuttimet, solukohdennukseen tarvittavat ryhmät ja lääkeaineet. [3].

2.2 Pallonukleiinihappojen syntetisointi

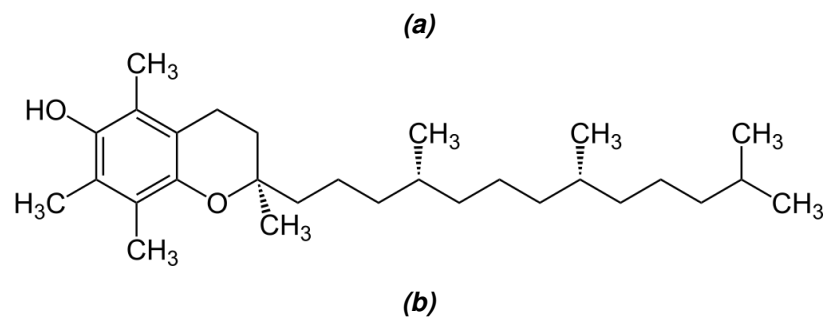
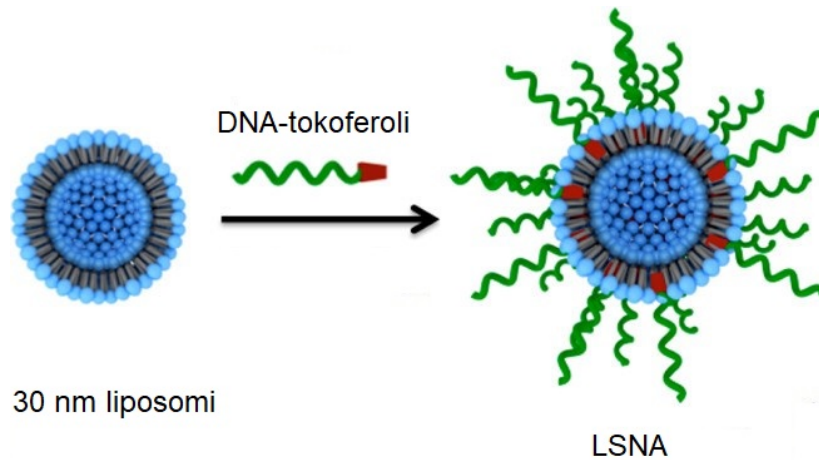
Ytimenä käytettävä nanopartikkeli valmistellaan lisäämällä sen pinnalle tarvittavia kiinnikkeitä, joihin oligonukleotidin kiinnitysosat voivat sitoutua. Syntetisointi menetelmät ovat hieman erilaiset nanopartikkelista ja oligonukleotideista riippuen. Tässä alaluvussa esitetään esimerkkinä AuNP ja liposominanopartikkelista (LNP) valmistetun pallonukleiinihapon syntetisointi menetelmät.

Yleensä AuNP:n pinnalle kiinnitetään sitraatti molekyylejä, johon oligonukleotidit liittyvät alkyylioli kiinnitysosallaan [3, 6]. Reaktio tehdään korkeakonsentraatioisessa natriumioniliuoksessa (0,15 M - 1,0 M), jotta maksimaalinen oligonukleotiditiheys voidaan saavuttaa. Tämä siksi, että oligonukleotidit ovat negatiivisesti varautuneita eli ne eivät voi pakkautua lähelle toisiaan hylkivien elektrostaattisten voimien takia. Jos reaktio tapahtuisi puhtaassa vesiliuoksessa, oligonukleotideja adsorboituisi vain vähän AuNP:n ympärille. Tätä on havainnollistettu kuvan 2.4 ensimmäisessä vaiheessa (DNA adsorptio). Suolaliuoksessa positiivisesti varautuneet natriumionit varjostavat hylkivää vaikutusta, jolloin oligonukleotidit sitoutuvat ytimeen tiheämmin. Kuvan 2.4 suolakäsittelyvaiheessa (engl. salt aging) havainnollistetaan suolakäsittelyn vaikutusta oligonukleotidien adsorboitumismäärään. Suolakäsittely vaihe etenee loppuun saakka noin 12 tunnissa. [3] Suolakäsittelyn lisäksi oligonukleotiditiheyden hallintaan voidaan myös hyödyntää nopeita alhaisen pH:n menetelmiä, jäädytys-lauhdutus syklejä ja ultraääntä [6, 12].



Kuva 2.4. Kultananopartikkeli pallonukleiinihapon syntetisointi. Kuva muokattu lähteestä [3]

Liposomipallonukleiinihappojen (LSNA) syntetisoinnissa oligonukleotidit ankkuroidaan liposomin kaksoislipidikerrokseen hydrofobisilla komponenteilla esimerkiksi kolesterolilla. Yleensä LSNA:n oligonukleotidien kiinnitysosana toimii α -tokoferoli (yksi E-vitamiinin muodoista). Kuva 2.5a havainnollistaa kuinka oligonukleotidit adsorboituvat liposomin kaksoislipidikerroksen pinnalle. Oligonukleotidin kiinnitysosaksi soveltuisivat myös monet muut hydrofobiset komponentit, mutta α -tokoferoli (esitetty kuvassa 2.5b) on yleisimmin käytetty, koska se on biohyteensopiva ja halpa valmistaa. [13]



Kuva 2.5. (a) Liposomipallonukleiinihapon syntetisointi ja (b) α -tokoferolin kemiallinen rakenne. Kuva 2.5a muokattu lähteestä [13].

2.3 Pallonukleiinihappojen karakterisointi

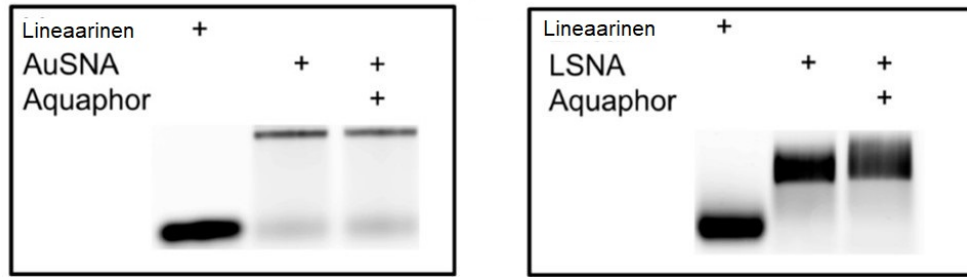
Karakterisoinnin tarkoituksena on selvittää halutun lopputuotteen laatu ja määrä. Lopputuotteen laatu saadaan selville käyttämällä kvalitatiivisia analyysimenetelmiä ja määrä vastaavasti käyttämällä kvantitatiivisia analyysimenetelmiä. Karakterisoinnissa selvitetään lopputuotteen fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia, joiden avulla voidaan tehdä johtopäätöksiä tuotteen saannosta. Tässä alaluvussa käsitellään vain fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien karakterisointia. Pallonukleiinihappojen kuljettaman geenin ilmentymistä käsitellään luvussa 3. Pallonukleiinihappoja karakterisoitaessa tutkittavia ominaisuuksia ovat stabiilius, koko, konsentraatio ja oligonukleotidivaipan tiheys [9].

Pallonukleiinihapot ovat hyvin negatiivisesti varautuneita tiheän oligonukleotidivaipan ansiosta, jolloin liuoksessa olevat positiivisesti varautuneet ionit (yleensä Na^+) sitoutuvat kerrokseksi pallonukleiinihapon oligonukleotidien läheisyyteen. Tätä kerrosta kutsutaan Sternin kerrokseksi. Sternin kerroksen päälle sitoutuu löyhästi toinen kerros negatiivisesti ja positiivisesti varautuneita ioneja. Sternin kerroksen ja löyhästi sitoutuneen ioni kerroksen kokonaisuutta kutsutaan sähköiseksi kaksoiskerrokseksi. Kun pallonukleiinihappo liikkuu, uloimman kerroksen löyhästi sitoutuneiden ionien ja liuoksessa olevien muiden ionien välille muodostuu potentiaali ero. Tätä elektrostaattista potentiaalia uloimman kerroksen ja liuoksen ionien välillä kutsutaan zeta-potentiaaliksi ζ . Zeta-potentiaali antaa suuntaa antavan arvion partikkelin stabiiliudesta kolloidisessa dispersiossa. Tämän ilmiön raja-arvoja on esitetty taulukossa 2.2. Mitä lähempänä partikkelin ζ arvo on 0 mV, sitä epästabiilimpi se on.

Taulukko 2.2. Partikkelin stabiilius kolloidisessa dispersiossa zeta-potentiaalin (mV) mukaan. [14]

Zeta-potentiaali (mV)	Stabiilius
$\pm 0-10$	Hyvin epästabiili
$\pm 10-20$	Melko epästabiili
$\pm 20-30$	Melko stabiili
yli/alle ± 30	Hyvin stabiili

Zeta-potentiaalia voidaan mitata elektroforeettisen siirtymän U_E avulla. [15] Elektroforeesissa tutkitaan partikkelin liikkumista liuoksen suhteen sähkökentän vaikutuksen alaisena. Geelielektroforeesissa partikkelit kulkevat agarosi tai muussa vastaavassa geelissä. Liikkeen määrä voidaan mitata suoraan geelistä. Kuvassa 2.6 on esitetty kultananopartikkeli ja liposomi pallonukleiinihappojen elektroforeesi tulokset. [14, 15]



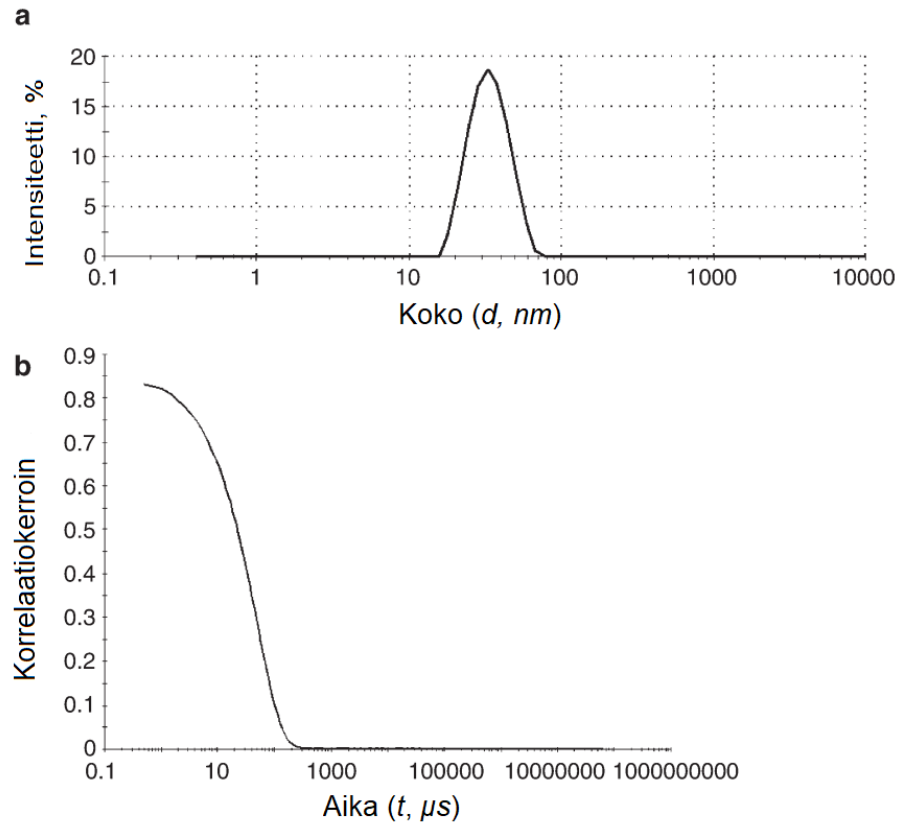
Kuva 2.6. Geelielektroforeesi kultananopartikkeli (vasen) ja liposomi (oikea) pallonukleiinihapoille. '+'-merkintä tarkoittaa eri aineen läsnäoloa sarakkeessa. Mittaus suoritettiin vapaalle oligonukleotidille (lineaarinen), pallonukleiinihapolle (AuSNA ja LSNA) sekä pallonukleiinihapon ja Aquaphor ihovoiteen sekoitukselle. Kuvan pallonukleiinihappoja käytettiin ihon arpien tutkimuksessa ja niiden stabiiliutta testattiin Aquaphor ihovoiteessa. Kuva muokattu lähteestä [16].

Kun elektroforeettinen siirtymä tunnetaan, voidaan laskea zeta-potentiaali z Henryn funktion avulla:

$$z = \frac{U_E 3\eta}{2\varepsilon f(\kappa a)} \quad (2.1)$$

jossa η on geelin viskositeetti, ε on väliaineen permittiivisyys ja $f(\kappa a)$ on Henryn funktio. Henryn funktion parametri κ kuvaa sähköisen kaksoiskerroksen paksuutta ja a pallonukleiinihapon halkaisijaa. Kun sähköisen kaksoiskerroksen paksuus on huomattavasti pienempi partikkelin halkaisijaan nähden ja liuoksen suolapitoisuus on suuri, voidaan tehdä Smoluchowski approksimaatio $f(\kappa a) \approx 1,5$. Kun taas sähköisen kaksoiskerroksen paksuus on suurempi kuin partikkelin halkaisija ja liuoksen suolapitoisuus on pieni, voidaan tehdä Hückelin approksimaatio $f(\kappa a) \approx 1,0$. [14, 15] Kuvan 2.6 tuloksista kultapallonukleiinihapon zeta-potentiaaliksi saatiin $z(\text{AuSNA}) = -8,8 \pm 0,5$ mV ja liposomipallonukleiinihapon zeta-potentiaaliksi $z(\text{LSNA}) = -11,6 \pm 0,8$ mV.

Pallonukleiinihappojen koon karakterisointi on hankalaa, koska pallonukleiinihapot ovat hyvin pieniä. Nanopartikkelien hydrodynaamista kokoa, eli kokoa vedessä, voidaan mitata dynaamisella valonsirontamenetelmällä (DLS, dynamic light scattering). DLS-menetelmässä nanopartikkeliä sisältävää vesiliuosta valaistaan monokromaattisella valolla ja liuoksesta siroavan valon intensiteettiä mitataan tiettyssä kulmassa. Sironneen valon intensiteetti on aikariippuvainen mikrosekunti skaalalla, koska nanopartikkelit liikkuvat satunnaisesti liuoksessa. Tätä liikettä kutsutaan Brownin liikkeeksi. Mikrosekunti aikaskaalalla intensiteetti muutokset kuvaavat nanoapartikkelien diffuusionopeutta. Intensiteetti muutokset mitataan autokorrelaation avulla, jossa intensiteetti mitataan ajassa t ja sitä verrataan itseensä ajassa $t + \tau$, jossa τ on korrelaatio viive. Tämä prosessi toistetaan eri τ arvoilla, jolloin saadaan korrelaatiofunktio, joka voidaan esittää graafisesti.



Kuva 2.7. Kokojakauma intensiteetin mukaan (a) ja korrelaatiokäyrä (b) kultananopartikkelille, joiden halkaisija on 30 nm. Muokattu lähteestä [15].

Korrelaatiofunktion vaimenemisesta voidaan laskea diffuusionopeus D yhtälöllä:

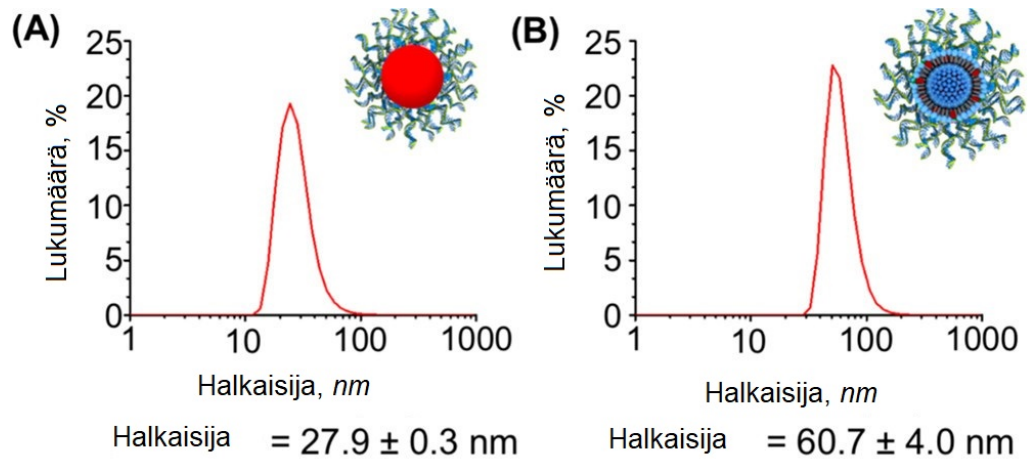
$$\Gamma = q^2 D \quad (2.2)$$

jossa Γ on korrelaatiofunktion eksponentiaalinen vaimenemisnopeus ja q on siroutuneen valon aaltovektorin normi. q riippuu sirontakulmasta ja valon aallonpituudesta. Pallonukleihin hapon pinnalle sitoutuneiden ionikerroksien takia havaittu hydrodynaaminen halkaisija on pallonukleihin hapon todellista halkaisijaa suurempi. Kun D tiedetään, nanopartikkelin d_H voidaan laskea Stokes-Einstein yhtälöllä:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (2.3)$$

jossa k on Boltzmannin vakio, T on absoluuttinen lämpötila ja η on viskositeetti. Yhtälön 2.3 d_H kuvaa vastaavan teoreettisen kiinteän pallon halkaisijaa, joka diffundoituu samalla nopeudella. [15] Liuoksessa olevien nanopartikkelien kokojakauma johtuu epätäydellisestä syntetisoinnista ja luonnollisista rakenneosien värähtelyistä. Hydrodynaamista halkaisijaa voidaan myös tulkita suoraan kokojakaumasta, mutta tarkkoja tuloksia varten autokorrelaatio menetelmää täytyy käyttää. Kuvassa 2.8 on esitetty kultananopartikkeli ja

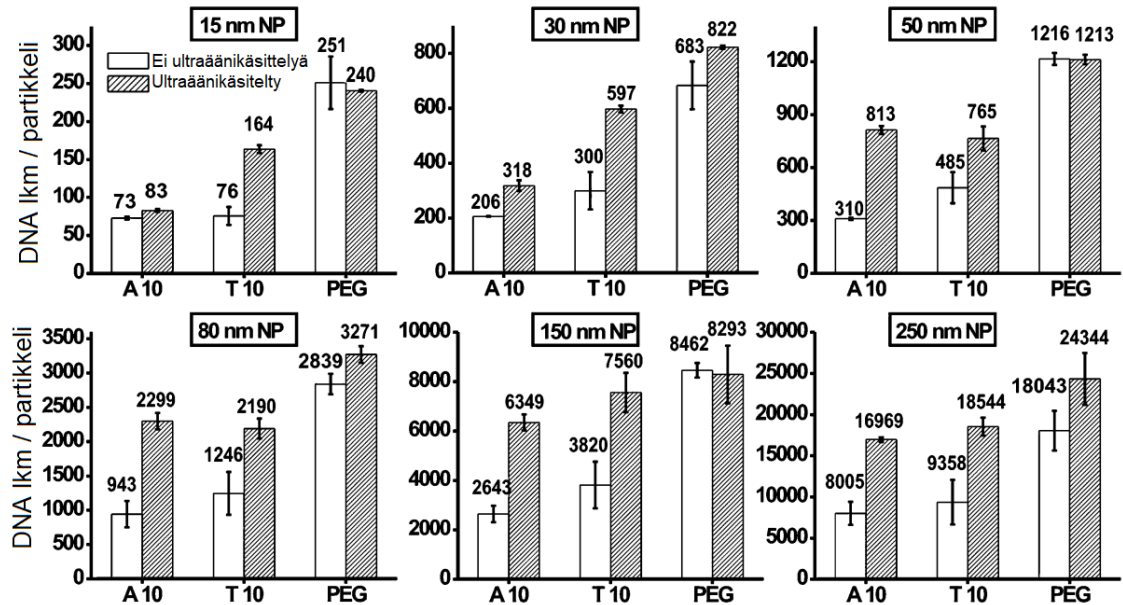
liposomi pallonukleiinihappojen DLS-menetelmällä saadut kokojakaumat.



Kuva 2.8. Kulta (A) ja liposomi (B) pallonukleiinihappojen hydrodynaamisen säteen karakterisointi DLS-menetelmällä. Kultananopartikkelin halkaisija oli noin 13 nm ja liposomin halkaisija noin 45 nm. Liposomissa käytetyt lipidimonomeerit olivat 1,2-dioleoyyli-sn-glysero-3-fosfokoliini (DOPC) Käytetyt oligonukleotidit olivat antisense-RNA:ta, jotka esitivät yhden ihon arpeutumista aiheuttavan proteiinin (TGF- β 1) synteessin. Kuva muokattu lähteestä [16].

Pallonukleiinihappojen konsentraatio ja oligonukleotidivaipan tiheys saadaan selville spektrofotometrisillä mittauksilla. Pallonukleiinihapon konsentraatio liuoksessa saadaan selville absorbanssin avulla. Lambert-Beerin lain mukaan absorbanssi on suoraan verrannollinen absorboivan aineen konsentraation kanssa. Tutkittavan aineen absorbanssia verrataan puhtaan aineen kalibraatiokäyrään, jolloin tutkittavan aineen konsentraatio saadaan selville. Epäorgaanisilla metallytimillä on niille ominaiset absorptiospektrit, jolloin niiden karakterisointi on helppoa. Oligonukleotidivaipan tiheys saadaan selville vertaamalla ytimien konsentraatiota niihin kiinnitettyjen oligonukleotidien konsentraatioon. Ytimien konsentraatio on sama kuin pallonukleiinihappojen konsentraatio. Jotta oligonukleotidien konsentraatio saadaan selville, ne täytyy irrottaa ytimestä. Esimerkiksi AuSNA:iden tapauksessa oligonukleotidit voidaan irrottaa ytimestä ditiotreitolilla (DTT). Tämä voidaan tehdä pienelle otokselle lopputuotteesta. Tämä menetelmä vaatii, että oligonukleotideihin on alunperin liitetty jokin fluoresoiva osa. Puhtaille fluoresoiville oligonukleotideille määritetään fluoresenssin kalibraatiokäyrä, johon tutkittavan näytteen fluoresenssia verrataan ja näin oligonukleotidien konsentraatio saadaan määritettyä. [12, 17] Kuvassa 2.9 on esitetty kultananopartikkelin koon ja oligonukleotidin välisän vaikutusta adsorboituvien oligonukleotidien määrään. Lisäksi kuvassa havainnollistetaan ultraäänikäsittelyn vaikutusta oligonukleotidien määrään. Polyetyleeniglykolilla (PEG) saatiin eniten DNA:ta per partikkeli, tymiinillä toiseksi eniten ja adeniinilla vähiten. Ultraäänien käytöllä havaittiin olevan positiivinen vaikutus adsorboituvien oligonukleotidien määrään, kun käytössä on adeniini tai tymiini välisat. PEG:llä ultraääni ei keskimäärin vaikuta adsorboituvien oligonukleotidien määrään. Ultraääni vähentää oligonukleotidien emästen vuorovaikutusta

AuNP:n kanssa, jolloin oligonukleotidin kiinnitysosan alkyyliliolit pääsevät vapaammin sioutumaan AuNP:n pinnalle. [12]



Kuva 2.9. Oligonukleotidien adsorboitumismäärät erikokoisille kultananopartikkeleille. Oligonukleotidien väliosana on 10 adeniinia (A10), 10 tymiiniä (T10) ja polyetyleeniglykolia (PEG). Ultraäänen käytöllä saadaan keskimäärin tiheämpi oligonukleotidivaippa. Kuva muokattu lähteestä [12].

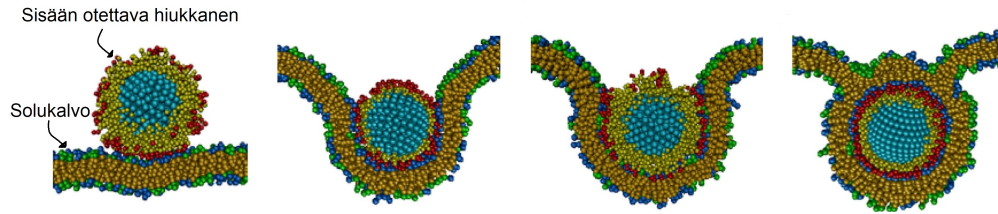
3. TOIMINTA SOLUSSA

Tässä luvussa esitetään kuinka pallonukleiinihapot pääsevät solun sisään ja miten ne toimivat solun sisässä. Luvun lopussa käsitellään myös miten immuunipuolustus käsittelee pallonukleiinihappoja ja selvitetään pallonukleiinihappojen myrkyllisyyttä.

3.1 Solun sisäänotto

Solukalvon ulko- ja sisäpuolen välillä vallitsee potentiaaliero, jota kutsutaan membraanipotentialiksi. Membraanipotentiali on solun toiminnan kannalta elintärkeä, sillä se mahdollistaa monen kalvoproteiinin toiminnan. Lisäksi se mahdollistaa hermo- ja lihassolujen toiminnan. Normaalitylanteessa solun sisäpuoli on negatiivisesti varautunut solun ulkopuoleen verrattuna. Membraanipotentiali johtuu solukalvon pinnalla olevien ionipumppujen ja -kanavien toiminnasta. Tämän potentiaalieron takia negatiivisesti varautuneet molekyylit eivät normaalisti pääse passiivisesti solun sisään. Negatiivisesti varautuneet oligonukleotidit tarvitsevat siis jonkinlaisen kuljettimen päästäkseen solut sisälle, sekä suojautuakseen entsymaatiselta hajoamiselta ja immuunipuolustusjärjestelmältä. Mahdollisimman stabiilin järjestelmän saavuttamiseksi negatiivisen oligonukleotidin kuljettimeksi tarvitaan siis yleensä positiivisesti varautunut kuljetinjärjestelmä. Positiivisesti varautuneet kuljetinjärjestelmät ovat yleensä sytotoksisia eli solulle myrkyllisiä [1].

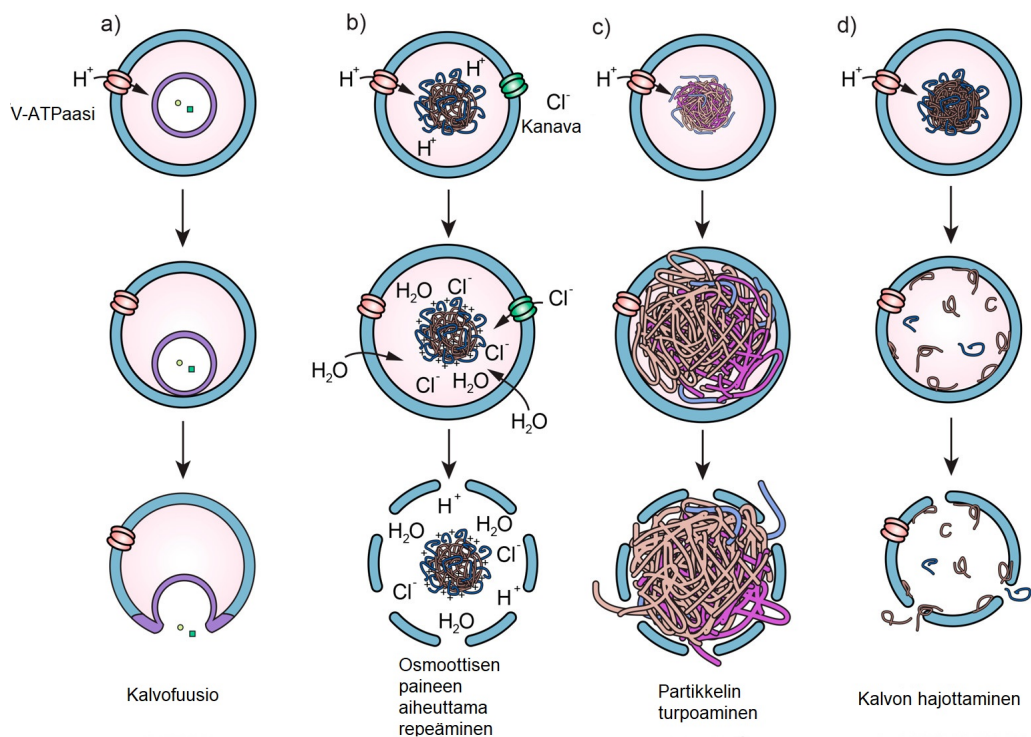
Pallonukleiinihapot ovat hyvin negatiivisesti varautuneita tiheän oligonukleotidivaippansa ansiosta [3]. On kuitenkin osoitettu, että pallonukleiinihapot pääsevät tehokkaasti solukalvon läpi ilman erillistä kuljetinjärjestelmää [4]. Tämän on todistettu johtuvan oligonukleotidivaipan tiheydestä. Suurempi tiheys johtaa tehokkaampaan solu sisäänottoon [18]. Pallonukleiinihapon oligonukleotidit tarttuvat solukalvon pintaproteiiniin ja sen aktivoituessa pallonukleiinihappo viedään solun sisään endosytoosilla. Tällöin pallonukleiinihappo on solun sisässä solukalvosta kuroutuneen rakkulan, endosomin, sisässä. Kuvassa 3.1 on esitetty endosytoosin eteneminen. Lopuksi solukalvon eri puolet yhdistyvät partikkelin sisältävän rakkulan yläpuolella. Kun solukalvo on taas kuroutunut kiinni, rakkulasta tulee endosomi. [19]



Kuva 3.1. Endosytoosin eteneminen. Kuva muokattu lähteestä [19].

3.2 Pallonukleiinihappojen toiminta solun sisässä

Pallonukleiinihapon siirtämät geenit eivät pysty toimimaan endosomin sisällä halutulla tavalla, joten sen täytyy päästä endosomista sytoplasmaan. Endosomista poistumiselle on useita eri reittejä, joita on esitetty kuvassa 3.2. Pallonukleiinihapot hyödyntävät näistä (b) osmoottisen paineen aiheuttamaa repeämistä ja (d) kalvon hajoittamista. Sytoplasmassa pallonukleiinihapon oligonukleotidivaipan funktionaaliseen osaan liitetyt geenit ja muut funktionaaliset ryhmät pääsevät vapaaksi solulimaan. [3, 20]

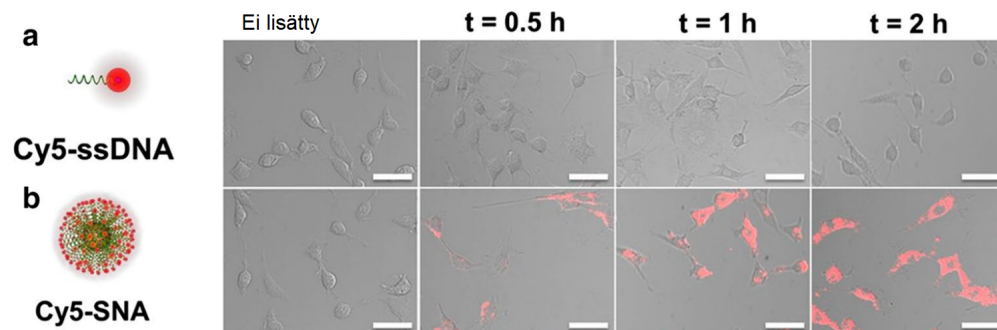


Kuva 3.2. Eri mekanismeja endosomista poistumiselle. (a) kalvofuusio, (b) osmoottisen paineen aiheuttama repeäminen, (c) partikkelin turpoaminen ja (d) kalvon hajottaminen. Kuva muokattu lähteestä [20].

Geeninsiirron toiminnan tavoitteet voidaan jakaa kolmeen osa-alueeseen, geenin hiljentämiseen, korvaamiseen (plasmidit ja virusvektorit) ja muokkaukseen (TALEN ja CRISPR) [2]. Pallonukleiinihapoilla siirretyt geenit ovat yleensä hiljentäviä, koska geenin korvauksessa ja muokkauksessa siirrettävät rakenteet ovat niin suuria, että niitä ei voi tehokkaasti siirtää pallonukleiinihappojen avulla. Hiljentävillä geneilla voidaan estää virheelli-

sen geenin toiminta häiritsemällä sen lähetti-RNA:n (messenger RNA, mRNA) toimintaa. Pallonukleiinihappoilla käytetään yleensä kahta eri hiljentävää geenityyppiä, mikro-RNA (miRNA) ja pieni häiritsevä RNA (small interfering RNA, siRNA). miRNA sitoutuu kohde mRNA:han ja estää sen toiminnan, kun taas siRNA sitoutuu kohde mRNA:han ja pilkkoo sen pieniksi palasiksi. Hiljentävien geenien toiminnasta voidaan varmistua polyakryyli geeli elektroforeesi (PAGE) analyysin avulla. PAGE:n avulla voidaan erotella proteiineja ja nukleiinihappoja. Kun tiedetään minkä geenin toimintaa halutaan rajoittaa, voidaan tarkastella solun tuottamien proteiinien määrää ennen pallonukleiinihappojen lisäämistä ja lisäämisen jälkeen.

Kuten luvussa 2 on mainittu, siirrettävien geenien lisäksi oligonukleotidivaippaan pystytään liittämään muitakin funktionaalisia ryhmiä. Väriaineilla voidaan seurata pallonukleiinihappojen kulkeutumista solu ympäristössä. Tällöin voidaan selvittää kuinka paljon pallonukleiinihappoja on kulkeutunut solun sisään ja varmistaa, että ne kulkeutuvat oikeaan solutyypiin. Voidaan myös käyttää väriaineita, jotka fluoresoivat sitoutuessaan johonkin tiettyyn aineeseen. Tällöin voidaan havaita onko solussa tiettyä ainetta. Väriaineet voidaan havaita fluoresenssimikroskoopilla. Kuvassa 3.3 on esitetty kuinka vapaa oligonukleotidi ei pääse solun sisään, mutta pallonukleiinihapolla kuljetettu sama oligonukleotidi pääsee. Kuvasta huomaa solusisäännoton eron selkeästi. Cy5-väriaine fluoresoi solun sisässä ja fluoresenssi voidaan havaita konfokaalimikroskoopin avulla. [21]



Kuva 3.3. Vapaana (a) ja pallonukleiinihapolla (b) kuljetettu Cy5-väriaineella leimatun yksisäikeisen DNA:n solusisäännotto. Huomataan, että vapaa DNA ei kulkeudu solun sisälle lainkaan. Punaisella esitetty Cy5:n fluoresenssi on kuvattu konfokaalimikroskoopilla. Kuva muokattu lähteestä [21].

3.3 Immuunivaste ja sytotoksisuus

Evoluutio on kehittänyt solujen puolustuskykyä ulkoisia uhkia vastaan, jotta eliöllä olisi parempi mahdollisuus selvitä erilaisissa ympäristöissä. Geeninsiirron yksi suurimmista haasteista onkin luoda keino viedä solulle vierasta geeniä riittävästi solun sisään ehjänä ja ilman immuunivasteen laukaisua. Vapaat nukleiinihapot pilkkotaan nukleaasientsyymien toimesta hyvin nopeasti soluvälitilassa ja solulimassa. Siirrettävät geenit ovat yleensä

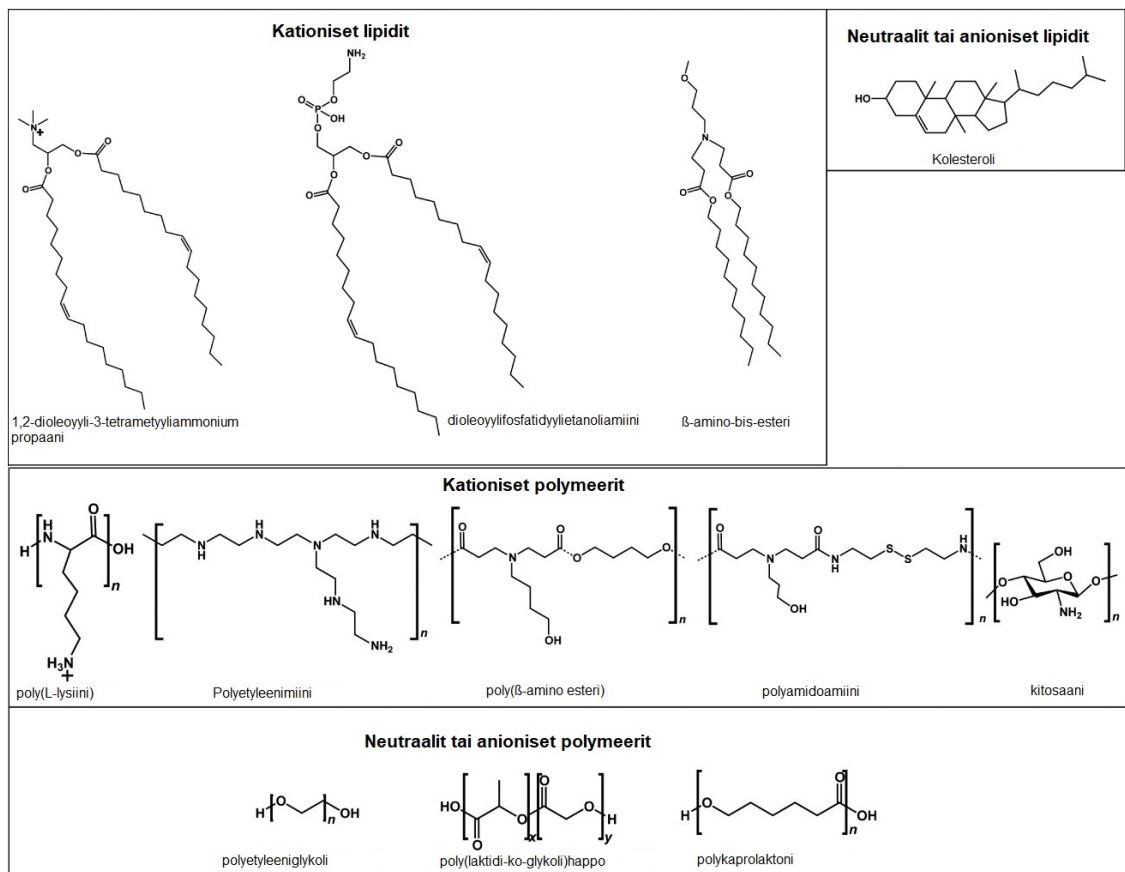
synteettisiä ja siksi vapaana ne laukaisevat immuunivasteen, koska immuunipuolustus ei tunnista niitä omiksi tuotoksiksi. [3]

Solut tarvitsevat toimiakseen normaalisti oikeanlaisen homeostaasin eli tasapainon. Tasapainoon vaikuttaa monet tekijät, joista tärkeimmät ovat muun muassa lämpötila, pH sekä ionien, ravintoaineiden ja jätteaineiden konsentraatiot. Sytotoksiset aineet horjuttavat homeostaasia yleensä jonkun edellä mainitun seikan kohdalta ja aiheuttavat solussa reaktion, joka voi pahimmassa tapauksessa johtaa solun kuolemaan. Pallonukleiinihappojen osalta suurin sytotoksisuusriski on ytimen materiaalissa. Esimerkiksi metallinano-partikkeliytimillä on tapana kerääntyä soluun. Kationiset eli positiivisesti varautuneet kuljettimet taas horjuttaavat solukalvon membraanipotentialiaa ja ne ovat siksi sytotoksisia. [22]

4. VERTAILUA VASTAAVIEN KEMIALLISTEN GEENINSIIRTOTEKNIIKOIDEN KANSSA

Tässä luvussa käsitellään lyhyesti muita kemiallisia geeninsiirtomenetelmiä. Käsiteltävät menetelmät ovat kalsiumfosfaatti menetelmä, kationiset lipidi kuljettimet, liposomi kuljettimet ja polymeeri kuljettimet. Luvun lopussa vertaillaan niiden ja pallonukleiinihappojen etuja ja haittoja.

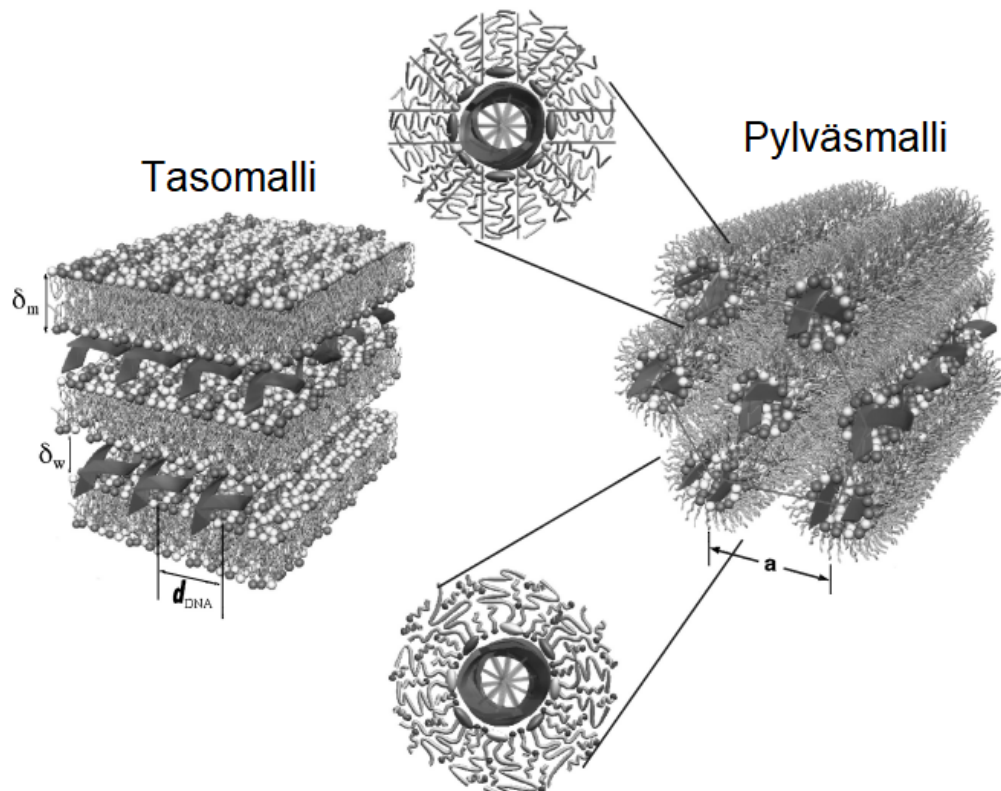
4.1 Muut kemialliset geeninsiirtotekniikat



Kuva 4.1. Esimerkkejä kemiallisista lipidi ja polymeeri kuljettimista. Kuva muokattu lähteestä [23].

Kationiset lipidit muodostavat kompleksin DNA:n kanssa. Lipidin kationinen ryhmä sitou-

tuu DNA:n fosfaatti ryhmään sähköisillä voimilla, jolloin lipidin hydrofobiset päät osoittavat liuokseen. Lipidin kationinen ryhmä on yleensä amiiniryhmä. Erilaisten kationisten lipidien kemialliset rakenteet on esitetty kuvassa 4.1. DNA-lipidi-komplekseissa lipidien kationiset päät sitoutuvat DNA:han ja hydrofobiset hännät osoittavat pois päin DNA:sta liuokseen. Eri kompleksien hydrofobiset päät hakeutuvat liuoksessa toisiaan vasten, jolloin kompleksit muodostavat suurempia rakenteita. Suuremmat rakenteet voivat muodostaa tasomaisen tai pylväsmäisen mallin (kuva 4.2). Tasomaisessa mallissa DNA:t ovat vierekkäin liuoksessa ja lipidit ovat sitoutuneet tasomaisesti DNA rivin ympärille. Näiden DNA-lipidi-kompleksien tasojen hydrofobiset hännät hakeutuvat toistensa läheisyyteen muodostaen lipidikaksoiskerroksen. DNA tasoa kutsutaan vesikerrokseksi, koska DNA:t eivät voi varauksensa takia asettua kovin lähelle toisiaan, jolloin DNA säikeiden väliin jää vettä. Pylväsmallissa lipidit sitoutuvat yksittäisen DNA säikeen ympärille muodostaen pylväsmäisen DNA-lipidi-kompleksin. Eri pylväiden hydrofobiset hännät hakeutuvat toistensa läheisyyteen muodostaen pylväsmallin. Kationiset lipidikuljettimia on helppo valmistaa ja ne yleensä eivät laukaise immuunivastetta, mutta suuret rakenteet ovat epävakaita ja positiivisen varauksensa takia ne ovat pitkäaikaisella altistumisella sytotoksisia. [2, 23, 24]



Kuva 4.2. DNA-lipidi-kompleksi. Kationiset ryhmät sitoutuvat DNA:han ja hydrofobiset hännät osoittavat pois päin DNA:sta liuokseen. Tällöin eri DNA-lipidi-kompleksien hydrofobiset hännät hakeutuvat toistensa läheisyyteen muodostaen suurempia rakenteita. Kuvassa δ_m on lipidikaksoiskerroksen paksuus, δ_w on vesikerroksen paksuus, d_{DNA} on DNA:iden keskikohtien etäisyys toisistaan ja a on pylväs yksiköiden keskikohtien etäisyys toistaan. Kuva muokattu lähteestä [24].

Liposomit muodostuvat samoista komponenteista kuin edellä esitetyt kationiset lipidit, mutta yksinkertaisen lipidikerroksen sijaan liposomit muodostuvat kaksinkertaisesta lipidikerroksesta. Yksittäinen liposomi on pallomainen rakkula, jonka ulko- ja sisäpuolella on hydrofiiliset päät liuosta vasten ja lipidikalvon sisäpuolella hydrofobiset hännät. Liposomin sisälle voidaan asettaa useita DNA tai RNA pätkiä, joiden määrä riippuu paljolti liposomi kuljettimen koosta. Liposomi kuljettimen rakenne on esitetty kuvassa 4.3. [13, 23]



Kuva 4.3. Liposomi kuljettimen rakenne. Kaksoiskerros muodostuu kationisista lipideistä ja auttaja lipideistä. Rakkulan sisään voidaan asettaa siirrettävät geenit. Auttaja lipidien avulla voidaan parantaa kohdennusta ja solusisäänottoa. Kuva muokattu lähteestä [25].

Polymeerikuljettimet ovat kationisia ja muodostuvat yleensä polyamideista eli pienistä proteiineista (polyornitiini ja polylysiini), lineaarisista ja haarautuvista synteettisistä polymeereistä (polybreeni), polysakkaridi johdannaisista (kitosaani, syklodekstriini ja dextraani) ja luonnollisista polymeereistä (kollageeni, histoni). Näitä yleensä liitetään vielä dendrimeereihin. Polymeerikuljettimia on siis paljon erilaisia, mutta ne ovat kaikki kationisia eli positiivisesti varautuneita. Tästä seuraa, että ne ovat myös sytotoksisia suurilla konsentraatioilla ja pitkäaikaisella altistumisella. Polymeerikuljettimet sitoutuvat vahvasti siirrettävän geenin fosfaatti ryhmään kationisella ryhmällään, joka on amiiniryhmä. Sitoutumisvahvuus riippuu siitä, ovatko polymeerin amiiniryhmät primäärisiä, sekundäärisiä vai tertiäärisiä. [2, 23, 26] Esimerkiksi polylysiinillä on vain primäärisiä amiineja ja ne vapauttavat sidotun geenin huonosti. Polyetyleenimiinissä on primäärisiä, sekundäärisiä ja tertiäärisiä amiineja ja se vapauttaa sidotun geenin helposti. Sitoutumisvahvuus määräytyy eri amiiniryhmien pK_a -arvojen mukaan. Polymeerin ja DNA:n muodostamaa kompleksia kutsutaan polypleksiksi (engl. polyplex). Polyplekseissä polymeerin amiinien ja siirrettävän geenin fosfaatti-ryhmien suhde (N/P-suhde) on tärkeä. Polyplekseissä DNA:ta ja heti sen ympärille sitoutunutta polymeerin kompleksia kutsutaan polypleksin ytimeksi. Ytimen ympärille saturoitunutta polymeeria kutsutaan polypleksin kuoreksi. Kun $N/P = 1$, polymeeriä on tarpeeksi vain ytimen muodostamiseen. Kun $N/P > 1$ muodostuu myös kuorta. Tehokkain solusisäänotto on havaittu olevan selkeästi positiivisilla ($N/P > 1$) polyplekseillä. [26, 27]

Polyplekseillä voidaan siis saada tehokas solusisäänotto, mutta haasteena voi olla geenin vapauttaminen solun sisällä.



Kuva 4.4. DNA-polymeeri-kompleksin rakenne. Kuvassa siirrettävä geeni (sininen) on sitoutunut polymeeriin. Siirrettävän geenin ja sen välittömässä läheisyydessä olevaa polymeerin osaa (johon geeni on sitoutunut) kutsutaan kompleksin ytimeksi (keltainen) ja sen ympärillä olevaa saturoitunutta polymeerin osaa kompleksin kuoreksi (punainen).

Kalsiumfostaatti menetelmässä DNA:ta ja CaCl_2 sekoitetaan fosfaattipuskuriin, jolloin saostuu DNA kalsiumfosfaatti sakkaa, joka kulkeutuu solun sisään solusyönnillä eli fagosytoosilla. Kalsiumfosfaatti menetelmä on erittäin halpa, mutta solusisäänottoteho on erittäin huono. Kalsiumfosfaatti menetelmä on hyvin vanhan aikainen. Sen tehottoman solusisäänoton takia se ei ole käytännöllinen nykyaikana, koska muut vaihtoehdot ovat huomattavasti parempia. Kalsiumfosfaatti menetelmä on halpa, mutta se on käyttökelpoinen lähinnä *in vitro* eli koeputkissa tai lasimaljoissa tehtävissä tutkimustöissä eikä niinkään *in vivo* eli eliöissä tehtävissä kliinisissä tutkimuksissa.

4.2 Kemiallisten geeninsiirtomenetelmien vertailua

Tässä aluvuussa vertaillaan pallonukleiinihappoja muiden kemiallisten geeninsiirtomenetelmien kanssa. Vertailussa keskitytään solusisäänottoon, syntetisointiin, stabiiliuteen, sytotoksisuuteen ja immuunivasteeseen.

Tehokas solusisäänotto on geeninsiirrossa tärkein ominaisuus, koska solun sisälle pääseminen on haastavin osuus geeninsiirrossa. Tehokaalla solusisäänotolla voidaan varmistaa, että geeniä tai muita funktionaalisia ryhmiä siirtyy tarpeeksi soluun. Pallonukleiinihapot ovat tässä osa-alueessa ylivoimaisesti parhaita. Joillain polymeereillä on myös tehokas solusisäänotto, kuten DEAE-dextranilla, muutoin ne ovat melko tavallisia solusi-

säänoton kannalta kationisten lipidien kanssa. Liposomeilla on tehoton solusisäännotto, mutta kuitenkin parempi kalsiumfosfaattilla. Helppo syntetisointi mahdollistaa pienemmät kulut (niin taloudelliset kuin ajalliset) tuotteen valmistusprosessiin. Tällöin tuotetta voidaan helpommin massatuottaa. Kalsiumfosfaatti on edellä käsitellyistä menetelmistä kaikista helpon, nopein ja halvin valmistaa. Pallonukleiinihapot, kationiset lipidit, liposomit ja polymeerit muodostuvat helposti vesiliuoksissa oikeissa olosuhteissa. Hyvällä stabiiliudella voidaan ehkäistä kuljettimien hajoamista solu ympäristössä.

Sytotoksisuus ei ole haluttu ominaisuus geeninsiirtomenetelmissä, koska geeninsiirron tarkoituksena ei aina ole tappaa tai vaurioittaa solua. Lisäksi sytotoksisuus voi ilmetä myös soluissa, joiden sisälle kuljetin ei edes mene. Pallonukleiinihappojen sytotoksisuus riippuu pitkälti käytettävästä ytimestä. Epäorgaaniset metalliytimet ovat pitkäaikaisella altistumisella sytotoksisia ja orgaaniset ytimet ovat bioyhteensopivia. Toisaalta epäorgaanisia ytimiä on helppo muokata oikealaisiksi verrattuna orgaanisiin ytimiin. Tällöin pallonukleiinihapoille olisi hyvä kehittää helposti muokattavia orgaanisia ytimiä. Liposomit eivät juurikaan ole sytotoksisia. Kationiset polymeerit ja lipidit ovat positiivisen varauksensa takia suurina määrinä sytotoksisia. Immuunivasteen laukaiseminen estää joitakin kuljettimia pääsemästä kohdesoluun, jolloin geeninsiirron teho laskee. Kemiallisten geeninsiirtomenetelmien yksi suurimmista eduista biologisiin menetelmiin on pieni immuunivaste.

Taulukko 4.1. *Kemiallisia geeninsiirtomenetelmiä ja niiden edut sekä haasteet. Taulukko on käännetty luvan kanssa lähteestä [2].*

Menetelmä	Edut	Haasteet
Pallonukleiinihapo	Erittäin tehokas solusisäännotto, homogeenisia, helppo muokata	Ytimen materiaalista riippuen sytotoksista, geenien siirto vain kohdesoluun
Kalsiumfosfaatti	Halpa	Erittäin tehoton solusisäännotto
Kationiset lipidit	Helppo valmistaa ja pieni immuunivaste	Epävakaita, sytotoksisia
Liposomit	Helppo valmistaa ja pieni immuunivaste	Tehoton solusisäännotto
Polymeerit	Vakaita ja voi käyttää monissa sovelluksissa	Sytotoksisia, vapauttaa geenin heikosti ja endosomista vapautuminen
DEAE-dextran	Tehokas solusisäännotto	Sytotoksinen

5. JOHTOPÄÄTÖKSET

Tässä luvussa esitetään lyhyt yhteenveto työstä ja käydään läpi johtopäätöksiä, joita vertailussa vastaavien kemiallisten geeninsiirtotekniikoiden kanssa on tullut esille. Työn tavoitteena oli selvittää pallonukleiinihappojen rakennetta tarkemmin sekä miten niitä valmistetaan, miten ne toimivat solu ympäristössä ja kuinka merkittäviä ne ovat geeninsiirtomenetelmänä.

Geeninsiirrolla tarkoitetaan tekniikoita, joilla voidaan viedä geenejä solun sisälle. Sen tarkoituksena on hiljentää, korvata tai muokata solun geenien toimintaa. Geeninsiirto voidaan jakaa biologisiin, fyysisiin ja kemiallisiin menetelmiin. Tässä työssä keskityttiin yhteen kemialliseen nanopartikkelikuljettimeen, pallonukleiinihappoihin. Pallonukleiinihapot muodostuvat nanopartikkeliytimestä ja siihen kiinnityneestä tiheästä oligonukleotidivaipasta. Oligonukleotidit adsorboituvat nanopartikkeliytimen pinnalle itsestään, mutta hyvin tehottomasti. Suolakäsittelyllä ja ultraäänellä voidaan parantaa oligonukleotidivaipan tiheyttä. Oligonukleotidivaippaan voidaan siirrettävien geenien lisäksi liittää muita funktionaalisia ryhmiä, kuten väriaineita, sammuttimia, kohdennusryhmiä ja lääkkeitä. Pallonukleiinihappojen on todettu siirtyvän solun sisään erittäin tehokkaasti. Oligonukleotidivaipan suuren tiheyden on todettu olevan yhteydessä erittäin tehokkaaseen solusisäänottoon. Pallonukleiinihapo pääsee solun sisään endosytoosin avulla ja poistuu endosytoosissa syntyneestä endosomista solulimaan, jolloin se vapauttaa oligonukleotidivaippaan kiinnitetyt geenit ja muut funktionaaliset ryhmät. Pallonukleiinihapoilla on todettu hyvin pieni immuunivaste, mutta ytimen materiaalista riippuen ne voivat olla pitkällä altistumisella sytotoksisia.

Erittäin tehokas solusisäänotto on pallonukleiinihappojen suurin etu, sillä solun sisään pääseminen on geeninsiirron haastavin osuus. Kationisilla polymeeri- ja lipidikuljettimillä on myös tehokas solusisäänotto, mutta niiden kationisuudesta johtuen ne ovat sytotoksisia pitkäaikaisella altistumisella. Pallonukleiinihapotkin voivat olla sytotoksisia, mutta oikean ytimen valinnalla on väliä. Epäorgaaniset ytimet kerääntyvät solun sisään, koska solu ei osaa hajoittaa tai käsitellä niitä tehokkaasti. Tällöin myös pitkäaikaisella altistuksella pallonukleiinihapot ovat sytotoksisia. Orgaaniset ytimet antavat tähän ongelmaan vastauksen, mutta niiden huono stabiilius ja liukoisuus ovat vielä haasteita pallonukleiinihappojen kehityksessä. Täytyisi siis löytää jokin orgaaninen ydintyyppi, joka olisi stabiili, helppo muokata ja jolla olisi tehokas solusisäänotto.

Vertailussa esille tulleiden asioiden pohjalta voi sanoa, että pallonukleiinihapoilla on erittäin paljon potentiaalia geeninsiirtomenetelmänä. Niillä on tällä hetkellä jo monissa tärkeissä osa-alueissa paremmat ominaisuudet muihin kemiallisiin geeninsiirtomenetelmiin verrattuna. Pallonukleiinihapot ovat mullistaneet biodiagnostiikka ja geeniterapia maailmaa. Uskon, että tulevaisuudessa niiden rooli geneettisten sairauksien torjunnassa tulee kasvamaan merkittävästi.

LÄHTEET

- [1] Mokhtarzadeh, A., Vahidnezhad, H., Youssefian, L., Mosafer, J., Baradaran, B. ja Uitto, J. Applications of Spherical Nucleic Acid Nanoparticles as Delivery Systems. eng. *Trends in molecular medicine* 25.12 (2019), s. 1066–1079. ISSN: 1471-4914.
- [2] Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., Khurana, I., Banothu, A. K., Weiskirchen, R. ja Bharani, K. K. Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. eng. *Life sciences (1973)* 294 (2022), s. 120375–120375. ISSN: 0024-3205.
- [3] Cutler, J. I., Auyeung, E. ja Mirkin, C. A. Spherical Nucleic Acids. eng. *Journal of the American Chemical Society* 134.3 (2012), s. 1376–1391. ISSN: 0002-7863.
- [4] Rosi, N., Giljohann, D., Thaxton, C., Lytton-Jean, A., Han, M. ja Mirkin, C. Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles for Intracellular Gene Regulation. eng. *Science (American Association for the Advancement of Science)* 312.5776 (2006), s. 1027–1030. ISSN: 0036-8075.
- [5] Kapadia, C. H., Melamed, J. R. ja Day, E. S. Spherical Nucleic Acid Nanoparticles: Therapeutic Potential. eng. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals, and gene therapy* 32.4 (2018), s. 297–309. ISSN: 1173-8804.
- [6] Song, Y., Song, W., Lan, X., Cai, W. ja Jiang, D. Spherical nucleic acids: Organized nucleotide aggregates as versatile nanomedicine. eng. *Aggregate (Hoboken)* 3.1 (2022). ISSN: 2692-4560.
- [7] Young, S. W. S., Stenzel, M. ja Jia-Lin, Y. Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? eng. *Critical reviews in oncology/hematology* 98 (2015), s. 159–169. ISSN: 1040-8428.
- [8] Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. ja Storhoff, J. J. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. eng. *Nature (London)* 382.6592 (1996), s. 607–609. ISSN: 0028-0836.
- [9] Tatiparti, K., Sau, S., Kashaw, S. K. ja Iyer, A. K. siRNA delivery strategies: A comprehensive review of recent developments. eng. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 7.4 (2017), s. 77–. ISSN: 2079-4991.
- [10] Zhu, S., Xing, H., Gordiichuk, P., Park, J. ja Mirkin, C. A. PLGA Spherical Nucleic Acids. eng. *Advanced materials (Weinheim)* 30.22 (2018), e1707113–n/a. ISSN: 0935-9648.
- [11] Hu, Y. ja Niemeyer, C. M. From DNA Nanotechnology to Material Systems Engineering. eng. *Advanced materials (Weinheim)* 31.26 (2019), e1806294–n/a. ISSN: 0935-9648.

- [12] Hurst, S. J., Lytton-Jean, A. K. R. ja Mirkin, C. A. Maximizing DNA Loading on a Range of Gold Nanoparticle Sizes. eng. *Analytical chemistry (Washington)* 78.24 (2006), s. 8313–8318. ISSN: 0003-2700.
- [13] Banga, R. J., Chernyak, N., Narayan, S. P., Nguyen, S. T. ja Mirkin, C. A. Liposomal Spherical Nucleic Acids. eng. *Journal of the American Chemical Society* 136.28 (2014), s. 9866–9869. ISSN: 0002-7863.
- [14] Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? eng. *Journal of controlled release* 235 (2016), s. 337–351. ISSN: 0168-3659.
- [15] McNeil, S. E. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. eng. 1. Methods in Molecular Biology, Methods and Protocols, 697. 2011.
- [16] Ponedal, A., Zhu, S., Sprangers, A. J., Wang, X.-Q., Yeo, D. C., Lio, D. C. S., Zheng, M., Capek, M., Narayan, S. P., Meckes, B., Paller, A. S., Xu, C. ja Mirkin, C. A. Attenuation of Abnormal Scarring Using Spherical Nucleic Acids Targeting Transforming Growth Factor Beta 1. eng. *ACS applied bio materials* 3.12 (2020), s. 8603–8610. ISSN: 2576-6422.
- [17] Hill, H. D., Millstone, J. E., Banholzer, M. J. ja Mirkin, C. A. The Role Radius of Curvature Plays in Thiolated Oligonucleotide Loading on Gold Nanoparticles. eng. *ACS nano* 3.2 (2009), s. 418–424. ISSN: 1936-0851.
- [18] Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Patel, P. C., Millstone, J. E., Rosi, N. L. ja Mirkin, C. A. Oligonucleotide Loading Determines Cellular Uptake of DNA-Modified Gold Nanoparticles. eng. *Nano letters* 7.12 (2007), s. 3818–3821. ISSN: 1530-6984.
- [19] Ding, H.-m. ja Ma, Y.-q. Role of physicochemical properties of coating ligands in receptor-mediated endocytosis of nanoparticles. eng. *Biomaterials* 33.23 (2012), s. 5798–5802. ISSN: 0142-9612.
- [20] Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R. ja Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. eng. *Bioconjugate chemistry* 30.2 (2019), s. 263–272. ISSN: 1043-1802.
- [21] Choi, C. H. J., Hao, L., Narayan, S. P., Auyeung, E. ja Mirkin, C. A. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. eng. *Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS* 110.19 (2013), s. 7625–7630. ISSN: 0027-8424.
- [22] Lewinski, N., Colvin, V. ja Drezek, R. Cytotoxicity of Nanoparticles. eng. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 4.1 (2008), s. 26–49. ISSN: 1613-6810.
- [23] Kozielski, K. L., Tzeng, S. Y. ja Green, J. J. Bioengineered nanoparticles for siRNA delivery. eng. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 5.5 (2013), s. 449–468. ISSN: 1939-5116.
- [24] Chesnoy, S. ja Huang, L. STRUCTURE AND FUNCTION OF LIPID-DNA COMPLEXES FOR GENE DELIVERY. eng. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 29.1 (2000), s. 27–47. ISSN: 1056-8700.

- [25] Žak, M. M. ja Zangi, L. Lipid nanoparticles for organ-specific mRNA therapeutic delivery. eng. *Pharmaceutics* 13.10 (2021), s. 1675–. ISSN: 1999-4923.
- [26] Fliervoet, L. A. L., Lisitsyna, E. S., Durandin, N. A., Kotsis, I., Maas-Bakker, R. F. M., Yliperttula, M., Hennink, W. E., Vuorimaa-Laukkanen, E. ja Vermonden, T. Structure and Dynamics of Thermosensitive pDNA Polyplexes Studied by Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. eng. *Biomacromolecules* 21.1 (2020), s. 73–88. ISSN: 1525-7797.
- [27] Ketola, T.-M., Hanzlíková, M., Leppänen, L., Raviña, M., Bishop, C. J., Green, J. J., Urtti, A., Lemmetyinen, H., Yliperttula, M. ja Vuorimaa-Laukkanen, E. Independent versus Cooperative Binding in Polyethylenimine–DNA and Poly(l-lysine)–DNA Polyplexes. eng. *The journal of physical chemistry. B* 117.36 (2013), s. 10405–10413. ISSN: 1520-6106.