

Kan origami av DNA bli en del av kampen mot cancer?

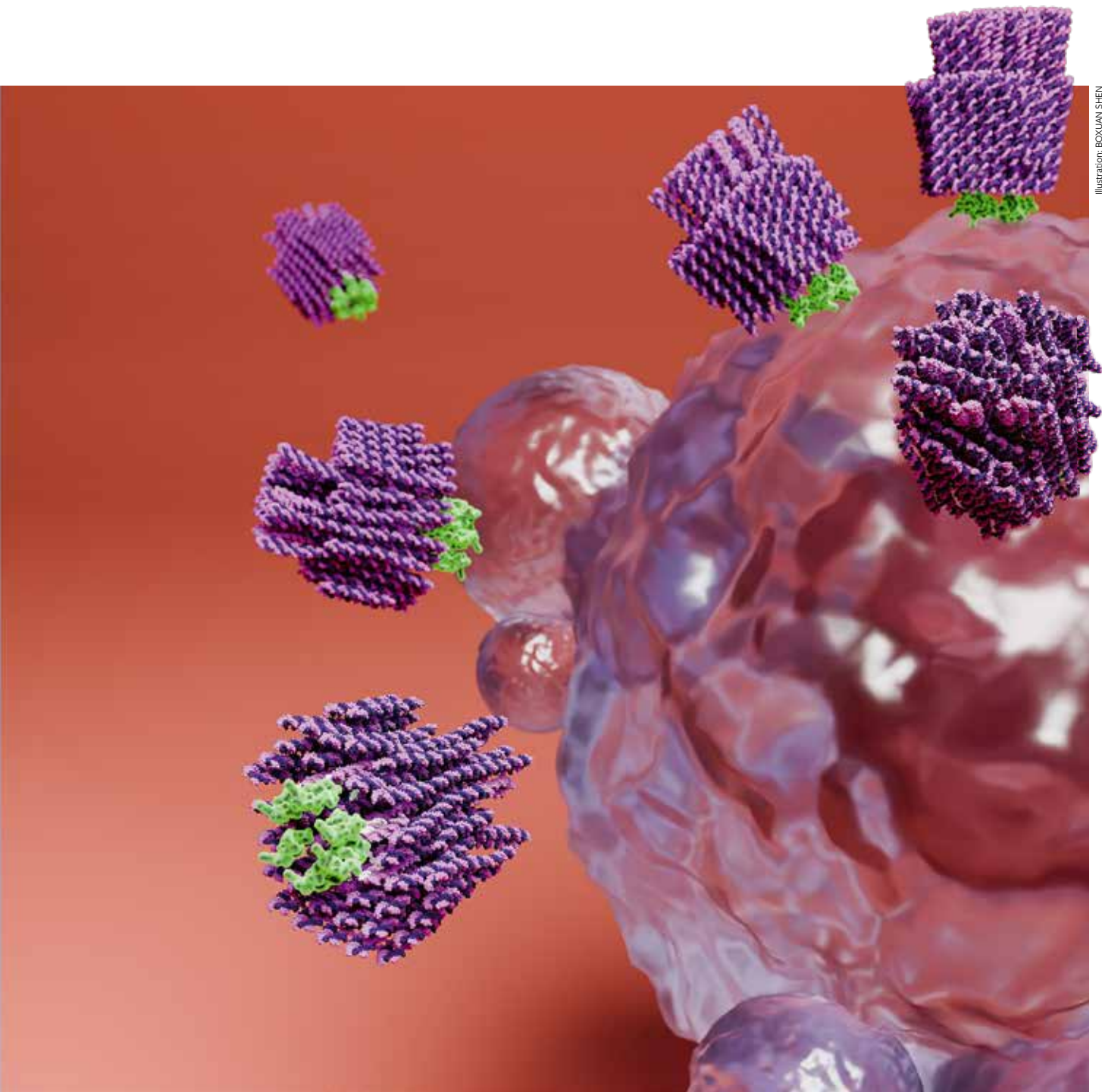
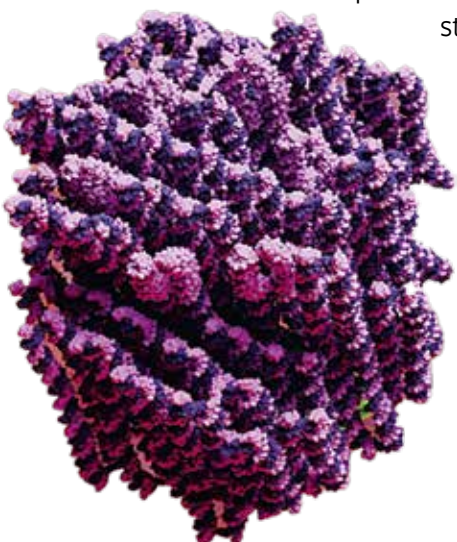


Illustration: BOXUAN SHEN

I början av 80-talet arbetade en professor vid namn Ned Seeman på New York University. Ned Seeman försökte lösa protein-strukturer med kristallografi men han hade ett problem: Inga av de proteiner han arbetade med verkade bilda kristaller. För att kunna bestämma strukturen hos ett protein med röntgenkristallografi så måste man ha just kristaller. Så som Ned Seeman berättade historien, så var han på väg att förlora jobbet om han inte fick resultat. Han började fundera på alternativa sätt att "hjälpa till" med kristallbildningen. Det han hittade på har sedan dess vuxit till ett helt fält, nämligen att använda små DNA-strängar för att sätta ihop designade strukturer. Under de följande årtiondena lärde vi oss att bygga med DNA lite som man bygger med Lego, fast på nanometerskalan och ett av fältets genombrott kom 2006 när Paul Rothemund, vid Caltech, upptäckte DNA origami.¹



»Just nu letar vi efter samarbetspartners med cancer-expertis och hoppas kunna ta projektet till nästa nivå.«

Vad är DNA origami och hur fungerar det?

I DNA origami använder vi en lång, enkelsträngad DNA-molekyl och till den långa molekylens tillsätter vi små korta DNA-strängar som binder till olika delar av den långa. På så sätt så viks den långa strängen ihop och genom att designa hur, så kan vi väva nanometerstora "virkningar" av DNA, där formen bestäms helt och hållet av DNA-koderna som vi blandar. En typisk nanostruktur gjord med DNA origami är ungefär lika stor som ett virus, men vi kan designa och förutsäga formen på strukturerna med extrem precision.

Nanometerstora strukturer och deras användningsområden

DNA origami kan idag vika DNA till i princip vilken form vi vill, och forskare har gjort nanometerstora kuber, sfärer, gubbar med mera. Det kan liknas vid en teknik för 3D-utskrifter på nanometerskalan. Så varför är det viktigt? Jag vill hävda att DNA origami är en teknik som är helt omatchad i att skapa mönster av biologiska molekyler på nanometerskalan. Det vi gör, är att vi använder DNA origami som en grundstruktur, en byggställning, och sedan dekorerar vi dessa med proteiner, peptider, små molekyler med mera. Genom att kontrollera exakt vilken bit av DNA som vi sätter ett protein på, så kan vi kontrollera exakt vilka mönster av dessa proteiner som bildas när vi viker vår DNA origami. Dessa nano-mönster av proteiner eller andra molekyler använder vi sedan för att studera hur celler reagerar. Genom att göra många sådana försök kan vi sakta lära oss att förstå cellernas blindskrift, hur celler via ytreceptorer känner av sin omgivning och reagerar på den.

Upptäckten av mönster för apoptos med TRAIL-liknande peptider

I ett försök för några år sedan utförde vi ett försök med peptider som imiterar TRAIL. TRAIL eller Dulanermin är ett protein som binder till s.k. dödsreceptorer, främst DR5 eller Death Receptor 5. Detta protein, samt antikroppsagonister som också binder till DR5 och DR4 (som Mapatumumab och Lexatumumab) har under relativt lång tid undersökts för cancerterapi eftersom aktivering av receptorn leder till apoptos som skulle kunna användas för att eliminera cancerceller. Med hjälp av tidigare hypoteser om hur DR5 signalerar kunde vi designa olika mönster på nanometernivå av den TRAIL-liknande peptiden med hjälp av DNA origami. Vi fann snabbt i cellstudier, att peptiden bara inducerade apoptos när den placerades i små, hexagonala mönster om sex peptider, med ett inbördes avstånd mellan peptiderna på mindre än 10 nm.² Om peptiderna gavs i lösning, eller placerades på DNA origami med inbördes avstånd större än 10 nm, så var de verkningslösa. Genom att använda DNA origami kunde vi alltså sluta oss till att bara vissa specifika mönster av dessa

DR5-bindande peptider var cytotoxiska. Vi hade fått en ledtråd om hur en del av cellernas blindskrift fungerade och vi hade hittat ett meddelande (ett mönster) som verkade fungera som en order till cancerceller att begå självmord.

Design av nanostrukturer för kontrollerad cytotoxicitet

Att bara injicera denna specifika nanostruktur av TRAIL-peptider skulle dock inte vara någon bra terapi. DR5 uttrycks i många celler och det aktiva mönstret verkade väldigt cytotoxiskt. Vi behövde ett sätt att aktivera mönstret nära cancerceller, men inaktivera det i övrigt. Min doktorand Yang Wang tog tag i problemet och lösningen var att gömma mönstret i magen på en DNA-nanostruktur, och bara visa upp det i en specifik miljö.

Trippel-helixar: En pH-beroende lösning

Att DNA kan bilda en dubbel-helix vet de flesta. Men att DNA under vissa förhållanden även kan bilda en trippel-helix är mindre känt. Genom att välja baserna noggrant kan vi bilda en trippel-helix vid specifika pH.

När omgivningen är sur bildas en trippel-helix, när omgivningen är neutral, släpper den tredje DNA-strängen och kvar blir en dubbel-helix.

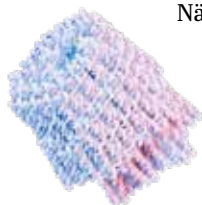
Yang designade en DNA-struktur med en hållighet i mitten, likt en tunna utan lock. I tunnans mage installerade vi 6 TRAIL-peptider och 6 specifika dubbel-helixar precis bredvid. När pH:t sjunker, så bildar DNA:t som peptiderna monterats på, en trippel-helix med intilliggande DNA som är riktad längs med tunnans långsidor och pekar därmed upp, och ut ur tunnans. När pH är neutralt så bildas inte trippel-helix och DNA:t som TRAIL-peptiderna sitter på, pekar i stället in i tunnans mage. Vi hade alltså designat en struktur som vid neutralt pH är ofarlig (peptiderna göms i strukturens mage), men vid något surare pH (mindre än pH 6.8) inducerar den apoptos och blir därmed cytotoxisk.

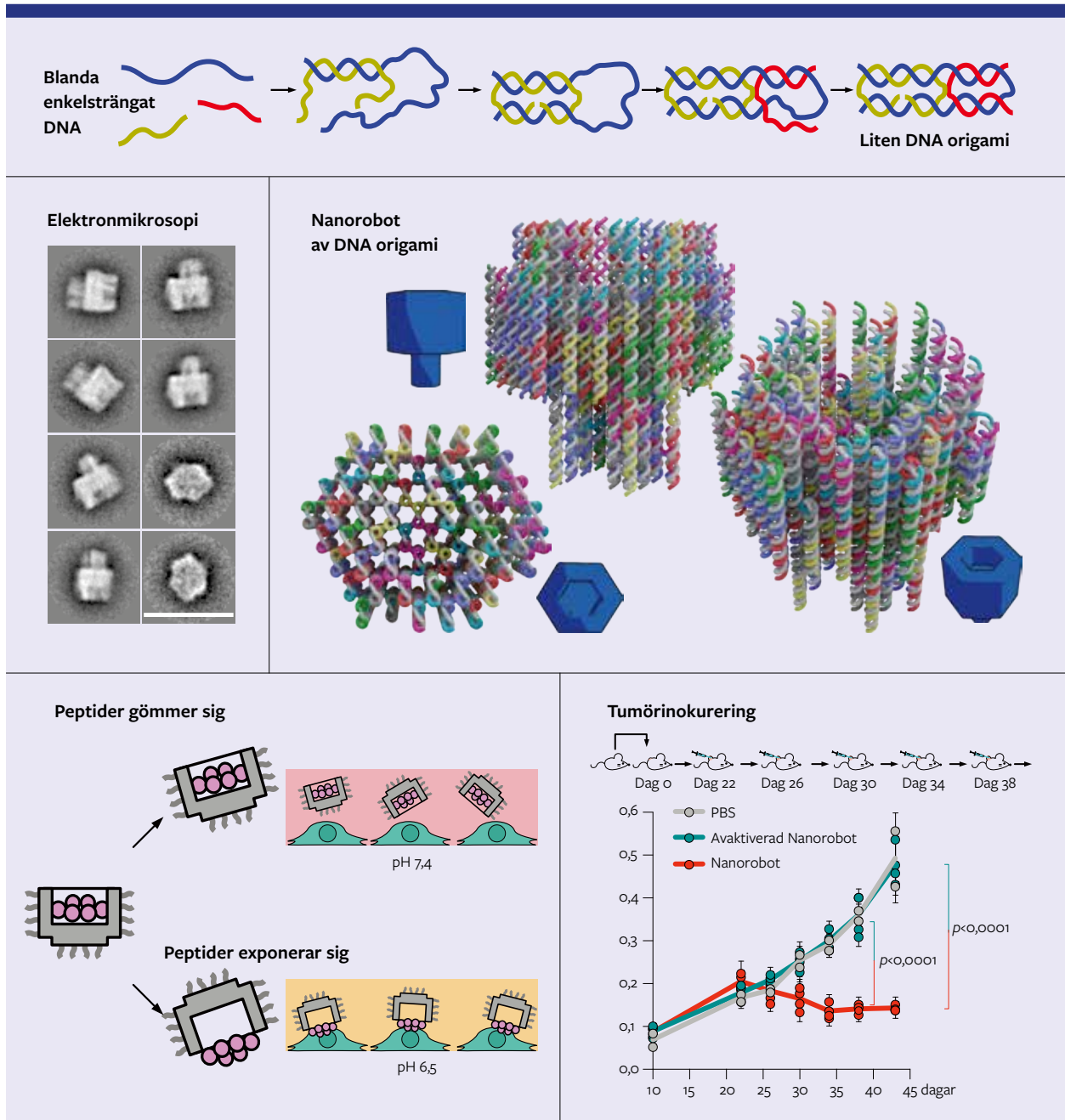
Nanoroboter för cancerbehandling:

Första experimenten

Eftersom cancertumörer generellt sett har högre metabolism och svårare med blodgenomströmning än friska organ, resulterar det ofta i ett pH som är surare i tumören än omgivande vävnad. Idén var alltså att designa en autonom "nanorobot" som kan bedöma pH:t i sin omgivning och visa upp det cytotoxiska nano-mönstret av peptider som vi upptäckte tidigare, bara när pH är under 6.8.³

Med denna formulering utförde vi djurförsök. I immunoresistenta möss med subkutana xenografter av mänskliga bröstcancerceller såg vi en signifikant reduktion av tumörtillväxt, upp till 70%, efter injektioner innehållandes nanostrukturerna. Genom att använda en variant av nanorobotten, en där sekvensen som bildar





trippel-helixarna som får peptiderna att skjuta ut vid lägre pH, muterats något, så såg vi ingen effekt alls – en tydlig indikation på att mekanismen faktiskt fungerar som vi tror.

Utmaningar och framtidsutsikter inom DNA origami-terapi

Även om denna typ av nanoroboter av DNA-origami visar på potential för eventuella framtida behandlingar, så är det mycket som återstår att göra. Våra strukturer verkar ha bra specificitet mot subkutana xenografter, men är pH-switchen tillräckligt för att ge specificitet mot mer realistiska cancermodeller? Kan nanoroboten ge biverkningar i människor? Vi kunde inte se några tydliga biverkningar i möss, men där behövs också mer realistiska modeller för att dra några slutsatser. Just nu

letar vi efter samarbetspartners med cancerexpertiser och hoppas kunna ta projektet till nästa nivå.



Text BJÖRN HÖGBERG

Professor i biofysik, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institutet
bjorn.hogberg@ki.se

Referenser

1. P. W. K. Rothmund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 440, 297–302 (2006).
2. Y. Wang, I. Baars, F. Fördös, B. Högberg, Clustering of Death Receptor for Apoptosis Using Nanoscale Patterns of Peptides. *ACS Nano*. 15, 9614–9626 (2021).
3. Y. Wang, I. Baars, I. Berzina, I. Rocamonde-Lago, B. Shen, Y. Yang, M. Lolaico, J. Waldvogel, I. Smyrlaki, K. Zhu, R. A. Harris, B. Högberg, A DNA robotic switch with regulated autonomous display of cytotoxic ligand nanopatterns. *Nat. Nanotechnol.* 19, 1366–1374 (2024).