



**TURUN
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen
tiedekunta

Nukleaasit ja niiden aktiivisuuden *in vitro* -mittausmenetelmät

Aleksandra Autio

Kemia
LuK-tutkielma
Laajuus: 6 op

17.4.2025

Turku

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

Pääaine: Kemia

Tekijä(t): Aleksandra Autio

Otsikko: Nukleasit ja niiden aktiivisuuden *in vitro* -mittausmenetelmät

Ohjaaja(t): Kari Kopra

Sivumäärä: 23 sivua

Päivämäärä: 17.4.2025

Nukleasit ovat entsyymejä, jotka pilkkovat nukleiinihappoja, kuten deoksiribonukleiinihappoa (DNA) ja ribonukleiinihappoa (RNA), hydrolysoimalla fosfodiesterisidoksia. Ne voidaan jakaa esimerkiksi endo- ja eksonukleaseihin. Endonukleasit pilkkovat keskeltä ketjua, ja eksonukleasit joko 3'- tai 5'-päästä. Nukleasit ovat keskeisiä perimän stabiloinnissa, immuunipuolustuksessa, apoptoosissa sekä DNA:n replikaatiossa, rekombinaatiossa ja korjauksessa. Niitä esiintyy kaikissa elämän domeeneissa. Monien nukleasien rakenne tunnetaan, mutta niiden katalyyttinen mekanismi on epäselvä. Uudet löydöt laajentavat ymmärrystä näistä elintärkeistä entsyymeistä. Nukleasien monimuotoisuuden takia niitä pystytään hyödyntämään esimerkiksi erilaisten sairauksien diagnostiikassa kehittämällä tarkempia ja herkempiä nukleiinihappokoettimia. Niiden katalyyttinen aktiivisuus voisi toimia diagnostisena biomarkkerina, mikä tarjoaisi mahdollisuuden uudentyyppisten määritysten kehittämiseen ja laajentaisi diagnostisia vaihtoehtoja.

Nukleasien aktiivisuus *in vitro* mitataan yleisimmin erotusvapaasti perustuen luminesenssiin, kuten nukleiinihappoihin sitoutuvilla leimoilla ja FRET-pohjaisilla menetelmillä. Esimerkiksi interkalaattorit, kuten väriaine PicoGreen, ovat nukleiinihappoihin sitoutuvia leimoja, jotka sitoutuvat DNA:n kaksoiskierteen väliin. Interkalaattorit pystyvät sitoutumaan vain kaksijuosteiseen DNA:han, minkä takia yksijuosteiseen DNA:han tai RNA:han sitoutuvia esimerkiksi fluoresenssipohjaisia koettimia on kehitetty. FRET-ilmiö perustuu energiansiirtoon virittyneen luovuttajamolekyylin ja perustilassa olevan vastaanottajamolekyylin välillä. HPLC, geelielektroforeesi ja elektrokemialliset menetelmät ovat erotukseen perustuvia standardimenetelmiä. Nykyisten mittausten ongelmien edellyttävät nukleasien tutkimuksen jatkamista tulevaisuudessa. Tämä mahdollistaa niiden entistä tehokkaamman hyödyntämisen esimerkiksi biomarkkereina ja genomien muokkauksessa.

Tämä tutkielma käsittelee nukleasien toimintaa, spesifisyyttä ja sovelluksia sekä niiden aktiivisuuden mittaamiseen käytettäviä *in vitro* -menetelmiä ja tulevaisuuden näkymiä. Tutkielmassa tarkastellaan erotukseen perustuvien ja erotusvapaiden menetelmien etuja ja haasteita sekä tutkitaan niiden tulevaisuuden näkymiä diagnostiikassa ja bioteknologisissa sovelluksissa.

Avainsanat: nukleasit, *in vitro* -mittausmenetelmät, nukleasiaktiivisuus, bioteknologia, biomarkkeri

SISÄLLYSLUETTELO

1	JOHDANTO	1
2	NUKLEAASIT	2
2.1	Toimintamekanismit	2
2.2	Spesifisyys ja substraattivaatimukset	4
2.3	Biokemiallinen ja lääketieteellinen merkitys	5
2.4	Hyödyntäminen bioteknologiassa ja lääketieteessä	7
3	<i>IN VITRO</i> -MITTAUSMENETELMÄT NUKLEAASIAKTIIVISUUDELLE	10
3.1	Erotukseen perustuvat standardimenetelmät	10
3.1.1	Korkean erotuskyvyn nestekromatografia	10
3.1.2	Geelielektroforeesi	11
3.1.3	Elektrokemialliset menetelmät	12
3.2	Erotusvapaat menetelmät	14
3.2.1	Nukleiinihappoihin sitoutuvat leimat	15
3.2.2	FRET-pohjaiset menetelmät	16
3.2.3	Absorbanssiin perustuvat menetelmät	19
4	TULEVAISUUDEN NÄKYMÄT	20
5	YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET	21
	LÄHTEET	22

Lyhenteet

CP – Konjugoitu polymeeri

DNA – Deoksiribonukleiinihappo

DNaasi – Deoksiribonukleaasi

FAM – Karboksifluoreseiini

FRET – Försterin resonanssienergiansiirto

HDR – Homologinen rekombinaatio (engl. *Homology directed repair*)

HPLC – Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

IRE1 α – Transmembraaninen kinaasi-endoribonukleaasi-1 α

PG – PicoGreen

QI – Quant-It

RNA – Ribonukleiinihappo

RNAasi – Ribonukleaasi

TAMRA – Tetrametyyli-rodamiini

ZFN – Sinkkisorminukleaasit (engl. *Zinc finger nucleases*)

1 Johdanto

Nukleaasit ovat entsyymejä, jotka katkaisevat hydrolysoimalla nukleiinihappojen, kuten deoksiribonukleiinihapon (DNA) ja ribonukleiinihapon (RNA), riboosiyksiköiden välisiä fosfodiesterisidoksia.¹ Ne muodostavat monimuotoisen entsyymaattisten proteiinien ryhmän, ja niitä esiintyy kaikissa elämän domeeneissa.² Nukleaasien monimuotoisuuden takia niiden luokitteluun ei ole yksinkertaista tapaa.³ Ne voidaan kuitenkin jaotella erilaisten ominaisuuksien, kuten substraatin pilkkomisominaisuuksien, biologisten toimintojen, biokemiallisten mekanismien sekä niiden sekvenssin, laskostumisen ja aktiivisen kohdan rakenteen perusteella.³ Eri nukleaaseilla on erilaisia tehtäviä, minkä takia ne sijaitsevat solun eri osissa.² Niillä on ratkaiseva merkitys esimerkiksi immuunipuolustuksessa ja kehon kyvyssä ylläpitää vakaita sisäisiä olosuhteita, kuten lämpötilaa, pH- ja ionitasapainoa, ympäristön muuttuessa.³ Ne osallistuvat perimän stabilisointiin, muokkaukseen ja oikolukuun. Nukleaaseilla on tärkeä merkitys DNA:n replikaatiossa, rekombinaatiossa ja korjauksessa. Ne myös hävittävät solusta vieraat ja tarpeettomat nukleiinihapot. Lisäksi ne osallistuvat ohjelmoituun solukuolemaan eli apoptoosiin. Koska nukleaasit osallistuvat keskeisiin solun toimintoihin, näiden prosessien ymmärtäminen on välttämätöntä esimerkiksi lääkekehityksessä.³

Nukleaasien aktiivisuutta voidaan kontrolloida tarkasti, mikä tekee niistä tärkeitä lääkekehityksen kohteita.¹ Niiden aktiivisuutta säädellään esimerkiksi ionien saatavuuden, nukleaasien sijainnin solussa ja kemiallisten muokkausten, kuten fosforylaation tai inhibiittorien avulla.⁴ Monet nukleaasit ovat ioniriippuvaisia eli ne tarvitsevat metallikationeja, kuten magnesiumia, joka mahdollistaa niiden katalyyttisen aktiivisuuden. Kemialliset muokkaukset, kuten fosforylaatio, lisää tai vähentää nukleaasin aktiivisuutta. Inhibiittoriproteiinit voivat sitoutua nukleaaseihin ja estää niiden aktiivisuuden.⁴

Nukleaasien aktiivisuuden mittaamiseen on useita eri menetelmiä. *In vitro* -mittausmenetelmät voidaan jakaa esimerkiksi erotukseen perustuviin ja erotusvapaisiin menetelmiin. Erotukseen perustuvia standardimenetelmiä ovat esimerkiksi korkean erotuskyvyn nestekromatografia (HPLC), geelielektroforeesi ja elektrokemialliset menetelmät. Nukleiinihappoihin sitoutuvat leimat, Försterin resonanssienergiansiirto (engl. *Förster resonance energy transfer*, FRET) -pohjaiset menetelmät ja absorbanssiin perustuvat menetelmät ovat erotusvapaita menetelmiä. Absorbanssiin perustuvat menetelmät mittaavat aineen absorboimaa valoa, ja elektrokemialliset menetelmät sähköisiä muutoksia nukleaasien aiheuttamien reaktioiden aikana.

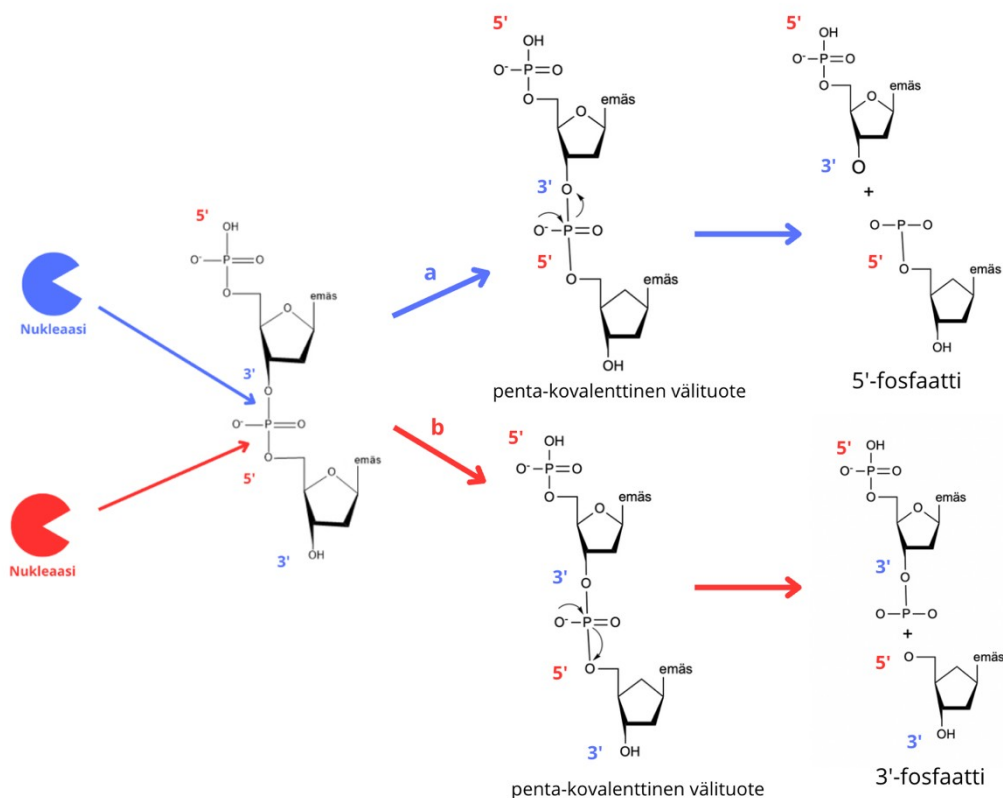
Tässä tutkielmassa perehdytään nukleaasien toimintamekanismeihin, spesifisyyteen ja merkitykseen sekä bioteknologisissa että lääketieteellisissä sovelluksissa. Lisäksi esitellään nukleaasien aktiivisuuden mittaamiseen käytettäviä *in vitro* -mittausmenetelmiä, jotka on jaettu erotukseen perustuviin ja erotusvapaisiin menetelmiin. Lopuksi tarkastellaan tulevaisuuden näkymiä nukleaaseihin liittyvissä tutkimuksissa.

2 Nukleaasit

Nukleaaseja esiintyy luonnollisesti bakteereissa, arkeoneissa ja eukaryoteissa solunsisäisinä, kalvoon sitoutuneina ja soluistami eritettynä.³ Ne ovat fosfodiesteriaseja eli fosfordiesterihydrolaaseja, jotka tunnistavat, sitovat ja pilkkovat nukleiinihappoja ja kemiallisesti modifioituja oligonukleotideja. Niitä yhdistää katalyyttinen kyky, mutta niillä on suuria rakenne-, toiminta- ja subsraattispesifisyyseroja.³ Nukleaaseilla saattaa olla esimerkiksi samanlainen toimintamekanismi, mutta täysin erilainen rakenne.⁴ Ne voivat olla endo- tai eksonukleaaseja, deoksiribonukleaaseja (engl. *DNase*, DNAasi) tai ribonukleaaseja (engl. *RNase*, RNAasi), topoisomeraaseja, rekombinaaseja, ribotsyymejä tai RNA:n silmukointientsyymejä. Endo- ja eksonukleaasit eroavat toisistaan siten, että endonukleaasit pilkkovat nukleiinihappoja ketjun päästä, kun eksonukleaasit pilkkovat ketjun keskeltä.⁴ Topoisomeraasilla tarkoitetaan sellaista entsyymiä, joka estää jännitteen syntymistä DNA:n kaksoiskierteen avautuessa.⁵ Ribotsyymit ovat RNA-entsyymejä, jotka katalysoivat biokemiallisia reaktioita, kuten RNA:n pilkkoutuminen ja silmukointi⁶, kun taas rekombinaasit katalysoivat DNA:n rekombinaatiota. Rekombinaatiolla tarkoitetaan DNA- tai RNA-segmenttien uudelleenjärjestäytymistä.⁷ Nukleaasien ominaisuuksien monimuotoisuuden takia niitä pystytään soveltamaan laajasti bioteknologiassa ja lääketieteessä terapeuttisina kohdemolekyyleinä sekä tautien biomarkkereina.³

2.1 Toimintamekanismit

Nukleaasit katkaisevat yhden kahdesta fosforin ja hapen välisestä sidoksesta (3' tai 5') nukleiinihappopolymeerissä, jolloin tuotteiksi saadaan joko 5'-fosfaatti ja 3'-OH tai 3'-fosfaatti ja 5'-OH (kuva 1).⁴ Fosfodiesterisidokset, jotka muodostavat nukleiinihappojen selkärangan, katkaistaan yleisen happo-emäs-katalyyysin avulla, jossa emäs aktivoi nukleofiilin poistamalla siitä protonin, ja happo helpottaa tuotteen muodostumista protonoimalla lähtevän ryhmän.⁴



Kuva 1. Nukleaasin toimintamekanismi fosfodiesterisidosten katkaisussa. Sininen nukleaasi pilkkoo ketjua 3'-5'- ja punainen 5'-3'-suunnassa. Jos nukleofiili hyökkää 5'-puolelta (a), se katkaisee 3' O-P -sidoksen, jolloin tuotteeksi saadaan 5'-fosfaatti ja 3'-OH-ryhmä.⁴ Vastaavasti jos nukleofiili hyökkää 3'-puolelta (b), se katkaisee 5' O-P -sidoksen, jolloin tuotteeksi saadaan 3'-fosfaatti ja 5'-OH-ryhmä.⁴

Nukleiinihappojen fosfodiesterisidosten katkeaminen tapahtuu yleensä spontaanisti S_N2 -mekanismilla. Reaktio voidaan jakaa kolmeen vaiheeseen, jotka ovat nukleofiilin hyökkäys, negatiivisesti varautuneen penta-kovalenttisen välituotteen muodostuminen ja kovalenttisen sidoksen katkeaminen.⁴ Hyökkääviä nukleofiilejä ovat yleisimmin vesimolekyylit, jotka deprotonoituvat emäksen avulla. Myös DNA:n tai RNA:n 3'-pään hydroksyyli-ryhmä voi toimia nukleofiilina esimerkiksi RNA:n silmukoinnissa, DNA-juosteen siirrossa tai hiusneularakenteen muodostumisessa. Näiden lisäksi seriinin, tyrosiinin ja histidiinin sivuketjut sekä RNA:n tai vapaiden ribonukleotidien 2'-hydroksyyli-ryhmä voivat toimia nukleofiileinä. Kun 3'-pään fosforin ja hapen välinen sidos katkeaa, muodostuu 5'-fosfaatti ja 3'-OH, mikä vaatii sen, että nukleofiili sijaitsee 5'-puolella. Kun penta-kovalenttinen välituote muodostuu, 5'-pään happi siirtyy keskitasolle, joka koostuu fosforista ja kahdesta ei-sitovasta hapesta. Samaan aikaan hyökkäävä nukleofiili ja 3'-pään lähtävä ryhmä asettuvat bipyramidin vastakkaisille kärkipisteille. Katkaistussa tuotteessa fosforin stereokonfiguraatio kääntyy tässä yksivaiheisessa reaktiossa. Vaikka nukleiinihapon fosfaatti on akiraalinen kahden ei-sitovan hapen vuoksi, konfiguraation kääntyminen voidaan havaita, jos toinen ei-sitovasta hapesta korvataan raskaalla isotoopilla tai rikillä. Fosforin

palauttaminen alkuperäiseen konfiguraatioonsa vaatii kaksivaiheisen reaktion, joka tapahtuu, jos entsyymien ja nukleiinihapon välinen kovalenttinen välituote muodostuu. 3'-fosfaatti ja 5'-OH muodostuvat reaktiosta, jos reaktiokonfiguraatio käännetään ja nukleofiili hyökkää fosfaatin 3'-puolelta.⁴

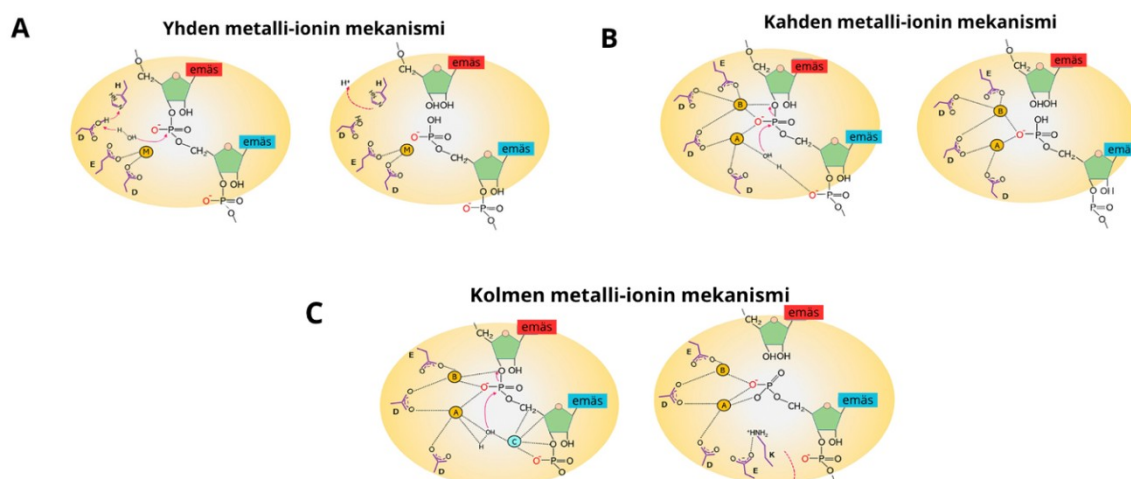
2.2 Spesifisyys ja substraattivaatimukset

Nukleasien luokitteluun ei ole yksinkertaista tapaa, koska ne muodostavat hyvin monimuotoisen ryhmän.³ Ne voidaan kuitenkin jakaa eri luokkiin niiden ominaisuuksien, kuten niiden substraatin pilkkomisominaisuuksien, biologisten toimintojen, biokemiallisten mekanismien tai niiden sekvenssin, laskostumisen ja aktiivisen kohdan rakenteen perusteella. Yleisesti ne jaetaan rakenteen ja toiminnan samankaltaisuuden mukaan perheisiin ja superperheisiin.³

Ensimmäinen tapa luokitella on substraattipreferenssin mukaan. Sen perusteella nukleasit voidaan jakaa DNAaseihin, jotka pilkkovat DNA:ta, ja RNAaseihin, jotka pilkkovat RNA:ta. Joillakin nukleaseilla ei ole tällaista sokerispesifisyyttä, jolloin ne pystyvät pilkkomaan sekä DNA:ta että RNA:ta. Nukleasit voivat olla spesifisiä pilkkomaan yksi- tai kaksijuosteisia nukleiinihappoja tai molempia. Joillain nukleaseilla on myös sekvenssispesifisyyttä. Esimerkiksi restriktioendonukleasit pilkkovat kaksijuosteista DNA:ta ja tunnistavat tietyn sekvenssin erittäin spesifisesti.³

Toinen luokittelutapa jakaa nukleasit endo- ja eksonukleaseihin.³ Eksonukleasit pilkkovat nukleiinihappoa ketjun päästä yksi nukleotidi kerrallaan. Endonukleasit puolestaan hajottavat nukleiinihapon keskeltä ketjua tuottaen oligonukleotidituotteita. Eksonukleasit voidaan jakaa vielä kahteen kategoriaan sen mukaan, pilkkovatko ne ketjua 5'- vai 3'-päästä. Jotkut eksonukleasit pystyvät hajottamaan DNA:ta molemmista suunnista. Eksonukleasin pilkkoessa nukleiinihappoa tuotteeksi saadaan joko mono- tai oligonukleotideja. Koska endo- ja eksonukleaseilla on samankaltainen kemiallinen pilkkomismekanismi (kuva 1), jotkut nukleasit voivat toimia sekä endo- että eksonukleasina käyttäen samaa aktiivista kohtaa. Esimerkiksi MRE11, joka osallistuu kaksoisjuosteen katkeaman (engl. *Double strand break*, DSB) korjaukseen, pilkkoo kaksijuosteista DNA:ta 3'-5' eksonukleasina ja yksijuosteista DNA:ta endonukleasina.³

Monet nukleasit ovat metalli-ioniriippuvaisia eli ne tarvitsevat metallikationeja, kuten Mg^{2+} ja Ca^{2+} , mahdollistamaan katalyyttisen aktiivisuuden (kuva 2).⁴ Myös Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} ja Cu^{2+} voivat toimia kofaktoreina katalyyttiselle aktiivisuudelle. Metallioniriippuvaisten nukleasien tapauksessa metalli-ionit deprotonoivat vesimolekyylit nukleofiilisen hyökkäyksen helpottamiseksi. Metallionit myös stabiloivat välituotteita fosforin siirtoreaktioissa.⁴



Kuva 2. Metallioniriippuvainen katalyysi. A) Yhden metalli-ionin mekanismissa metalli-ioni (M) sitoutuu kahteen säilyneeseen karboksylaattiin vakauttaen reaktion väliuotetta.⁸ B) Kahden metalli-ionin mekanismissa P-O3⁻-sidoksen hydrolyysi perustuu kahteen metalli-ioniin (A ja B). Metalli-ioni A aktivoi vesimolekyylin, jolloin se toimii nukleofiilina ja hyökkää katkaistavaan fosfaattiin. Metalli-ioni B edistää fosforyyliryhmän siirtymistä. C) Kolmen metalli-ionin mekanismi toimii samalla tavalla kuin kahden metalli-ionin mekanismi, mutta kolmas metalli-ioni C sitoutuu hetkellisesti ja toimii yhteistyössä metalli-ioni A:n kanssa aktivoitakseen veden nukleofiilisen hyökkäyksen.⁸ ”Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut Frontiers in Microbiology, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC-BY) (8).”

2.3 Biokemiallinen ja lääketieteellinen merkitys

Nukleaasit osallistuvat moniin solun elintärkeisiin toimintoihin, kuten virheiden korjaamiseen DNA:ssa, Okazakin fragmenttien muokkaukseen ja DNA-väliuotteiden pilkkomiseen.⁹ Ne ovat keskeisiä myös apoptoosissa eli ohjelmoidussa solukuolemassa, joka on välttämätön kehitykselle, homeostaasille ja puolustautumiselle virusinfektioita vastaan.¹⁰ Rakennespesifiset nukleaasit ovat keskeisiä kolmessa tärkeässä prosessissa liittyen Okazakin fragmenttien muokkaukseen, jotka ovat RNA-alukkeiden poisto, DNA-katkosten käsittely ja Holliday-liitosten (engl. *Holliday junction*) purkaminen. Lisäksi ne osallistuvat kaksijuosteisten DNA-säikeiden katkosten rekombinaatiokorjaukseen.¹¹ Kaksi nukleaasiluokkaa hajottavat solun DNA:ta apoptoosin aikana, soluautonomiset ja jätehuollon nukleaasit. Soluautonomiset, kuolevan solun DNA:ta pilkkovat nukleaasit, kuten kaspasi-aktivoitu DNAasi (engl. *Caspase-activated DNase*, CAD), eivät ole välttämättömiä apoptoosille, mutta niiden aktiivisuus liittyy siihen. CAD on tärkeä kromatiinin tiivistymisessä ja DNA:n pilkkoutumisessa apoptoosin aikana. Jätehuollon nukleaasit, kuten DNAasi II, ovat elintärkeitä eliölle, koska ne hajottavat apoptoosin seurauksena vapautunutta DNA:ta joko fagosytoivissa soluissa tai solunulkoisessa ympäristössä eritettynä entsyyminä. Monissa apoptoottisissa soluissa tapahtuu solunsisäinen

happamoituminen, minkä takia on ehdotettu, että DNAasi II vapautuisi lysosomeista ja pilkkoisi tuman DNA:ta.¹⁰

Nukleaasien fysiologinen merkitys viittaa siihen, että niiden epätyypillinen toiminta voi johtaa erilaisten sairauksien kehittymiseen, mikä tekee niistä potentiaalisia biomarkkereita.³ Esimerkiksi bakteerien nukleaasit ovat tärkeitä bakteeri-infektioiden diagnostiikassa.² Bakteerien nukleaasien monimuotoisuus, kyky hajottaa sekä luonnollisia nukleinihappoja (DNA ja RNA) että kemiallisesti modifioituja nukleotideja sekä niiden vaihtelevat biokemialliset ja katalyyttiset ominaisuudet, kuten substraattipreferenssi, sekvenssispesifisyys, kationiriippuvuus ja termostabiilisuus, tekevät niistä lupaavia ehdokkaita diagnostisiksi biomarkkereiksi.² Nukleaasiaktiivisuutta on käytetty esimerkiksi *Salmonella*-bakteerien tunnistamiseen.³ On myös kehitetty nopea testi virtsatieinfektioiden diagnosointiin hyödyntämällä *Escherichia coli* -bakteerin endonukleaasi I -aktiivisuutta biomarkkerina. Tässä substraattina toimi spesifinen nukleinihappokoetin, joka pilkkoutui virtsanäytteissä kyseisen bakteerin nukleaasin vaikutuksesta.³

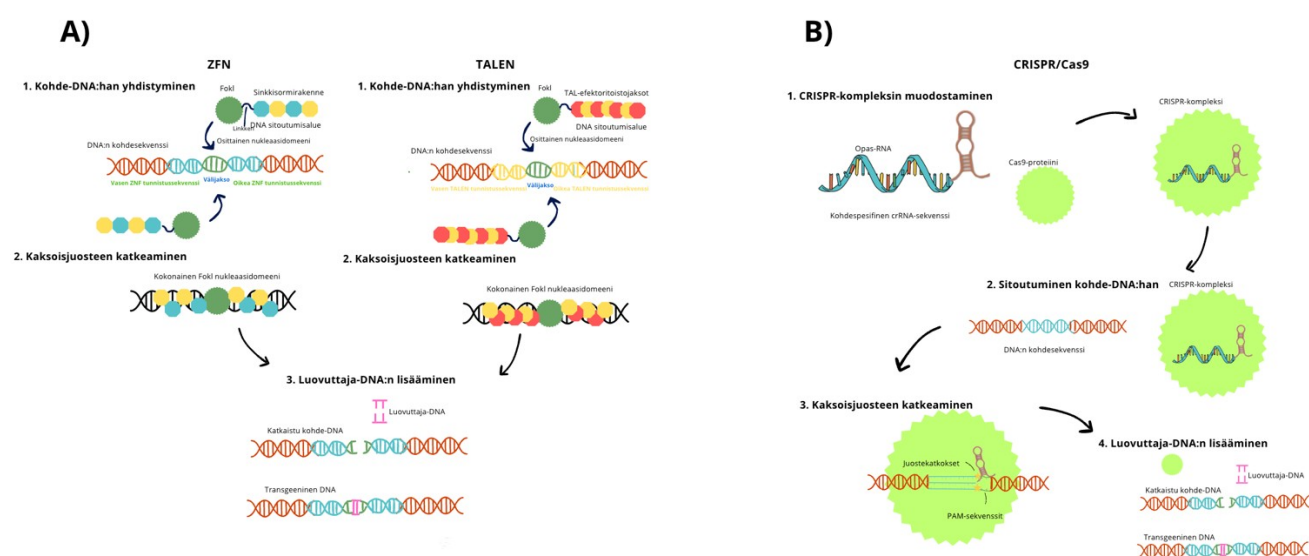
Nukleaasit voivat toimia myös syövän biomarkkereina niiden runsaan solunsisäisen ja solunulkoisen saatavuuden ja niiden katalyyttiseen entsyymaattiseen aktiivisuuden takia.¹ Esimerkiksi DNAasi I fenotyypin 2 korkean esiintyvyyden ja mahalaukun syövän välillä on todettu yhteys, minkä takia sitä on ehdotettu biomarkkeriksi tunnistamaan henkilöt, jolla on riski kyseisen syövän kehittymiseen. Toinen esimerkki mahdollisesta syöpäbiomarkkerista on TREX2 (engl. *Three prime repair exonuclease*), jonka puutos hiirille tehdyissä tutkimuksissa on havaittu johtavan ihosyöpään, kun hiiri altistetaan ultraviolettia B säteilylle tai DNA-vaurioita aiheuttavalle karsinogeenille. Tämä havainto liittyy siihen, että vaurioituneen DNA:n hajoaminen ja poistaminen on heikentynyt. Tutkimuksesta pääteltiin, että TREX2 edistää keratinosyyttien solukuolemaa sekä tulehdus- ja immuunivastetta. Tällöin se estää keratinosyyttien aiheuttamaa karsinogeneesiä, ja estää syövän syntymistä.¹

Solunulkoisten nukleaasien, kuten DNase I, DNase IL1 ja DNase IL3, puutteet voivat altistaa autoimmunisairauksille. Ne säätelevät verenkierrossa olevan soluvapaan DNA:n tasapainoa. Esimerkiksi DNAasi I -entsyymien häiriöt ovat yhteydessä systeemiseen lupus erythematosukseen (SLE) siten, että kyseisen sairauden perinnöllistä muotoa sairastavilta henkilöiltä on löydetty mutatoitunut DNase IL3 -entsyymi, jolla ei ole nukleaasiaktiivisuutta.³

Nukleaaseilla on merkitys myös lihavuuden kehittämisessä ja kaihien patogeneesissa.³ Makrofagien transmembraaninen kinaasi-endoribonukleaasi-1 α (IRE1 α) -reitti on yhteydessä lihavuuteen. Hiirille tehdyissä tutkimuksissa selvisi, että IRE1 α :n poisto esti lihavuuden ja diabeteksen kehittymisen, jolloin IRE1 α voisi olla terapeuttinen kohde metabolisen oireyhtymän ja lihavuuden hoidossa.³ DNAasi 2 β -entsyymiä esiintyy sekä hiirillä että ihmisillä linssisoluisissa, ja se katalysoi tumallisen DNA:n hajoamista erilaistumisprosessin aikana. Tehdyssä tutkimuksessa DNAasi 2 β poistogeenisille hiirille kehittyi harmaakaihi, koska hajottamatonta DNA:ta kertyi linssisoluihin DNAasi 2 β -geenin puutoksen takia.³

2.4 Hyödyntäminen bioteknologiassa ja lääketieteessä

Nukleaaseja voidaan hyödyntää laajasti sekä bioteknologiassa että lääketieteessä. Geenien toiminnan ymmärtäminen on erityisen tärkeää, jotta voidaan kehittää terapeuttisia strategioita sairauksien tunnistamiseen.¹² Genomin muokkaus perustuu sellaisten nukleaasien käyttöön, jotka on suunniteltu leikkaamaan tiettyjä genomin kohdealueita. Geenien toiminnan ymmärtämiseksi on kehitetty kohdennettuja menetelmiä, jotka vähentävät geenien tai proteiinien endogeenistä ilmentymistä.¹² Nämä menetelmät mahdollistavat geenien ja proteiinien toiminnan syvällisemmän ymmärtämisen elävässä solussa. Näiden lisäksi on kehitetty teknologioita, jotta genomia voidaan muokata tarkasti pelkän transkriptiotason säätelyn sijaan. Tällaisia teknologioita ovat esimerkiksi sinkkisorminukleaasit (engl. *Zinc finger nucleases*, ZFN), TALENit (engl. *Transcription activator-like effector nucleases*, TALENs) ja CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*)/Cas9-tekniikka, jotka aiheuttavat DNA:n kohdesekvenssiin kaksijuosteisia katkoja. Solu korjaa nämä katkokset kahdella mahdollisella mekanismilla, jotka on esitetty alla (kuva 3). Kaikkia näitä tekniikoita voidaan hyödyntää tiettyjen DNA-sekvenssien muokkaamiseen monenlaisissa solutyypeissä.¹²

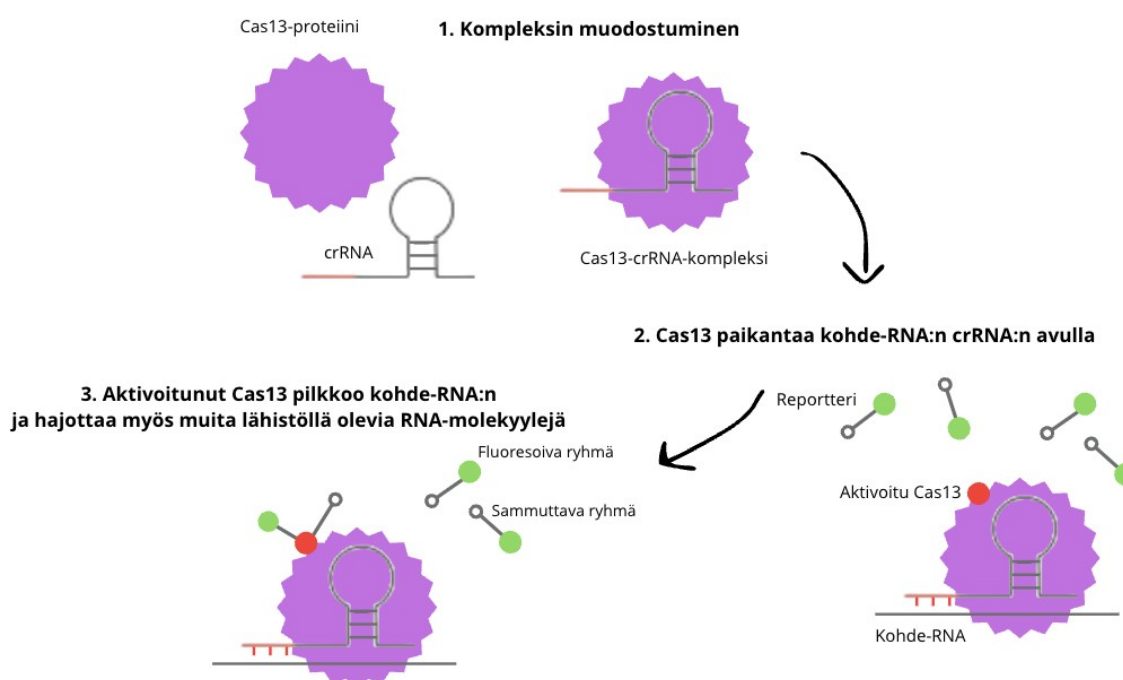


Kuva 3. Genomin muokkaus ZFN-tekniikalla, TALENeilla ja CRISPR/Cas9-tekniikalla. A) Sinkkisorminukleasirakenteessa on FokI -endonukleasi ja joukko sinkkisormisidontadomeeneja, jotka tunnistavat DNA:n kohdesekvenssin.¹² Kaksi sinkkisorminukleasia aiheuttavat DNA:han kaksijuosteisen katkoksen, johon voidaan lisätä ulkopuolinen luovuttaja-DNA, minkä seurauksena syntyy transgeeninen DNA-sekvenssi. TALEN-menetelmä eroaa ZFN:stä siten, että siinä käytetään sinkkisormidomeenien sijaan TAL-efektoritoistojaksoja kohdistamaan nukleasi tarkasti haluttuun sekvenssiin. B) CRISPR/Cas9-tekniikassa yksijuosteinen opas-RNA ohjaa Cas9-endonukleasin haluttuun kohtaan genomissa, missä se katkaisee DNA:n kaksijuosteisen. Luovuttaja-DNA voi korvata katkaistun alueen ja muodostaa transgeenisen sekvenssin. Jos luovuttaja-DNA:ta ei lisätä, solu korjaa

katkoksen itse, mikä voi aiheuttaa nukleotidien lisääntymistä tai poistumista ja siten häiritä geenin normaalia toimintaa.¹² ”Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut National Library of Medicine, ja jota voidaan jatkelevittää ja muokata Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported -lisenssillä (CC BY-NC-SA 3.0) (12).”

CRISPR-Cas13 on RNA:lle suunniteltu CRISPR/Cas9 vastaava tekniikka, joka koostuu Cas13-proteiinista ja CRISPR-RNA:sta (crRNA).¹³ crRNA:n sitoutuminen johtaa kohde-RNA:n katkaisun lisäksi myös muiden lähistöllä olevien yksijuosteisten RNA-molekyylien pilkkoutumiseen (kuva 4) Sekvenssispesifinen mutta epäspesifisesti RNA:ta laajasti hajottava CRISPR-Cas13-tekniikka voi tutkimusten mukaan mahdollisesti estää faagien lisääntymistä tuhoamalla kaikki solun RNA:t. Se voi myös mahdollisesti suojata naapurisoluja esimerkiksi aiheuttamalla solun lepotilan tai kuoleman. CRISPR-Cas13-tekniikalla pystytään samanaikaisesti pilkkomaan sekä kohde-RNA:ta että ei-kohde-RNA:ta. Tätä ominaisuutta on hyödynnetty laajasti esimerkiksi tautien hoidossa, virustartuntojen ehkäisemisessä ja puuttuvan toiminnan mutaatioiden (engl. *loss of function mutants*) seulonnassa.¹³

CRISPR-Cas13



Kuva 4. CRISPR-Cas13-tekniikka, jossa kohde-RNA pilkotaan Cas13-proteiinilla crRNA:n ohjaamana. Cas13-crRNA-kompleksin muodostumisen jälkeen Cas13 paikantaa kohde-RNA:n crRNA:n avulla.¹³ Kun crRNA sitoutuu kohde-RNA:han, Cas13 aktivoituu. Aktivoitunut Cas13 pilkkoo kohde-RNA:n ja hajottaa satunnaisesti myös muita lähistöllä olevia RNA-molekyylejä. Tämä havaitaan reportterirRNA:iden avulla, joilla on fluoresoivia ja sammuttavia ryhmiä molemmissa päissä.¹³ ”Kuva on mukailtu

kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut National Library of Medicine, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC-BY) (13).”

Genomin muokkaus teknologiat, erityisesti CRISPR/Cas9, ovat antaneet tutkijoille kyvyn manipuloida genomisia sekvenssejä.¹⁴ Näitä nukleaaseja käytetään mallisolulinjojen luomiseen, metabolisten reittien muokkaamiseen, transgeenisten eläinten ja kasvien tuottamiseen, genomi laajuisiin toiminnallisiin seulontoihin sekä erityisesti ihmisten sairauksien hoitoon, joita ei pystytä perinteisillä lääkkeillä hoitamaan. Nukleaasien tehokkuuden ja spesifisyyden parantamiseen kliinisissä sovelluksissa on panostettu huomattavasti, mutta turvalliset ja tehokkaat nukleaasin kuljetustavat kohdesolun sisälle ovat edelleen suurin este terapeuttiselle genomin muokkaukselle. Lisäksi nukleaasi-indusoitujen homologisten rekombinaatioiden (engl. *homology directed repair*, HDR) alhainen tehokkuus vaikeuttaa tarkkojen geenikorjausten tekemistä *in vivo*. Koska nukleaasien genomin tunnistus on epäspesifistä, tapahtuu ei-toivottua DNA:n katkaisua, mikä aiheuttaa myös ongelmia.¹⁴

3 *In vitro* -mittausmenetelmät nukleasiaktiivisuudelle

Nukleasien aktiivisuuden *in vitro* -mittausmenetelmät voidaan jakaa esimerkiksi erotukseen perustuviin standardimenetelmiin ja erotusvapaisiin menetelmiin. Nukleasiaktiivisuutta mitataan kontaminaatioiden havaitsemiseksi, lääkekehityksen tueksi ja biomarkkereiden tunnistamiseksi.¹ Geelielektroforeesi, HPLC, elektrokemialliset mittaukset ja ELISA eli entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) ovat esimerkkejä perinteisistä heterogeenisistä erotukseen perustuvista standardimenetelmistä.¹⁵ Näissä menetelmissä on kuitenkin useita ongelmia, kuten hitaus, korkea DNA:n kulutus, epäjatkuvuus sekä työläys.¹⁵ Jotta nämä ongelmat saataisiin ratkaistua, on kehitetty paljon uusia homogeenisia menetelmiä. Tutkielmassa käsitellään erilaisia menetelmiä, jotka perustuvat erotukseen tai ovat erotusvapaita. Erotusvapaita menetelmiä ovat esimerkiksi nukleinihappoihin sitoutuvat leimat, FRET-pohjaiset menetelmät ja absorbanssiin perustuvat menetelmät. Absorbanssiin perustuvilla menetelmillä oligonukleotidin katkaisu havaitaan visuaalisesti ja kvantitatiivisesti.¹⁶ Elektrokemialliset menetelmät sen sijaan perustuvat oligonukleotidin pilkkoutumisesta aiheutuviin sähkövirran muutoksiin, jotka pystytään mittaamaan.¹⁷

3.1 Erotukseen perustuvat standardimenetelmät

Erotukseen perustuvia *in vitro* standardimenetelmiä nukleasiaktiivisuuden mittaamiseen ovat esimerkiksi HPLC, geelielektroforeesi ja elektrokemialliset menetelmät. Erotus voidaan tehdä kromatografisesti¹⁸, sähköisen varauksen ja koon perusteella elektroforeesissa¹⁹ tai analysoimalla sähkökemiallisia muutoksia, jotka aiheutuvat nukleasin pilkkoessa substraattia.¹⁷ HPLC:ssa hydrolysoituneet nukleotidit pystytään kvantifioimaan tarkasti¹⁸, geelielektroforeesilla nähdään visuaalisesti nukleinihapon rakenteelliset muutokset¹⁹ ja elektrokemiallisissa menetelmissä hyödynnetään esimerkiksi ferroseeniä sähkökemiallisten muutosten havaitsemiseksi.¹⁷

3.1.1 Korkean erotuskyvyn nestekromatografia

HPLC on analyttinen menetelmä, joka perustuu näytteen komponenttien erilaiseen vuorovaikutukseen liikkuvan ja paikallaan pysyvän faasin kanssa.¹⁸ Näyte liuotetaan sopivaan liuottimeen ja ruiskutetaan kolonniin, joka sisältää paikallaan pysyvän faasin. Näytteen komponentit liikkuvat kolonnin läpi eri nopeuksilla, jolloin ne erottuvat toisistaan. Erottuminen havaitaan detektorilla ja tuloksena saadaan kromatogrammi, joka esittää komponenttien esiintymisajat ja pitoisuudet. HPLC sopii nukleasiaktiivisuuden mittaamiseen, koska se erottelee sekvenssin pituuden mukaan.¹⁸

On kehitetty nukleasi P1/HPLC-menetelmä, joka perustuu siihen, että DNA hydrolysoidaan nukleasi P1:llä ja muodostuneet 2'-deoksinukleosidi 5'-monofosfaatit määritetään HPLC:llä UV-detektoria käyttäen.²⁰ Menetelmä soveltuu myös epäpuhtaan DNA:n kvantifointiin, ja sitä testattiin vasikan kateenkorvan DNA:lla, sian maksan DNA:lla ja hiiren ihon DNA:lla. Saatuja tuloksia verrattiin

happohydrolyysi/HPLC-menetelmään, UV-absorbanssiin ja väriaineen sitoutumiseen. Nukleaasi P1/HPLC-menetelmän tulokset erosivat UV-absorbanssin ja väriaineen sitoutumisen kanssa, mutta olivat yhdenmukaisia happohydrolyysi/HPLC-menetelmän kanssa. Nukleaasi P1 pilkkoo DNA:n yksittäisiksi 2'-deoksinukleosidi 5'-monofosfaateiksi, jotka erotetaan HPLC:llä. HPLC-kromatogrammista nähdään kutakin nukleotidia eli adeniinia, guaniinia, sytosiinia ja tymiiniä vastaavat huiput. Näitä huippuja verrattiin standardinäytteisiin, jotka sisälsivät tunnetun määrän nukleotideja, ja ne mitattiin UV-absorbanssin avulla. Analysoidun näytteen DNA-konsentraatio saadaan HPLC-huippujen perusteella käyttäen neljän standardinukleotidin kalibrointikäyrää. Tämä menetelmä ei kuitenkaan ole suositeltava hyvin pienille DNA-määrille, koska tulokset eivät välttämättä ole luotettavia tällä tasolla. Menetelmässä tehty oletus siitä, että DNA on puhdasta, voi myös aiheuttaa ongelmia, koska vaikka katkaisu olisi havaittavissa epäpuhtaudet voivat vaikeuttaa tarkkaa kvantifiointia ja siten vaikuttaa tulosten luotettavuuteen.²⁰

3.1.2 Geelielektroforeesi

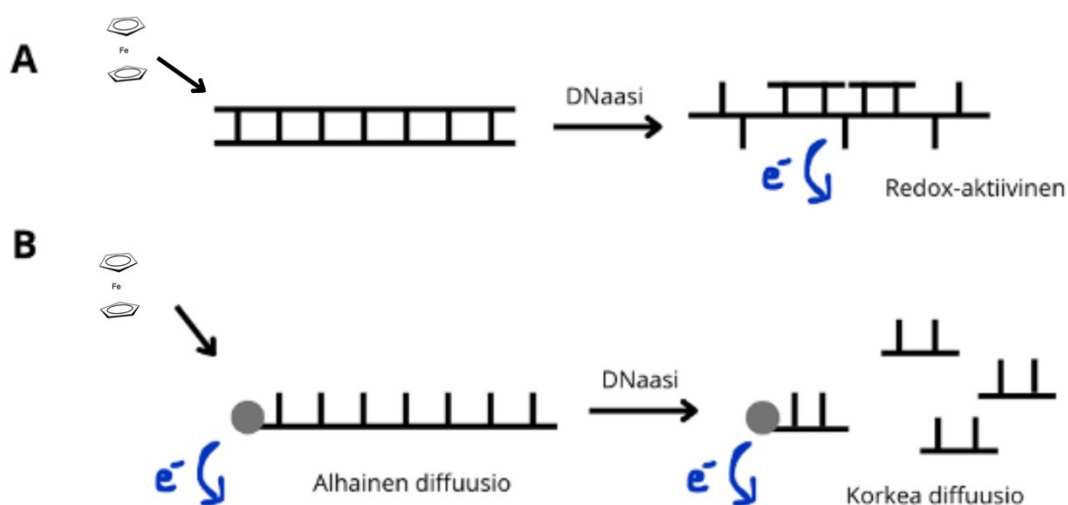
Geelielektroforeesia käytetään erikokoisten nukleinihappojen visualisointiin ja erotteluun.¹⁹ Esimerkiksi DNA:n erottelu tapahtuu sähkökentän avulla, jossa negatiivisesti varautunut DNA liikkuu katodilta kohti anodia, kun jännite asetetaan. Erotteluun käytetään erityyppisiä geelejä, kuten agarosigeeliä, joka sisältää huokosia. DNA-molekyylit kulkevat näiden huokosten läpi fragmentin koon mukaan. Suuremmat fragmentit liikkuvat vähemmän, kun pienemmät fragmentit pystyvät liikkumaan helpommin ja kulkevat siksi pidemmän matkan.¹⁹ Tämä ero liikkumisnopeudessa mahdollistaa esimerkiksi endonukleasiaktiivisuuden kvantitatiivisen analyysin.²¹

Tutkimuksissa on hyödynnetty agarosigeelielektroforeesia esimerkiksi erottamaan yksisäikeinen rengasmainen DNA ja sen lineaarinen muoto.²¹ Endonukleasin pilkkoessa yksisäikeistä rengas-DNA:ta saadaan lineaarista DNA:ta, ja näiden kahden muotoerot havaitaan geelikuvassa, koska ne liikkuvat sähkökentässä eri nopeuksilla. Rengasmainen DNA liikkuu geelissä hitaammin kuin sen lineaarinen muoto. Havaittiin myös, että sekä rengasmaisessa että lineaarisessa DNA:ssa DNA:n määrä korreloi nukleasin aktiivisuuden kanssa eli mitä enemmän nukleasia, sitä enemmän lineaarista DNA:ta. Menetelmää voidaan helposti soveltaa myös kaksijuosteiseen DNA:han ja RNA-substraatteihin.²¹

Myös RNAasiaktiivisuuden havaitsemiseksi voidaan hyödyntää geelielektroforeesia.²² Esimerkiksi polyakryyliamidigeeliin voidaan upottaa polyanioinista RNA:ta ja lisätä RNAasia, jolloin RNAasi liikkuu geelin läpi ja pilkkoo RNA:ta. Menetelmän herkkyyttä voidaan parantaa lisäämällä spermiiniä, joka neutraloi RNA:n negatiivisen varauksen. Tällöin RNAasiaktiivisuus voidaan havaita nano- tai pikogrammamääristä, kun geeli värjätään ja pilkotut alueet näkyvät värittöminä.²²

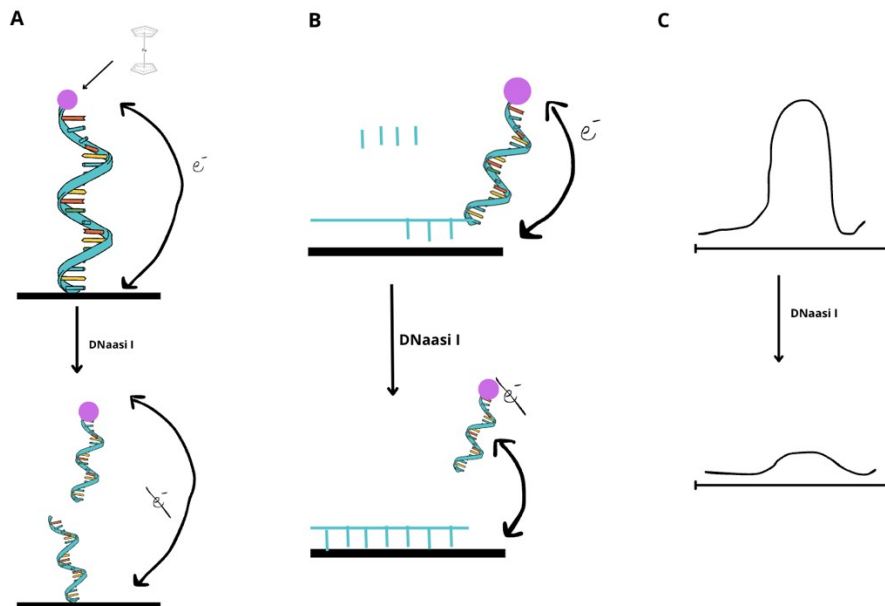
3.1.3 Elektrokemialliset menetelmät

Elektrokemiallisia menetelmiä voidaan käyttää esimerkiksi DNAasi- ja RNAasiaktiivisuuden mittaamiseen.¹⁷ Ne ovat hyödyllisiä sairauksiin liittyvien entsyymien havaitsemisessa. Ne ovat nopeita, helppokäyttöisiä ja vaativat vain kompaktin laitteiston. Ne eivät myöskään ole herkkiä näytteiden epäpuhtauksille. Elektrokemiallinen nukleasiaktiivisuuden havaitseminen perustuu esimerkiksi nukleasiaktiivisuuden paljastamien ferroseenilla modifioitujen oligonukleotidien emästen suoraan redox-reaktioon (kuva 5A), ferroseenien diffuusion (kuva 5B), ferroseeniryhmän irtoamiseen elektrodilta nukleasi-substraatin pilkkoutumisen seurauksena ja emästen suoraan tunnistamiseen nukleasiaktiivisuuden ja hydrolyysin jälkeen.¹⁷ Edellä mainituissa menetelmissä virran väheneminen tai muutos kuvastaa nukleasiaktiivisuutta. Yleisesti elektrokemiallisissa menetelmissä nukleasi pilkkoo oligonukleotidirakenteen, mikä johtaa muutoksiin elektrodille sitoutuneessa ferroseenissa tai suoraan emästen redox-reaktioissa. Kun nukleasi pilkkoo ferroseenilla modifioitua DNA:ta, paljastuu emäksiä, jotka voivat osallistua redox-reaktioihin. Tämä aiheuttaa muutoksen sähkövirrassa, mikä voidaan mitata (kuva 5A). Ferroseeni on elektrokemiallisesti aktiivinen, jolloin sen diffuusio vaikuttaa mitattavaan sähkövirtaan. Ferroseeni voidaan yhdistää oligonukleotidiin, jolloin syntyy FcODN-rakenne (kuva 5B). Kun nukleasi pilkkoo FcODN:n, ferroseeni vapautuu liuokseen, jolloin virta vähenee.¹⁷



Kuva 5. Elektrokemialliset menetelmät nukleasiaktiivisuuden havaitsemiseksi voivat perustua esimerkiksi A) nukleasin hajotuksessa paljastuvien ferroseenilla modifioitujen oligonukleotidien emästen suoraan redox-reaktioon tai B) ferroseenien diffuusion, kun nukleasi on pilkkonut kohdemolekyylin.¹⁷ ”Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut MDPI Sensors, ja jota voidaan jatkovittata ja muokata Creative Commons Attribution License 3.0 -lisenssillä (CC-BY) (17).”

FcODN-rakenne voidaan kiinnittää elektrodille Au-S-sidosten tai elektrodin pinnalla tapahtuvien sytosiini- ja aminoryhmien reaktioiden avulla (kuva 6).¹⁷ Kun lisätään DNAasi I, se pilkkoo ferroseenioligonukleotidifragmentin ja vapauttaa sen elektrodilta. Tällöin ferroseenin määrä vähenee, jolloin virran voimakkuus laskee. Virran voimakkuuden lasku kertoo DNAasi I:n aktiivisuudesta.¹⁷

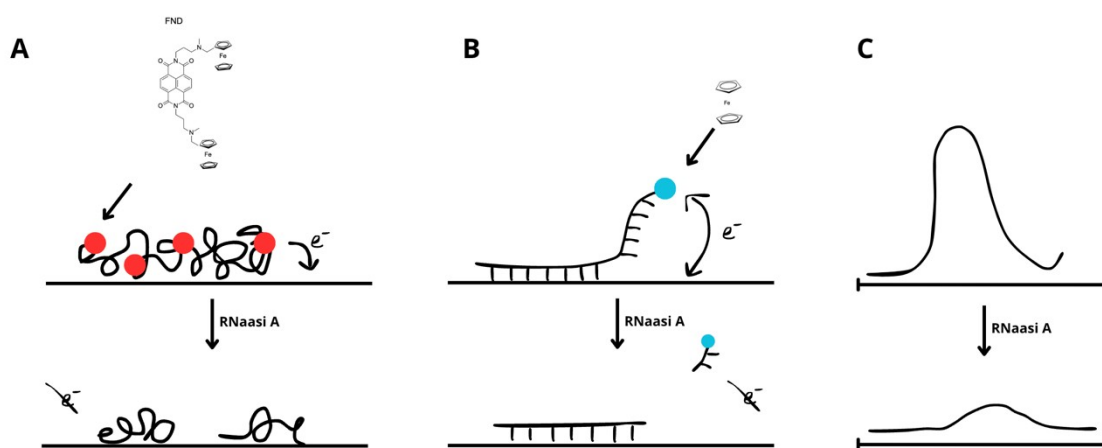


Kuva 6. Ferroseenilla modifioitu oligonukleotidi, joka on kiinnitetty elektrodin Au-S-sidoksen kautta ja sytosiini-oligonukleotidin reaktio aktivoidun esterin kanssa elektrodilla. A) Oligonukleotidi, jonka päähän on liitetty ferroseeni, on kiinnitetty elektrodin Au-S-sidoksen avulla.¹⁷ Ferroseeni tuottaa sähkövirran, ja kun DNAasi I hajottaa oligonukleotidin, ferroseeni irtoaa ja virta heikkenee. B) Sytosiinia sisältävä oligonukleotidi on kiinnitetty elektrodin aktivoidun esterin avulla. C) Molemmissa menetelmissä (A ja B) virta heikkenee kuvaajan mukaisesti, kun DNAasi I hajottaa oligonukleotidia.¹⁷ ”Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut MDPI Sensors, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 3.0 -lisenssillä (CC-BY) (17).”

DNAasi I voidaan myös havaita muodostamalla DNA:sta kompleksi positiivisesti varautuneen polymeerin kanssa.¹⁷ Kun negatiivisesti varautunut DNA muodostaa kompleksin positiivisesti varautuneen polymeerin kanssa, DNA:n varaus neutraloituu. Kun DNAasi I pilkkoo DNA:ta, tämän negatiivisesta DNA:sta ja positiivisesta polymeeristä koostuvan kompleksin rakenne heikkenee ja sen varaus menee epätasapainoon, koska DNA:n pilkkoutuessa negatiivista varausta on vähemmän. Tämä varauksen epätasapaino tuottaa sähkömagneettisen voiman, joka havaitaan elektrokemiallisesti. DNAasi I:n aktiivisuus havaitaan siis sähkömagneettisen voiman muutoksena, joka syntyy DNA:n ja polymeerin kompleksissa ennen ja jälkeen DNAasi I pilkkomisen.¹⁷

RNAasiaktiivisuuden havaitsemiseen käytetään elektrodin kiinnitettyä RNA:ta (kuva 7A) tai FcODN-rakennetta, jossa ribonukleosidiyksikkö on kiinnitetty sytosiinilla aktivoidulle esterielektrodille (kuva 7B). Lisäksi voidaan käyttää kronopotentimetriä mittauksia grafiittikynäelektrodilla.¹⁷ FND

(engl. *ferrocenyl naphthalene diimide*) on DNA-dupleksin indikaattori, joka voi sitoutua elektrodiin kiinnitettyyn mRNA:han. Kun tämä lasihiilelektrodi käsiteltiin RNAasi A:lla, mRNA:n määrä väheni elektrodilla. RNAasi A:n aktiivisuus ilmenee virran vähenemisenä. Toinen tapa havaita RNAasiaktiivisuus on kiinnittää FcODN-rakenne elektrodille sytosiinien ja aktivoitujen esteriryhmien kanssa. Kun RNAasi A pilkkoo elektrodilla FcODN:stä ribonukleosidisyksikön, ferroseenin sisältävät FcODN-fragmentit vapautuvat. Tällöin virta vähenee, mikä toimii indikaattorina RNAasi A:n aktiivisuudelle (kuva 7C). Kolmas tapa on käyttää sellaisia oligonukleotidejä, jotka on kiinnitetty magneettisiin helmiin. RNAasi A:n pilkkoutumisen ja guaniinin puriiniosan poistamisen jälkeen guaniiniemäkset erotetaan magneettisista helmistä. Erotetut emäkset havaitaan kronopotentiometrillä mittauksilla grafiittikynäelektrodilla. RNAasi A:n aktiivisuus arvioitiin guaniiniemäksistä mitatun virran huipun perusteella.¹⁷



Kuva 7. RNAasin detektio, jossa A) mRNA on kiinnitetty lasihiilelektrodiin tai B) FcODN-rakenne on kiinnitetty elektrodille sytosiinien ja aktivoitujen esteriryhmien kanssa.¹⁷ C) Virran intensiteetti laskee RNAasi A:n aktiivisuuden kasvaessa.¹⁷ ”Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut MDPI Sensors, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 3.0 -lisenssillä (CC-BY) (17).”

3.2 Erotusvapaat menetelmät

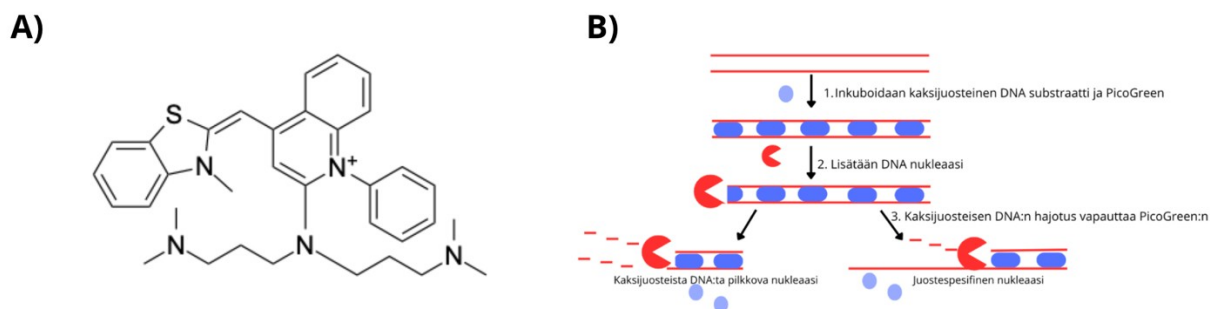
Erotusvapaisissa menetelmissä nukleasiin aktiivisuus mitataan ilman erottelua esimerkiksi signaalin muutoksen perusteella. Nukleasiaktiivisuus *in vitro* mitataan yleisimmin perustuen luminesenssiin esimerkiksi nukleiinihappoihin sitoutuvilla leimoilla tai FRET-pohjaisilla menetelmillä. Luminesenssilla tarkoitetaan ilmiötä, jossa aineessa olevat atomit, molekyylit tai ionit emittoivat optista säteilyä, joka ylittää tietyillä aallonpituuksilla tai spektrin alueilla saman aineen lämpösäteilyn kyseisessä lämpötilassa.²³ Tämä ilmiö tapahtuu, kun hiukkaset virittyvät energialla, joka ei perustu

lämpöliikkeeseen.²³ Nukleiinihappoihin sitoutuvat leimat, FRET-pohjaiset menetelmät ja absorbanssiin perustuvat menetelmät ovat esimerkkejä erotusvapaista menetelmistä.

3.2.1 Nukleiinihappoihin sitoutuvat leimat

Nukleiinihappoihin sitoutuvat leimat mahdollistavat nukleiinihappojen havaitsemisen ja kvantifioinnin.²⁴ Ne ovat molekyylejä, jotka sitoutuvat spesifisesti nukleiinihappojen rakenteisiin, ja tuottavat havaittavan signaalin. Ne voivat interkalatoitua kaksijuosteiseen DNA:han, asettua uriin tai ne voivat muodostaa komplekseja yksijuosteisten rakenteiden kanssa.²⁴ Interkalaatiolla tarkoitetaan jonkin yhdisteen, kuten väriaine PicoGreenin, kykyä sitoutua DNA:n kaksoiskierteeseen emäsparien väliin. Prosessissa DNA:n kierteinen rakenne häiriintyy, koska interkalatoituva leima aiheuttaa sitoutuessaan konformaatiomuutoksia, mikä aiheuttaa DNA:n purkautumisen ja pitenemisen.²⁵ Interkalatoituvia leimoja hyödynetään esimerkiksi syöpähoidoissa, molekyylikoettimissa ja geenien säätelyssä.²⁵ Tärkeimpiä ominaisuuksia leimalle ovat herkkyys, havaitsemisnopeus, stabiilisuus sekä leiman ja siihen liittyvien reagenssien kokonaiskustannukset.²⁴ Leimat voidaan kiinnittää suoraan tai leimausjärjestelmän kautta nukleiinihappoihin. Nukleiinihappoihin sitoutuvia leimoja ovat esimerkiksi fluoroforit, kuten karboksifluoreseiini (FAM) ja syaniinit Cy3 ja Cy5, jotka emittoivat valoa spesifisellä aallonpituudella, kun ne liitetään kovalenttisesti oligonukleotideihin. Ne eivät siis pysty sitoutumaan spontaanisti nukleiinihappoihin, kuten interkalatoituvat väriaineet. Niitä pystytään hyödyntämään esimerkiksi reaaliaikaisessa PCR:ssä (polymeraasiketjureaktio), jossa fluorofori on yhdistetty lyhyeen DNA tai RNA koettimeen, jonka toinen pää sisältää myös sammuttajan. Polymeraasi hajottaa koetinta, jolloin fluorofori vapautuu ja sen signaali voimistuu, mikä mahdollistaa reaaliaikaisen mittauksen.²⁴

Tutkimuksissa on kehitetty menetelmä, joka perustuu DNA-dupleksirakenteen purkautumiseen tai muodostumiseen (kuva 8).²⁶ Menetelmässä muodostuu PicoGreen (PG)-DNA-kompleksi, jonka DNA-dupleksirakenne hajoaa nukleaasin pilkkoessa kompleksia. PG (kuva 8A) interkalatoituu kaksijuosteiseen DNA:han, jolloin se emittoi syntyneen fluoresoivan signaalin. Jos leima ei ole sitoutunut, signaali on huomattavasti heikompi. Tämän signaalin voimakkuus voidaan mitata reaaliajassa. Signaali riippuu kuitenkin käytetystä leimasta, ja fluoresenssin voimakkuuteen vaikuttaa ympäristön olosuhteet, kuten lämpötila ja pH. Piirretystä standardikäyrästä nähtiin, että PG sitoutuu yksijuosteiseen DNA:han heikommin kuin kaksijuosteiseen. Menetelmä on kestävä, monikäyttöinen ja joustava, koska se toimii eri suolapitoisuuksissa ja lämpötiloissa.²⁶



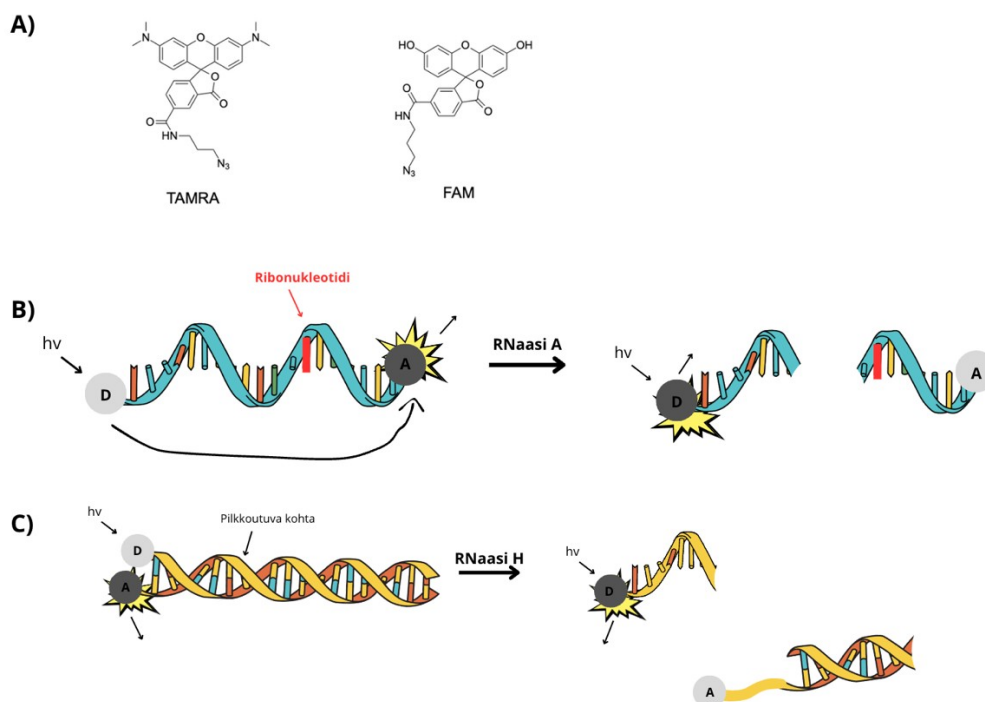
Kuva 8. Interkalatoituvan väriaineen, PicoGreenin, rakennekaava ja toiminta nukleasiaktiivisuusmäärityksessä. A) PicoGreenin rakennekaava.²⁷ B) Menetelmä, jossa PG (sininen) interkalatoituu kaksijuosteiseen DNA:han (punainen) ja emittoi fluoresoivan signaalin. PG-DNA-kompleksin DNA-dupleksirakenne hajoaa, kun nukleasi (punainen) pilkkoo kompleksia. Tämä johtaa signaalin heikkenemiseen (haalea sininen), mikä voidaan mitata reaaliajassa.²⁶ Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut Scientific Reports, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC-BY) (26).²⁷

PG:tä hyödyntävää menetelmää pystytään laajentamaan myös RNA nukleasien tutkimukseen.²⁶ Koska PG tuottaa hyvin heikon fluoresenssisignaalin RNA:n läsnäollessa, RNA-nukleasien tutkimiseen on käytetty Quant-It (QI) mikro-RNA väriainetta, joka tunnistaa erityisesti lyhyitä RNA-molekyylejä sekä muita nukleinihappoja. Tutkimuksessa havaittiin, että RNAasi A pilkkoo tehokkaasti yksijuosteista RNA:ta, mutta ei osoittanut aktiivisuutta kaksijuosteiselle RNA:lle, RNA:DNA-hybrideille tai kaksijuosteiselle DNA:lle. RNAasi H puolestaan pilkkoo RNA:ta satunnaisesti eri kohdista RNA:DNA-hybrideissä, mutta ei osoita affiniteettia yksijuosteiselle tai kaksijuosteiselle RNA:lle eikä kaksijuosteiselle DNA:lle. Sekä PG:n että QI:n täysi potentiaali reaktion etenemisen reaaliaikaisessa visualisoinnissa on kuitenkin edelleen rajallinen.²⁶

3.2.2 FRET-pohjaiset menetelmät

Peruseriaatteeltaan FRET-pohjaiset menetelmät ovat prosesseja, jotka perustuvat energiansiirtoon virittyneen luovuttajamolekyylin ja perustilassa olevan vastaanottajamolekyylin välillä.³ Luovuttajamolekyylin absorboi virittyessään fotonin ja siirtyy perustilasta virittyneelle energiatasolle. Tämä johtaa siihen, että energia siirtyy vastaanottajamolekyylille, joka absorboi sen ja emittoi signaalin palatessaan takaisin perustilaan. FRETin toteutuminen vaatii kolme ehtoa, jotka ovat luovuttajan emissiospektrin ja vastaanottajan absorptiospektrin päällekkäisyys, niiden riittävän lyhyt etäisyys toisistaan ja niiden oikea keskinäinen suuntautuminen.³ Edellä mainitut ehdot on tiivistetty monista tekijöistä, jotka vaikuttavat FRETin tehokkuuteen.²⁸

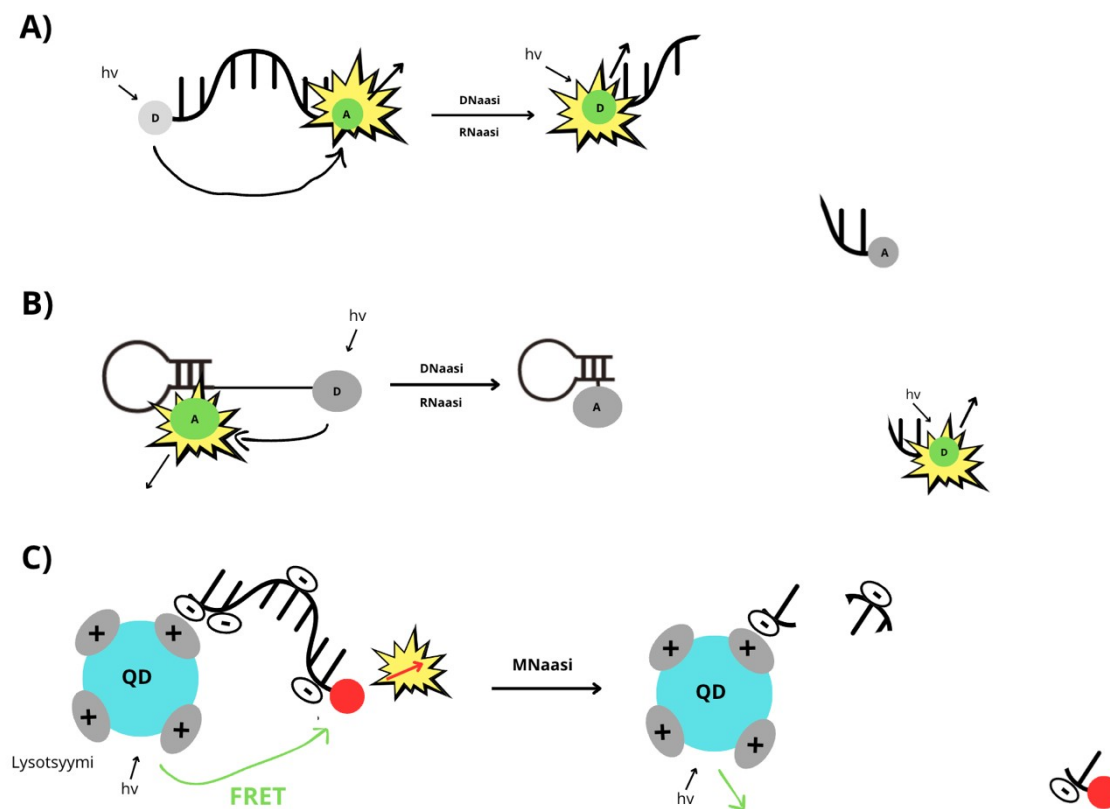
RNAasi A -aktiivisuuden havaitsemiseksi on kehitetty FRET-koetin, jossa on kaksi kromoforia (6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA) (kuva 9A).¹⁷ TAMRA (tetrametyyli-rodamiini) -sammuttaja estää FAMin fluoresenssin, mutta kun RNAasi A pilkkoo ribouridiinikohtaa, sammutus vähenee (kuva 9B). Toinen esimerkki fluoresenssikoettimesta RNAasille kostuu fluoreskeinilla merkitystä RNA-juosteesta ja dabcyyl-DNA-juosteesta muodostuvasta kaksoiskierteestä. Dabcyyl hyödyntää fluoresenssin sammuttamiseen FRET-ilmiötä, mutta fluoresenssi palautuu, kun RNAasi H pilkkoo RNA-juostetta DNA-RNA-hybridissä (kuva 9C).



Kuva 9. FRET-koettimen kahden kromoforin rakennekaavat ja RNAasiaktiivisuuden detektio FRET-koettimilla. A) TAMRAn ja FAMin rakennekaavat.¹⁷ B) RNAasi A:n detektio FRET-koettimella, jossa TAMRA-sammuttaja estää FAMin fluoresenssin. C) RNAasi H:n detektio FRET-koettimella, joka muodostuu fluoreskeinilla merkitystä RNA-juosteesta ja dabcyyl-DNA-juosteesta muodostuvasta kaksoiskierteestä.¹⁷ ”Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut MDPI Sensors, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 3.0 -lisenssillä (CC-BY) (17).”

Myös DNAasiaktiivisuuden havaitsemiseksi on kehitetty FRET-pohjaisia menetelmiä, jossa oligonukleotideihin on liitetty fluorofori ja sammutin (kuva 10A).¹⁷ Kun näytteeseen lisätään DNAasia, oligonukleotidi pilkkoutuu ja vapauttaa kromoforit, jolloin sammutus vähenee ja kuvastaa DNAasiaktiivisuutta. Tätä FRET-koetinta on paranneltu lisäämällä hiusneulamuotoisia DNA-sekvenssejä ja korvaamalla osa fosfaattiryhmistä fosforitiolilla (kuva 10B). Myös MNaasiaktiivisuuden havaitsemiseen voidaan hyödyntää FRETiä. MNaasia on pystytty havaitsemaan perustuen

sähköstaattiseen vuorovaikutukseen FRETissä positiivisesti varautuneiden kvanttipisteiden (QD) ja negatiivisesti varautuneen väriaine leimatun yksisäikeisen DNA:n välillä (kuva 10C).¹⁷



Kuva 10. DNAasiaktiivisuuden havaitsemiseen FRET-koettimia. A) FRET-koettimien sammumisen purkautuminen ja B) osittain fosforotioaatilla modifioitujen hiuspinnimäisten FRET-koettimien sammumisen purkautuminen.¹⁷ C) MNaasin havaitseminen elektrostaattisen vuorovaikutuksen kautta FRET-menetelmällä, jossa QD:t ja negatiivisesti varautuneet väriaineella (punainen) merkatut yksijuosteiset DNA:t vuorovaikuttavat.¹⁷ Kuva on mukailtu kopio avoimen julkaisun artikkelista, jonka on julkaissut MDPI Sensors, ja jota voidaan jatkolevittää ja muokata Creative Commons Attribution License 3.0 -lisenssillä (CC-BY) (17).”

On myös kehitetty herkkä ja leimaamaton nukleaasiaktiivisuuden mittaamenetelmä, joka perustuu konjugoidun polymeerin (CP), DNA:n ja joko interkalatoituvan tai muulla tavalla sitoutuvan väriaineen yhdistelmään.¹⁵ Menetelmässä hyödynnetään FRETiä, jossa CP siirtää energiaa interkalatoituvalla väriaineelle, kun DNA tuo leimat lähekkäin. Kun DNA pilkkoutuu nukleaasiaktiivisuuden seurauksena, se ei enää tuo leimoja lähelle toisiaan, mikä aiheuttaa FRETin tehokkuuden heikkenemisen. Tämä mahdollistaa nukleaasin vaikutuksen seuraamisen fluoresenssimuutosten avulla. Menetelmä on monikäyttöinen, koska siinä voidaan käyttää substraattina sekä kaksi- että yksijuosteista DNA:ta, ja vaihtamalla DNA-sekvenssiä pystytään tunnistamaan erilaisia nukleaaseja. Menetelmä on nopea, herkkä ja siinä ei tarvita monimutkaisia DNA-koettimien modifikaatioita. Tällä menetelmällä pystytään havaitsemaan nukleaasiaktiivisuutta paremmalla herkkyydellä eikä siihen tarvita esimerkiksi

kromoforeimattuja DNA-substraatteja. Menetelmää pystytään hyödyntämään myös DNA:n pilkkoutumisen visuaaliseen havaitsemiseen UV-valon alla, kun DNAasi I pilkkoo DNA:ta, joka näkyy fluoresenssin heikkenemisenä kirkkaasta himmeäksi.¹⁵

3.2.3 Absorbanssiin perustuvat menetelmät

Absorbanssiin perustuvia menetelmiä ovat esimerkiksi kultananohiukkasiin perustuva kolorimetrinen menetelmä ja metyyli vihreä-DNA-kompleksiin perustuva menetelmä. Kultananohiukkasiin perustuvalla kolorimetrisellä absorbanssia hyödyntävällä mittausmenetelmällä voidaan määrittää endonukleaasiaktiivisuutta.¹⁶ Mallientsyyminä käytettiin DNAasi I:stä, joka katalysoi kaksijuosteisen DNA:n katkaisun. Menetelmässä tapahtuu kultananopartikkelien värimuutos, joka johtuu partikkelien aggregaatiosta ja joka voidaan havaita absorbanssista. Aggregaatio johtuu DNA:n hybridisaatiosta eli juosteiden pariutumisesta, joka yhdistää kultananohiukkaset toisiinsa. Ilman DNAasi I:tä kultananopartikkelit aggregoituvat natriumkloridin läsnäollessa, mikä aiheuttaa liuoksen sinisen värin. Analyytin eli DNAasi I läsnäollessa kultananopartikkelit eivät aggregoidu vaan pysyvät hajallaan, koska DNAasi pilkkoo DNA:n pienemmiksi yksiköiksi, jolloin hybridisaatiota ei enää tapahdu ja liuos säilyttää punaisen värin. Tämä menetelmä mahdollistaa DNAasi I:n aktiivisuuden visuaalisen ja homogeenisen mittauksen ilman lisämuokkauksia tai monimutkaisia detektoreita. Nämä ominaisuudet tekevät tästä menetelmästä yksinkertaisen ja kustannustehokkaan. Menetelmässä voi kuitenkin esiintyä myös haasteita esimerkiksi herkkyteen ja spesifisyyteen liittyen. Vaikka menetelmän kerrotaan olevan erittäin herkkä, se saattaa olla altis häiriöille esimerkiksi muiden entsyymien läsnä ollessa, mikä voi vaikuttaa tulosten luotettavuuteen etenkin alhaisissa pitoisuuksissa. Menetelmää voi rajoittaa mahdollisesti näytteessä olevat muut aineet, jotka vaikuttavat kultananohiukkasten aggregaatioon. Lisäksi menetelmän työläisyys on haaste.¹⁶

DNAasiaktiivisuutta voidaan mitata myös perustuen metyyli vihreä-DNA-kompleksiin.²⁹ Metyyli vihreä sitoutuu kaksijuosteiseen DNA:han muodostaen stabiilin kompleksin, joka absorboi valoa 630 nm aallonpituudella. Metyyli vihreä vapautuu ja absorbanssi pienenee, kun DNAasi hajottaa DNA:ta, koska metyyli vihreä ei enää pysty sitoutumaan pilkkoutuneeseen DNA:han. Absorbanssi pienenee, koska vapautunut metyyli vihreä ei absorboi valoa samalla tavalla kuin kompleksiin sitoutuneena. Absorbanssin muutos on suoraan verrannollinen DNAasiaktiivisuuteen siten, että mitä aktiivisempi nukleaasi on, sitä enemmän DNA pilkkoutuu ja sitä suurempi absorbanssin lasku havaitaan. Menetelmän avulla voidaan kvantifioida tarkasti DNAasiaktiivisuutta.²⁹

4 Tulevaisuuden näkymät

Vaikka uusia nukleaaseja löydetään vuosittain ja monien nukleaasien rakenne tunnetaan, niiden katalyyttinen mekanismi on silti usein epäselvä.⁴ Lisäksi hiljattain löydettyillä nukleaaseilla on uudenlaisia sekvenssimotiiveja, minkä takia niiden rakenteita ei voida mallintaa aiemmin tunnetuilla nukleaaseilla. Myös esimerkiksi mRNA:n silmukoinnista ja prosessoinnista sekä eksoniliitoskompleksin ja virheellisen lopetuksen aiheuttama hajotus ovat edelleen osittain epäselviä. Edellä mainittujen seikkojen takia on selvää, että tulevaisuuden löydöt tulevat laajentamaan ymmärrystä näistä monimuotoisista ja elämälle välttämättömistä entsyymeistä.⁴

Syövän varhainen diagnosointi on edelleen merkittävä kehityskohde, vaikka diagnostiikassa on saavutettu paljon viime vuosikymmeninä.¹ Varhaiseen diagnosointiin kehitetyt biomarkerit eivät ole ongelmattomia, koska ne eivät tarjoa riittävää herkkyttä tai spesifisyyttä yksittäisinä tekijöinä. Tämä voitaisiin tulevaisuudessa ratkaista kehittämällä sellaisia nukleiinihappokoettimia, joilla on parannettu herkkyys ja spesifisyys. Tämä saataisiin aikaan siten, että koettimia paranneltaisiin kunkin seulontakierroksen ehdokas oligonukleotidisekvenssin perusteella.¹ Nukleaasien katalyyttinen aktiivisuus voisi toimia monikäyttöisenä diagnostisena biomarkerina kliinisessä mikrobiologiassa.² Näillä biomarkkereilla voitaisiin saada ratkaistua jotkut diagnostiikan nykyisistä haasteista, kuten pitkä diagnosointiaika, heikentynyt tarkkuus, korkeat kustannukset ja monimutkaisuus. Nukleaasien hyödyntäminen kliinisessä tutkimuksessa voisi myös edistää täysin uusien menetelmien kehittymistä, kuten *in vivo* -bakteerien tunnistamista ja visualisointia.²

Genomin muokkaustekniikat, kuten ZFN, TALEN ja CRISPR/Cas9, tarjoavat uusia mahdollisuuksia hoitaa esimerkiksi syöpiä ja infektioitauteja.¹⁴ Suurimpia haasteita tuottavat kuitenkin edelleen turvallinen ja tehokas kuljetus kohdesoluihin erityisesti *in vivo* -sovelluksissa sekä se, että HDR on tehotonta useimmissa ihmisen soluissa.¹⁴

Useilla eri *in vitro* -menetelmillä on lupaavia tulevaisuuden näkymiä diagnostiikan sovelluksiin ja lääkeaineiden seulontaan. Esimerkiksi elektrokemialliset menetelmät ovat osoittautuneet hyödyllisiksi sairauksien, kuten rintasyövän, diagnostiikassa, mutta niidenkin tuloksiin voi vaikuttaa mahdolliset häiriöt muista näytekomponenteista, mikä voi heikentää toistettavuutta.¹⁷ Interkalatoituvaa väriainetta, PicoGreeniä, hyödyntävä menetelmä tarjoaa lupaavia tulevaisuuden näkymiä esimerkiksi nukleaasiaktiivisuuksien karakterisoinnissa.²⁶ Haasteita tässä menetelmässä tuottavat näytteiden monimutkaisuus ja mahdolliset häiriöt muista komponenteista.²⁶ FRET-pohjaiset menetelmät ovat hyödyllisiä lääkeaineiden seulonnassa ja sairauksien diagnosoinnissa, mutta ne soveltuvat vain endonukleaaseille ja voivat olla alttiita näytteiden epäpuhtauksille ja häiriöille, jotka voivat vaikuttaa mittaustuloksiin. Nukleaasiaktiivisuuden *in vitro* -mittausmenetelmät tarvitsevat edelleen tutkimusta ja kehitystä menetelmien herkkyyden, spesifisyyden ja kustannustehokkuuden parantamiseksi. Myös menetelmien nopeutta ja helppokäyttöisyyttä on kehitettävä, jotta niiden kaupallistaminen ja kliininen käyttöönotto olisi mahdollista.

5 Yhteenveto ja johtopäätökset

Nukleaasit muodostavat erittäin monimuotoisen entsyymiryhmän, jonka merkitys ulottuu solun perustoiminnoista kehittyneisiin genomin muokkausteknologioihin. Niitä on mahdollista hyödyntää laajasti bioteknologiassa ja lääketieteessä, koska niiden toimintaperiaatteet ja spesifisyys vaihtelevat laajasti. Bioteknologiassa niistä on tehty sovelluksia esimerkiksi genomin muokkaukseen. Lääketieteessä niitä hyödynnetään esimerkiksi biomarkkereina erilaisten sairauksien diagnosoinnissa.

Genomin muokkaustekniikoiden, erityisesti CRISPR/Cas -tekniikoiden, kehittymisen ansiosta nukleaasit ovat herättäneet kiinnostusta lupaavina työkaluina geenitoimintojen ymmärtämiseen ja sairauksien hoitoon. Haasteena näissä tekniikoissa on kuitenkin turvallisuus ja tarkkuus, mitä voitaisiin parantaa esimerkiksi kuljetusmekanismien kehittämisellä.

In vitro -mittausmenetelmien kehittyminen voi mahdollistaa nukleaasien laajemman käytön bioteknologiassa ja lääketieteessä. Näissä menetelmissä on kuitenkin haasteita esimerkiksi herkkyteen ja spesifisyyteen liittyen, minkä takia näiden menetelmien kliininen hyödyntäminen ei ole vielä mahdollista. Nukleaasien tutkimus ja uusien mittausmenetelmien kehitys tulee varmasti jatkumaan tulevaisuudessa, jotta nykyiset epäselvät asiat, kuten hiljattain löydettyjen nukleaasien rakenne, ja mittausmenetelmien ongelmat, saadaan ratkaistua. *In vitro* -mittausmenetelmien herkkyyttä, nopeutta ja kustannustehokkuutta on edelleen parannettava, jotta nukleaasien aktiivisuuden mittaus on tehokasta ja luotettavaa. Kun löydetään uusia nukleaaseja ja kehitetään entistä tarkempia analyysimenetelmiä, nukleaaseja voidaan hyödyntää entistä tehokkaammin ja laajemmin esimerkiksi biomarkkereina ja genomin muokkauksessa.

Lähteet

1. Balian, A. & Hernandez, F. J. Nucleases as molecular targets for cancer diagnosis. *Biomarker Research* **vol. 9** (2021).
2. Garcia Gonzalez, J. & Hernandez, F. J. Nuclease activity: an exploitable biomarker in bacterial infections. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **vol. 22** 265–294 (2022).
3. Balian, A. *Nuclease Activity As a Biomarker in Cancer Detection*. **vol. 2265**. Väitöskirja, Linkopings Universitet, 2022.
4. Yang, W. Nucleases: Diversity of structure, function and mechanism. *Q Rev Biophys* **44**, 1–93 (2011).
5. Tieteentermipankki. ‘Topoisomeraasi.’ Saatavilla: <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:topoisomeraasi>. Viitattu 12.3.2025.
6. Tieteentermipankki. ‘Ribotsyymi.’ Saatavilla: <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Mikrobiologia:ribotsyymi>. Viitattu 12.3.2025.
7. Tieteentermipankki. ‘Rekombinaatio.’ Saatavilla: <https://tieteentermipankki.fi/wiki/Nimitys:rekombinaatio>. Viitattu 12.3.2025.
8. Pang, J., Guo, Q. & Lu, Z. The catalytic mechanism, metal dependence, substrate specificity, and biodiversity of ribonuclease H. *Front Microbiol* **13**, 1034811 (2022).
9. Marti, T. M. & Fleck, O. DNA repair nucleases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **vol. 61** 336–354 (2004).
10. Samejima, K. & Earnshaw, W. C. Trashing the genome: The role of nucleases during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **vol. 6** 677–688 (2005).
11. Sun, H. *et al.* Structure-specific nucleases in genome dynamics and strategies for targeting cancers. *J Mol Cell Biol* **vol. 16** (2024).
12. Costa, J. R. *ym. Genome Editing Using Engineered Nucleases and Their Use in Genomic Screening* [online]. Teoksessa: Markossian, S., Grossman, A., Arkin, M. *ym.*, toim. Assay Guidance Manual. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company ja National Center for Advancing Translational Sciences, 2004-. Saatavilla: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/> (2017). Viitattu 20.2.2025.
13. Huang, Z., Fang, J., Zhou, M., Gong, Z. & Xiang, T. CRISPR-Cas13: A new technology for the rapid detection of pathogenic microorganisms. *Front Microbiol* **13**, 1011399 (2022).
14. Liu, J. & Shui, S. lan. Delivery methods for site-specific nucleases: Achieving the full potential of therapeutic gene editing. *Journal of Controlled Release* **244**, 83–97 (2016).
15. Pu, F., Hu, D., Ren, J., Wang, S. & Qu, X. Universal platform for sensitive and label-free nuclease assay based on conjugated polymer and DNA/intercalating dye complex. *Langmuir* **26**, 4540–4545 (2010).
16. He, Y., Cheng, F., Pang, D. W. & Tang, H. W. Colorimetric and visual determination of DNase I activity using gold nanoparticles as an indicator. *Microchimica Acta* **184**, 101–106 (2017).

17. Sato, S. & Takenaka, S. Highly sensitive nuclease assays based on chemically modified DNA or RNA. *Sensors (Switzerland)* **vol. 14** 12437–12450 (2014).
18. HPLC Basics | Thermo Fisher Scientific - FI. Saatavilla: https://www.thermofisher.com/fi/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html?erpType=Global_E1. Viitattu 13.4.2025.
19. Gel Electrophoresis - an overview | ScienceDirect Topics. Saatavilla: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/gel-electrophoresis>. Viitattu 13.4.2025.
20. Shimelis, O. & Giese, R. W. Nuclease P1 digestion/high-performance liquid chromatography, a practical method for DNA quantitation. *J Chromatogr A* **1117**, 132–136 (2006).
21. Bieker, J. J. & Dumas, L. B. An easy, quantitative method for detection of endonuclease activity. *Anal Biochem* **108**, 285–289 (1980).
22. Karpetsky, T. P., Davies, G. E., Shriver, K. K. & Levy, C. C. Use of polynucleotide/polyacrylamide-gel electrophoresis as a sensitive technique for the detection and comparison of ribonuclease activities. *Biochemical Journal* **189**, 277 (1980).
23. Luminesenssi. (n.d.). Termipankki. Saatavilla: <https://termipankki.fi/tepa/fi/haku/luminesenssi>. Viitattu: 12.3.2025.
24. Kricka, L. J. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Ann Clin Biochem* **39**, 114–129 (2002).
25. What are DNA intercalators and how do they work? Saatavilla: <https://synapse.patsnap.com/article/what-are-dna-intercalators-and-how-do-they-work?> Viitattu: 31.3.2025.
26. Sheppard, E. C., Rogers, S., Harmer, N. J. & Chahwan, R. A universal fluorescence-based toolkit for real-time quantification of DNA and RNA nuclease activity. *Sci Rep* **9**, (2019).
27. Picogreen | C34H42N5S+ | CID 16071083 - PubChem. Saatavilla: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Picogreen#section=2D-Structure>. Viitattu: 1.4.2025.
28. Zhang, X. *et al.* Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors for biological applications. *Biosens Bioelectron* **138**, 111314 (2019).
29. Sinicropi, D., Baker, D. L., Prince, W. S., Shiffer, K. & Shak, S. Colorimetric Determination of DNase I Activity with a DNA-Methyl Green Substrate. *Anal Biochem* **222**, 351–358 (1994).