



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Sokeriosasta modifioidut nukleosiditriposfaatit ja niiden käyttö bakteerien elintoimintojen tutkimuksessa**

Janica Mäkelä

Bio-organisen kemian tutkimusryhmä  
LuK-tutkielma  
Laajuus: 6 op

05.05.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu  
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä(t):** Janica Mäkelä

**Otsikko:** Sokeriosasta modifioidut nukleosiditriposfaatit ja niiden käyttö bakteerien elintoimintojen tutkimuksessa

**Ohjaaja:** Satu Mikkola

**Sivumäärä:** 16 sivua

**Päivämäärä:** 05.05.2025

---

## Abstrakti

Nukleosiditriposfaatit (NTP) ovat kaikilla eliöillä luonnollisesti esiintyviä molekyyliä. NTP:t ja deoksinukleosiditriposfaatit eli dNTP:t toimivat RNA:n ja DNA:n rakennusyksiköinä. Tässä tutkielmassa keskitytään sokerimodifioituihin eli synteettisiin NTP:ihin. Sokerimodifikaatioihin kuuluvat mm. heteroatomien tai funktionaalisten ryhmien lisääminen sokerirenkaaseen sekä erilaiset silloittuneet rengasrakenteet. Modifioitujen NTP:iden sovelluskohteisiin kuuluvat mm. antisense- ja antigeenioligonukleotidien kehittäminen, antiviraalit nukleosidianalogit ja oligonukleotidien leimaus. Lisäksi puhutaan geneettisen ”aakkoston” laajentamisesta, eli keinotekoisien NTP:iden sisällyttämisestä DNA:han tai RNA:han.<sup>1,4</sup> Johdannossa esitetään lyhyesti esimerkit näistä sovelluksista.<sup>7,8</sup>

Ensimmäinen NTP:iden kemiallinen synteesi raportoitiin vuonna 1949. NTP:iden synteessissä lähtöaineena käytetään tavallisesti nukleosidimonofosfaattia, joka fosforyloidaan erilaisten menetelmien avulla. Synteessin tavanomainen ongelma on 5'-hydroksiryhmän selektiivinen fosforylaatio. Tutkielmassa tutustutaan erilaisiin synteessimenetelmiin, jonka avulla tätä ongelmaa on voitu ratkaista.<sup>4,13</sup>

Tutkielmassa tarkastellaan, kuinka erilaiset sokerimodifioidut NTP:t toimivat sekä luonnollisten, että modifioitujen, eli evoluutiivisesti ohjattujen polymeerasien substraatteina. Sokerimodifioidut NTP:t vaikuttavat merkittävästi bakteerien polymeerasien entsyymattiseen aktiivisuuteen. Tästä johtuen tutkimus on keskittynyt polymeerasien ohjattuun evoluutioon, jonka ansioista sitä voidaan tunnistaa ja käyttää eri polymeerasien substraatteina DNA- ja XNA -synteesiä, replikaatiota ja käänteistranskriptiota varten.<sup>1,19</sup> Tutkielman lopussa tarkastellaan sokerimodifioitua XNA:ita.<sup>7,8</sup>

---

**Avainsanat:** nukleosiditriposfaatti, nukleosidi analogi, sokerimodifikaatio.

# Sisällysluettelo:

## Lyhenteet

### 1 Johdanto

#### 2 NTP:iden synteesi, haasteita ja ratkaisuja

- 2.1) Yhden astian synteesi
- 2.2) NTP:n entsyymiavusteinen synteesi

#### 3 Sokerimodifioidut NTP:t polymeerasien substraatteina

- 3.1) Luonnolliset NTP:t
- 3.2) Silloitetut NTP:t
- 3.3) Sykloheksitoli-NTP:t (CeNTP)
- 3.4) Fluoratut NTP:t
- 3.5) Isonukleosidi ja glyseroli-pohjaiset NTP:t
- 3.6) 4'-alkyyli-substituoidut dTTP:t
- 3.7) 4'-tio- ja 4'-seleno-NTP:t
- 3.8) Heksitolinukleiinihappo

#### 4 Sokerimodifioidut ksenonukleiinihapot

### 5 Yhteenveto

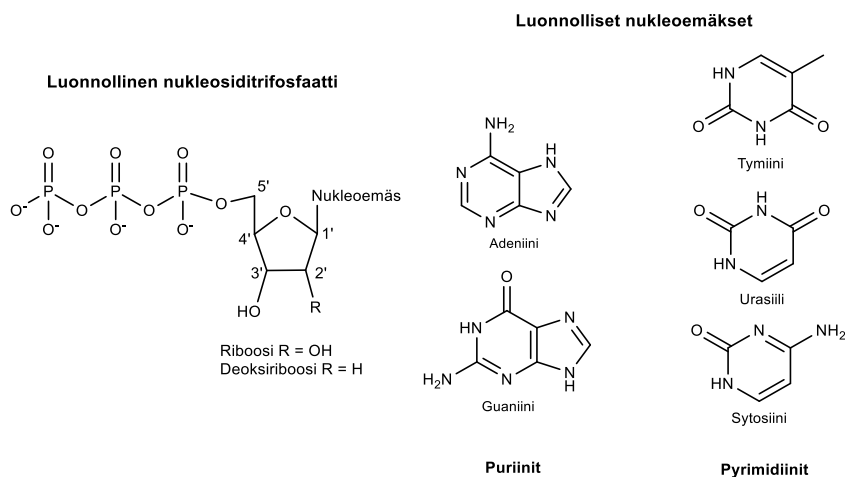
## Lyhenteet:

ACVTP = Asykloviiritrifosfaatti  
AEX = Anion exchange chromatography eli anioninvaihtokromatografia  
ANA = Arabinonukleiinihappo  
Arg = Arginiini  
ATP = Adensiinitrifosfaatti  
CeA = Sykloheksenyliadenosiini  
CeATP = Sykloheksenyliadenosiinitrifosfaatti  
CeNA = Sykloheksenylinukleiinihappo  
CeT = Sykloheksenylylitymidiini  
CuAAC = Kuparikatalysoitu atsidi-alkyyni-sykloadditio  
dAMP = Deoksiadenosiinimonofosfaatti  
dATP = Deoksiadenosiinitrifosfaatti  
dGTP = Deoksiguanosiinitrifosfaatti  
DNA = Deoksiribonukleiinihappo  
DMF = Dimetyyliformamidi  
dNTP = Deoksinukleosiditrifosfaatti  
dTTP = Deoksitymidiinitrifosfaatti  
Bst = *Bacillus stearothermophilus*  
*E. coli* = *Escherichia coli*  
FANA = 2'-fluoroarabinonukleiinihappo  
FNA = Fluorinukleiinihappo  
GNA = Glyserolinukleiinihappo  
HNA = Heksitolinukleiinihappo  
hNTP = Heksitolinukleosiditrifosfaatti  
HSV = *Herpes simplex* virus  
INA = 2'-deoksi-2'-isonukleiinihappo  
iATP = 2'-deoksi-2'-isoadenosiini-5'-trifosfaatti  
iNTP = 2'-deoksi-2'-isonukleosidi-5'-trifosfaatti  
KF = Klenow-fragmentti  
LNA = Lukittu/silloitettu nukleiinihappo  
NTP = Nukleosiditrifosfaatti  
OPS = Yhden astian synteesi / *Engl. One pot synthesis*  
PAP = Poly(A)-polymeraasi  
PCR = Polymeraasiketjureaktio  
RNA = Ribonukleiinihappo  
RNAP = RNA-polymeraasi  
SeTTP = 4'-selenotymidiinitrifosfaatti  
tCfTp = 1,3-diatsa-2-oksofenotiatsiini  
Taq = *Thermus aquaticus*  
TFAA = Trifluorietikkahappoanhydridi  
Tgo = *Thermococcus gorgonarius*  
TNA = Treosinukleiinihappo  
XNA = Ksenonukleiinihappo

# 1 Johdanto

Nukleosiditriposfaatit eli NTP:t (kuva 1) ovat tärkeitä molekyyliä, joita esiintyy luonnostaan kaikilla eliöillä. Tavalliset NTP:t koostuvat kolmesta perusosasta: sokerirenkaasta, negatiivisesti varautuneesta fosfaattiketjusta ja *N*-glykosidisella sidoksella kiinnittyneestä emäsosasta. <sup>1</sup> NTP:iden sokeriosa on tavallisesti riboosi tai deoksiriboosi. Emäsosa koostuu puriinista tai pyrimidiinistä ja fosfaattiketju kolmesta peräkkäisestä fosfaattiryhmästä. <sup>1</sup>

NTP:iden tärkeänä tehtävänä on toimia substraatteina DNA:n ja RNA:n synteesissä. RNA-polymeraasit syntetisoivat RNA:ta NTP:istä, kun taas deoksiribonukleosiditriposfaateista eli dNTP:stä muodostetaan DNA:ta <sup>1</sup>. NTP:itä tarvitaan myös lipidi-, glykogeeni- ja kofaktorisynteesiä varten. <sup>2</sup> Adenosinotriposfaatilla (ATP) on spesifinen rooli elimistössä, ja sitä käytetään soluissa energian vaihdon välineenä. <sup>3</sup> Energian siirrossa fosfaattiketju on tärkeä, sillä sidosten välinen energia on suuri. Näin siis suurin osa ATP:n energiasta on kemiallisesti varastoitu fosfaattiketjuun. <sup>3</sup>

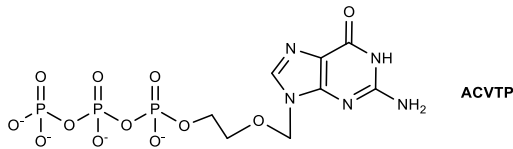


Kuva 1. Luonnollinen NTP ja nukleinihappoemäkset. <sup>1</sup>

NTP:ille voidaan tehdä kemiallisia muokkauksia niiden eri osiin, kuten fosfaattiketjuun, emäsosaan tai sokerirenkaaseen. <sup>1</sup> Sokerimodifioituja NTP:itä on lukuisia erilaisia. Yleisiin muokkauksiin kuuluu mm. sokerirenkaan koon kasvattaminen tai supistaminen sekä sokerirenkaaseen liitettävät funktionaaliset ryhmät. <sup>1</sup>

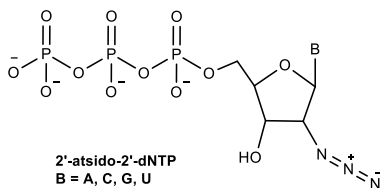
Useiden modifioitujen NTP:iden on todistettu toimivan substraatteina eri DNA-polymeraasien sisällyttämänä. <sup>4</sup> Modifioitujen NTP:iden ja niistä syntetisoitujen oligonukleotiden sovelluskohteisiin kuuluvat mm. antisense- ja antigeenilääkkeiden kehittäminen, oligonukleotidien leimaus ja ns. geneettisen aakkoston laajentaminen. <sup>5</sup> Modifioidut NTP:t voivat toimia pohjana myös ksenonukleinihapolle eli XNA:lle, joka on DNA:n synteettinen variaatio. XNA:t toimivat potentiaalisina terapeuttisina ja bioteknologisina työkaluina. <sup>1,6,7</sup>

Modifioidut nukleotidit voivat olla myös antiviraaleja, kuten esimerkiksi asykloviiritriposfaatti eli ACVTP (kuva 2). <sup>2</sup> ACVTP:tä toimii antiviraalisena lääkeaineena *herpes simplex* -virusta eli HSV:itä vastaan ja se tunnetaan kaupallisesti muun muassa nimellä Zovirax. <sup>8,9</sup> ACVTP:n antiviraalinen aktiivisuus johtuu 3'-hiilen hydroksyyli ryhmän puutteesta, joka estää viruksen DNA-ketjun pidentymisen. <sup>8</sup>



Kuva 2. ACVTP:n rakenne. <sup>2</sup>

Modifioituja nukleotideja voidaan käyttää myös diagnostiikassa. Esimerkiksi fluoresovia 2'-atsido-NTP:itä (kuva 3) voidaan käyttää entsyymiaktiivisuuden tutkimukseen. Fluoresoivien tunnisteiden lisääminen post-synteettisesti CuAAC reaktion avulla mahdollistaa RNA:n detektoimisen sekä RNA:han liittyvien entsyymaattisten mekanismien tutkimisen. <sup>1,10,11</sup> Fluoresoivien nukleosiditrisfosfaattien kehittäminen on helpottanut myös Sangerin sekvensoinnin automatisointia innovatiivisten havaitsemismenetelmien avulla. <sup>1,12</sup>



Kuva 3. 2'-atsido modifioidun NTP:n rakenne. <sup>10</sup>

Tässä tutkielmassa keskitytään sokeriosasta kemiallisesti muokattuihin nukleosiditrisfosfaatteihin, niiden synteesiin ja siihen, kuinka NTP:iden sokerirenkaaseen kohdistuvat muokkaukset vaikuttavat NTP:n ominaisuuksiin. Lisäksi tarkastellaan sitä, kuinka NTP:itä voidaan käyttää bakteerien tutkimuksissa. Lopuksi tarkastellaan lyhyesti sokerimodifioituja ksenonukleiinihappoja.

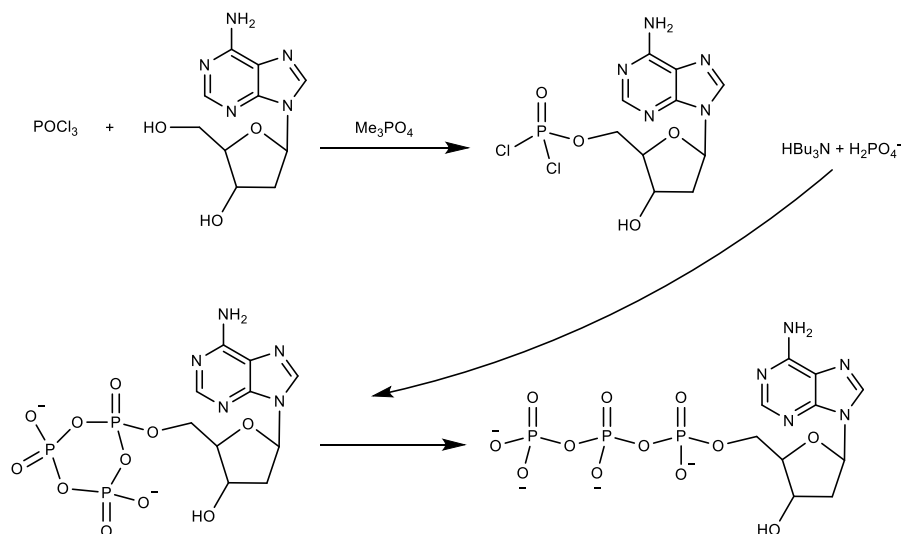
## 2 NTP:iden synteesi, haasteita ja ratkaisuja

Ensimmäiset nukleosiditrisfosfaatit eristettiin maksa- ja lihasoluista vuonna 1929. <sup>13</sup> NTP:n rakenteen selviäminen sekä sen tärkeys soluprosesseissa herätti kemistien kiinnostuksen käyttää synteettisiä analogeja uusien NTP:iden sovelluksien löytämiseen tai keksimiseen. Baddiley ja kollegat <sup>13</sup> raportoivat ensimmäisen kemiallisen NTP-synteesin, joka julkaistiin vuonna 1949. Aluksi synteesit keskittyivät lähinnä luonnollisten NTP:iden valmistukseen. Lähtöaineena käytettiin luonnollista nukleosidimonofosfaattia, joka fosforyloitiin erilaisten reaktioiden avulla. Esimerkiksi Smith ja Khorana <sup>13</sup> syntetisoivat NTP:itä ja dNTP:itä käyttäen nukleosidimonofosfaattia, pyrofosforihappoa ja disykloheksyylikarbodi-imidiä. <sup>4,13</sup>

Suurin osa nukleosideista sisältää useamman hydroksiryhmän, minkä seurauksena 5'-hydroksiryhmän selektiivinen fosforylaatio on hankalaa. Alun perin nukleosidien 5'-fosforylaatioreaktioissa lähtöaineina käytettiin siksi 2'-, 3'-suojattuja nukleosideja trialkyylifosfaattiliuottimessa. <sup>4,13</sup> Myöhemmin huomattiin, että fosfaattiryhmä reagoi selektiivisesti 5'-hiileen suojaamattomilla 2'- ja 3'-nukleosideilla happamissa sekä heikosti emäksisissä olosuhteissa. <sup>4,13</sup>

Yoshikawan metodi <sup>4,13</sup>, joka esitetään mm. kaaviossa 1 on yksi ensimmäisistä NTP:iden synteesistä ja on edelleen suosittu menetelmä. Tässä menetelmässä trimetyylifosfaatin (tai muiden trialkyylifosfaattien) käyttö liuottimena fosforioksidikloridin ( $\text{POCl}_3$ ) kanssa vaikuttaa 5'-hiilen hydroksiryhmän fosforylaation selektiivisyyteen ilman suojaryhmien käyttöä. <sup>4,13</sup> Kaavion 1 menetelmässä nukleosiditrikloorifosfaattiin lisättiin pyrofosforihapon tributyylimmoniumsulua

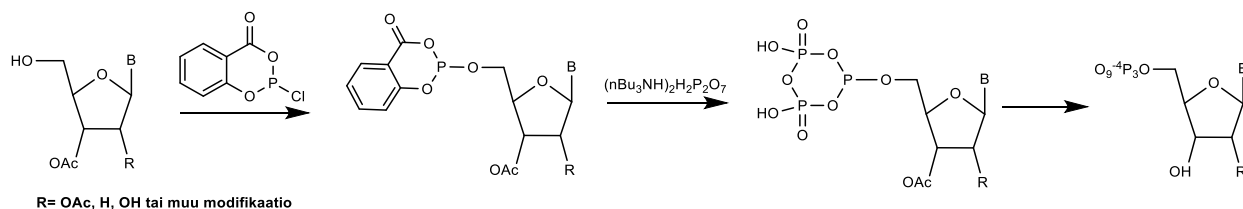
vedettömässä DMF:ssä. Reaktio lopetettiin yhden minuutin kuluttua käyttäen trietyyliammoniumbikarbonaatti-puskuria. Lopputuote puhdistettiin AEX:llä.<sup>13</sup>



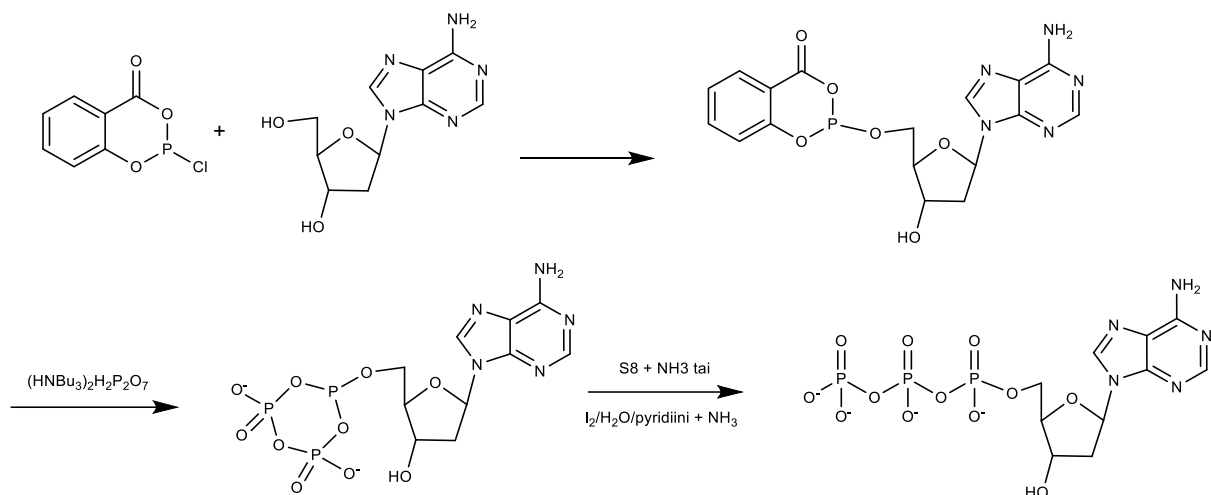
Kaavio 1. 5'-aseman selektiivinen fosforylaatio fosforioksidikloridilla trimetyylifosfaatissa Yoshikawan menetelmääkäyttäen.<sup>13</sup>

## 2.1) Yhden astian synteesi

Yhden astian synteesi (OPS, Engl. "one pot synthesis") tarkoittaa menetelmää, jossa monivaiheiset reaktiot suoritetaan yhdessä reaktioastiassa ilman välierotuksia. OPS:n avulla voidaan tuottaa tiettyjä tuotteita samalla synteesikerralla säätämällä reagenssien määriä. Tehokkuuden, yksinkertaisuuden ja energiankulutuksen ansiosta se on yleistynyt ja laajasti käytetty synteesitapa orgaanisessa kemiassa.<sup>14</sup> Ludwig ja Eckstein<sup>4,13</sup> ovat kehittäneet 1980-luvun loppupuolella OPS-metodeja modifioitujen NTP:iden valmistukseen (kaaviot 2 ja 3). Nämä synteesit sopivat parhaiten 2'-3'-dideoksinukleosideille, sillä fosforylaation selektiivisyys primäärisen ja sekundäärisen hydroksiryhmän välillä on heikko. 2'- ja 3'-hiilen hydroksyyli-ryhmät olisi siis hyvä suojata.<sup>4,13</sup> Ludwigin ja Ecksteinin menetelmässä käytetään tavanomaisesti salisyylifosforikloridiä reagenssina ja fosforyylikloridia liuottimena, joka vaikuttaa 5'-hiilen hydroksyyli-ryhmän selektiiviseen fosforylaatioon.<sup>13</sup> Ludwigin ja Ecksteinin menetelmä tarjoaa edun verrattuna Yoshikawan menetelmään siten, että sen avulla saadaan vähemmän ei-haluttuja sivutuotteita.<sup>4,5</sup>



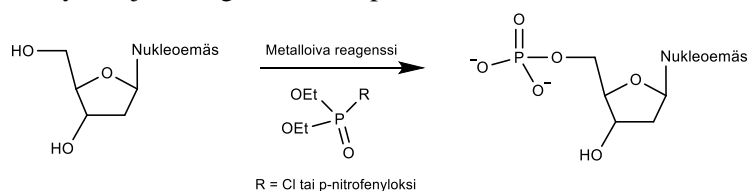
Kaavio 2. Ludwigin ja Ecksteinin menetelmä, jossa suojattu (modifioitu) nukleosidin esiaste reagoi salisyylifosforokloridiin kanssa.<sup>4</sup>



Kaavio 3. Ludwig ja Ecksteinin kehittämä OPS-synteesi, jossa salisyylifosforokloriitti toimii fosforyloivana reagenssina. <sup>13</sup>

Bogachev <sup>13</sup> on kehittänyt oman OPS-synteesin käyttäen trifluoretikkahapponhydriä (TFAA). Reaktiossa käytetään lähtöaineina erilaisia nukleosidimonofosfaatteja, jotka reagoivat TFAA:n kanssa aproottisessa liuotuksessa *N*-metyyli-imidatsolin läsnäollessa. Näille reaktioille lopputuotteiden (NTP:iden) saanto oli 89-92%. <sup>13</sup>

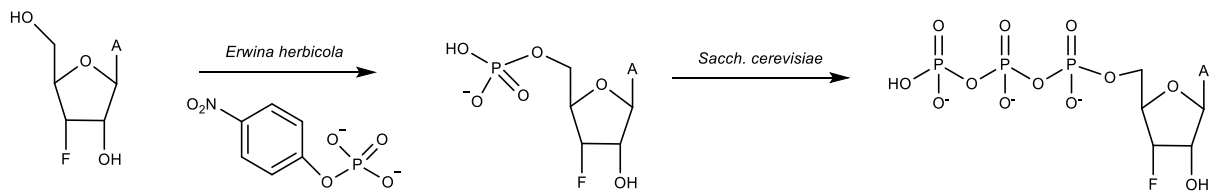
NTP:iden synteesiä on myös mahdollista suorittaa organometallireagenssien avulla (kaavio 4). Organometallireagensseja, kuten alkyylilitiumia, tai *tert*-butyylimagnesiumiokloridia voidaan käyttää myös 5'-hiilessä olevan hydroksiryhmän aktivointiin. Aktivoitu hydroksiryhmä voidaan käsitellä fosforokloridaatilla tai *p*-nitrofenyylifosfaatilla, jolloin tuotteena saadaan nukleosidi-5'-fosfaattia. Uchiyama ja kollegat <sup>13</sup> ovat raportoineet tälle reaktiolle kokeissaan saannoksi 90%. <sup>13</sup>



Kaavio 4. Nukleosidi-5'-monofosfaatin organometallikatalyyttinen synteesi. <sup>13</sup>

## 2.2) NTP:n entsyymivusteinen synteesi

Entsyymivusteisia synteesiä on käytetty jo varhain nukleotidikemiassa, sillä entsyymit kykenevät reagoimaan spesifisesti. Entsyymien käyttö soveltuu luonnollisten sekä synteettisten nukleosidien 5'-OH-ryhmän fosforylaatioon. Entsyymien käytössä on myös ongelmia. Kokosolusynteesissä tavallisia komplikaatioita ovat kilpailevat ja ei-toivotut entsyymaattiset reaktiot, kuten adensiinin deaminaatio inosiiniksi. <sup>15</sup> Monet entsyymit fosforyloivat myös 3'- ja 2'-aseman OH-ryhmät. *Erwinia herbicola* -bakteerin reaktioissa näitä ongelmia ei kuitenkaan havaittu. <sup>16</sup> *Erwinia herbicola* -bakteerin kokonaisia soluja ja *Sacch* -leipurihiivasoluista peräisin olevaa uutetta on käytetty luonnollisten sekä synteettisten fluorattujen nukleosidien, kuten 3'-deoksi-3'-F-ATP:n fosforyloitiiin (Kaavio 5). <sup>15</sup>



Kaavio 5. 3'-deoksi-3'-F-ATP:n entsyymiaivusteinen synteesi. <sup>15</sup>

Nukleosidi- ja deoksiribonukleosidikinaasit ovat tavallisia entsyymejä, joita käytetään deoksiribo- ja ribonukleosidien sekä niiden analogien 5'-OH-ryhmän fosforylaatioissa. <sup>16</sup> Fosfaattidonorina reaktiossa käytetään tavallisesti ATP:tä. Huonona puolena reaktioissa on se, että entsyymit toimivat spesifisesti. Tämä tarkoittaa myös sitä, että niillä on korkea selektiivisyys tiettyjä nukleosideja kohtaan. Tavallisesti tällaiset reaktiot suoritetaan seoksissa, jotka sisältävät ATP:tä, ADP:tä, AMP:tä,  $Mg^{2+}$ -asetaattia, adenylaattikinaasia, asetaattikinaasia sekä pelkistävää yhdistettä, ditiotreitolia. <sup>16</sup> Esimerkiksi *Drosophila melanogaster* -kärpäsiästä peräisin olevien kinaasien (DmdNK) sekä kasveista peräisin olevien kinaasien on osoitettu olevan potentiaalisia työkaluja laajemman nukleosidi- ja nukleosidianalogien kirjon fosforylaatioissa. <sup>16</sup>

Eckstein ja Imazawa <sup>17</sup> syntetisoivat sokeriosasta modifioituja NTP:itä muokatulla Yoshikawan menetelmällä, käyttäen osittain puhdistettua vasikan kateenkorvan kinaasia. Nämä kinaasit ovat ilmeisesti vähemmän spesifisiä NTP:iden sokeriosalle verrattuna *E. Coli* -bakteerin kinaaseihin. <sup>17</sup>

### 3 Sokerimodifioidut NTP:t polymeeraasien substraatteina

Perinteisesti polymeeraasit ryhmitellään niiden dNTP- tai rNTP-substraattispesifisyyden mukaan. Jotkin luonnolliset polymeeraasit eivät valikoi deoksi- tai ribonukleosidisubstraattien välillä, vaan ne kykenevät käyttämään molempia substraatteja. Esimerkkinä laajan substraattikirjon hyväksyvistä polymeeraasista on *E. Colin* DNA-polymeeraasi. Luonnollisten polymeeraasien spesifisyys vähenee monesti, kun  $Mn^{2+}$ -ioni korvaa  $Mg^{2+}$ -ionin kofaktorina. <sup>1,18</sup>

NTP:iden modifikaatiot vaikuttavat merkittävästi polymeeraasien katalyyttiseen eli entsyymaattiseen aktiivisuuteen. Tämän vuoksi tutkimus keskittyy polymeeraasien ohjattuun evoluutioon, jonka ansiosta synteettisiä substraatteja voitaisiin tunnistaa ja käyttää eri polymeeraaseilla entistä laajemmin. <sup>1,19</sup> Muokkauksen avulla polymeeraasit kykenevät hyväksymään modifioituja NTP:itä substraatteina ja sen tavoitteena on päästä eroon polymeeraasien substraattispesifisyydestä säilyttäen niiden aktiivisuuden ja tarkkuuden. Taulukko 1. listaa esimerkkejä polymeeraaseista, jotka ovat kehittyneet hyväksymään synteettisiä NTP:itä sekä erilaisia ksenonukleiinihappoja. <sup>1,19,20</sup>

Polymeraasi	Mutaatiot	Havainnot
1 T7 RNAP (VRS)	(G542V:H784S:H772R)	Sisällyttää 2'-F-pyrimidiinejä
2 T7 RNAP (RGVG, E593G, V685A)	(Y639V:H784G:E593G:V685A)	Sisällyttää 2'-OMe pyrimidiinejä
3 T7 RNAP (RGLH, A255T)	(Y639L:A255T)	Sisällyttää 2'-F pyrimidiinejä, 2'-OMe pyrimidiinejä
4 TgoT DNAP 6G12	(TgoT:V589A:E609K:I610M:K659Q: E664Q:Q665P:R668K:D669Q:K671H: K674R:T676R:A681S:L704P:E730G)	Replikoi DNA:ta käyttämällä HNA:ta
5 TgoT DNAP RT521	(TgoT:E429G:I521L:K726R)	Havaittu RT-aktiivisuutta oligonukleotideille, jotka sisältävät HNA:ta, ANA:ta tai FANA:ta
6 TGLLK	TgoT: Y409G, I521L, F545L, E664K	Korvaa puriinin dNTP:t ja NTP:t vastaavilla 3'-deoksi- tai 3'-O-metyylianalogeilla

Taulukko 1. Muutamia polymeeraaseista, jotka ovat onnistuneesti kehittyneet hyväksymään ja käyttämään NTP:iden ja nukleotidien sokerimodifioituja analogeja. <sup>21</sup>

### 3.1) Luonnolliset NTP:t

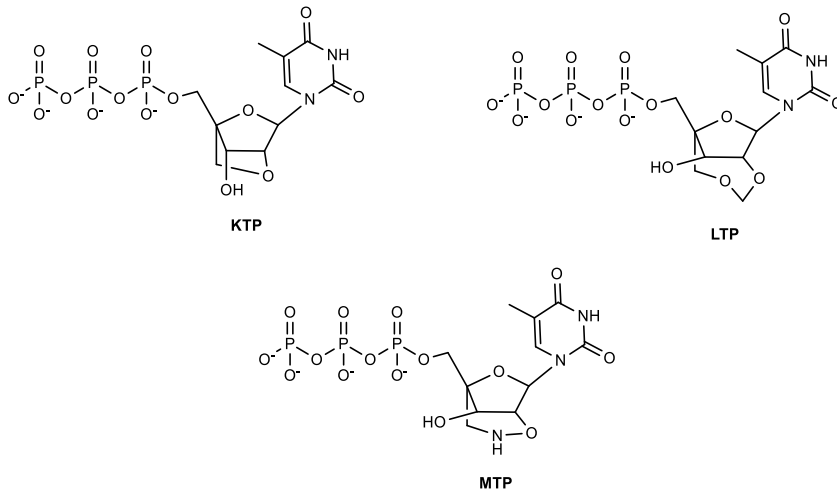
RNA-polymeeraasit eli RNAP:t syntetisoivat RNA:ta ribonukleosiditriposfaateista (NTP:istä). DNA:ta kootaan puolestaan 2'-deoksiribonukleosiditriposfaateista eli 2'dNTP:istä DNA-polymeeraasien avulla (DNAP). <sup>22</sup> Polymeeraasit tunnistavat ja erottavat NTP:t sekä dNTP:t toisistaan niiden sokerirenkaan konformaation perusteella. Kaksijuosteinen RNA suosii 3'-endo-konformaatiota nukleotidin ribosiosassa, kun taas DNA toimii B-muotoisena kaksoiskierteenä, jossa deoksiriboosi omaksuu 2'-endo-konformaation. Nukleinihappopolymeeraasien aktiivisessa kohdassa NTP:t ja 2'dNTP:t saavat kuitenkin yleensä 3'-endo-konformaation. Yhden alayksikön RNAP:t käyttävät Tyr-tähdettä 2'dNTP:n hylkimiseen muodostamalla vetysidoksen ribosiosan 2'-hydroksyyliyhdyntämisen kanssa. <sup>22</sup>

Mäkinen ja kollegat <sup>22</sup> analysoivat 2'-deoksisubstraattien sitoutumista *Thermus thermophilus* -bakteerin RNA-polymeeraasiin *in silico* -telakoinnilla ja röntgenkristallografiolla. Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan sanoa, että konservoitunut Arg-tähde tunnistaa 2'dNTP:iden 2'-endo-konformaation. Tämä konformaatio sisältyy RNA:han huonosti. Tutkimuksessa havaittiin, että  $\beta'$ Arg425 -sivuketju on merkittävä tekijä sokerirakenteen selektiivisyydelle.  $\beta'$ Arg425 -tähde suosii GTP:n sitoutumista 2'dGTP sitoutumisen sijasta. Tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että  $\beta'$ Arg425 edistää NTP:iden sitoutumista RNA:han 2'dNTP:iden sisällyttämisen sijaan muokkaamalla 2'dNTP:n deoksiriboosiosan inaktiiviseen tai epäedullisempaan 2'-endo-konformaatiomuotoon. <sup>22</sup>

### 3.2) Silloitetut NTP:t

Kuwahara ja kollegat <sup>1,23</sup> syntetisoivat 16 erilaista modifioitua templaattia, joiden avulla oli tarkoitus tutkia sokerimodifioitujen NTP:iden toimintaa DNA-polymerisaatiossa. Tutkitut NTP:t (esitetty kuvassa 4) koostuivat rakenteista, jossa sokerirengas sisälsi 2'-4'-hiilten välisen sillan. Kokeissa käytettiin viittä erilaista termostabiilia DNA-polymeeraasia: Taq, Phusion HF, Vent(exo-), KOD (exo-) ja KOD Dash. Parhaimmat tulokset havaittiin KOD Dash- ja KOD (exo-) -polymeeraaseilla. Nämä polymeeraasit kykenivät lukemaan 2'-O,4'-C-metyleenisilloitettuja nukleotideja helposti ja tehokkaasti silloin, kun templaatin silloitetut nukleotidit olivat parin yksikön päässä toisistaan. Taq-polymeeraasilla havaittiin korkeita saantoja täyspituisille tuotteille silloin, kun nukleotidit olivat kahden tai kolmen yksikön päässä toisistaan. Kun Taq-, Vent (exo-) ja KOD (exo-) -polymeeraasien konsentraatio oli suuri, tuotteiden saanto oli 90 %. <sup>1,23</sup>

2'-4' silloitetujen nukleotidien sisällyttäminen pidentyviin ketjuihin oli huomattavasti hankalampaa. Seitsemän peräkkäisen 2'-4'-silloitetun nukleotidin sisällyttäminen ei onnistunut yhdelläkään kokeissa käytetyillä polymeeraaseilla. Syynä tähän oli todennäköisesti sokerirenkaasta aiheutuva steerinen este. <sup>1,23</sup>



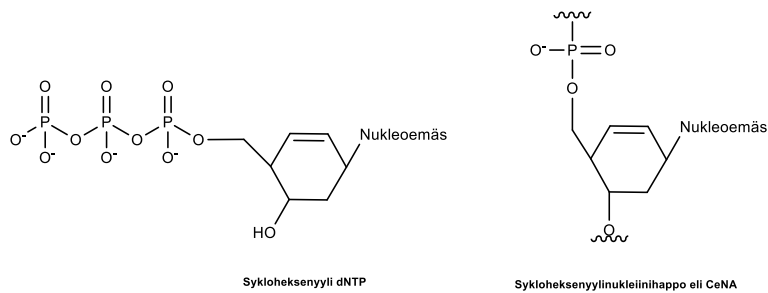
Kuva 4. Silloitettujen NTP:iden rakenteet. <sup>23</sup>

### 3.3) Sykloheksitoli-NTP:t (CeNTP)

CeNA eli sykloheksitolinukleiinihappo (kuva 5) matkii DNA:n rakennetta. CeNA sisältää syklohekseenirenkaan, jossa on kaksoissidos 5'- ja 6'-hiilten välillä. Kuusirengasrakenne vaikuttaa CeNA:n joustavuuteen sekä konformaatioihin. Ce-nukleosidit voivat esiintyä kahdessa eri puolituolikonformaatioissa ja ne pystyvät omaksumaan eri konformaatioita silloin, kun se on sisällytetty kaksijuosteisiin DNA-sekvensseihin. CeNA:n on havaittu hybridisoituvan sekä DNA:n, että RNA:n kanssa ja CeNa lisää dupleksin lämpöstabiilisuutta. siRNA:aan sisällytettynä CeNA indusoi biologista aktiivisuutta. <sup>24,25</sup>

Herdewijn ja kollegat <sup>1,24</sup> tutkivat CeNA-replikaation mahdollisuutta erilaisilla polymeraaseilla kuten HIV-käänteiskopioijaentsyymillä, Vent (exo-):lla ja Taq:illa. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, onko CeNA:a mahdollista käyttää näiden polymeraasien substraattina siten, että polymeraasit kehittyvät tunnistamaan Ce-nukleotideistä koostuvan ketjun. <sup>1,24</sup> Keinotekoisien geneettisen järjestelmän luominen *in vitro* vaatii DNA:n kopiointia CeNA:ksi ja CeNA-templaattien kopioimista DNA:ksi. DNA-riippuvaisessa CeNA-polymeraatioissa käytetyt polymeraasit kykenivät käyttämään CeATP:tä substraattina alukkeidenpidennys -kokeissa. HIV-transkriptaasi pysähtyi kahden CeA:n lisäämisen jälkeen, mutta Taq ja Vent(exo-) kykenivät sisällyttämään peräti kuusi CeATP-yksikköä mangaani-ionien läsnäollessa. Mangaanin tarkoitus on vähentää erilaisten analogien syrjintää, kun molekyyli sisältää modifikaatioita furanoosirenkaassa, emäksessä tai fosfaattisidoksissa. <sup>1,24</sup>

Useiden CeA-nukleotidien sisällyttäminen CeNA-riippuvaisessa CeNA polymeraatioissa on todettu hankalaksi. <sup>1,24</sup> Tulosten mukaan polymeraaseilla on vaikeuksia sitoa sekä CeNA, että sykloheksenyylitriphosfaatti-templaatti aktiiviseen keskukseen. Taq DNA-polymeraasi ei kyennyt sisällyttämään yhtäkään CeA-nukleotidiä ja CeT:tä (sykloheksenyylit-T) vastakkain. HIV-käänteiskopiointientsyymi kykeni sisällyttämään yhden vastakkaisen CeT:n ja CeA-nukleotidin ja Vent (exo-) DNA-polymeraasi kaksi sykloheksenyylinukleotidiparia. Havainnot voidaan selittää suurempikokoisen sokerirungon aiheuttavan steerisen esteen. Steerinen este vaikuttaa polymeraasien aktiiviseen kohtaan sitoutumiseen tai polymeraasien kykyyn katalysoida reaktioita johtuen Ce-nukleosidien kyvyttömyydestä konformaation muutoksiin. <sup>1,24</sup>

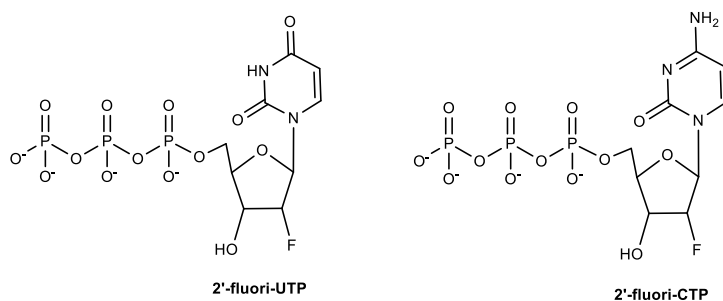


Kuva 5. Sykloheksitrihofosfaatin (CeNTP) ja sykloheksenylihapon eli CeNA:n rakenne. <sup>1,24</sup>

### 3.4) Fluoratut NTP:t

Fluoratut NTP:t, (Kuva 6) ovat kiinnostuksen kohteina, sillä ne muodostavat oligonukleotideja, jotka ovat resistenttejä nukleaseille. <sup>1</sup> Aurup ja kollegat <sup>21</sup> havaitsivat luonnollisen T7 RNA-polymeraasin kykenevän käyttämään 2'-fluori-CTP-, 2'-fluori-ATP-, 2'-fluori-UTP- ja 2'-amino-UTP-nukleotideja substraatteina transkriptioreaktioissa. Tulosten mukaan näiden NTP:iden läsnäollessa lyhyitä templaatteja pystyttiin kopioimaan täyspituiseksi RNA-tuotteiksi. <sup>21</sup>

Peng ja kollegat <sup>1,26</sup> tutkivat useiden eri bakteeriperheiden A ja B polymeraasien kykyä sisällyttää 2'-fluori-D-*arabino*-NTP:itä. Perheen B polymeraasit (DV, 9N, Th, Ph) tuottivat kokopituksia tuotteita. Perheen A polymeraaseilla (Bst, Taq, KF) saatiin tuotteita, jotka sisälsivät vain kaksi-neljä 2'-F-ara-NTP-tähdettä. Tutkimusten tulosten perusteella voidaan sanoa, että eri polymeraasiperheiden entsyymien aktiivisessa kohdassa on suuria rakenteellisia eroja. <sup>1,26</sup>



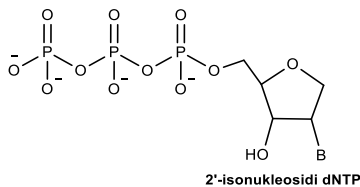
Kuva 6. 2'-fluoratut NTP:iden rakenteet, jossa nukleoemäksenä on urasiili tai sytosiini. <sup>21</sup>

### 3.5) Isonukleosidi- ja glyseroli-pohjaiset NTP:t

2'-deoksi-2'-isonukleotideja (iNTP; kuva 7) on alun perin tutkittu potentiaalisina antiviraalisina lääkeaineina. <sup>21,22</sup> INA:lla on todettu olevan antiviraalista aktiivisuutta HSV-1 and HSV-2 –viruksia vastaan. <sup>27</sup>

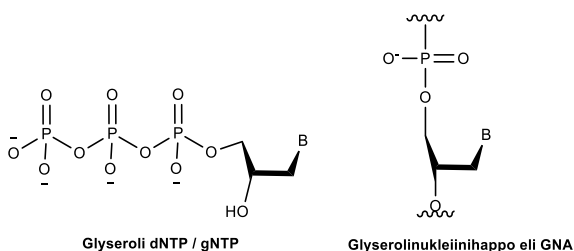
Zhang ja kollegat <sup>27</sup> tutkivat 2'-deoksi-2'-isoadenosiini-5'-trifosfaatin eli iATP:n sisällyttämistä DNA-dupleksiin käyttäen useita erilaisia perheiden A ja B polymeraaseja. Taq-polymeraasilla iATP aiheutti synteesin keskeytymisen, kun taas perheen B polymeraaseilla saatiin kokopituisia tuotteita. <sup>27</sup>

Ogino ja kollegat <sup>1,27</sup> tutkivat iNTP:itä alukkeen pidennyskokeissa käyttäen ODN–ODN ja ION–ODN duplekseja. Tulosten mukaan KF:llä eli Klenow-fragmentilla (perhe A) ja Terminator DNA-polymeraasilla (perhe B) on erilaiset tunnistusmekanismit. KF (exo-) tunnistaa NTP:iden muodon, kun taas terminaattori DNA-polymeraasi tunnistaa aluke-templaattikompleksin muodon (erityisesti kaksi emäsparia alukkeen 3'-päässä). Tutkimusten perusteella näyttää siltä, että iNTP:itä pystytään sisällyttämään DNA/DNA-aluke-templaatti-dupleksiin, mutta ainoastaan kahtena peräkkäisenä nukleotidina. <sup>1,27</sup>



Kuva 7. Ogino ja kollegoiden tutkimuksessa käytetyn iNTP:n eli 2'-isonukleosidi-dNTP:n rakenne. <sup>1,27</sup>

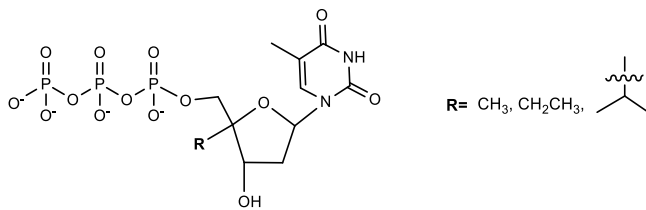
Glyserolipohjaisia NTP:itä (kuva 8) on myös kokeiltu substraatteina eri DNA-polymeraaseja käyttäen. GNA:t eli glyserolipohjaiset DNA-analogit muodostavat stabiileja duplekseja Watson–Crick-emäspariutumisen perusteella. Chen ja kollegat <sup>28</sup> tutkivat alukkeen pidennystä gNTP:illä. Bakteerin DNA-polymeraaseilla Taq:illa ja Bst:illä dNTP:itä saatiin sisällettyä vain yksi tai kaksi gNTP:ia, mutta terminaattori DNA-polymeraasilla jopa viisi. Tästä huolimatta mikään polymeraaseista ei kyennyt syntetisoimaan GNA:ta gNTP:istä GNA-templaatilla. Pääosin syynä GNA-synteesin epäonnistumiselle on 2'-hydroksyyli-ryhmän huono asema GNA-alukkeen päässä. <sup>1,28</sup>



Kuva 8. Glyserolipohjaisen NTP:n eli gNTP:n rakenne. <sup>1,28</sup>

### 3.6) 4'-alkyyli-substituoidut dTTP:t

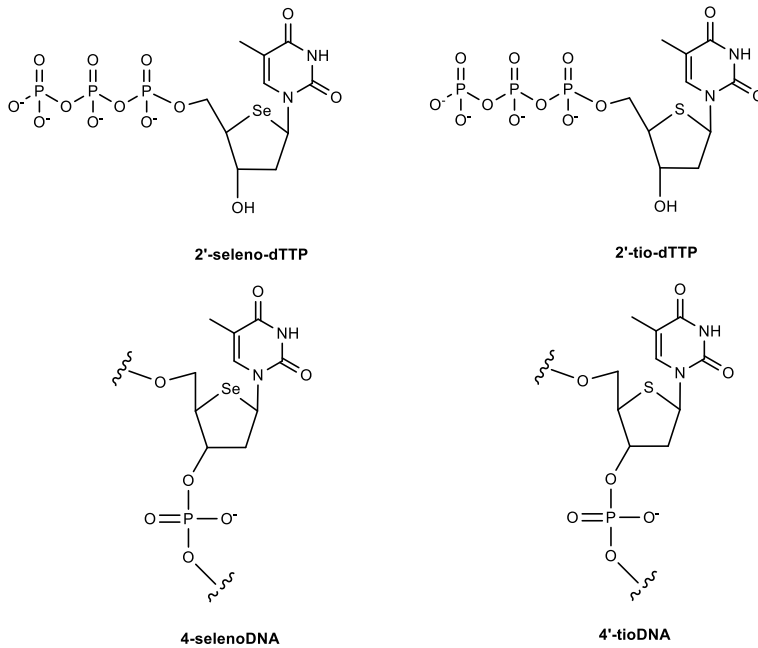
Marx ja kollegat <sup>1,29</sup> tutkivat 4'-alkyyli-substituoidujen dTTP:iden (kuva 9) sisällyttämistä DNA:han eri DNA-polymeraasien avulla. DNA:n pienessä uurteessa sijaitsevat modifikaatiot johtivat steerisen esteen lisääntymiseen ja rajoittivat saapuvan modifioitujen dTTP:n sitoutumista entsyymiin. Steerinen este ja aktiivisen kohdan ahtaus lisäsivät dNTP -selektiivisyyttä ja näin siis DNA-polymeraasin tarkkuutta. Samalla 4'-aseman vedyn korvaamiden suuremalla ryhmällä (esim. metyyli, etyyli tai isopropyyli) vaikutti KF:n sisällyttämisenopeuteen. Steerisestä esteestä johtuen liittymisnopeus hidastui sitä enemmän mitä suurempi substituentti oli kyseessä. Metyyli- sekä etyyli-substituutioita siedetään paremmin, vaikka myös suurimmalla koettimella eli isopropyylisubstituoidulla nukleotidilla havaittiin korkea sitoutumisaffiniteetti Klenow-fragmenttiin verrattuna luonnolliseen nukleotidiin. <sup>1,29</sup>



Kuva 9. 4'-alkyloitu dTTP. <sup>1,29</sup>

### 3.7) 4'-tio- ja 4'-seleno-NTP:t

Tarashima ja kollegat <sup>1,30</sup> syntetisoivat entsyymaattisen replikaation avulla 4'-selenotymidiini- ja 4'-tiotymidiiniyksikköjä (kuva 10) sisältäviä DNA-fragmenteja. Alukkeidenpidennysreaktioita toteutettiin eri perheiden A ja B DNA-polymeraaseilla. Perheen B polymeraaseilla saatiin pidentyneitä tuotteita, mutta perheen A polymeraaseilla pidentyneitä tuotteita ei havaittu. Kokeiden seuraavassa vaiheessa Tarashima ja kollegat tutkivat PCR:n onnistumista eri termofiilisillä perheen B polymeraaseilla. Kaikki kokeessa käytetyt polymeraasit tuottivat onnistuneesti PCR-monistuksessa tymidiini- ja 4'-tiotymidiini-yksiköitä sisältäviä DNA-jaksoja eli amplikoneja. <sup>1,30</sup> Sen sijaan ainoastaan KOD Dash-polymeraasi kykenee SeTTP:iden sisällyttämiseen. KOD Dash-polymeraasilla havaittiin pieniä määriä pidentyneitä tuotteita, jotka sisälsivät SeT-yksiköitä. <sup>1,30</sup>

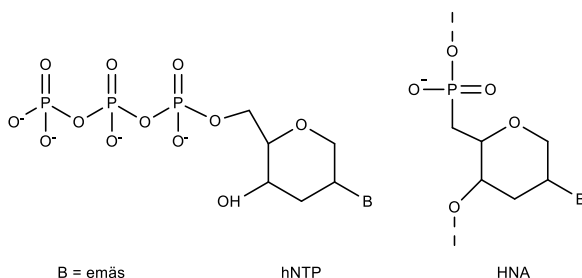


Kuva 10. Tio- ja seleno- dTTP sekä vastaavat DNA rakenteet. <sup>1,30</sup>

### 3.8) Heksitoli-NTP:t

Heksitoli-NTP:t (kuva 11) eroavat luonnollisista nukleotideista siten, että 1'- ja 3'- aseman sokerirengashiiltien väliin on lisätty CH<sub>2</sub>-ryhmä. <sup>7</sup> hNTP:itä on käytetty substraatteina HNA-synteesiä varten T7 RNA-polymeraasin ja terminaalisen transferaasin läsnäollessa. Saadut tulokset osoittavat hNTP:tä ja HNA:ta voidaan käyttää rajoitetusti templaattina sekä substraattina. Tämä osoittaa mahdollisuuden kehittää polymeraaseja HNA-replikaatiojärjestelmän kehittämiseksi. <sup>7</sup>

*In vivo* -kokeissa on tutkittu, kuinka HNA kopioituu kanonisiksi DNA:ksi *E. Coli* -bakteereissa, joilta on poistettu thyA-geeni. Tämä geeni säätelee tymidylaattisyntaasi-entsyymin toimintaa. Muokattuihin bakteereihin siirrettiin HNA:ta sisältävä plasmidi, jonka HNA sisälsi ohjeet tymidylaattisyntaasientsyymin valmistamiseen. Bakteerien kasvualustalta puuttui synteesiin vaadittava tymiini tai tymidiniini. Havaittiin, että ainoastaan ne bakteerit, jotka onnistuneesti kopioivat kahta HNA kodonia sisältävää plasmidia kykenivät kasvamaan kyseisellä kasvualustalla. <sup>7</sup>



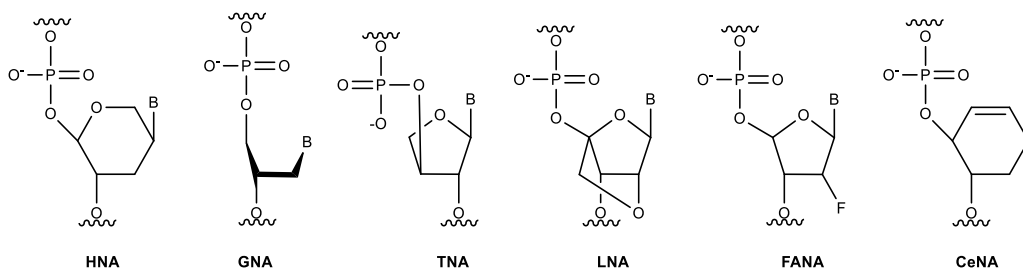
Kuva 11. hNTP:n ja HNA:n rakenne, jatkoviiva kuvaa toistuvaa yksikköä. <sup>7,31</sup>

## 4 Sokerimodifioidut ksenonukleiinihapot

Tässä kappaleessa tarkastelemme lyhyesti ksenonukleiinihappoja eli XNA:ita, jotka ovat ei-kanonisia DNA-analogeja. Muun muassa sokerimodifioidut NTP:t voivat olla ksenonukleiinihappojen (XNA:iden) rakennusyksiköitä. Sokerimodifioituihin XNA:ihin kuuluvat mm. HNA (heksitolinukleiinihappo), GNA (glyserolinukleiinihappo), TNA (treosinukleiinihappo), LNA (lukittunukleiinihappo), FNA (fluorinukleiinihappo), FANA (2'-fluoroarabinonukleiinihappo), CeNA (sykloheksenylinukleiinihappo), 4'-TioDNA ja ANA (arabinonukleiinihappo) (kuva 12).<sup>28,31</sup> XNA:iden kehitys voi antaa nukleiinihapoille uusia ominaisuuksia kuten biokemiallista tai kemiallista stabiilisuutta.<sup>28,31</sup> Sokerirenkaan ja fosfaattiketjun muokkaukset parantavat yleisesti nukleiinihappojen fenotyypillisiä ominaisuuksia, sekä nukleasiresistenssiä.<sup>31</sup> HNA esimerkiksi pystyy hybridisoitumaan DNA:n, RNA:n sekä itsensä kanssa ja sen on myrkytön soluille. XNA:t toimivat myös lupaavina työkaluina uusien lääkeaineiden kehityksessä.<sup>32</sup> Sokerimodifioiduista XNA:ista on kehitetty muun muassa aptameereja sekä katalyyttisiä nukleiinihappoja *in vitro* evolutiivisessa prosessissa. Kaikilla sokerimodifioiduilla XNA (HNA, TNA, FANA) -aptameereilla on todettu olevan parempi stabiilisuus biologisessa ympäristössä.<sup>31</sup>

XNA:t pystyvät varastoimaan informaatiota ja manipuloimaan polymeraasiaktiivisuutta ja XNA:ita käytetään muun muassa bakteeripolymeraasien kehittämiseen.<sup>1,7</sup> Sokerimodifioidut XNA:t ovat kauempana luonnollisesta DNA:sta verrattuna emäsmodifioituihin XNA:ihin. Tästä johtuen suuri osa luonnollisista polymeraaseista ei kykene käyttämään näitä XNA:ita substraatteina geneettisen materiaalin syntetisoitiin. Polymeraasien muokkaaminen eli ohjattu evoluutio XNA:iden kontekstissa voisi siten mahdollistaa mm. ei-kanonisten nukleiinihappojen biosynteesin ja replikaation sekä synteettisten geneettisten polymeerien kehityksen.<sup>1,19</sup> Jotkin XNA:t kuten HNA, arabinonukleiinihappo (ANA) ja treosinukleiinihappo (TNA) pystyvät jo nyt kopioimaan geneettistä tietoa DNA-templaattista XNA:ksi ja siitä jälleen DNA:ksi.<sup>20,31</sup>

Taulukossa 2 esitetään muokattuja polymeraaseja, jotka kykenevät käyttämään sokerimodifioitua XNA:ita synteetissä, käänteisessä transkriptiossa sekä replikaatiossa.<sup>20</sup> Terminaattori -polymeraasin substraattikirjo on laajin, mutta yleisesti suurin osa analogeista toimii huonosti substraatteina.<sup>20</sup>



Kuva 12. Esimerkit erilaisista sokerimodifioiduista XNA:ista.<sup>28,31</sup>

Taulukko 2. Taulukossa esitetään eri sokerimodifioituja XNA:ta sekä mutatoituja polymeraaseja, jotka

XNA tyyppi	DNA → XNA synteesi	XNA → DNA käänteinen transkriptio	XNA → XNA replikaatio
ANA	D4K	RT521(K)	-
FANA	D4K	RT521(K)	D4K/RT521K
HNA	6G12	RT521(K)	RT521Kf
CeNA	6G12/C7	RT521(K)	6G12/RT521Kf
TNA	Terminaattori d/RT521	RT521	-
LNA	C7	RT521K	-

hyväksyvät kutakin XNA tyyppiä DNA-synteesissä, käänteisessä transkriptiossa ja XNA-replikaatiossa.<sup>20</sup>

## 5 Yhteenveto

Nukleosiditriposfaatit eli NTP:t ja dNTP:t ovat kaikilla eliöillä luonnostaan esiintyviä molekyyliä, joita käytetään rakennusyksiköinä DNA- ja RNA-synteesissä polymeraasien toimesta. NTP:itä käytetään lisäksi lipidi-, glykogeeni- ja kofaktorisynteesiä varten. NTP:t koostuvat kolmesta perusosasta: trifosfaatista, joka toimii tärkeänä energiavarastona, nukleoemäsosasta, jonka avulla mahdollistetaan Watson Crick emäspariutumisen ja sokeriosasta, joka voi sisältää luonnostaan yksi tai kaksi OH-ryhmää. NTP:iden sokerimodifikaatio tarkoittaa NTP:iden kemiallista tai biokemiallista muokkausta, joka kohdistuu sokeriosaan. Sokerimodifikaatioihin kuuluu mm. heteroatomien tai funktionaalisten ryhmien lisääminen tai korvaaminen ja sokerirenkaan renkaan koon tai muodon erilaiset muokkaukset.<sup>1,3</sup>

NTP:t pystyvät toimimaan myös ksenonukleiinihappojen (XNA) eli ei-kanonisen DNA:n rakennusyksiköinä. Modifioitujen NTP:iden sovelluskohteisiin kuuluvat muun muassa oligonukleotidien leimaus, geneettisen aakkoston laajentaminen sekä antisense- ja antigeeniainneiden kehitys. XNA:iden sovelluskohteisiin kuuluvat mm. terapeuttisten ja bioteknologisten työkalujen kehitys sekä lääketieteelliset sovellukset.<sup>1,4-7</sup>

NTP:iden synteesiin ei ole olemassa yleispätevää menetelmää, joka soveltuisi kaikentyyppisten NTP:iden valmistamiseen. NTP:iden synteesissä käytetään tavallisesti nukleosideja lähtöaineina. Yleinen haaste synteesissä on sokerirenkaan oikean hydroksiryhmän fosforylaatio, jonka ratkaisemiseksi on kehitetty mm. läpimurrollinen Yoshikawan menetelmä. Tutkimusten perusteella trialkyylifosfaattien käyttö liuottimena nopeuttaa 5'-hiilen hydroksiryhmän fosforylaatiota. NTP:itä voidaan syntetisoida myös entsyymiväestöisesti organismien (bakteerien ja hiivojen) avulla tai kemiallisesti käyttäen metallireagensseja.<sup>4,13</sup>

Sokerimodifioitujen NTP:iden sisällyttäminen DNA:han on usein hankalaa, erityisesti luonnollisten polymeraasien avulla. Sisällyttämisen hankaluus johtuu esimerkiksi substraattispesifisyydestä, steerisistä esteistä tai NTP:n 3'-aseman hydroksiryhmän puutteesta. Polymeraaseja voidaan muokata, jotta niiden sisällyttämiskyky erilaisia NTP:itä kohtaan paranee. Polymeraasien muokkauksen tavoitteena on päästä eroon niiden substraattispesifisyydestä säilyttäen polymeraasien aktiivisuuden ja tarkkuuden.<sup>1,20,21,26,28,33</sup> Sokerimodifioituja NTP:itä voidaan sisällyttää DNA:han tai RNA:han eteenkin mutatoituilla polymeraaseilla. Tämä on merkki siitä, että polymeraasien muokkaaminen on lupaava keino erilaisten NTP:iden hyväksymiseen ja sisällyttämiseen sekä tulevaisuuden sovelluksiin.<sup>1,21,26,28,33</sup>

## Lähdeluettelo

1. Espinasse A., Lembke H. K., Cao A. A. ja Carlson E. E., *RCS Chem Biol*, **2020**, *1*, 333–351
2. Feldman A., Fischer E., Ledbetter MP., Liao J., Chaput J. ja Romesberg F., *J Am Chem Soc*, **2018**, *140*, 1447–1454.
3. Tortora G., Funke B., Case C., *Microbiology An Introduction*, Pearson Education, Yhdysvallat, **2014**, 76–78.
4. Hollenstin M., *Molecules*, **2012**, *17*, 13569–91.
5. Hollenstein M., Smith C. C. ja Rätz M., *JOVE*, **2014**, e51385.
6. Groaz E., Herdewijn P., Hexitol Nucleic Acid (HNA). Kirjassa Chemical Design to Functional Genetic Polymer, Sugimoto N., Toim. Springer nature - Handbooks, Springer Singapore, **2023**, 401–430.
7. Herdewijn P. ja Marlière P., *Chem Biodivers*, **2009**, *6*, 791–808.
8. Elion G. B., *J. Antimicrob Chemoth*, **1983**, *12*, 9–17.
9. August J. T., Anders M. W. ja Murad F., *Advances in pharmacology*, volume 22, Academic Press Inc, San Diego, California, **1991**, 1–23.
10. Winz M., Samantha A., Bezinger D. ja Jäschke A., *Nucleic Acids Res*, **2012**, *40*, e78.
11. Holstein J. ja Rentmeister M., *Methods*, **2016**, *98*, 18–25.
12. Chen C., *Front Microbiol*, **2014**, *5*, 305.
13. Vaghefi M. M., *Nucleoside Triphosphates and their Analogs*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **2005**, 1–20.
14. Yang Q., Jiang Y., Zhuo H., Mitchell E. ja Yu Q., *Nano Energy*, **2023**, *111*, 108404.
15. Burgess K. ja Cook D., *Chem Rev*, **2000**, *100*, 2047–2059.
16. Eriksson S., *Nucleoside Triphosphates and their Analogs*, CRC Press, Boca Raton, Florida, **2005**, 24–34.
17. Imazawa M. ja Eckstein F., *BBA*, **1979**, *570*, 284–90.
18. Joyce C., *Natl. Acad. Sci*, **1997**, *94*, 1619–1622,
19. Houlihan G., Arangundy-Franklin S. ja Holliger P., *Acc Chem Res*, **2017**, *50*, 1079–1087.

20. Pinhiero V. ja Holliger P., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2012**, *16*, 245–252.
21. Dellafiore M., Montserrat J. ja Iribarren A., *Front. Chem*, **2016**, *4*, 18.
22. Mäkinen J., Shin y., Vieras E., Virta P., Metsä-Ketel M., Murakami K. ja Belohurov G., *Nat Commun*, **2021**, *12*, 796.
23. Kuwahara M., Obika S., Nagashima J., Ohta Y., Suto Y., Ozaki H., Sawai H. ja Imanishi T., *Nucleic Acids Res*, **2008**, *36*, 4257–4265.
24. Kempeneers V., Renders M., Froeyen M. ja Herdewijn P., *Nucleic Acids Res*, **2005**, *33*, 3828–3836.
25. Ovaere M., Herdewijn P. ja Van Meervelt L., *Chem. - Eur. J*, **2011**, *17*, 7823–7830.
26. Peng C. ja Damha M., *J Am Chem Soc*, **2007**, *129*, 5310–5311.
27. Ogino T., Sato K. ja Matsuda A., *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2597–2605.
28. Chen J., Tsai C., Cai X., Horhota A., McLaughlin L. ja Szostak J., *PLoS One*, **2009**, *4*, e4949.
29. Cramer J., Rangam G., Marx A. ja Restle T., *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 1243–1250.
30. Tarashima N., Sumitomo T., Ando H., Furukawa K., Ishida T. ja Minakawa N., *Org Biomol Chem*, **2015**, *13*, 6949–6952.
31. Ereemeeva E. ja Herdewijn P., *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2019**, *57*, 25–33.
32. Gutfreund C., Betz K., Abramov M., Coosemans F., Hollger P., Herdewijn P. ja Marx A., *Nucleic Acids Res*, **2025**, *53*, gkae1055.
33. Chen T., Hongdilokkul N., Liu Z., Adhikary R., Tsuen S. ja Romesberg F., *Nat Chem*, **2016**, *8*, 556–562.



