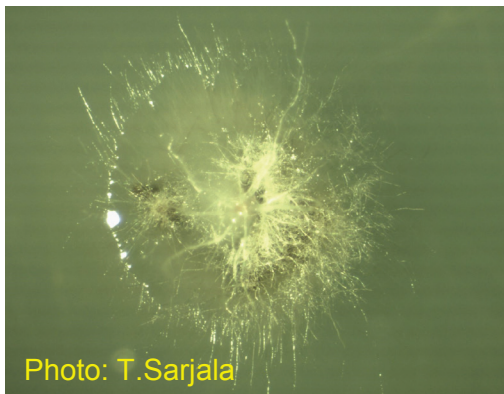
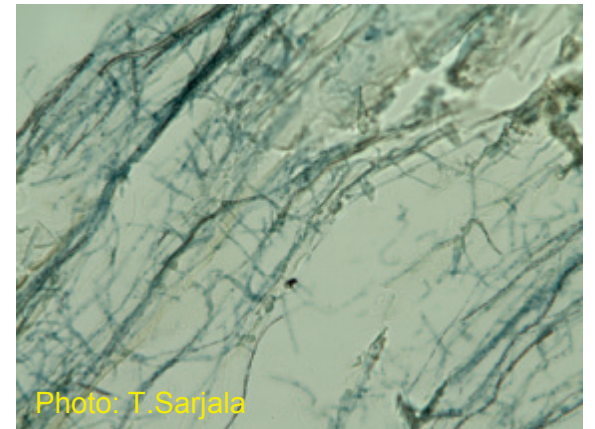
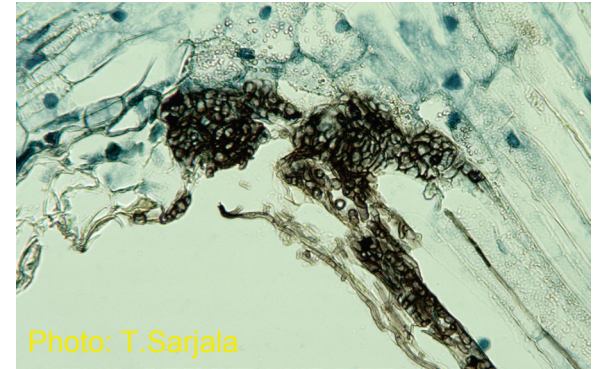


Suot bioaktiivisten yhdisteiden aarreaitta – endofyyttisienten bioaktiiviset ominaisuudet

Tytti Sarjala
Suoseuran kevätseminaari
7.4.2016 Helsinki

Endofyytit

- Endofyytit ovat mikro-organismeja, kuten bakteereita tai sieniä, jotka elävät kasvisolukoissa vahingoittamatta niitä.
- Voivat elää kasvissa oireettomasti tai ovat jopa latentteja patogeeneja tai lepotilassa olevia saprofyyttejä (Schueffler & Anke 2011)
- Endofyytit voivat stimuloida kasvua, lisätä tautiresistenssiä, parantaa ympäristöstressien sietokykyä. Endofyytit edesauttavat puuvartisten kasvien ekologista sopeutumista (Newcombe 2011).



Endofyytit muodostavat laajan ja monimuotoisen ryhmän, josta suurin osa on edelleen tunnistamatta

- Suurin osa sieniendoofyyteistä on edelleen tutkimatta, niitä ei ole edes löydetty saati kuvattu. Arviot lajien mahdollisesta kokonaismäärästä globaalisti vaihtelevat suuresti (0,5-1,3 milj.) riippuen tarkastelutavasta.
- Esim. lauhkean vyöhykkeen 1000:sta puulajista sieniendoofyyttejä on tutkittu vain noin 10%:sta (Unterseher 2011) puulajeja. Niissäkin tarkastelu on keskittynyt versoissa eläviin lajeihin.

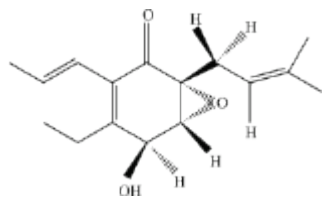


Kasvien endofyyteistä suurin osa on vielä löytymättä

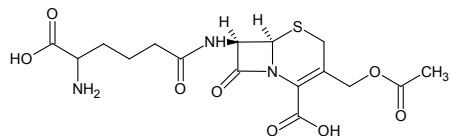
Endofyyttien bioaktiiviset yhdisteet

- Monien endofyyttisienten tiedetään sisältävän bioaktiivisia yhdisteitä, joilla on sytotoksisia, kasvaimien kasvua ehkäiseviä, antimikrobisia, anti-oksidatiivisia ja tulehdusta estäviä vaikutuksia (Strobel ym. 2004).
- Eräässä kokooma-artikkelissa tarkastelluista endofyyttisienistä eristetyistä yhdisteistä yli 50% osoittautui uusiksi, ennen tuntemattomiksi (Gutierrez et al. 2012).
- Vuosina 2000-2007 endofyyteistä → yli 100 uutta bioaktiivista luonnonainetta. Vuosina 2008-2009 → yhtä paljon uusia löydöksiä (Aly et al. 2010)
 - antimikrobisia, sytotoksisia, antiparasiittisia, hermosoluja suojaavia yhdisteitä
- Isäntäkasvin ja endofyytin välinen vuorovaikutus tulisi tuntea perusteellisemmin molekyylitasolla, jotta sekundäärimetaboliittien tuottoa olisi mahdollista optimoida laboratorio-olosuhteissa.

Muutamia esimerkkejä sienten tuottamista bioaktiivisista yhdisteistä ja lääkeaineista



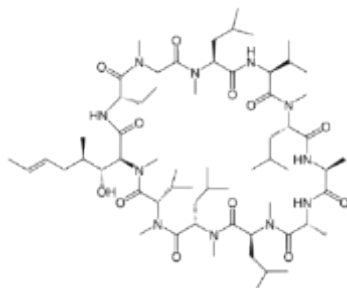
Jesterone



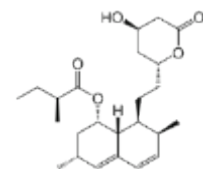
cephalosporin C



Cryptocandin A,



cyclosporin A



lovastatin

- Uusista lajeista löytyy usein myös uusia yhdisteitä, esim. 8 eri Hypoxylon-endofyyttilajin tutkiminen tuotti 50 uutta biologisesti aktiivista yhdistettä (Dr. Frank Surup, *Helmholz Center for Infection Research, Department Microbial Drugs*)

Ojitusalueiden mäntyjen endofyytit

- Olimme kiinnostuneita männynjuurten yhteydessä elävien endofyyttisienten antioksidatiivisista ym. ominaisuuksista. Onko niillä vaikutusta puiden elinkykyyn ja menestymiseen vaativilla kasvupaikoilla?



Sienten puhtasviljelmien eristäminen männynjuurista



PCR ITS1/ITS4 sequencing

←

Männyn juurista löytyi runsaasti endofyyttisieniä



ITS-sekvenssien perusteella sienet kuuluivat 14 eri sukuun, joista suurin osa ns. DSE-sieniin (dark septate endophytes)

Endofyyttisienet ja bioaktiiviset yhdisteet

- **Terveyttä metsästä 2008-2011 (EAKR)**
- **BIOAKT, Pirkanmaan verkostopohjainen bio-osaamislaboratorio 2012-2013 (EAKR)**
- **Bioaktiiviset yhdisteet osana tulevaisuuden biotaloutta, 2012-2016 (Luke)**
- **BIOSTEP - Luonnosta lääkaihoita 2014 (EAKR)**
- **FORLEAP-Metsäbiomassan sivuvirroista uusia tuotteita 2015-2018 (EAKR)**
- **Yhteistyökumppanit:**

Luke: dos. Pekka Saranpää (puun kemia ja ominaisuudet)

TaY, Lääketiet. laitos: prof. Hannu Uusitalo (Silmälääketiede), FT Ulla Aapola,

TaY, Lääketiet. laitos: prof. Eeva Moilanen (Immunofarmakologia), LT Katriina Vuolteenaho

HY: prof. Kristiina Wähälä (org. kemia, lääkeainekemia)

TTY: prof. Robert Franzén (org. kemia, lääkeaine- ja luonnonaineiden synteesi)

TTY: prof. Matti Karp (teollinen biotekniikka)

Fundación Medina, Espanja, Dr. Jesús Martín



UNIVERSITY
OF TAMPERE

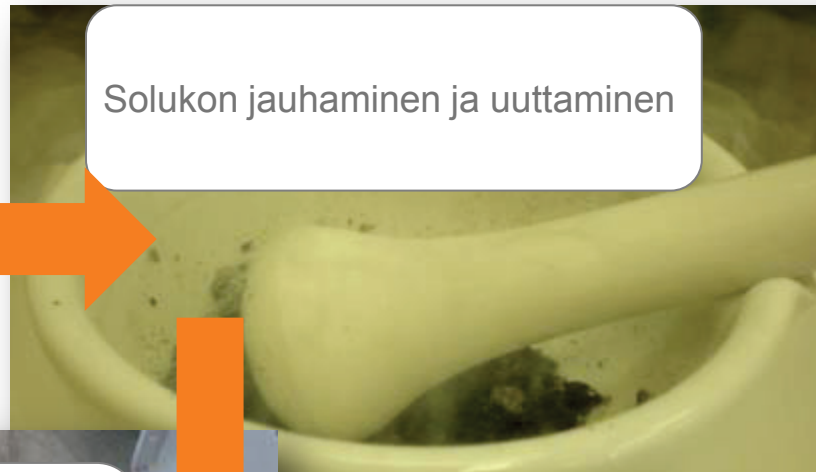


PIRKANMAAN LIITTO



Luke
LUONNONVARAKESKUS

Uuttaminen ja esitestaus



**Testaukset solumalleilla ja
biosensoreilla (TaY, TTY)**

Vipuvoimaa
EU:lta
2007-2013

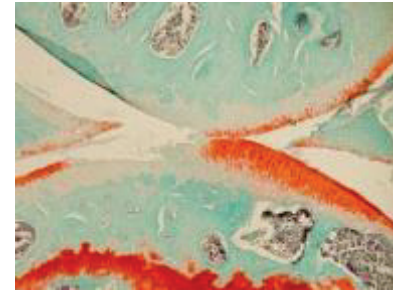
© Luonnonvarakeskus

Luke
LUONNONVARAKESKUS

BIOAKT-hanke (EAKR): TaY:n solumallit biotestaukseen

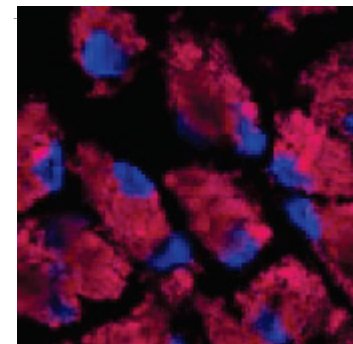
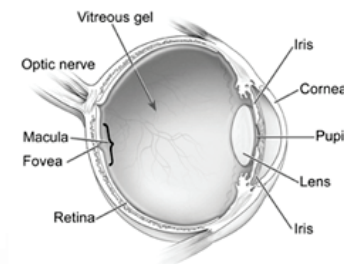
- **Immunofarmakologia, prof. Eeva Moilanen, LT Katriina Vuolteenaho**

- Immortalisoitu ihmisen rustosolulinja
- Nivelrikko, rustosolukko
- Uutteiden vaikutus MMP entsyymiaktiivisuuteen



- **Silmälääketiede, prof. Hannu Uusitalo, FT Ulla Aapola**

- Silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelisoluviiljelmät (RPE), kokeellinen silmän ikärappeumamalli
- RPE-solut, fagosytoosi
- Sarveiskalvon haavanparanemismalli



TAMPEREEN
YLIOPISTO

13.4

.201

6

11



SILK

Strategic and Innovative Leadership Center for Sustainable Development

Vipuvoimaa
EU:lta
2007–2013



PIRKANMAAN LIITTO

© Luonnonvarakeskus

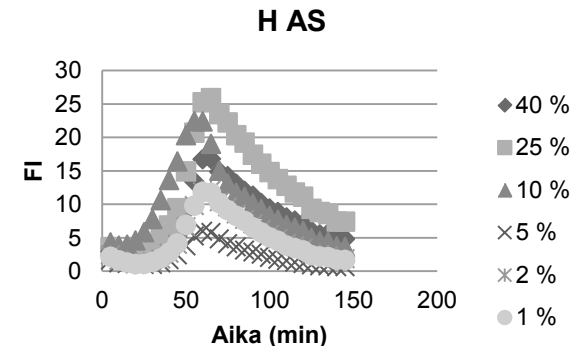
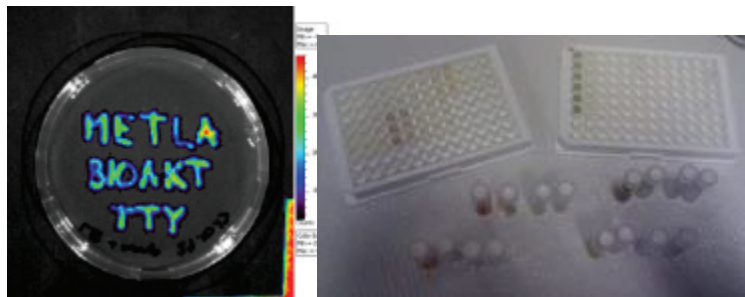
Luke
LUONNONVARAKESKUS

BIOAKT-hanke: Testaukset mikrobipohjaisilla biosensoreilla

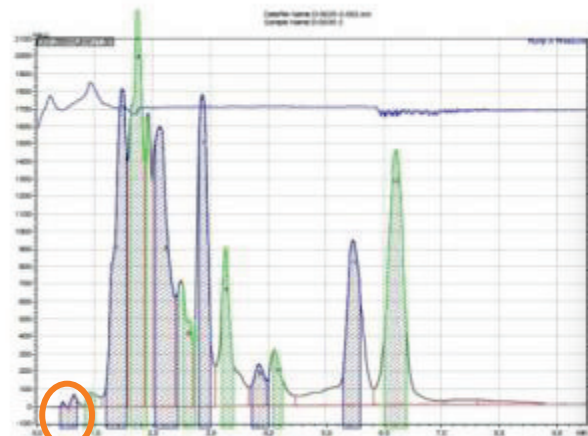
DI Jenni Tienaho, Prof. Matti Karp, Prof. Robert Franzen, TTY

- Bakterisensoreina käytettiin geneettisesti modifioituja *Escherichia coli* –bakteereja. Toinen kanta on muokattu siten, että se tuottaa valoa oksidatiivisten aineiden läsnä ollessa ja toinen bakteerin perimää eli DNA:ta vaurioittavien aineiden läsnä ollessa.
- *E. coli* DPD2511 – Oksidatiiviset ja antioksidatiiviset ominaisuudet
- *E. coli* DPD2794 –DNA:ta vaurioittavat tekijät
- Alustavat tulokset osoittavat, että endofyyttisienistä on mahdollista löytää runsaasti bioaktiivisia yhdisteitä, joiden jatkotutkimuksiin kannattaa panostaa.
- Fundación Medina, Granada, jatkotestaukset ja kemialliset analyysit kolmen sienikannan bioaktiivisista fraktioista

J.Tienaho, T.Sarjala, R.Franzen, M.Karp 2015. **Method with high-throughput screening potential for antioxidative substances using *Escherichia coli* biosensor *katG*::*lux***. Journal of Microbiological Methods 118:78-80.



Sieniuutteen fraktiointi prep. HPLC:llä



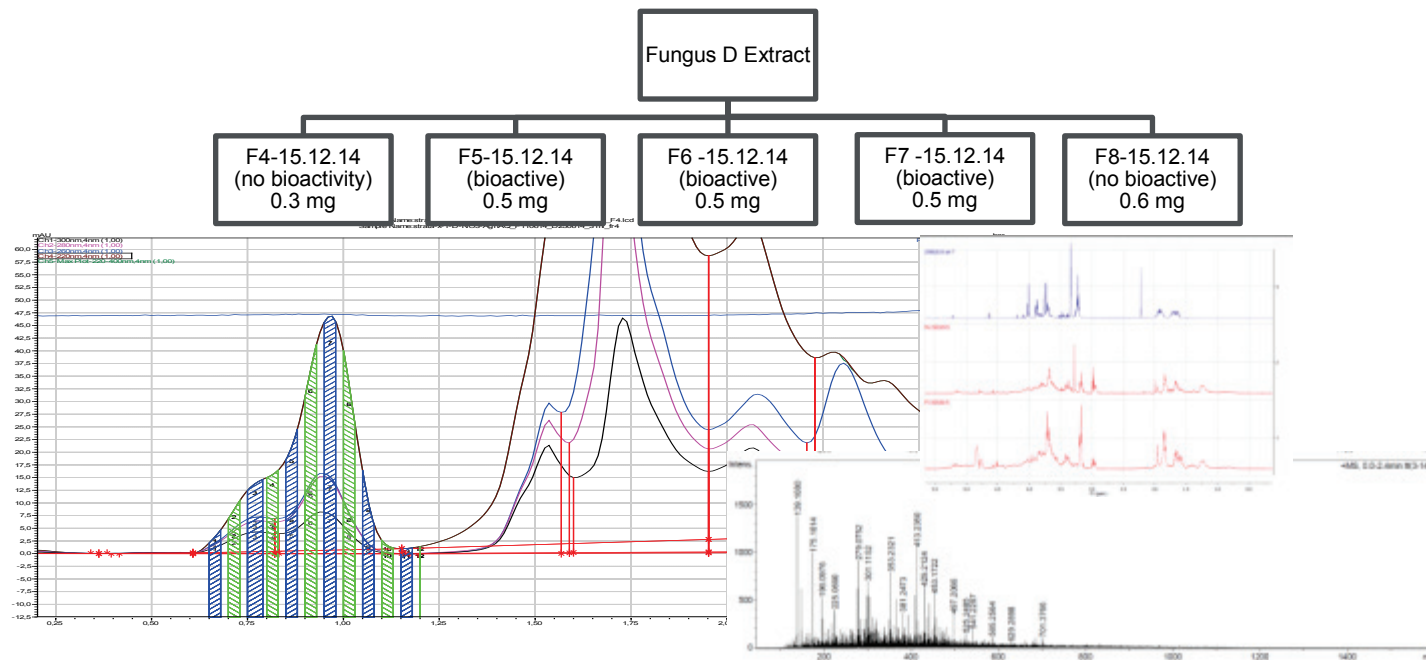
aktiivinen



Fraktioiden bioaktiivisuuden esitestaus H_2O_2 SCAV-testillä ja jatkotestaus solumallitesteillä (TaY, TTY).

Fraktioiden kemiallisen rakenteen selvitys, HY, kemian laitos (K.Wähälä, E.León-Denegri, R.Wufu).

Mitä seuraavaksi?



Sienten lääkeyhdisteiden tai niiden johtoyhdisteiden tunnistamisen ja hyödyntämisen hyvät ja huonot uutiset

- Endofyyttien kohdalla suuret mahdollisuudet löytää aivan uusia yhdisteitä, joilla erilainen vaikutusmekanismi verrattuna aiempiin lääkeyhdisteisiin
- Suuri osa endofyyteistä vielä löytämättä/tunnistamatta, eli niissä on olemassa valtava tutkimaton potentiaali
- Suot ovat suurelta osin tutkimaton kasvuympäristö endofyyttisienten osalta
- Lääkesienten kohdalla tutkimus on keskittynyt muutamaaan viljeltävään lajiin
- Sienten bioaktiivisten yhdisteiden solumalleilla toteutettuja ja eläinkokeita tehty paljon, mutta klinisiä tutkimuksia on vain vähän
- Endofyyttien osalta raaka-aineen saanti hankalaa. Biotekniset ratkaisut voivat soveltua joissakin tapauksissa luonnosta löytyneen yhdisteen tuottamiseen muunnelluilla organismeilla bioreaktoreissa

Lähdeluettelo

- Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J., Proksch P. (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41:1–16
- Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P. (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl Microbiol Biotechnol* 90:1829–1845
- Doty, S.L. 2011. Growth-promoting endohytic fungi of forest trees. In Pirttilä, A-M., Frank, C. (eds.) *Endophytes of Forest Trees*. Springer, p. 151, ISBN 978-94-007-1598-1
- Gutierrez, R.M.P., Gonzales, A.M.N., Ramirez, A.M. (2012) Compounds derived from endophytes: a review of phytochemistry and pharmacology. *Current Med. Chem.* 19,2992-3030.
- Newcombe, G. 2011. Endophytes in forest management: four challenges. In Pirttilä, A-M., Frank, C. (eds.) *Endophytes of Forest Trees*. Springer, p.251, ISBN 978-94-007-1598-1
- Pirttilä, A.M., Frank, A.C. (2011) *Endophytes of Forest Trees*. Springer, pp.319, ISBN 978-94-007-1598-1
- Rodriguez, R.J., White Jr, J.F., Arnold, A.E., Redman R.S. (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330
- Schueffler, A., Anke, T. 2011. Antimicrobial compounds from tree endophytes. In Pirttilä, A-M., Frank, C. (eds.) *Endophytes of Forest Trees*. Springer, pp.319, ISBN 978-94-007-1598-1
- Strobel, G.A. (2004) Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5, 535-544.
- Strobel, G.A., Knighton, B., Kluck, K., Ren, Y., Livinghouse, T., Griffin, M., Spakowicz, D., Sears, J. (2008) The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiol.*,154,3319–3328
- Unterseher, M. (2011) Diversity of fungal endophytes in temperate forest trees. In Pirttilä, A-M., Frank, C. (eds.) *Endophytes of Forest Trees*. Springer, pp.319, ISBN 978-94-007-1598-1

Kiitos!