Metsä Tieto Osaaminen METLA Hyvinvointi

Endofyyttisienet uusien terveysvaikutteisten bioaktiivisten yhdisteiden lähteenä

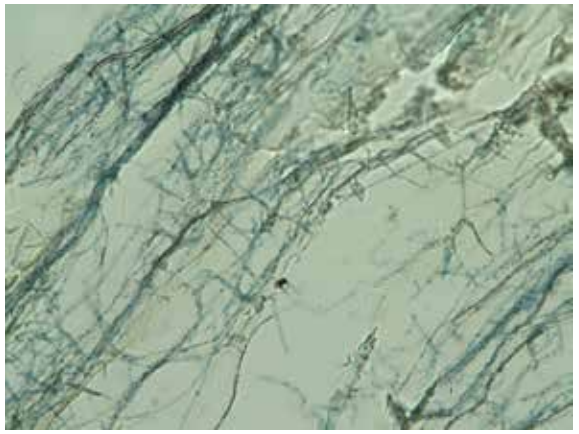
Tytti Sarjala

Metla, Parkano

Mitä ovat endofyytit?

- Endofyytit ovat mikro-organismeja, kuten bakteereita tai sieniä, jotka elävät elävissä kasvisolukoissa vahingoittamatta niitä.
- Rodriquez et al. 2009: *"**All plants in natural ecosystems appear to be symbiotic with fungal endophytes**. This highly diverse group of fungi can have profound impacts on plant communities through increasing fitness by conferring abiotic and biotic stress tolerance, increasing biomass and decreasing water consumption, or decreasing fitness by altering resource allocation."*
- Voivat elää oireettomasti kasvissa, tai ovat jopa latentteja patogeeneja tai lepotilassa olevia saprofyyttejä (Schueffler & Anke 2011)
- Metsäpuilla endofyyttisienten vaikutus puiden kasvuun on melko uusi tutkimusala. Useat tutkimukset ovat osoittaneet endofyyttien suojaavan patogeeneilta (Doty 2011, review). Endofyytit edesauttavat puuvartisten kasvien ekologista sopeutumista (Newcombe 2011, review).


Photo: T.Sarjala



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

- Suurin osa sieniendofyyteistä 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 sieniendofyyttejä on tutkittu vain noin 10%:sta (Unterseher 2011) puulajeja. Niissäkin tarkastelu on keskittynyt versoissa eläviin lajeihin.

Kasvien endofyyteistä suurin osa on vielä löytymättä

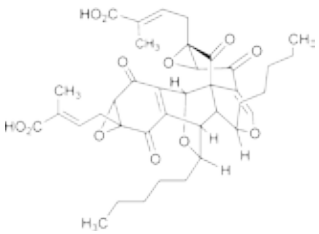
Endofyyttien bioaktiiviset yhdisteet

- Monien endofyyttisienten tiedetään sisältävän bioaktiivisia yhdisteitä, joilla on sytotoksisia, kasvaimien kasvua ehkäiseviä, antimikrobiaalisia, 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).

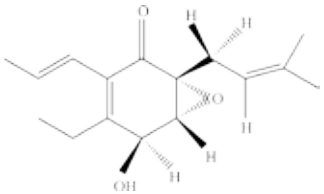
A.H. Aly, A. Debbab, P. Proksch (2011) Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. Appl Microbiol Biotechnol 90:1829–1845
A.H. Aly, A.Debbab, J. Kjer, P. Proksch (2010) Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. Fungal Diversity 41:1–16

- Vuosina 2000-2007 sieniendofyyttitutkimuksissa → yli 100 uutta bioaktiivista luonnonainetta. Vuosina 2008-2009 → yhtä paljon uusia löydöksiä.
  - antimikrobiaalisia, sytotoksisia, antiparasiittisia, hermosoluja suojaavia metaboliitteja
- Isäntäkasvin ja endofyytin välinen vuorovaikutus tulisi tuntea perusteellisemmin molekyylitasolla, jotta sekundäärimetaboliittien tuottoa olisi mahdollista optimoida laboratorio-olosuhteissa.
- Uusista lajeista löytyy usein myös uusia yhdisteitä, esim. 8 Hypoxylon-lajin tutkiminen tuotti 50 uutta biologisesti aktiivista yhdistettä (Dr. Frank Surup, *Helmholz Center for Infection Research, Department Microbial Drugs*)

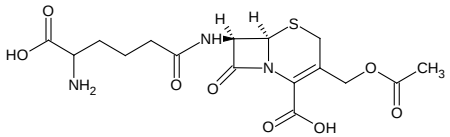
Muutamia esimerkkejä sienten tuottamista bioaktiivisista yhdisteistä ja lääkeaineista



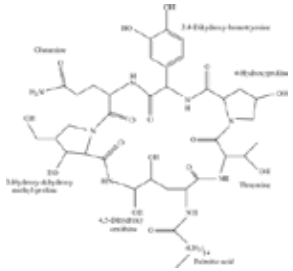
Torreyanic acid



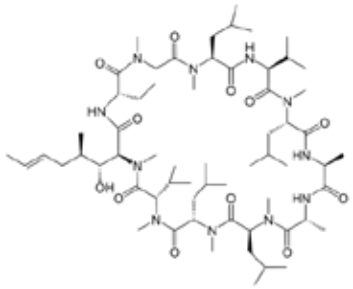
Jesterone



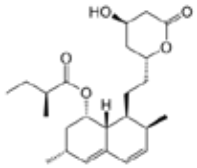
cephalosporin C



Cryptocandin A,



cyclosporin A



lovastatin

Endofyyttisienet ja bioaktiiviset yhdisteet/hankkeet, Metla

- **Terveyttä metsästä** 2008-2011 (EAKR)
- **BIOAKT, Pirkanmaan verkostopohjainen bio-osaamislaboratorio** 2012-2013 (EAKR)
- **Bioaktiiviset yhdisteet osana tulevaisuuden biotaloutta**, 2012-2015 (Metla)
- BIOSTEP - Luonnosta lääkeaihioita 2014 (EAKR)

- Yhteistyökumppanit:

Metla: 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)

Miksi endofyytit kiinnostavat – onko niillä vaikutusta puiden elinkykyyn ja menestymiseen ”vaikeilla” kasvupaikoilla?

- Ojitetuilla turvemailla (Suomessa n. 5milj. ha) puut (erityisesti uudistusalojen pienet taimet) joutuvat usein sietämään abioottista stressiä eri muodoissaan: äärevät lämpötilat, voimakas säteily, vaihteleva pohjavedenpinnan taso (kuivuus tai tulva) ja huonot ravinnesuhteet maaperässä.

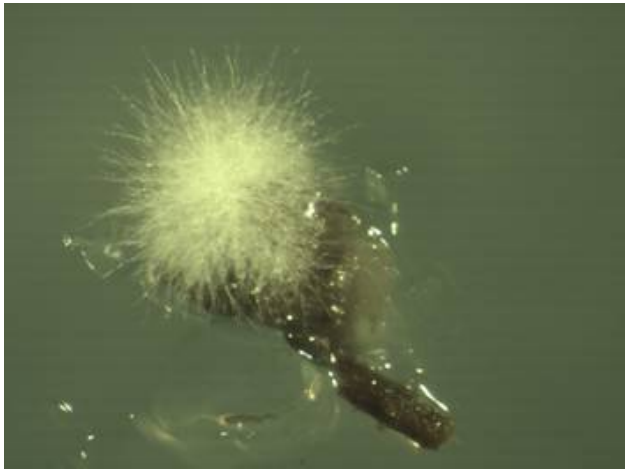




Mitä organismeja löytyy männyn juurista ojitetulta turvemaalta ja mikä on niiden merkitys?

- Olemme kiinnostuneita mm. männyn juurten yhteydessä elävien endofyyttisienten antioksidatiivisista ym. ominaisuuksista







Sienten puhdasviljelmien eristäminen männyn juurista



Juurten puhdistaminen



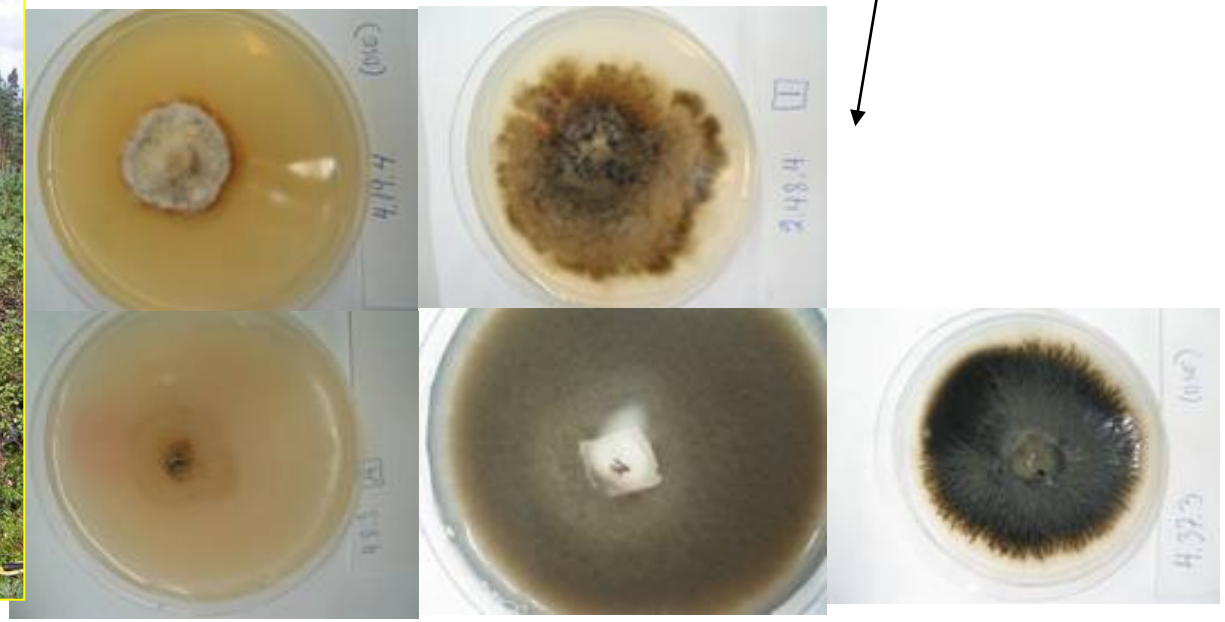
8-vuotiaat männyt

Juurten kärkien pintasterilointi





Pintasteriloidut juuren kärjet agarmaljoilla



PCR ITS1/ITS4 sequencing ← **Sieniviljelmät agarmaljoilla**

16:sta männyntaimen juuristosta otetuista juurenkärjistä samalta kasvupaikalta eristettiin 191 sienikantaa puhdasviljelmiin

- Rihmastosta uutettiin DNA 105 sienikannasta ja nukleotidisekvenssi (ITS1-ITS4 alue) selvitettiin
- Vertailemalla ITS alueen sekvenssiä NCBI-BLAST:ssa oleviin sienisekvensseihin havaittiin, että eristetyistä kannoista tuntemattomia oli 48% (Uncultured unknown), Phialocephala 29%, Meliniomyces 8%



Männyn juuristossa elävistä endofyyttisienistä suurin osa tuntemattomia

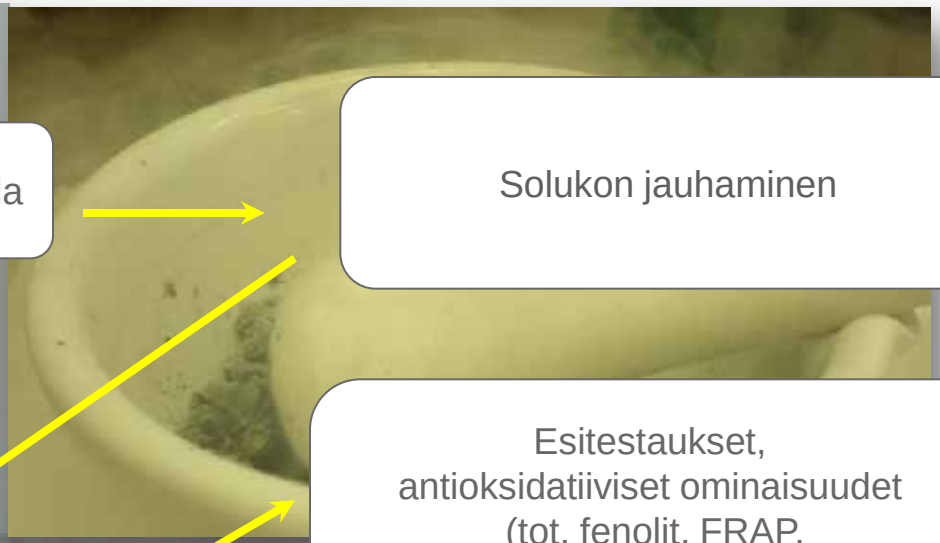
Onko männyn endofyyttisienissä bioaktiivisia yhdisteitä?

- Valikoitiin olemassa olevista sieniklooneista 26 kantaa tutkimuksiin
- Eri tavoin valmistettuja uutteita
- Eri esitestusmenetelmien pystytys ja soveltaminen
- Yhteistyö TaY:n Lääketieteen yksikön kanssa, solumallitestaukset
- Aktiivisten uutteiden jatkotutkimukset

Uuttaminen ja esitestaus



Sienirihmaston viljely maljalla



Solukon jauhaminen

Esitestaukset,
antioksidatiiviset ominaisuudet
(tot. fenolit, FRAP,
H2O2 scavenging)



Uuttaminen
(kuuma vesi)



Testaukset solumalleilla (TaY)

Vipuvoimaa EU:lta 2007–2013

METLA

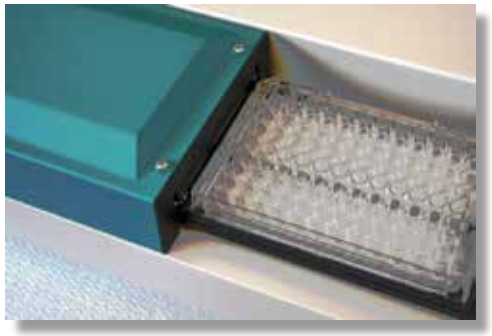
UNIVERSITY OF TAMPERE

SILK

Esitestausmenetelmät 96-kuoppalevyllä

- **Fenoliyhdisteiden kokonaispitoisuuden määritys Folin-Ciocalteaun (FC) menetelmällä**
- **FRAP-testi (Ferric reducing antioxidant power)**
- **Proteiinimääritys Bio-Rad Protein Assay –menetelmällä**
- **'H_2O_2 scavenging' -testi**

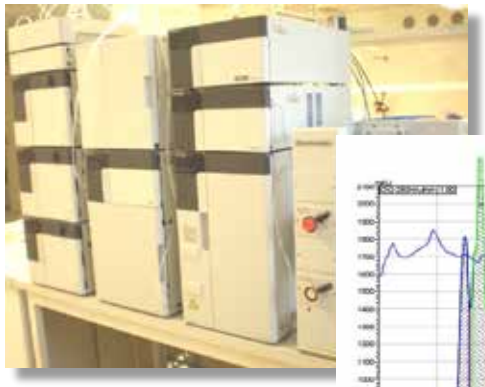
Lähteet: Singleton *et al*, 1999; Benzie & Strain, 1999, Hazra *et al*, 2008

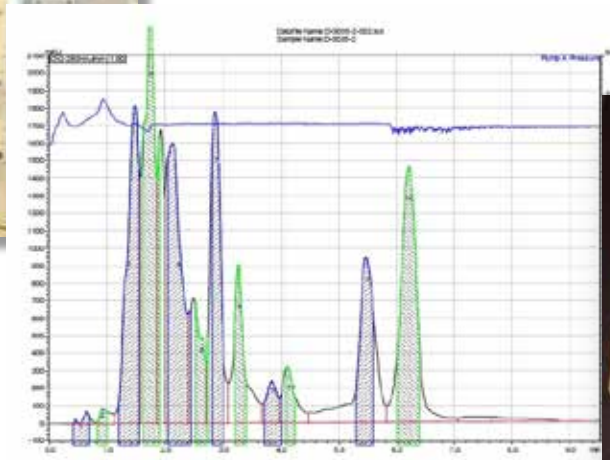




METLA
METSÄNTUTKIMUSLAITOS

Sieniuutteen fraktiointi prep. HPLC:llä







Fraktioiden bioaktiivisuuden esitestaus H_2O_2 SCAV-testillä ja jatkotestaus solumallitesteillä (TaY, TTY).
Fraktioiden kemiallisen rakenteen selvitys, HY, kemian laitos.

Sieniuutteiden ja fraktioiden bioaktiivisuuden testaus Tampereen yliopiston Lääketieteen yksikössä

- **Yhteistyökumppanit:**
  - **Immunofarmakologian tutkimusryhmä, prof. Eeva Moilanen, LT Katriina Vuolteenaho**
    - Immortalisoitu ihmisen rustosolulinja
    - Nivelrikko, rustosolukko, MMP-entsyymit
  - **Silmälääketieteen tutkimusryhmä, prof. Hannu Uusitalo, FT Ulla Aapola**
    - Silmän verkkokalvon pigmenttiepiteelisolumalli (RPE), kokeellinen silmän ikärappeumamalli
    - RPE-solut, fagosytoosi
    - Sarveiskalvon haavanparanemismalli

TAMPEREEN YLIOPISTO

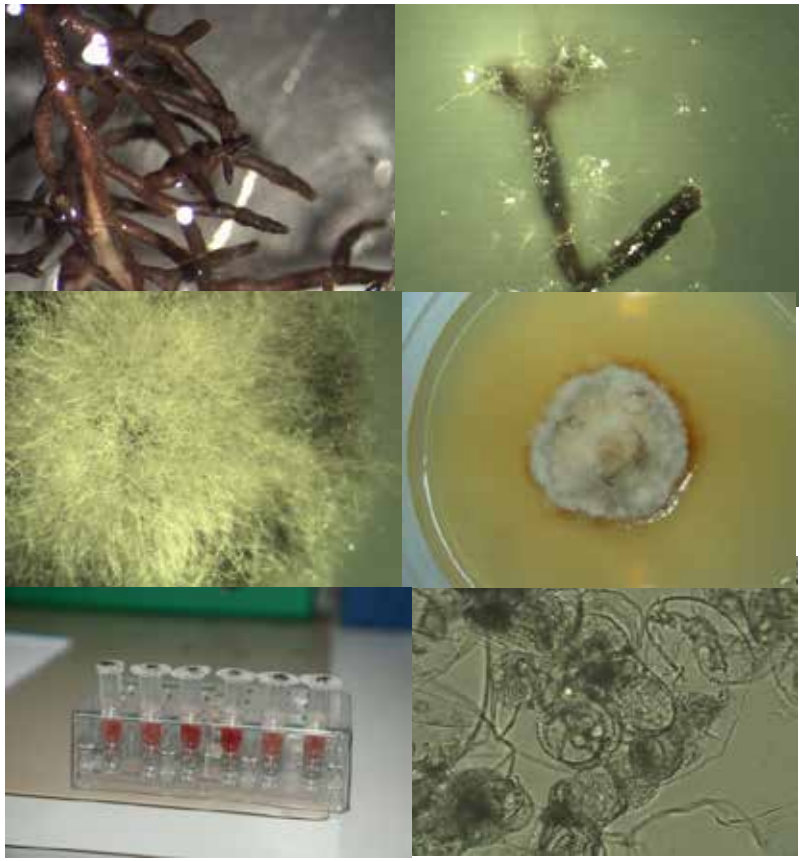
SILK

Bioaktiivisuuden testaukset geneettisesti modifioiduilla mikrobipohjaisilla biosensoreilla Tampereen teknillisessä yliopistossa biotekniikan laboratoriossa

- **Yhteistyökumppanit TkK Jenni Tienaho , Prof. Matti Karp, Prof. Robert Franzen**
  - *E. coli* DPD2511 – Oksidatiiviset ja antioksidatiiviset ominaisuudet
  - *E.coli* DPD2794 – mikrobi-DNA:ta vaurioittavat tekijät
  - *S. cerevisiae* - pRS316-kanta – Epäspesifinen toksisuus
  - *S.cerevisiae* - Erα-kanta – Estrogeeniset yhdisteet

Mitä poikkitieteellinen tutkimustyö paljastaa endofyyttisienistä?

- Poikkitieteellisen yhteistyön tuloksena bioaktiivisuuden testaukset eri malleilla ja menetelmillä ovat osoittaneet, että endofyyttisienet sisältävät bioaktiivisia yhdisteitä, joiden tutkiminen voisi mahdollisesti johtaa uusien lääkkeiden kehittämiseen tulevaisuudessa tai muihin mahdollisiin terveysvaikutteisten tuotteiden kehittämiseen.
- Luonnon monimuotoisuuden ylläpitäminen takaa myös endofyyttien monimuotoisuuden säilymisen metsäluonnossamme.



Tulevaisuuden tuotteet?

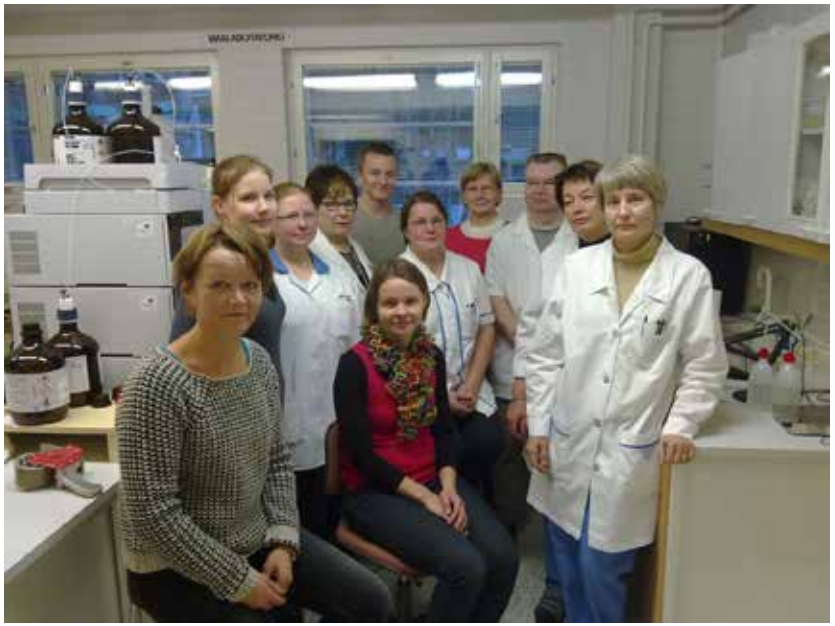
- Lääkeaineet tai niiden lähtöaineet
- Kosmetiikka
- Luonnonaineista kehitetyt synteesireaktioiden katalyytit (lääke)teollisuuden käyttöön
- **Tärkeää**
  - Luonnon monimuotoisuus takaa myös endofyyttien olemassaolon ja potentiaalisen reservin uusille bioaktiivisille yhdisteille tulevaisuudessakin

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 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

Metla, Parkanon toimipaikan laboratoriotiimi

Tytti Sarjala, erikoistutkija, FT, dosentti
Harri Latva-Mäenpää, tutkija, FM
Eira-Maija Savonen, tutkija, FM
Riina Muilu-Mäkelä, ulkopuolinen tutkija, FM
Jenni Tienaho, projektityöntekijä, TkK (TTY)
Kari Honka, laboratoriomestari
Anneli Käenmäki, laboratoriomestari
Hanna Leppälammi, laboratorioanalyytikko
Eeva Pihlajaviita, laboratoriomestari
Arja Ylinen, laboratoriomestari




metsä
METLA
TIETO
osaaminen
hyvinvointi
Kiitos