

Endofyyttien tuottamat antimikrobiset peptidit

Melina Erjama

LuK-tutkielma

Biologian tutkinto-ohjelma

Oulun Yliopisto

Joulukuu 2020

Sisällysluettelo

Tiivistelmä	2
1. Johdanto	3
2. Antimikrobiset peptidit	4
2.1. Antimikrobisten peptidien tuotto, luokittelu ja rakenteet	4
2.2. Antimikrobisten peptidien toimintamekanismit	6
2.3. Antimikrobisten peptidien hyödyntäminen	8
3. Endofyyttien tuottamat antimikrobiset peptidit	9
3.1. Endofyyttien tuottamien peptidien tutkimisesta	9
3.2. Trtesin	10
3.3. Munumbikiinit A-D	10
3.4. SC39 peptidit	12
4. Antibioottiresistenssi	13
4.1. Antibioottiresistenssin muodostuminen	14
4.2. Antimikrobisten peptidien käyttö lääkeaineina ja resistenssin syntyminen	14
5. Johtopäätökset	16
6. Kirjallisuuslähteet	18

Tiivistelmä

Endofyytit ovat kasvien soluväleissä tai soluissa eläviä mikro-organismeja, jotka eivät aiheuta kasville haittaa. Endofyytit voivat edistää kasvin kasvua sekä suojella kasvia bioottiselta ja abioottiselta stressiltä. Osa kasvien endofyyteistä tuottaa antimikrobisia aineenvaihduntatuotteita, kuten alkaloideja, steroideja, terpenoideja ja peptidejä. Tunnetuimpia endofyyttejä ovat sienet ja bakteerit, joissa antimikrobisia peptidejä tuotetaan ribosomaalisesti sekä ei-ribosomaalisesti. Antimikrobiset peptidit ovat lyhyitä, usein positiivisesti varautuneita ja amfifilisiä. Nämä, pääosin aminohapoista koostuvat molekyylit, omaavat aktiivisuuksia esimerkiksi kasvi- ja ihmispatogeenejä vastaan. Antimikrobiset peptidit pystyvät tappamaan myös antibiooteille resistenttejä bakteerikantoja. Tässä tutkielmassa esitellään kolmen eri endofyytin tuottamia antimikrobisia peptidejä ja niiden erilaisia aktiivisuuksia. Trtesin on suopursusta (*Rhododendron tomentosum*) löytyneen endofyyttisen *Fusarium tricinctum* -sienen tuottama antimikrobinen peptidi. Munumbikiinit A-D ovat *Kennedia nigriscans* kasvista löytyneen *Streptomyces* NRRL 3052 -bakteerin tuottamia antimikrobisia peptidejä. SC39 peptidit ovat paprikasta (*Capsicum annuum* L.) eristetyn endofyyttisen EML-CAP3 –bakteerikannan tuottamia antimikrobisia peptidejä.

Useat bakteerikannat ovat muodostaneet resistenssin käytössä oleville antibiooteille, kuten penisilliinille, metisilliinille ja vankomysiinille. Antibioottiresistenssi onkin suuri ongelma kansanterveydelle ja uusia lääkkeitä on löydettävä taistelussa mikrobeja vastaan. Antimikrobisista peptideistä on kiinnostuttu lääketieteessä, koska peptidit pystyvät tappamaan bakteereita pienillä pitoisuuksilla ja niiden toimintamekanismit ovat tarkkoja mikrobeja vastaan. Lisäksi, toisin kuin antibiootit, antimikrobiset peptidit omaavat aktiivisuuksia myös esimerkiksi sieniä, alkueläimiä ja syöpäsoluja vastaan. Endofyyttien tuottamat antimikrobiset peptidit ovat mielenkiintoinen tutkimuskohde, koska niistä odotetaan löytyvän täysin uusia molekyylijä lääketeineiksi. Löydettyjä peptidejä voidaan muokata, jolloin niiden ominaisuuksia saadaan parannettua. Tässä tutkielmassa perehdytään siihen, onko antimikrobisille peptideille kehittynyt resistenssiä ja voisivatko antimikrobiset peptidit toimia uusina lääketeineinä antibioottiresistenssin leviämisen ehkäisemisessä.

1. Johdanto

Maapallolla elää noin 300 000 kasvilajia, ja jokaisella niistä odotetaan olevan yksi tai useampi endofyytti (G. Strobel & Daisy, 2003). Hardoim ym. (2015) kirjoittamassa artikkelissa on kuvattu endofyyttien piirteitä. Endofyytit ovat kasvin kudoksissa eläviä mikro-organismeja. Ne voivat sijaita esimerkiksi kasvin juurissa, lehdistä tai varressa riippuen kasvista ja endofyytistä. Ne eivät yleensä haittaa kasvin menestymistä, mutta osa endofyyteistä on kasville hyödyllisiä. Kasvien ja endofyyttien väliset suhteet voivat olla kommensalistisia, mutualistisia, symbionttisia tai antagonistisia. Endofyytit voivat edistää kasvin kasvua sekä suojella kasveja bioottiselta ja abioottiselta stressiltä. Bakteerit ja sienet ovat tunnetuimpia endofyyttejä, ja ne koostavat kasvin mikrobiomin. Endofyytit esimerkiksi osallistuvat nitrifikaatioon, estävät herbivoriaa tai tuottavat antimikrobisia aineenvaihduntatuotteita (Hardoim ym., 2015).

Endofyyttien tuottamat antimikrobiset aineenvaihduntatuotteet ovat laaja ryhmä erilaisia yhdisteitä, kuten alkaloideja, steroideja, terpenoideja, fenoleita, kinoneita, flavonoideja ja peptidejä. Nämä yhdisteet auttavat kasveja torjumaan patogeenejä kasvien itse tuottamien yhdisteiden lisäksi (Yu ym., 2010). Eristettyjen endofyyttien tiedetään tuottavan esimerkiksi antimikrobisia peptidejä, joiden on tutkittu olevan aktiivisia myös ihmisten patogeenejä vastaan. Tulevaisuudessa löydettävien endofyyttien tuottamista aineenvaihduntatuotteista voisi löytyä ratkaisuja uusien lääkeaineiden kehitykseen, maatalouteen sekä teollisuuteen (G. Strobel & Daisy, 2003).

Lewiesin, Du Plessisin ja Wentselin (2019) kirjoittamassa artikkelissa antibioottiresistenssiä on kuvattu maailmanlaajuisesti ja nopeasti leviäväksi ongelmaksi. Bakteerit ovat nopeita kehittämään resistenssiä antibiootteja vastaan ja useat bakteerikannat ovat resistenttejä monelle eri antibiootille. Antibioottiresistenssin leviämisen ja multiresistenttien bakteereiden tappamiseen on kehitettävä uusia lääkeaineita, joten antimikrobisten peptidien käytön mahdollisuuksista on kiinnostuttu. Antimikrobisten peptidien toimintamekanismit mikrobien tappamiseen ovat erilaisia kuin perinteisillä antibiooteilla, joten mikrobien resistenssin kehittyminen on myös erilaista (Lewies, Du Plessis & Wentzel, 2019). Eri organismien tuottamien antimikrobisten peptidien on huomattu olevan aktiivisia mm. gram-positiivisia ja -negatiivisia bakteereita, usealle eri antibiootille resistenttejä bakteerikantoja, sieniä, viruksia, malariaa sekä syöpäsoluja vastaan (Seyfi ym., 2020). Peptidien käyttöä uusina lääkeaineina pidetään potentiaalisena vaihtoehtona, koska niiden toimintamekanismit ovat tarkkoja ja ne ovat nopeita

tappamaan mikrobeja. Muokkauksilla peptideistä voidaan tehdä vielä tehokkaampia (Hassan, Kjos, Nes, Diep & Lotfipour, 2012).

Tässä tutkielmassa keskitymme endofyyttien tuottamiin antimikrobisiin peptideihin ja siihen, voisivatko peptidit toimia uusina lääkeaineina antibioottien korvaajina ja synnyttävätkö peptidit resistenssiä.

2. Antimikrobiset peptidit

Antimikrobiset peptidit ovat osa eliöiden synnynnäistä immuunipuolustusta. Antimikrobisia peptidejä ei esiinny vain eukaryooteilla, vaan on olemassa myös bakteereita, jotka tuottavat antimikrobisia peptidejä muita bakteereita vastaan (Hassan ym., 2012). Antimikrobisia peptidejä esiintyy siis kaikissa organismeissa prokaryooteista ihmisiin. Niillä on ominaisuuksia patogeenejä, kuten bakteereita, sieniä, viruksia ja alkueläimiä vastaan (Hancock & Diamond, 2000).

Antimikrobiset peptidit ovat moninainen ryhmä rakenteellisesti erilaisia peptidejä. Ne ovat pieniä, 6–100 aminohaposta koostuvia makromolekyylejä ja ne ovat yleensä positiivisesti varautuneita sekä amfiifiilisiä (Seyfi ym., 2020). Marraskuussa 2020 antimikrobisia peptidejä on lisätty The Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides (DBAASP) tietokantaan 16180 kappaletta. Tietokanta sisältää peptidejä sekä pro- että eukaryooteilta (DBAAP Statistics, 2020).

2.1. Antimikrobisten peptidien tuotto, luokittelu ja rakenteet

Antimikrobisia peptidejä tuotetaan nisäkkäillä mm. neutrofiileissä sekä epiteelisoluissa. Hyönteisiltä antimikrobisia peptidejä on löydetty hyönteisten hemolymfasta sekä niiden tuottamista myrkyistä. Matelijoilta antimikrobisia peptidejä on havaittu erityisesti iholta sekä ruoansulatuselimistön limakalvoilta (Hancock & Chapple, 1999). Kasveilla antimikrobisia peptidejä esiintyy mm. lehdistä, siemenissä ja juurissa, mutta myös muissa rakenteissa (Tam, Wang, Wong & Tan, 2015). Peptidejä luokitellaan perheisiin esimerkiksi niiden rakenteen mukaan. Defensiinit ovat yksi antimikrobisten peptidien perheistä ja niitä esiintyy eläimillä, kasveilla sekä sienillä (Mygind ym., 2005). Tässä kappaleessa keskityn kasvien ja erityisesti endofyyttien tuottamiin antimikrobisiin peptideihin.

Geenien koodaamia, eli ribosomaalisesti tuotettuja, antimikrobisia peptidejä löytyy kaikilta organismeilta. Peptidien tuottoa säädellään transkriptionaalisella sekä translaation

jälkeisellä tasolla. Proteaasit muokkaavat osaa peptideistä translaation jälkeen siten, että ne muuttuvat aktiivisiksi mikrobeja vastaan (Lai & Gallo, 2009). Hancockin ja Sahlin (2006) artikkelissa ribosomaalisesti tuotettuja antimikrobisia peptidejä kuvataan seuraavasti. Ribosomaalisesti tuotetut antimikrobiset peptidit ovat yleensä lyhyitä, noin 10–50 aminohappoa pitkiä, positiivisesti varautuneita ja niissä on hydrofobisia osia enemmän kuin 30 %. Antimikrobiset peptidit voidaan jakaa neljään luokkaan niiden kolmiulotteisen rakenteen perusteella. Luokat koostuvat peptideistä, joissa on joko α -heliksi tai β -levy, ne ovat rakenteeltaan pidennettyjä ja niissä esiintyy paljon jotain tiettyä aminohappoa, kuten glysiiniä, proliinia, tryptofaania, arginiinia tai histidiiniä. Viimeinen luokka koostuu peptideistä, jotka muodostavat silmukan yhdellä disulfidisillalla. Edellä mainitut ominaisuudet tekevät peptidien kolmiulotteisista rakenteista amfiifilisiä. Peptidit, joissa on α -heliksejä tai niiden rakenne on pidennetty, saavuttavat amfiifilisen rakenteen vasta kosketuksissa mikrobin pintaan (Hancock & Sahl, 2006).

Tam ym. (2015) listasivat artikkelissaan kasvien antimikrobisten peptidien piirteitä. Nämä ribosomaalisesti tuotetut peptidit luokitellaan niiden sekvenssin, kysteiniiniosien ja tertiäärirakenteeseen vaikuttavien disulfididosten perusteella. Kasvien antimikrobiset peptidit voidaan jakaa myös isommassa kuvassa kysteiniirikkaisiin sekä ei-kysteiniirikkaisiin peptideihin. Suurin osa kasvien antimikrobisista peptideistä on kysteiniirikkaita. Disulfididokset takaavat sen, että kysteiniirikkaat peptidit ovat rakenteeltaan kemiallisesti, lämpötilallisesti ja entsyymaattisesti hyvin stabiileja. Kysteiniirikkaat peptidit luokitellaan perheisiin ominaisuuksiensa mukaan. Perheitä ovat esimerkiksi tioniinit, defensiinit, heveiin kaltaiset peptidit, knottiini-tyyppin peptidit sekä lipidinsiirtopeptidit. Kysteiniirikkailla peptideillä on yleensä kahdesta kuuteen disulfididosta, mutta esimerkiksi tioniineillä ja defensiineillä voi olla yksi tai kaksi disulfididosta enemmän (Tam ym., 2015). Myös sieniltä löytyy defensiinejä. Esimerkiksi plektasiini on *Pseudoplectania nigrella* -sieneltä löydetty antimikrobinen peptidi (Mygind ym., 2005).

Meaden, Slattery ja Garveyn (2020) artikkelissa on esitelty bakteriosiinejä, jotka ovat yksi ryhmä bakteereiden tuottamista antimikrobisista peptideistä. Bakteerit tuottavat bakteriosiinejä puolustautuakseen sekä kilpaillakseen elintilasta. Bakteriosiinit tuotetaan ribosomaalisesti ja ne ovat myrkyllisiä muita bakteereita vastaan, mutta translaation jälkeisten muutosten takia ne eivät vahingoita isäntäbakteeria. Nämä muutokset ovat peptidin konfiguraation muutoksia. Suurin osa tunnetuista bakteriosiineistä on gram-positiivisten bakteereiden tuottamia, mutta myös gram-negatiiviset bakteerit tuottavat näitä peptidejä. Bakteriosiinit ovat rakenteeltaan 30–60 aminohapon kokoisia, kationisia ja ne eroavat toisistaan molekyyllipainojen, aktiivisuuksien ja biokemiallisten ominaisuuksiensa suhteen. Bakteriosiinit jaetaan neljään luokkaan niiden ominaisuuksien

perusteella. Esimerkiksi luokan I tunnetuin bakteriosiini on Nisiini A, jonka massa on alle 5 kDa, se on ribosomaalisesti tuotettu peptidi *Lactococcus lactis* -bakteerissa ja se on aktiivinen useita eri bakteerisukuja vastaan (Meade, Slattery & Garvey, 2020).

Sieniltä sekä bakteereilta löytyy ribosomaalisesti tuotettujen peptidien lisäksi ei-ribosomaalisesti tuotettuja antimikrobisia peptidejä (Breen, Solomon, Bedon & Vincent, 2015). Breen ym. (2015) artikkelissa kuvataan ei-ribosomaalisesti tuotettujen peptidien synteesiä sekä rakennetta. Multientsyymikompleksit, joita kutsutaan peptidisyntetaaseiksi (NonRibosomal Peptide Synthetases, NRPS) rakentavat ei-ribosomaalisesti tuotetut antimikrobiset peptidit. Nämä syntetaasit tuotetaan geeniklustereissa tai operonialueilla. Syntetaasien tuottamat peptidit eroavat ribosomaalisesti tuotetuista peptideistä niiden rakenteen monimuotoisuudella (Breen ym., 2015). Peptidisyntetaaseilla on kyky tunnistaa ja muokata aminohappoa sekä liittää se kasvavaan aminohappoketjuun. Näin syntyneissä peptideissä voi olla esimerkiksi L- tai D-konfiguraation aminohappoja tai aminohappoja, joissa on hydroksiryhmä (Hancock & Chapple, 1999). Lisäksi syntetaasit voivat lisätä peptidiketjuun metyloituja, glykosyloituja tai fosforiloituja aminohappotähteitä sekä rasvahappoja. Nämä rakenteet tekevät ei-ribosomaalisesti syntetisoiduista peptideistä makrosyklisiä. Ei-ribosomaalisesti tuotettu antimikrobinen peptidi on esimerkiksi Syringoliini A, joka on *Pseudomonas syringae* -bakteerin tuottama syklinen lipopeptidi (Breen ym., 2015).

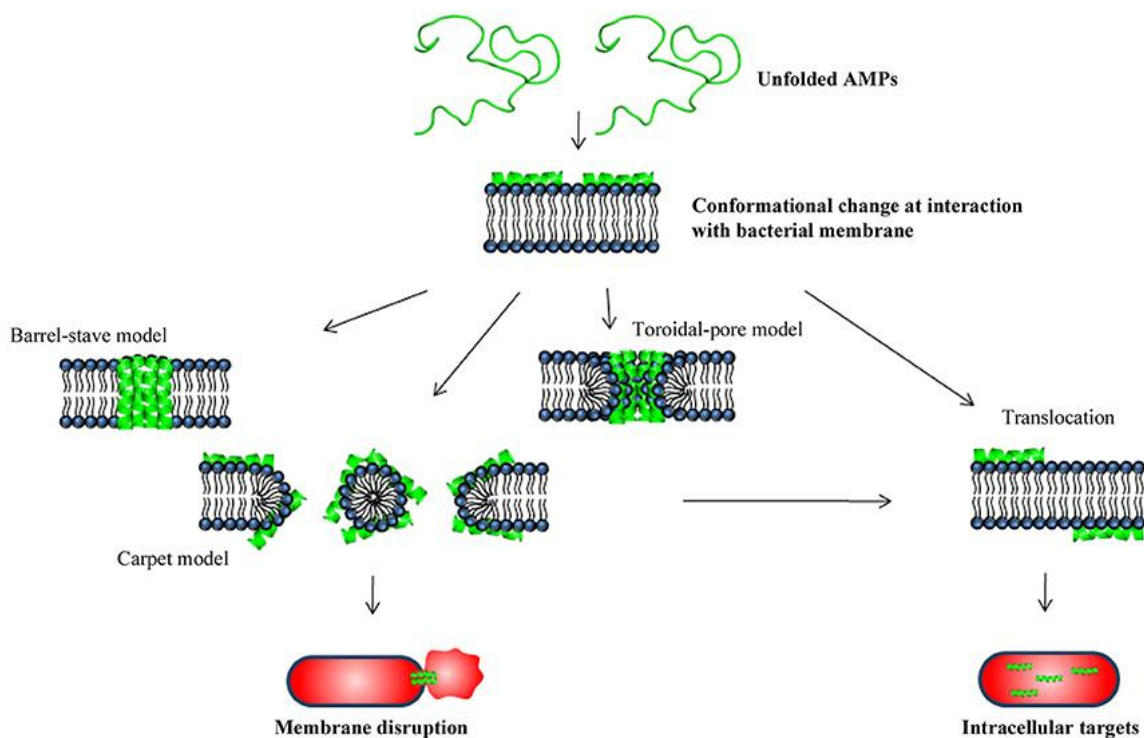
2.2. Antimikrobisten peptidien toimintamekanismit

Useimpien antimikrobisten peptidien toimintamekanismi perustuu peptidien sitoutumiseen mikrobin solukalvolle ja solukalvon rakenteen rikkomiseen (Broden, 2005). Sekä eukaryoottisolun että prokaryoottisolun solukalvo koostuu kaksikerroksisesta fosfolipidikalvosta, mutta solukalvoissa on kuitenkin eroja varauksen suhteen. Eukaryoottisolun solukalvossa on lähinnä neutraalisti varautuneita molekyylejä, kuten fosfatidyylikoliinia, kolesterolia, ergosterolia ja sfingomyeliiniä. Prokaryoottisolujen solukalvoissa, esimerkiksi gram-positiivisten ja -negatiivisten bakteerien solukalvoissa, on negatiivisesti varautuneita fosfolipidejä, kuten fosfatidyyliglyserolia, kardioliipiiniä ja fosfatidyyliiseriiniä (Yeaman & Yount, 2003). Kationiset antimikrobiset peptidit sitoutuvat negatiivisesti varautuneeseen solukalvoon elektrostaattisen eron takia, ja pystyvät tämän jälkeen vaikuttamaan bakteerin solukalvon rakenteeseen (Broden, 2005).

Kolme tunnetuinta mekanismia, joilla peptidit voivat rikkoa solukalvon, perustuvat reiän luomiseen solukalvoon (kuva 1). Solukalvossa oleva reikä häiritsee solun toimintaa

vaikuttamalla mm. ionitasapainoon ja solukalvon toimintaan. Lopulta solukalvo rikkoutuu täysin (Brogden, 2005; Yeaman & Yount, 2003). Brogden (2005) artikkelissa mekanismit kuvataan seuraavasti. ”Tynnyri-lauta mallissa” (”barrel-stave model”) peptidit asettuvat kohtisuoraan solukalvon läpi luoden kanavan kalvon lävitse. ”Toroidi-aukko mallissa” (”toroidal-pore model”) peptidit pakottavat kalvon taipumaan siten, että syntyvä reikä muodostuu yksikerroksisesta fosfolipidikalvosta sekä peptideistä. ”Matto mallissa” (”carpet model”) peptidit asettuvat vaakatasossa solukalvon pinnalle. Peptidit luovat painetta solukalvolle ja lopulta muodostavat solukalvon kanssa misellejä. Kaikissa malleissa peptidit ovat asettuneet kalvolle siten, että peptidin hydrofobiset osat ovat kalvoa vasten ja hydrofiiliset osat ovat aukon sisälle päin (Brogden, 2005).

Osa antimikrobisista peptideistä pystyy siirtymään solukalvon läpi solulimaan ja näin tappamaan mikrobin. Solulimassa peptidit vaikuttavat inhiboivasti solulle välttämättömiin toimintoihin, kuten soluseinän tai nukleiinihappojen synteesiin, entsyymitoimintaan sekä proteiinisynteesiin (Brogden, 2005).



Kuva 1. Antimikrobisten peptidien mekanismit bakteerin tuhoamiseen. Kuva: Frontiers, Mahlapuu ym. (2016). Lupa kuvaan: CC-BY 4.0.

Tiedetään, että eri peptidit voivat toimia samanaikaisesti mikrobin hajotuksessa, osa solukalvon toimintaan vaikuttaen ja osa, solukalvon hajottua, solunsisäisten toimintojen lopetukseen (Brogden, 2005). Eri peptideillä on eri kohteet mikrobiin sitoutuessa. Esimerkiksi kasvien heveisiin kaltaiset peptidit sitoutuvat mikrobin kitiiniin, knottiini-tyypin peptidit inhiboivat entsyymejä ja lipidinsiirtopeptidit sitoutuvat lipideihin läpäistäkseen solukalvon (Tam ym., 2015).

On olemassa antimikrobisia peptidejä, joilla on aktiivisuuksia sieniä vastaan, joten kaikkien peptidien sitoutumismekanismit eivät perustu vain elektrostaattiseen eroon kuten positiivisesti varautuneilla peptideillä ja negatiivisesti varautuneella bakteerin solukalvolla. Kasveilla esiintyy esimerkiksi defensiinejä, joilla on aktiivisuuksia sieniä vastaan, mutta ne eivät vahingoita kasvin omaa solukkoa eivätkä myöskään nisäkässoluja. On tutkittu, että osa antimikrobisista peptideistä pystyy sitoutumaan tiettyihin sienisolun kalvoreseptoreihin ja sitä kautta vaikuttamaan negatiivisesti sienisolun (Thevissen, Osborn, Acland & Broekaert, 1997).

2.3. Antimikrobisten peptidien hyödyntäminen

Antimikrobisten peptidien ominaisuuksista on kiinnostuttu mm. lääketieteessä ja ravinnontuotannossa. Viljelykasvien, esimerkiksi perunan, riisin ja tomaatin, geenejä on muokattu tuottamaan antimikrobisia peptidejä kasvipatogeeniä vastaan (Keymanesh, Soltani & Sardari, 2009). Peptidien käyttöä ruoantuotannossa voidaan hyödyntää esimerkiksi lisäämällä peptidejä sadonkorjuun jälkeen rehuun kemikaalisten homeenestoaineiden sijaan. Peptideistä haetaan myös ratkaisua ruoansäilöntään ja ruokamyrkytystä aiheuttavien bakteereiden torjuntaan (Seyfi ym., 2020). Antimikrobisista peptideistä toivotaan ratkaisua antibioottiresistenttien bakteerikantojen torjuntaan, haavojen ja tulehdusten hoitoon sekä syöpähoitoihin (Mahlapuu, Håkansson, Ringstad & Björn, 2016). Antimikrobisten peptidien käytöstä syöpähoidoissa on kiinnostuttu, koska nykyään käytettävillä syöpähoitoilla on paljon haitallisia sivuvaikutuksia potilaaseen, joten olisi hyvä löytää hoitokeino, joka on vain syöpäsoluja tappava (van Zoggel ym., 2012). Endofyyttien tuottamat antimikrobiset peptidit, kuten Leukostatiini A ja myöhemmin tässä tutkielmassa esiteltävät SC39 peptidit ovat osoittaneet aktiivisuutta syöpäsoluja vastaan (Jung, Kim, Lee & Kwon, 2015; G. A. Strobel, Torczynski & Bollon, 1997).

3. Endofyyttien tuottamat antimikrobiset peptidit

Aspergillus, *Alternaria*, *Pichia*, *Colletotrichum*, *Fusarium* ja *Pestalotiopsis* ovat esimerkkejä sienisuvuista, joita on tutkimuksissa eristetty endofyytteinä eri kasvilajeilta. Näillä endofyyttisillä sienillä on huomattu olevan myös antimikrobisia ominaisuuksia (Tejesvi ym., 2013). Endofyyttisiä bakteerisukuja, joilla on tutkimuksissa todettu olevan antimikrobisia ominaisuuksia ovat esimerkiksi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* (Castillo ym., 2002; Miller, Qing, Man-Yuen Sze, Roufogalis & Neilan, 2012). Endofyyttien tuottamien geneettisesti koodattujen antimikrobisten peptidien tutkimus on kuitenkin vasta aluillaan. Uusien endofyyttien löytäminen mahdollistaa myös uusien antimikrobisten tuotteiden, kuten peptidien, löytämisen ja tutkimisen (Tejesvi ym., 2013).

Tässä kappaleessa esittelen kolmen erilaisen esimerkin avulla minkälaisia aktiivisuuksia ja rakenteita endofyyttien tuottamilla antimikrobisilla peptideillä voi olla. Trtesin on endofyyttisen sienien tuottama peptidi, kun taas munumbikiinit sekä SC39 peptidit ovat endofyyttisten bakteereiden tuottamia.

3.1. Endofyyttien tuottamien peptidien tutkimisesta

Endofyyttien tuottamien antimikrobisten aineiden tutkimusta pidetään tärkeänä mm. siksi, että uusien molekyylien löytäminen voi olla ratkaisuna ihmisten ja kasvien patogeenien torjumiseen. Yu ym. (2009) listasivat artikkelissaan perusteita sille, mistä kasvilajista sopivia endofyyttejä lähdetään etsimään. Uusia, antimikrobisia aineita tuottavia, endofyyttejä on todennäköistä löytää kasvilajeista, joiden elinympäristön biodiversiteetti on runsas tai ne elävät terveenä patogeeneille altistuneiden kasvilajien rinnalla. Kasvilaji voi valikoitua tutkimuksen kohteeksi myös silloin kun tiedetään, että se on ollut alkuperäiskansojen käytössä parantavana kasvina (Yu ym., 2010).

Endofyyttien tuottamien antimikrobisten peptidien antimikrobisia aktiivisuuksia voidaan testata erilaisilla diffuusioanalyseillä sieniä, bakteereita, loisia tai solulinjoja vastaan (Tejesvi ym., 2016). Peptidien eristystä ja karakterisointia tehdään esimerkiksi kromatografisin menetelmin sekä massaspektroskopiolla (Castillo ym., 2002). Myös uuden sukupolven sekvensointimenetelmiä käytetään endofyyttien tuottamien antimikrobisten peptidien tutkimisessa. Menetelmät mahdollistavat esimerkiksi endofyytin transkriptomin tutkimisen (Tejesvi ym., 2013). Tutkimuksia hankaloittaa usein se, että endofyyttien kasvattaminen kasvatusalustalla ei onnistu, joten esimerkiksi endofyytin tunnistaminen voi olla vaikeaa (Tejesvi ym., 2016).

Antibioottien ja myös antimikrobisten peptidien tehoa kuvataan tutkimuksissa MIC (Minimal Inhibitory Concentration) -arvolla. MIC-arvo kuvaa pienintä kasvun estävää pitoisuutta ja se ilmoitetaan µg/ml (Wiegand, Hilpert & Hancock, 2008). Tutkimuksissa käytetään myös IC₅₀ -arvoa, joka kuvaa aineen pitoisuutta esimerkiksi silloin, kun puolet mikrobeista ovat kuolleet (Cer, Mudunuri, Stephens & Lebeda, 2009).

Tutkimuksissa löytyneitä antimikrobisia peptidejä voidaan muokata esimerkiksi muuttamalla niiden aminohapporakennetta. Näin peptideistä saadaan stabiilimpia, tehokkaampia ja vähemmän toksisia muille kuin kohdesoluille (Monteiro ym., 2019).

3.2. Trtesin

Suopursu (*Rhododendron tomentosum*) on varpukasvi, jota esiintyy pohjoisella pallonpuoliskolla. Suopursun lehdistä on eristetty 87 erilaista endofyyttistä sientä. Tutkimuksessa suopursulta löydettiin antibakteerisia endofyyttisiä sieniä suvuilta *Fusarium*, *Lecythophora*, *Sordaria* sekä *Pleosporales* (Tejesvi ym., 2011). Tejesvi ym. (2013) tutkivat *Fusarium tricinctum* -lajin endofyyttisestä sienestä sen transkriptomia. Analyysien tuloksena löydettiin antimikrobinen peptidi Trtesin, joka on ensimmäinen raportoitu defensiinin tapainen peptidi endofyyttisen sienien tuottamana. Trtesin on pituudeltaan 52 aminohappoa, siinä on kuusi kysteiinimolekyyliä ja sen molekyylipaino on 6138.92 Da (Tejesvi ym., 2013).

Tutkimuksessa Trtesinin antimikrobisia ominaisuuksia testattiin useita erilaisia gram-positiivisia ja -negatiivisia bakteereita sekä hiivaa (*Candida glabrata*) vastaan. Antimikrobisia aktiivisuuksia Trtesiniltä löytyi *Staphylococcus carnosus*, *Candida albicans* ja *C. utilis* lajeja vastaan MIC-arvolla 64µg/ml. Lisäksi Trtesin oli aktiivinen *Fusarium oxysporum* -sientä vastaan. Hiivaa sekä mm. *Escherichia coli* - ja *Staphylococcus aureus* -bakteereita vastaan ei havaittu antimikrobista aktiivisuutta. Trtesinin aktiivisuus oli heikohkoa bakteereita kohtaan, mutta peptidin muokkauksella sen ominaisuuksia voidaan parantaa (Tejesvi ym., 2013).

3.3. Munumbikiinit A-D

Castillon ym. (2002) tekemässä tutkimuksessa löydettiin endofyyttisestä *Streptomyces* NRRL 3052 -bakteerista neljä hyvin samankaltaista peptidiä, munumbikiinit A, B, C ja D. *Streptomyces* NRRL 3052 eristettiin *Kennedia nigriscans* -kasvista, joka on korallipapuihin kuuluva kasvilaji. Tutkimuksessa kasvista löytyi yhteensä 24 endofyyttistä mikro-organismia, mutta huomio kiinnittyi

Streptomyces NRRL 3052 -bakteeriin sen antimikrobisten ominaisuuksien takia. Sekvensoinnin ja GenBank -tietokannassa tehtyjen analyysien perusteella voitiin todeta, että löydetty bakteerilaji oli täysin uusi löydös. Tutkimuksessa käytettiin bakteereille ominaista 16S rDNA -sekvenssiä, jolla yleisesti tutkitaan bakteerilajien fylogenioita (Castillo ym., 2002).

Munumbikiinien rakenne määritettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (HPCL). Neljän löydetyn munumbikiinin aminohappokoostumus oli hyvin samankaltainen. Glutamiinihapon/glutamiinin, proliinin, treoniinin ja valiinin suhde oli kaikissa neljässä peptidissä sama, 1:2:1:3. Munumbikiini A erosi muista sisältäen lisäksi kaksi leusiinia ja muissa munumbikiineissä kuin C:ssä oli yksi asparagiini tai asparagiinihappo. Munumbikiinien massat määritettiin massaspektrometrialla. Munumbikiini A:n massa on 1326.5 Da, B:n 1269.6 Da, C:n 1298.5 Da ja D:n 1312.5 Da. Erot peptidien massoissa viittaavat mm. kaksoissidosten erilaiseen muodostumiseen. Lisäksi peptidien kelta-oranssi-punainen väritys havaittiin munumbikiinejä yhdistäväksi ominaisuudeksi (Castillo ym., 2002).

Munumbikiinien aktiivisuuksia testattiin useita kasveille patogeenisiä sieniä ja bakteereita vastaan. Ensimmäisessä kokeessa todettiin, että kaikki munumbikiineistä oli aktiivisia eri kasvien sienipatogeeniä sekä yhtä ihmiselle patogeenistä bakteeria vastaan matalilla MIC-arvoilla. Kaikki munumbikiinit osoittivat aktiivisuutta patogeenisiä *Pythium ultimum* -, *Sclerotinia sclerotinum* - ja *Pseudomonas syringae* -lajeja vastaan. Esimerkiksi munumbikiini C:n MIC-arvo *Pythium ultimum* -sienelle oli 0.2 µg/ml ja munumbikiini D:n 0.4 µg/ml. Kokeen tulokset olivat niin hyviä, että seuraavaksi munumbikiinien vaikutusta testattiin useaan ihmiselle patogeeniseen bakteeriin (Castillo ym., 2002).

Gram-positiivisista bakteereista *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ja *Staphylococcus aureus* olivat sensitiivisiä yhdelle tai useammalle munumbikiinille. Gram-negatiivisista bakteereista kolme viidestä, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ja *Acinetobacter* sp., olivat resistenttejä kaikille munumbikiineille. Tutkimuksessa havaittiin myös munumbikiinien aktiivisuutta antibiooteille resistenttejä bakteerikantoja vastaan. Munumbikiini B oli aktiivinen MIC-arvolla 2.5 µg/ml metisilliinille resistenttiä *Staphylococcus aureus* -bakteeria vastaan (taulukko 1). Munumbikiinit A ja C osoittivat aktiivisuutta vankomysiinille resistenttiä *Enterococcus faecalis* -bakteeria vastaan MIC-arvoilla 8 µg/ml ja 16 µg/ml (taulukko 1). Munumbikiini B oli aktiivinen usealle eri antibiootille resistentille *Mycobacterium tuberculosis* -bakteerikannalle IC₅₀-arvolla 10 µg/ml. Ihmiselle patogeenisiä sieniä vastaan munumbikiinien MIC-arvot olivat niin isoja (>10 µg/ml), että niiden lisätutkimusta ei tehty (Castillo ym., 2002).

Taulukko 1. Munumbikiinien MIC-arvoja eräitä ihmiselle patogeenisia sieniä ja bakteereita vastaan. Taulukko: Microbiology, Castillo ym. (2002). Lupa taulukkoon: CC-BY.

Test organism	MIC ($\mu\text{g ml}^{-1}$)				Amphotericin B
	Mun. A	Mun. B	Mun. C	Mun. D	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	10	10	10	10	0.13
<i>Candida albicans</i>	–	–	> 10	> 10	1.25
<i>Aspergillus fumigatus</i>	20	20	20	20	0.62
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591*	NA	2.5	NA	NA	–
<i>Staphylococcus aureus</i> MH II Eli Lilly Co.†	–	–	0.4	0.4	–
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299‡	8	NA	16	NA	–

* Methicillin-resistant strain.

† Sensitive to vancomycin; MIC 0.06 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

‡ Resistant to vancomycin and sensitive to ciprofloxacin.

NA, Not active at any of the concentrations tested; –, Activity not determined.

Yksi merkittävimmistä havainnoista tutkimuksessa oli se, että jokainen munumbikiineistä osoitti aktiivisuutta *Plasmodium falciparum* -loista vastaan. *P. falciparum* on malariaa levittävä loislaji, joka on kehittänyt resistenssin useimmille malarialääkkeille. Munumbikiinit C ja D osoittivat hyvin matalia IC₅₀-arvoja (6.5 ± 2 ng/ml ja 4.5 ± 0.7 ng/ml) verrattuna klorokiiniin (7.0 ± 0 ng/ml), joka on paljon käytetty malarialääke. Munumbikiinit B, C ja D eivät myöskään vahingoittaneet ihmisen punasuoluja konsentraatiossa < 80 $\mu\text{g/ml}$, mikä on positiivista, mikäli munumbikiinien käyttöä lääketieteessä halutaan tutkia lisää. Munumbikiinien käyttöä maanviljelyssä kasvipatogeenejä vastaan voitaisiin myös harkita, koska peptidit osoittivat aktiivisuuksia kasvipatogeenejä vastaan suhteellisen matalilla MIC-arvoilla (Castillo ym., 2002).

3.4. SC39 peptidit

Jungin, Kimin, Leen ja Kwonin (2015) tekemässä tutkimuksessa eristettiin endofyyttisiä bakteereita paprikan (*Capsicum annuum* L.) lehdistä. Eristetyn EML-CAP3 –bakteerikannan havaittiin tuottavan lipofiilisiä antimikrobisia peptidejä (SC39 peptidit), joilla oli aktiivisuuksia angiogeneesiä vastaan (Jung ym., 2015).

Angiogeneesi tarkoittaa uusien verisuonien muodostumista ja se on monivaiheinen prosessi. Angiogeneesi on välttämätön tapahtuma mm. embryogeneesissä sekä kudosten uusiutuessa. Angiogeneesi on kuitenkin myös suuri tekijä kasvainten ja syöpäsolujen kehityksessä ja kasvamisessa, joten angiogeneesin inhibointia käytetään esimerkiksi yhtenä syövän hoitokeinona (Folkman, 2001).

HIF-1 α on transkriptiofaktori, joka toimii yleensä yliaktiivisena syöpäkasvaimen muodostuessa, ja se säätelee esimerkiksi kasvaimen angiogeneesiä (VEGF-geeni) ja glukoosiaineenvaihduntaa. Mikäli HIF-1 α saadaan inhiboitua, myös syövän kasvu hidastuu (Semenza, 2003). Jungin ym. (2015) tutkimuksessa SC39 peptidien angiogeneesiä inhiboivaa vaikutusta tutkittiin napanuoran solujen avulla. SC39 peptidien havaittiin vähentävän kasvaimen aiheuttamaa angiogeneesiä inhiboimalla HIF-1 α transkriptiofaktoria ja näin myös VEGF-geeniä. Peptidit osoittivat angiogeneesiä rajoittavaa toimintaa *in vitro* ja *in vivo*. Tutkimuksessa kävi ilmi myös se, että SC39 peptidit eivät olleet muille soluille vahingollisia, mikä on tärkeää, mikäli peptidejä ajatellaan käytettäväksi lääketieteessä. SC39 peptidien rakennetta tai toimintamekanismia ei tutkittu tässä tutkimuksessa tarkemmin, joten lisätutkimuksia tarvitaan (Jung ym., 2015).

4. Antibioottiresistenssi

Antibioottiresistenssi on maailmanlaajuinen terveysongelma. Vuonna 2002 97 % kyselyyn osallistuneista lääkäreistä oli sitä mieltä, että antibioottiresistenssi johtuu pääosin antibioottien vääränlaisesta sekä liiallisesta käytöstä (Hassan ym., 2012). Patogeenit kasvattavat vastustuskykyään antibiootteja vastaan, jolloin infektioiden määrä lisääntyy ihmiskunnassa. Infectious Disease Society of America (IDSA) raportoi vuonna 2004, että noin 70 % patogeenisistä bakteereista, jotka aiheuttavat kuolemaan johtavia infektioita, ovat resistenttejä ainakin yhdelle bakteerisairauksien hoitamiseen käytettävälle lääkkeelle. Tunnetuimpia esimerkkejä resistenteistä bakteereista ovat metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA), penisilliiniresistentti *S. aureus* ja vankomysiiniresistentti *Enterococcus* (VRE) (Hassan ym., 2012). Vuonna 2016 löydettiin karbapeneemiresistentti *Klebsiella pneumoniae*, joka on resistentti kaikille käytettäville antibiooteille (Lewies ym., 2019). Patogeenien resistenssikehitys lääkkeille ei rajaudu kuitenkaan vain ihmiskunnan terveydenhuoltoon, vaan myös esimerkiksi viljelykasvien ja karjan patogeenien antibioottiresistenssin kehitys on suuri ongelma (Keymanesh ym., 2009). Antibioottiresistenttien patogeenien aiheuttamien infektioiden parantamiseen on löydettävä ja kehitettävä uusia lääkkeitä. Myös jo käytössä olevia lääkkeitä voidaan muokata erilaisiksi, jolloin niiden aktiivisuus mikrobeja vastaan kasvaa (Hassan ym., 2012).

Antimikrobisista peptideistä on kiinnostuttu lääketieteessä, koska ne voisivat toimia uusina lääkkeinä patogeeneja vastaan. Tutkimuksissa on löydetty antimikrobisia peptidejä, jotka ovat aktiivisia ihmisten patogeeneille ja myös sellaisille kannoille, jotka ovat kehittäneet resistenssin usealle eri antibiootille. Tällainen peptidi on esimerkiksi munumbikiini B (Castillo ym.,

2002). Tässä kappaleessa keskitymme antibioottiresistenssin kehittymiseen ja siihen, voisiko antimikrobisten peptidien käyttö olla ratkaisu antibioottiresistenssiin leviämisen ehkäisyssä ja resistenttien bakteerikantojen torjunnassa.

4.1. Antibioottiresistenssin muodostuminen

Bakteeri voi muuttua antibiooteille resistentiksi geenimutaation tai horisontaalisesti siirtyvien geenien avulla. Bakteerien jakautuessa ominaisuus siirtyy tytärsoluille. Resistenssigeenit vaikuttavat esimerkiksi bakteerin kykyyn pumpata antibiootteja ulos solusta tai bakteerin kykyyn hajottaa antibiootti entsyymaattisesti. Resistenssigeeni voi myös muokata antibiootin sitoutumiselle spesifisiä rakenteita siten, että antibiootti ei pysty enää vaikuttamaan soluun (Hassan ym., 2012).

Soucyn, Huangin ja Gogarten (2015) artikkeli käsittelee mikrobien horisontaalista geenien siirtämistä. Horisontaalinen geenien siirtäminen on tärkeä evolutiivinen voima bakteereiden ja arkkien sopeutumisessa ympäristöön. Geenien horisontaalisen siirtämisen tiedetään olevan tärkeä mekanismi myös antibioottiresistenssigeenien siirtämiseen. Konjugaatio, transformaatio sekä transduktio ovat kolme pääasiallisinta horisontaalisen geenisiirron mekanismeja. Konjugaatiossa bakteerisolujen välille syntyy ns. pilus, jota pitkin esimerkiksi plasmidi siirtyy bakteerilta toiselle. Transformaatioissa bakteeri ottaa sisälleen vapaata DNA:ta ympäristöstään. Transduktiossa geneettistä materiaalia bakteereiden välillä siirtää bakteriofagit. Lisäksi tunnetaan muitakin geeninvaihtomekanismeja, kuten solujen yhdistyminen sekä geeninsiirtosysteemeitä, joissa isäntäsolun genomia siirretään kapsideissa viereisille soluille (Soucy, Huang & Gogarten, 2015).

4.2. Antimikrobisten peptidien käyttö lääkaineina ja resistenssin syntyminen

Lewiesin ym. (2019) artikkeli käsittelee antimikrobisten peptidien käyttöä perinteisten antibioottien korvaajina esimerkiksi siksi, että resistenssiä ei synny yhtä helposti peptideille kuin antibiooteille. Ajatellaan, että bakteereiden on vaikeampi kehittää resistenssiä antimikrobisia peptidejä vastaan, koska eri peptideillä on monia tapoja toimia (Lewies ym., 2019). Lewiesin ym. (2019) artikkelissa esimerkkinä toimii nisiini, jolla on viisi erilaista mekanismia bakteerin tuhoamiseen. Nisiini voi esimerkiksi inhiboida soluseinän synteesiä, estää huokosten syntymistä tai aktivoida autolyttisiä entsyymejä, jotka tuhoavat bakteerin soluseinää. Artikkelissa nostettiin esiin muitakin antimikrobisten peptidien käytön etuja. Kationiset peptidit eivät vaikuta bakteereiden SOS ja *rpoS* stressireitteihin, joten mutageneesi ei lisääntynyt samalla tavalla kuin antibiootteja käytettäessä

(Lewies ym., 2019). Kuten aiemmin tässä tutkielmassa on mainittu, peptideillä on monia aktiivisuuksia esimerkiksi sieniä ja syöpäsoluja vastaan, kun taas antibiootit vaikuttavat useammin kohdennetusti vain bakteereihin. Lisäksi geenin koodaamat ja ribosomaalisesti tuotetut antimikrobiset peptidit ovat helposti muokattavissa ja kehitettävissä bioteknologian keinoin. Antimikrobiset peptidit, esimerkiksi nisiini, ovat aktiivisia myös antibiooteille resistenttejä patogeenisia bakteerikantoja, kuten vankomysiiniresistenttiä *Streptococcus pneumoniae* -bakteeria ja MRSA:ta vastaan (Lewies ym., 2019).

Mikrobeja esiintyy lähes kaikkialla, joten niiden on täytynyt kehittää keinoja myös antimikrobisia peptidejä vastaan. Evoluution ansiosta bakteerit pystyvät kehittämään resistenssiä myös uusille lääkeaineille. Tutkimuksista tiedetään myös, että esimerkiksi mikrobin resistenssi bakteriosiineille voi syntyä horisontaalisen geenisiirron avulla (Meade ym., 2020).

Yeamanin ja Yountin (2003) artikkelissa on esitelty mekanismeja, joilla bakteerit pystyvät kehittämään resistenssiä antimikrobisia peptidejä vastaan. Mekanismit voidaan jakaa rakenteellisiin sekä indusoituviin mekanismeihin. Bakteerin rakenteelliset ominaisuudet, jotka estävät peptidien toimintaa ekspressoituvat, vaikka peptidejä ei olisi läsnä. Bakteerit pystyvät kehittämään esimerkiksi soluseinän rakennettaan varauksellisesti neutraalimmaksi, jolloin kationiset peptidit eivät sitoudu bakteerisolun yhtä helposti. Bakteerit pystyvät myös muokkaamaan solukalvon rakennetta sekä toimintaa siten, että peptidien toiminta estyy. Lisäksi gram-negatiiviset bakteerit pystyvät muuttamaan uloimman kalvonsa rakennetta. Bakteerit pystyvät myös välttämään peptidien vaikutuksia valitsemalla sellaisen anatomisen tai fysiologisen ekologisen lokeron, jossa niitä tuhoavat peptidit eivät ole läsnä (Yeaman & Yount, 2003).

Indusoituvat mekanismit aktivoituvat silloin kun peptidejä on läsnä. Nämä mekanismit toimivat usein nopeiden reaktioteiden avulla, jotka aktivoituvat antimikrobisten peptidien aiheuttamasta stressistä (Yeaman & Yount, 2003). Yeamanin ja Yountin (2003) artikkelissa käytettiin esimerkkinä PhoP/PhoQ -systemiä, jota on tutkittu esimerkiksi *Salmonella* suvun bakteereilla. PhoP aktivoi ja PhoQ hiljentää tiettyjä geeniklustereita. Aktivoituvat geenit koodaavat antimikrobisia peptidejä hajottavia peptidaaseja sekä saavat aikaan entsyymaattisia muutoksia bakteerisolun pintarakenteissa. Peptidaaseja eritetään esimerkiksi bakteerisolun ulkopinnalle. Geenit, joiden ekspressiota vähennetään stressitilanteessa, liittyvät rakenteellisiin ja toiminnallisiin osiin, jotka ovat antimikrobisten peptidien kohteena. Lisäksi tiedetään, että bakteerit pystyvät muokkaamaan solunsisäisten kohteiden rakenteita siten, että peptidien sitoutuminen ei onnistu niihin. Bakteerit pystyvät kehittämään myös pumppuja, jotka aktiivisesti siirtävät antimikrobisia peptidejä ulos solusta (Yeaman & Yount, 2003).

Lewiesin ym. (2019) artikkelissa esimerkkinä bakteerikannasta, joka on kehittänyt resistenssin peptideille, toimii *E. coli* -kanta. Tällä bakteerikannalla on resistenssigeeni *mcr-1* kolistiinia vastaan. Kolistiini on ei-ribosomaalisesti tuotettu peptidi ja se vaikuttaa gram-negatiivisen bakteerin uloimpaan kalvoon, sekä sen lisäksi se pystyy hajottamaan bakteerin soluseinän. Resistenssigeeni estää solun hajoamisen, mutta ei vaikuta kolistiinin aktiivisuuteen uloimpaan kalvoon. Antibioottien ja peptidien yhtäaikainen käyttö on kuitenkin mahdollista infektioita aiheuttavien resistenttien bakteereiden torjunnassa. Esimerkin kolistiiniresistenttiä bakteerikantaa vastaan sellainen yhdistelmä toimi, jossa kolistiini vaikutti uloimman kalvon hajoamiseen ja rifampisiini *E. coli* -bakteerin soluseinään. (Lewies ym., 2019; MacNair ym., 2018).

5. Johtopäätökset

Antimikrobiset peptidit ovat potentiaalisia vaihtoehtoja perinteisten antibioottien korvaajiksi. Esimerkiksi niiden tarkat toimintamekanismit, laaja aktiivisuus sekä bakteerien hitaampi resistenssinmuodostus tekevät niistä mielenkiintoisia tutkimuskohteita (Mahlapuu ym., 2016). Vaikka bakteerit pystyvätkin muodostamaan resistenssiä antimikrobisia peptidejä vastaan, esimerkiksi muokkaamalla soluseinän varausta, peptidien toimintamekanismien moninaisuuden sekä vaihtelevuuden vuoksi resistenssi ei muodosta yhtä suurta ongelmaa, kuin perinteisiä antibiootteja käytettäessä (Brogden, 2005; Mahlapuu ym., 2016).

Mahlapuu ym. (2016) artikkelissa on nostettu esiin ongelmia, joita täytyy vielä ratkaista, ennen kuin antimikrobiset peptidit ovat valmiita kaupallisiksi lääkeaineiksi. Peptidien ominaisuudet ovat riippuvaisia ympäristöstä, kuten pH:sta ja lämpötilasta. On tärkeää, että peptidi säilyttää oikean rakenteen, koska rakenteen muutokset voivat tehdä peptidistä toksisen myös ihmissoluja vastaan. Lisäksi iholla sekä suolistossa toimivat proteaasit rikkovat peptidirakenteen helposti. Proteaasien hajottavaa vaikutusta voidaan vähentää muokkaamalla peptidejä tai kehittämällä kuljettajia, jotka pitävät peptidin ehjänä sen kulkeutuessa ruoansulatuskanavassa. Peptidien muokkauksella niistä voidaan tehdä stabiilimpia, tehokkaampia ja vähentää peptidien sivuvaikutuksia. Peptidien kaupallinen valmistus on vielä hyvin kallista verrattuna perinteisiin antibiootteihin, mutta menetelmien kehittyessä kustannuksia voidaan pienentää (Mahlapuu ym., 2016).

Erityisesti endofyyttien tuottamien antimikrobisten aineenvaihduntatuotteiden tutkiminen on ajankohtaista. Eri kasvilajeilta odotetaan löytyvän laaja kirjo erilaisia, vielä tuntemattomia, endofyyttejä. Kun uusia endofyyttejä löydetään, on hyvin todennäköistä löytää

myös uusia lääkeaineiksi kelpaavia yhdisteitä (G. Strobel & Daisy, 2003). Tässä tutkielmassa esiteltyt endofyyttien tuottamat antimikrobiset peptidit ovat osoittaneet aktiivisuuksia esimerkiksi ihmiselle patogeenisiä bakteereita ja sieniä, antibioottiresistenttejä bakteerikantoja, malarialoista sekä syöpäsoluja vastaan. Tällä hetkellä antimikrobisia peptidejä käytetään esimerkiksi paikallisten tulehdusten hoitamisessa, mutta mahdollisuuksia on muitakin. Lisätutkimuksia antimikrobisten peptidien toimintamekanismeista, rakenteista sekä tuottamisesta tarvitaan, jotta niistä saadaan turvallisia vaihtoehtoja perinteisille antibiooteille (Mahlapuu ym., 2016).

6. Kirjallisuuskäsitteet

- Breen, S., Solomon, P. S., Bedon, F., & Vincent, D. (2015). Surveying the potential of secreted antimicrobial peptides to enhance plant disease resistance. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 6, p. 900. Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fpls.2015.00900
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 3, pp. 238–250. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrmicro1098
- Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., ... Yaver, D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*, 148(9), 2675–2685. doi: 10.1099/00221287-148-9-2675
- Cer, R. Z., Mudunuri, U., Stephens, R., & Lebeda, F. J. (2009). IC50-to-Ki: A web-based tool for converting IC50 to Ki values for inhibitors of enzyme activity and ligand binding. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 2), 441–445. doi: 10.1093/nar/gkp253
- DBAAP Statistics. (2020). Haettu 9. marraskuuta 2020, osoitteesta <https://dbaasp.org/statistics/general>
- Folkman, J. (2001). Angiogenesis-dependent diseases. *Seminars in Oncology*, 28(6), 536–542. doi: 10.1016/S0093-7754(01)90021-1
- Hancock, R. E. W., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 43, pp. 1317–1323. American Society for Microbiology. doi: 10.1128/aac.43.6.1317
- Hancock, R. E. W., & Diamond, G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology*, Vol. 8, pp. 402–410. Elsevier. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01823-0
- Hancock, R. E. W., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, Vol. 24, pp. 1551–1557. doi: 10.1038/nbt1267
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... Sessitsch, A. (2015). The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320. doi: 10.1128/mmb.00050-14
- Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: Characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance.

Journal of Applied Microbiology, Vol. 113, pp. 723–736. John Wiley & Sons, Ltd. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x

Jung, H. J., Kim, Y., Lee, H. B., & Kwon, H. J. (2015). Antiangiogenic activity of the lipophilic antimicrobial peptides from an endophytic bacterial strain isolated from red pepper leaf. *Molecules and Cells*, 38(3), 273–278. doi: 10.14348/molcells.2015.2320

Keymanesh, K., Soltani, S., & Sardari, S. (2009). Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 25, pp. 933–944. Springer. doi: 10.1007/s11274-009-9984-7

Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology*, Vol. 30, pp. 131–141. Elsevier Current Trends. doi: 10.1016/j.it.2008.12.003

Lewies, A., du Plessis, L. H., & Wentzel, J. F. (2019). Antimicrobial Peptides: the Achilles' Heel of Antibiotic Resistance? *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 370–381. doi: 10.1007/s12602-018-9465-0

MacNair, C.R., Stokes, J.M., Carfrae, L.A. et al. Overcoming mcr-1 mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nat Commun* 9, 458 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02875-z>

Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 6, p. 194. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194

Meade, Slattery, & Garvey. (2020). Bacteriocins, Potent Antimicrobial Peptides and the Fight against Multi Drug Resistant Species: Resistance Is Futile? *Antibiotics*, 9(1), 32. doi: 10.3390/antibiotics9010032

Miller, K. I., Qing, C., Man-Yuen Sze, D., Roufogalis, B. D., & Neilan, B. A. (2012). Culturable Endophytes of Medicinal Plants and the Genetic Basis for Their Bioactivity. *Springer*. doi: 10.1007/s00248-012-0044-8

Monteiro, C., Costa, F., Pirttilä, A. M., Tejesvi, M. v, Cristina, & M., & Martins, L. (2019). prevention of urinary catheter-associated infections by coating antimicrobial peptides from crowberry endophytes. *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-019-47108-5

Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., ... Kristensen, H. H. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061), 975–980. doi: 10.1038/nature04051

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, Vol. 3, pp. 721–732. European Association for Cardio-Thoracic Surgery. doi: 10.1038/nrc1187

- Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial Peptides (AMPs): Roles, Functions and Mechanism of Action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, Vol. 26, pp. 1451–1463. Springer. doi: 10.1007/s10989-019-09946-9
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 16, pp. 472–482. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrg3962
- Strobel, G. A., Torczynski, R., & Bollon, A. (1997). Acremonium sp. - A leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science*, 128(1), 97–108. doi: 10.1016/S0168-9452(97)00131-3
- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 491–502. doi: 10.1128/mubr.67.4.491-502.2003
- Tam, J. P., Wang, S., Wong, K. H., & Tan, W. L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals*, Vol. 8, pp. 711–757. MDPI AG. doi: 10.3390/ph8040711
- Tejesvi, M. v., Picart, P., Kajula, M., Hautajärvi, H., Ruddock, L., Kristensen, H. H., ... Pirttilä, A. M. (2016). Identification of antibacterial peptides from endophytic microbiome. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(21), 9283–9293. doi: 10.1007/s00253-016-7765-4
- Tejesvi, M. v., Segura, D. R., Schnorr, K. M., Sandvang, D., Mattila, S., Olsen, P. B., ... Pirttilä, A. M. (2013). An antimicrobial peptide from endophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*, 60(1), 153–159. doi: 10.1007/s13225-013-0227-8
- Tejesvi, Mysore v., Kajula, M., Mattila, S., & Pirttilä, A. M. (2011). Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity*, 47(1), 97–107. doi: 10.1007/s13225-010-0087-4
- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P., & Broekaert, W. F. (1997). Specific, high affinity binding sites for an antifungal plant defensin on *Neurospora crassa* hyphae and microsomal membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32176–32181. doi: 10.1074/jbc.272.51.32176
- van Zoggel, H., Carpentier, G., dos Santos, C., Hamma-Kourbali, Y., Courty, J., Amiche, M., & Delbé, J. (2012). Antitumor and Angiostatic Activities of the Antimicrobial Peptide Dermaseptin B2. *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0044351
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. doi: 10.1038/nprot.2007.521

Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews*, Vol. 55, pp. 27–55. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. doi: 10.1124/pr.55.1.2

Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., ... Qin, L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, Vol. 165, pp. 437–449. Urban & Fischer. doi: 10.1016/j.micres.2009.11.009

Kuva 1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 6, p. 194. Frontiers Media S.A., Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194. Lupa kuvaan: CC-BY 4.0)

Taulukko 1. *Microbiology*, 148(9), 2675–2685, Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., ... Yaver, D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. doi: 10.1099/00221287-148-9-2675. Lupa taulukkoon: CC-BY.