

Pro gradu -tutkielma

**Endofyyttisieninäytteiden antiviraalinen vaikutus
korona- ja enteroviruksilla**

Anni Westerholm



Jyväskylän yliopisto

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

30.5.2024

JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO, Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologian maisteriohjelma

Westerholm Anni M. Endofyyttisieninäytteiden antiviraalinen vaikutus
korona- ja enteroviruksilla
Pro gradu tutkielma: 34 s., 3 liitettä (3 s.)
Työn ohjaajat: Professori Varpu Marjomäki, Tohtoritutkija Mira
Laajala, Tohtoritutkija Dhanik Reshamwala
Tarkastajat:
Toukokuu 2024

Hakusanat: Antiviraaliset aineet, koronavirus, coxsackievirus, endofyytit,
sienet

Kasvin solukossa symbioosissa elävät endofyyttis sienet tuottavat suuren määrän bioaktiivisia aineita, joiden avulla ne muun muassa osallistuvat kasvin immuunipuolustukseen ja tuholaisten torjuntaan. Maapallon kaikista sienilajeista tunnetaan vain murto-osa ja niiden tuottamissa metaboliatuotteissa on suuri potentiaali antiviraalisten yhdisteiden löytämiseksi. Tutkielmassa etsittiin kuudesta eri endofyyttisieninäytteestä antiviraalista vaikutusta HCov-OC43-koronavirukselle ja CVA9-enterovirukselle. Molemmat virukset ovat yksijuosteisia RNA-viruksia ja niitä vastaan on kehitetty vain muutamia rokotteita. Käytetyistä näytteistä ei löydetty antiviraalista vaikutusta koronavirukselle, mutta enterovirukselle yhdellä sieninäytteellä (E12117 MY) nähtiin antiviraalista vaikutusta erityisesti suuremmilla pitoisuuksilla. Tämän näytteen vaikutusta CVA9-viruksen kapsidirakenteeseen ja kulkeutumista soluissa tutkittiin lisää. Sulamispistettä tutkimalla havaittiin virusta stabiloiva vaikutus, joka nähtiin käsittelyn jälkeen sulamispisteen nousuna. Stabilisaatiota tuki myös koe, missä viruskapsidin reaaliaikaista avautumista tutkittiin. Koe perustui SYBR Green II -värin sitoutumiseen viruksesta vapautuvaan RNA:han. Tämän lisäksi radioaktiivisesti leimatun viruksen signaalia seuraamalla oletettiin endofyyttisieninäytteen vaikuttavan viruksen rakenteeseen aggregoivasti. Tätä oletusta tuki myös läpivalaisuelektronimikroskoopilla otetut kuvat viruksesta. E12117 MY -näytteen vaikutusta CVA9-viruksen kulkeutumiseen soluissa tutkittiin konfokaalimikroskoopilla ja havaittiin, että näytteellä ei ollut siihen vaikutusta. Yhdessä nämä tulokset osoittavat, että endofyyttis sienestä E12117 MY löytyy potentiaalista antiviraalista vaikutusta CVA9-virusta vastaan ja tämä vaikutus perustuu viruksen lisääntyneeseen stabiilisuuteen. Sieninäytteen fraktiointi ja vaikuttavan yhdisteen tai yhdisteiden identifiointi voisi olla seuraava tutkimusvaihe sieninäytteen antiviraalisuutta tutkittaessa.

UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ, Faculty of Mathematics and Science
Department of Biological and Environmental Science
Master's Degree Programme in Cell and Molecular Biology

Westerholm Anni M. Endophyte fungi samples antiviral activity against
corona- and enteroviruses.

MSci Thesis 34 p., 3 appendices (3 p.)

Supervisors: Professor Varpu Marjomäki, Doctoral researcher

Mira Laajala, Doctoral researcher Dhanik
Reshamwala

Inspectors:

May 2024

Keywords: Antiviral compounds, coronavirus, coxsackievirus, endophytes,
fungi

Endophyte fungi live in symbiosis with host plants and produce numerous bioactive compounds that contribute to the plants' immune defense and resistance to pests. Of all the fungi in the world, only a small fraction is known or studied yet the metabolites they produce hold a significant potential for discovering antiviral compounds. In this thesis, six endophyte samples and their antiviral activity were studied with HCoV-OC43 coronavirus and CVA9 enterovirus, both of which are single stranded RNA viruses. From these samples no antiviral activity was found against coronavirus. However, one sample (E12117 MY) demonstrated potential antiviral activity against CVA9, particularly at higher sample concentrations. The effects of E12117 MY on CVA9 capsid structure and migration were investigated. Analysis of the capsid's thermal stability revealed a shift in the melting point post-treatment with endophyte fungi sample, indicating stabilizing effect. This was further supported by in-house developed real-time uncoating assay that was based on the binding of SYBR Green II stain to the released viral RNA. In addition, by following the signal of radioactively labeled virus it was assumed that the endophyte sample aggregated the viral particles. This result was supported by transmission electron microscopy images taken of the viral particles. The effect of the E12117 MY sample on the intracellular trafficking of the CVA9 virus was investigated using confocal microscopy, revealing no impact. Collectively, these results demonstrate that the fungi sample E12117 MY has antiviral activity against CVA9 and the effect is based on increased stability of the virus. Further research could involve fractionating the sample to identify the active compounds within the fungi extract.

SISÄLLYSLUETTELO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | JOHDANTO..... | 5 |
| 1.1 | Koronavirus HCoV-OC43 | 5 |
| 1.2 | Coxsackievirus A9 | 6 |
| 1.3 | Endofyyttisienet | 9 |
| 1.4 | Antiviraaliset aineet | 9 |
| 1.5 | Hypoteesit..... | 11 |
| 2 | AINEISTO JA MENETELMÄT | 11 |
| 2.1 | Solut ja virukset..... | 11 |
| 2.2 | Endofyyttisienet | 12 |
| 2.3 | Antiviraalisen vaikutuksen tutkiminen | 13 |
| 2.3.1 | Antiviraalinen vaikutus HCoV-OC43-koronavirukselle | 13 |
| 2.3.2 | Antiviraalinen vaikutus CVA9-enterovirukselle | 13 |
| 2.4 | Endofyyttisieniuutteen vaikutus CVA9-viruksen kapsidin stabiilisuuteen | 14 |
| 2.4.1 | Lämpöstabiilisuus | 14 |
| 2.4.2 | Viruskapsidin avautuminen lämpötilakokeen avulla | 14 |
| 2.4.3 | Vaikutus viruksen rakenteeseen radioaktiivisen gradientin avulla | 15 |
| 2.4.4 | Läpivalaisuelektronimikroskopia (TEM) | 16 |
| 2.5 | CVA9-viruksen kulkeutuminen solussa | 16 |
| 2.6 | Aineiston analyysi | 17 |
| 3 | TULOKSET | 18 |
| 3.1 | Endofyyttisienien antiviraalinen teho | 18 |
| 3.2 | Endofyyttisienien vaikutus enteroviruksen stabiilisuuteen ja avautumiseen | 22 |
| 3.3 | Endofyyttisienien vaikutukset enteroviruksen rakenteeseen | 25 |
| 3.4 | Endofyyttisienien vaikutukset enterovirukseen solutasolla | 28 |
| 4 | TULOSTEN TARKASTELU | 30 |
| 4.1 | Endofyyttisienten vaikutus CVA9-virusinfektioon..... | 30 |
| 4.2 | Endofyyttisieninäytteiden vaikutus HCoV-OC43 -virusinfektioon.. | 32 |
| 5 | PÄÄTELMÄT..... | 33 |

SANASTO JA LYHENTEET

Sanasto

Endofyyttisieni Kasvin solukossa symbioosissa elävä sieni

Lyhenteet

CoV Koronavirus
CPM Radioaktiivista signaalia seuraava yksikkö, eng. *counts per minute*
DMSO Dimetyylisulfoksidi, liuotin
EV Enterovirus
KF Sienen tuottama fermentti
MOI Viruksen suhde infektoitavaan kohteeseen. Ilmaisee infektion määrää eng. *multiplicity of infection*
MY Sienirihmasto eng. *Mycelium*
PFU/ml Kuvaa plakkia muodostavien virusten määrää tilavuutta kohden eng. *plaque forming units / ml*
PV Poliovirus
qPCR Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio, eng. *quantitative polymerase chain reaction*
TEM Läpivalaisuelektronimikroskopia eng. *Transmission Electron Microscopy*

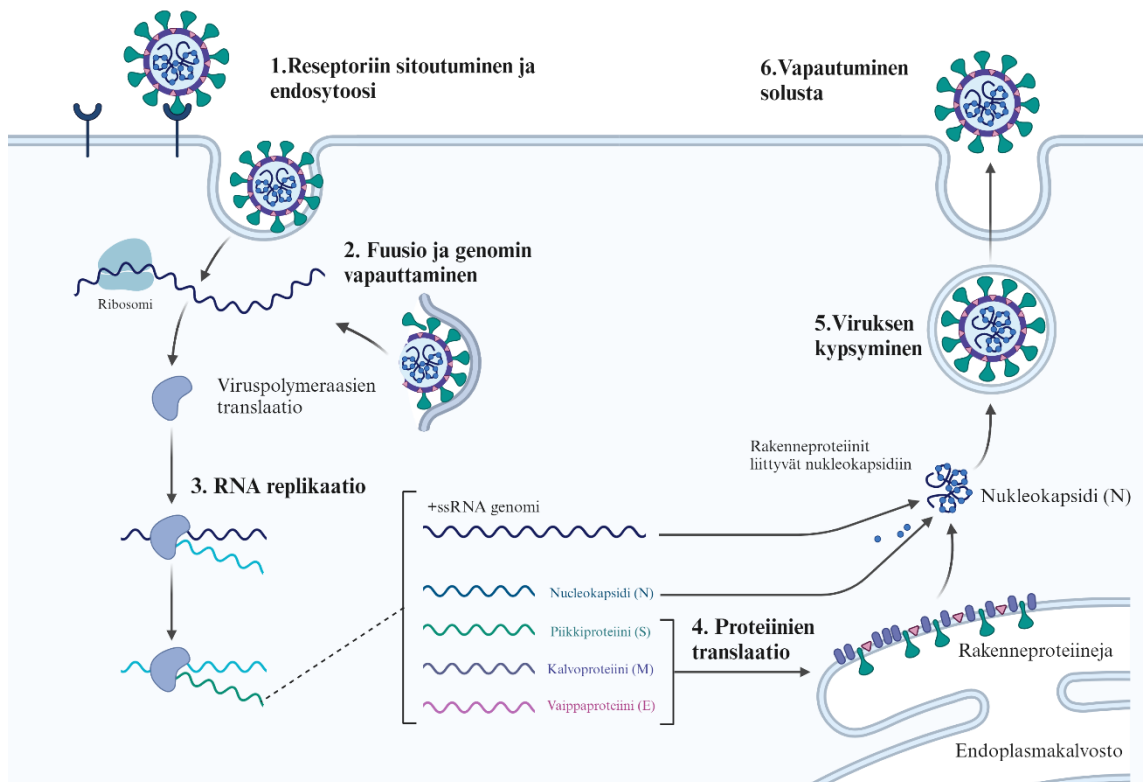
1 JOHDANTO

1.1 Koronavirus HCoV-OC43

Koronavirukset kuuluvat *Coronaviridae* -heimoon ja *Orthocoronavirinae*-alaheimoon. Ne jaotellaan vielä neljään sukuun; alfa, beta, gamma ja delta (International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)). Beta-koronavirukset jaotellaan vielä 2a-c viruksiin, joista ihmisen koronavirus OC43 kuuluu 2a, SARS 2b ja MERS 2c jaokseen (ICTV ja Kim ja Lee 2023). HCoV-OC43 on yksi yleisimmistä ihmisistä infektoivista koronaviruksista (Ogimi ym. 2020), mutta aiheuttaa SARS-virusta lievempiä oireita ja se on luokiteltu epidemiaa aiheuttavaksi, toisin kuin esimerkiksi SARS-CoV-2, joka on aiheuttanut maailmanlaajuisen Covid-19 pandemian suurella kuolleisuudella. Koronavirukset infektoivat pisaratartunnan kautta hengitysteitä ja leviävät keuhkoihin aiheuttaen vakavia hengitysoireita (V'kovski ym. 2021). HCoV-OC43 onkin siksi hyvä mallivirus tutkittaessa muita vaarallisempia ja vaikeasti käsiteltäviä koronaviruksia (Kim ja Lee 2023).

Koronavirus (Kuva 1) on vaipallinen, yksijuosteinen RNA-virus, jonka helikaalisen kapsidin sisältä löytyy viruksen genomi. Genomi tuottaa kaksi isoa avointa lukukehystä (eng. *Open reading frame*, ORF), jotka yhdessä koodaavat 16:ta ei-rakenteellista proteiinia, jotka vaikuttavat isäntäsolun vasteen säätelyyn (V'kovski ym. 2021). Rakenneproteiineja on neljä: S-piikkiproteiini, M-kalvoproteiini, E-vaippaproteiini, sekä N-nukleokapsidiproteiini (V'kovski ym. 2021).

S-piikkiproteiinit sitoutuvat solukalvon reseptoreihin, kuten ACE2-reseptoriin. HCoV-OC43 on todistettu kiinnittyvän solukalvon glykaanikerrokseen, esimerkiksi siaalihappoihin, kuten 9-O-asetyloitu siaalihappoon (Hulswit ym. 2019) tai hepariinisulfaattiin (Szczipanski ym. 2019). Reseptoriin kiinnittymisen jälkeen viruspartikkelin sisäänotto tapahtuu kaveolivilitteisesti dynamiinin avustamana (Owczarek ym. 2018). Endosomeista genomi vapautuu, kun viruksen vaippa fuusioituu endosomin kalvojen kanssa ja koronaviruksen RNA replikoidaan soluliman replikointialueilla (V'kovski ym. 2021). Nukleokapsidiproteiini (N) osallistuu transkription säätelyyn ja myöhemmin RNA:n pakkaamiseen (Cologna ym. 2000, Wu ym. 2023). Samalla se myös estää solun torjuntamekanismeja (Wu ym. 2023). Myös vaippaproteiini (E) osallistuu viruksen kokoamiseen ja kypsymiseen. Kypsynyt virus vapautuu solusta golginlaitteen kautta eksosytoosilla kuroutumalla (V'kovski ym. 2021).



Kuva 1. Koronaviruksen elinkierto. Kuvaa on muokattu V'kovski ym. 2021 julkaisun pohjalta. Koronaviruksen elinkierto voidaan jakaa kuuteen osaan. 1. Virus sitoutuu solureseptoreihin piikkiproteiinien avulla. 2. Viruksen vaipan fuusio endosomin kalvojen kanssa vapauttaa genomien soluun. 3. Virus-RNA replikoidaan solun replikointialueella. 4. Proteiinien translaatio tuottaa 4 rakenneproteiinia, joista 3 ilmenevät ER-golgin pinnalla ja N-proteiini pakkaa syntetisoidun virus-RNA:n nukleokapsidimuotoon. 5. Virus kypsyy, kun rakenneproteiinit kertyvät nukleokapsidin ympärille. 6. Kypsynyt virus vapautuu solusta kuroutumalla. Kuva on luotu BioRender.com avulla.

1.2 Coxsackievirus A9

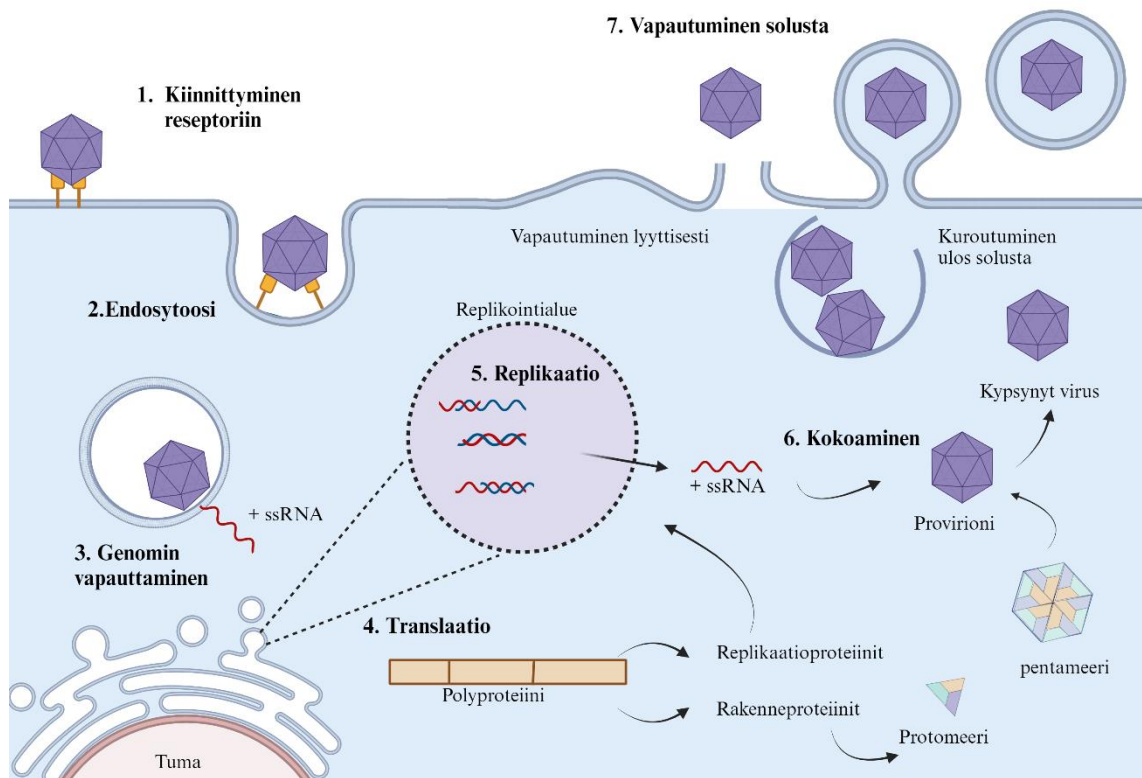
Picornaviridae-heimoon ja enterovirusten sukuun kuuluva coxsackievirus A9 (CVA9) on vaipaton, yksijuosteinen ja positiivisesti polarisoitunut RNA-virus (+ssRNA). Muita enterovirusia ovat esimerkiksi polio- ja echovirukset (Ehrenfeld ym. 2010). Coxsackievirusia on noin 29 serotyyppiä, jotka infektoivat ihmisiä eikä yhtäkään vastaan ole toistaiseksi kehitetty rokotetta (Tariq ja Kyriakopoulos 2024). Poliorokotteiden lisäksi vain muutamille muille picornaviruksille on kehitetty rokotteita (Baggen ym. 2018).

Enterovirus infektoi lähengitysteiden soluja tai huonon käsihygienian seurauksena suoliston soluja. Sekundäärisiä infektoita voi tapahtua myös muissa elimissä (Baggen ym. 2018). Enterovirukset aiheuttavat flunssan kaltaisia oireita, mutta voivat myös aiheuttaa vakavia tauteja, kuten aivokalvon- ja sydänlihastulehdusta (Laajala ym. 2020). Ne ovat usein yhteydessä kroonisiin

sairauksiin, kuten tyypin 1 diabetekseen ja valtimokovettumatautiin (Laajala ym. 2020).

Viruksen elinkierto (Kuva 2) alkaa reseptorivälitteisellä endosytoosilla. Enteroviruksilla on laaja kirjo solureseptoreita, joista CVA9 reseptoreita ovat esimerkiksi $\alpha V\beta 3$ -intergriini (Pozzetto ja Gaudin, 1999). Muita mahdollisia reseptoreita ovat $\beta 2$ -microglobuliini ja MHC-1 antigeenit (Huttunen ym., 2014). Vaikka enterovirukset käyttävät hyvin erilaisia reseptoreita solun sisään pääsemiseksi, monet sitä seuraavat infektiokulun vaiheet ovat enterovirusten välillä saman kaltaisia. Kuitenkin monet elinkierron vaiheiden yksityiskohdat ovat vielä epäselviä.

CVA9:n on osoitettu käyttävän perinteisestä klatriinivälitteisestä endosytoosireitistä poikkeavaa pH-neutraalia makropinosytoosia solun sisään pääsemiseksi (Myllynen ym., 2016, Huttunen ym. 2014). Genomi vapautetaan endosomien tai multivesikkelien (eng. *multivesicular bodies*) kalvon huokosten kautta solulimaan, jossa replikaatio ja proteiinien tuotto käynnistyy (Huttunen ym. 2014). +ssRNA:n translaatio tuottaa yhden ison polyproteiinin, joka käsitellään proteolyttisesti jakamalla se kapsidiproteiineihin (VP0, VP1 ja VP3), sekä replikaatioproteiineihin, jotka avustavat genomien replikaatioprosessissa. Kapsidiproteiinit muodostavat yhdessä protomeerejä, jotka kokoontuvat pentameereiksi ja lopulta provirioneiksi, jonne virus-RNA pakataan. Kypsä virioni syntyy, kun VP0 proteiini lohkotaan kapsidin VP2 ja VP4 proteiineiksi. Virus vapautuu solusta lyyttisesti tai eksosytoosilla kuroutumalla (eng. *budding*) (Baggen ym. 2018).



Kuva 2. Enteroviruksen elinkierto. Kuva on muokattu Baggen ym. 2018 julkaisun pohjalta. Enteroviruksen elinkierto voidaan jakaa seitsemään vaiheeseen. 1. Virus kiinnittyy solukalvon reseptoreihin. 2. Virus otetaan solun sisään reseptorivälitteisesti endosytoosilla. 3. Genomi vapautuu solulimaan endosomin kalvon huokosen kautta. 4. Virus-RNA:n translaatio yhdeksi polyproteiiniksi. Polyproteiini pilkotaan rakenneproteiineihin ja replikaatioproteiineihin. 5. +ssRNA replikoidaan muodostamalla -ssRNA vastinpari, joka puolestaan tuottaa uusia +ssRNA-juosteita. 6. Rakenneproteiineista koottuun provirioniin pakataan virusgenomi. 7. vapautuminen solusta tapahtuu lyttisesti tai eksosytoosilla. Kuva on luotu BioRender.com. avulla.

Enterovirusten kapsidin pinnalla havaitaan useita syvänteitä, jotka toimivat reseptorin sitoutumisen paikkoina. Syvänteiden pohjassa, hydrofobisessa taskussa, on usein sitoutuneena lipidiosa, joka osallistuu viruspartikkelin stabilointiin (Baggen ym. 2018). Kapsidin avautumisprosessissa lipidiosa irtoaa, mikä vaikuttaa viruspartikkelin epästabiilisuuteen ja vaikuttaa siten genomin vapautumiseen (Marjomäki ym. 2015). Enterovirusten kiinnittymisen ja kapsidin avautumisen välillä on havaittu stabiileja ja infektoivia välimuotoisia partikkeleita (135S) (Myllynen ym. 2016). Nämä välimuotoiset partikkelit pystyvät yhä kiinnittymään reseptoreihin, mutta niiden konformaatio on muuttunut ja ne havaitaan radioaktiivisissa fraktioissa kevyempinä, kuin natiivit, kompaktit partikkelit (180S) (Ruokolainen ym. 2019). Näiden välikokoisten partikkelien ympäröimä on myös natiivia partikkelia hiukan isompi. Tyhjä partikkeli (80S) on avautumisprosessin lopputulos, jolloin genomi on vapautunut, eikä partikkeli ole enää infektiivinen (Baggen ym. 2018).

1.3 Endofyyttisienet

On arvioitu, että vain noin 3–8 % maapallon sienilajeista on löydetty ja tutkittu (Hawksworth ja Lücking 2017). Endofyyttisienet, jotka kuuluvat pääasiassa kotelosieniin (*Ascomycota*), sekä kantasieniin (*Basidiomycota*), elävät joko osan tai koko elinkiertonsa ajan kasvin solukossa (Linnakoski ym. 2018, Omomowo ym. 2023). Endofyyttisieniä ilmenee jokaisessa elinympäristössä, missä kasvejakin (Wen ym. 2022). Isäntäkasvi ja sieni luovat yhdessä monimutkaisen symbioosijärjestelmän, jossa endofyyttisien tuottamat metaboliatuotteet voivat hyödyttää isäntäkasvia (Omomowo ym. 2023). Sienten tuottamien sekundääristen metaboliatuotteiden tehtävänä on esimerkiksi kemiallinen signaalointi, abioottisten ja bioottisten stressitekijöiden hallitseminen sekä puolustus muita mikro-organismeja vastaan (Linnakoski ym. 2018). Tällaisia bioaktiivisten aineiden ryhmiä ovat esimerkiksi polyfenolit, jotka sisältävät rakenteessaan yhden tai useamman fenoliryhmän. Näitä ovat esimerkiksi flavonoidit. Toinen iso bioaktiivisten aineiden ryhmä ovat emäksiset ja tyypipitoiset alkaloidit, kuten terpenoidit (dos Santos ym. 2022, Laajala ym. 2020, Wen ym. 2022). Sienet tuottavat noin 20 000 erilaista sekundääristä metaboliatuotetta (Paranagama ym. 2007), joten luonnollisten bioaktiivisten aineiden tutkiminen onkin yksi mahdollinen väylä antiviraalisten aineiden löytämiseksi.

1.4 Antiviraaliset aineet

Antiviraaliksi aineeksi kutsutaan sellaista ainetta, joka vaikuttaa viruksen tai isäntäsolun toimintoihin infektiota estäen. Antiviraalinen teho ei siis perustu rokotteen tapaan immunologiseen vasteeseen, vaan vaikutuksen luovat muut mekanismit. Esimerkiksi kantasieniin kuuluvan lakkakäävän (*Ganoderma lucidum*) bioaktiivisten triterpenoidien on osoitettu sitoutuvan enterovirus 71 kapsidin hydrofobiseen taskuun (Zhang ym. 2014). Triterpenoidien sitoutumisen kapsidiin arvellaan estävän joko viruksen kiinnittymistä solun reseptoriin tai stabiloivan virusta estäen genomien vapautumisen solussa (Zhang ym. 2014). Hydrofobiseen taskuun kiinnittyminen on yleensä dynaamista, joten pitkäkestoisen vaikutuksen saavuttaminen on hankalaa (Linnakoski ym. 2018).

Epigallokatekiinigallaattin (EGCG), joka kuuluu polyfenoleihin, on havaittu inhiboivan enteroviruksen infektiokykyä sitoutumalla viruksen pinnan hydrofobiseen taskuun, mutta myös useaan muuhun kohtaan kapsidin pinnalla. Tämä sitoutuminen vahvistaa viruspartikkelin stabilaatiota, jolloin avautuminen estyy (Reshamwala ym., 2021). Koronaviruksella EGCG:n on havaittu häiritsevän ACE2-reseptorin ja S-piikkiproteiinin vuorovaikutusta (Tsvetkov ym. 2021), sekä inhiboivan replikaatiolle tärkeän 3C-tyyppisen proteaasin toimintaa (Kato ym. 2021).

Antiviraalisen yhdisteen vaikutus voi kohdistua viruksen jokaiseen elinkierron vaiheeseen tai vastaavasti isäntäsolun toimintoihin. Sopivan antiviraalisen yhdisteen löytäminen on silti haasteellista. Yhden haasteen luo se, että virusten infektiomekanismit eivät ole täysin tunnettuja (Huttunen ym. 2014, Linnakoski ym. 2018). Tällöin antiviraalinen yhdiste ei välttämättä inhiboi infektiota kokonaan, jonka seurauksena muodostuu yhdisteelle resistenttejä viruskantoja. Lisäksi haasteena on antiviraalin mahdollinen sytotoksinen vaikutus soluille sekä epätoivotut sivuvaikutukset (Wang ja Yang 2023). Lisäksi, jos vaikutus kohdistuu solutoimintoihin, on huomioitava, että luonnollisia kalvoliikennereittejä ei voida täysin inhiboida. Jotta antiviraalisten tuotteiden kehittäminen olisi kannattavaa, niiden pitäisi myös olla laaja-alaisesti toimivia eri viruslajeille (Wang ja Yang 2023).

Näistä edellä mainituista syistä johtuen kiinnostavia antiviraalisia tuotteita ei ole tällä hetkellä kliinisessä käytössä enterovirusia vastaan (Zhang ym. 2014, Linnakoski ym. 2018, Laajala ym. 2020). Esimerkiksi laajasti eri entero- ja rhinovirusia vastaan antiviraalista aktiivisuutta osoittanutta yhdistettä Pleconaril:a ei hyväksytty käyttöön sen aiheuttamien haittavaikutusten vuoksi (Pevear ym. 1999, Hayden ym. 2003).

Koronavirukselle on sen sijaan muutamia kliinisessä käytössä olevia antiviraalisia valmisteita. Yksi niistä on Paxlovid, joka hyväksyttiin ensimmäisen kerran vuonna 2021 SARS-CoV-2 hoitoon niillä potilailla, joilla oli kohonnut riski sairastua tautiin vakavasti (WHO, Therapeutics and COVID-19: living guideline 2023). Antiviraalinen Paxlovid -lääkevalmiste koostuu kahdesta osasta: nirmatrelvir ja ritonavir. Nirmatrelvirin antiviraalinen vaikutus perustuu sen SARS-CoV-2 proteaasia inhiboivaan vaikutukseen, joka estää virusinfektiossa replikaatiolle tärkeiden polyproteiinien pilkkoutumisen (Owen ym. 2021). Ritonavir sen sijaan tehostaa vaikuttavan nirmatrelvirin toimintaa (WHO, Therapeutics and COVID-19: living guideline 2023).

Useita tutkimuksia on tehty sekä biologisista, että synteettisistä antiviraalista potentiaalia ilmaisevista yhdisteistä. Taulukkoon 1 on kerättyinä muutamia tällaisia yhdisteitä, joita on tutkittu entero- ja koronaviruksilla.

Taulukko 1. Esimerkkejä tutkimuksista antiviraalisista yhdisteistä entero- ja koronavirukselle

| Yhdiste | Yhdisteiden tyyppi | Kohdevirus | Kohde | Lähde |
|--------------|-------------------------|------------|--|---|
| Oxoglausiini | Alkaloidi | CVB1, PV | Replikaatio | Arita ym. 2015 |
| Suramin | Bentsanilidi | EV-A, EV-B | Viruskapsidi | Ren ym. 2017, Nishimura ym. 2015 |
| ST077124 | Synteettinen flavonoidi | EV-A71 | Transkriptio ja replikaatio | Min ym.2018 |
| GLTA | Terpenoidi | EV | Viruskapsidi, avautuminen, replikaatio | Zhang ym. 2014 |
| EGCG | Polyfenoli | CoV, EV | Transkriptio ja replikaatio | Wang ja Yang, 2023, Reshamwala ym. 2021 |
| Hesperidin | Flavanoniglykosidi | CoV | Reseptorin sitoutuminen | Ovchynnykova ym. 2022 |

1.5 Hypoteesit

Tämän tutkielman tutkimuskysymyksenä oli, löytyykö endofyyttisienistä peräisin olevista eritteistä mahdollista antiviraalista vaikutusta korona- ja enteroviruksille. Näytteinä toimi sienistä peräisin olevat metaboliittiuutteet, sekä sienirihmastosta tehdyt homogenaatit.

Tutkielman hypoteesit:

1. Käytetyistä sieninäytteistä löytyy antiviraalista vaikutusta tutkittavia viruksia vastaan.
2. Antiviraalinen vaikutus perustuu viruksen lisääntyneeseen stabiilisuuteen.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Solut ja virukset

Tutkimuksissa käytettiin keuhkojen adenokarsinooman solulinjaa A549 (ATCC, USA) ja keuhkojen fibroblastien MRC5 solulinjaa (ATCC, USA). A549 -soluja kasvatettiin Dulbecco's Modified Eagle mediassa (DMEM, Gibco, UK) ja MRC5 -

soluja Minimum Essential mediassa (MEM, Gibco, UK). Molempiin kasvatusliuoksiin oli lisätty 10 % FBS-seerumia (eng. *Fetal Bovine Serum*), 1 % L-Glutamaxia (Gibco, UK) ja 1 % penisilliini/streptomysiini antibiootteja (Gibco, UK). Soluja kasvatettiin 5 % suhteellisessa CO₂-pitoisuudessa ja +37 °C lämpötilassa. Solujen pesussa käytettiin fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS, eng. *phosphate buffered saline*) ja irrotuksessa 0,05 % trypsiiniä (Gibco, UK). Virusten kanssa käytetty media oli antibiootitonta ja FBS-seerumin pitoisuus 1–2 %.

Käytetyt viruslinjat olivat HCoV-OC43 (puhdistamaton erä #5; 7,43E+07 PFU/ml). CVA9-virukselle käytettiin sekä puhdistettua että puhdistamatonta virusta (Griggs-linja, ATCC). Puhtaat viruserät olivat #14 (1,29E+10 PFU/ml, proteiinipitoisuus= 1,28 mg/ml; 260/280= 1,70) sekä #16 (1,09E+10 PFU/ml). Puhdistamaton CVA9-erä oli 6,72E+08 PFU/ml. Lisäksi käytettiin radioaktiivisesti leimattua CVA9-virusta (2,18E+07 PFU/ml, 1 µl= 7000 CPM, Marjomäen laboratorio). Koronavirusta tutkittiin käyttämällä MRC5-solulinjaa ja vastaavasti enterovirusta A549-solulinjalla.

2.2 Endofyyttisienet

Endofyyttisieniuutteet saatiin Mainzin yliopistosta tohtori Anja Schöffleriltä (Dr. Anja Schöffler, Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung gGmbH (IBWF) Mainz). Näytteitä oli sekä sieniviljelmästä uutetusta liuoksesta (KF) että sienirihmastosta tehdyistä homogenaateista (MY). Sekä sieniviljelmän uutteista (KF) että sienirihmastosta (MY) oli Saksassa testattu sytotoksisuus Hela S3 -soluilla (100 µg/ml).

Varpu Marjomäen tutkimusryhmässä oli alustavasti testattu näytteiden antiviraalinen tehokkuus kausikoronaviruksella HCoV-OC43 ja CVA9-enteroviruksella. Näiden testien perusteella valittiin kuusi endofyyttisieninäytettä (Taulukko 2) tähän tutkimukseen. Sytotoksisuus oli testattu MRC5-fibroblastilla sekä A549-keuhkokarsinomasoluilla (Reshamwala ym. 2021). Endofyyttisieninäytteitä säilytettiin DMSO:hon liuotettuna 1 mg/ml erissä -80 °C.

Taulukko 2. Viruksilla testattujen endofyyttisienien näytekoodit

| HCoV-OC43 | CVA9 |
|-----------|-----------|
| E12077 KF | E12117 MY |
| E12105 MY | E12118 MY |
| E13180 KF | |
| E13180 MY | |

2.3 Antiviraalisen vaikutuksen tutkiminen

Antiviraalisuutta tutkittiin valituilla endofyyttisieninäytteillä korona- ja enteroviruksille. Tutkimus toteutettiin esikäsittelemällä viruksia endofyyttisieninäytteellä, jonka jälkeen solut infektoitiin ja lopuksi solut värjättiin kristallivioletilla. Värjättyjen solujen absorbanssiarvoja mittaamalla voitiin havaita käsittelyn vaikutus kontrolleihin verrattuna.

2.3.1 Antiviraalinen vaikutus HCoV-OC43-koronavirukselle

Tutkimuksia varten MRC5-soluja viljeltiin 96-kuoppalevyille 15000 solua per kaivo ja inkuboitiin +37 °C lämpötilassa sekä 5 % CO₂-pitoisuudessa yhden päivän ajan. Endofyyttisieninäytteet (Taulukko 3) laimennettiin PBS-MgCl₂-puskuriin, jonka jälkeen näytteisiin lisättiin puhdistamatonta HCoV-OC43-virusta (#5; 7,43E+07 PFU/ml). Käytetyn viruksen pitoisuus optimoitiin inkubointiaikaan sopivaksi. Lisäksi valmistettiin viruskontrolli ja solukontrollit (Taulukko 3).

Taulukko 3. Endofyyttisieninäytteiden pitoisuudet

| Näyte | Sienipitoisuus (µg/ml) |
|----------------|------------------------|
| Viruskontrolli | - |
| Selukontrollit | 0,1 1 10 100 200 500 |
| Sieninäyte | 0,1 1 10 100 200 500 |

Näytteitä inkuboitiin +34 °C lämpötilassa tunnin ajan, jonka jälkeen seokset laimennettiin mediaan niin, että lopullinen virusmäärä vastasi soluissa MOI-lukemaa 0,007. Tämän jälkeen 96-kuoppamaljalla kasvatetuilta soluilta poistettiin vanha kasvatusmedia ja näytteseokset lisättiin soluille (100 µl). Soluja inkuboitiin +34 °C lämpötilassa ja 5 % CO₂-pitoisuudessa viisi päivää, jonka jälkeen solut värjättiin kristallivioletilla sisältävällä väriaineella (0,03 % kristallivioletti, 2 % etanoli ja 36,5 % formaldehydi) ja pestiin kahdesti PBS-liuoksella. Sen jälkeen solut hajotettiin lysaattipuskurilla (0,8979 g natriumsitraattia ja 1N HCl 47,5 % etanolissa), jonka jälkeen absorbanssiarvot luettiin Victor X4 levylukijalla (PerkinElmer) 570 nm aallonpituudella (Liite 1).

2.3.2 Antiviraalinen vaikutus CVA9-enterovirukselle

Tutkimuksia varten A549-soluja viljeltiin 96-kuoppalevyille 12000 solua per kaivo ja inkuboitiin kuten kappaleessa 2.3.1. Käytetyn CVA9-viruksen (#14; 6,72E+08 PFU/ml) pitoisuus optimoitiin inkubointiaikaan sopivaksi. Näytteet ja kontrollit valmistettiin kuten yllä (Taulukko 3).

Näytteitä inkuboitiin +37 °C lämpötilassa tunnin ajan, jonka jälkeen näytteet laimennettiin mediaan niin, että lopullinen virusmäärä vastasi soluissa

MOI-lukemaa 0,075. Tämän jälkeen soluilta poistettiin vanha kasvatusmedia ja näytteitä lisättiin soluille (100 µl). Soluja inkuboitiin +37 °C lämpötilassa ja 5 % CO₂-pitoisuudessa kaksi päivää, jonka jälkeen solut värjättiin kristalliviolettiä sisältävällä väriaineella, pestiin PBS-liuoksella ja hajotettiin lysaattipuskurilla. Tämän jälkeen absorbanssiarvot luettiin Victor X4 levylukijalla (PerkinElmer) kuten yllä (Liite 1).

2.4 Endofyyttisieniuutteen vaikutus CVA9-viruksen kapsidin stabiilisuuteen

Enterovirukselle tehtiin antiviraalisuuden osittamisen lisäksi useampi koe, jotka tutkivat endofyyttiuutteen vaikutusta CVA9-viruksen kapsidin stabiilisuuteen ja avautumiseen. Näihin tutkimuksiin valittiin eniten antiviraalista aktiivisuutta osoittanut näyte E12117 MY.

2.4.1 Lämpöstabiilisuus

E12117 MY-sieniuutteen vaikutusta CVA9-viruksen lämpöstabiilisuuteen tutkittiin kvantitatiivisen PCR-menetelmän (qPCR) avulla. E12117 MY -näytteestä valmistettiin jäillä pidetyille PCR-levylle kaksi näytettä (100 ja 200 µg/ml) PBS-MgCl₂-puskuriin. Näytteisiin lisättiin puhdistettua CVA9-virusta (#14; 1.29E+10 PFU/ml; proteiinipitoisuus= 1,28 mg/ml; 260/280= 1,70) siten, että virusproteiinien määrä näytteissä oli 1 µg. Endofyyttisieninäytteistä valmistettiin kaksi replikaattia ja lisäksi valmistettiin CVA9-viruskontrolli sekä E12117 MY -endofyyttisienikontrolli.

Kaikkia näytteitä ja kontroleja inkuboitiin +37 °C lämpötilassa tunnin ajan, jonka jälkeen näytekuoppiin lisättiin 10 000x SYBR Green II fluoresoivaa väriainetta laimennettuna 1:10 (Invitrogen). Fluoresenssin intensiteetti mitattiin BioRad qPCR laitteella (malli CFX96) +20–95 °C välillä 0,5 °C lämpötilan korotuksilla. Ajon alussa näytettä lämmitettiin +20 °C 30 minuutin ajan. Koe toistettiin samalla puhdistetulla viruserällä.

2.4.2 Viruskapsidin avautuminen lämpötilakokeen avulla

Kapsidin avautumista tutkittiin fluoresoivan SYBR Green II -väriaineen ja RNAasi A:n (Sigma, R5500, 1 mg/ml in 150 nM NaCl, 17.1.2023 KK) avulla Victor-levylukijalla. Määrittäminen perustui väriaineen sitoutumiseen RNA:han, joka vapautui avautuneesta viruskapsidista (Ruokolainen ym., 2019). Koetta varten valmistettiin kaksi näytettä joko RNAasi A:lla tai ilman ja niitä vastaavat kontrollinäytteet pelkällä CVA9-viruksella (Taulukko 4). Käytetyn endofyyttisieniuutteen E12117 MY pitoisuus näytteissä oli 200, 100, tai 10 µg/ml. Jokaista näytettä valmistettiin kolme rinnakkaista replikaattia.

Taulukko 4. CVA9-viruksen kapsidin avautumista tutkivan kokeen näytteet

| | Näyte |
|---|---|
| 1 | E12117 MY + CVA9 + SYBR Green II + RNAasi |
| 2 | E12117 MY + CVA9 + SYBR Green II |
| 3 | CVA9 + SYBR Green II + RNAasi |
| 4 | CVA + SYBR Green II |

Aluksi 10 000x SYBR Green II -väriaine laimennettiin tislattuun veteen 1:100 ja endofyyttisieninäytteestä tehtiin 1 mg/ml välilaimennos. Reagensseja lisättiin jäällä pidettyyn 96-kuoppalevyn kuoppiin niin, että ensin PBS-MgCl₂-puskuriin lisättiin puhdistettua CVA9-enterovirusta (#14; 1.29E+10 PFU/ml; proteiinipitoisuus=1,28 mg/ml; 260/280= 1,70). Virusta lisättiin sen verran, että virusproteiinin määrä näytteessä oli 1 µg. Seuraavaksi kuoppiin lisättiin laimennettu SYBR Green II -väriaine ja RNAasi A (10 µg/ml) sekä lopuksi juuri ennen mittausta sieninäyte E12117 MY. Lopullinen näytetilavuus oli 50 µl. Näytteet sekoitettiin varovasti ja kuplia välttämällä, jonka jälkeen levy mitattiin Victor levylukijalla 3 minuutin välein +37 °C lämpötilassa noin tunnin ajan (Liite 2).

2.4.3 Vaikutus viruksen rakenteeseen radioaktiivisen gradientin avulla

E12117 MY -sieniuutteen vaikutusta CVA9-viruksen kapsidirakenteeseen tutkittiin radioaktiivisesti leimatun viruksen avulla. CVA9 metioniini/kysteiini oli leimattu Marjomäen laboratoriossa radioaktiivisella rikillä ([³⁵S], 2,18E+07 PFU/ml, 1 µl= 7000 CPM).

E12117 MY -näyte laimennettiin PBS-MgCl₂-puskuriin kahteen eri pitoisuuteen (100 ja 200 µg/ml) radioaktiivisesti leimatun viruksen kanssa. Virusta lisättiin niin, että leiman signaali oli 100 000 CPM. Lisäksi valmistettiin viruskontrolli, johon ei lisätty endofyyttisientä. Näytteitä inkuboitiin +37 °C lämpötilassa tunnin ajan.

Inkuboinnin jälkeen näytteisiin lisättiin puskuria 1 ml tilavuuteen saakka. Seuraavaksi valmistettiin 5–20 % sakkaroosigradientit ultrasentrifuugiputkiin (Beckman Coulter, 14x18 mm, USA), joihin näytteet ladattiin ja putket tasapainotettiin puskurilla. Näytteitä sentrifugoitiin 35 000 rpm 2 tunnin ajan Beckman Optima LE-80K ultrasentrifuugilla (SW 41, 41 000 rpm, Beckman, Irlanti), jonka jälkeen näytteet fraktioitiin pipetoimalla gradientin yläpinnalta 500 µl tuikenesteputkiin, joihin oli lisätty 4 ml tuikenestettä (Ultima Gold™ MV, Perkin Elmer, LOT 80-18141, USA). Lopuksi näytteet mitattiin PerkinElmer Liquid scintillator -laitteella. Koe toistettiin kahdesti.

2.4.4 Lämpivalaisuelektronimikroskopia (TEM)

Uutteen vaikutusta CVA9-virukseen pystyttiin myös kvalitatiivisesti havainnoimaan kuvaamalla endofyyttisieninäytteellä käsiteltyjä viruksia lämpivalaisuelektronimikroskopiolla (TEM). E12117 MY näyte laimennettiin 200 ja 500 µg/ml pitoisuuksiin PBS-MgCl₂-puskuriin, johon lisättiin puhdistettua CVA9-enterovirusta (1,6E+10 PFU/ml). Lisäksi valmistettiin viruskontrolli ilman endofyyttikäsittelyä. Näytteitä inkuboitettiin +37 °C lämpötilassa ja 5 %CO₂-pitoisuudessa tunnin ajan.

Formvad-päällystetyt kuparihilat käsiteltiin plasmalaitteella (EMS/SC7620 Mini sputter coater, Electron Microscopy Sciences, USA), jonka jälkeen hiloille annosteltiin noin 5 µl näytettä 30 sekunnin ajaksi. Ylimäärä imeytettiin hilalta Whatmann 3MM imeytyspaperilla, jonka jälkeen hilat värjättiin 1 % fosfovolframihapolla 10 sekunnin ajan (PTA, Sigma-Aldrich, Japani). Ylimäärä väriainetta imeytettiin pois ja hilat siirrettiin kuivumaan hilakoteloon. Kuivat näytteet kuvattiin Jeol Jem 1400 lämpivalaisuelektronimikroskoopilla (Japani). Kuvauksessa käytettiin LaB₆-filamentin tuottamaa kenttäemissiosäteilyä 80 kV jännitteellä ja Quemsa CCD-kameraa.

2.5 CVA9-viruksen kulkeutuminen solussa

Endofyyttisieniuutteella käsitellyn CVA9:n kulkeutumista soluissa tutkittiin konfokaalimikroskopiolla immunoleimaamalla näytteistä viruksen VP1-proteiini, sekä A549-soluista tuma ja endosomit.

Aluksi A549-soluja viljeltiin peitinlaseille 48 000 solua per lasi ja inkuboitettiin 4-kuoppamaljoilla +37 °C lämpötilassa ja 5 % CO₂-pitoisuudessa yhden päivän ajan. Seuraavaksi puhdistettua CVA9-virusta (#16, 1,09E+10 PFU/ml) laimennettiin niin, että näytetiitteri oli 7,52E+06 PFU/ml ja MOI=100. Endofyyttisieniuutteesta E12117 MY valmistettiin 100 ja 200 µg/ml näytteet DMEM:iin (1 % FBS), johon virus lisättiin. Näytteitä ja viruskontrollia inkuboitettiin +37 °C tunnin ajan, jonka jälkeen vanha media poistettiin soluilta ja 1 ml näytettä lisättiin soluille. Soluja inkuboitettiin kuuden tunnin ajan, jonka jälkeen peitinlasit pestiin kolmesti minuutin ajan 0,5 % BSA-PBS-liuoksella. Pesujen jälkeen solut kiinnitettiin 30 minuutin ajan 4 % paraformaldehydillä huoneenlämmössä. Kiinnityksen jälkeen peitinlaseille lisättiin puhdasta PBS-liuosta ja lasit säilöttiin +4 °C lämpötilassa.

Seuraavaksi kiinnitetyt solut immunoleimattiin kuvaamista varten. Leimausta varten kiinnitetyt näytteet permeabilisoitiin huoneenlämmössä 0,2 % TritonX-100-liuoksella 5 minuutin ajan, jonka jälkeen näytekuoppiin lisättiin puhdasta PBS-liuosta. Seuraavaksi primäärivasta-aineet laimennettiin 3 % BSA-PBS-liuoksella. Jokaiselle näytteelle valmistettiin kaksi rinnakkaista peitinlasia molemmilla primäärivasta-aineilla. Immunoleimauksessa käytettiin sekä EEA1 (aikaiset endosomit) että CD63 (myöhäiset endosomit) hiiren primäärivasta-ainetta ja CVA9-viruksen VP1 kanin primäärivasta-ainetta (Taulukko 5). CVA9-

virusen proteiinia leimaavaa VP1 laimennettiin 1:1500 ja vastaavasti EEA1 2,5 µg/ml, sekä CD63 2,45 µg/ml. Laimennettuja vasta-aineita lisättiin peitinlaseille 40 µl ja inkuboitui tunnin ajan huoneenlämmössä. Tämän jälkeen näytteitä pestiin kolmesti PBS-liuoksella 5 minuutin ajan.

Seuraavaksi sekundäärisistä vasta-aineista (Taulukko 5) valmistettiin 1:200 laimennokset BSA-PBS-liuokseen ja jaettiin peitinlaseille. Samoja sekundäärisiä vasta-aineita käytettiin sekä EEA1 ja CD63 primäärivasta-aineille. Peitinlaseja inkuboitui valolta suojattuna huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan, jonka jälkeen lasit pestiin kahdesti PBS:llä, kuten edellä. Peitinlasit asetettiin mikroskooppilaseille Prolong Dapi-asennusliuoksen (Sigma) avulla ja säilöttiin +4 °C lämpötilassa.

Näytteet kuvattiin Nikon A1R konfokaalimikroskoopilla (Liite 3) ja kuvat käsiteltiin Fiji ImageJ-ohjelmistolla.

Taulukko 5. Immunoleimauksessa käytetyt vasta-aineet

| Primääriset vasta-aineet | Valmistaja | Nimi | Pitoisuus | Erätiedot |
|----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------|--------------|
| EEA1 | BD Transduction laboratories | Purified mouse-anti-EEA1 | 250 ug/ml | LOT 52897 |
| CD63 | Mousex | CD63 concentrate antibody | 490 mg/ml | LOT 41081030 |
| CVA9 VP1 | Merja Roivanen | CVA9 rabbit VP1 antibody | | 861 |
| Sekundääriset vasta-aineet | | | | |
| Goat anti-mouse 488 | Life Technologies. | Alexa Fluor 488 | 1 mg/ml | #A11029 |
| Goat anti-rabbit 546 | Life Technologies. | Alexa Fluor 546 | 1 mg/ml | #A11010 |

2.6 Aineiston analyysi

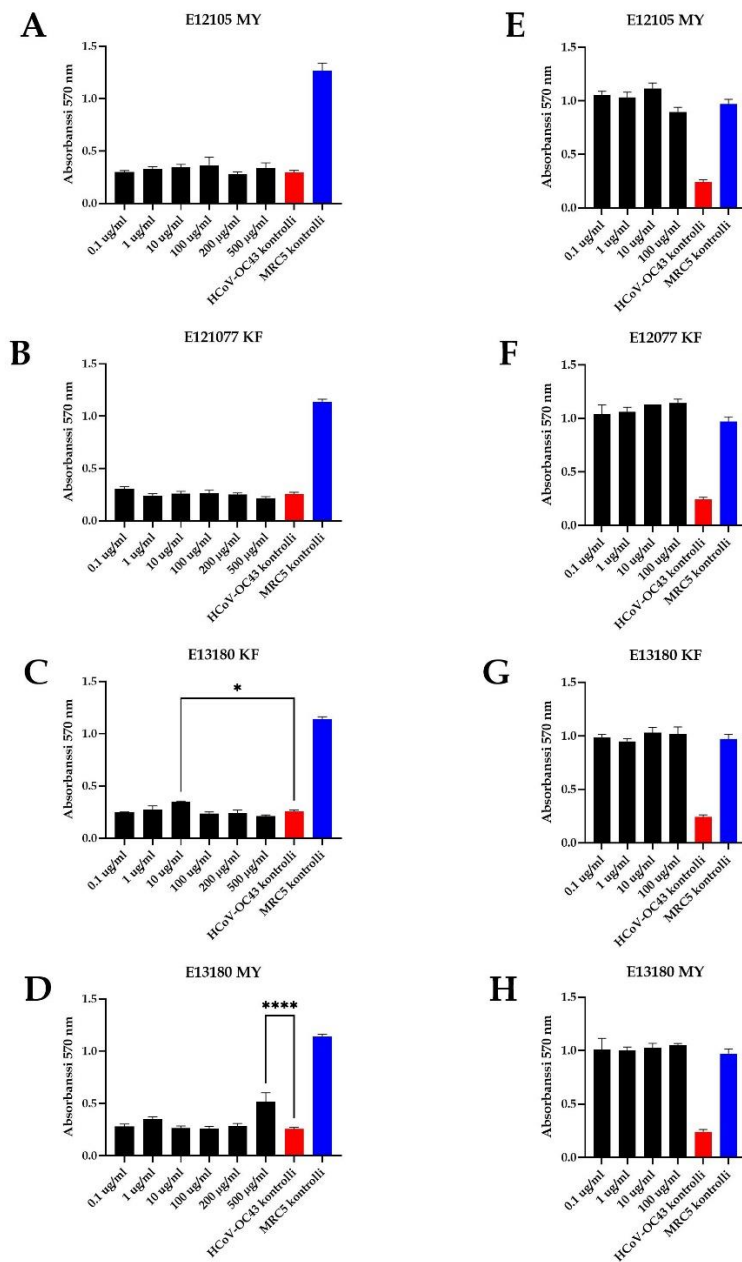
Aineisto analysoitiin käyttäen GraphPad Prism ohjelmaa (versio 10.2.0. Windows, USA). Data esitettiin keskiarvona ± SEM. Parittaiset vertailut tehtiin yksisuuntaisella Anovalla ja Bonferroni-testillä, jossa tilastollisen merkitsevyyden raja-arvo oli $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ja **** $p < 0,0001$). Lisäksi kuvia analysoitiin ja muokattiin Fiji ImageJ ohjelmalla (Schindelin ym. 2012) yhdistämällä eri fluoresenssikanavat.

3 TULOKSET

3.1 Endofyyttisienien antiviraalinen teho

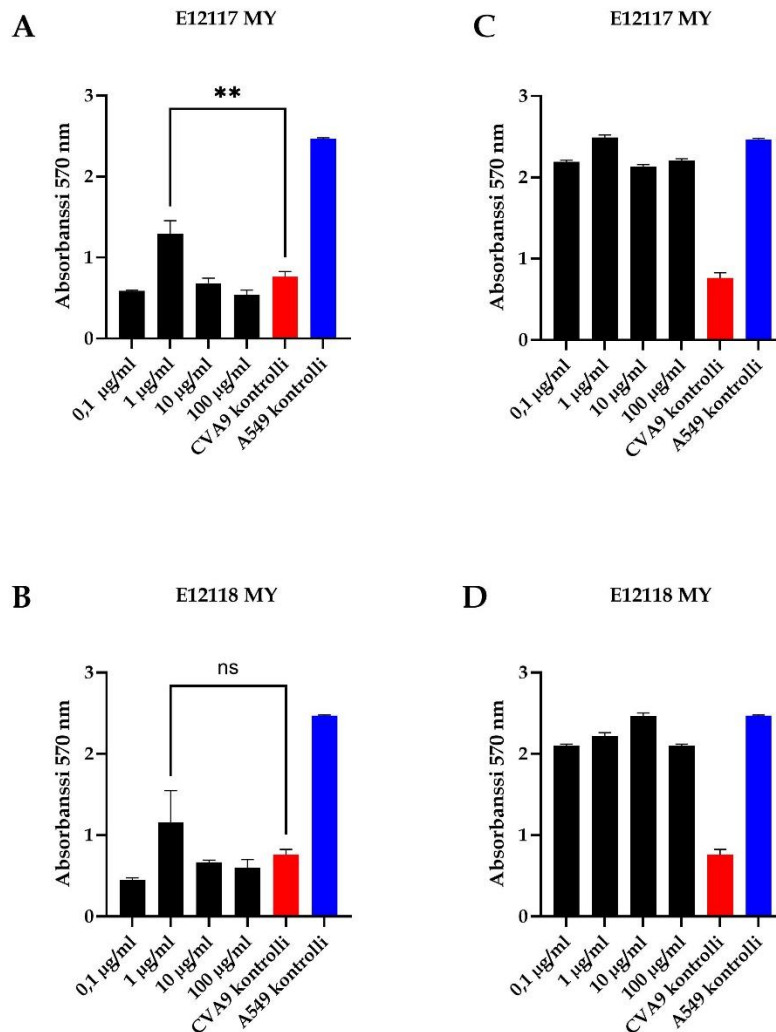
Tutkielman tavoitteena oli selvittää, löytyykö kuudesta eri endofyyttisieninäytteestä antiviraalista vaikutusta CVA9-enterovirukselle ja HCoV-OC43-koronavirukselle. Endofyyttisieniuutteiden antiviraalista vaikutusta tutkittiin esikäsittelemällä virusta endofyyttisieninäytteellä ja infektoimalla solut käsittelyn jälkeen. Infektoituneet solut värjättiin kristallivioletilla ja kuolleet solut pestiin pois näytekaivoista. Mittaamalla elävien solujen absorbanssi saatiin käsitys endofyyttisieninäytekäsittelyn vaikutuksesta infektion etenemiseen vertaamalla käsiteltyjen solujen absorbanssiarvoja virus- ja solukontrolleihin. Yksisuuntaisella Anova-testillä, sekä Bonferronin testillä tehtiin parittaiset vertailut eri näytepitoisuuksien ja viruskontrollin sekä virus- ja solukontrollin välillä.

Kuvasta 3. nähdään, että käytetyt endofyyttinäytteet (4 kpl) eivät vaikuttaneet HCoV-OC43-koronaviruksen infektiokykyyn juuri lainkaan, vaan elävien solujen osuus mittauksissa oli sama viruskontrollin kanssa viruksen sienikäsitteystä riippumatta. Samalla huomattiin, että käytetyt näytteet kaikissa pitoisuuksissa eivät ole olleet soluille toksisia (Kuva 3). Tämä tarkoittaa, että näytteiden mahdolliset toksiset vaikutukset eivät ole peittäneet endofyyttisienien vaikutusta infektiivisyyteen tehden tuloksista luotettavat. Koe toistettiin kolmesti tuloksen varmistamiseksi, mutta antiviraalista vaikutusta ei näillä sieninäytteillä huomattu HCoV-OC43-virukselle, sillä tilastollisesti merkittävää eroa näytteiden ja viruskontrollin välillä ei havaittu ($p > 0,05$), paitsi kun virusta oli käsitelty $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ pitoisella E13180 MY -näytteellä (jolloin $****p < 0,0001$), sekä $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ pitoisella E13180 KF -näytteellä (jolloin $*p < 0,05$) (Kuva 3).



Kuva 3. Endofyyttisten antiviraalinen teho testattuna HCoV-OC43-viruksella. Eri endofyyttisienipitoisuuksia inkuboitin 1 h HCoV-OC43-viruksen kanssa, jonka jälkeen virusta inkuboitin MRC5-soluissa 5 vrk. Kuvaaja (A-D) näyttävät solujen elävyyden kristalliviolettiväryksen jälkeen (Y-akselilla Absorbanssi 570 nm). Samojen sienipitoisuuksien vaikutus soluihin ilman virusta 5 vrk:n jälkeen näkyvät kuvaajissa (E-H). Kuvaajissa punaisella on merkitty viruskontrolli ilman endofyyttisieninäytettä ja sinisellä solukontrolli ilman virusta tai endofyyttisientä. Parittaiset vertailut tehtiin Bonferroni- testillä viruskontrollia vastaan (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ja **** $p < 0.0001$).

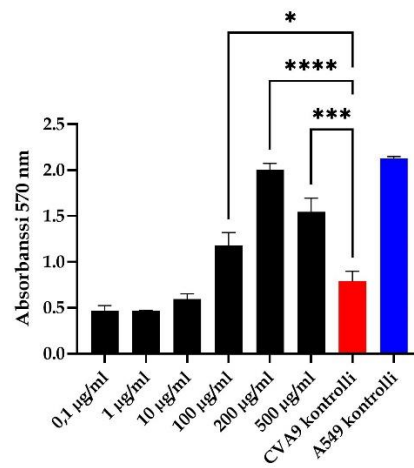
Endofyyttisienten antiviraalista vaikutusta tutkittiin vastaavasti myös CVA9-viruksella. Käytettyjä endofyyttisieninäytteitä oli kaksi, joilla tehtyjen alustavien kokeiden perusteella nähtiin, että 1 µg/ml pitoisella E12117 MY-näytteellä oli positiivinen vaikutus infektoitujen solujen elävyyteen (**p<0,01). Bonferronin testin perusteella E12118 MY -näytteen kohdalla merkittävää eroa viruskontrolliin ei ollut yhdelläkään endofyyttisienipitoisuudella (ns, p>0,05) (Kuva 4).



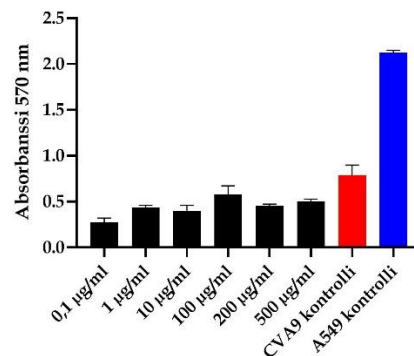
Kuva 4. Endofyyttisienten antiviraalinen teho testattuna CVA9-viruksella. Eri endofyyttisienipitoisuuksia inkuboitii 1 h CVA9-viruksen kanssa, jonka jälkeen virusta inkuboitii A549-soluissa 2 vrk. Kuvaajat (A-B) näyttävät solujen elävyyden kristalliviolettivärjäyksen jälkeen. Samojen sienipitoisuuksien vaikutus soluihin ilman virusta 2 vrk:n jälkeen näkyy kuvaajissa (C-D) (Y-akselilla Absorbanssi 570 nm). Kuvaajissa punaisella on merkitty viruskontrolli ilman endofyyttisieninäytettä ja sinisellä solukontrolli ilman virusta tai endofyyttisientä. Parittaiset vertailut tehtiin Bonferroni- testillä viruskontrollia vastaan (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 ja **** p < 0.0001)

Tämän alustavan kokeen perusteella E12117 MY -näytteellä tehtiin jatkotutkimuksia, jolloin havaittiin, että suuremmilla näytepitoisuuksilla sieniuutteella E12117 MY oli positiivinen vaikutus solujen elävyyteen, kun CVA9-virusta oli esikäsitelty tällä näytteellä. Paras vaikutus havaittiin, kun CVA9-virusta oli esikäsitelty 200 µg/ml endofyyttisieninäytepitoisuudella, jolloin havaittu tilastollinen vaikutus oli suurin (**** $p < 0,0001$) (Kuva 3). Havaittiin myös, että vastaavia tuloksia ei saatu toisella CVA9-virusta vastaan testatun endofyyttisieninäytteen E12218 MY kanssa, vaikka sieninäytteen pitoisuutta viruksen esikäsitelyssä oli lisätty (Kuva 5).

E12117 MY



E12218 MY

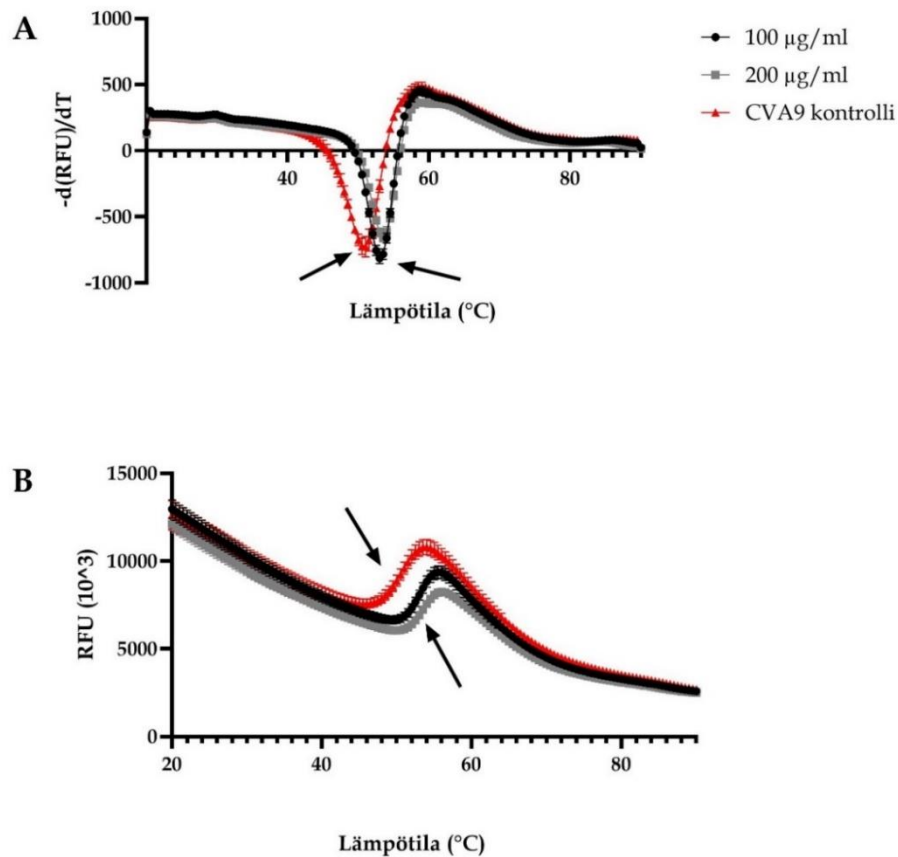


Kuva 5. Suurempien endofyyttisienipitoisuuksien antiviraalinen teho testattuna CVA9-viruksella. Kuvaajassa A kolme suurinta pitoisuutta (100, 200 ja 500 µg/ml) ylittivät raja-arvon $p < 0,05$. Kuvaajassa (A-B) solujen elävyys 2 vrk infektion jälkeen kristallivioletilla värjättyinä. Kuvaajassa punaisella on merkitty viruskontrolli ilman endofyyttisieninäytettä ja sinisellä solukontrolli ilman virusta tai endofyyttisientä. Parittaiset vertailut tehtiin Bonferroni- testillä viruskontrollia vastaan (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ja **** $p < 0,0001$).

3.2 Endofyyttisienen vaikutus enteroviruksen stabiilisuuteen ja avautumiseen

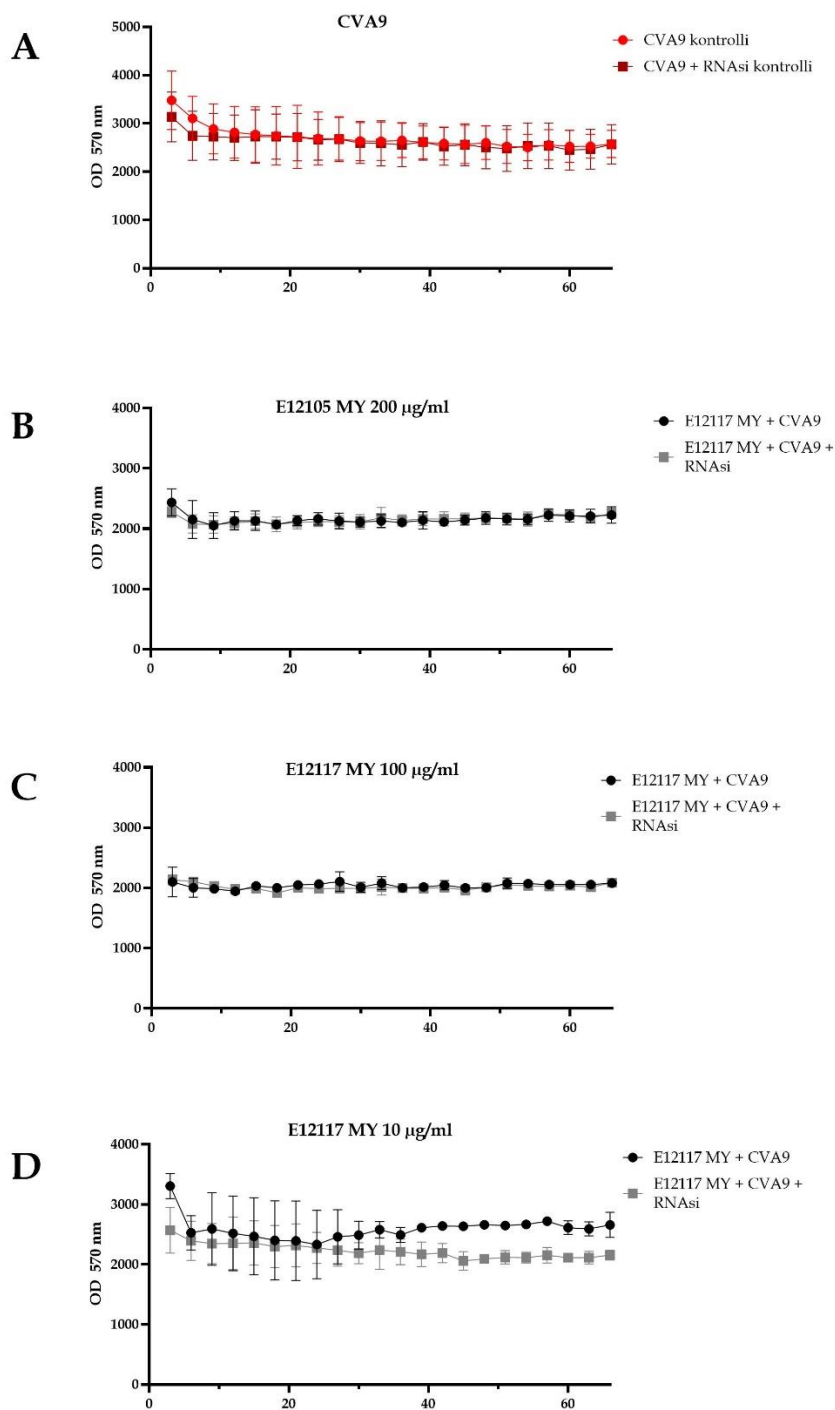
Alustavien antiviraalikokeiden jälkeen valittiin näyte E12117 MY lisätutkimuksiin, joissa pyrittiin havainnoimaan endofyyttisienen vaikutusta CVA9-viruksen stabiilisuuteen ja avautumiseen. Endofyyttisienenäytteen vaikutusta virukseen tutkittiin qPCR:ää hyödyntäen. PCR-laite mittasi SYBR Green II -väriaineen fluoresenssia lämpötilan noustessa +25 asteesta +90 asteeseen saakka 0,5 asteen lämpötilannousuilla. Lämpötilan nousun avulla voitiin laskea se lämpötila, missä 50 % viruksista oli avautunut. Tämä niin sanottu sulamispiste voitiin havaita fluoresenssin määrän nousuna, kun viruskapsidi avautui ja RNA vapautui partikkelista. Fluoresenssi havaittiin, kun väriaine sitoutui RNA:han.

Sulamispistettä kuvaava käyrä muodostettiin suhteellisen fluoresenssin derivaatan suhteessa lämpötilan derivaattaan $[d(\text{RFU})/dT]$ (Kuva 6A). Tässä havaittiin, että endofyyttisienellä E12117 MY käsitelty virus avautui hieman myöhemmin kuin viruskontrolli, mikä näkyy piikin siirtymänä lämpötilaa kuvaavalla x-akselilla. Saman tuloksen antoi kuvan 6B sulamiskäyrä, josta havaittiin, että viruskontrollin avautumispiste oli alhaisemmassa lämpötilassa kuin endofyyttisienellä käsitellyn viruksen. Endofyyttisienenäytteellä käsitellyn viruksen sulamispisteet olivat 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ näytepitoisuudella käsiteltynä $T_m=53,5$ °C ja 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ näytepitoisuudella $T_m=53$ °C verrattuna kontrollinäytteen lämpötilaan $T_m=50$ °C.



Kuva 6. Endofyyttisienen E12117 MY vaikutus CVA9-viruksen sulamispisteeseen. Kuvaajassa A sulamislämpötila (T_m) on määritetty suhteellisen fluoresenssin (RFU) derivaattana lämpötilan (T) suhteen. Kuvaajassa B viruksen sulaminen on kuvattu fluoresenssin (RFU) nousuna lämpötilan (T) suhteen. Nuolet kuvaavat sulamislämpötilaa T_m kuvaajissa A-B. Punainen käyrä osoittaa CVA9-viruskontrollin, musta ja harmaa E12117 MY -käsittelyn viruksen fluoresenssin muutokset lämpötilan suhteen.

Samaa periaatetta SYBR Green II -väriaineen sitoutumisesta johtuvaa fluoresenssia hyödynnettiin reaaliaikaisesti kapsidin avautumista tutkivassa kokeessa. E12117 MY -endofyyttisieninäytteellä käsitellystä CVA9-viruksesta mitattiin +37 °C lämpötilassa fluoresenssi kolmen minuutin välein tunnin ajan, jonka jälkeen fluoresenssin muutoksesta pystyttiin tutkimaan kapsidin avautuminen. Kuvassa 7 kontrolliviruksen fluoresenssia seuraamalla avautumista ei nähty, sillä viruksen ei pitäisi avautua stabiloivassa PBS-MgCl₂-puskurissa (Ruokolainen ym. 2019). Samalla havaitaan, että endofyyttisienellä käsitellyn viruksen ja näytteen, johon oli lisätty RNAasi A:ta, fluoresenssiarvot olivat hyvin samankaltaiset (Kuva 7). Toisin sanoen viruskapsidin avautumista ei havaittu käsitellyn seurauksena. Pienimmällä endofyyttisieninäytepitoisuudella (10 µg/ml) käsitellyn viruksen fluoresenssissa havaittiin pientä vaihtelua noin 30 minuutin kohdasta alkaen, mikä indikoi viruksen avautumista.

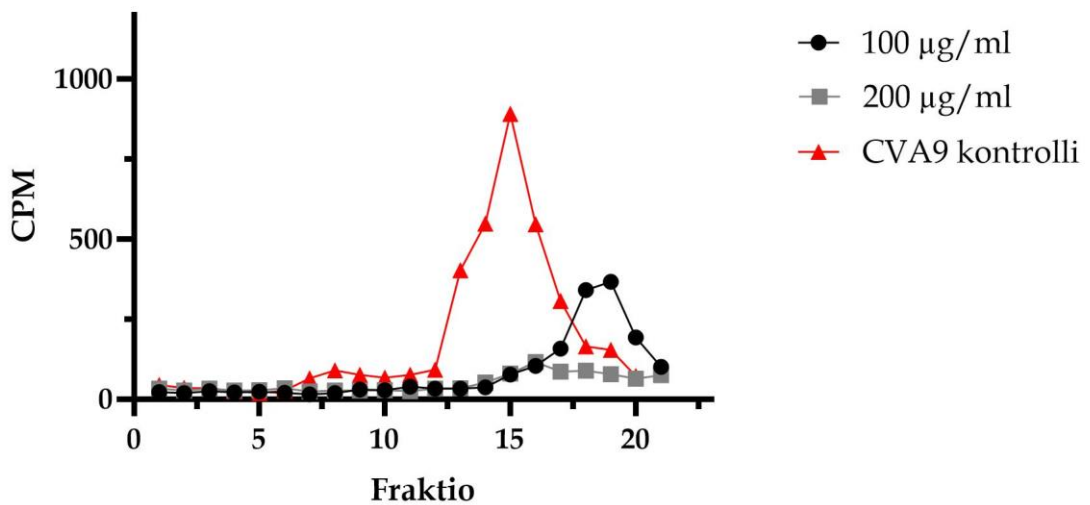


Kuva 7. Endofyyttisienen E12117 MY vaikutus CVA9-viruksen kapsidin avautumiseen reaaliaikaisessa avautumiskokeessa. Y-akselilla OD 570 nm ilmoittaa SYBR Green II:n fluoresenssin intensiteetin ajan (min) suhteen. Kuvaajissa (A-D) näytteiden (\pm RNAasi A) välinen ero kertoo CVA9-viruksen kapsidin avautumisesta.

3.3 Endofyyttisienen vaikutukset enteroviruksen rakenteeseen

Radioaktiivisesti leimatun viruksen signaalia seuraamalla voidaan sakkaroosifraktioista erottaa tyhjentyneet (80S), välikokoiset/osittain avautuneet (135S) ja kompaktit (S180) viruspartikkelit (Myllynen ym. 2016). Partikkelit jakautuivat tyypillisesti tällaisissa gradienteissa niin, että alkupään fraktioihin 1–12 jäävät kevyimmät hajonneet partikkelit ja kapsidin osat. Välikokoiset ja ehjät partikkelit löytyivät fraktioista 13–18 (Myllynen ym. 2016).

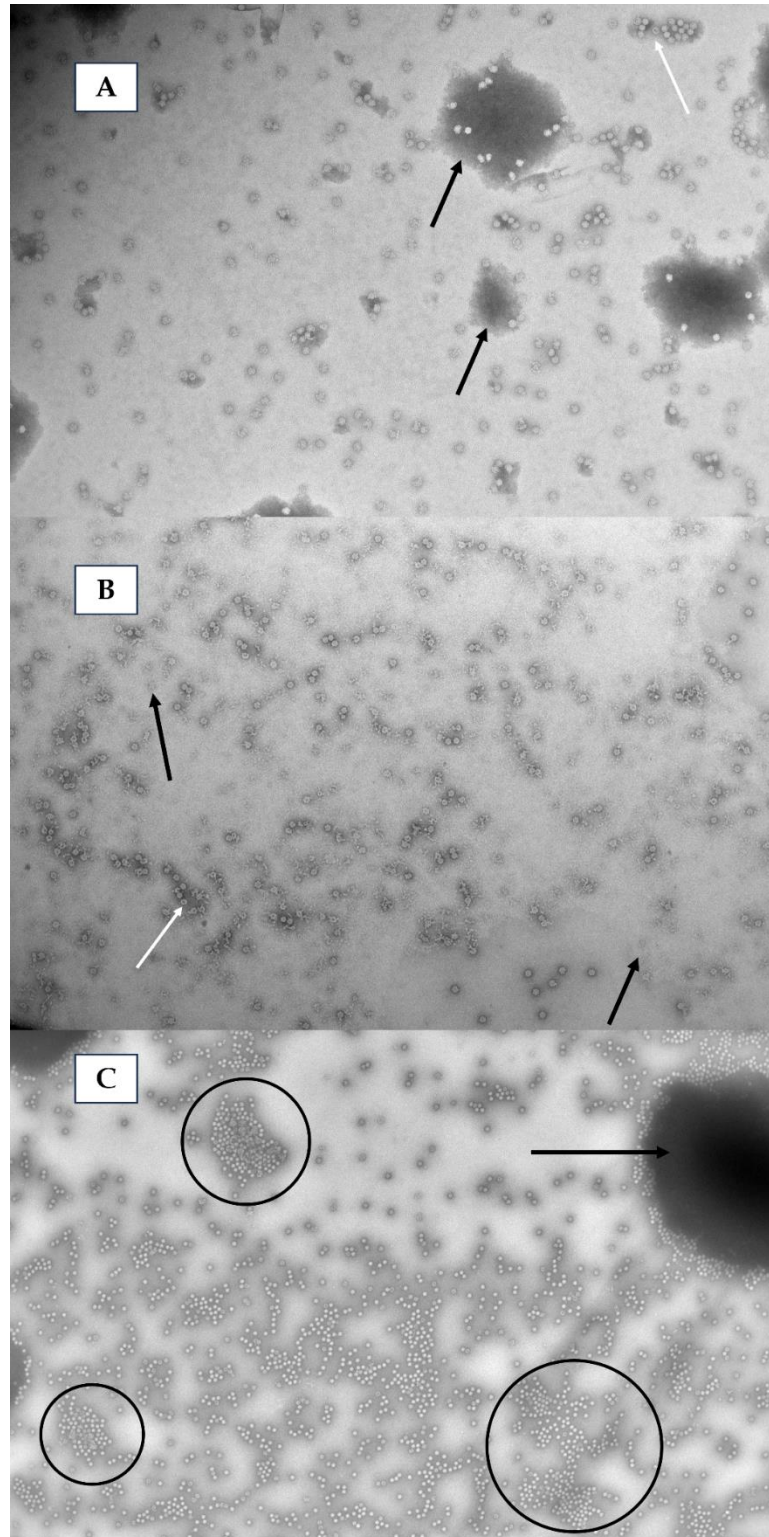
Kuvassa 8 viruskontrollista huomattiin sen sisältävän välikokoisia ja kompakteja viruspartikkeleita (fraktiot 13–18). Kun virusta oli inkuboitu 100 µg/ml E12117 MY -näytteellä signaalipiikki siirtyi fraktioihin 18–20, mistä voidaan päätellä näytteen sisältävän aggregoituneita viruksia. Kokeessa 200 µg/ml pitoisella E12117 MY -sieninäytteellä käsitellyn näytteen signaali hävisi fraktioinnissa lähes kokonaan todennäköisesti johtuen vielä suuremmista aggregaateista (Kuva 8) (Reshamwala ym. 2021).



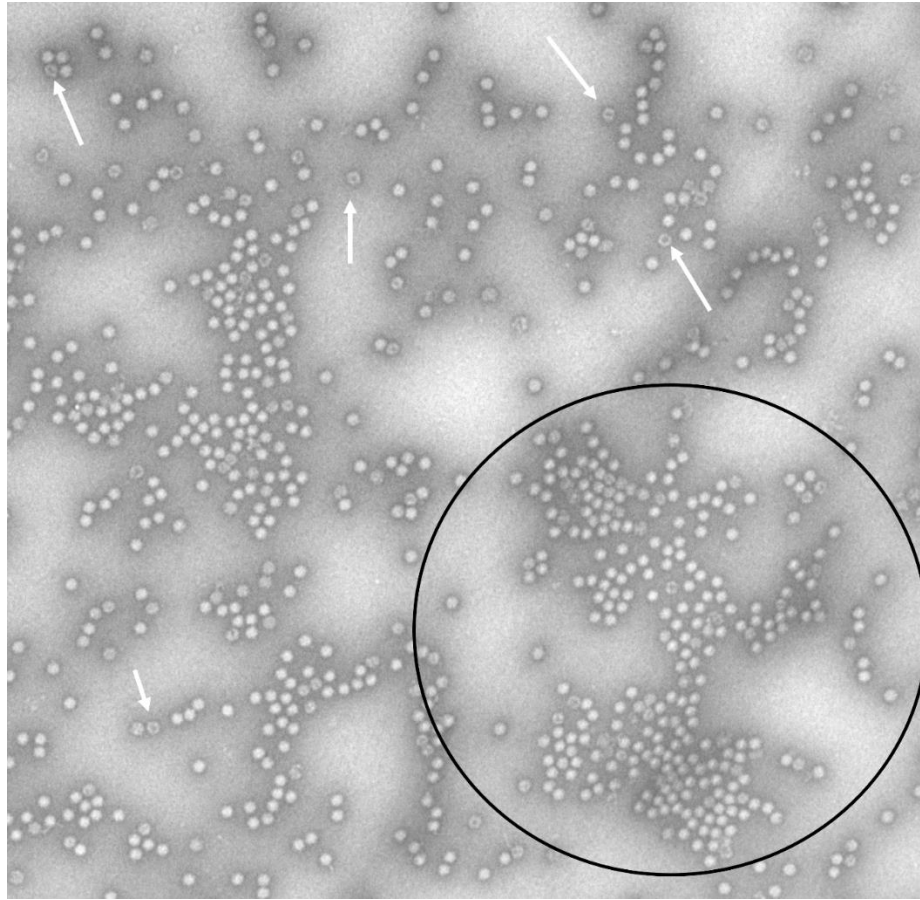
Kuva 8. Radioaktiivisen CVA9-viruspartikkelien signaali E12117 MY käsittelyn jälkeen. Y-akselilla radioaktiivisen signaalin intensiteetti (CPM) ja x-akselilla sakkaroosigradienttifraktiot. Alkupään fraktioista löytyy kaikista kevyimmät partikkelit, kun taas loppupäästä raskaimmat.

Radioaktiivisuuskokeen lisäksi CVA9-viruksen rakennetta ja endofyyttisieninäytteen E12117 MY vaikutusta siihen tutkittiin läpivalaisuelektronimikroskoopilla (Kuva 9). CVA9- virusnäytteet negatiivivärjättiin PTA-liuoksella, jonka ansiosta viruspartikkelit näkyivät kuvissa vaaleina tummempaa taustaa vasten. Avautuneissa rakenteissa väriaine oli päässyt viruksen sisään ja tämä nähtiin tummana pisteenä partikkelin sisällä.

Kontrollinäytteessä (Kuva 9A) vaaleat ehjät viruspartikkelit ovat jakautuneet hilalle tasaisesti. Kuvassa nähtiin myös tummana väriainejäämiä. Kuvassa 9B endofyyttisieninäytteellä (200 µg/ml E12117 MY) käsitellyt virukset olivat pääsääntöisesti ehjiä kuten kontrollissa, vaikka joitain laajeneita partikkeleita sekä tyhjiä viruskapsideja havaittiin. Kuvassa 9C suurimmalla näytepitoisuudella (500 µg/ml E12117 MY) käsitellyt virukset muodostivat pieniä aggregaatteja. Tällainen virusaggregaatti on suurennettu Kuvaan 10. Kuvasta 10 voidaan havaita CVA9- viruksen isokahedraaninen rakenne selkeästi. Kuvassa näkyy myös avautuneita partikkeleita, joiden sisällä väriaine näkyy tummana.



Kuva 9. Lämpivalaisuelektronimikroskooppikuvia negatiivivärjätystä CVA9-viruksista. Kuvassa A käsittelemätön CVA9-viruskontrolli. Kuvassa B 200 µg/ml ja kuvassa C 500 µg/ml E12117 MY -sieninäytteellä käsiteltyjä CVA9-viruspartikkeleita. Kuvissa mustalla nuolella on osoitettu väriainejäämät sekä muut artefaktit ja valkoisella avautuneet viruspartikkelit. Aggregaatteja on ympyröitynä kuvassa C.



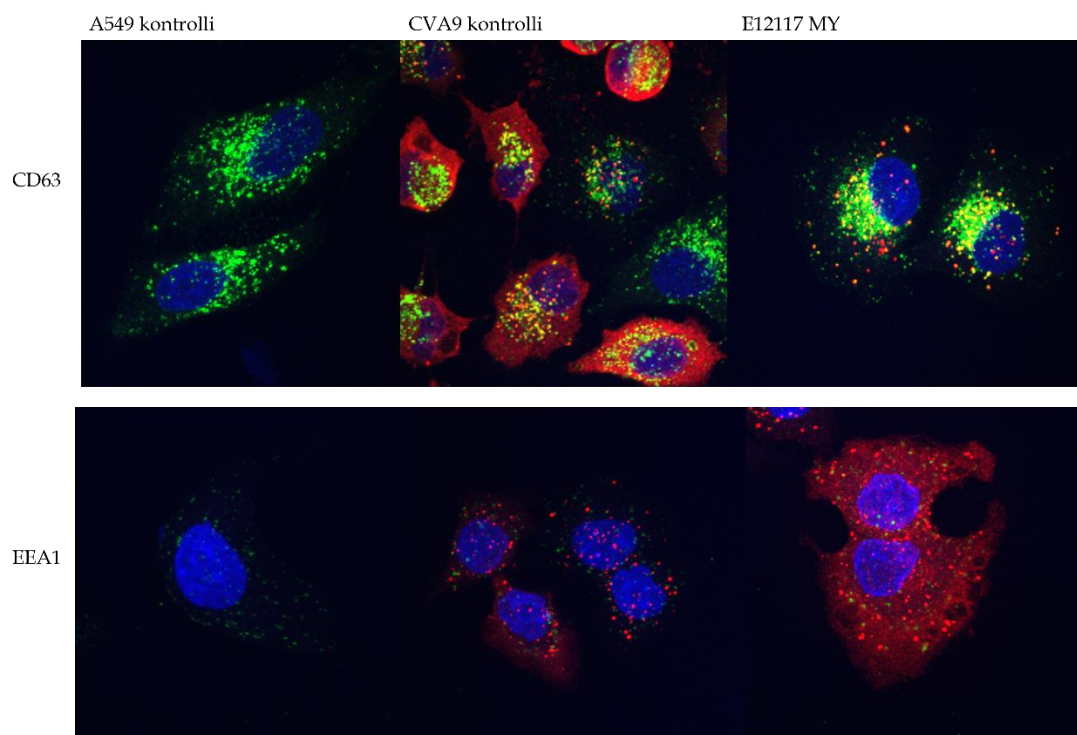
Kuva 10. Suurennos läpivalaisuelektronimikroskooppikuvasta, jossa on 500 µg/ml E12117 MY sieninäytteellä käsiteltyä CVA9-virusia. Valkoisilla nuolilla on osoitettu avautuneita viruspartikkeleita ja ympäröitynä virusaggregaatti.

3.4 Endofyyttisienen vaikutukset enterovirukseen solutasolla

Sen lisäksi, että antiviraalista aktiivisuutta osoittaneen endofyyttisienen E12117 MY vaikutusta CVA9-viruksen stabiilisuuteen tutkittiin, haluttiin myös seurata CVA9-infektiota endofyyttisienikäsittelyn jälkeen. Infektiota tutkittiin kvalitatiivisesti kuvaamalla CVA9-viruksella infektoiduja soluja Nikon A1R konfokaalimikroskoopilla (Liite 3). Kun CVA9-virusta oli esikäsitelty E12117 MY-endofyyttisieninäytteellä, solut infektoidiin ja fiksattiin kuusi tuntia infektion aloittamisen jälkeen. Soluista värjättiin immunoleimaamalla tumat ja endosomit sekä CVA9-viruksen kapsidiproteiini.

Tutkielmassa kuvattiin soluja, joissa CVA9-virusta oli esikäsitelty joko 100 tai 200 µg/ml pitoisella E12117 MY endofyyttinäytteellä. Lisäksi kuvattiin käsittelemättömiä infektoiduneita soluja sekä solukontrolleja ilman virusta tai endofyyttisieninäytettä. Kuvat käsiteltiin Fiji ImageJ ohjelmistolla, jolla eri kanavat yhdistettiin.

Kuvassa 11 nähdään CVA9-viruskapsidin punainen VP1-leima, Dapi-leimalla sininen tuma ja vihreänä endosomit. EEA1 leimasi varhaiset ja CD63 myöhäiset endosomit. Huomattiin, että CD63 oli EEA1 leimaa kirkkaampi. Ensimmäisessä sarakkeessa kuvassa 11 nähdään solukontrollit, joissa ei havaittu infektiota, vaan pelkästään tuma ja kirkkaana vihreällä myöhäiset endosomit. Seuraavassa sarakkeessa soluja oli infektoitu CVA9-viruksella, joka nähdään hyvin kirkkaana punaisena värinä solujen sisällä. Virusta ei silti havaittu kolokalisoituneena endosomien kanssa (Huttunen ym. 2014). Viimeisenä kuvassa 11 nähdään, kun CVA9-virusta oli inkuboitu E12117 MY -näytteen kanssa ennen infektiota, että käsittely ei ollut ehkäissyt virusten pääsyä solujen sisään. Näissäkään kuvissa virusten lokalisaatiota endosomeihin ei nähty.



Kuva 11. Endofyyttisienäytteen vaikutus CVA9-viruksen infektiioon A549-soluissa. Kuvissa vihreä väri (EEA1, CD63), punainen (CVA9-kapsidi VP1) ja sininen (DAPI). Ylemmällä rivillä soluista endosomit on värjätty CD63-värillä ja alemmalla EEA1-värillä. Solukontrollissa (A549 kontrolli) ei nähdä lainkaan viruksia. CVA9-viruskontrollissa infektiio on edennyt normaalisti ja solut ovat täynnä viruksen VP1-leimalla värjäytyneitä kohtia. E12117 MY -endofyyttisienikäsitteily ei ole estänyt viruksen pääsyä solujen sisään. Kuvassa VP1-väriä havaitaan solujen sisällä.

4 TULOSTEN TARKASTELU

Luontaiset bioaktiiviset yhdisteet, kuten kasvien ja sienten tuottamat sekundääriset metaboliatuotteet, vaikuttavat entero- ja koronavirusten elinkiertoa infektioita estäen. Usein vaikutuksen luo viruksen lisääntynyt stabiilisuus (Zhang ym. 2014) tai yhdisteiden vaikutus virusten elinkierron eri vaiheisiin, kuten replikaatioon (Kato ym. 2021, Arita ym. 2015, Wang ja Yang, 2023). Antiviraalisia yhdisteitä, joilla olisi kohdevirukseen riittävä inhiboiva vaikutus ilman epätoivottuja sivuvaikutuksia, on hankala löytää. Sienten tuottamien yli 20 000 bioaktiivisten metaboliatuotteiden (Paranagama ym. 2007) joukosta on todennäköistä havaita yhdisteitä, joilla antiviraalinen vaikutus on mahdollista saada aikaiseksi. Siksi näytteiden seulonta on ensimmäinen tärkeä vaihe antiviraalisia yhdisteitä tutkittaessa.

Tutkielmassa kuudesta endofyyttisieninäytteestä etsittiin antiviraalista vaikutusta korona- ja enteroviruksille, jotka ovat laajasti elinyhteisöissä kiertäviä viruksia ja voivat aiheuttaa vakavia oireita (V'kovski ym. 2021, Laajala ym. 2020). Tutkielmassa CVA9-virusta vastaan löydettiin antiviraalista vaikutusta osoittanut endofyyttisieninäyte, kun taas yhdelläkään HCoV-OC43-virusta vastaan testatulla näytteellä ei ollut infektioita estävää vaikutusta.

4.1 Endofyyttisienien vaikutus CVA9-virusinfektioon

Tutkimuksessa havaittiin E12117 MY -endofyyttisienien antiviraalinen vaikutus CVA9-enterovirusta vastaan. Eri sieninäytteiden vaikutusta enterovirusten infektiioon on tutkittu aikaiseminkin esimerkiksi Zhang ym. (2014) tutkimuksessa, jossa infektioita estävä vaikutus perustui näytteiden viruksen avautumista estävään toimintaan. Zhang ym. tutkimuksessa vaikutusmekanismia tutkittiin kolmella eri toimintatavalla, jotka olivat solujen esikäsittely näytteellä ennen infektioita, virusten esikäsittely näytteellä ennen infektioita ja solujen käsittely näytteellä infektion jälkeen. Heidän tuloksissaan havaittiin antiviraalista vaikutusta käsittelystä riippumatta (Zhang ym. 2014).

Tässä gradututkielmassa antiviraalista vaikutusta tutkittiin ainoastaan esikäsittelemällä viruksia endofyyttisienellä. Menetelmä valikoitui hypoteesin mukaan, jossa ajateltiin, että antiviraalinen vaikutus perustuu viruksen lisääntyneeseen stabiilisuuteen. CVA9-viruksen pinnan syvänteet eli hydrofobiset taskut toimivat reseptoriin kiinnittymisen kohtina. Näihin syvänteisiin on usein kiinnittyneenä lipidiosa, joka vaikuttaa viruksen stabiilisuuteen. Lipidiosan irtoaminen reseptoriin kiinnittymisen seurauksena vaikuttaa osaltaan kapsidirakenteen avautumisen prosessiin (Baggen ym., 2018, Marjomäki ym., 2015). Reshamwala:n ym. (2021) tutkimuksessa antiviraalinen yhdiste sitoutui viruksen pinnalla hydrofobisen taskun lisäksi muihin kapsidin kohtiin. Kun viruskapsidi ei lisääntyneen stabilaation vuoksi avaudu, myöskään infektio ei etene, vaikka virus olisi onnistunut sitoutumaan solun pinnalle ja

päätymään solun sisäisiin endosomeihin, kuten tässä tutkimuksessa havaittiin (Kuva 11) (Huttunen ym., 2014). Yksi gradututkielman vahvuutena oli useampi samaa ilmiötä kuvaava tutkimusmenetelmä, jotka vahvistivat ja tukivat saatuja tuloksia, jotka olivat endofyyttisieninäytteen E12117 MY antiviraalinen ja stabiloiva vaikutus CVA9-virukselle.

Stabilaation lisäksi tutkielmassa havaittiin CVA9-viruksen kerääntymistä ryppäiksi erityisesti läpivalaisuelektronimikroskooppikuvissa. Viruksia aggregoi esimerkiksi biologisen materiaalin sitoutuminen, muutokset pH:ssa, sekä suolapitoisuuden muutokset (Gerba ja Betancourt 2017). Radioaktiivisesti leimatun CVA9 signaalia seuraamalla havaittiin suurimmalla endofyyttisieninäytepitoisuudella käsitellyn viruksen signaalin häviämistä fraktioinnissa. Samankaltaisia tuloksia signaalin häviämisestä on raportoitu esimerkiksi Reshamwala:n ym. (2021) tutkimuksessa, jossa arveltiin viruksen muodostaneen aggregaatteja ja täten keräytyneen näyteputken reunamille, josta fraktioinnin yhteydessä virusta ei siirry mittaukseen.

Sen lisäksi, että tutkimuksessa havaittiin endofyyttisieninäytteen infektiota estävä vaikutus, havaittiin, että pelkkä näyte ei vaikuttanut soluihin sytotoksisesti. Tämä osaltaan tekee tutkitusta näytteestä mielenkiintoisen jatkotutkimuksia ajatellen. Mahdollinen lähestymistapa olisi fraktioida endofyyttisieninäytteestä yhdisteitä molekyylipainon mukaisiin fraktioihin ja tehdä vastaavat antiviraalikokeet näillä fraktioilla. Tällä tavoin voidaan erottaa ne fraktiot, joissa antiviraalista vaikutus ilmenee ja mahdollisesti eristää vaikutuksen aikaan saavat yhdisteet. Lee:n ym. tutkimuksessa *Phellinus pini*-sienestä oli eristetty kaksi polysakkaridia, joiden antiviraalinen vaikutus tutkittiin coxsackie B3-viruksella ja herpesviruksella (Lee ym. 2010). Heidän tutkimuksessaan käytettiin tämän gradututkielman tavoin kahta RNA-virusta, joista toinen oli vaipallinen ja toinen vaipaton, tutkimaan sieninäytteen antiviraalista vaikutusta. He havaitsivat, että sieniperäiset polysakkaridit inhiboivat molempien virusten infektiota (Lee ym. 2010). Koska tässä gradututkielmassa käytetyistä endofyyttisieninäytteistä ei ollut saatavilla tietoa esimerkiksi sienikaaresta tai mahdollisista metaboliiteista, E12117 My-näytettä on tärkeää tutkia lisää ja tunnistaa mahdolliset vaikuttavat yhdisteet. Yhdisteitä tunnistamalla molekyylitason vaikutusmekanismeja, kuten näytteen sitoutumiskohtaa kapsidin pinnalla, on mahdollista havaita tarkemmin. Näiden mekanismien tuntemien on tärkeää, jotta mahdollisten haittavaikutusten syntyminen voidaan ehkäistä. Samalla tunnistamalla näytteiden välisiä eroja voidaan tunnistaa, miksi toinen CVA9-virusta vastaan testatuista näytteistä toimi halutulla tavalla ja toinen ei.

4.2 Endofyyttisieninäytteiden vaikutus HCoV-OC43 -virusinfektioon

Endofyyttisieninäytteet oli valittu tutkimukseen Marjomäen tutkimusryhmässä tehtyjen alustavien testitulosten perusteella, joissa kaikilla näytteillä nähtiin potentiaalisia vaikutuksia virusinfektion ehkäisemisessä. Kuitenkin tutkielman aikana käytetyillä neljällä endofyyttisieninäytteellä ei ollut antiviraalista vaikutusta tutkittua HCoV-OC43-virusta vastaan. Pitkäkestoisen ja stabiilin antiviraalisen vaikutuksen aikaansaaminen on ollut yksi antiviraalisten tuotteiden tutkimuksen haasteista, jossa tämä tutkielma ei ollut poikkeus (Zhang ym. 2014, Linakoski ym. 2018, Laajala ym. 2020).

Endofyyttisieninäytteitä oli säilytetty ennen tutkimuksen aloitusta pakkasessa -80 °C useita kuukausia ensimmäisten seulontakokeiden ja antiviraalikokeiden välillä. Joitain tutkimuksia kasvien, marjojen ja hedelmien bioaktiivisten tuotteiden säilytyksestä on tehty ja usein vastakkaisilla tuloksilla. Puupponen-Pimiä:n ym. (2003) tutkimuksessa tutkittiin kasvien kuitujen, mineraalien, antioksidanttien ja muiden bioaktiivisten aineiden säilyvyyttä pakastuksessa. Puupponen-Pimiä:n ym. tutkimuksessa bioaktiivisten aineiden säilyvyys riippui kasvilajista, mutta yleisesti antioksidanttien ja kasvien tuottamien fenolisten yhdisteiden määrä väheni huomattavasti, kun niitä oli säilytetty -20 °C pakkasessa 6, 12 tai 18 kuukautta (Puupponen-Pimiä ym. 2003). Bernas ja Jaworska (2016) tutkivat pakastuksen vaikutusta *Agaricus bisporus* -sienen laatuun sen vitamiinipitoisuutta seuraamalla säilytyksen yhteydessä. Heidän tutkimuksessaan havaittiin sienen vitamiinimäärien laskevan, kun pakastussäilytys oli kestänyt yli 6 kuukautta indikoiden sienen laadun heikkenemistä (Bernas ja Jaworska 2016). Toisaalta taas Celli:n ym. (2016) katsausartikkelissa todettiin, että hedelmien ja hedelmätuotteiden fenolisten yhdisteiden määrä säilyy samankaltaisena tai jopa lisääntyy pakastuksen aikana (Celli ym. 2016). Toisissa tutkimuksissa havaittiin korkeamman pakastuslämpötilan (-20 °C) vaikuttavan yhdisteiden hajoamiseen enemmän, kuin matalampi säilytyslämpötila (-70 °C) (Chaovanalikit ja Wrolstad 2004).

Tässä gradututkielmassa endofyyttisieninäytteitä säilytettiin DMSO:ssa ja pakastettiin nopeasti -80 asteeseen, minkä pitäisi estää näytteiden laadun heikkenemistä säilytyksessä. Biologisen vaikutuksen aikaansaamiseen liittyy monia tekijöitä, kuten käytettyjen solujen, virusten ja endofyyttisieninäytteiden laatu. Säilytys voi olla yksi osatekijä tässä tutkielmassa havaituissa endofyyttisieninäytteiden vaikutuksissa HCoV-OC43-virusta vastaan (Kuva 3), missä jonkin tasoista positiivista eroa viruskontrolliin nähden havaittiin muutamilla näytenäytteillä.

5 PÄÄTELMÄT

Yleisesti kiertävien virusinfektioiden, kuten entero- ja koronartartuntojen, estämiseksi tarvitaan rokotteiden rinnalla tehokkaita rinnakkaisvalmisteita. Monia kasveja ja sieniä on jo pitkään käytetty lääkinnällisissä tarkoituksissa ja niiden tuottamista metaboliatuotteista löydetään yhä enemmän mahdollisia potentiaalisia antiviraalisia yhdisteitä. Sienten tuottamien bioaktiivisten yhdisteiden ryhmät ovat laajoja ja toimivat luontaisesti mikrobi-infektioiden ehkäisijöinä. Kun sopiva yhdiste löytyy, on lisäksi tärkeä selvittää antiviraalisen vaikutuksen luovat molekyyllitason mekanismit, jotta mahdolliset haittavaikutukset, kuten resistenssien viruskantojen syntyminen, voidaan ehkäistä. Yhdisteellä pitäisi myös olla laaja-alaisesti vaikutusta eri viruslajeille, jotta antiviraalisen yhdisteen käyttö olisi kannattavaa. Tästä syystä tutkimukset virusten elinkierrosta ja niihin vaikuttavista tekijöistä ovat oleellisia.

Tässä tutkielmassa pystyttiin osoittamaan, että endofyyttisienistä on mahdollista löytää infektiota estävää vaikutusta CVA9-enterovirukselle ja että havaittu vaikutus perustuu viruksen lisääntyneeseen stabiilisuuteen. Endofyyttisieninäytteen E12117 MY vaikutusta muille enteroviruksille on kannattavaa tutkia, sillä näyte ei ilmaissut toksisia vaikutuksia soluille. Endofyyttisienet tuottavat runsaasti erilaisia bioaktiivisia yhdisteitä, joten on todennäköistä, että näytteestä löytyy aktiivisia yhdisteitä myös muille enteroviruslajeille ja mahdollisesti muille vaipattomille RNA-viruksille. Tulevaisuudessa endofyyttinäytteen fraktioidinnalla saadaan selville tarkemmin, mitkä ovat ne tekijät, jotka aiheuttavat tässä tutkielmassa havaitut vaikutukset CVA9-virusta vastaan.

KIITOKSET

Kiitos Varpu Marjomäelle ohjauksesta, sekä koko tutkimusryhmälle kiitos tuesta ja neuvoista. Haluan myös kiittää Mainzin yliopistoa ja tohtori Anja Shuffleriä tutkimusnäytteistä.

Jyväskylässä 31.5. 2024
Anni Westerholm

KIRJALLISUUSLUETTELO

- Arita M., Philipov S. & Galabov A.S. 2015. Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is the target of oxoglaucine and pachypodol (Ro 09-0179) for their anti-poliovirus activities, and is located at upstream of the target step of brefeldin A. *Microbiology and Immunology*. 53:338-347.
- Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M & van Kuppeveld F.J.M. 2018. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology* 16:368-381
- Bernaś E. & Jaworska G. 2016. Vitamins profile as an indicator of the quality of frozen *Agaricus bisporus* mushrooms. *Journal of food composition and analysis*. 49:1-8
- Celli G.B., Ghanem A. & Brooks M.S-L. 2016. Influence of freezing process and frozen storage on the quality of fruits and fruit products. *Food Reviews International*. 32:280-304
- Chaovanalikit A. & Wrolstad R.E. 2004. Anthocyanin and polyphenolic composition of fresh and processed cherries. *J. Food Sci.*69. doi: 10.1111/j.1365-2621.2004.tb17859.x
- Colonaga R., Spagnolo J.F. & Hogue B.G. 2000. Identification of Nucleocapsid Binding Sites within Coronavirus-Defective Genomes. *Virology* 277:235-249
- dos Santos Lacerda I.C., Polonio J.C. & Golias H.C. 2022. Endophytic Fungi as a Source of Antiviral Compounds -A Review. *Chemistry & Biodiversity* 19. doi: <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100971>
- Ehrenfeld E., Domingo E. & Roos R.P. 2010. The picornaviruses. *American Society for Microbiology*. USA
- Gerba C.P. & Betancourt W.Q. 2017. Viral Aggregation: Impact on Virus Behavior in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* 51:7318-7325.
- Hawksworth D. L. & Lucking R. 2017. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr.* 5. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
- Hayden F.G., Herrington D.T., Coats T.L. Kim K., Cooper E.C., Villani S.A., Liu S., Hudson S., Pevear D.C., Collett M., McKinlay M. & Pleconaril Respiratory Infection Study Group. 2003. Efficacy and Safety of Oral Pleconaril for Treatment of Colds Due to Picornaviruses in Adults: Results of 2 Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trials. *Clinical Infectious Diseases*. 36:1523-1532,
- Hulswit R.J.G., Lang Y., Bakkens M.J.G., Li W., Li Z., Schouten A., Ophorst B., van Kuppeveld F.J.M., Boons G. Bosch B., Huizinga E.G. & de Groot R.J. 2019. Human coronaviruses OC43 and HKU1 bind to 9-O-acetylated sialic acids via a conserved receptor-binding site in spike protein domain A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 7:2681-2690
- Huttunen M., Waris M., Kajander R., Hyypiä T. & Marjomäki V. 2014. Cocksackievirus A9 Infects Cells via Nonacidic Multivesicular Bodies. *Journal of Virology* 88: 5138-5151

- International Committee on Taxonomy of Viruses, Family: *Coronaviridae*, Subfamily: *Orthocoronavirinae*, Genus: *Betacoronavirus*. <https://ictv.global/report/chapter/coronaviridae/coronaviridae/betacoronavirus>. (luettu 2.5.2024)
- Kato Y., Higashiyama A., Takaoka E., Nishikawa M. & Ikushiro S. 2021. Food phytochemicals, epigallocatechin gallate and myricetin, covalently bind to the active site of the coronavirus main protease in vitro. *Adv. Redox Res.*, 3, 100021. doi: 10.1016/j.arres.2021.100021
- Kim M.I. & Lee C. 2023. Human Coronavirus OC43 as a Low-Risk Model to Study COVID-19. *Viruses* 15. doi: <https://doi.org/10.3390/v15020578>
- Laajala M., Reshamwala D. & Marjomäki V. 2020. Therapeutic targets for enterovirus infections. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 8:745-757
- Lee S.M., Kim S.M., Lee Y.H., Kim W.J., Park J.K. & Park Y.I. 2010. *Macromolecular Research*. 18:602-609
- Linnakoski R., Reshamwala D., Veteli P., Corintina-Escribano M., Vanhanen H. & Marjomäki V. 2018. Antiviral Agents From Fungi: Diversity, Mechanisms and Potential Applications. *Front. Microbiol.* 9:2325. doi: 10.3389/fmicb.2018.02325
- Min N., Leong P.T., Lee R.C.H., Khuan J.S.E & Chu J.J.H. 2018. A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication. *Antiviral Research* 150:60-68
- Myllynen M., Kazmertusk A. & Marjomäki V. 2016. A novel open and infectious form of Echovirus 1. *J. Virology*. 90:6759-6770.
- Marjomäki V., Turkki P. & Huttunen M. 2015. Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. *Viruses* 7:6387-6399
- Nishimura Y., McLaughlin N.P, Pan J., Goldstein S., Hafenstein S., Shimizu H., Winkler J.D. & Bergelson J.M. 2015. The suramin derivative NF449 interacts with the 5-fold vertex of the Enterovirus A71 capsid to prevent virus attachment to PSGL-1 and heparan sulfate. *PLoS Pathog.* 11. doi: 10.1371/journal.ppat.1005184
- Omomwoa I.O., Amaoa J.A., Abubakar A., Ogundoola A.F., Ezediuno L.O. & Bamigboyea C.O. 2023. A review on the trends of endophytic fungi bioactivities. *Scientific African*. 20. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01594>
- Ogimi C., Kim Y.J., Martin E.T., Huh H.J., Chiu C. & Englund J.A. 2020. What's New With the Old Coronaviruses? *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*. 9: 210-217.
- Ovchynnykova O., Kapusta K., Sizochenko N., Sukhyy K.M., Kolodziejczyk W., Hill G.A. & Saloni J. 2022. Homology Modeling and Molecular Dynamics-Driven Search for Natural Inhibitors That Universally Target Receptor-Binding Domain of Spike Glycoprotein in SARS-CoV-2 Variants. *Molecules*. 27:7336. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27217336>

- Owczarek K., Szczepanski A., Milewska A., Baster Z., Raijfur Z., Sarna M. & Pyrc K. 2018. Early events during human coronavirus OC43 entry to the cell. *Scientific Reports*. 8:7124. doi:10.1038/s41598-018-25640-0
- Owen D.R., Allerton C.M.N., Anderson A.S., Aschenbrenner L., Avery M., Berritt S., Boras B., Cardin R.D., Carlo A., Coffman K.J., Dantio A., Di L., Eng H., Ferre R., Gakiwala K.S., Gibson S.A., Greasley S.E., Hurst B.L., Kadar E.P., Kalgutkar A.S., Lee J.C., Lee J., Liu W., Mason S.M., Noell S., Novak J.J., Obach R.S., Ogilvie K., Patel N.C., Petterson M., Rai D.K., Reese M.R., Sammons M.F., Sthish J.G., Singh R.S.P., Steppan C.M., Stewart A.E., Tuttle J.B., Updyke L., Verhoest P.R., Wei L., Yang Q. & Zhu Y. 2021. An oral SARS-CoV-2 Mpro inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. *Science*. 374:1586-1593.
- Paranagama P.A., Wijeratne E.M.K. & Gunatilaka A.A.L. 2007. Uncovering Biosynthetic Potential of Plant-Associated Fungi: Effect of Culture Conditions on Metabolite Production by *Paraphaeosphaeria quadrisepitata* and *Chaetomium chiversii*. *J. Nat. Prod.* 70:1939-1945
- Pevear D.C, Tull T.M., Seipel M.E. & Groarke J.M. 1999. Activity of Pleconaril against Enteroviruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43:2109-2115
- Pozzetto B. & Gaudin O.G.1999. Coxsackieviruses (*Picornaviridae*). *Encyclopedia of Virology*. 305-311. doi: 10.1006/rwvi.1999.0057
- Puupponen-Pimiä R., Häkkinen S.T., Marjukka A., Suortti T., Lampi A-M., Euroola M., Piironen V., Nuutila A., M. & Oksman-Caldentey K-M. 2003. Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *J Sci Food Agric* 83:1389-1402.
- Ren P., Zheng Y., Wang W., Hong L., Delpeyroux F., Arenzana-Seisdedos F. & Altmeyer R. 2017. Suramin interacts with the positively charged region surrounding the 5-fold axis of the EV-A71 capsid and inhibits multiple enterovirus A. *Scientific Reports*. 7:42902. doi: 10.1038/srep42902
- Reshamwala D., Shroff S., Sheik Amamuddy O., Laquintana V., Denora N., Zacheo A., Lampinen V., Hytonen V.P., Tastan Bishop Ö., Krol S. & Marjomäki V. 2021. Polyphenols Epigallocatechin Gallate and Resveratrol and Polyphenol-Functionalized Nanoparticles Prevent Enterovirus Infection through Clustering and Stabilization of the Viruses. *Pharmaceutics* 13: 1182. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081182>
- Ruokolainen V., Damanska A., Laajala M., Pelliccia M., Butcher S.J. & Marjomäki V. 2019. Extracellular albumin and endosomal ions prime enterovirus particles for uncoating that can be prevented by fatty acid saturation. *J. Virol.* 13:93. doi: 10.1128/JVI.00599-19
- Schindelin, J., Arganda-Carreras I. & Frise E. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9: 676-682.
- Szczepanski A., Owczarek K., Bzowska M., Gula K., Drebot I., Ochman M., Maksym B., Raijfur Z., Mitchell J.A. & Pyrc K. 2019. Canine Respiratory Coronavirus, Bovine Coronavirus, and Human Coronavirus OC43: Receptors and Attachment Factors. *Viruses*. 11:328. doi:10.3390/v11040328

- Tariq N. & Kyriakopoulos C. 2024. Group B Coxsackie Virus. *StatPearls Publishing*. Treasure Island.
- Tsvetkov V., Varizhuk A., Kozlovskaya L., Shtro A., Lebedeva O., Komissarov A., Vedekhina T., Manuvera V., Zubkova O., Ereemeev A., Shustova E., Pozmogova G., Lioznov D., Ishmukhametov A., Lazarev V. & Lagarkova M. 2021. EGCG as an anti-SARS-CoV-2 agent: Preventive versus therapeutic potential against original and mutant virus. *Biochimie* 191: 27-32
- Zhang W., Tao J., Yang X., Yang Z., Zhang L., Liu H., Wu K. & Wu J. 2014. Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection. *BBRC*. 449:307-312
- V'kovski P., Krazel A., Steiner S., talder H. & Thiel V. 2021. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology* 19:155-167
- Wang Z. & Yang L. 2023. The Therapeutic Potential of Natural Dietary Flavonoids against SARS-CoV-2 Infection. *Nutrients*. 15:3443. doi: <https://doi.org/10.3390/nu15153443>
- Wen J., Okyere S.K., Wang S., Wang J., Xie L., Ran Y. & Hu Y. 2022 Endophytic Fungi: An Effective Alternative Source of Plant-Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *J. Fungi*. 8:205. doi: <https://doi.org/10.3390/jof8020205>
- World Health Organization (WHO). 2023. Therapeutics and COVID-19: living guideline. Geneva.
- Wu W., Cheng Y., Zhou H., Sun C. & Zhang S. 2023. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. *Virol. J.* 20:6. doi: 10.1186/s12985-023-01968-6

LIITE 1. VICTOR X4 -LEVYLUKIJAN MITTAUSASETUKSIA ANTIVIRAALI- JA SYTOTOKSISUUSKOKEISSA

Taulukko 6. Antiviraalisuus- ja sytotoksisuuskokeiden Viktor X4-levylukijan asetukset

| Asetus | |
|-------------------------|--------------|
| Väriaineen nimi | A570/630 |
| Levytyyppi | Generic 8x12 |
| Toistojen määrä | 1 |
| Toistojen välinen viive | 0 s |
| CW-lamppu filttteri | A4 |
| Mittausaika | 0,1 s |
| Absorbanssi | Näkyvä |
| Exsitaatio apertuuri | N/A |

LIITE 2. VICTOR X4 -LEVYLUKIJAN ASETUKSET CVA9 AVAUTUMISKOKEESSA

Taulukko 7. Avautumiskokeen Viktor X4-levylukijan asetukset

| Asetus | |
|-------------------------|--------------|
| Levytyyppi | Generic 8x12 |
| Toistojen määrä | 22 |
| Toistojen välinen viive | 170 s |
| Emissiofilteri | D615 |
| Mittausaika | 0,1 s |
| Emissio apertuuri | Normaali |
| CW-Lamppu filteri | P570 |
| CW-Lamppu energia | 10320 |
| Eksitaatio apertuuri | N/A |

LIITE 3. NIKON A1R KUVAUSASETUKSET

Taulukko 8. Nikon A1R konfokaalimikroskoopin kuvausasetukset

| Asetus | |
|-------------------|---|
| Laseri | 405 nm diodilaser, 488 nm multilinjainen Argon-laser, 561 nm Sapphire laser |
| Filtterin emissio | BP 450/5, 482/35 and 540/30 |
| Objektiivi | CFI plan Apo VC 60xH (N.A 1.4, WD 0.13, oil immersion) |
| Ohjelma | NIS Elements AR 5.21.03 NIKON imaging software |

