



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Flavonoidien antimikrobiaktiivisuuden parantaminen prenyloimalla**

Tiina Seppänen

Kemia (Luonnonyhdisteiden kemia)

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

10.5.2024

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Oppiaine:** Kemia

**Tekijä:** Tiina Seppänen

**Otsikko:** Flavonoidien antimikrobiaktiivisuuden parantaminen prenyloimalla

**Ohjaajat:** Juha-Pekka Salminen, Maarit Karonen

**Sivumäärä:** 25 sivua

**Päivämäärä:** 10.5.2024

---

Flavonoidit ovat tärkeitä kasveissa esiintyviä fenolisia yhdisteitä. Niillä on erilaisia biologisia aktiivisuuksia, joista lääkekehityksen kannalta yksi mielenkiintoisimmista on antimikrobiaktiivisuus. Antimikrobiaktiivisuuden ansiosta flavonoideja voidaan hyödyntää mikrobilääkkeissä. Flavonoidien antimikrobiaktiivisuus riippuu pitkälti niiden rakenteesta, jolloin aktiivisuutta voidaan parantaa muokkaamalla yhdistettä kemiallisesti. Yksi tapa muokata flavonoideja on prenylointi.

Prenyloidut flavonoidit rakentuvat flavonoidirungosta ja prenyylisivuketjusta. Näitä yhdisteitä löytyy useista kasveista, mutta luonnossa näitä on kuitenkin saatavilla vain rajallisissa määrin. Tutkimuskäyttöä varten niitä onkin hyvä pystyä syntetisoimaan helposti saatavilla olevista yhdisteistä. Reaktioissa voidaan hyödyntää luonnosta saatavia prenyylitransferaasientsyymejä tai kemiallisia katalyyttejä. Kemiallisia katalyyttejä hyödynnettäessä tarvitaan yleensä kuitenkin useita reaktiovaiheita ja erilaisia suojayhdisteitä ei-toivottujen sivureaktioiden estämiseksi.

Prenyloitujen flavonoidien parantunut antimikrobiaktiivisuus runkorakenteeseen verrattuna perustuu prenyylisivuketjun poolittomuuteen. Poolittomuus lisää yhdisteen lipofiilisyyttä, jonka myötä yhdisteellä on mikrobeissa korkeampi affiniteetti kohdeproteiineihin ja toisaalta se pystyy vuorovaikuttamaan paremmin solukalvon kanssa.

Prenyloinnin myötä yhdisteen lipofiilisyyttä voi kasvaa kuitenkin liian suureksi, joten prenyloitujen flavonoidien kemiallisella muokkauksella pyritään parantamaan yhdisteen hydrofiilisyyttä esimerkiksi lisäämällä positiivisesti varautuneita ryhmiä yhdisteeseen. Tämä parantaa yhdisteen antimikrobiaktiivisuutta sähköstaattisten vuorovaikutusten avulla, jonka myötä yhdiste pystyy vuorovaikuttamaan paremmin mikrobien negatiivisesti varautuneen solukalvon kanssa.

---

**Avainsanat:** antimikrobiaktiivisuus, bioaktiivisuus, biosynteesi, erikoistuneet metaboliitit, flavonoidit, kemiallinen muokkaaminen, prenylointi, synteesi

## Lyhenneluettelo

4CL	4-kumaraatti-KoA-ligaasi
AACT	asetyyli-KoA-asetyyli transferaasi
AcOEt	etyyliasettaatti
Arg	arginiini
C4H	kinnamaatti-4-hydroksylaasi
cDNA	komplementaarinen DNA
CDP-ME	4-difosfositidyli-2-C-metyyli-D-erytritoli
CDP-MEP	4-difosfositidyli-2-C-metyyli-D-erytritoli-2-fosfaatti
CHI	kalkoni-isomeraasi
CHS	kalkonisyntaasi
CMK	4-difosfositidyli-2-C-metyyli-D-erytritoli-kinaasi
CPR	sytokromi-P450-reduktaasi
DIC	N,N'-di-isopropylikarbodi-imidi
DIPEA	N,N-di-isopropylietyyliamiini
DMAPP	dimetyyliallyylipyrofosfaatti
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DXP	1-deoksi-D-ksyluloosi-5-fosfaatti
DXR	1-deoksi-D-ksyluloosi-5-fosfaattireduktoisomeraasi
DXS	1-deoksi-D-ksyluloosi-5-fosfaattisyntaasi
EHEC	enterohemorraginen <i>Escherichia coli</i>
F3'H	flavanoni-3-hydroksylaasi
FNS II	flavonisyntaasi II
FoPT1	<i>Fusarium oxysporum</i> in prenyyli transferaasi 1
FPP	farnesylyli pyrofosfaatti
G3P	glyseraldehydifosfaatti
GPP	geranylyli pyrofosfaatti
HATU	2-(3H-[1,2,3]triatso[4,5-b]pyridin-3-yyli)-1,1,3,3-tetrametyyli-isouronium- heksafluorofosfaatti
HDR	4-hydroksi-3-metyyli but-2-enyli-difosfaattireduktaasi
HDS	4-hydroksi-3-metyyli but-2-enyli-difosfaattisyntaasi

His	histidiini
HMBPP	4-hydroksi-3-metyyli-but-2-enyylipyrofosfaatti
HMGR	3-hydroksi-3-metyyliglutaryyli-KoA-reduktaasi
HMGS	3-hydroksi-3-metyyliglutaryyli-KoA-syntaasi
HOBt	N-hydroksibentsotriatsoli
IDI	IPP-isomeraasi
IPP	isopentenyylipyrofosfaatti
KoA	koentsyymi A
Lys	lysiini
MEcPP	2-C-metyyli-D-erytritoli-2,4-syklodifosfaatti
MCT	2-C-metyyli-D-erytritoli-4-fosfaattisitidyylitransferaasi
MDS	2-C-metyyli-D-erytritoli-2,4-syklodifosfaattisyntaasi
MEP	2-C-metyyli-D-erytritoli-4-fosfaatti
MIC	minimi-inhibitiokonsentraatio (engl. minimum inhibitory concentration)
MK	mevalonaattikinaasi
MOM	metyylimetyylieetteri
MVD	difosfomevalonaattidekarboksylaasi
NADP <sup>+</sup>	nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti
NADPH	pelkistetty nikotiiniamidiadeniinidinukleotidifosfaatti
PAL	fenyylialaniiniammoniakkilyaasi
PMK	fosfomevalonaattikinaasi
PPi	epäorgaaninen pyrofosfaatti
PT	prenyylitransferaasi
TAL	tyrosiiniammoniakkilyaasi
THF	tetrahydrofuraani
ZnCl <sub>2</sub>	sinkkikloridi

## Sisällysluettelo

<b>1</b>	<b>Johdanto</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Flavonoidit</b> .....	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Prenyloidut flavonoidit</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1</b>	<b>Prenyloidut flavonoidit luonnossa</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2</b>	<b>Prenyloitujen flavonoidien biosynteesi</b> .....	<b>11</b>
<b>3.3</b>	<b>Synteettisesti prenyloidut flavonoidit</b> .....	<b>14</b>
3.3.1	Flavonoidien prenylointi kemiallisesti .....	14
3.3.2	Prenyloitujen flavonoidien kemiallinen muokkaaminen .....	17
<b>4</b>	<b>Flavonoidien antimikrobiaktiivisuus</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Yhteenveto</b> .....	<b>22</b>
	<b>Lähteet</b> .....	<b>23</b>

## 1 Johdanto

Flavonoidit ovat tärkeitä monissa kasveissa, kuten marjoissa, hedelmissä ja lehdissä, esiintyviä fenolisia yhdisteitä. Ne ovat kasvien erikoistuneita metaboliitteja ja toimivat muun muassa väripigmenteinä ja puolustusyhdisteinä. Flavonoidien onkin havaittu olevan biologisesti ja farmakologisesti aktiivisia ja niillä on monia terveyttä hyödyttäviä ominaisuuksia (Panche et al., 2016).

Erilaiset mikrobit, kuten bakteerit ja virukset, ovat yksi merkittävimmistä patogeeniluokista. Näitä vastaan on kehitetty mikrobilääkkeitä, joilla saadaan tapettua tai estettyä mikrobien kasvu. Lääkkeillä on erilaisia vaikutusmekanismeja, jotka vaikuttavat esimerkiksi mikrobien metaboliaan, DNA:n replikaatioon tai soluseinän biosynteesiin (Cegelski et al., 2008). Lääkkeiden liiallinen käyttö on kuitenkin lisännyt mikrobien lääkeresistenssiä ja tämän myötä tarvitaan koko ajan uusia tehokkaampia mikrobilääkkeitä korvaamaan vanhoja lääkkeitä (Aguilera-Correa et al., 2021; Sarbu et al., 2019).

Koska flavonoideilla on antimikrobisia ominaisuuksia, tutkitaan niiden hyödyntämistä mikrobilääkkeissä (Cushnie & Lamb, 2005). Flavonoidien antimikrobiaktiivisuus riippuu pitkälti niiden rakenteesta ja flavonoidien ominaisuuksia voidaan muokata esimerkiksi lisäämällä niihin erilaisia sivuketjuja. Tällainen sivuketju voi olla esimerkiksi prenyylisivuketju, jonka myötä flavonoidin antimikrobiaktiivisuus vaikuttaisi parantuvan. Näitä yhdisteitä kutsutaan prenyloiduiksi flavonoideiksi ja niitä esiintyy luonnossa, mutta niitä voidaan myös valmistaa flavonoideista kemiallisesti muokkaamalla (Shi et al., 2021).

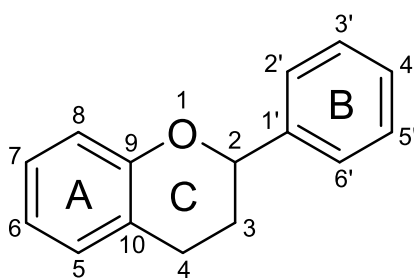
Tässä tutkielmassa on keskitytty flavonoidiaglykonien eli sokerittomien flavonoidien prenylointiin ja antimikrobiaktiivisuuteen. Tarkoituksena on selvittää, miten flavonoidien prenylointi vaikuttaa niiden antimikrobiaktiivisuuteen sekä tutustua erilaisiin reaktioihin, joiden avulla kyseisiä kemiallisia modifikaatioita voitaisiin tehdä.

## 2 Flavonoidit

Flavonoidit ovat kasvien erikoistuneita metaboliitteja ja toimivatkin erityisesti erilaisina puolustusyhdisteinä mikrobeja ja muita stressitekijöitä vastaan (Singh et al., 2014). Ne ovat yleisiä yhdisteitä luonnossa ja niitä löytyy melkein kaikista kasvilajeista. Flavonoidit tunnetaankin erilaisista biologisista aktiivisuuksistaan, kuten antimikrobi-, antibakteeri-, antioksidantti- ja antimutageeniaktiivisuuksistaan (Panche et al., 2016).

Flavonoidien monipuolisten ominaisuuksien takia niitä voidaan hyödyntää monissa käytännön sovelluksissa, kuten farmaseuttisissa ja lääketieteellisissä sovelluksissa (Panche et al., 2016). Hyödyntämisen kannalta yksi tärkeimmistä ominaisuuksista on flavonoidien antimikrobiaktiivisuus. Tällä tarkoitetaan yhdisteiden kykyä toimia mikrobeja vastaan. Esimerkiksi lootuksen lehdistä eristetty kversetiini vaikuttaisi toimivan hampaiden tukikudostulehdusta aiheuttavia bakteereja vastaan (M. Li & Xu, 2008). Antimikrobiaktiivisuuden takia olisikin tärkeää tutkia tarkemmin, voitaisiinko flavonoideja hyödyntää mikrobilääkkeissä korvaamaan nykyisiä lääkkeitä.

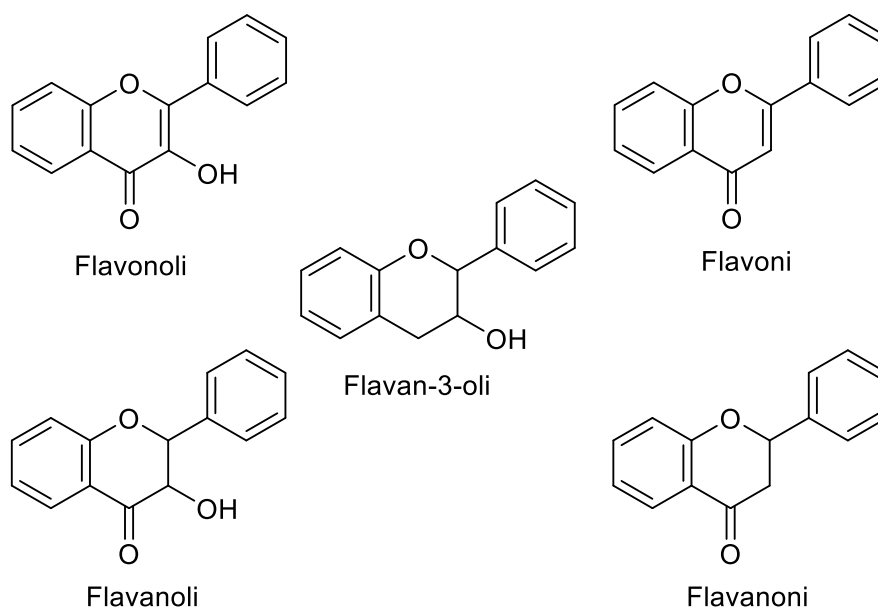
Kemiallisesti flavonoidit ovat monipuolinen luokka erilaisia polyfenolisia yhdisteitä. Fenoliset yhdisteet voi tunnistaa bentseenirenkaasta, johon on liittynyt yksi tai useampi hydroksyyliiryhmä. Flavonoidien perusrakenne muodostuu  $C_6C_3C_6$ -rungosta, joka on esitetty alla kuvassa 1 (Górniak et al., 2019). Flavonoidit voidaan jakaa useampaan eri alaluokkaan niiden rungon erojen perusteella.



Kuva 1: Flavonoidien perusrunko

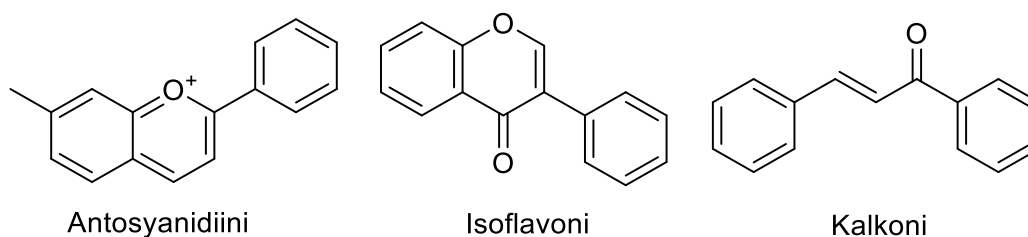
Flavonoidien eri alaluokkien väliset erot ilmenevät pääasiassa niiden heterosyklisessä C-renkaassa. Merkittävimmät rakenteelliset erot liittyvät kyseisen renkaan 3-hiilen hydroksyyliiryhmään sekä 2- ja 3-hiilten välissä olevaan kaksoissidokseen. Näiden läsnäolo vaihtelee alaluokkien välillä, ja erojen perusteella flavonoidit voidaan jakaa viiteen tyypillisimpään alaluokkaan: flavonoleihin, flavoneihin, flavan-3-oleihin, flavanoleihin ja flavanoneihin. Edellä esitettyjen erojen lisäksi flavan-3-oleista puuttuu happi, joka on muissa

ryhmissä liittynyt C-renkaaseen kaksoissidoksella. Eri alaluokat on esitetty kuvassa 2 (Panche et al., 2016; Singh et al., 2014).



Kuva 2: Tärkeimpien flavonoidien rakenteet

Yllä esitettyjen flavonoidialaluokkien lisäksi on olemassa fenolisten yhdisteiden alaluokkia, joiden runko eroaa jollain tavalla flavonoidien perusrungosta, mutta joita käsitellään kuitenkin usein flavonoidien yhteydessä. Näitä ovat muun muassa antosyanidiinit, isoflavonit ja kalkonit. Näiden perusrakenteet on esitetty alla kuvassa 3 (Panche et al., 2016).

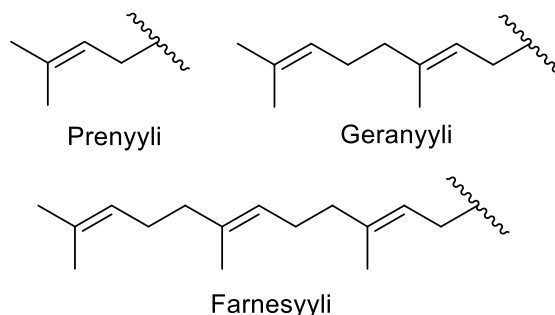


Kuva 3: Antosyanidiinin, isoflavonin ja kalkonin rakenne



### 3 Prenyloidut flavonoidit

Prenyloidut flavonoidit ovat nimensä mukaisesti johdannaisia flavonoideista. Ne koostuvat flavonoidirungosta, kuten luvussa 2 esitettiin, ja prenyylisivuketjusta. Kyseinen prenyylisivuketju voi olla esimerkiksi prenyyli, geranyyli tai farnesyyli (Wang et al., 2001). Kyseiset rakenteet on esitetty alla kuvassa 4. Näissä voi esiintyä myös erilaisia modifikaatioita, kuten hydroksylaatiota, syklistaatiota ja oksidaatiota (Shi et al., 2021).



Kuva 4: Prenyylisivuketjujen rakenteet

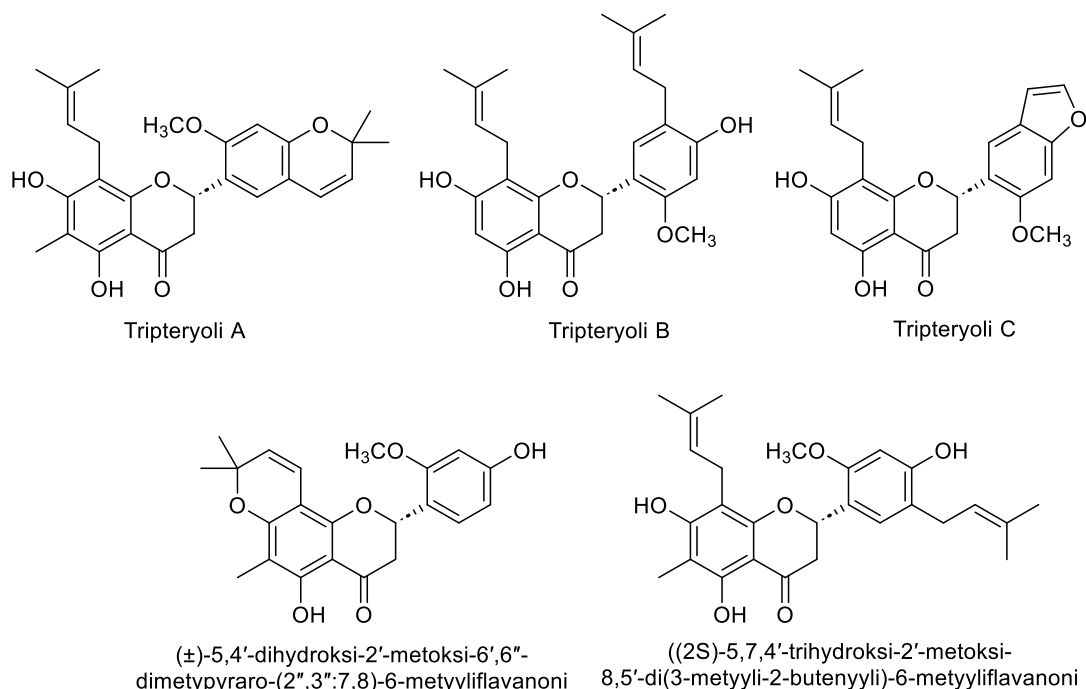
Kuten flavonoidien yleisesti, myös prenyloitujen flavonoidien on todettu toimivan kasveissa suojajyhdisteinä mikrobeja vastaan. Niillä on monia bioaktiivisuuksia, kuten suuri antimikrobiaalinen potentiaali, jonka takia niitä voidaan hyödyntää lääkekemiassa lääkeaineina (Shi et al., 2021; Xu et al., 2012). Tämän myötä kiinnostus prenyloitujen flavonoidien hyödyntämisestä lääketieteessä mikrobeja vastaan on tullut ajankohtaiseksi aiheeksi luonnonyhdisteiden tutkimuksessa lääkekehityksen alalla.

Prenyloituja flavonoideja on kuitenkin vain rajallisesti kasveissa (Yang et al., 2015). Tutkimuskäyttöä varten näitä on hyvä osata syntetisoida yhdisteistä, joita on helposti saatavilla. Kasveista eristämisen lisäksi prenyloituja flavonoideja voidaankin valmistaa kokonaan synteettisesti oikeista lähtöaineista liittämällä prenyylisivuketju flavonoidirunkoon tai semi-synteettisesti eristämällä kasveista biosynteesin välivaihe ja jatkamalla tämän muokkaamista. Rakennetta voidaan muokata edelleen erilaisilla modifikaatioilla pyrkimyksenä parantaa haluttuja ominaisuuksia entisestään. (Shi et al., 2021) Seuraavissa luvuissa on käsitelty tarkemmin niin flavonoidien synteesiä ja kemiallista muokkausta kuin myös yleisesti näitä yhdisteitä sekä yhdisteiden antimikrobiaktiivisuutta.

### 3.1 Prenyloidut flavonoidit luonnossa

Prenylaatiota on havaittu lähes kaikilla flavonoideilla, yleisimmin flavoneilla (Barron & Ibrahim, 1996). Prenyloitujen flavonoidien esiintyvyys luonnossa on kuitenkin huomattavasti pienempi verrattuna flavonoideihin. Toistaiseksi on tunnistettu noin 1000 eri prenyloitua flavonoidia 37 kasvisuvusta (Yang et al., 2015). Näitä löytyy pääasiassa Moraceae-heimojen kasveista, mutta myös esimerkiksi Fabaceae-, Celastraceae- ja Umbelliferae-heimojen kasveista (Botta, Vitali, et al., 2005; Shi et al., 2021).

Hyvä esimerkki luonnon prenyloiduista flavonoideista on siipiköynnöskasvien sukuun kuuluvasta *Tripterygium wilfordii* -kasvista löytyvät yhdisteet. Chen et al. eristivät tutkimuksessaan kyseisestä lajista 5 yhdistettä, joiden he havaitsivat tehoavan hyvin eri bakteereja vastaan. Näiden rakenteet on esitetty kuvassa 5. Näiden aktiivisuutta tutkittiin muun muassa *C. neoformans*ia, MRSA:ta ja *S. aureusta* vastaan. Tutkimuksessa selvisi, että erityisesti tripteryoli A ja (2S)-5,7,4'-trihydroksi-2'-metoksi-8,5'-di(3-metyyli-2-butenyyli)-6-metyyli-flavanoni toimivat tehokkaasti *C. neoformans*ia vastaan, kun taas erityisesti (±)-5,4'-dihydroksi-2'-metoksi-6',6''-dimetyypyraro-(2'',3'';7,8)-6-metyyliflavanoni tehoi MRSA:han ja *S. aureukseen* (Chen et al., 2017; Shi et al., 2021).

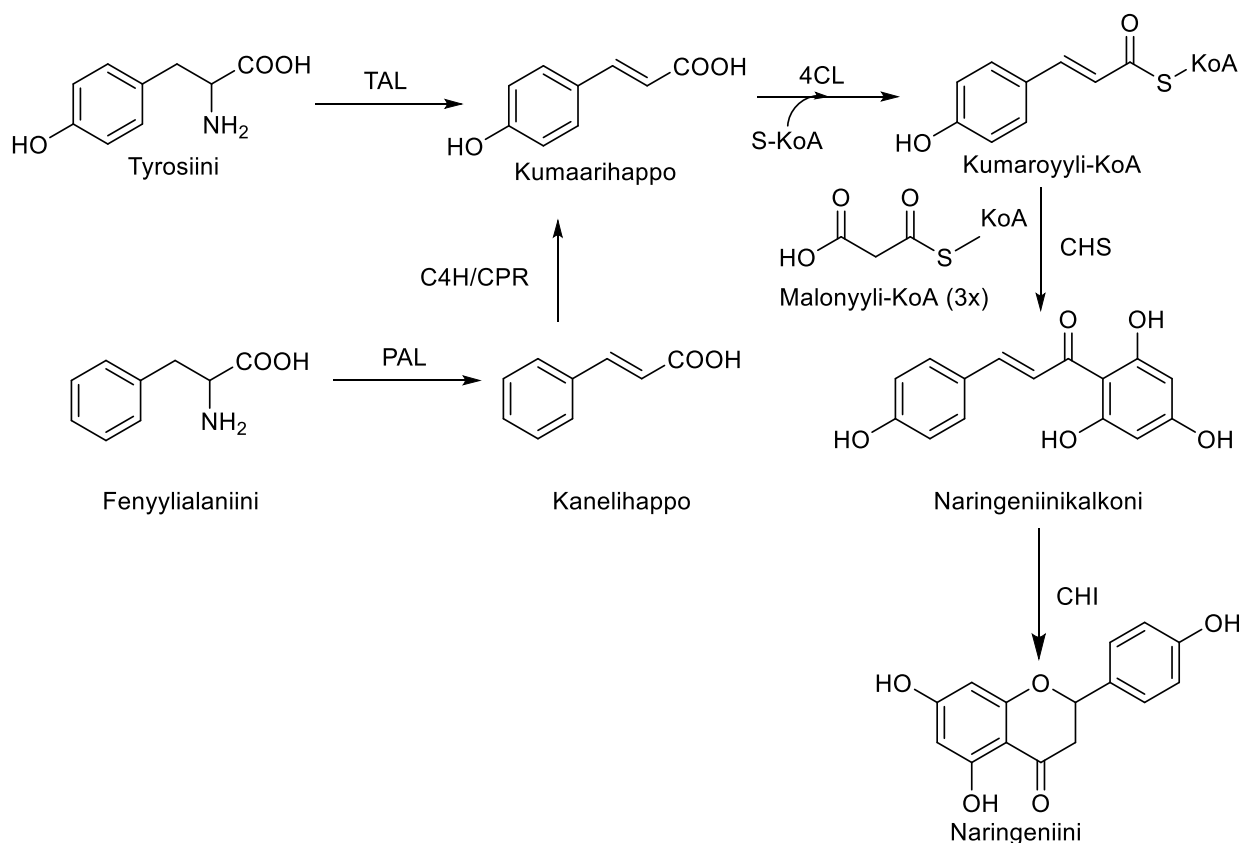


Kuva 5: *Tripterygium wilfordii*-lajista löytyviä prenyloituja flavonoideja

### 3.2 Prenyloitujen flavonoidien biosynteesi

Kasveissa prenyloitujen flavonoidien biosynteesi tapahtuu yksinkertaisuudessaan lisäämällä flavonoidirunkoon dimetyyliallyylipyrofosfaatti eli DMAPP (Shi et al., 2021). Kyseinen runko voi olla mikä tahansa luvun 2 kuvassa 2 esitetyistä flavonoidirungoista. Kyseistä reaktiota katalysoivat useat erilaiset prenyylitransferaasit, jotka ovat stereo- ja aluespesifisyyttä sääteleviä entsyymejä (Gomes et al., 2022). Nämä aiheuttavat prenyloitujen flavonoidien monimuotoisuuden.

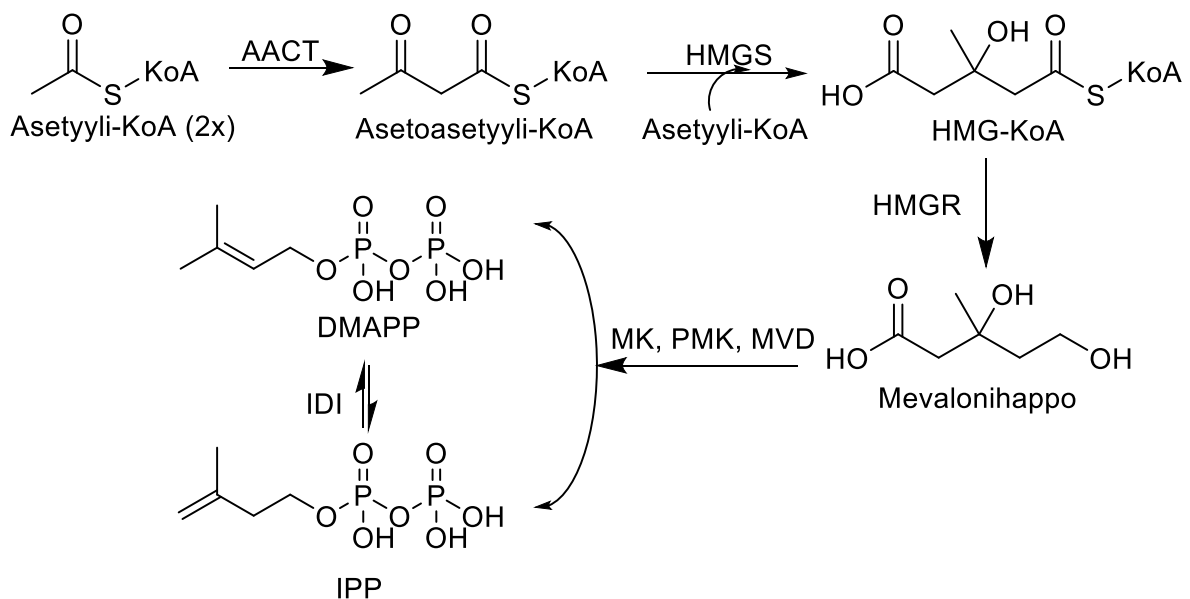
Flavonoidien biosynteesin lähtöaineena on joko L-fenyylialaniini tai L-tyrosiini. Näistä muodostuu eri katalyytteinä toimivien entsyymien avulla kumaroyyli-KoA, joka reagoi kolmen malonyyli-KoA:n kanssa muodostaen naringeniinikalkonin. Kalkoni-flavanoni-isomeraasi aiheuttaa yhdisteen isomerisaation, jolloin muodostuu flavonoidien perusrunko. Kyseinen biosynteesireitti on esitetty kaaviossa 1 (Gomes et al., 2022; Levisson et al., 2019).



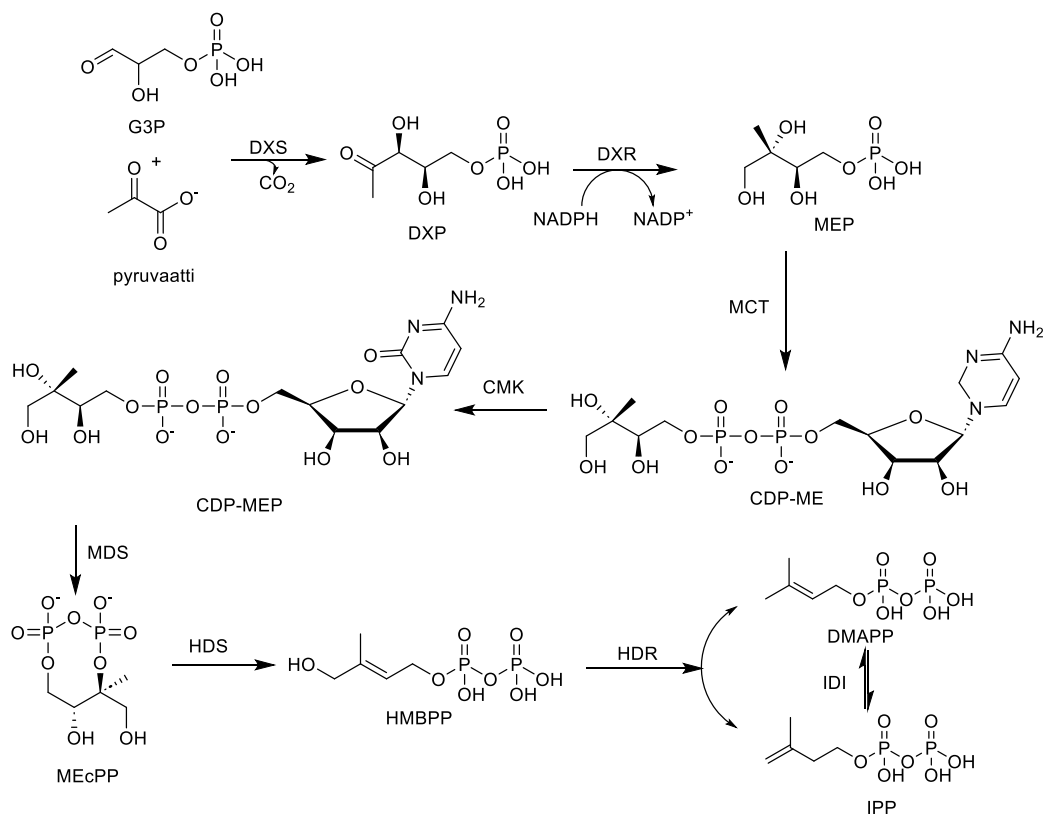
Kaavio 1: Flavonoidien biosynteesi. Biosynteesireitillä esiintyvät entsyymit: tyrosiiniammoniakkilyaasi (TAL), fenyylialaniiniammoniakkilyaasi (PAL), kinnamaatti-4-hydroksylaasi (C4H), sytokromi-P450-reduktaasi (CPR), 4-kumaraatti-KoA-ligaasi (4CL), kalkonisyntaasi (CHS) ja kalkoni-isomeraasi (CHI)

Prenyylisivuketjut muodostuvat puolestaan mevalonihappo- tai metyylierytriolifosfaattireittiä pitkin. Nämä on esitetty kaavioissa 2 ja 3. Mevalonihapporeitti alkaa asetyyli-KoA:sta, kun taas metyylierytriolifosfaattireitti alkaa puryvaatin ja glyseraldehydifosfaatin kondensaatioreaktiosta. Kummassakin reaktioreitissä muodostuu entsyymien avulla isopentenyylipyrofosfaattia IPP, joka isomerisoituu DMAPP:ksi. DMAPP voi puolestaan reagoida edelleen muodostaen geranyylipyrofosfaatin GPP tai farnesylipyrofosfaatin FPP (Gomes et al., 2022; Levisson et al., 2019).

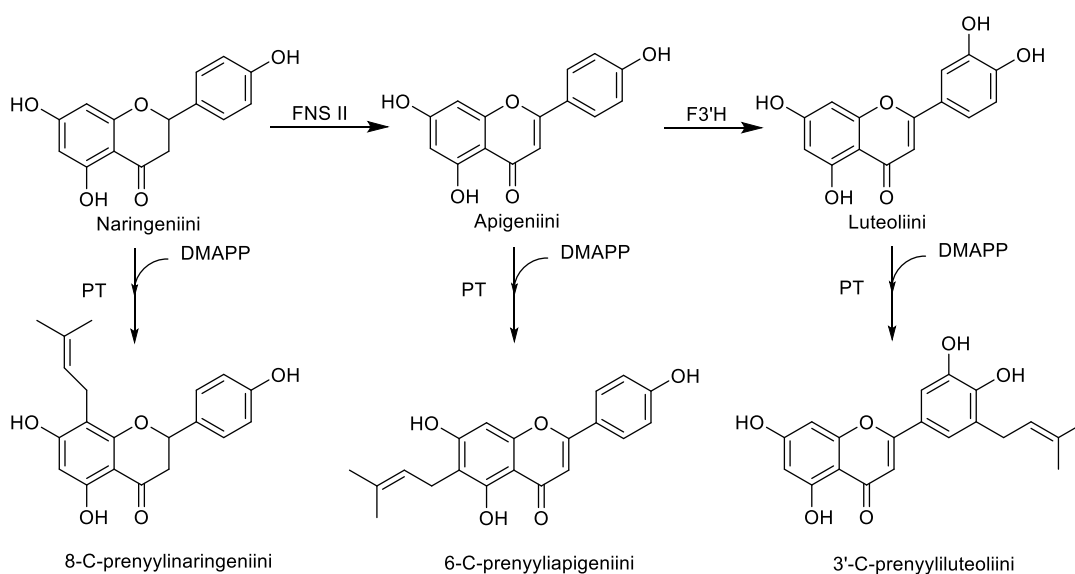
Kasveissa tapahtuvan biosynteesin viimeisessä vaiheessa tapahtuu kondensaatioreaktio prenyylisivuketjun luovuttajan ja flavonoidirungon välillä. Prenyylisivuketjun luovuttajana toimii DMAPP, GPP tai FPP. Reaktioita katalysoi prenyylitransferaasi. Kasveissa on useita eri transferaasientsyymejä, jotka ovat usein spesifejä tietylle flavonoidille ja liittävät sivuketjun tiettyyn kohtaan rungossa. Reaktiossa muodostuu prenyloituja flavonoideja. Muutamia esimerkkireaktioita on esitetty kaaviossa 4 (Botta, Monache, et al., 2005; Gomes et al., 2022).



Kaavio 2: DMAPP:n biosynteesi mevalonihapporeittiä pitkin. Biosynteesireitillä esiintyvät entsyymit: asetyyli-KoA-asetyyliitransferaasi (AACT), 3-hydroksi-3-metyyliglutaryyli-KoA-syntaasi (HMGS), 3-hydroksi-3-metyyliglutaryyli-KoA-reduktaasi (HMGR), mevalonaattikinaasi (MK), fosfomevalonaattikinaasi (PMK), difosfomevalonaattidekarboksylaasi (MVD) ja IPP-isomeraasi (IDI)



Kaavio 3: DMAPP:n biosynteesi metyylierytritolfosfaattireittiä pitkin. Biosynteesireitillä esiintyvät entsyymit: 1-deoksi-D-ksyluloosi-5-fosfaattisyntaasi (DXS), 1-deoksi-D-ksyluloosi-5-fosfaattireduktoisomeraasi (DXR), 2-C-metyyli-D-erytritoli-4-fosfaattisitidyyli-transferaasi (MCT), 4-difosfaatitidyyli-2-C-metyyli-D-erytritoli-kinaasi (CMK), 2-C-metyyli-D-erytritoli-2,4-syklofosfaattisyntaasi (MDS), 4-hydroksi-3-metyyli-but-2-enyyli-difosfaattisyntaasi (HDS), 4-hydroksi-3-metyyli-but-2-enyyli-difosfaattireduktaasi (HDR) ja IPP-isomeraasi (IDI)



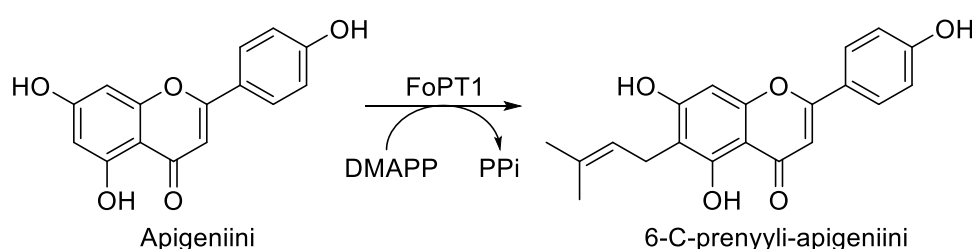
Kaavio 4: Kolmen eri prenyloidun flavonoidin biosynteesi naringeniinista. Reaktioissa esiintyvät entsyymit: flavonisyntaasi II (FNS II), flavanoni-3-hydroksylaasi (F3'H) ja prenyylitransferaasi (PT). Prenyylitransferaasit ovat reaktioille spesifisiä.

### 3.3 Synteettisesti prenyloidut flavonoidit

Kuten aiemmin on jo todettu, tutkimuskäyttöä varten prenyloituja flavonoideja voi olla tarvetta syntetisoida. Tässä voidaan hyödyntää esimerkiksi luonnosta saatavia prenyylitransferaaseja tai kemiallisia katalyyttejä. Kemiallisia katalyyttejä hyödynnettäessä reaktiovaiheita on kuitenkin usein enemmän ja prosessissa tarvitaan erilaisia suojajhdisteitä ei-toivottujen reaktioiden estämiseksi. Toisaalta myös prenyloitua flavonoidia voi olla tarvetta muokata edelleen paremman antimikrobiaktiivisuuden saavuttamiseksi. Seuraavissa luvuissa käsitellään prenyylisivuketjun liittämistä kemiallisesti flavonoidirunkoon sekä rakenteen edelleenmuokkausta erilaisilla modifikaatioilla.

#### 3.3.1 Flavonoidien prenylointi kemiallisesti

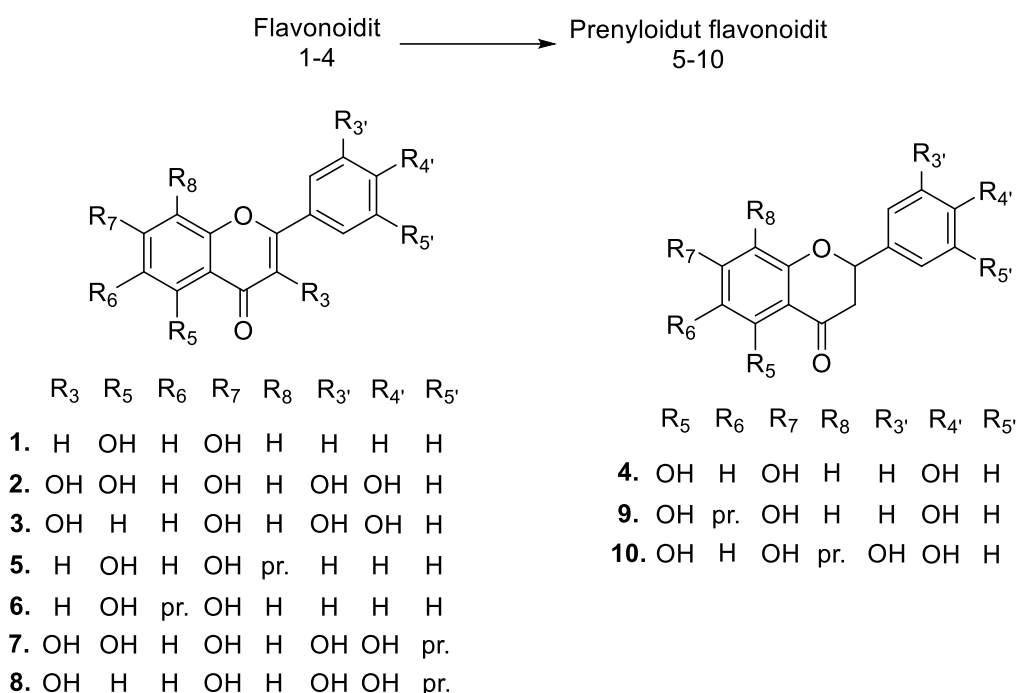
Prenyylisivuketjun liittäminen flavonoidirunkoon vastaa yksinkertaisimmillaan kasveissa tapahtuvan biosynteesireitin viimeistä vaihetta, jossa prenyylisivuketjun luovuttaja reagoi flavonoidin kanssa kondensaatioreaktiossa. Kyseisessä reaktiossa voidaan hyödyntää aluespesifistä prenyylitransferaasientsyymiä. Tästä esimerkki on kaaviossa 5 esitetty apigeniinin reaktio DMAPP:n kanssa. Yang et al. olivat tutkimuksessaan kloonanneet *Fusarium oxysporum* -sienestä hyvin aluespesifisen FoPT1-prenyylitransferaasientsyymän ja tutkivat tämän toimivuutta katalyyttinä 7 eri flavonoidin kanssa. Näistä vain apigeniinin reaktiosta saatiin tuotetta, joka oli 6-C-prenyyli-apigeniini (Yang et al., 2016).



Kaavio 5: Apigeniinin ja DMAPP:n välinen kondensaatioreaktio

Entsyymien kloonauksia varten aluksi sienikantaa viljeltiin ja tästä kerättiin rihmastoa totaali-RNA:n uuttoa varten. Tässä hyödynnettiin valmista uuttosarjaa ja saadun cDNA:n avulla selvitettiin FoPT1:tä koodaavan geenin sekvenssi. Sekvenssi optimoitiin kloonauksia varten. Kloonauksia tehtiin *E. coli*ssa hyödyntäen valmista vektoria. *E. coli* kasvatettiin ja solut kerättiin sentrifugoimalla. Solut hajotettiin lyysipuskurissa, lyaatti suodatettiin ja kohdeproteiinit puhdistettiin siitä usealla eri pesupuskurilla (Yang et al., 2016).

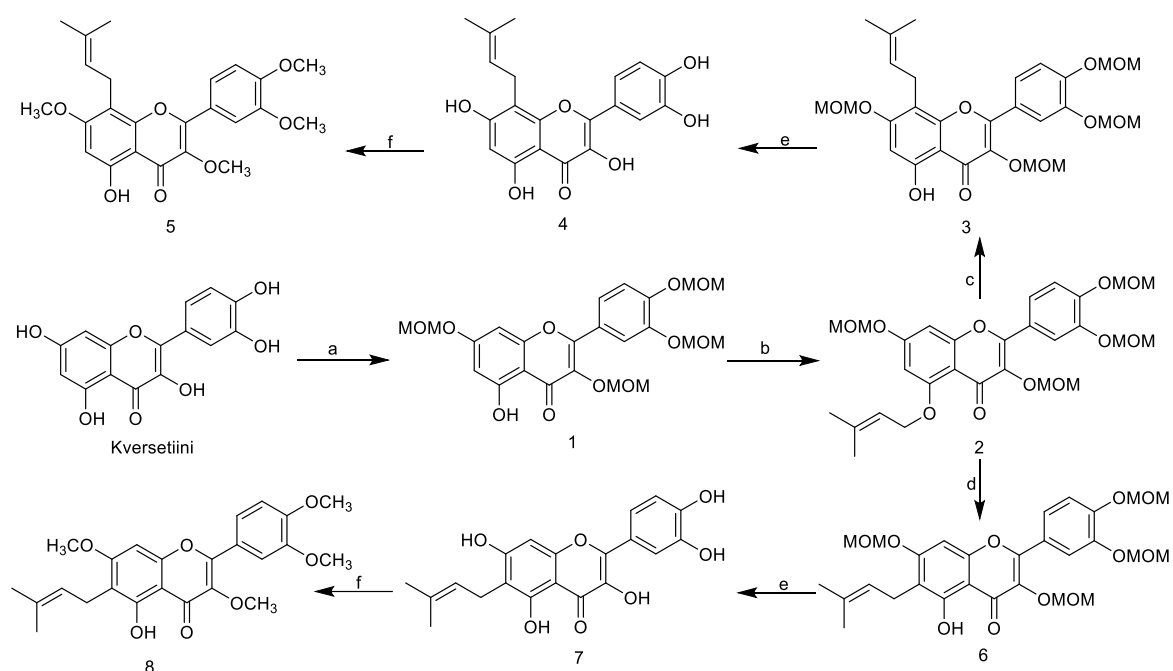
Spesifisten prenyylitransferaasientsyymien käytön lisäksi prenyloituja flavonoideja voidaan valmistaa myös puhtaasti kemiallisesti. Tällöin entsyymien sijasta käytetään kemiallisia katalyyttejä. Osorio et al. olivat tutkimuksessaan syntetisoineet erilaisia prenyloituja flavonoideja yksivaiheisella aromaattisella elektrofiilisellä substituutioreaktiolla. Kyseinen reaktiokaavio on esitetty kaaviossa 6. Reaktion lähtöaineena käytettiin kaupallisesti saatavia flavonoideja sekä 2-metyyli-2-buten-1-olia. Katalyyttinä oli puolestaan  $ZnCl_2$ . Reaktioiden saannot olivat kuitenkin suhteellisen pieniä, vain noin 23–36 %, ja pääasiassa reaktiossa syntyikin erilaisia sivutuotteita päätuotteen sijasta (Osorio et al., 2021).



Kaavio 6: Flavonoidien yksivaiheinen prenylointireaktio kemiallisia katalyyttejä hyödyntämällä. Lyhenne pr. taulukoissa viittaa prenyylisivuketjuun. Reaktio-olosuhteet ja reagenssit: 3-metyyli-2-buten-1-oli,  $ZnCl_2/AcOEt$ , refluksointi 40°C:ssa 4 h;

Joissain tapauksissa kemiallisia katalyyttejä käytettäessä tarvitaan suojaryhmiä eihaluttujen sivureaktioiden estämiseksi ja spesifisyyden lisäämiseksi. Tällöin tarvitaan myös useampia reaktiovaiheita tietyn tuloksen aikaansaamiseksi. Tästä esimerkki on kversetiinin prenylointireaktio, joka on esitetty kaaviossa 7. Kyseisessä reaktiossa suojaryhmänä on käytetty metyyylimetyylieetteriä. Li et al. olivat tutkimuksessaan valmistaneet C-prenyloituja flavonoideja intramolekulaarisilla [1,3]- ja [1,5]-siirtymäreaktioilla (engl. intramolecular [1,3] and [1,5] shift reaction) 5-O-prenyyliflavonoideista. Katalyyttinä 6-C-prenyyliflavonoidien

synteesissä oli florisiili ja 8-C-prenyyliflavonoidien synteesissä montmorilloniitti K10. Vastaavat reaktiot tehtiin tutkimuksessa myös diosmetiinille ja luteoliinille (W. Li et al., 2019).



Kaavio 7: Kversetiinin monivaiheinen prenylointireaktio kemiallisia katalyyttejä hyödyntämällä. Suojaryhmänä on käytetty metyylimetyylieetteriä MOM. Reaktio-olosuhteet ja reagenssit: (a)  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{Cl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , asetoni, sekoitus huoneenlämpötilassa 4–6 h; (b) prenyylibromidi,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , asetoni, sekoitus  $45^\circ\text{C}$ :ssa 4 h; (c) florisiili, tolueeni, refluksointi 4 h; (d) montmorilloniitti K10, tolueeni, refluksointi 4 h; (e) laimennettu  $\text{HCl}$  (aq.),  $\text{CH}_3\text{OH}$ , sekoitus huoneenlämpötilassa 4 h; (f)  $(\text{Me})_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , asetoni, sekoitus huoneenlämpötilassa 6 h.

Kversetiinin prenylointireaktion ensimmäisessä vaiheessa hydroksyyliyhdytys suojattiin haluttua 5-aseman hydroksyyliyhdytystä lukuun ottamatta kloorimetyylimetyylieetterin avulla. Suojaryhmänä käytetyn metyylimetyylikloridin hyvä puoli on sen pysyvyys perusolosuhteissa ja lisäksi se on helposti poistettavissa yhdisteestä happokäsittelyllä. Seuraavassa reaktiovaiheessa vapaaksi jäänyt 5-hydroksyyliyhdytys prenyloitiin prenyylibromidin avulla (W. Li et al., 2019).

Kaavion 7 yhdisteestä 2 synteesi jatkuu kahteen suuntaan 8- ja 6-C-prenyloituihin yhdisteisiin. Aiemmassa tutkimuksessaan Li et al. olivat saaneet syntetisoitua 8-C-prenyloituja flavonoideja mikroaaltoavusteisella Claisen-toisiintumisreaktiolla (engl. microwave-assisted Claisen rearrangement reaction) (Nguyen et al., 2015). Kyseisen reaktion saanto oli hyvä, mutta sillä ei saatu valmistettua 6-C-prenyloituja flavonoideja. Tämän myötä tutkimuksessa hyödynnettiin happamalla savella (engl. acidic clay) katalysoituja intramolekulaarisia [1,3]- ja



[1,5]-siirtymäreaktioita. Katalyyttinä 6-*C*-prenyyliflavonoidien synteesissä oli florisiili ja 8-*C*-prenyyliflavonoidien synteesissä montmorilloniitti K10 (W. Li et al., 2019).

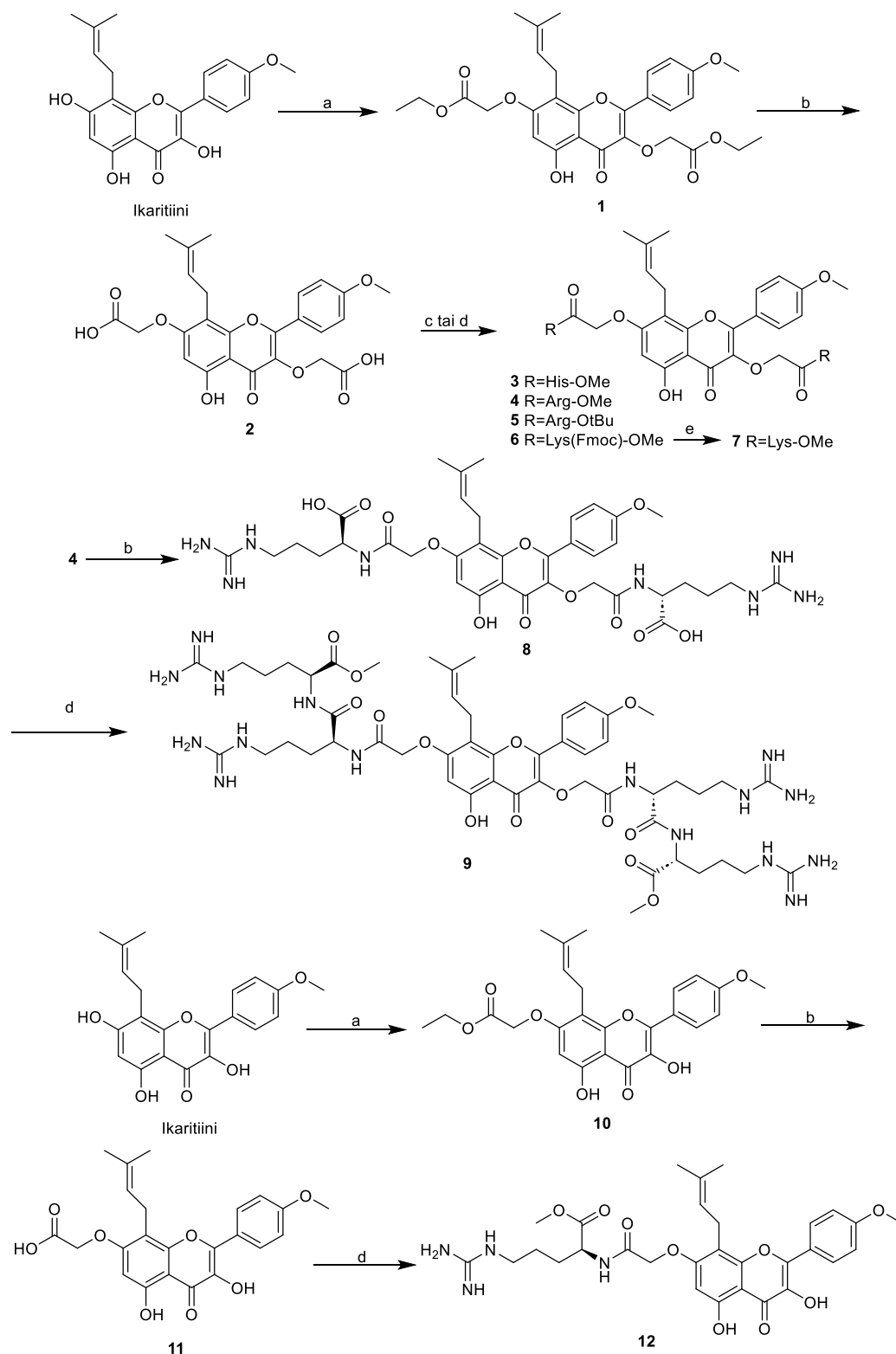
Intramolekulaarisen reaktion jälkeen suojayhdisteet poistettiin happokäsittelyllä. Happona tutkimuksessa oli käytetty laimennettua vetykloridia HCl. Reaktion tuloksena saatiin 8-*C*-prenyyliversetiini ja 6-*C*-prenyyliversetiini. Näitä muokattiin edelleen dimetyylisulfaattilla, jonka myötä hydroksyyliiryhmiin saatiin liitettyä metyyliiryhmät (W. Li et al., 2019).

Kuten aiemmin jo todettu prenylaatio lisää yhdisteen bioaktiivisuutta ja tutkimuksen reaktiotuotteilla on havaittu olevan korkeampi bioaktiivinen potentiaali kversetiiniin verrattuna. Esimerkiksi 8-*C*-prenyyliversetiini voi estää Gram-negatiivisten bakteerien soluseinästä löytyvän lipopolysakkaridin aiheuttamaa tulehdusta (Hisanaga et al., 2016; W. Li et al., 2019). Luonnosta 8-*C*-prenyyliversetiiniä on eristetty esimerkiksi aiemmin mainitun *Fabaceae*-heimon *Ohwia caudata* -lajista (aiemmin *Desmodium caudatum*) (W. Li et al., 2019).

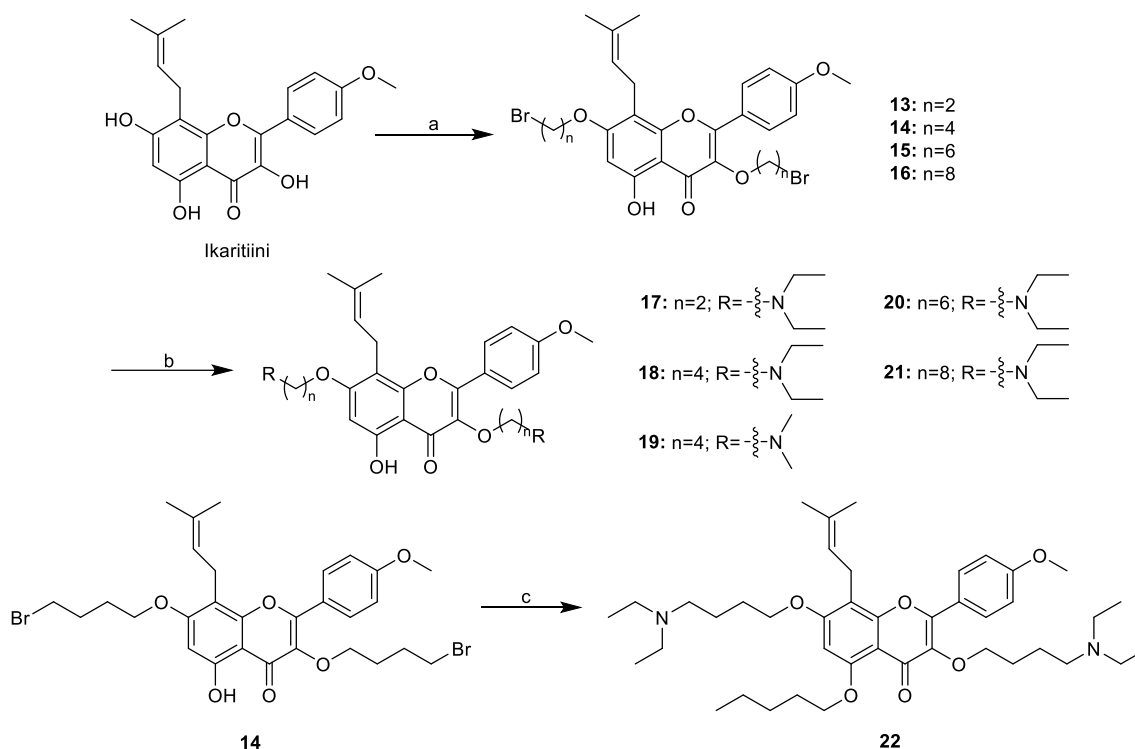
### 3.3.2 Prenyloitujen flavonoidien kemiallinen muokkaaminen

Vastaavasti kuin flavonoideja, myös prenyloituja flavonoideja voidaan muokata kemiallisesti. Siinä missä prenylointi lisäsi yhdisteen lipofiilisyyttä ja täten antimikrobiaktiivisuutta, kemiallisen muokkauksen tavoitteena on parantaa antimikrobiaktiivisuutta sähköstaattisten vuorovaikutusten avulla (Shi et al., 2021). Lipofiilisyyden kasvaminen nimittäin heikentää antimikrobiaktiivisuutta, kun se kasvaa liian suureksi. Mikrobin solukalvo sisältää negatiivisesti varattuja proteiineja. Tämän myötä antimikrobisten yhdisteiden antimikrobiaktiivisuutta voidaan parantaa lisäämällä yhdisteen affiniteettia positiivisesti varautuneilla ryhmillä.

Tällaisesta prenyloitujen flavonoidien muokkaamisesta hyvä esimerkki on ikaritiini ja sen johdannaiset. Ikaritiini on luonnollinen prenyloitu flavonoidi ja sitä on saatu eristettyä *Epimedium*- eli varjohiippa-suvun kasveista (Lin et al., 2017). Sen on todettu tehoavan esimerkiksi MRSA:ta vastaan ja onkin loistava luonnollinen pohjarakenne kemiallisille modifikaatioille, joilla voidaan parantaa yhdisteen biologisia aktiivisuuksia (Shi et al., 2021). Lin et al. olivat tutkimuksessaan hyödyntäneet biojäljittelystrategiaa (engl. biomimicking strategy) potentiaalisten ikaritiinipohjaisten solukalvoon kohdistettujen antimikrobiaalien suunnittelussa. Tutkimuksen tavoitteena oli jäljitellä antimikrobisia peptidejä eli AMP:itä ja valmistaa semisynteettisiä flavoniamfiifejä. Kaavioissa 8 ja 9 on esitetty reaktiot, joilla ikaritiinia oli muokattu kyseisessä tutkimuksessa.



Kaavio 8: Aminohapoilla muokattujen ikaritiinijohdannaisten synteesi. Reaktio-olosuhteet ja reagenssit: (a) Etyyliodiasetaatti,  $K_2CO_3$ , asetoni, refluksointi 12 h; (b) LiOH, THF,  $H_2O$ , huoneenlämpötilä, 1,5 h; (c) Tuotetta vastaava aminohappo, DIC, HOBt, vedetön DMF, huoneenlämpötilä, yön yli. His = histidiini, Arg = arginiini, Lys = lysiini; (d) Tuotetta vastaava aminohappo, HATU, DIPEA, vedetön DMF, huoneenlämpötilä, yön yli; (e) piperidiini, DMF, huoneenlämpötilä, 20 min;



Kaavio 9: Alifaattisilla amiineilla muokattujen ikaritiinijohdannaisten synteesi. Reaktio-olosuhteet ja reagenssit: (a)  $\alpha,\omega$ -dibromialkaanit,  $K_2CO_3$ , asetoni, refluksointi, 12 tuntia; (b) dietyyliamiini tai dimetyyliamiini, DMSO, huoneenlämpötila, 4 tuntia; (c) 1-jodipentaani,  $Cs_2CO_3$ , asetoni, refluksointi, 12 tuntia, tämän jälkeen dietyyliamiini, DMSO, huoneenlämpötila, 4 tuntia.

Kaavion 8 reaktioissa ikaritiiniin on lisätty positiivisia ryhmiä sisältäviä aminohappoja, kuten histidiini, arginiini ja lysiini. Positiivisen varauksensa ansiosta nämä voivat vuorovaikuttaa solukalvon negatiivisesti varautuneiden proteiinien kanssa. Puolestaan kaavion 9 reaktioissa ikaritiiniin on lisätty alifaattisia amiineja. Yhdisteiden antibakteerisia ominaisuuksia testattiin *S. aureusta*, MRSA:ta ja *Bacillus cereusta* vastaan mikrodiluutiometodeilla. Tulosten perusteella suurin osa johdannaisista oli aktiivisempia testattuja bakteereita vastaan ikaritiiniin verrattuna (Shi et al., 2021). Yhdisteissä antimikrobiaktiivisuuden parantuminen perustuu samaan ominaisuuteen kuin positiivisia ryhmiä sisältävillä aminohapoilla. Alifaattisten amiinien tyypeen voi nimittäin liittyä neljäs ryhmä, jonka myötä ryhmä saa positiivisen varauksen (Lin et al., 2017).

Lin et al. selvittivät tutkimuksessaan yhdisteiden MIC-arvot sekä hemolyyttisen aktiivisuuden nisäkäs soluja vastaan. MIC-arvot (Minimum Inhibitory Concentration) viittavat pienimpään lääkepitoisuuteen, jolla bakteerin kasvu saadaan estettyä laboratorio-olosuhteissa. Mitä pienempi MIC-arvo, sitä tehokkaampi lääke (Nazeri & Ghaiour, 2019). Puolestaan hemolyyttisellä aktiivisuudella viitataan punasolujen hajottamiseen. Tätä mitataan  $HC_{50}$ -arvolla, joka kuvaa sitä konsentraatiota, jossa puolet punasoluista hajoaa. Hemolyyttisen

aktiivisuuden avulla voidaan arvioida yhdisteiden sytotoksisuutta nisäkässoluja vastaan. Mitä suurempi  $HC_{50}$ -arvo on, sitä turvallisempi yhdiste on elimistölle.

Kaavion 8 yhdisteet 3–5 ja 7 sisälsivät kationisen ryhmän ja täten positiivisen varauksen sivuketjussaan. Näistä yhdiste 3 oli inaktiivinen testattuja Gram-positiivisia bakteereja vastaan, kun taas yhdisteiden 4, 5 ja 7 MIC-arvot parantuivat huomattavasti verrattuna ikaritiiniin. Yhdiste 3 sisälsi aminoryhmän, jolla oli matala  $pK_a$ -arvo, kun taas muiden yhdisteiden aminohapoilla oli korkea  $pK_a$ -arvo. Täten aminoryhmän  $pK_a$ -arvolla on merkitystä antimikrobiaktiivisuuden parantumisessa. Ikaritiinin MIC-arvo oli 50  $\mu\text{g/ml}$ , kun taas yhdisteellä 4 oli 1,56–3,13  $\mu\text{g/ml}$ , yhdisteellä 5 3,13–6,25  $\mu\text{g/ml}$  ja yhdisteellä 7 25  $\mu\text{g/ml}$ . Näistä yhdisteellä 4 oli lisäksi hyvin matala  $HC_{50}$ -arvo ( $HC_{50} > 1600 \mu\text{g/ml}$ ) verrattuna ikaritiiniin ja yhdisteisiin 5 ja 7. Yhdisteessä 5 hemolyyttisen aktiivisuuden kasvu luultavimmin johtui kasvaneesta hydrofobisuudesta yhdisteeseen 4 verrattuna. Kationisen ryhmän sisältävistä yhdisteistä yhdiste 4 vaikutti siis toimivan parhaiten (Lin et al., 2017).

Lin et al pyrkivät tutkimuksessaan selvittämään myös, miten yhdisteen kokonaisvaraus vaikuttaa yhdisteen antimikrobiaktiivisuuteen. Tätä varten syntetisoitiin yhdisteet 9 ja 12, joiden varaukset olivat +4 ja +1, joiden ominaisuuksia verrattiin yhdisteeseen 4 (varaus +2). Tutkimuksen perusteella kummankin yhdisteen ominaisuudet parantuivat ikaritiiniin verrattuna, mutta niiden MIC-arvot olivat huonompia yhdisteeseen 4 verrattuna. Varauksen ja hydrofobisuuden suhteella on täten vaikutusta antimikrobiaktiivisuuteen (Lin et al., 2017).

Alifaattisten amiinien tapauksessa yhdisteillä 18 ja 19 MIC-arvo parantui 6,25–25  $\mu\text{g/ml}$ :aan, joka johtui luultavimmin yhtä lailla korkean  $pK_a$ -arvon omaavista kationisista ryhmistä. Sivuketjun pituuden vaikutuksen tutkimista varten Lin et al syntetisoivat yhdisteet 17, 18, 20 ja 21. Näille tehtyjen kokeiden perusteella yhdiste 20 ( $n=6$ ) omasi paremman antimikrobiaktiivisuuden (MIC=3,13–12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) yhdisteeseen 18 ( $n=4$ ) verrattuna. Puolestaan yhdisteillä 17 ( $n=2$ ) ja 21 ( $n=8$ ) MIC-arvot olivat suurempia kuin 50  $\mu\text{g/ml}$ . Yhtä lailla yhdisteellä 22, joka sisälsi yhden ylimääräisen lipidiketjun, MIC-arvo oli huonompi. Tämän perusteella liian suuri hydrofobisuus huonontaa antimikrobiaktiivisuutta. Yhdisteiden  $HC_{50}$ -arvot olivat puolestaan melko matalia, mutta vaikuttivat kasvavan hydrofobisuuden lisääntyessä (Lin et al., 2017).

Koko tutkimuksen perusteella yhdiste 4 vaikutti potentiaalisimmalta lääkeresistenttejä Gram-positiivisia bakteereja vastaan ja sen aktiivisuus oli verrattavissa vankomysiinin aktiivisuuteen. Lisäksi sillä oli hyvin matala hemolyyttinen aktiivisuus ja sytotoksisuus nisäkässoluja vastaan (Shi et al., 2021).

## 4 Flavonoidien antimikrobiaktiivisuus

Flavonoidien prenyloinnilla ja prenyloitujen flavonoidien muokkauksella on tarkoitus parantaa yhdisteen antimikrobiaktiivisuutta. Prenyloidut flavonoidit ovatkin bioaktiivisempia runkorakenteeseensa verrattuna. Parannukset ominaisuuksissa perustuvat prenyylisivuketjun poolittomuuteen. Pooliton sivuketju lisää koko yhdisteen lipofiilisyyttä eli liukoisuutta poolittomiin liuottimiin, kuten rasvoihin. Lipofiilisyyden kasvun myötä yhdiste pystyy vuorovaikuttamaan paremmin kohdeproteiinien ja solukalvon kanssa (Yang et al., 2015).

C-prenylaatio vaikuttaisi olevankin tärkeä osa prenyloitujen flavonoidien biologista aktiivisuutta. Lipofiilisyyden lisääminen membraanin permeabiliteettiä eli sitä, kuinka hyvin yhdiste pystyy läpäisemään mikrobin solukalvon. Solukalvon läpäisykyky puolestaan johtaa parantuneeseen solukalvon kohdentamiseen ja lisää täten solunsisäistä aktiivisuutta. Solunsisäisen aktiivisuuden myötä yhdiste pystyy vuorovaikuttamaan paremmin solun sisällä olevien proteiinien ja reseptorien kanssa (Osorio et al., 2021).

Toisaalta prenyylisivuketjujen ja muiden substituenttien asemilla vaikuttaisi olevan merkitystä bakteerien kasvun inhibiitioaktiivisuuteen. Osorio et al. 2021 tutkimuksen perusteella erityisesti C6- ja C8-asemien prenyyliryhmät ja toisaalta 5-, 7- ja 4'-asemien hydroksyyliiryhmät vaikuttaisivat lisäävän antimikrobiaktiivisuutta muihin asemiin verrattuna. Puolestaan C3-aseman ja hydroksyyliiryhmien metylointi vähentää aktiivisuutta (Boozari et al., 2019; Osorio et al., 2021).

Antimikrobiaktiivisuus voi perustua myös kykyyn estää biofilmin muodostuminen. Biofilmi on mikrobeista muodostunut limamainen kerros, joka suojaa siihen kiinnittyneitä mikrobeita muun muassa antibiooteilta (Vahdati et al., 2022). Antibiofilmi-inhibiittorit vähentävät bakteerien taudinaiheutuskykyä, mutta eivät vaikuta solujen elinkykyyn. Tämän myötä ne eivät myöskään johda lääkeresistenssiin. Esimerkki tällaisista prenyloiduista flavonoideista on *Macaranga tanarius* -kasvin hedelmistä löytyvät propoliinit. Lee et al. 2019 tutkivat näiden yhdisteiden antibiofilmiaktiivisuutta muun muassa *C. albicansia* ja enterohemorragista *E. colia* (EHEC) vastaan. Tutkimuksen perusteella propoliini D toimi näistä parhaiten *C. albicansia* eli hiivasientitulehdusta aiheuttavaa hiivasientä vastaan. Se vaikutti vähentävän biofilmin muodostusta inhiboimalla aggregaatiota. EHEC:n tapauksessa propoliini D puolestaan vaikutti vähentävän fimbrioiden eli tarttumiskarvojen muodostusta eikä niinkään vaikuttanut solukalvoon. Biofilmin muodostuminen vähentää mikrobien taudinaiheutuskykyä tappamatta niitä, jonka myötä se ei myöskään johda lääkeresistenssiin (Lee et al., 2019).

Joissakin tapauksissa antimikrobiaktiivisuuden parantuminen voi johtua puolestaan sähköstaattisesta vuorovaikutuksesta yhdisteen positiivisesti varautuneiden ryhmien ja negatiivisesti varautuneen bakteerin solukalvon välillä (Lin et al., 2017). Näin on esimerkiksi ikaritiinijohdannaisten tapauksessa. Kappaleessa 3.2.2 esitetyissä ikaritiinijohdannaissa ikaritiinirunkoon on liitetty joko positiivisesti varautunut aminohappotähte tai alifaattinen amiiniryhmä, jonka myötä yhdiste on amfiifiilinen (Koh et al., 2015; Lin et al., 2017). Positiivisesti varautuneet aminohappotähteet ovat itsessään nimensä mukaisesti positiivisesti varautuneita. Puolestaan alifaattiset amiiniryhmät voivat varautua positiivisesti, kun ryhmän tyypeen sitoutuu neljäs ryhmä.

Ikaritiinijohdannaisten antimikrobiaktiivisuus perustuu kahteen rakenteelliseen tekijään yhdisteiden rakenteissa. Toisaalta flavonirunko ja prenyylisivuketju toimivat hydrofobisina ryhminä helpottaen yhdisteen tunkeutumista bakteerin solukalvon läpi. Puolestaan positiivisesti varautuneet ryhmät, eli positiivisesti varautuneita ryhmiä sisältävät aminohapot ja alifaattiset amiiniryhmät toimivat hydrofiilisinä ryhminä. Nämä puolestaan pystyvät häiritsemään bakteerin solukalvon toimintaa sähköstaattisilla vuorovaikutuksilla ja lisätä selektiivisyyttä (Koh et al., 2015; Lin et al., 2017).

## 5 Yhteenveto

Lääkekehityksen kannalta flavonoidit ovat hyvä lähtökohta mikrobilääkkeissä biologisten aktiivisuuksiensa, matalan toksisuutensa ja selektiivisyytensä myötä (Cushnie & Lamb, 2005; Panda & Duarte-Sierra, 2022). Lisäksi flavonoidien antimikrobiaktiivisuutta on helppo parantaa muokkaamalla niiden rakennetta kemiallisesti erilaisilla sivuryhmillä, kuten prenyylisivuketjulla, positiivisesti varatuilla aminohapoilla tai alifaattisilla amiineilla (Shi et al., 2021).

Prenyylisivuketjun liittämässä voidaan hyödyntää esimerkiksi kemiallisia katalyyttejä tai prenyylitransferaasientsyymiä. Kummassakin tavassa on puolensa. Prenyylitransferaasissa hyötynä on erityisesti menetelmän spesifisyys, mutta entsyymiä ei voida eristää kemian keinoin vaan se on kloonattava kloonausvektoria ja tuotto-organismia hyödyntäen (Yang et al., 2016). Kemiallisia katalyyttejä hyödynnettäessä katalyytit ovat puolestaan helposti saatavilla. Näistä yksivaiheiset reaktiot eivät kuitenkaan ole spesifejä ja näiden saannot ovat vielä melko pieniä (Osorio et al., 2021). Monivaiheiset reaktiot ovat spesifimpiä, mutta monimutkaisia ja aikaa vieviä. Kyseisten reaktioiden eri vaiheiden saannot ovat melko hyviä, mutta lopputuotteen saanto on niissäkin melko pieni verrattuna lähtöaineiden määrin (W. Li et al., 2019).

Prenyylisivuketju lisää prenyloitujen flavonoidien antimikrobiaktiivisuutta lipofiilisyytensä takia. Toisaalta näiden liiallinen lipofiilisyys kuitenkin heikentää niiden antimikrobiaktiivisuutta. Tätä voidaan korjata lisäämällä flavonoidiin varauksellisia ryhmiä. Tästä esimerkkinä oli ikaritiinin muokkaus positiivisesti varatuilla aminohapoilla ja alifaattisilla amiineilla. Näiden kohdalla on kuitenkin otettava huomioon yhdisteiden poolittoman ja varauksellisen osan suhde, sillä toisen ominaisuuden liiallisuus suhteessa toiseen heikentää koko yhdisteen antimikrobiaktiivisuutta (Lin et al., 2017).

## Lähteet

- Aguilera-Correa, J. J., Fernández-López, S., Cuñas-Figueroa, I. D., Pérez-Rial, S., Alakomi, H. L., Nohynek, L., Oksman-Caldentey, K. M., Salminen, J. P., Esteban, J., Cuadros, J., Puupponen-Pimiä, R., Perez-Tanoira, R., & Kinnari, T. J. (2021). Sanguiin H-6 fractionated from cloudberry (*Rubus chamaemorus*) seeds can prevent the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm development during wound infection. *Antibiotics*, *10*(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121481>
- Barron, D., & Ibrahim, R. K. (1996). Isoprenylated flavonoids - a survey. *Phytochemistry*, *43*(5), 921–982.
- Boozari, M., Soltani, S., & Iranshahi, M. (2019). Biologically active prenylated flavonoids from the genus *Sophora* and their structure–activity relationship—A review. In *Phytotherapy Research* (Vol. 33, Issue 3, pp. 546–560). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/ptr.6265>
- Botta, B., Monache, G. D., Menendez, P., & Boffi, A. (2005). Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 26, Issue 12, pp. 606–608). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.09.012>
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D., & Delle Monache, G. (2005). Prenylated Flavonoids: Pharmacology and Biotechnology. In *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 12).
- Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 17–27). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1818>
- Chen, Y., Zhao, J., Qiu, Y., Yuan, H., Khan, S. I., Hussain, N., Iqbal Choudhary, M., Zeng, F., Guo, D. A., Khan, I. A., & Wang, W. (2017). Prenylated flavonoids from the stems and roots of *Tripterygium wilfordii*. *Fitoterapia*, *119*, 64–68. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.04.003>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 26, Issue 5, pp. 343–356). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>

- Gomes, D., Rodrigues, L. R., & Rodrigues, J. L. (2022). Perspectives on the design of microbial cell factories to produce prenylflavonoids. *International Journal of Food Microbiology*, 367. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109588>
- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 18, Issue 1, pp. 241–272). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Hisanaga, A., Mukai, R., Sakao, K., Terao, J., & Hou, D. X. (2016). Anti-inflammatory effects and molecular mechanisms of 8-prenyl quercetin. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(5), 1020–1032. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500871>
- Koh, J. J., Lin, S., Aung, T. T., Lim, F., Zou, H., Bai, Y., Li, J., Lin, H., Pang, L. M., Koh, W. L., Salleh, S. M., Lakshminarayanan, R., Zhou, L., Qiu, S., Pervushin, K., Verma, C., Tan, D. T. H., Cao, D., Liu, S., & Beerman, R. W. (2015). Amino acid modified xanthone derivatives: Novel, highly promising membrane-active antimicrobials for multidrug-resistant gram-positive bacterial infections. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(2), 739–752. <https://doi.org/10.1021/jm501285x>
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Khadke, S. K., Yamano, A., Woo, J. T., & Lee, J. (2019). Antimicrobial and antibiofilm activities of prenylated flavanones from *Macaranga tanarius*. *Phytomedicine*, 63. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153033>
- Levisson, M., Araya-Cloutier, C., De Bruijn, W. J. C., Van Der Heide, M., Salvador López, J. M., Daran, J. M., Vincken, J. P., & Beekwilder, J. (2019). Toward Developing a Yeast Cell Factory for the Production of Prenylated Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(49), 13478–13486. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01367>
- Li, M., & Xu, Z. (2008). Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Archives of Pharmacal Research*, 31(5), 640–644. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1206-5>
- Li, W., Shu, L., Liu, K., & Wang, Q. (2019). Regioselective synthesis of C-prenylated flavonoids via intramolecular [1,3] or [1,5] shift reaction catalyzed by acidic clays. *Tetrahedron Letters*, 60(41). <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.151138>
- Lin, S., Koh, J. J., Aung, T. T., Sin, W. L. W., Lim, F., Wang, L., Lakshminarayanan, R., Zhou, L., Tan, D. T. H., Cao, D., Beerman, R. W., Ren, L., & Liu, S. (2017). Semisynthetic Flavone-Derived Antimicrobials with Therapeutic Potential against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(14), 6152–6165. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00380>
- Nazeri, R., & Ghaiour, M. (2019). Evaluation of antibacterial effect of Propolis and its application in mouthwash production. *Frontiers in Dentistry*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.18502/fid.v16i1.1103>
- Nguyen, V. S., Dong, L. P., Wang, S. C., & Wang, Q. (2015). The First Total Synthesis of Sophoflavescenol, Flavenochromane C, and Citrusinol. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015(10), 2297–2302. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403689>



- Osorio, M., Carvajal, M., Vergara, A., Butassi, E., Zacchino, S., Mascayano, C., Montoya, M., Mejías, S., Martín, M. C. S., & Vásquez-Martínez, Y. (2021). Prenylated flavonoids with potential antimicrobial activity: Synthesis, biological activity, and in silico study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115472>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. In *Journal of Nutritional Science* (Vol. 5). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Panda, L., & Duarte-Sierra, A. (2022). Recent Advancements in Enhancing Antimicrobial Activity of Plant-Derived Polyphenols by Biochemical Means. In *Horticulturae* (Vol. 8, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050401>
- Sarbu, L. G., Bahrin, L. G., Babii, C., Stefan, M., & Birsa, M. L. (2019). Synthetic flavonoids with antimicrobial activity: a review. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 127, Issue 5, pp. 1282–1290). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.14271>
- Shi, S., Li, J., Zhao, X., Liu, Q., & Song, S. J. (2021). A comprehensive review: Biological activity, modification and synthetic methodologies of prenylated flavonoids. *Phytochemistry*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112895>
- Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 84, pp. 206–239). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.013>
- Vahdati, S. N., Behboudi, H., Navasatli, S. A., Tavakoli, S., & Safavi, M. (2022). New insights into the inhibitory roles and mechanisms of D-amino acids in bacterial biofilms in medicine, industry, and agriculture. In *Microbiological Research* (Vol. 263). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127107>
- Wang, Y., Tan, W., Li, W. Z., & Li, Y. (2001). A facile synthetic approach to prenylated flavanones: First total syntheses of (±)-bonannione A and (±)-sophoraflavanone A. *Journal of Natural Products*, 64(2), 196–199. <https://doi.org/10.1021/np0001124>
- Xu, M. J., Wu, B., Ding, T., Chu, J. H., Li, C. Y., Zhang, J., Wu, T., Wu, J., Liu, S. J., Liu, S. L., Ju, W. Z., & Li, P. (2012). Simultaneous characterization of prenylated flavonoids and isoflavonoids in *Psoralea corylifolia* L. by liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(19), 2343–2358. <https://doi.org/10.1002/rcm.6361>
- Yang, X., Jiang, Y., Yang, J., He, J., Sun, J., Chen, F., Zhang, M., & Yang, B. (2015). Prenylated flavonoids, promising nutraceuticals with impressive biological activities. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 93–104). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.03.007>
- Yang, X., Yang, J., Jiang, Y., Yang, H., Yun, Z., Rong, W., & Yang, B. (2016). Regiospecific synthesis of prenylated flavonoids by a prenyltransferase cloned from *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep24819>