



**TURUN  
YLIOPISTO**

Matemaattis-luonnontieteellinen  
tiedekunta

# **Punatalvion alkaloidien yksisolumassaspektrometria**

Sanni Korhonen

Kemia

LuK-tutkielma

Laajuus: 6 op

19.5.2025

Turku

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu

Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä.

LuK-tutkielma

**Pääaine:** Kemia

**Tekijä:** Sanni Korhonen

**Otsikko:** Punatalvion alkaloidien yksisolomassaspektrometria

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

**Sivumäärä:** 20 sivua

**Päivämäärä:** 19.5.2025

---

*Catharanthus roseus* -kasvi eli tavallisemmin tunnettu punatalvio on lääketieteellisesti merkittävä kasvi, sillä se valmistaa syöpälääkkeissä käytettäviä alkaloidoja, kuten vinblastiinia ja vinkristiiniä. Alkaloidit ovat kasveissa esiintyviä orgaanisia yhdisteitä, jotka sisältävät typpeä ja niillä on paljon biologisia toimintoja.

Vinblastiini ja vinkristiini valmistuvat punatalviossa monimutkaisen biosynteettisen reitin kautta. Biosynteetireitti koostuu neljästä eri vaiheesta, jotka ovat jakautuneet kasvin eri soluihin. Tämä solukohtaisesti jakautuva biosynteesi mahdollistaa monimutkaisen biosynteetireitin tehokkaan toteutumisen. Esiasteet vindoliini ja katarantiini dimerisoituvat vakuolissa muodostaen anhydrovinblastiinia. Tästä muokataan monien välivaiheiden kautta vinblastiinia ja vinkristiiniä. Solukohtaisesti jakautuva biosynteesi tekee sen tutkimisesta haastavaa, joten vaiheiden seuraamiseen soveltuu hyvin hiljattain kehitetty uusi tutkimusmenetelmä, yksisolomassaspektrometria (single-cell mass spectrometry, scMS).

ScMS on moderni analyysimenetelmä, joka mahdollistaa molekyylien havaitsemisen, tunnistamisen ja kvantifioinnin yksittäisistä soluista. ScMS-menetelmässä yhdistetään yksisolunäytteenotto ja massaspektrometrinen analyysi. Näytteenotto suoritetaan usein pintakäsitellyillä mikroneuloilla. ScMS-menetelmän avulla saadaan erittäin tarkkaa tietoa kasvien luonnontuotteiden biosynteesin jakautumisesta solukohtaisella resoluutiolla. Yksisolutasolla voidaan tutkia sekä biosynteettisiä välituotteita että lopullisia tuotteita.

Menetelmällä on edelleen merkittäviä haasteita, jotka rajoittavat sen laajamittaista käyttöä. Haasteisiin kuuluvat näytteenoton tekniset vaikeudet, metaboliittien alhainen pitoisuus, datan analysoinnin haasteet sekä teknologian korkeat kustannukset ja monimutkaisuus. Menetelmän tekninen monimutkaisuus, korkeat kustannukset ja standardoinnin puute voivat heikentää mittausten toistettavuutta ja vertailtavuutta eri tutkimusten välillä.

ScMS mahdollistaa tulevaisuudessa lupaavan lähestymistavan syöpälääkkeiden tuotannon optimointiin, sillä menetelmän avulla voidaan tutkia biosynteetireittiä ja tehostaa biosynteesiä esimerkiksi mikrobiperäisten tuotantojärjestelmien avulla. Lisäksi scMS tulee tulevaisuudessa olemaan yhä enemmän käytössä yhdessä muiden yksisolutekniikoiden, kuten yksisolugenomiikan, -transkriptomiikan ja -proteomiikan kanssa. Tämä mahdollistaa vielä monipuolisemman solukohtaisen analyysin.

---

**Avainsanat:** alkaloidit, biosynteesi, punatalvio, vinblastiini, vinkristiini, yksisolomassaspektrometria

# Sisällysluettelo

<b>Lyhenteet</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Johdanto</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Punatalvion alkaloidien biosynteesi</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Solukohtainen jakautuminen punatalviossa</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Solukerrosten roolit</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Vinblastiinin ja vinkristiinin muodostuminen</b> .....	<b>5</b>
<b>3 Yksisolumaspektrometria (scMS)</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1 Pintakäsitellyt mikroneulat</b> .....	<b>7</b>
<b>3.2 Edut verrattuna perinteisiin menetelmiin</b> .....	<b>8</b>
<b>3.3 Menetelmän haasteet</b> .....	<b>9</b>
<b>4 Yksisolumaspektrometrian sovellukset</b> .....	<b>11</b>
<b>4.1 Kasvin eri osien yksisoluanalyysi</b> .....	<b>12</b>
4.1.1 Lehden ja terälehten yksisoluanalyysi .....	13
4.1.2 Juuren ja varren yksisoluanalyysi.....	15
<b>4.2 Käytettävyys biosynteesin tutkimuksessa</b> .....	<b>16</b>
<b>4.3 Syöpälääkkeiden tuotannon optimointi</b> .....	<b>17</b>
<b>5 Johtopäätökset</b> .....	<b>18</b>
<b>6 Viiteluettelo</b> .....	<b>20</b>

## Lyhenteet

ESI – Sähkösumutus-ionisaatio (engl. Electrospray ionisation)

FACS – Fluoresenssilla aktivoitu solujen lajittelu (engl. Fluorescence-activated cell sorting)

HTT – Korkean lämpötilan käsittely (engl. High-temperature treatment)

IPAP – Sisäinen floemiparenkyma (engl. Inner phloem-associated parenchyma)

LCM – Laseravusteinen mikrodisektio (engl. Laser capture microdissection)

MIA - Monoterpeeni-indoliaikaloidi (engl. Monoterpene indole alkaloid)

RNA – Ribonukleiinihappo (engl. Ribonucleic acid)

SAT – Vahvahappo käsittely (engl. Strong-acid treatment)

scMS – Yksisolumassaspektrometria (engl. Single-cell mass spectrometry)

scRNA-seq – Yksittäisten solujen RNA-sekvensointi (engl. Single-cell RNA-sequencing)

# 1 Johdanto

Kasvit tuottavat laajasti erilaisia luonnonaineita, joita käytetään lääketieteessä, maataloudessa, elintarvike- ja tuoksuteollisuudessa. Näiden luonnonaineiden tarkka tutkiminen on haastavaa, sillä niiden biosynteesi tapahtuu usein spesifisissä solutyypeissä. Vinblastiini on yksi merkittävä lääketieteellinen luonnonaine, jota käytetään syövän hoidossa, ja se syntyy monimutkaisen biosynteettisen reitin kautta *Catharanthus roseus* -kasvissa.<sup>1</sup> Tämä reitti koostuu useista entsyymeistä, jotka toimivat eri solutyypeissä kasvin lehtien sisällä. Punatalviossa syntyy vinblastiinin lisäksi muita lääketieteellisesti merkittäviä alkaloideja, kuten vinkristiiniä, vindoliinia ja katarantiinia.<sup>2,3</sup>

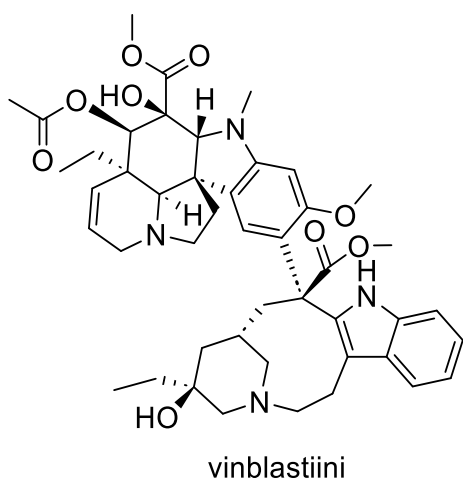
Alkaloidit ovat ryhmä tyyppiä sisältäviä luonnontuotteita, joita on pääasiassa kasveissa.<sup>4</sup> Alkaloidit ovat yksi suurimmista erikoistuneista metaboliittiryhmistä, joista monilla on biologisia toimintoja ja jotka ovat välttämättömiä paitsi kasveille itselleen, myös ihmisten terveydelle. Noin 20 %:n kasvilajeista tiedetään sisältävän alkaloideja.<sup>5</sup> *Catharanthus roseus* -kasvi eli tavallisemmin tunnettu punatalvio on lääketieteellisesti merkittävä kasvi, sillä se valmistaa paljon näitä lääketieteellisesti merkittäviä alkaloideja.

Massaspektrometria ja RNA-sekvensointi ovat perinteisiä menetelmiä, jotka ovat mahdollistaneet luonnonaineiden ja niiden biosynteettisten geenien tutkimuksen.<sup>1</sup> Nämä eivät kuitenkaan ole riittävän tarkkoja menetelmiä yksittäisten solujen tutkimiseen. Tätä varten on kehitetty uusi tutkimusmenetelmä, yksisolumassaspektrometria (scMS), jotta pystytään analysoimaan luonnonaineita yksittäisissä kasvisoluissa. Tämä menetelmä mahdollistaa sekä kvantitatiivisen että kvalitatiivisen analyysin suoraan yksittäisistä soluista ja mahdollistaa uuden tavan tutkia biosynteettisten reittien solutason paikantumista.<sup>1</sup>

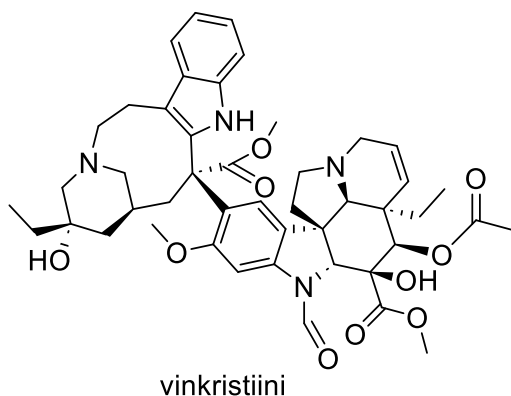
Tämä tutkielma esittelee punatalvion alkaloideja sekä niiden jakautumista ja syntymistä kasvin eri solutyypeissä yksisolumassaspektrometrian avulla. Tutkielmassa käsitellään esimerkiksi, kuinka vindoliinin ja katarantiinin kaltaiset esiasteet yhdistyvät muodostamaan anhydrovinblastiinia, joka toimii vinblastiinin esiasteena. Lisäksi käsitellään yksisolumassaspektrometriaa ja luonnonaineiden biosynteesiä, joita ymmärtämällä voidaan tehostaa lääkekehitystä. Tämä tutkielma pohjautuu pääosin artikkeleihin "Quantitative Single-Cell Mass Spectrometry Provides a Highly Resolved Analysis of Natural Product Biosynthesis Partitioning in Plants" (Vu et al. 2024)<sup>1</sup> ja "Probing the formation of anhydrovinblastine in *Catharanthus roseus* by single-cell mass spectrometry" (Cai et al. 2022)<sup>2</sup>.

## 2 Punatalvion alkaloidien biosynteesi

Punatalviosta on tunnistettu yli 130 monoterpeeni-indolialkaloidia (MIA), ja ne ovat tämän kasvin suurin ja monimuotoisin alkaloidiryhmä.<sup>4</sup> Punatalvio on ainoa lähde vinblastiinille (kuva 1) ja vinkristiinille (kuva 2), mitkä ovat merkittävimpiä MIA-yhdisteitä niiden voimakkaiden syöpää torjuvien vaikutusten ansiosta.<sup>4</sup> Näiden alkaloidien biosynteesireitti voidaan jakaa neljään vaiheeseen. Biosynteesi alkaa metyylierytritolifosfaatti (MEP) -vaiheella, jossa valmistuu prekursori alkaloidien monoterpeeniosalle. Toinen vaihe on iridoidivaihe, jossa tuotetaan alkaloidien monoterpeeniosa. Kolmas vaihe on alkaloidirakennevaihe ja neljäs vaihe on myöhäinen alkaloidivaihe, jossa muokataan näiden alkaloidien rakenteet oikeanlaiseksi.<sup>6</sup> Nämä biosynteesin eri vaiheet jakautuvat kaikki eri kasvin osiin. MEP-reitti ja iridoidivaihe tapahtuvat johtojänteisiin liittyvässä solutyypissä, sisäinen floemiparenkyymi (IPAP), kun taas alkaloidien runkorakenteen muodostumisvaihe tapahtuu epidermiksessä.<sup>6</sup> Lopulta viimeiset biosynteesivaiheet tapahtuvat idioblasteissa ja lateksisoluissa.<sup>1</sup>



Kuva 1. Vinblastiinin rakenne.



Kuva 2. Vinkristiinin rakenne.

## 2.1 Solukohtainen jakautuminen punatalviossa

Alkaloidien biosynteesi on jakautunut punatalviossa solukohtaisesti, mikä mahdollistaa monimutkaisten biosynteettisten reittien tehokkaan toteutumisen kasvin eri soluissa. Esimerkiksi kaksi tärkeää esiastealkaloidia, katarantiini ja vindoliini, syntetisoidaan kasvin lehdistä erillisissä soluissa. Katarantiini muodostuu pääasiassa vuolaarisissa idioblasteissa ja vindoliini muodostuu ylemmissä epidermissoluissa (kasvin pintasolukossa).<sup>2</sup> Solut kuljettavat alkaloideja toisilleen, mikä tekee biosynteesistä paikallisesti ja biokemiallisesti koordinoitun prosessin.<sup>4</sup> Anhydrovinblastiinin eli vinblastiinin ja vinkristiinin yhteisen esiasteen muodostuminen tapahtuu vakuolissa luokan III peroksidaasin (CrPrx1) katalysoimana.<sup>4</sup> Tämä osoittaa vakuolien merkittävän roolin sekä biosynteettisten reittien säätelyssä, että alkaloidin varastoinnissa.

## 2.2 Solukerrosten roolit

Jokaisella punatalvion eri solukerroksella on tarkkaan määritelty tehtävä luonnonaineiden, kuten MIA-yhdisteiden, biosynteesissä, minkä mahdollistaa monimutkaisten biokemiallisten reittien tapahtumisen koordinoitusti. Esimerkiksi vinblastiinin ja vinkristiinin biosynteesireitissä on mukana kolme keskeistä solukerrosta.<sup>1</sup>

Ensimmäinen solukerros on sisäinen floemiparenkyymi eli IPAP-solut. Näissä IPAP-soluissa tapahtuvat biosynteesin alkuvaiheet, kuten prekursoriyhdisteiden (logaanihappo ja sekologaniini) tuotanto, jotka ovat välttämättömiä MIA-yhdisteiden muodostumiselle.<sup>1</sup>

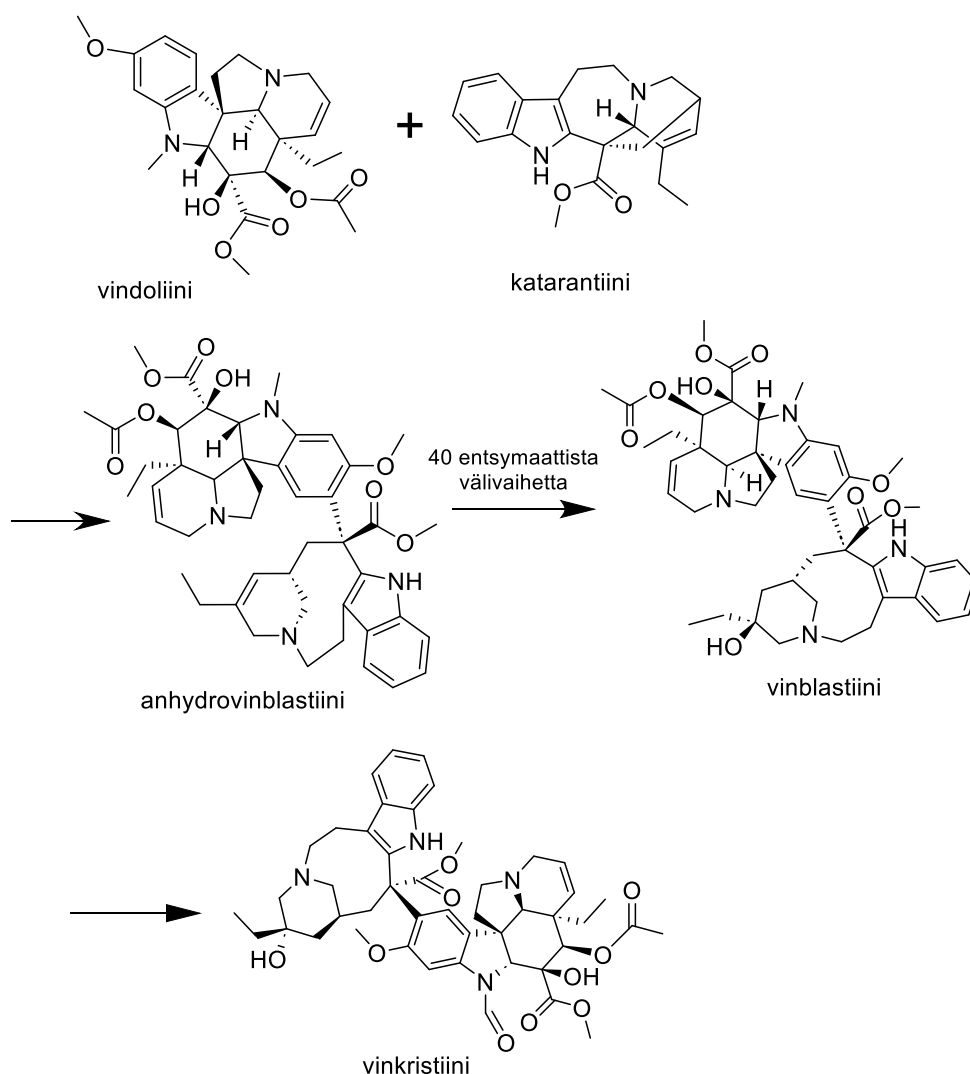
Seuraava solukerros biosynteesireitissä on epidermissolut, missä tapahtuu pääasiassa vindoliinin biosynteesi. Lisäksi epidermissolut muokkaavat biosynteettisiä välituotteita ja siirtävät niitä muihin soluihin.<sup>2</sup>

Kolmas solukerros koostuu idioblasti- ja lateksisoluista. Nämä solut ovat erikoistuneet alkaloidien, kuten katarantiinin ja muiden välituotteiden, varastointiin ja prosessointiin. Idioblastit ovat myös biosynteesireitin viimeisen vaiheen tapahtumapaikka, kun katarantiini ja vindoliini yhdistyvät muodostaen  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastiinia.<sup>1</sup>

Solukerrosten välinen yhteistyö edellyttää tehokkaita kuljetusmekanismeja, jotta ne pystyvät siirtämään välituotteita eri solujen välillä. Solukerrosten erikoistuminen eri tehtäviin ei pelkästään paranna biosynteesin tehokkuutta, vaan se auttaa hallitsemaan reaktioiden myrkyllisiä sivutuotteita.<sup>2</sup>

## 2.3 Vinblastiinin ja vinkristiinin muodostuminen

MIA-alkaloidit vinblastiini ja vinkristiini ovat punatalvion tärkeimpiä alkaloideja niiden syöpälääkinnällisten ominaisuuksien vuoksi.<sup>4</sup> Nämä yhdisteet johdetaan monomeeristen alkaloidien, katarantiinin ja vindoliinin, kondensoitumisesta. Katarantiinin ja vindoliinin dimerisaatio tapahtuu vakuolissa, jossa reaktiota katalysoi vakuolaarinen luokan III peroksidaasi (CrPrx1). Tämän CrPrx1:n katalysoima tuote on  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastiini, joka toimii kaikkien dimeristen alkaloidien yhteisenä esiasteena.<sup>4</sup> Anhydrovinblastiini voi siten edelleen muokkautua vinblastiiniksi ja siitä vinkristiiniksi noin 40 entsyymistä katalysoimien reaktioiden kautta (kaavio 1).<sup>1</sup> Vinblastiinilla on kasvin alkaloidista yksi pisimmistä biosynteettisistä reiteistä.<sup>7</sup>



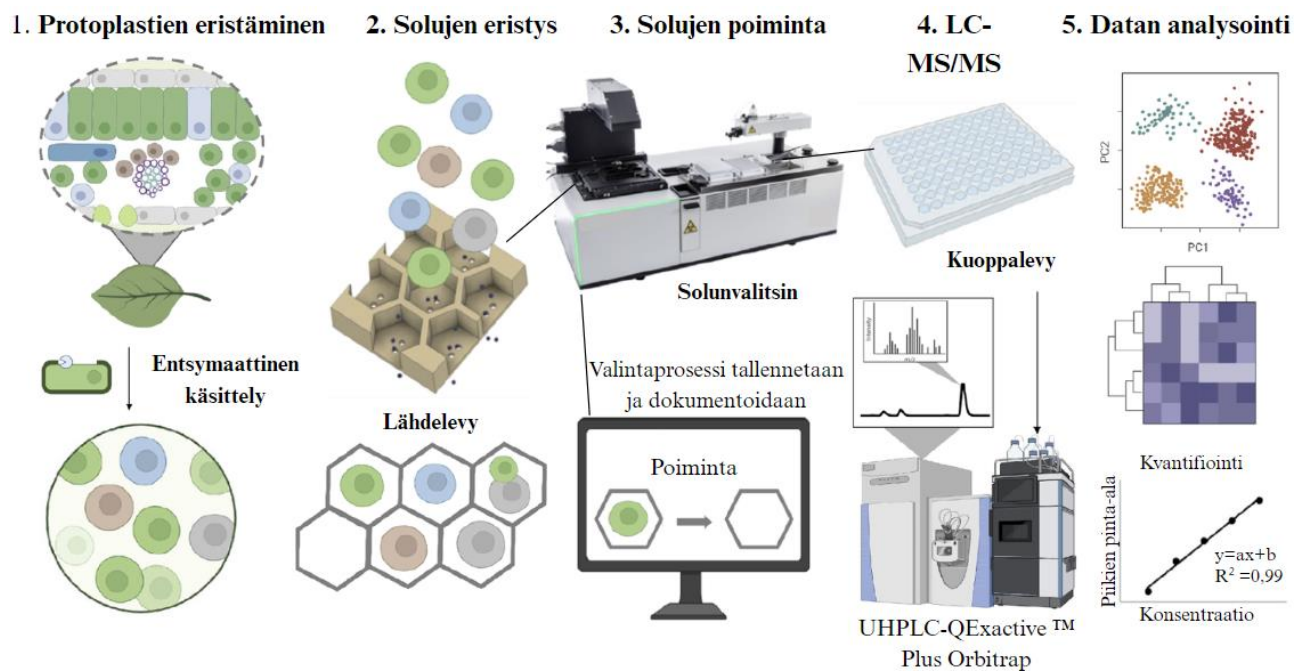
Kaavio 1. Vinblastiinin ja vinkristiinin biosynteettinen muodostuminen yksinkertaistettuna. Kaavio on mukailtu artikkelin ”Biosynthetic Pathway of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus Roseus*” kuvasta 5.<sup>4</sup>

### 3 Yksisolumassaspektrometria (scMS)

Yksisolumassaspektrometria (scMS) on moderni analyysimenetelmä, joka mahdollistaa molekyylien havaitsemisen, tunnistamisen ja kvantifioinnin yksittäisistä soluista.<sup>1</sup> Yksisolumassaspektrometrian avulla saadaan erittäin tarkkaa tietoa kasvien luonnontuotteiden biosynteesin jakautumisesta solukohtaisella resoluutiolla. Tätä menetelmää hyödynnetään paljon kasvitieteellisissä tutkimuksissa, joissa luonnonaineiden biosynteesi on jakautunut solukohtaisesti. Yksisolutasolla voidaan tutkia sekä biosynteettisiä välituotteita että lopullisia tuotteita, mikä antaa kattavan kuvan solun metaboliaprosesseista.<sup>1</sup> Yksisolumassaspektrometriamenetelmän eteneminen on havainnollistettu kuvassa 3.

Yksisoluanalyysi on keskeinen vaihe solujen genomiikan, transkriptomiikan, proteomiikan ja metabolomiikan tutkimuksessa, sillä se mahdollistaa solujen ja soluelinten ainesosien ja metaboliittien tarkemman ymmärtämisen. Yksisoluanalyysi antaa myös merkittäviä näkökulmia biologisen lääketieteen, farmakologian, kliinisen patologian ja toksikologian tutkimukseen.<sup>8</sup>

ScMS:ssa yhdistetään yksisolunäytteenotto ja massaspektrometrinen analyysi.<sup>2</sup> Näytteenotto voidaan suorittaa usealla eri tavalla, mutta useasti käytetään mikroneuloja tai mikrofluidisia järjestelmiä. Nämä näytteenotto tavat mahdollistavat solun sisällön eristämisen ilman merkittävää häiriötä solun biokemialliselle tilalle. Yksisolunäytteestä saatavat metaboliitit ionisoidaan sähkösumutus-ionisaatiolla (electrospray ionisation, ESI) tai muilla ionisaatiotekniikoilla, minkä jälkeen ne analysoidaan massaspektrometrillä.<sup>1</sup>



Kuva 3. Yksisolumassaspektrometria menetelmän eteneminen. Vaiheessa 1 protoplastit eristetään lehdestä, juuresta tai terälehdessä. Vaiheessa 2 protoplastit vangitaan lähdelevylle. Vaiheessa 3 protoplastit kuvataan ja poimitaan soluvalitsijalla. Vaiheessa 4 yksittäiset solut siirretään kuoppalevyille ja tehdään LC-MS-analyysi. Vaiheessa 5 analysoidaan massaspektrometristä saatu data. Kuva on mukailtu avoimen julkaisun artikkelin ”Quantitative Single-Cell Mass Spectrometry Provides a Highly Resolved Analysis of Natural Product Biosynthesis Partitioning in Plants” kuvasta 2, jonka on julkaissut American Chemical Society, ja jota voidaan jatkovittää ja muokata Creative Commons Attribution License 4.0 -lisenssillä (CC BY 4.0). Alkuperäinen kuva on luotu Biorenderillä (biorender.com).<sup>1</sup>

### 3.1 Pintakäsitellyt mikroneulat

Pintakäsitellyt mikroneulat on kehitetty yksisolumassaspektrometrian työkaluksi. Näitä mikroneuloja käytetään yhdisteiden eristämiseen ja analysointiin yksittäisistä soluista.<sup>2</sup> Punatalvion alkaloidien tutkimuksessa pintakäsitellyjä mikroneuloja on erityisesti hyödynnetty vindoliinin ja katarantiinin paikallistamiseen kasvin lehtisolukosta sekä niiden yhdistymisprosessin tarkasteluun.

Pintakäsitellyt mikroneulat valmistetaan käsittelemällä ne eri tavoin niiden erottelutehon ja ionisaatiokyvyn parantamiseksi.<sup>2</sup> Ennen pintakäsittelyä mikroneulat pestään vedellä ja metanolilla. Tämän jälkeen niille tehdään korkean lämpötilan käsittely (HTT) liekillä 3,0 sekunnin ajan (>1000 °C), jotta mikroneulojen pinta hapettuu. Vahvahappokäsittely (SAT) tehdään upottamalla mikroneulat kuningasveteen (seos, jossa on kloorivetyhappoa ja typpihappoa tilavuussuhteessa 3:1) 1,5 minuutiksi. HTT- ja SAT-käsitellyt mikroneulat puhdistetaan Milli-Q-vedellä (ultrapuhdas vesi) ja metanolilla, minkä jälkeen ne kuivataan. HTT- ja SAT-käsittelyn jälkeen mikroneulan sileä pinta muuttuu karkeaksi ja huokoiseksi.<sup>2</sup>

Yksisolunäytteenoton jälkeen pintakäsitellyt mikroneulat voivat toimia suoraan sähkösuihkutusionisaatiolla (ESI) emittereinä massaspektrometriassa, jolloin saadaan tarkka ja nopea analyysi soluista eristetyistä metaboliiteista. Tämä tekniikka mahdollistaa reaaliaikaisen seurannan punatalvion alkaloidien biosynteesistä ja solukohtaisesta jakautumisesta<sup>2</sup>.

Pintakäsittelyihin mikroneuloihin perustuvan näytteenoton havaittiin toimivan hyvin punatalvion yksittäisten solujen analysointiin.<sup>2</sup> Tulokset osoittivat, että kasvin lehtien ylä- ja alaosan solut tuottavat eri alkaloideja, siten että vindoliini havaittiin ylemmissä epidermissoluissa ja katarantiini alemmissa epidermissoluissa.

Pintakäsittelyillä mikroneuloilla on havaittu olevan potentiaalia analyyttien adsorboimiseen näytteenoton aikana.<sup>2</sup> Pintakäsittelyjen mikroneulojen näytteenottotehokkuutta on verrattu käsittelemättömään mikroneulaan, jolloin tulokset osoittivat, että HTT-käsittely mikroneula lisäsi punatalvion vinblastiinin esiasteiden, katarantiinin ja vindoliinin, havaittavuutta 4,6-kertaiseksi verrattuna käsittelemättömään mikroneulaan. Vielä parempi vaste esiasteiden havaittavuuteen saatiin SAT-käsittelyillä mikroneuloilla, joiden signaalivahvistus oli 42-kertainen. Pintakäsittelyn mikroneulan huokoinen pinta parantaa metaboliittien adsorptiokapasiteettia sileään pintaan verrattuna. Tulokset osoittavat selkeästi, että pintakäsittelyjä mikroneuloja voidaan käyttää ultra-pienten metaboliittimäärien eristämiseen ja analysointiin.<sup>2</sup>

Lisäksi on havaittu, että mikroneulojen avulla saadaan tarkkoja yksisoluanalyysijä kasvin eri osista, kuten juuresta, varresta ja lehdistä, ja ne pystyvät havaitsemaan eri solutyypin väliset metaboliittierot.<sup>2</sup> Tutkimuksen tulokset vahvistavat, että scMS yhdistettynä pintakäsittelyihin mikroneuloihin on tehokas menetelmä yksittäisten solujen metaboliittien tutkimiseen.

### **3.2 Edut verrattuna perinteisiin menetelmiin**

Toisin kuin perinteisissä menetelmissä, yksisolumassaspektrometriä pystytään käyttämään soluihin, jotka ovat peräisin useista kasvin eri kudoksista (lehti, juuri, varsi ja terälehti). ScMS voi myös tunnistaa ja kvantifioida tarkasti eri metaboliittiluokkia, jopa noin 180 solua/päivä suorituskyvyllä.<sup>1</sup> Tämä yksisolumassaspektrometriaan perustuva lähestymistapa tarjoaa erittäin tarkkoja profiileja siitä, miten ja missä luonnonaineet sijaitsevat solukohtaisesti. Yhdistettynä yksisolusekvensointimenetelmiin se luo entistä paremman perustan geenien löytämiselle, kasvien metabolisen muokkauksen kehittämiseksi ja luonnonaineiden toimintojen ymmärtämiselle. ScMS-menetelmän etuna on myös sen kyky analysoida elävien järjestelmien soluja *in situ*, mikä mahdollistaa reaaliaikaisen seurannan ilman laajaa näytteenvalmistelua.<sup>1,2</sup>

Yksisolumassaspektrometria avaa uusia mahdollisuuksia ymmärtää luonnonaineiden biosynteesiä ja niiden paikallisia ja kvantitatiivisia muutoksia soluissa. Menetelmän avulla saadaan lisää tietoa kasvien kemiallisista prosesseista, ja se antaa perustan bioteknologisten sovellusten, kuten lääkkeiden tuotannon optimoinnin, kehittämiseksi.<sup>1</sup> *Catharantuhus roseus* -kasvin tutkimuksessa yksisolumassaspektrometria on mahdollistanut alkaloidien paikantamisen eri solutyyppeihin, kuten aiemmin on esitelty.

Yksittäissolutekniikoiden etu perinteisiin massamenetelmiin verrattuna on parempi kyky ymmärtää solujen alaryhmiä ja tutkia ajallisia muutoksia geeniekspressiossa yksittäisissä soluissa.<sup>9</sup> Aiemmissä kasvitutkimuksissa yksittäissolutekniikat ovat mahdollistaneet harvinaisten tai vaihtelevien solupopulaatioiden tunnistamisen, erityisten solutyypin tai -tilojen löytämisen sekä yksityiskohtaisen paikallisen ja ajallisen geeniekspressiotiedon tuottamisen. Nämä yksisolutekniikat ovat edistäneet solutyypin tunnistamista, ilmentymistrajektorien luomista ja geenien säätelyverkostojen selvittämistä kasveissa.<sup>9</sup>

### 3.3 Menetelmän haasteet

ScMS on edistänyt kasvitutkimusta, mutta menetelmällä on edelleen merkittäviä haasteita, jotka rajoittavat sen laajamittaista käyttöä.<sup>9</sup> Menetelmän haasteisiin kuuluvat näytteenoton vaikeudet, datan analysoinnin haasteet sekä teknologian korkeat kustannukset ja monimutkaisuus. Huolimatta edistysaskelista kasvien yksittäissolu tutkimuksessa on edelleen merkittäviä kasvumahdollisuuksia.<sup>9</sup>

Näytteenotossa ilmenevä merkittävä menetelmällinen haaste on tiettyjen solujen tehokas fyysinen eristäminen yksittäissolujen RNA-sekvensointi (scRNA-seq) -teknologialla, sillä osassa soluista on jäykkä soluseinä, mikä vaikeuttaa prosessia.<sup>9</sup> Tätä haastetta on yritetty ratkaista kehittämällä useita soluseinän pilkkomistekniikoita, mitkä mahdollistavat protoplastien vapauttamisen eri kasvukudostyypeistä. Tässä ongelmaksi on ilmentynyt se, että soluseinän entsyymaattinen tuhoaminen voi aiheuttaa väistämättömiä häiriöitä kasvin biologisessa järjestelmässä. Toinen lähestymistapa tämän haasteen ratkaisemiseksi on yksittäissolujen valmisteluprotokollan optimointi, mikä sisältää hienovaraisia menettelyjä, joilla eristetään ja uutetaan geneettistä materiaalia yhdestä solusta.<sup>9</sup> Parempien solujen erottamistekniikoiden kehittäminen on tarpeen, jotta yksittäissolujen tutkimistekniikoita voitaisiin käyttää laajemmin ja estää myöhempi kontaminaatio.

Muita kehitettyjä menetelmiä yksittäisten solujen, protoplastien tai tumien eristämiseksi kudoksista, solujen liuoksista tai tumaliuoksista eristämiseksi ovat mikro-pipetointi, optiset pinsetit, mikrofluidiikka, laseravusteinen mikrodissektio (LCM), fluoresenssilla aktivoitu

solujen lajittelu (FACS). FACS- ja LCM-tekniikat ovat laajasti käytettyjä, mutta niiden käyttäminen voi kuitenkin aiheuttaa paikallista vaurioitumista soluille mekaanisen lajittelun ja lasersironnan aikana.<sup>9</sup> Lisäksi joidenkin fluoresenssimerkintöjen lajittelu näiden menetelmien avulla on haasteellista.

Toinen huomattava haaste on solujen matala metaboliittipitoisuus ja mittaustehokkuus.<sup>9</sup> Yksittäisten solujen metaboliittien määrät ovat usein hyvin pieniä, mikä asettaa haasteita massaspektrometrian herkkyydelle ja kvantifioinnille. ScMS perustuu usein sähkösumutus-ionisaatioon, jonka tehokkuus voi vaihdella eri yhdisteiden välillä, ja matriisivaikutukset voivat vääristää tuloksia. Lisäksi massaspektrometrin taustamelu ja mittaussvaihtelut voivat vaikuttaa havaittavien yhdisteiden tarkkuuteen.<sup>9</sup>

Kolmas haaste ilmenee datan analysoinnista, sillä yksisoluanalyysit tuottavat suuria määriä monimutkaista dataa.<sup>9</sup> Tämän datan käsittely vaatii kehittyneitä laskennallisia menetelmiä. Esimerkiksi yksisolugenomiikan ja -transkriptomiikan yhdistäminen metabolomiikkaan edellyttää monitasoista dataintegraatiota. Lisäksi täytyy kiinnittää huomiota datan normalisointiin ja tekniseen vaihteluun, jotta eri solujen analyysit olisivat vertailukelpoisia.<sup>9</sup>

Neljäs haaste scMS-menetelmässä on sen korkeat kustannukset ja tekninen monimutkaisuus.<sup>9</sup> Yksisolumassaspektrometria tarvitsee erikoistuneita laitteistoja, kuten korkean resoluution massaspektrometrejä ja mikrofluidisia järjestelmiä. Mikrofluidiikkaan perustuvat eristämisteknologiat tarjoavat suuritehoisia ja korkean tarkkuuden ominaisuuksia, ne vaativat näytteitä, joissa on matala saastumistaso, mutta ne ovat myös kalliimpia kuin muut tekniikat.<sup>9</sup> Lisäksi menetelmän käyttö vaatii asiantuntemusta sekä massaspektrometrian että bioinformatiikan alalla, mikä voi rajoittaa sen saatavuutta pienemmissä tutkimuslaboratorioissa.

Viides haaste tulee mittausten standardoinnin haastavuudesta ja vaikeasta toistettavuudesta.<sup>9</sup> Menetelmän toistettavuus voi olla ongelmallinen, sillä pienet erot näytteen valmistuksessa, ionisaatio-olosuhteissa ja analyysimenetelmissä voivat vaikuttaa tuloksiin. Tähän vaikuttaa se, että scRNA-seq haaste on solujen paikallisen tiedon menetyksessä solujen erottamisprosessin aikana.<sup>9</sup> Tällä hetkellä yksisoluanalyysille ei ole vakiintuneita protokollia, mikä vaikeuttaa eri tutkimusten välistä vertailua. Menetelmien standardointi on edelleen kehitysvaiheessa, ja analyysien välinen vaihtelu voi vaikeuttaa tulosten vertailtavuutta eri tutkimusten välillä.

## 4 Yksisolumaspektrometrian sovellukset

ScMS tarjoaa monipuolisia sovelluksia luonnonaineiden biosynteesin tutkimuksessa ja bioteknologian kehityksessä. Yksi keskeinen sovellusalue on lääkekasvitutkimus ja lääkekehitys.<sup>10</sup> Vinblastiini ja vinkristiini ovat merkittäviä syöpälääkkeitä, mutta niiden luonnollinen pitoisuus kasvissa on hyvin alhainen.<sup>1</sup> ScMS mahdollistaa alkaloidien biosynteesin eri vaiheiden analysoinnin ja optimoinnin, minkä ansiosta pystytään edistämään bioteknologisia menetelmiä, kuten metabolista muokkausta ja soluviljelmiä, lääkkeiden tuotannon tehostamiseksi.<sup>1</sup>

Toinen tärkeä sovellus on kasvien puolustusmekanismien tutkimus.<sup>2</sup> Tulokset osoittivat, että katarantiini ja vindolini sijaitsevat eri solutyypeissä, mutta niiden sekoittuessa muodostuu nopeasti anhydrovinblastiinia. Tämä viittaa siihen, että kasvi voi säädellä bioaktiivisten alkaloidien tuotantoa vastauksena mekaaniseen stressiin tai saalistajiin. ScMS:n avulla voidaan tutkia vastaavia mekanismeja muissakin kasvilajeissa ja kehittää uusia strategioita kasvien vastustuskyvyn parantamiseksi.<sup>2</sup>

Menetelmällä on myös potentiaalia bioteknologian ja synteettisen biologian sovelluksissa.<sup>11</sup> Yhdistettynä yksisolugenomiikkaan ja -transkriptomiikkaan scMS voi auttaa tunnistamaan biosynteesiin liittyviä entsyymejä ja sääteleviä tekijöitä. Tämä voi mahdollistaa bioaktiivisten yhdisteiden tuotannon suunnittelun solutehtaissa, kuten mikro-organismeissa tai soluviljelmissä, mikä vähentäisi harvinaisten lääkekasvien tarvetta ja mahdollistaisi kestävästä lääketuotannon.<sup>11</sup>

Menetelmää voidaan lisäksi soveltaa muihin biologisiin järjestelmiin, kuten mikro-organismeihin tai eläinsoluihin, joissa solutason metaboliininen vaihtelu on keskeinen tutkimuskohde.<sup>2</sup> Yksisoluanalyysin avulla voidaan tutkia esimerkiksi syöpäsolujen metaboliaa, bakteerien antibioottiresistenssimekanismeja ja hermosolujen välittäjäaineiden biosynteesiä, mikä tekee menetelmästä monipuolisen työkalun biotieteiden ja lääketutkimuksen alalla.<sup>2</sup>

Kokonaisuudessaan yksisolumaspektrometria tarjoaa uuden työkalun kasvimetabolian, lääkekehityksen ja bioteknologian tutkimukseen, avaten uusia mahdollisuuksia bioaktiivisten yhdisteiden tehokkaampaan hyödyntämiseen ja tuotantoon.<sup>10</sup>

Punatalvion alkaloidien, erityisesti vinblastiinin ja vinkristiinin, merkitys syövän hoidossa on tehnyt punatalviosta yhden tutkituimmista lääkekasveista.<sup>1,2</sup> Biosynteettisen reitin, joka vastaa näiden monimutkaisten luonnontuotteiden valmistumisesta, löytämisellä ja muokkaamisella on keskeinen merkitys näiden arvokkaiden alkaloidien saatavuuden parantamisessa. ScRNA-seq-datan saatavuus paljastaa, kuinka biosynteettiset elementit

ilmentyvät tietyissä solutyypeissä. Tämä muuttaa perusteellisesti tapaa, jolla selvitetään ja suunnitellaan kasvipohjaisten luonnontuotteiden biosynteettisiä reittejä.<sup>1</sup> Vu et al. ryhmän tutkimuksessa käytetty scMS-työprosessi on yhteensopiva erilaisten massaspektrometrialaitteiden kanssa, mikä tekee menetelmästä helposti käytettävän monissa laboratorioissa.<sup>1</sup>

Yksittäisiin soluihin kohdistuva yksittäissolusekvensointi paljastaa geneettisen monimuotoisen heterogeenisyyden eri solujen välillä.<sup>9</sup> Yksittäissolujen RNA-sekvensoinnin (scRNA-seq) avulla pystytään tunnistamaan kasvin erilaisia solutyyppejä ja kehitysvaiheita. ScRNA-seq on mullistanut transkriptomiikan mahdollistamalla yksittäisten solujen tunnistamista ja solujen heterogeenisyyden syvällisempää ymmärtämistä. ScRNA-seq-teknologia on mahdollistanut jokaisen yksittäisessä solussa olevan transkription karakterisoinnin korkean läpäisykyvyn transkriptomisekvensoinnin avulla. Kasvitutkimuksissa scRNA-seq:ta on käytetty erilaisten kasv kudosten, kuten lehtien, juurien ja varsien tutkimiseen.<sup>9</sup>

#### **4.1 Kasvin eri osien yksisoluanalyysi**

Vu et al. ryhmän tutkimuksessa selvitettiin punatalvion yksittäisissä soluissa olevien luonnonaineiden molekyylien pitoisuudet.<sup>1</sup> Tutkimuksessa tunnistettiin ja kvatifioitiin yksiselitteisesti 16 eri molekyyliä ja niiden pitoisuudet punatalvion lehdistä, juurista ja terälehdistä hyödyntäen scMS-menetelmää.<sup>1</sup> Tutkimuksessa havaittiin, että luonnostaan syntyvä yhdiste, vinblastiini, tuotetaan vain kolmessa lehtisolutyypissä.

Tämän scMS-analyysin päätulos osoitti selvästi, että punatalvion eri osat (lehdet, juuret ja terälehdet) varastoivat metaboliitteja eri tavalla solutyypin tasolla.<sup>1</sup> Tässä tutkimuksessa keskityttiin vain 16 yhdisteeseen, jotka edustavat vain pientä osaa punatalvion luonnontuoteprofiilista. Analyysi osoitti kuitenkin, että kaikissa kudoksissa on soluja, jotka erikoistuvat monoterpeeni-indoli alkaloidien kertymiseen.<sup>1</sup>

Tutkimuksen tuloksista havaittiin, että lehtien scMS-data osoitti kolme pääasiallista solupopulaatiota, jotka vastasivat suurilta osin scRNA-seq-datan tuloksia.<sup>1</sup> Lisäksi havaittiin, että osa alkaloideista (esim. katarantiini) kulkeutuivat toiseen solutyyppiin. Yleisesti ottaen tutkimuksessa huomattiin, että scRNA-seq-datan ja scMS-datan vertailu viittaa vahvasti monien aktiivisten solujen välisten kuljetusprosessien olemassaoloon.<sup>1</sup> Toistaiseksi punatalviosta on tunnistettu vain yksi solujen välinen kuljettajaproteiini, joka vastaa logaanihapon siirtymisestä IPAP-soluista epidermisen soluihin. Näin ollen scMS-data ja scRNA-seq-data luovat pohjan uusien kuljettajaproteiinien löytämiselle.<sup>1</sup>

Tutkimuksessa kohdennettu scMS-data osoitti, että yksittäiset solut voivat kerätä poikkeuksellisen korkeita (>100 mM) pitoisuuksia monista luonnontuotteista. Useimpien korkeisiin pitoisuuksiin kertyvien metaboliittien, kuten sekologaniin ja vindoliinin, ennustetaan sijaitsevan vakuolissa, mikä korostaa tämän soluelimen varastointikykyä.<sup>1</sup>

Alkaloidien biosynteettiset välituotteet ovat epävakaita, mutta niitä ei havaittu tutkimuksen scMS-kokeissa.<sup>1</sup> Sekä kohdennettu että kohdentamaton massaspektrometria viittasivat tutkimuksessa siihen, että suurin osa alkaloideista kertyy erikoistuneisiin soluihin, jotka muodostavat vain pienen osan koko solupopulaatiosta. Lääketieteellisesti arvokkain alkaloidi, vinblastiini, esiintyy mikromolaarisina pitoisuuksina vain pienessä osassa tutkituista soluista.<sup>1</sup> Vaikka yksittäissolusekvensointi on nykyään laajalti käytössä kasveissa, metaboliittien tarkka rakenteellinen karakterisointi ja kvantifiointi yksittäisissä soluissa on osoittautunut haastavaksi.<sup>1</sup>

Cai et al. ryhmän tutkimuksessa analysoitiin punatalvion kasvin eri soluja.<sup>2</sup> Tulokset osoittivat, että vindoliini ja katarantiini ovat peräisin lehtien ylä- ja alapuolen epidermisen soluista. Nämä yhdisteet muodostavat sekoituessaan anhydrovinblastiinia.<sup>2</sup> Tutkimuksessa havaittiin, että katarantiini ja vindoliini olivat paikallisesti erillään eri soluissa punatalvion lehdessä. Lisäksi tutkimuksessa havaittiin, että kasvin maanpäällisen ja maanalaisen osien metaboliitit eroavat toisistaan.<sup>2</sup>

Tämän tutkimuksen tuloksena todettiin, että pintamuokattu mikroneula voisi toimia näytteenottokärkenä yksittäissolujen metaboliittien havaitsemisen parantamiseksi.<sup>2</sup> Yksittäissolujen näytteenotto osoitettiin havaitsemalla metaboliitteja eri soluista punatalvion varresta ja juuresta. Lisäksi analysoitaessa lehtien ylä- ja alaosan soluja, havaittiin, että yläosan solut tuottavat katarantiinia ja alaosan solut puolestaan vindoliinia.<sup>2</sup>

#### 4.1.1 Lehden ja terälehtien yksisoluanalyysi

Vu et al. ryhmän tutkimuksessa käytetty kromatografiamenetelmä optimoitiin alkaloidien, iridoidien ja fenyylipropanoidien luonnonaineiden havaitsemiseen.<sup>1</sup> Lehtiprotoplastien analyysissä havaittiin, että pieni määrä soluja oli voimakkaasti rikastunut alkaloideilla, kun taas suuremmissa osassa soluja kertyi flavonoideja, sekologaniinia ja matalampia alkaloidipitoisuuksia. Analyysi toistettiin juuri- ja terälehtiprotoplasteilla, jonka tulokset osoittivat myös, että osa soluista oli erikoistunut alkaloidien kertymiseen.<sup>1</sup>

Tuloksista havaittiin, että monissa soluissa seurattavien yhdisteiden pitoisuudet olivat millimolaarisella tasolla. Tutkimuksen perusteella iridoidimonoterpeeni, sekologaniini, oli selvästi runsain luonnonaine, joka havaittiin koko lehtikudoksessa ja sen pitoisuus vaihteli

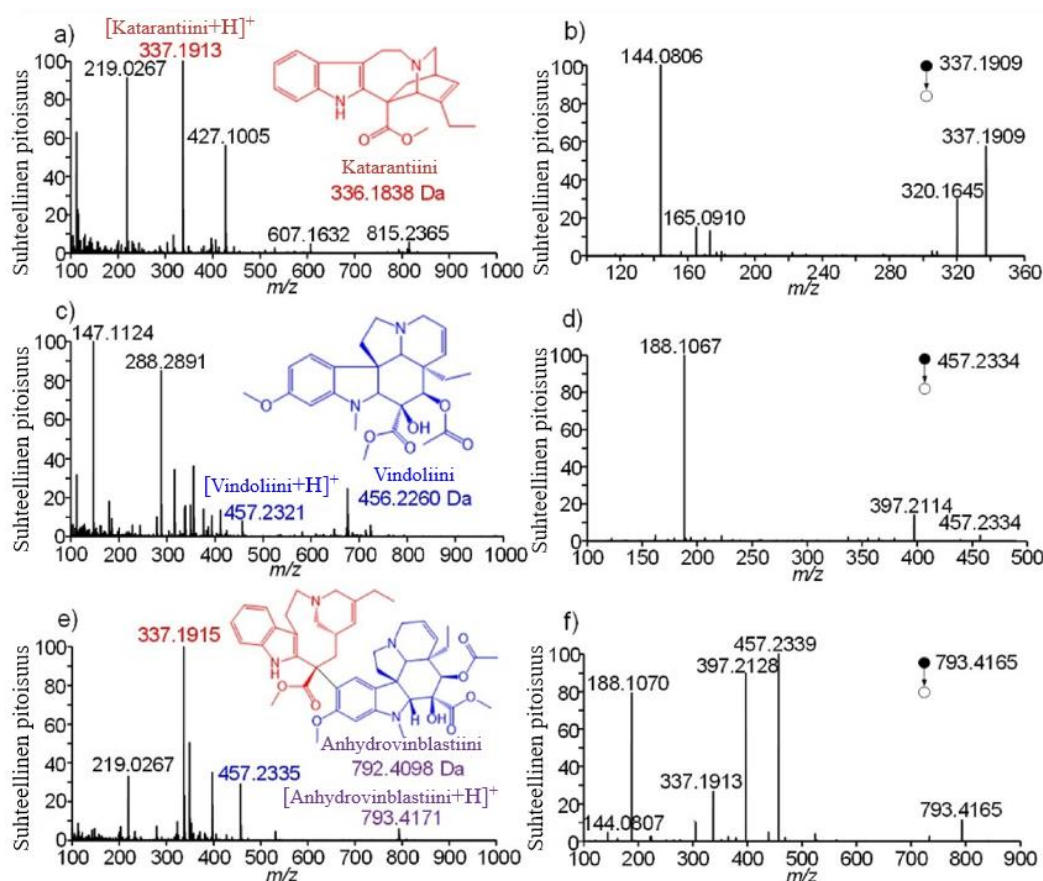
50–600 mM välillä. Anhydrovinblastiini oli huomattavasti harvinaisempi lehdissä, ja sen pitoisuus vaihteli välillä 300  $\mu\text{M}$  – 10 mM pienemmässä määrässä soluja.<sup>1</sup> Vinblastiinin maksimi pitoisuus oli tulosten perustella 100  $\mu\text{M}$  ja se havaittiin vain yhdestä näytteestä.

Tutkimuksessa havaittiin kudostyyppien välillä suurta vaihtelua kaikkien kvantifioitujen yhdisteiden pitoisuuksissa.<sup>1</sup> Lisäksi havaittiin, että muutamat lehti- ja juurisolut sisälsivät yli 100 mM katarantiinia, vaikka sen maksimipitoisuus liuoksissa on normaalisti noin 20 mM. Tämä voi johtua siitä, että eutektinen liuotin auttaa tiettyjen metabolisten aineiden liukenemisessä kasveissa.<sup>1</sup>

Idioblastit ovat harvinainen solutyyppi, mutta ne keräävät suurimman osan alkaloideista.<sup>1</sup> Tämän vuoksi scMS-tiedot korostavat, että korkeat alkaloidipitoisuudet, jotka havaitaan massakudoksessa, johtuvat hyvin harvoista erikoistuneista soluista, jotka sisältävät suuria määriä näitä yhdisteitä. Vaikka geenin ilmentymistiedot osoittavat, että katarantiini syntetisoituu epidermissolussa, se kertyy lähes täysin idioblastisoluihin. Tämä viittaa siihen, että on olemassa tehokas kuljetusmekanismi, mikä kuljettaa katarantiinin epidermissoluilta idioblastisoluihin.<sup>1</sup>

Terälehdistä havaittiin, että ne sisältävät kaikkia luonnonaineita, flavonoideja, antosyaaneja, iridoideja ja alkaloideja.<sup>1</sup> Terälehdistä peräisin olevissa soluissa havaittuja metaboliitteja tai näiden metaboliittien biosynteettisiä välimuotoja saatetaan syntetisoida kukkien kehityksen eri vaiheissa, tai vaihtoehtoisesti nämä yhdisteet voivat kulkeutua muista kudoksista.<sup>1</sup>

Cai et al. ryhmän tutkimuksessa havaittiin katarantiinin ja vindoliinin erilaiset reaktiot, mitkä viittaavat siihen, että ylä- ja alaosan epidermoksen soluissa on merkittäviä eroja.<sup>2</sup> Tästä syystä punatalvion lehtien pinnan solujen suora analyysi olisi parempi tapa ymmärtää anhydrovinblastiinin muodostumista lehdissä. Protonoitu katarantiini löytyi yläosan epidermoksen solusta, jossa vindoliinia ei havaittu. Kun lehtien alaosan solujen metaboliitteja uutettiin, protonoitu vindoliini havaittiin sen sijaan, että olisi löytynyt katarantiinia. Kun katarantiini ja vindoliini sekoitetaan, anhydrovinblastiini voi muodostua nopeasti entsyymien vaikutuksesta. Nämä tulokset osoittavat, että pintamuokattu mikroneula voi olla hyödyllinen yksittäissolujen metaboliittien seuraamisessa.<sup>2</sup> Kuvassa 4 on esitetty punatalvion lehden yksisolujen metaboliittien massaspektrejä.



Kuva 4. Punatalvion lehden yksisolujen metaboliittien massaspektrit: a) yläpinnan solu, b) katarantiinin MS/MS-spektri, c) alapinnan solu, d) vindoliinin MS/MS-spektri, e) koko poikkileikkaus, f) anhydrovinblastiinin MS/MS-spektri. Kuva on mukailtu Elsevierin luvalla International Journal of Mass Spectrometry lehden julkaisemasta artikkelista, vol. 473 2022, Shen-Hui Cai, Weini Chen, Dandan Di, Zi-Cheng Yuan, Ru Jiang, Wei Gao, Bin Hu, ”Probing the Formation of Anhydrovinblastine in *Catharanthus Roseus* by Single-Cell Mass Spectrometry” (4) kuvasta 4.<sup>2</sup> Copy-right © 2025 Elsevier.

#### 4.1.2 Juuren ja varren yksisoluanalyysi

Vu et al. ryhmän tutkimuksessa vertailtiin scMS-profiileja juuren ja lehtien kudosten välillä. Kuten lehdissä, juurissa on solualaryhmiä, jotka erikoistuvat alkaloidien keräämiseen (esim. katarantiini). Tuloksissa havaittiin juurille spesifinen alkaloidi, hörhammercine.<sup>1,12</sup> Tätä ei kuitenkaan pystytty kvantifioida tarkasti, mutta pystyttiin varmasti määrittämään, että tämä alkaloidi esiintyy samassa paikassa katarantiinin kanssa. Tämä tukee havaintoa, että alkaloidit kerääntyvät erikoistuneisiin solutyyppeihin juurissa, kuten lehdissä.<sup>1</sup>

Cai et al. ryhmän tutkimuksessa käytettiin hyväksi mikroneulaa näytteiden ottoon, joissa havaittiin, että punatalvion varren pintasoluista otetut näytteet sisälsivät katarantiinia ja vindoliinia.<sup>2</sup> Juuren pintasoluista otetusta näytteestä havaittiin katarantiinia, mutta ei vindoliinia. Nämä tulokset vahvistivat, että katarantiini jakautuu kasvin maanpäällisiin ja maanalaisiin osiin, kun taas vindoliini kertyy vain maanpäällisiin osiin. Nämä tulokset

osoittivat myös, että metallinen mikroneula voi olla hyödyllinen yksittäissolujen metaboliittien havaitsemisessa.<sup>2</sup>

## 4.2 Käytettävyys biosynteesin tutkimuksessa

ScMS tarjoaa tehokkaan ja tarkasti kohdennettavan menetelmän kasvien biosynteesireittien tutkimiseen solutasolla.<sup>1</sup> Punatalvion alkaloidien biosynteesin analysoinnissa scMS mahdollisti katarantiinin ja vindoliinin solukohtaisen paikantamisen sekä niiden yhdistymisen anhydrovinblastiiniksi.

Perinteisiin analyysimenetelmiin verrattuna scMS tarjoaa useita etuja biosynteesin tutkimuksessa.<sup>5</sup> Menetelmä mahdollistaa suoran ja reaaliaikaisen analyysin ilman monimutkaista näytteen esikäsittelyä, mikä vähentää analyysiin liittyviä häviöitä ja vääristymiä. Yksisolutarkkuus mahdollistaa biosynteesireittien paikallisen järjestäytymisen tarkastelun, mikä erityisen tärkeää kasveissa, joissa eri solutyypit vastaavat eri biosynteesin vaiheista.<sup>1</sup>

Kehitetyt pintakäsitellyt mikroneulat paransivat ultra-pienten metaboliittimäärien eristämistä, joka mahdollistaa biosynteesiväliuotteiden, kuten anhydrovinblastiinin, tarkan havaitsemisen. Tämä osoittaa, että scMS soveltuu erityisesti luonnonaineiden biosynteesin kartoitukseen ja voi auttaa tunnistamaan uusia entsyymejä sekä tekijöitä, jotka vaikuttavat biosynteesin tehokkuuteen.<sup>2</sup>

ScMS-menetelmän käyttö ei rajoitu vain punatalvion alkaloidien tutkimukseen, vaan sillä on laajempi potentiaali myös muiden bioaktiivisten yhdisteiden, kuten flavonoidien terpenoidien ja fenoliyhdisteiden, biosynteesin analysoinnissa.<sup>1</sup> Lisäksi yhdistettynä yksisolugenomiikan ja -transkriptomiikan menetelmiin scMS voi edistää geenien löytämistä ja metabolisen muokkauksen kehittämistä, mikä voi johtaa entistä tehokkaampiin lääkeaineiden tuotantostراتيجioihin.<sup>1</sup>

Menetelmän avulla pystytään myös tutkimaan bioaktiivisia molekyyliä elävissä järjestelmissä.<sup>1</sup> Perinteiset analyysimenetelmät vaativat laajoja näytteenkäsittelyvaiheita, jotka häiritsevät solun luonnollista metaboliaa. ScMS mahdollistaa suoran analyysin yksittäisistä soluista, säilyttäen solukohtaisen biokemiallisen profiilin, jonka avulla saadaan tarkkaa tietoa metaboliittien sijainnista ja pitoisuuksista.<sup>1</sup> ScMS:n soveltaminen elävien järjestelmien tutkimukseen mahdollistaa myös biosynteesin seurannan reaaliajassa.<sup>1</sup> Tämän avulla pystytään havainnoimaan biosynteesin muutokset eri ympäristötekijöissä ilman näytteiden käsittelyä. Tämä avaa uusia mahdollisuuksia esimerkiksi kasvien puolustusmekanismien, signaalireittien ja lääkekasvien tuotannon tutkimuksessa.<sup>1</sup>

### 4.3 Syöpälääkkeiden tuotannon optimointi

Syöpälääkkeinä käytetyt punatalvion alkaloidit ovat kemiallisesti vaikeasti syntetisoitavissa, joten niiden toimitusketju perustuu matalatuottoiseen esiasteiden, vindoliinin ja katarantiinin, uuttamiseen ja puhdistukseen kasvista.<sup>7</sup> Puhdistuksen jälkeen ne yhdistetään teollisessa mittakaavassa yksinkertaisella *in vitro* -kemiallisella kytkennällä ja pelkistyksellä. Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirasto (FDA) luokitteli vinkristiinin ja vinblastiinin vuonna 2019-2020 lääkkeiksi, joista on pulaa, joten tietoisuus näiden biosynteesin tuotannollistamisen tärkeydestä kasvoi.<sup>7</sup> Vinkristiiniä käytetään laajasti esimerkiksi kemoterapiassa.<sup>1</sup>

Vinblastiinin ja vinkristiinin biosynteesireitin syvällinen ymmärtäminen avaa uusia mahdollisuuksia syöpälääkkeiden tuotannon tehostamiseen. Näiden alkaloidien biosynteesi on osoitus punatalvion kyvystä tuottaa monimutkaisia ja lääketieteellisesti arvokkaita yhdisteitä.<sup>1</sup> ScMS-menetelmä mahdollistaa alkaloidien tuotannon optimoinnin punatalviosta. Alkaloidien monimutkainen biosynteesireitti ja alhaiset pitoisuudet punatalviossa tekevät lääkkeitä kalliita ja hankalasti saatavia.<sup>1</sup>

ScMS-menetelmällä pystyttiin analysoimaan tarkasti biosynteesin vaiheet, ja näin tunnistamaan biosynteesin rajoittavat tekijät. Nämä tunnistamalla pystytään optimoimaan entsyymien aktiivisuutta ja näin tehostaa lääkeaineiden tehokkaampaa tuotantoa kasveissa tai muokatuissa mikro-organismeissa.<sup>1,12</sup> Esimerkiksi vinblastiinin biosynteesissä entsyymejä voidaan ilmentää tunnistetuissa kohdesoluissa, jolloin lääkkeen saantoa pystytään kasvattamaan ilman, että kasvin muut metaboliareitit häiriintyvät. Lisäksi scMS-menetelmä mahdollistaa lääkekasvien tutkimisen erilaisissa kasvuolosuhteissa, kuten valon, ravinteiden ja stressitekijöiden vaikutuksen lääkeaineiden muodostumisessa. Tutkimalla näiden vaikutuksia lääkeaineiden tuotantoon, pystytään kehittämään optimaalinen kasvuympäristö ja tehostaa lääkeaineiden tuotantoa kasvissa ilman kemiallisia synteesiprosesseja.<sup>1</sup>

ScMS:n mahdollistama tarkka solukohtainen analyysi voi auttaa myös bioteknologisessa lääketuotannossa kehittämään geenimunneltuja kasveja tai mikrobisoluja, jotka pystyvät tuottamaan suurempia pitoisuuksia syöpälääkkeiden esiasteita, kuten vindoliinia tai katarantiinia.<sup>12</sup> Tutkimus esittelee, kuinka esiasteita voidaan tuottaa esimerkiksi hiivojen ja bakteerien avulla, mikä vähentäisi riippuvuutta kasveista, kuten punatalviosta, joiden luonnollinen alkaloidien tuotanto on hidasta ja tehotonta.<sup>12</sup> Yhdistämällä scMS-menetelmä muiden yksisoluteknologioiden (esim. scRNA-seq) kanssa, scMS-menetelmällä pystytään säätelemään entistä paremmin biosynteesireittiä ja auttaa kehittämään vielä tehokkaampia tapoja syöpälääkkeiden kestävään ja taloudelliseen tuotantoon.<sup>12</sup>

## 5 Johtopäätökset

Yksisolumaspektrometria (scMS) on laajasti hyödynnetty menetelmä punatalvion (*Catharanthus roseus*) alkaloidien biosynteesin ja solukohtaisen jakautumisen tutkimuksessa. ScMS:n avulla on mahdollista saada tarkka ja paikallisesti eritelty kuva alkaloidien jakautumisesta kasvin eri solutyypeissä, minkä avulla saadaan uutta tietoa luonnontuotteiden biosynteesin solukohtaisista mekanismeista. Tutkimukset ovat osoittaneet, että vinblastiinin ja vinkristiinin biosynteesireitti on monimutkainen ja siihen osallistuu monia solutyyppejä.

ScMS-menetelmällä on saatu selville alkaloidien solukohtainen jakautuminen punatalvion lehtien, juurien ja varren välillä. Tulokset ovat vahvistaneet, että alkaloidien biosynteesireitit ovat tarkasti säädeltyjä prosesseja ja paikallisesti jakautuneita.

Syöpälääkkeiden tuotannon optimoinnin näkökulmasta yksisolumaspektrometria tarjoaa lupaavan lähestymistavan tehokkaampien tuotantostrategioiden kehittämiseen, sillä menetelmä mahdollistaa biosynteesireittien yksityiskohtaisen tarkastelun ja niiden tehostamisen. Biosynteesiä voidaan tehostaa esimerkiksi mikrobiperäisten tuotantojärjestelmien avulla. Mikrobien hyödyntäminen voi lisätä vinblastiinin ja vinkristiinin tuotantotehokkuutta kasvissa sekä vähentää kasvien viljelyyn liittyviä haasteita.

Yksisolumaspektrometria on avannut paljon uusia mahdollisuuksia ja etuja, mutta menetelmän kehittämiseen liittyy vielä paljon haasteita, kuten analyysien toistettavuus, herkkyys ja mittakaavan laajentaminen. Menetelmän yhdistäminen muihin yksisoluteknologioihin, kuten yksisolugenomiikkaan ja -transkriptomiikkaan voisi parantaa scMS:n sovellettavuutta.

Yksisoluanalyysi, erityisesti scMS, on nopeasti kehittyvä teknologia, joka avaa uusia mahdollisuuksia biotieteissä, lääketutkimuksessa ja bioteknologiassa. ScMS-menetelmän tarkkuus ja herkkyys on mahdollistanut solukohtaisen tutkimuksen, mikä on edistänyt muun muassa luonnonaineiden biosynteesin, lääkekehityksen ja solutason biokemian tutkimusta<sup>1</sup>. Tulevaisuudessa scMS tulee yhä enemmän käyttöön yhdessä muiden yksisoluteknologioiden kuten yksisolugenomiikan, -transkriptomiikan ja -proteomiikan kanssa. Tämä mahdollistaa vielä monipuolisemman solukohtaisen analyysin, jossa voidaan yhdistää geneettinen ja metaboliittitieto, ja näin tutkia tarkemmin biosynteesireittien säätelymekanismeja.<sup>2</sup>

Toinen kehityssuunta scMS:ssa on reaaliaikaisen ja *in vivo* -analyysin parantaminen, sillä tällä hetkellä scMS usein hajottaa solun analyysia varten. Tulevaisuudessa kehittyneempi menetelmä voisi mahdollistaa metaboliittien seuraamisen elävissä soluissa ilman näytteen

häiriintymistä.<sup>1</sup> Tämän ansiosta pystyttäisiin esimerkiksi tutkia metaboliittimuutoksia kasveissa stressivasteissa, soludifferentiaatioissa ja kasvien puolustusmekanismeissa.

Yksisoluanalyysin haasteiden ratkaisemiseksi tarvitaan entistä kehittyneempiä solueristysmenetelmiä, herkkiä massaspektrometritekniikoita ja parempia laskennallisia analyysityökaluja.<sup>9</sup> Automaatio, tekoälypohjainen data-analyysi ja mikrofluidiset järjestelmät voivat tulevaisuudessa parantaa menetelmän tarkkuutta ja toistettavuutta. Lisäksi yksisoluanalyysin yhdistäminen paikalliseen transkriptomiikkaan voisi auttaa parantamaan tietoa solukohtaisesta metaboliasta kasveissa ja muissa biologisissa järjestelmissä.<sup>9</sup>

ScRNA-seq:n jatkuva käyttö eri kasvilajeissa osoittaa lupaavia näkymiä yksittäissolujen transkriptomiikan tulevalle käytölle viljelykasveissa, mikä voi vaikuttaa soveltavaan kasvitutkimukseen ja edistää nykyisten ja tulevien maatalousjärjestelmien kehitystä.<sup>9</sup>

Yksittäissolujen proteomiikka on nouseva ala, jonka tavoitteena on tunnistaa ja kvantifioida yksittäisten solujen proteomi. Näiden teknologioiden peruseriaate sisältää yksittäisten solujen eristämisen solukannasta, jonka jälkeen niiden proteiinisäilytys analysoidaan erilaisten massaspektrometriaan (MS) perustuvien menetelmien avulla.<sup>9</sup> Yksittäissolujen proteomiikan teknologiat ovat erityisen hyödyllisiä yksittäisten solujen biologisen heterogeenisyyden ja proteiiniexpression kuvien selvittämisessä, ja niillä on potentiaalisia sovelluksia syöpätutkimuksessa, regeneratiivisessa lääketieteessä, mikrobiekologiassa ja muilla aloilla.<sup>9</sup>

Menetelmän haasteista huolimatta, scMS on osoittautunut tehokkaaksi menetelmäksi punatalvion alkaloidien analysoinnissa. Sen avulla voidaan edistää syöpälääkkeiden tuotannon optimointia ja lisätä ymmärrystä luonnontuotteiden biosynteesistä kasveissa. Yksisolumasaspektrometrian käytettävyys ja tarkkuus tekevät menetelmästä tärkeän työkalun kasvimetabolomiikan ja farmaseuttisen tutkimuksen kehittämisessä. Tulevaisuudessa menetelmän kehittäminen ja soveltaminen laajemmin kasvimetabolomiikassa voi avata uusia mahdollisuuksia lääketuotannossa.

## 6 Viiteluettelo

- (1) Vu, A. H.; Kang, M.; Wurlitzer, J.; Heinicke, S.; Li, C.; Wood, J. C.; Grabe, V.; Buell, C. R.; Caputi, L.; O'Connor, S. E. Quantitative Single-Cell Mass Spectrometry Provides a Highly Resolved Analysis of Natural Product Biosynthesis Partitioning in Plants. *J Am Chem Soc* **2024**, *146* (34), 23891–23900. <https://doi.org/10.1021/jacs.4c06336>.
- (2) Cai, S. H.; Chen, W.; Di, D.; Yuan, Z. C.; Jiang, R.; Gao, W.; Hu, B. Probing the Formation of Anhydrovinblastine in *Catharanthus Roseus* by Single-Cell Mass Spectrometry. *Int J Mass Spectrom* **2022**, *473*. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2021.116793>.
- (3) Li, C.; Wood, J. C.; Vu, A. H.; Hamilton, J. P.; Rodriguez Lopez, C. E.; Payne, R. M. E.; Serna Guerrero, D. A.; Yamamoto, K.; Vaillancourt, B.; Caputi, L.; O'Connor, S. E.; Buell, C. R. Single-Cell Multi-Omics Enabled Discovery of Alkaloid Biosynthetic Pathway Genes in the Medical Plant *Catharanthus Roseus*. July 4, **2022**. <https://doi.org/10.1101/2022.07.04.498697>.
- (4) Zhu, X.; Zeng, X.; Sun, C.; Chen, S. Biosynthetic Pathway of Terpenoid Indole Alkaloids in *Catharanthus Roseus*. *Frontiers of Medicine in China*. Higher Education Press Limited Company September 1, **2014**, pp 285–293. <https://doi.org/10.1007/s11684-014-0350-2>.
- (5) Yamamoto, K.; Takahashi, K.; Mizuno, H.; Anegawa, A.; Ishizaki, K.; Fukaki, H.; Ohnishi, M.; Yamazaki, M.; Masujima, T.; Mimura, T. Cell-Specific Localization of Alkaloids in *Catharanthus Roseus* Stem Tissue Measured with Imaging MS and Single-Cell MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (14), 3891–3896. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521959113>.
- (6) Li, C.; Colinas, M.; Wood, J. C.; Vaillancourt, B.; Hamilton, J. P.; Jones, S. L.; Caputi, L.; O'Connor, S. E.; Buell, C. R. Cell-type-aware Regulatory Landscapes Governing Monoterpene Indole Alkaloid Biosynthesis in the Medicinal Plant *Catharanthus Roseus*. *New Phytologist* **2025**, *245* (1), 347–362. <https://doi.org/10.1111/nph.20208>.
- (7) Zhang, J.; Hansen, L. G.; Gudich, O.; Viehrig, K.; Lassen, L. M. M.; Schrübbers, L.; Adhikari, K. B.; Rubaszka, P.; Carrasquer-Alvarez, E.; Chen, L.; D'Ambrosio, V.; Lehka, B.; Haidar, A. K.; Nallapareddy, S.; Giannakou, K.; Laloux, M.; Arsovska, D.; Jørgensen, M. A. K.; Chan, L. J. G.; Kristensen, M.; Christensen, H. B.; Sudarsan, S.; Stander, E. A.; Baidoo, E.; Petzold, C. J.; Wulff, T.; O'Connor, S. E.; Courdavault, V.; Jensen, M. K.; Keasling, J. D. A Microbial Supply Chain for Production of the Anti-Cancer Drug Vinblastine. *Nature* **2022**, *609* (7926), 341–347. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05157-3>.
- (8) Yang, Y.; Huang, Y.; Wu, J.; Liu, N.; Deng, J.; Luan, T. Single-Cell Analysis by Ambient Mass Spectrometry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. May 1, **2017**, pp 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.02.009>.
- (9) Rhaman, M. S.; Ali, M.; Ye, W.; Li, B. Opportunities and Challenges in Advancing Plant Research with Single-Cell Omics. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Beijing Genomics Institute April 1, **2024**. <https://doi.org/10.1093/gpbjnl/qzae026>.

- (10) Katam, R.; Lin, C.; Grant, K.; Katam, C. S.; Chen, S. Advances in Plant Metabolomics and Its Applications in Stress and Single-Cell Biology. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI July 1, **2022**. <https://doi.org/10.3390/ijms23136985>.
- (11) Liang, S.; Li, Y.; Chen, Y.; Huang, H.; Zhou, R.; Ma, T. Application and Prospects of Single-Cell and Spatial Omics Technologies in Woody Plants. *Forestry Research*. Maximum Academic Press **2023**. <https://doi.org/10.48130/FR-2023-0027>.
- (12) Li, C.; Wood, J. C.; Vu, A. H.; Hamilton, J. P.; Rodriguez Lopez, C. E.; Payne, R. M. E.; Serna Guerrero, D. A.; Gase, K.; Yamamoto, K.; Vaillancourt, B.; Caputi, L.; O'Connor, S. E.; Robin Buell, C. Single-Cell Multi-Omics in the Medicinal Plant *Catharanthus Roseus*. *Nat Chem Biol* **2023**, *19* (8), 1031–1041. <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01327-0>.