

UiT

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Norges Fiskerihøgskole

Antimikrobielle peptider i O-skjell, *Modiolus modiolus*

—
Inger Kristine Rødum

Masteroppgave i Marin bioteknologi (60 stp)

Mai 2015



Forord

Denne masteroppgaven i marin bioteknologi ble gjennomført ved Norges Fiskerihøgskole, UiT-Norges Arktiske Universitet, i perioden september 2014 til mai 2015. Veiledere har vært førsteamanuensis Tor Haug, professor Klara Stensvåg og post doc. Chun Li.

Først og fremst ønsker jeg å takke Tor og Klara for at dere har latt meg få gjennomføre dette spennende prosjektet i min masteroppgave. Tusen takk for all veiledningen dere har gitt meg under hele perioden både underveis i lab arbeidet og i skriveprosessen. Videre ønsker jeg å rette en stor takk til Chun for alle den gode veiledningen du ga meg under det molekylærbiologiske arbeidet. Jeg ønsker også å rette en takk til alle i forskningsgruppa, spesielt Hege, Runar og Ida, for at dere har vært behjelpelig med å svare på alle mine rare spørsmål, og for god opplæring ved bruk av diverse maskiner og utstyr.

Takk til alle dere som har vært med på å gjøre studietiden her ved UiT fantastisk. En spesiell takk til Silje for tre flotte år på biomedisin, og til Isabel for alle de litt for lange kaffepausene vi har hatt sammen gjennom studietiden.

Torunn, takk for at du har vært min fantastiske «klasse» gjennom de to siste årene. Din positivitet og engasjerende vesen har betydd utrolig mye for meg. Lykke til videre i den nye jobben!

Til slutt ønsker jeg å rette en stor takk til min fantastiske familie og min kjære samboer. Tusen takk for all støtte og motivasjon dere har gitt meg, og for at dere alltid har trua på meg.

Tromsø, mai 2015

Inger Kristine Rødum

Sammendrag

I en tidligere studie utført på O-skjell (*Modiolus modiolus*) har antimikrobiell aktivitet blitt påvist i en rekke vevstrakter, deriblant fra hemocytterne. En videreføring av dette arbeidet har ført til isoleringen av flere antimikrobielle peptider samt karakterisering av partielle N-terminale sekvenser. Dette masterprosjektet har hatt som hensikt å følge opp disse funnene ytterligere ved å påvise og karakteriserer antimikrobielle peptider samt gener som koder for disse i O-skjell.

I denne oppgaven har forskjellige vev/organer samt blodvæsken og blodcellene blitt separert og ekstrahert, og videre testet for antimikrobiell aktivitet. Interessante ekstrakter har videre blitt analysert ved ESI-MS for påvisning av peptider. I tillegg til dette har RNA blitt isolert fra hemocytterne til O-skjell for karakterisering av cDNA sekvenser kodende for antimikrobielle peptider. Denne karakteriseringen ble gjort med utgangspunkt i de partielle N-terminale sekvensene fra de tidligere isolerte peptidene fra O-skjell.

Antimikrobiell aktivitet ble, i denne oppgaven, påvist i forskjellige ekstrakter fra samtlige vev testet, hvorav hemocytterne viste høyest antimikrobiell aktivitet totalt sett. Høy aktivitet ble også sett i kappen. Analyser ved ESI-MS på aktive ekstrakter og HPLC-fraksjoner indikerte tilstedeværelsen av både tidligere isolerte antimikrobielle peptider samt andre peptider som ikke har vært påvist tidligere i O-skjell.

I tillegg til dette ble to cDNA-sekvenser karakterisert ved isolering av RNA fra hemocytterne. Disse cDNA sekvensene koder for to peptider på 115 og 81 aminosyrer, og har en antatt molekylvekt på henholdsvis 12,3 og 9,0 kDa. Peptidene samsvarte ikke fullstendig med de tidligere isolerte antimikrobielle peptidene fra O-skjell, men viste en høy sekvenslikhet med deres N-terminale sekvenser. Dette, samt det faktumet at disse peptidene inneholder en rekke karakteristika som samsvarer med hva som er sett for andre antimikrobielle peptider, indikerer at disse peptidene kan være antimikrobielle. Homologisøk viste at ingen av disse peptidene er beskrevet tidligere, og at det ene peptidet med stor sannsynlighet tilhører en proteinfamilie bestående av en rekke antimikrobielle peptider.

Abstract

In a previous study performed on the marine horse mussel (*Modiolus modiolus*) antimicrobial activity was observed in a variety of tissue extracts, including the haemocytes. A continuation of this work has led to the isolation of several antimicrobial peptides and characterization of partial N-terminal sequences.

The aim of this master project was to follow up these findings by detecting and characterizing antimicrobial peptides and genes that encode them. In this project, various tissues/ organs, as well as blood fluid and blood cells, were separated and extracted from the horse mussel and further tested for antimicrobial activity. Interesting extracts were further analysed by ESI-MS for detection of peptides. RNA was also isolated from the haemocytes of the horse mussel for the characterization of cDNA sequences encoding antimicrobial peptides. This characterization was based on the partial N-terminal sequences from previously isolated peptides from the horse mussel.

In this study antimicrobial activity was observed in various extracts from all tissues tested, where the haemocytes showed the highest antimicrobial activity overall. High activity was also observed in the mantle. Analysis by ESI-MS on active extracts and HPLC fractions indicated the presence of both previously isolated antimicrobial peptides and other peptides, which had not previously been described in the horse mussel.

Two cDNA sequences were also characterized in this study by isolation of RNA from the haemocytes. These cDNA sequences encode two peptides of 115 and 81 amino acids, and have predicted molecular weights of 12,3 and 9,0 kDa, respectively. These peptides did not fully match with the previously isolated antimicrobial peptides from the horse mussel, but showed high sequence similarity with their partial N-terminal sequences. This and the fact that these peptides contain a number of characteristics normally seen in antimicrobial peptides, indicates that these peptides may be antimicrobial. Homology searches revealed that none of these peptides are previously described, and that one peptide shows a conserved domain indicating that it belongs to a protein family containing a number of known antimicrobial peptides.

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Sammendrag	III
Abstract	IV
Innholdsfortegnelse	V
Forkortelser	VII
1 Innledning.....	1
1.1 Det marine miljø - en kilde til fremtidens medisiner	1
1.2 Behovet for nye antimikrobielle komponenter.....	3
1.3 Antimikrobielle peptider	3
1.4 Antimikrobielle peptider hos bløtdyr og muslinger	7
1.5 Mål for oppgaven	10
2. Bakgrunn	11
2.1 Muslinger	11
2.2 Metodiske prinsipper i oppgaven.....	12
3. Materialer og metoder	22
3.1 Materialer	22
3.2 Metodeforløp for separasjon og påvisning av antimikrobielle peptider	24
3.3 Prøvetakning.....	25
3.4 Ekstraksjon og grov separasjon av materiale	25
3.5 Preparativ RP-HPLC.....	26
3.6 Massespektrometri.....	27
3.7 Antimikrobiell testing	28
3.8 Metodeforløp for identifisering og karakterisering av cDNA-sekvenser	31
3.9 Isolering av RNA.....	32
3.10 Syntese av cDNA	33
3.11 Design av primere	34
3.12 PCR for amplifisering av cDNA fra ønsket sekvens	36
3.13 Ekstraksjon og rensing av PCR-produkter	38
3.14 Ligering og transformasjon	39
3.15 Isolering av plasmid	40

3.16	Sekvensering av isolerte plasmid	41
3.17	Bioinformatiske analyser	42
4.	Resultater	44
4.1	Utbytte fra ekstrahering av materiale	44
4.2	Antimikrobiell aktivitet	45
4.3	Preparativ HPLC av SPE eluater	48
4.4	Innledende karakterisering av peptider	50
4.5	RNA fra hemocytter i O-skjell	55
4.6	Gensekvenser som koder for antimikrobielle peptider	56
4.7	cDNA- og peptidsekvenser fra hemocytter i O-skjell	59
4.8	Strukturpredikasjon av antimikrobielle peptider fra O-skjell.....	67
5.	Diskusjon	69
5.1	Ekstraksjon og utbytte av materiale fra hemocytter	69
5.2	Antimikrobiell aktivitet	69
5.3	Tilstedeværelse av tidligere isolerte antimikrobielle peptider	71
5.4	OS-12_2 og OS-24_2, to nye antimikrobielle peptider i O-skjell.....	72
5.5	Tilstedeværelse av hittil ukjente peptider i O-skjell.....	77
5.6	Videre arbeid	79
6.	Konklusjoner.....	80
7.	Referanser	81
	Appendiks.....	a

Forkortelser

ACN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielle peptider
APD	The antimicrobial peptide database
AU	Absorbansenheter (Absorbance units)
BLAST	Basic local alignment search tool
CDD	Conserved domain database
cDNA	Komplementært DNA (complementary DNA)
ddNTP	dideoksynukleotid trifosfat
dNTP	deoksynukleotid trifosfat
EMBL-EBI	European Bioinformatics institute
ESI-MS	Elektrospray ionisering- MS
EtBr	Etylbromid
EtOH	Etanol
ExpPASy	Expert Protein Analysis system
HPLC	Høytrykksvæskeskromatografi (High pressure liquid chromatography)
LA	Luria agar
LB	Luria broth
m/z	Masse / ladning
MH	Müller Hinton
MIC	Minste inhiberende konsentrasjon (Minimal inhibition concentration)
mRNA	budbringer RNA (messenger RNA)
MS	Massespektrometri
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Optisk tetthet (Optical density)
PCR	Polymerasekjedereaksjon (Polymerase chain reaction)
PDA	Fotodiode array (photodiode array)
PSI-BLAST	Position specific iterated - BLAST
RP-HPLC	Revers fase – HPLC
RNase	Ribonuklease
rRNA	Ribosomalt RNA
SPE	Fast-fase ekstraksjon (Solide phase extraction)
TAE	Tris-acetate-EDTA
TFA	Trifluoreddiksyre (trifluoroacetic acid)
TIC	Total ione strøm (total ion current)
UTR	Ikke-translatert region (Untranslated region)
UV	Ultrafiolett (ultra violet)
UV-Vis	Ultrafiolett-synlig lys (Ultraviolet-Visual)
Z	Ladning

1 Innledning

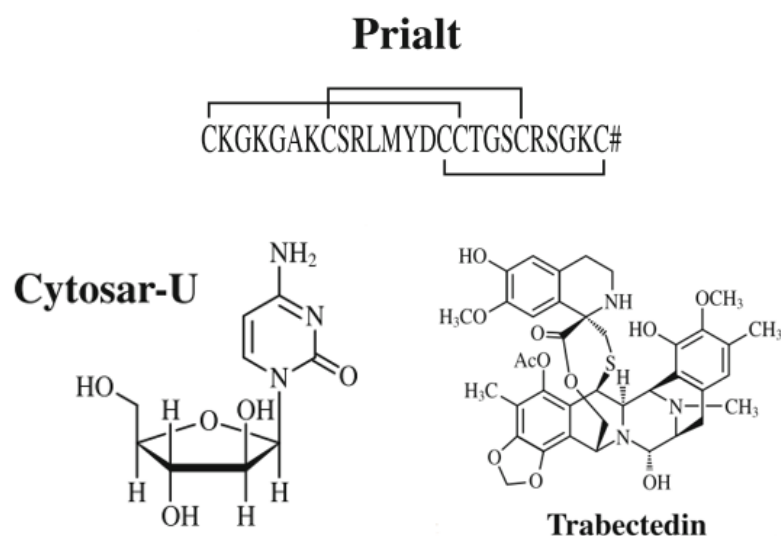
1.1 Det marine miljø - en kilde til fremtidens medisiner

Mennesker har lange tradisjoner med å se mot naturen på jakt etter stoffer med helbredende effekt, og en lang rekke av dagens medisiner kan spores tilbake til urgamle tradisjoner og tilfeldige oppdagelser. De tidligste skriftene som viser bruk av planter i tradisjonell medisin stammer fra et av de tidligste samfunnene, Mesopotamia, hvor over 1000 plantederiverte substanser er beskrevet. Også gamle egyptiske, kinesiske og greske skrifter viser til bruken av planter til medisinsk bruk (Cragg og Newman, 2013). Denne bruken av naturprodukter fra det terrestriske miljø har også vært viktig for utviklingen av den moderne medisin. Aktive komponenter har vært isolert fra blant annet planter og mikrober og gitt opphav til viktige medisiner som blant annet morfin og penicillin (Molinski *et al.*, 2009, Lewis, 2013). Til tross for den viktige rollen naturprodukter har hatt for utviklingen av nye medisiner har fokuset hovedsakelig vært på naturprodukter isolert fra landjorda, mens det marine miljøet har vært relativt lite utforsket (Molinski *et al.*, 2009).

Den marine biodiversiteten er estimert til å utgjøre omtrent halvparten av den globale biodiversiteten. I tillegg er langt fra alle marine arter i dag kartlagt. Så mange som 32 av de 33 animalske rekkene er representert i akvatiske miljø, og av disse finnes 15 kun i havet (Cragg og Newman, 2013). Havet blir ofte betegnet som livets «vugge», og inneholder alt fra de mest primitive organismene til mer kompliserte pattedyr. Denne enorme variasjonen av organismer er spredt utover de enorme verdenshavene, og organismer i havet er funnet på de mest utenkelige plassene; fra enorme dyp til de kaldeste ishavene (Mecklenburg *et al.*, 2011, Karleskint *et al.*, 2013). For å kunne leve på alle disse ulike områdene har forskjellige marine arter utviklet et bredt spekter av sekundære metabolitter, for å overleve de utfordringene de møter i sitt miljø (Houssen og Jaspars, 2006). Resultatet av dette er at det marine miljø inneholder et enormt spekter av komponenter som kan ha et kommersielt potensiale for oss mennesker. Den systematiske jakten på disse komponentene er selve definisjonen på marin bioprospektering.

I 1951 ble to nukleosider isolert fra den marine svampen *Tethya crypta* (Molinski *et al.*, 2009, de Jesús Paniagua-Michel *et al.*, 2015). Disse komponentene ga opphav til de to første marineriverte legemidlene Cytosar-U® og Vira-A, godkjent i henholdsvis 1969 og 1979, som

et antikreft og et antiviralt legemiddel (de Jesús Paniagua-Michel *et al.*, 2015). Selv om disse komponentene var relativt tidlig ute på markedet tok det lang tid før det neste marinderiverte legemiddelet ble godkjent. I 2004 ble ziconotide godkjent. Dette legemiddelet er et syntetisk ekvivalent av et neurotoksin først isolert fra det marine bløtdyret, *Conus magus*, i 1979 (Olivera *et al.*, 1985, de Jesús Paniagua-Michel *et al.*, 2015), og brukes i dag til behandling av koniske rygg smerter under navnet Prialt® (Molinski *et al.*, 2009). Etter dette har flere marinderiverte legemidler blitt godkjent, deriblant de tre kreftlegemidlene Yondelis® (trabectedin), Halaven® og Adcetris®, som alle ble godkjent i perioden mellom 2005 og 2011 (Mayer og Glaser, 2014, de Jesús Paniagua-Michel *et al.*, 2015). I tillegg til disse godkjente legemidlene er en rekke legemidler med marint opphav under prekliniske og kliniske tester (Mayer *et al.*, 2010, de Jesús Paniagua-Michel *et al.*, 2015), og hvert år isoleres nye potente naturprodukter fra det marine miljø (Blunt *et al.*, 2012, 2015). Mye av fokuset er rettet mot å finne nye potensielle kreftmedisiner (Newman og Cragg, 2014), men i tillegg til dette er det også et behov for nye komponenter med en effekt mot en rekke andre sykdommer, deriblant bakterielle infeksjoner.



Figur 1 - Tre legemidler med marint opphav som i dag er godkjente legemidler. Bildene er hentet fra de Jesús Paniagua-Michel og medarbeidere (2015).

1.2 Behovet for nye antimikrobielle komponenter

Oppdagelsen av det første antibiotikumet, penicillin i 1928, ble ansett som en revolusjon innenfor behandlingen av bakterielle infeksjoner. Likevel tok det ikke lang tid fra det første antibiotikumet ble introdusert i 1936 før bakterier begynte å vise resistens mot det samme antibiotikumet i 1942 (Davies og Davies, 2010, Lewis, 2013). Antibiotikaresistens oppstår ved at bakterien spontant muterer eller mottar gener fra andre bakterier, og med tilstedeværelsen av slike gener oppnår de forskjellige mekanismer som gir dem evnen til å bekjempe antibiotikumet slik at det ikke kan gi sin virkning (Tenover, 2006, Blair *et al.*, 2015). En av strategiene for å motvirke disse endringene hos bakterien har vært å gjøre kjemiske modifikasjoner på allerede kjente antibiotika, men også mot flere av disse nye antibiotikaene har bakterier etter hvert begynt å opparbeide seg nye resistente mekanismer (Lewis, 2013). I dag er antibiotikaresistens et voksende problem, med stadige økninger i antall tilfeller av bakterielle infeksjoner som skyldes antibiotikaresistente bakterier (WHO, 2001, 2014). Det er derfor et behov for å finne nye typer antibiotika som har evnen til å virke på slike antibiotikaresistente bakteriestammer, og som det er lite tenkelig at bakteriene vil opparbeide resistens mot.

1.3 Antimikrobielle peptider

Allerede på slutten av 1800-tallet ble antimikrobiell aktivitet observert i sekreter, blod, leukocytter og lymfatiske vev. Senere ble flere av komponentene bak disse effektene isolert, deriblant antimikrobielle proteiner og peptider. Antimikrobielle peptider (AMP) ble sett i sammenheng med immunsystemet, og ble antatt å ha en forsterkende effekt ved eksponering til patogene mikroorganismer (Brogden, 2005). I dag anses AMP som viktige forsvarsmolekyler i det medfødte immunsystemet til de fleste levende organismer, som planter, invertebrater og vertebrater (Reddy *et al.*, 2004, Brogden, 2005). Denne tilstedeværelsen i de fleste levende organismer har gitt dem kallenavnet «naturens antibiotika» (Hancock og Sahl, 2006). Disse peptidene produseres derimot kun i små mengder i organismen, og flere lignende peptider med overlappende aktivitet ses ofte i én og samme organisme. Tilstedeværelsen av flere lignende AMP kan være nødvendig for den helhetlige antimikrobielle effekten til disse peptidene (Hancock og Patrzykat, 2002, Yeaman og Yount, 2003). Selve begrepet AMP omfatter en rekke peptider med forskjellige funksjoner, men brukes hovedsakelig om peptider med en effekt på patogene mikrober, som bakterier, virus, parasitter og sopp (Cruz *et al.*,

2014, Wang, 2015). Det er derimot også sett at AMP kan ha immunregulatoriske, sårhelende og antikreft egenskaper (Hancock og Sahl, 2006).

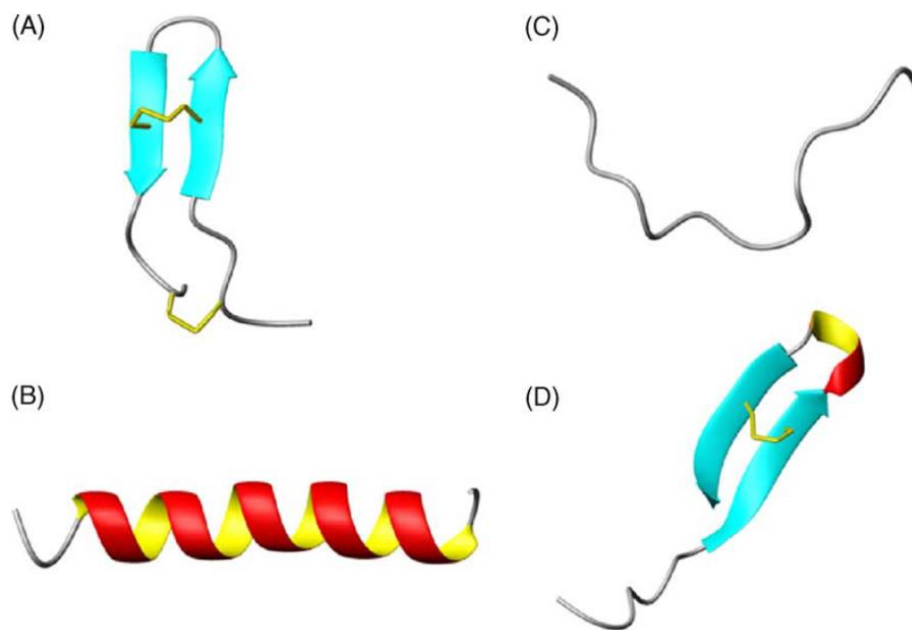
1.3.1 Generelle struktur og kjemisk sammensetning

AMP uttrykkes hovedsakelig fra organismens genom og gjennomgår som regel ett eller flere post-translasjonssteg før det gir opphav til det funksjonelle antimikrobielle peptidet (Hancock og Sahl, 2006, Fox, 2013). Peptidene er ofte relativt små molekyler (< 10 kDa), og er hovedsakelig positivt ladet med en amfipatisk natur (Cruz *et al.*, 2014). Aminosyresammensetningen til AMP er viktig både for struktur og virkning, og tilstedeværelsen av spesifikke aminosyrer, i en viss grad, vil være typisk for enkelte AMP (Mishra og Wang, 2012). De fleste AMP er rik på de positivt ladde aminosyrene arginin og lysin (Brogden, 2005). Peptidet vil også kunne inneholde negativt ladde aminosyrer, men vil som regel ha en positivt nettoladning, noe som gjør peptidet kationsk (Hancock *et al.*, 2006). AMP er også ofte rike på hydrofobe aminosyrer som alanin, isoleucin, leucin, fenylalanin og valin (Brogden, 2005), og de hydrofobe aminosyrene utgjør som regel 30-50 % av aminosyrene i et AMP (Hancock *et al.*, 2006). Noen AMP er også rike på cysteiner, noe som er viktig for den tredimensjonale strukturen (Bulet *et al.*, 1999, Powers og Hancock, 2003).

I tillegg til de større kationske AMP er også mindre anionske AMP sett. Disse kan være så små som 5 aminosyrer lange, men kan også være opp mot 70 aminosyrer lange. De kationske peptidene er som regel lengre, og er ofte mellom 12 til 100 aminosyrer lange (Cruz *et al.*, 2014).

«The antimicrobial peptide database» (APD; <http://aps.unmc.edu/AP/>) gir en oversikt over kjente AMP og deres karakteristika (Wang og Wang, 2004, Wang *et al.*, 2009). Strukturen til de fleste AMP registrert i denne databasen er fremdeles ikke kjent, og kun 13 % har en kjent tredimensjonal struktur (Wang, 2015). Det man derimot vet om strukturen til AMP er at de kan ha en rekke forskjellige sekundærstrukturer, og kan bestå av α -helikser, β -flak, utstrakte strukturer eller looper (Hancock og Patrzykat, 2002, Powers og Hancock, 2003). Disse sekundære strukturene er vist i **Figur 2**. I tillegg til dette kan AMP også ha en sekundærstruktur bestående av en kombinasjon av både α -helikser og β -flak (Wang, 2015). For flere av disse sekundære strukturene er cysteiner viktig for å støtte opp strukturen i form av disulfidbindinger (Bulet *et al.*, 1999, Powers og Hancock, 2003), noe som kan ses ved de gule

båndene i **Figur 2**. Disse forskjellige strukturene vil ha innvirkning på hvordan det antimikrobielle peptidet gir sin virkning (Brogden, 2005, Cruz *et al.*, 2014).

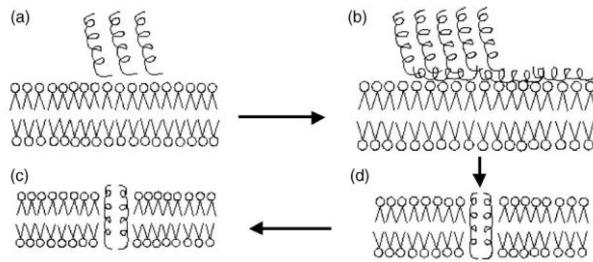


Figur 2 - Strukturklasser til AMP. AMP kan bestå av β -flak (A), α -heliks (B), utstrakte strukturer (C) eller looper (D). Bindinger mellom cysteiner (disulfidbindinger) er markert i gult (Powers og Hancock, 2003).

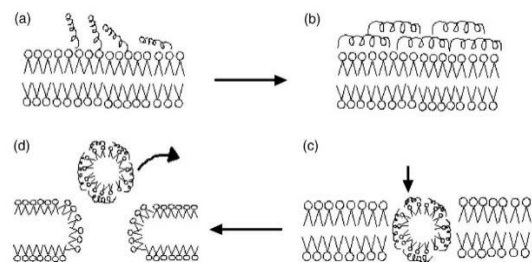
1.3.2 Virkningsmekanismer

De faktiske virkningsmekanismene til AMP er ennå ikke fullstendig kartlagt. Felles for de fleste AMP er at den første interaksjonen mellom peptidet og målcellen skjer via elektrostatiske interaksjoner mellom det kationiske peptidet og de negativt ladde komponentene som befinner seg på den ytre cellemembranen til bakteriecellene (Perez Espitia *et al.*, 2012).

Selve virkningsmekanismene til peptidene etter denne første interaksjonen deles grovt inn i to kategorier. Den første kategorien inneholder peptider som binder seg til målbakteriens membranen og danner irreversible porer eller på andre måter gjør membranen ustabil. Konsekvensen av dette vil være at cytoplasma fra bakterien lekker ut eller at membranen går i oppløsning, og bakterien vil dø i løpet av kort tid (Brogden, 2005, Sperstad *et al.*, 2011). Det finnes flere modeller som forklarer dette fenomenet, deriblant tønne-stav modellen (**Figur 3**) og teppe modellen (**Figur 4**) (Reddy *et al.*, 2004).



Figur 3 - Tønne-stav modellen (Reddy *et al.*, 2004).



Figur 4 – Teppemodellen (Reddy *et al.*, 2004).

Den andre kategorien innebærer at peptidene passerer bakteriens cellemembran, og entrer cellen hvor de gir sin virkning på essensielle cellulære prosesser, som for eksempel proteinsyntesen eller DNA-syntesen (Nicolas, 2009, Perez Espitia *et al.*, 2012).

Ved å virke på slike elementære komponenter, som bakteriens cellemembran, antas det at bakterier vil ha vanskeligheter med å opparbeide resistens mot AMP, siden det vil innebære en fullstendig omstrukturering av cellemembranen (Zasloff, 2002). Dette antas å være en fordel i forhold til klassiske antibiotika som hovedsakelig virker på spesifikke proteiner (da Costa *et al.*, 2015).

1.3.3 Terapeutisk potensiale

Bruk av AMP til behandling av bakterielle infeksjoner har både sine fordeler og utfordringer. Siden AMP hovedsakelig virker på mikrobenes cellemembran vil de fleste AMP ha liten til ingen effekt på eukaryote celler, ettersom lipidsammensetningen i membraner hos mikrober og eukaryote celler er såpass forskjellig (Nicolas, 2009). Denne spesifikke effekten er svært gunstig og vil potensielt gi færre bivirkninger. En annen fordel er at peptidene vil ha en kort halveringstid og vil ikke akkumulere i kroppen som en del andre legemidler. Denne nedbrytningen, som skyldes proteolytiske enzymer (Marr *et al.*, 2006), vil også gi opphav til ikke-toksiske komponenter som aminosyrer og mindre peptider. Slik proteolytisk nedbrytning kan likevel være en utfordring dersom nedbrytningen skjer før peptidet når sitt virkningssted. En løsning på dette problemet kan derimot være kjemiske modifikasjoner av peptidet slik at det ikke blir brutt ned like raskt (da Costa *et al.*, 2015).

En av de store fordelene forbundet med AMP er at de har en bred aktivitet, og dermed virker mot en rekke organismer som er patogene for mennesker. I tillegg har flere AMP vist aktivitet mot bakteriestammer som er antibiotikaresistente (Hancock og Patrzykat, 2002). Dette gjør blant annet at AMP anses som en potensiell erstatning for antibiotika i behandling av

antibiotikaresistente bakterier (Brogden, 2005). I dag er det derimot kun ett antimikrobielt peptid som er godkjent til klinisk bruk (Steckbeck *et al.*, 2014), men flere AMP er i prekliniske og kliniske tester (Guaní-Guerra *et al.*, 2010).

1.4 Antimikrobielle peptider hos bløtdyr og muslinger

AMP fra marine invertebrater har vært sett i flere forskjellige animalske rekker, deriblant leddyr, kappedyr, pigghuder og bløtdyr (Smith *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2010b, Otero-González *et al.*, 2010, Sperstad *et al.*, 2011). En av de første påvisningene av AMP i muslinger ble gjort av Charlet og medarbeidere (1996), hvor totalt fire AMP ble isolert og delvis karakterisert fra blodvæsken til blåskjell, *Mytilus edulis*. To av disse ble identifisert til å tilhøre defensin familien, som tidligere kun var beskrevet i leddyr, mens de to andre ikke tilhørte noen tidligere beskrevet familie og fikk dermed navnet mytiliner. Siden dette studiet har fem andre AMP familier; myticiner, mytimyciner, mytimaciner, store (big) defensiner og mytilus cystein-rik-I (MutiCRP), blitt karakterisert i forskjellige *Mytilus* arter. Felles for alle disse AMP familiene er at de har en cystein-rik natur (Gerdol og Venier, 2015).

Tabell 1 viser en oversikt over alle AMP som er beskrevet i muslinger og som er registrert i APD. Databasen inneholder totalt 2476 forskjellige peptider, hvorav 20 er AMP fra muslinger. I tillegg til disse 20 peptidene er 10 andre peptider sett i andre bløtdyrarter (Wang *et al.*, 2009, APD, 2015). APD inneholder derimot ikke alle beskrevne AMP, og flere AMP er påvist i muslinger (Gerdol *et al.*, 2012).

Felles for de fleste AMP beskrevet i bløtdyr er at de hovedsakelig har vært påvist eller isolert fra hemolymfen (Dolashka *et al.*, 2011, Gerdol og Venier, 2015), men noen AMP ser også ut til å være uttrykt i andre vev (Gerdol *et al.*, 2012, Seo *et al.*, 2013b).

I tillegg til å inneholde AMP har forskjellige bløtdyr vist seg å inneholde en rekke andre komponenter med en eller annen form for antimikrobiell aktivitet, deriblant lysozymer og lysozym-lignede komponenter (Nilsen *et al.*, 1999, Olsen *et al.*, 2003, Zhao *et al.*, 2007), pigmenter (Sanduja *et al.*, 1985), lektiner (Tunkijjanukij *et al.*, 1997) og fettsyrer (Benkendorff *et al.*, 2005).

Tabell 1 - Antimikrobielle peptider hos muslinger registrert i APD per januar 2015 (Wang *et al.*, 2009, APD, 2015).

Art	Navn/klasse	APD ID	Lengde	Aktivitet
<i>Mytilus edulis</i>	Mytilin A	AP00332	34	
	Mytilus defensin (mytilin) A	AP00709	37	Anti G+ og G-
	Mytilin B	AP00333	34	Anti G+ og G-, antiviral
	Mytilus defensin (mytilin) B	AP00710	35	
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mussel Defensin MGD-1	AP00438	39	Anti G+
	Mussel defensin MGD-2	AP00711	39	
	Myticin A	AP01789	40	Anti G+
	Myticin B	AP01790	40	Anti G+ og G-, antifungal
	Myticin C	AP01788	43	Antiviral
<i>Mytilus coruscus</i>	Myticusin-1	AP02168	104	Anti G+
	Mytichitin-A	AP02406	55	Anti G+ og G-, antifungal
	Mytichitin-CB	AP02434	55	Anti G+, antifungal
<i>Crassostrea virginica</i>	American oyster defensin (AOD)	AP00539	38	
<i>Crassostrea gigas</i>	Cg-Def	AP00558	43	Anti G+
	Cg-Prp	AP01379	37	Anti G+ og G-
	cgUbiquitin	AP02030	74	Anti G+ og G-
	cgMolluscidin	AP02232	55	Anti G+ og G-
<i>Argopecten purpuratus</i>	Ap	AP01522	47	Anti G+, antifungal
<i>Venerupis philippinarum</i>	VpBD	AP01642	74	Anti G+ og G-
<i>Ruditapes philippinarum</i>	MCdef	AP02233	44	Anti G+ og G-

Forkortelser: G+: Gram-positiv, G-: Gram-negativ

1.4.1 Antimikrobiell aktivitet i O-skjell

Søk i litteraturen indikerer at ingen AMP er beskrevet i O-skjell (*Modiolus modiolus*) eller andre *Modiolus* arter, men et antimikrobielt glykoprotein (lektin) på rundt 100-1,300 kDa er tidligere isolert fra O-skjell (Tunkijjanukij *et al.*, 1997). I tillegg til dette har Haug og medarbeidere (2004) påvist antimikrobiell aktivitet i en rekke forskjellige vev separert fra O-skjell. Hvorvidt aktiviteten skyldes AMP eller ei ble ikke påvist, men flere ekstrakter var sensitiv ovenfor proteinase K behandling noe som indikerte tilstedeværelsen av komponenter av protein-rik natur. Av de forskjellige vevene som ble testet viste blant annet hemocytterne høy antimikrobielle aktiviteten.

Etter 2004 er dette arbeidet fulgt opp, og en rekke upubliserte data er produsert. Deriblant tre partielle N-terminale sekvenser fra isolerte peptider. Disse er angitt som henholdsvis OS-12, OS-24 og OS-27, og er isolert fra 40 % SPE eluatet fra hemocytterne. Antimikrobiell testing av de isolerte peptidene viste at alle tre peptidene har antimikrobiell aktivitet. De partielle sekvensene er framkommet ved Edman degradering. En oversikt over molekylvektene og de partielle N-terminale peptidsekvensene fra disse peptidene er oppsummert i **Tabell 2**.

Tabell 2 - Isolerte peptider fra O-skjell. Tre peptider er blitt isolert fra hemocytterne til O-skjell. Molekylvekten og den partielle N-terminale sekvensen til disse peptidene er gjengitt i tabellen.

Peptidnavn	Molekylvekt	Partiell N-terminale peptidsyresekvens
OS-12	12,12 kDa	GTN C GVGYSV C DK C GANSKV LEVVIKGVRY TTKV C CKN C N KXFRAGYNNE TAKLGPY
OS-24	9,10 kDa	GK C FTTWSXLSSWSXF
OS-27	12,32 kDa	(A)GX(H)VTYDIS TQARXKEYTR GXSG

1.5 Mål for oppgaven

Ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø er det tidligere blitt påvist antimikrobiell aktivitet i ekstrakter fra hemocytter fra O-skjell, *M. modiolus* (Haug *et al.*, 2004). Peptider er blitt isolert og karakterisert, og partielle peptidsekvensdata (**Tabell 2**) er framkommet (upublisert data; **1.4.1**).

Hensikten med denne oppgaven er å følge opp disse funnene ytterligere ved å påvise og karakterisere antimikrobielle peptider samt gener som koder for disse. Delmål for denne oppgaven er:

- 1) Teste ekstrakter fra forskjellige organer/vev fra O-skjell for antimikrobiell aktivitet ovenfor Gram-positive og Gram-negative bakterier
- 2) Påvise tilstedeværelsen av antimikrobielle peptider i O-skjell med hovedvekt på tidligere påviste og delvis karakteriserte peptider
- 3) Karakterisere gensekvenser som koder for antimikrobielle peptider med utgangspunkt i tidligere fremstilte data på partielle peptidsekvenser

2. Bakgrunn

2.1 Muslinger

Muslinger (Bivalvia) er en klasse som tilhører rekken bløtdyr (Mollusca). Det finnes omtrent 20 000 forskjellige muslingarter på verdensbasis både i det marine miljø og i ferskvann (Dorit *et al.*, 1991). I Norge finnes det om lag 211 marine arter og 24 ferskvannsararter (Hågvar, 2010).

Muslinger lever hovedsakelig på bunnsedimentet, enten festet til bunnen eller ved å ligge fritt oppå det. Det mest normale er at muslinger er festet til bunnen ved hjelp av sterke tråder kalt byssustråder (Dorit *et al.*, 1991, Hågvar, 2010).

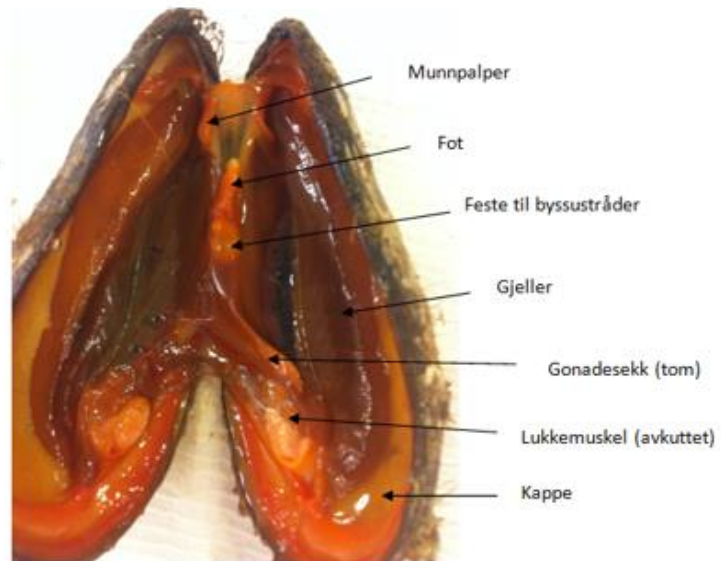
Som bløtdyr flest har muslinger et åpent sirkulasjonssystem. Hjertet mottar blodvæsken, kalt hemolymfe, fra gjellene og pumper det videre ut via aorta og ut i kroppshulen hvor den når de forskjellige vevene/organene (Song *et al.*, 2010, Hågvar, 2010). Hemolymfen har også en viktig funksjon som organismens beskyttelse mot mulige patogene organismer, både via cellulære forsvarsmekanismer hvor patogene organismer fagocytteres eller innkapsles av blodcellene (hemocytter) samt via immun effektorer som blant annet AMP (Song *et al.*, 2010, Gerdol og Venier, 2015).

2.1.1 O-skjell (*M. modiolus*)

O-skjell (*M. modiolus*, Linnaeus 1758) tilhører, sammen med blant annet blåskjell (*M. edulis*), familien Mytilidae. De kjennetegnes blant annet ved deres avlange symmetriske skall med umbo forskjøvet mot den ene enden av skallet. O-skjell er primært å finne i store kolonier i bunnområder fra noen få meters dyp ned til rund 150 meter, hvor de er festet til bunnlaget via byssustråder. De er vanlige i Nord-Europa, og er å finne langs hele norskekysten. Ferdig vokste individer kan være opp mot 20 cm lang og har en dyp brun farge. Yngre individer kan forveksles med blåskjell på grunn av deres mer blålige farge. O-skjell er ofte tildekket av andre organismer som mosdyr, hydroider og sadelskjell (Moen og Svensen, 2008, Hågvar, 2010). Den taksonomiske inndelingen samt en beskrivelse av forskjellige vev/organer i O-skjell er vist i

Figur 5.

Taksonomi	
Rekke	Mollusca
Klasse	Bivalvia
Orden	Mytiloida
Familie	Mytilidae
Slekt	<i>Modiolus</i>



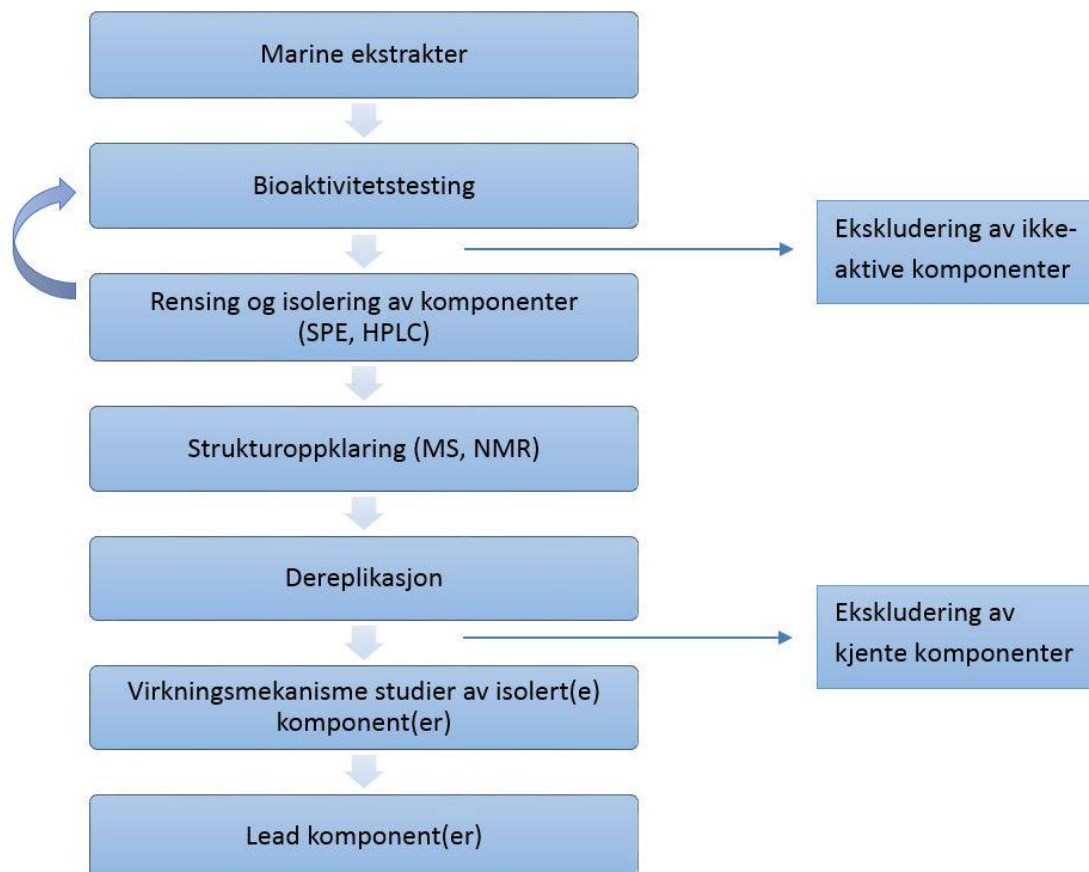
Figur 5 - Taksonomisk inndeling til O-skjell, *M. modiolus*, samt en beskrivelse av de forskjellige vevene.

2.2 Metodiske prinsipper i oppgaven

2.2.1 Bioaktivitetsledet rensing

Bioaktivitetsledet rensing er en fremgangsmåte som benyttes for å rense komponenter med hensyn på ønsket bioaktivitet. Dette gjøres ved kontinuerlig testing opp mot de ønskede bioaktivitetene underveis i rensingsprosessen slik at uinteressante og inaktive ekstrakter og fraksjoner ekskluderes på et tidlig tidspunkt (Sarker *et al.*, 2006, Ghisalberti, 2008). **Figur 6** viser et generelt bilde av et typisk forløp i en bioaktivitetsledet rensingsprosess.

Selve rensingsprosessen vil variere avhengig av hvilket utgangsmateriale man jobber med og hva som er målkomponenten(e) (Sarker *et al.*, 2006). I tillegg til bioaktivitetstesting og separeringen/ isoleringen er dereplikasjon også en viktig del av bioaktivitetsledet rensing. Ved å tidlig kartlegge mest mulig om komponenten(e) kan man ekskludere komponenter som er kjent fra tidligere (Dinan, 2006).



Figur 6 - Bioaktivitetsledet rensing. Figuren viser et generelt metodeforløp for rensing av marine naturprodukter med hovedfokus på komponentenes bioaktivitet fra et marint ekstrakt til en lead komponent (en komponent med et betydelig potensiale). Figuren er en modifikasjon av figur 5 i Houssen og Jaspars (2006) og figur 1 i Dinan (2006).

Ekstraksjon

Det første steget i en isoleringsprosess er ekstraksjonen. Valg av ekstraksjonsmetode vil variere avhengig av hvilket materiale ekstraksjonen skal utføres på, og med hensyn på hvilke komponenter man ønsker å isolere. Ekstraksjonsmetoden vil for eksempel variere om det er plantemateriale eller marint materiale man jobber med, og om man ønsker å isolere alle sekundære metabolitter i organismen eller om man ønsker å isolere komponenter med bestemte kjemiske egenskaper. En typisk ekstraksjon tar utgangspunkt i tørket og homogenisert materiale for å få større ekstraksjonsflate. Videre velges et løsemiddel med ønsket polaritet avhengig av hva som er best egnet for materialet og mål komponenten(e). Selve ekstraksjonsmetoden kan variere og være basert på enkle prinsipper som bløtlegging av materialet i løsemidlet under omrøring, koking eller mer konkrete ekstraksjonsmetoder som soxhlet og superkritisk væske-ekstraksjon (Sarker *et al.*, 2006).

Bioaktivitetstesting

Under en isoleringsprosess hvor hovedmålet er å isolere komponenter med en bestemt bioaktivitet er det viktig å teste for denne bioaktiviteten underveis i prosessen. Dette for å tidlig ekskludere uinteressante og inaktive ekstrakter og fraksjoner. Testing etter forskjellige bioaktiviteter gjøres normalt i *in vitro* biotester (bioassays) som gjenskaper det biologiske systemet man ønsker at komponenten skal ha sin effekt på (Sarker *et al.*, 2006). Detektering av ekstrakter, fraksjoner eller komponenter med antimikrobiell aktivitet kan for eksempel gjøres ved å måle en bakteriekulturs vekstevne i et medium med tilstedeværelse av testmaterialet. Dette gjøres normalt i mikrotiterplater hvor hver brønn tilsettes forskjellig testmateriale sammen med bakteriekulturen. Etter en satt inkubasjonstid registreres brønner hvor bakterievekst er fraværende, noe som indikerer at materialet inneholder stoffer med antimikrobiell effekt (Hancock, 2000).

Kromatografisk separasjon

Kromatografiske separasjonsteknikker benyttes for å separere komponenter i en løsning basert på kjemiske egenskaper som for eksempel størrelse, ladning, polaritet og isoelektrisk punkt. Separeringen gjøres mellom to faser; en stasjonær fase og en mobil fase. Ved bruk av kromatografiske kolonner er den stasjonære fasen pakket inn i en kolonne mens den mobile fasen pumpes gjennom kolonnen (Ersson *et al.*, 2011). Avhengig av de kjemiske egenskapene til mobilfasen, kolonnematerialet og komponentene i løsningen vil forskjellige komponenter bevege seg gjennom kolonnen med forskjellig hastighet, og kan samles opp i forskjellige fraksjoner (Janson og Jönsson, 2011). I tilfeller hvor målkomponentene for isoleringsprosessen er AMP er det normalt å benytte seg av en revers fase (reverse phase; RP) kolonne bestående av et absorberende C18-materiale kjemisk bundet til silica partikler. AMP vil binde seg til dette upolare kolonnematerialet via reversible bindinger og vil kunne elueres ut av kolonnen ved å endre på den kjemiske sammensetningen til den mobile fasen (Reid og Sarker, 2006, Sperstad *et al.*, 2011).

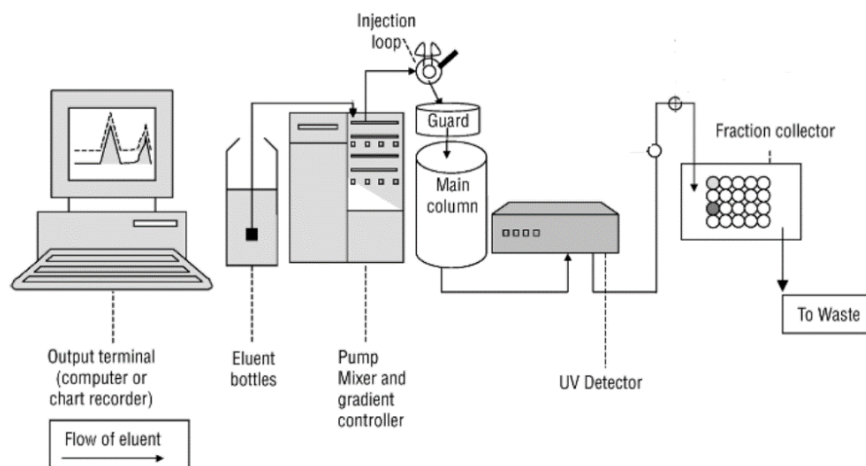
Fast-fase ekstraksjon

Prinsippet, som nevnt ovenfor, kan benyttes for grov separering av marine ekstrakter gjennom en lavtrykksvæskrokromatografisk metode kalt fast-fase ekstraksjon (solid phase extraction; SPE). Her blir prøvematerialet blandet med den mobile fasen og satt på kolonnen. Det retarderte materiale i kolonnen kan så stegvis elueres ut av kolonnen ved å gradvis endre

polariteten til den mobile fasen. For hvert elueringssteg samles det eluerte materialet i hver sin fraksjon, og vil dermed gi en grov separasjon av komponentene retardert på kolonnen (Reid og Sarker, 2006). I tillegg til å gi en grovseparasjon av ekstrakter er SPE også gunstig for å fjerne salt fra de marine ekstraktene som senere kan være problematisk ved bioaktivitetstesting, separeringen ved høytrykksvæskerkromatografi (High pressure liquid chromatography; HPLC) eller analyseringen med massespektrometri (MS) (Sperstad *et al.*, 2011).

Høytrykksvæskerkromatografi

Preparativ HPLC (prep HPLC) er en viktig metode for å separere og isolere komponenter i en kompleks løsning (Figur 7) (Houssen og Jaspars, 2006). I likhet med andre kromatografiske metoder vil separeringen være avhengig av de kjemiske egenskapene til den stasjonære og den mobile fasen, og det samme separeringsprinsippet bak SPE, med en RP-kolonne med C18 materiale kjemisk bundet til silica, kan også benyttes i et HPLC-system. I motsetning til SPE er partikkelstørrelsen på den stasjonære fasen mindre og et høyt trykk settes på systemet for å presse den mobile fasen gjennom kolonnen (Latif, 2006). I stedet for å gjøre stegvise elueringer kan man kjøre en gradient som kontinuerlig endrer konsentrasjonen på løsemidlet benyttet i den mobile fasen. Dette gir en jevnere eluering av komponentene fra kolonnen og en bedre separasjon av komponentene.



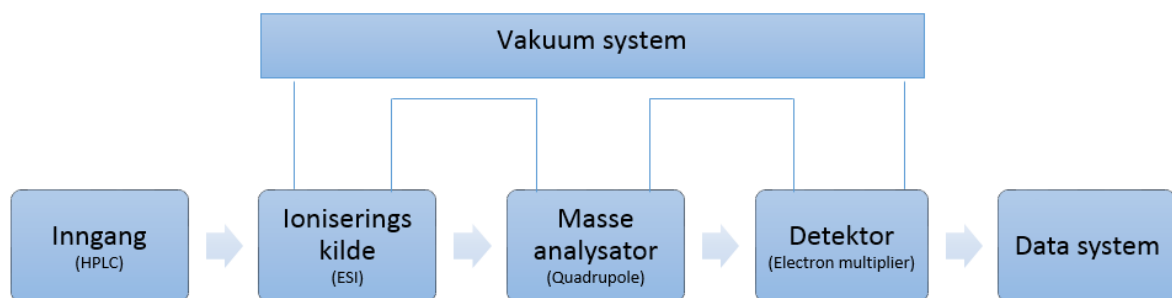
Figur 7 - Et preparativ HPLC-system. Systemet består av en system kontrollør, pumpe, injeksjonsenhet, kolonne og detektor. Fraksjonene samles opp i en fraksjonssamler. Bildet er hentet fra Latif (2006) med noen modifikasjoner.

Komponentene som elueres ut av kolonnen blir detektert av en detektor, gjerne en UV-Vis detektor som detekterer komponenter som absorberer lys i det ultrafiolette-synlige spekteret (UV-Vis; 200-600 nm). Detektoren kan enten stilles inn på en bestemt bølgelengde eller detektere absorpsjonen over et intervall av bølgelengder. Sistnevnte kalles en fotodiode array (photodiode array; PDA) detektor (Latif, 2006). Koblingen av et HPLC-system med en PDA-detektor er svært fordelaktig for å kunne identifisere komponenter i forskjellige topper i HPLC-kromatogrammet, og sammenligning av retensjonstiden og UV-spekteret til komponenten kan være viktig for dereplikasjon (Sarker og Nahar, 2006, Houssem og Jaspars, 2006).

Massespektrometri

MS er en teknikk som brukes for å identifisere molekylvekten til ukjente komponenter ved å ionisere dem og detektere masse/ladnings-forholdet (m/z) av de ioniserte molekylene. Teknikken er svært sensitiv og kan detektere mikrogram av komponenter med den forutsetningen at komponentene lar seg ionisere (Houssem og Jaspars, 2006).

Det finnes en rekke forskjellige MS-typer, men alle er hovedsakelig satt sammen av komponentene vist i **Figur 8**. I tilfeller hvor materialet som skal analyseres er en kompleks løsning er det en fordel med en inngang som er koblet til en separeringsmodul (f. eks HPLC) som separerer komponentene i løsningen før prøven entrer selve MS-systemet (Sarker og Nahar, 2006). Videre er valg av ioniseringskilde viktig avhengig av hvilket materiale som skal analyseres. Dersom man skal analysere polare ekstrakter er elektrospay ionisering (ESI) den anbefalte ioniseringsteknikken (Houssem og Jaspars, 2006).



Figur 8 - Komponentene i et MS-system. Et MS-system består av en inngang, en ioniseringskilde, en masse analysator, en detektor og et datasystem. I tillegg er systemet koblet til et vakuum system for å unngå kollisjon mellom ionene og luft molekyler. Datasystemet genererer et MS-spekter med topper med ulike m/z -verdier. Dette benyttes for å kalkulere molekylvekten til komponentene. Bildet er en modifisering av figur 9.1 i Wilson og Walker (2005).

2.2.2 Molekylærbiologiske metoder

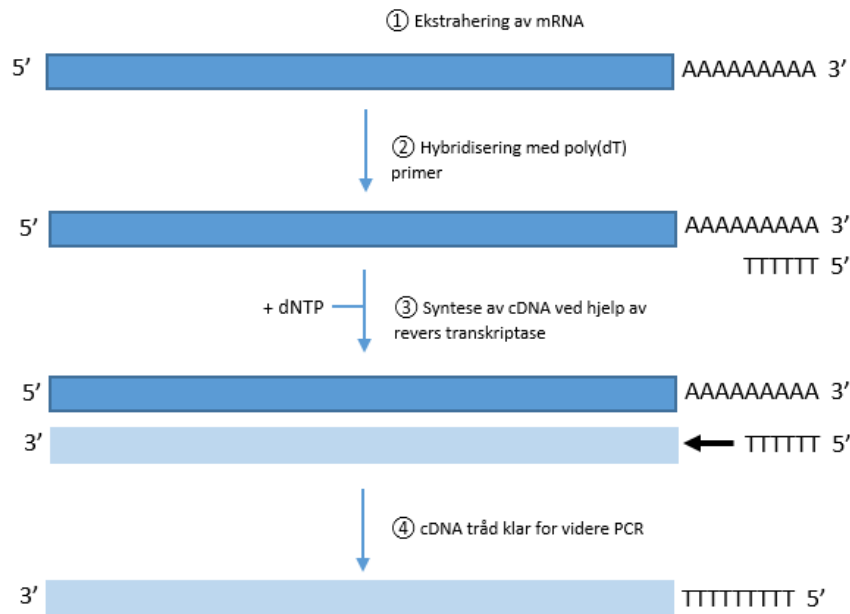
I tilfeller hvor man kjenner deler av den ønskede gensekvensen eller den tilhørende peptidsekvensen til et antimikrobielt peptid kan molekylærbiologiske metoder benyttes for å identifisere hele den tilhørende gensekvensen (Sperstad *et al.*, 2011). Avsnittene under tar for seg prinsippene bak molekylærbiologiske metoder som kan benyttes for å identifisere denne.

Isolering av RNA

Gensekvensen til et spesifikt gen kan identifiseres ved å isolere RNA tilstede i en celle eller et vev. Alle genene som er uttrykt i cellen eller vevet vil være tilstede i form av budbringer RNA (messenger RNA; mRNA) molekyler, og ved å isolere alle RNA-molekylene vil man kunne sitte igjen med mRNA-sekvensen til det ønskede genet dersom det er uttrykt på det gitte tidspunktet. Renheten til det isolerte RNAet analyseres ved å skanne prøven i UV-spekteret mellom 200 og 300 nm, slik at et A_{260} til A_{280} forhold bestemmes. For rene RNA-prøver skal dette forholdet være 2, og et forhold over eller under 2 kan bety at prøven er kontaminert (Wilson og Walker, 2005).

Syntese av komplementært DNA

Fra det isolerte RNAet kan komplementært DNA (complementary DNA; cDNA) syntetiseres ved hjelp av enzymet revers transkriptase, som lager en komplementær DNA-tråd til alle mRNA-trådene tilstede (**Figur 9**). Kort fortalt er prinsippene som følger; Syntesen gjøres ved at en poly-dT primer binder poly-A halen til mRNA-molekylene. Deretter blir en komplementær DNA-tråd syntetisert ved hjelp av enzymet revers transkriptase. Avhengig av om man ønsker å lage et cDNA bibliotek eller om man ønsker å benytte cDNAet direkte i en polymerasekjedereaksjon (polymerase chain reaction; PCR) kan dobbeltrådig cDNA lages ved hjelp av enzymet DNA-polymerase (Wilson og Walker, 2005).

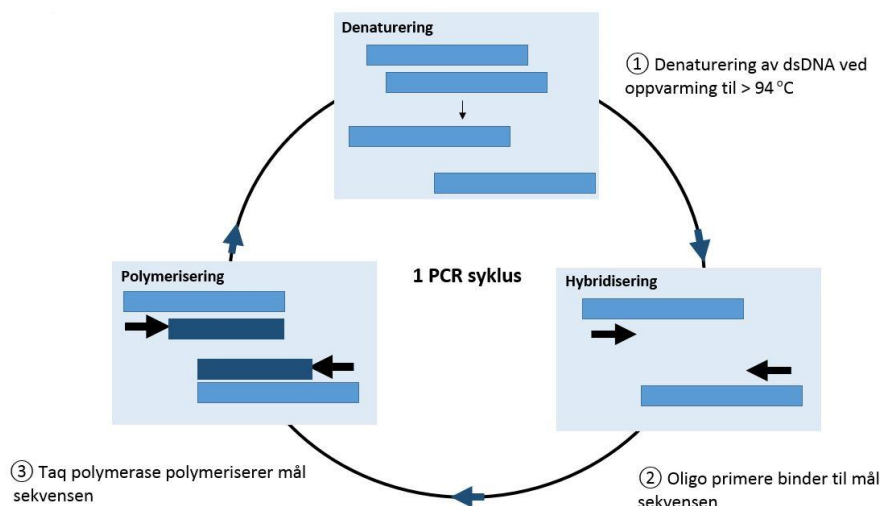


Figur 9 - Revers transkripterung fra mRNA til cDNA. En poly(dT) primer benyttes for å binde poly-A halen til ekstraherte mRNA-molekyler. Enzymet revers transkriptase bruker primeren som utgangspunkt for syntese av en komplementært DNA (cDNA) tråd med tilstedeværelse av dNTP. RNA degenereres ved hjelp av ribonuklease (RNase). Bildet er en modifikasjon av figur 5.35 i Wilson og Walker (2005).

Polymerase kjedereaksjon

PCR er en metode som benyttes for å kopiere opp en rekke kopier av en bestemt DNA-sekvens i en kompleks blanding av DNA-molekyler. For å kunne amplifisere denne gitte målsekvensen er det nødvendig å kjenne til hele eller deler av målsekvensen (Wilson og Walker, 2005, Alberts *et al.*, 2008).

En PCR-reaksjon består av tre steg som gjentas i 30 til 40 sykluser avhengig av hvor stor mengde DNA man ønsker å amplifisere. Det generelle prinsippet bak en PCR-reaksjon er vist i **Figur 10**, og viser de tre stegene i hver syklus; denaturering, hybridisering og polymerisering. I det første steget separeres de to DNA-trådene ved hjelp av en temperaturøkning til ca. 90 °C. En senkning i temperaturen til rundt 40 til 60 °C tillater hybridisering av primerene og målsekvensen. For at denne hybridiseringen skal være mest mulig spesifikk er det viktig å ha en optimal hybridiseringstemperatur avhengig av hvilken primer som benyttes. I det siste steget syntetiseres en ny DNA-tråd, hvor primerene brukes som templat for DNA-syntesen, ved hjelp av det varmestabile enzymet Taq DNA polymerase. Syntetiseringen er det siste steget i syklusen og gir opphav til dobbelt så mange DNA-molekyler av den ønskede målsekvensen enn hva som var tilstede ved syklusens start (Wilson og Walker, 2005).



Figur 10 – PCR-syklus. Hver syklus starter ved at temperaturen øker for å gi denaturering av den dobbeltrådede DNA-tråden (dsDNA). Temperaturen synker så til den optimale hybridiseringstemperaturen som gir best hybridisering mellom den enkeltrådede DNA-trådene (ssDNA) og primeren. Taq polymerase sørger så for syntetiseringen av en ny DNA-tråd med utgangspunkt i primeren. Et nytt dobbeltrådig DNA-molekyl er laget, og en ny syklus kan starte. Figuren er en modifikasjon av figur 5.33 i Wilson og Walker (2005).

Gel elektroforese

Gel elektroforese er en separasjonsteknikk som kan benyttes for å separere molekyler etter størrelse på en gel ved å sette til et elektrisk felt. Metoden kan benyttes for å identifisere størrelsen og mengden av spesifikke DNA-fragmenter eller for å isolere spesifikke DNA-fragmenter (Wilson og Walker, 2005, Griffiths, 2012).

Separering av DNA-molekyler gjøres normalt på en agarosegel tilsatt etylbromid (EtBr). Løsningen med DNA-fragmentene som skal analyseres settes i hver sin brønn i den øvre delen av gelen, og de negative DNA-molekylene trekkes mot den positive polen av gelen. Forflytningen nedover gelen vil være avhengig av DNA-fragmentenes størrelse. DNA-molekylene kan, etter separeringen, visualiseres under UV-lys, og DNA-fragmentene vil ses i form av bånd på gelen. Størrelsen på DNA-fragmentene fastslås ved å sammenligne båndene mot en kjent standard kalt ladder (Griffiths, 2012).

Ligering og transformasjon

Kloning av DNA-fragmenter kan gjøres ved å sette DNAet inn i plasmidvektorer. Slike vektorer er små sirkulære dobbeltrådede DNA-molekyler derivert fra større bakterielle plasmider. For å bruke slike plasmidvektorer som kloningsvektorer må vektoren kuttes ved hjelp av

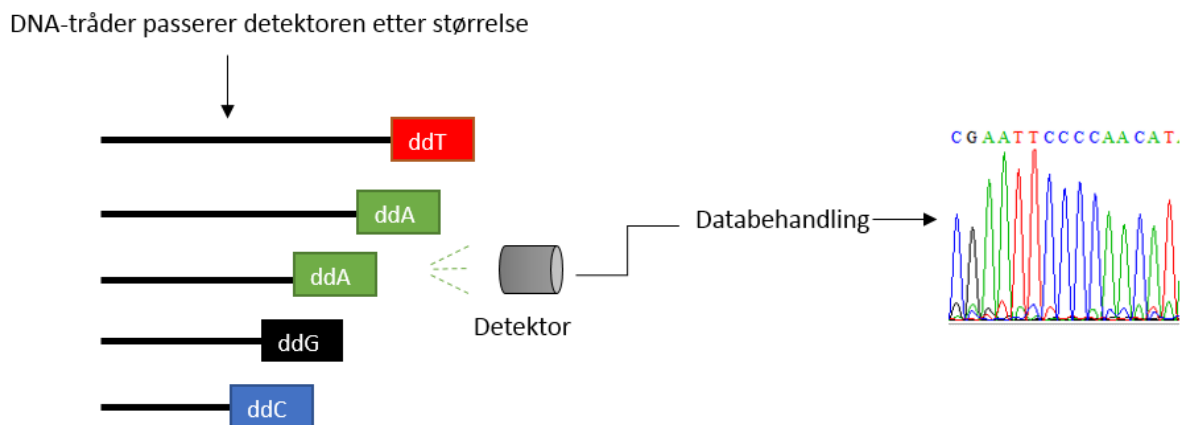
restriksjonsenzymmer for å gi et lineært DNA-molekyl (Alberts *et al.*, 2008). Den interessante DNA-fragmenten kan så settes inn i denne vektoren ved hjelp av enzymet ligase. Dette kalles liggering. For at liggeringen skal gå vellykket må endene på DNA-fragmenten som skal settes inn i vektoren samsvare med endene på vektoren laget ved hjelp av restriksjonsenzymene (Wilson og Walker, 2005).

Resultatet av en slik liggering er et plasmid hvor den ønskede DNA-sekvensen er satt inn. Plasmider kan igjen tas opp i kompetente bakterieceller via transformasjon. Kompetente celler er bakterieceller, gjerne *Escherichia coli* celler, som er behandlet på en måte som gjør at de enklere vil ta opp DNA fra omgivelsene. (Wilson og Walker, 2005). Vektorer inneholder normalt gener som gjør de resistent mot en bestemt type antibiotika, noe som gjør dyrking av bakterier med tilstedeværelsen av vektoren enklere og mulig å detektere (Madigan *et al.*, 2009).

Sekvensering

Sekvensering av en DNA-sekvens blir normalt utført basert på et kjedeterminering DNA-sekvenserings prinsipp, en sekvenseringsmetode som bygger på Sanger-sekvenserings prinsippet. Her benyttes fluoriserende nukleotider i stedet for radioaktive nukleotider for å muliggjøre deteksjonen av DNAet. For å klargjøre prøven til sekvensering må det først kjøres en sekvenserings PCR. I en slik PCR-reaksjon tilsettes de «normale» PCR-reagensene, DNA-templat, DNA polymerase, primer og deoksynukleotid trifosfat (dNTP), sammen med en liten mengde dideoksynukleotid trifosfat (ddNTP). Disse ddNTP er merket med en fluorosens markør. En PCR-reaksjon vil så kjøres basert på det samme prinsippet som tidligere beskrevet. Unntaket her er at etter primeren har hybridisert med DNA-templaten, vil DNA polymerase syntetisere den komplementære DNA-tråden enten ved å feste dNTP (som normalt) eller en ddNTP. For at DNA polymerase skal fortsette å syntetisere DNA-tråden er den avhengig av en OH-gruppe tilgjengelig på 3' enden av den voksende DNA-tråden; dette har dNTP mens ddNTP mangler den. Ved å feste ddNTP istedenfor dNTP vil DNA-syntesen termineres. Siden det er tilfeldig om DNA polymerasen fester en dNTP eller en ddNTP vil reaksjonsmiksen inneholde DNA-tråder med forskjellig lengde. Dette utnyttes videre for å bestemme DNA-sekvensen (Brown, 2010, Fitzgerald-Hayes og Reichsman, 2010).

For å bestemme DNA-sekvensen separeres DNA-trådene etter størrelse i en kapillær gel elektroforese. Etter at DNA-trådene er separert kjøres de forbi en fluorescens detektor, som registrerer den fluoriserende markøren til ddNTP i enden av DNA-tråden (**Figur 11**). Siden hver av de fire ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP og ddTTP) er merket med hver sin farge, vil den detekterte fargen indikere hva den siste basen i hver av DNA-trådene er. Siden DNA-trådene allerede er separert etter størrelse/lengde, kan DNA-sekvensen bestemmes (Brown, 2010).



Figur 11 - Sekvensering av DNA-sekvens. De forskjellige DNA-trådene av forskjellig lengde, tillaget under sekvensering PCR-reaksjonen, passerer detektoren som detekterer den fluoriserende markøren til de forskjellige ddNTP-ene i enden av hver DNA-tråd. Rekkefølgen av detekterte ddNTP blir prosessert og gir opphav til DNA-sekvensen. Figuren er en modifikasjon av figur 10.3 i Brown (2010).

3. Materialer og metoder

3.1 Materialer

3.1.1 Biologisk materiale

Levende O-skjell (ca. 50 individer) ble samlet inn av dykkere i Kaldfjorden ved Tromsø den 26. august 2014. Individene ble oppbevart i tanker med sirkulerende sjøvann i kjelleren på NFH frem til prøvetakning av hemolymfe og vev ble utført i perioden september/oktober 2014, og til isoleringen av RNA ble utført i januar 2015.

3.1.2 Reagenser og kjemikalier

Tabell 3 - Reagenser og kjemikalier. Tabellen gir en oversikt over alle reagensene og kjemikaliene benyttet i denne oppgaven, samt leverandør. Leverandør er kun oppgitt i denne tabellen, og ikke i senere avsnitt hvor materialet blir omtalt.

Reagens / kjemikalie	Leverandør (sted)
Acetonitril	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Trifluoreddiksyre	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Milli-Q vann	Millipore Corp. (MA., USA)
TRIZOL	Life technologies (USA)
Kloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Isopropanol	Kemetyl (Halden, Norge)
Etanol (EtOH)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Ultra Pure Water	Biochrom (Berlin, Tyskland)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Etylbromid (EtBr)	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
1 kb DNA plus ladder	Invitrogen (Carlsbad, USA)
6X loading dye	BioLabs inc. (New England, USA)
10 mM dNTP miks	Invitrogen (Carlsbad, USA)
10X M-MLV reverse transcriptase buffer	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
M-MLV reverse transcriptase	Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)
RNase hemmer	Thermo scientific (Waltham, USA)
SMART cDNA Library Construction Kit	Clontech (Mountain View, USA)
10X buffer	Thermo scientific (USA)
Taq polymerase	Thermo scientific (USA)
QIAquick gel extraction kit	QIAGEN (Hilden, Tyskland)
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase	Promega (Madison, USA)
T4 DNA ligase	Promega (Madison, USA)
QIAprep Spin miniprep kit	QIAGEN (Hilden, Tyskland)
Big Dye 3.1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
5X Sekvensering buffer	Applied Biosystems (Foster City, USA)

3.1.3 Medier og buffere tillaget ved Norges Fiskerihøgskole

- Müller Hinton (MH) plater
- Müller Hinton (MH) medium
- Luria broth (LB) medium
- Luria agar (LA) plater med 100 µg/ml ampicillin
- 1x Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer

Tillaging av disse mediene er beskrevet i **Appendiks 2**.

3.1.4 Bakterier og plasmider

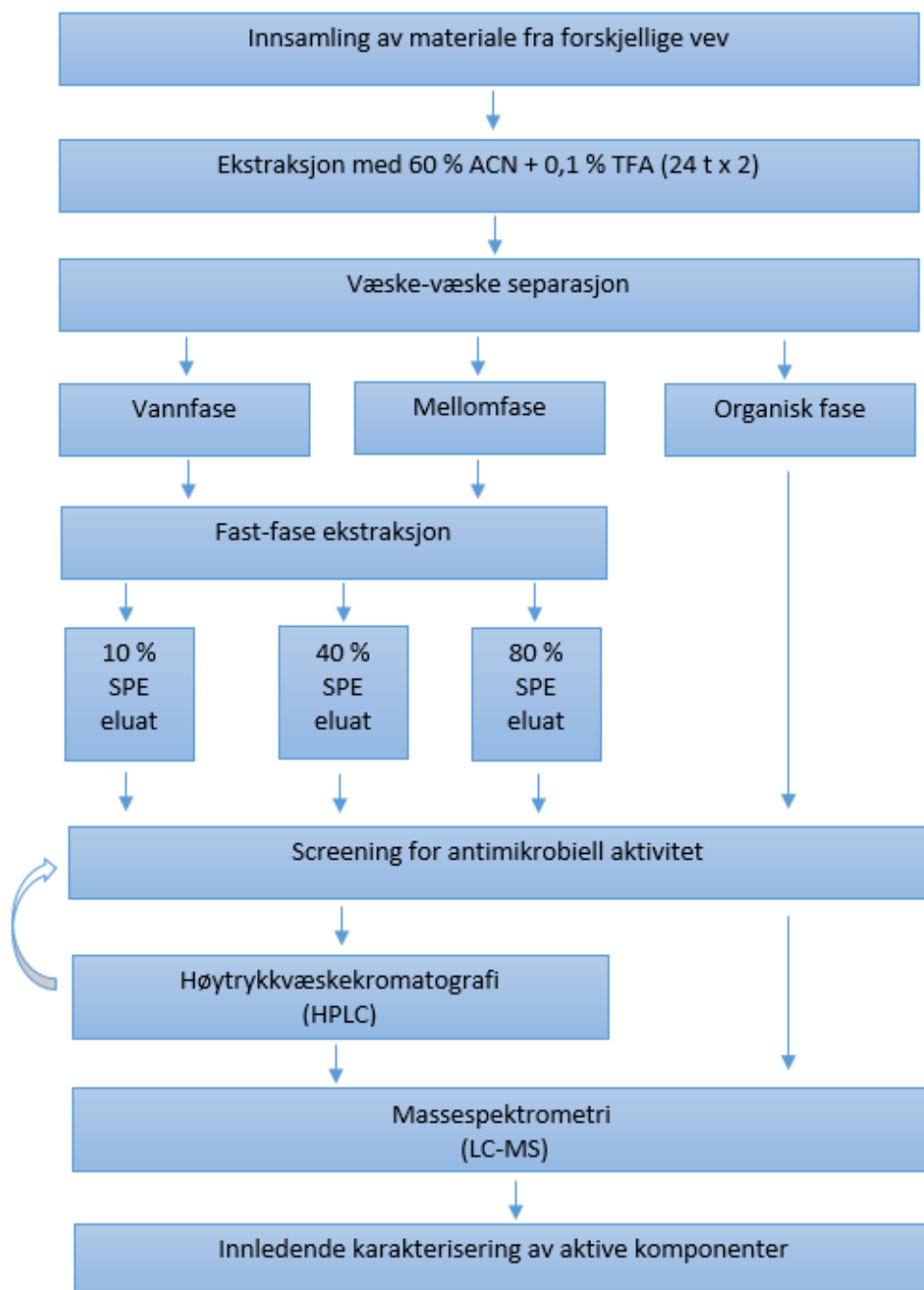
- Bakterier benyttet til antimikrobiell testing (Tilhørende forskningsgruppen Marin bioprospektering ved Norges Fiskerihøgskole):
 - *Escherichia coli* (ID: ATCC25922)
 - *Corynebacterium glutamicum* (ID: CCUG 27702)
 - Stamkulturer av bakteriestammene oppbevares i en stamløsning på 80 % glyserol + 20 % MH-medium ved -80 °C.
- pGEM- T easy vector (Promega, Madison, USA)
- Bakterier benyttet til transformasjon
 - One Shot TOP10 Chemically competent *E.coli* (Invitrogen, Carlsbad, USA).

3.1.5 Primere

- G413: 5' – TCTGAATTCTCGAGTCGACATCTTTTTTTTTTTTTTTTTT - 3' (Sigma-Aldrich, USA)
- Oligo A primer 5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCCGGG -3' (Sigma-Aldrich, USA)
- T7: 5' - CAGTGAATTGTAATACGACTCACT - 3' (Sigma-Aldrich, USA)
- Designede primere er nærmere beskrevet i avsnitt **3.11** (Sigma-Aldrich, USA).

3.2 Metodeforløp for separasjon og påvisning av antimikrobielle peptider

I den første delen av oppgaven var hovedfokuset å separere og påvise tilstedeværelsen av AMP i forskjellige vev fra O-skjell. Hovedfokuset lå på delvis karakteriserte peptider tidligere sett i O-skjell (se avsnitt 1.4.1). Fremgangsmåten som ble benyttet for å nå dette målet er som vist i **Figur 12**. De forskjellige metodene er nærmere beskrevet i avsnittene under.



Figur 12 – Metodeforløpet. Fremgangsmåten for separering og påvisning av AMP i O-skjell.

3.3 Prøvetakning

O-skjellene ble åpnet ved hjelp av en kniv, og hemolymfen ble trukket ut fra lukkemuskelen ved bruk av en 21G nål koblet på en sprøyte. Hemolymfen ble umiddelbart sentrifugert (Multifuge 1 S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientific, USA) ved 800 G ved 4°C i 20 minutter for å separere hemocytter fra plasma. Etter at dyret var tappet for hemolymfe ble de forskjellige organene/vevene samlet opp i forhåndsveide begerglass, og det gjenværende materialet ble samlet opp i en resterende samling. Prøvene ble deretter fryst ned (-80 °C) før de ble tørket i en VirTis Genesis 35 EL frysetørker (SP Scientific, USA). Tørket materiale ble veid og oppbevart ved -20 °C frem til ekstraksjonstidspunktet.

Følgende materiale ble samlet opp fra 34 O-skjell: hemocytter, cellefri hemolymfe, hemolymfe med celler, kappe, gjeller, gonader, fot, munnpalp og byssustråder. Det gjenværende materialet ble samlet i en resterende samling (med unntak av skallet).

3.4 Ekstraksjon og grov separasjon av materiale

3.4.1 Ekstrahering og væske-væske separasjon

Det frysetørkede materialet fra de forskjellige vevene ble først pulverisert med en morter, før materialet ble overført til hver sin glassflaske. Materialet ble deretter ekstrahert med 10 volum (v/w) 60 % acetonitril (ACN) med 0,1 % trifluoreddiksyre (TFA) i 24 timer ved 4 °C under omrøring. Prøven ble så overført til 50 ml Falcon-rør (BD Biosciences, San Jose, USA), og sentrifugert ved 3000 rpm i 5 minutter (Multifuge 1 S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientific, USA). Supernatanten ble overført til en ny glassflaske og satt til oppbevaring ved 4 °C, mens pelleten ble ekstrahert på nytt under de samme betingelsene. Etter 24 timer ble materialet igjen overført til 50 ml Falcon-rør og sentrifugert som tidligere beskrevet. Supernatanten ble så slått sammen med supernatanten som ble opparbeidet dagen før.

De sammenslåtte supernatantene ble inkubert ved – 20 °C i 1-2 timer for å gi et faseskille; en organisk (ACN rik) fase og en vandig (salt-rik) fase. For noen prøver oppsto også en tredje mellomfase. Fasene ble separert ved pipettering og overført til forhåndsveide 50 ml Falcon-rør. Prøvene ble deretter dampet inn til tørrstoff i en Scan Speed 50 vakuumsentrifuge (Scanvec, Danmark) ved 2000 rpm. De tørkede prøvene ble veid på nytt og tørrstoffmengden beregnet. Prøvene ble fryst ned ved -20 °C inntil videre separering og bioaktivitetstesting.

3.4.2 Fast-fase ekstraksjon

For å fjerne salt fra vann- og mellomfasene ble de forskjellige opparbeidede vann- og mellomfasene videre ekstrahert ved SPE. Tørket materiale ble løst opp i 0,05 % TFA til en konsentrasjon på 100 mg/ml. På grunn av forskjellige mengder tørrstoff i vann- og mellomfasene fra de forskjellige vevene ble Sep-Pak Vac C18 kolonner (Waters, USA) på 10, 5, 2 og 0,1 gram benyttet (se **Tabell 4**). Kolonnene ble montert på et stativ med vakuumsug og aktivert ved et gitt volum ACN, og påfølgende ekvilibrert med 0,05 % TFA (volumet varierte etter størrelsen på kolonnen, og er presentert i **Tabell 4**). Prøvematerialet ble deretter tilsatt og dryppet gjennom kolonnen i en hastighet på ca. 1 dråpe per sekund. Etter at prøvematerialet hadde gått gjennom kolonnen ble den vasket med et gitt volum 0,05 % TFA. Det retarderte materialet i kolonnen ble deretter stegvis eluert ut med en økende konsentrasjon av ACN. Elueringene ble gjort med konsentrasjonene 10, 40 og 80 % ACN + 0,05 % TFA, og de forskjellige SPE eluatene ble samlet opp i hvert sitt reagensrør. De forskjellige SPE eluatene, 10, 40 og 80 %, ble overført til forhåndsveide 50 ml Falcon-rør og dampet inn til tørrstoff ved vakuumsentrifugering som tidligere beskrevet i avsnitt **3.4.1**. Tørkede prøver ble veid og tørrstoffmengden ble beregnet. Prøvene ble deretter fryst ned ved -20 °C frem til videre separering og bioaktivitetstesting.

Tabell 4 – Sammenheng mellom kolonnestørrelse og vask-/ elueringsvolum. Tabellen gir en oversikt over kolonnestørrelsen til de forskjellige SPE-kolonnene benyttet relatert til egnet mengde prøvemateriale samt vask-/ elueringsvolum.

Kolonnestørrelse (gram materiale)	Kolonnevolum (ml)	Egnet prøvemengde (gram tørrvekt)	Vask / elueringsvolum (ml)
0,1	0,2	<0,1	0,5
2	3,6	1-2	10
5	8,0	2-5	20
10	16,8	5-10	30-60

3.5 Preparativ RP-HPLC

Preparativ revers fase HPLC (RP-HPLC) ble kjørt på 40 % SPE eluertet til hemocytterne. Et volum på 250 µl av SPE eluertet med konsentrasjonen 10 mg/ml (løst ut i milli-Q vann) ble injisert på kolonnen på HPLC-systemet (Waters Associates, Millipore Corp., USA). Systemet var utstyrt med en prep C18 kolonne (XBridge, 5µl; 12x250 mm). Absorbansen mellom 200-600 nm ble registrert via en 2996 PDA-detektor, og resultatene ble registrert ved programvaren Millennium³² (v 4.0). Den mobile fasen ble pumpet gjennom systemet fra to flasker med A) 0,05

% TFA og B) ACN + 0,05 % TFA, men en hastighet på 7 ml/min. De første 10 minuttene ble 100 % A pumpet gjennom systemet, etterfulgt av en gradient på 0 til 60 % B over 86 minutter. Fraksjonene ble samlet opp via en Gilson FC 204 fraksjonssamler (Gilson, USA) i fraksjoner på 1 minutt (7 ml). HPLC-kromatogrammet ble studert for å finne de mest interessante fraksjonene med tanke på tilstedeværelsen av AMP. Disse fraksjonen ble dampet inn til tørrstoff som tidligere beskrevet i avsnitt 3.4.1. De tørkede fraksjonene ble deretter løst i 250 µl milli-Q vann og lagret ved -20 °C inntil bioaktivitetstesting.

3.6 Massespektrometri

Aktive HPLC-fraksjoner samt SPE eluater med en MIC-verdi $\leq 62,5$ µg/ml ble analysert med et HPLC-MS-system med hensyn på deteksjon av molekylmassene på komponenter i løsningene. Rør med 20 µl prøvemateriale (løst ut i milli-Q vann) ble satt inn i HPLC-MS autosampleren, og et volum på 10 µl ble injisert på et HPLC-PDA-ESI-MS system (Waters Associates, Millipore corp., USA). Systemet besto av en Waters 2690 separasjonsmodul utstyrt med en C18 kolonne (Sunfire, 3µm; 2 x 100 mm). UV-Vis-spekteret (200-600 nm) ble registrert ved hjelp av en Waters 2998 PDA-detektor, og ESI-MS-spekteret ble registrert ved hjelp av en Waters micromass ZQ analysator. Dataene ble videre prosessert med programvaren MassLynx (v4.1). Det ble benyttet to mobile faser; A) 0,05 % TFA og B) ACN + 0,05 % TFA, som ble pumpet gjennom systemet med en hastighet på 20 µl/min med en gradient på 5 til 60 % B over 30 minutter.

MS-spektrene ble benyttet for å beregne molekylvektene på komponentene tilstede i de forskjellige SPE eluatene og HPLC-fraksjonene. For høymolekylære komponenter (>2 kDa) ble molekylvektene beregnet ved å relatere beslektede topper til hverandre i form av å finne ladningen til toppene. Følgende formel ble benyttet for å beregne ladningen (z) til to topper som ble antatt å høre sammen:

$$z_A = \frac{1}{(m/z_A - m/z_B)} \times (m/z_B - 1)$$

Hvor m/z_A var en topp med høyere m/z -verdi enn m/z_B . Ladningen til m/z_A (z_A) var et tilnærmet helt tall dersom toppene hørte sammen. Ladningen til m/z_B ble videre beregnet ved å legge til en ladning fra ladningen til toppen m/z_A (z_A). Molekylvekten til toppene ble så beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$Mw = (m/z \times z) - z$$

For lavmolekylære komponenter (< 2 kDa) var det forventet at komponenten(e) hadde tatt opp et positivt ladd atom (H^+ , Na^+ eller K^+). Molekylvekten til komponenten(e) ble beregnet ved å trekke fra et proton ($H^+ = 1$) fra m/z verdien til den toppen med lavest m/z -verdi. Relaterte topper som hadde tatt opp flere protoner eller andre positivt ladde atomer ble så identifisert ved å legge til atommassen til det positivt ladde atomet.

3.7 Antimikrobiell testing

3.7.1 Dyrking av bakterier og preparering av bruksløsninger

De nedfrosne bakteriestammene (se avsnitt [3.1.4](#)) ble dyrket opp på MH-plater og ga utgangspunkt til agarplater med brukskolonier. Hver bakteriestamme ble sådd ut på hver sin plate, og ble deretter satt til inkubering i 2-4 dager ved romtemperatur (avhengig av bakterienes vekstevne). Etter inkuberingen ble platene med brukskoloniene pakket inn i plast for å forhindre inntørking og oppbevart ved 4 °C i opptil 2 uker.

Med utgangspunkt i brukskoloniene ble bakteriestammene dyrket opp i flytende medium for å gi en bakterieløsning til testingen. Fra hver plate med de to forskjellige bakteriestammene ble en koloni overført til hvert sitt rør med 5 ml MH-medium for videre dyrkning. Rørene ble satt på ristning over natt (ca. 16 timer) ved romtemperatur. Dagen etter ble 20 µl av bakterieløsningen overført til nye rør med 5 ml MH-medium, og satt til inkubering ved ristning i romtemperatur i ca. 2 timer. Etter inkuberingen ble den optiske tettheten (OD) målt ved 600 nm (OD_{600}) (BioMate 3, Thermo scientific, USA) på de to bakterieløsningene. Avhengig av den målte OD_{600} verdien ble 3-20 µl av bakterieløsningen overført til 10 ml MH-medium for å gi en bakterietetthet på $2,5-3 \times 10^4$ bakterier/ml. Dette ga brukerløsningen som ble brukt under den antimikrobielle testingen. [Tabell 5](#) viser en oversikt som ble benyttet for å justere bakterieløsningen til ønsket bakterietetthet:

Tabell 5 – Tilpasning av bakterietettheten til brukerløsningene. Tabellen gir en oversikt over sammenhengen mellom målt OD₆₀₀ verdi og mengden bakterieløsning som overføres til 10 ml MH-medium for å gi rett bakterietetthet. Oversikten er utarbeidet fra tidligere OD₆₀₀ målinger gjort på de to bakteriestammene ved NFH.

OD₆₀₀ verdi	Volum bakterieløsning overført til 10 ml MH-medium
0,003-0,010	20 µl
0,010-0,030	10 µl
0,030-0,075	5 µl
0,075-0,100	4 µl
0,100-0,150	3 µl

3.7.2 Minste inhiberende konsentrasjon test av SPE eluater og organiske faser

En minste inhiberende konsentrasjon (minimal inhibition concentration; MIC) test ble utført for å bestemme den laveste konsentrasjonen av de forskjellige prøvematerialene som hemmet bakterieveksten av *E. coli* og *C. glutamicum*. De tørkede SPE eluatene og de organiske fasene (videre betegnet prøvematerialene) ble løst opp i milli-Q vann til en konsentrasjon på 1 mg/ml (stamløsning). For de prøvematerialene hvor det oppsto problemer med å løse prøven i vann ble de løst i ACN til en konsentrasjon opp mot 5 % avhengig av løsningsvevnen til materialet. Det ble på forhånd kontrollert at denne konsentrasjonen av ACN ikke ville påvirke bakterieveksten.

En mikrotiterplate med 96 brønner (Nunc, Thermo Scientific, USA) ble benyttet til MIC-testingen. Alle prøvematerialene ble fortynnet åtte ganger i en tofolds fortynningsrekke. Den høyeste konsentrasjonen var på 500 µg/ml, og de videre fortyningene utgjorde en konsentrasjon på 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 og 3.9 µg/ml. I den første brønnen i hver fortynningsrekke ble 100 µl av stamløsningen til det gitte prøvematerialet tilsatt. De resterende sju brønnene i fortynningsrekkene ble tilsatt 50 µl milli-Q vann hver. Fortyningene ble deretter utført ved at 50 µl ble tatt ut fra brønn 1 og overført til brønn 2 og blandet godt. Dette ble gjort videre nedover fortynningsrekka. I den siste brønnen ble 50 µl tatt ut og kastet. Dette gjorde at hver brønn inneholdt 50 µl prøvemateriale i forskjellige konsentrasjoner. Det ble kjørt to paralleller per prøvemateriale. Etter at hver brønn var fortynnet til de ønskede konsentrasjonene ble 50 µl bakterieløsning med bakterietettheten på $2,5-3 \times 10^4$ bakterier/ml tilsatt hver brønn. For å kontrollere bakterienes vekstevne ble det kjørt en vekstkontroll på hver plate. Her ble 50 µl milli-Q vann benyttet i stedet for prøvemateriale, og 50 µl bakterieløsning ble tilsatt hver brønn i likhet med testbrønnene med

prøvemateriale. Nunc forseglingssteip (Thermo scientific, USA) ble lagt over hver plate, og det ble stukket hull over hver brønn med en steril nål for å hindre kondens. Mikrotiterplatene ble deretter inkubert i en EnVision 2103 Multilabel Reader (PerkinElmer, Turku, Finland), ved 35 °C i 48 timer. Bakterieveksten, i hver av brønnene, ble registrert ved at OD₆₀₀ målinger ble gjort hver time under inkuberingen. Før hver avlesning ble platene ristet i 20 sekunder. Målingene ble registrert i det tilhørende dataprogrammet Wallac EnVision Manager (v 1.12).

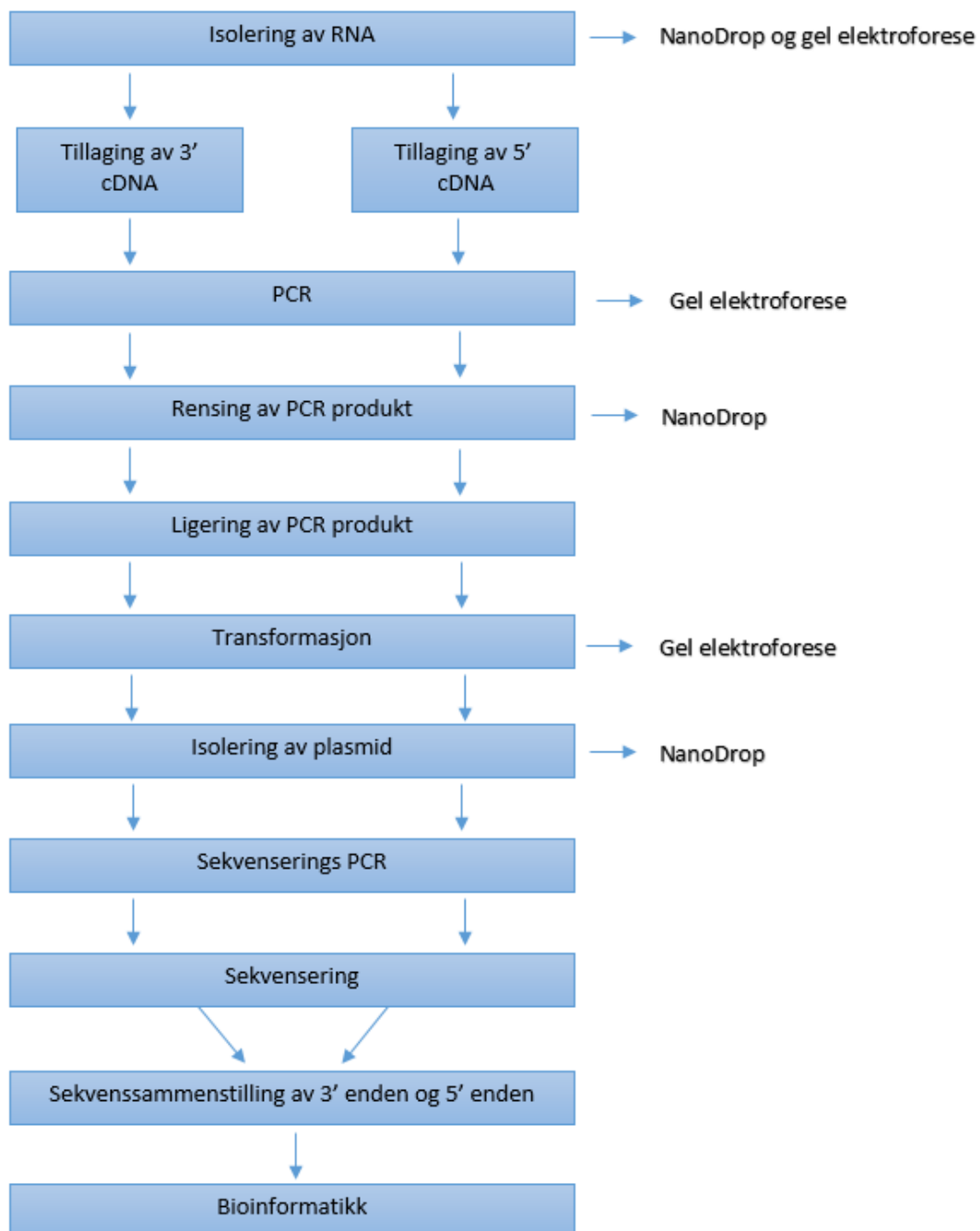
MIC ble avlest ved å sammenligne OD-verdiene til prøvematerialet i forskjellige konsentrasjoner opp mot vektkontrollen. Et prøvemateriale ble ansett som aktiv når OD-verdien ikke hadde steget i løpet av inkuberingen, noe som indikerte fullstendig hemming av bakterieveksten. I tillegg til avlesningen i EnVisions dataprogram ble platene kontrollert visuelt ved å se etter vekst i brønnene. Brønner hvor det tydelig var bakterievekst (grumset innhold) ble betegnet som ikke aktiv, mens brønner hvor bakteriene ikke hadde vokst (gjennomsiktig matt væske) ble betegnet som aktiv. Den laveste konsentrasjonen hvor vekst ikke var synlig visuelt ble satt til å være prøvematerialets MIC. For noen få prøver ble MIC-verdien kun bestemt ved avlesning av OD i EnVision.

3.7.3 Antimikrobiell test av HPLC-fraksjoner

Den antimikrobielle aktiviteten til HPLC-fraksjonene ble testet mot den Gram-positive bakterien *C. glutamicum* i en 96 brønns mikrotiterplate (Nunc, Thermo Scientific, USA). De utvalgte fraksjonene ble tilsatt hver sin brønn i mikrotiterplaten med et volum på 50 µl. Deretter ble 50 µl av bakterieløsningen, med konsentrasjonen $2,5-3 \times 10^4$ bakterier/ml, tilsatt hver brønn. Platen ble forseglet med et plastlokk (Nunc, Thermo Scientific, USA) og satt til inkubering i et varmeskap (Termaks, Bergen, Norge) som holdt 33°C i 24 timer. Etter inkuberingen ble platen avlest visuelt, og brønner hvor bakterieveksten var fraværende ble betegnet som aktive fraksjoner.

3.8 Metodeforløp for identifisering og karakterisering av cDNA-sekvenser

I den andre delen av oppgaven var hovedmålet å karakterisere cDNA-sekvenser som koder for AMP med utgangspunkt i partielle N-terminale peptidsekvenser (avsnitt 1.4.1). For å nå dette målet ble fremgangsmåten som beskrevet i **Figur 13** benyttet. De forskjellige metodene er beskrevet i nærmere detalj i avsnittene under.



Figur 13 - Metodeforløpet for identifisering og karakterisering av cDNA-sekvenser. Identifiseringen og karakteriseringen av cDNA-sekvenser tilhørende AMP ble gjort med utgangspunkt i partielle N-terminale sekvenser opparbeidet fra tidligere isolerte peptider i O-skjell (1.4.1).

3.9 Isolering av RNA

RNA ble isolert fra hemocytterne fra et O-skjell. Et volum på ca. 4 ml hemolymfe ble trukket ut fra et levende individ som tidligere beskrevet i avsnitt 3.3. For å holde prøvene stabil ble de holdt på is gjennom hele prosessen, med mindre annet er beskrevet. Et volum på 1 ml ble overført til hvert sitt eppendorfrør og umiddelbart sentrifugert ved 800 G i 20 minutter ved 4 °C (5417 R, Eppendorf AG, Tyskland). Supernatanten ble tatt av og kastet, og 1 ml TRIzol ble tilsatt hvert rør med den gjenværende pelleten. For å lysere og homogenisere prøvene ble de gjentatte ganger trukket inn og ut i en 1 ml sprøyte via en 23G nål helt til cellepelletene var fullstendig oppløst i TRIzol løsningsene. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 12 000 G i 15 minutter ved 4 °C (IEC MicroMax, Heigar, Norge). De samme betingelsene ble benyttet i senere sentrifugeringssteg, med mindre annet er beskrevet. Supernatanten ble overført til nye eppendorfrør, og 0,2 ml kloroform ble tilsatt for hver ml TRIzol. Rørene ble deretter ristet kraftig for hånd før de ble satt til inkubering i 2-3 minutter ved romtemperatur, etterfulgt av en ny sentrifugering. Etter sentrifugeringen hadde prøven delt seg i to faser med et proteinlag i midten. Den øverste fasen (vannfasen) ble overført til nye rør, og 0,5 ml kald isopropanol (oppbevart ved -20 °C) ble tilsatt, for hver ml TRIzol, til hvert av rørene og blandet godt. Prøvene ble deretter satt til inkubering i 5-10 minutter ved romtemperatur for felling av RNA før de ble sentrifugert i 10 minutter. Supernatanten ble så fjernet før pelleten ble vasket i 1 ml 75 % etanol (EtOH). Rørene ble vendt noen ganger før de ble sentrifugert ved 7500 G i 5 minutter ved 4 °C. To av pelletene ble løst ut i 30 µl Ultra Pure Water, mens to av pelletene ble lagret i 100 % EtOH ved -20 °C. Prøvene som ble løst i Ultra Pure Water ble lagret ved -80°C.

3.9.1 NanoDrop analyse

Prøvene med isolert RNA, løst i Ultra Pure Water, ble videre analysert spektrofotometrisk i et ND-1000 NanoDrop spektrofotometer (NanoDrop products, USA) for å måle RNA-konsentrasjonen til prøvene samt å analysere deres renhet. Instrumentet ble først rensert ved å tilsette 2 µl milli-Q vann, og en blank måling ble gjort ved å tilsette 2 µl Ultra Pure Water. Deretter ble absorbansen til 2 µl av prøvematerialet målt ved 260 nm for å bestemme RNA-konsentrasjonen. Absorbansen ble også målt i området mellom 200 og 300 nm for å gi et A_{260}/A_{280} forhold som reflekterte prøvens renhet. Dataene ble analysert i den tilhørende programvaren NanoDrop ND-1000 (v 3.1.2).

3.9.2 Gel elektroforese

De isolerte RNA-prøvene, løst i Ultra Pure Water, ble også analysert ved gel elektroforese for å bekrefte tilstedeværelsen av ribosomalt RNA (rRNA), som en indikator på at RNA var blitt isolert.

En 1 % agarosegel ble laget ved å blande 50 ml 1x TAE og 0,5 g agarose. Blandingen ble varmet opp i en mikrobølgeovn til agarosepartiklene var fullstendig oppløst, og ble deretter kjølt ned. Et volum på 2,5 µl EtBr ble tilsatt direkte i den nedkjølte løsningen. Gelen ble støpt og kjørt i et Liberty 4 høyhastighets gel kammer (Biokey American instruments, USA). Etter at gelen hadde stivnet ble gelkammeret fylt med destillert vann, mens sidekamrene ble fylt med 1x TAE. Et volum på 3 µl av 1 kb DNA plus ladder ble tilsatt den første brønnen. I de resterende brønnene ble et volum på 6 µl tilsatt, bestående av 5 µl prøvemateriale blandet med 1 µl 6X loading dye. Gel elektroforesen ble deretter kjørt i 10-12 minutter med en konstant spenning på 200 volt fra en Power pac 300 (Bio Rad, USA). Bilder av gelen ble tatt under UV-lys i en Gene genius Bio imaging system (Synogene, England), og analysert ved hjelp av den tilhørende programvaren GeneSnap (v. 7.12).

3.10 Syntese av cDNA

3.10.1 Syntese av cDNA for 3' enden

For syntese av cDNA for 3' enden ble de isolerte RNA-prøvene, løst opp i Ultra Pure Water, benyttet. Et volum tilsvarende ca. 2 µg RNA ble tilsatt PCR-rør sammen med 1 µl 10 mM dNTP miks, 1 µl G413 primer og Ultra Pure Water til et totalt volum på 10 µl. For å samle komponentene i bunnen av røret ble prøvene sentrifugert forsiktig. Prøvene ble deretter inkubert ved 70 °C i 10 minutter i en 2720 Thermal Cycler (AB applied biosystems, USA). Etter inkuberingen ble et ytterligere volum på 10 µl, bestående av 2 µl 10x M-MLV Revers Transkriptase Buffer, 1 µl M-MLV Revers Transkriptase, 0,5 µl RNase hemmer (40 units/µl) og 6,5 µl Ultra Pure water, tilsatt. Prøvene ble så satt tilbake i maskinen hvor de ble inkubert ved 37 °C i 60 minutter, etterfulgt av en inkubering på 10 minutter ved 94 °C for å inaktivere enzymet. De ferdige cDNA-løsningen ble oppbevart ved -20 °C inntil videre bruk. Dette materialet blir i senere avsnitt betegnet som 3' cDNA.

3.10.2 Syntese av cDNA for 5' enden

Syntese av cDNA for 5' enden ble gjort fra de isolerte RNA-prøvene, løst i Ultra Pure Water, ved hjelp av SMART cDNA Library Construction Kit fra Clontech. Et volum tilsvarende 1 µg isolert RNA ble tilsatt PCR-rør sammen med 1 µl G413 primer, 1 µl SMART oligo A primer og Ultra Pure water til et totalt reaksjonsvolum på 5 µl. Reaksjonsmaterialet ble blandet godt ved pipettering før røret ble sentrifugert forsiktig for å samle komponentene i bunnen av røret. Prøven ble inkubert ved 70 °C i 2 minutter i en 2720 Thermal Cycler (AB applied biosystems, USA), og ble deretter direkte overført til is for nedkjøling i 2 minutter. Prøvematerialet ble igjen sentrifugert forsiktig for å samle komponentene i bunnen av røret, før 2 µl 5X First-Strand Buffer, 1 µl DTT (20 mM), 1 µl dNTP miks (10 mM) og 1 µl Powerscript Reverse Transcriptase ble tilsatt for å gi et totalvolum på 10 µl. Prøvematerialet ble forsiktig mikset ved pipettering og sentrifugert for å samle komponentene i bunnen av røret. Prøven ble så satt tilbake i maskinen og inkubert ved 42 °C i 90 minutter. Deretter ble 100 µl Ultra Pure Water tilsatt før røret igjen ble inkubert i samme maskin ved 72 °C i 7 minutter. Den ferdige cDNA-løsningen ble oppbevart ved -20 °C inntil videre bruk. Dette materialet blir i senere avsnitt betegnet som 5' cDNA.

3.11 Design av primere

3.11.1 Degenererte primere

Fra tidligere er tre N-terminale peptidsekvenser opparbeidet (se avsnitt [1.4.1](#)). Med utgangspunkt i disse sekvensene ble degenererte primere for to av peptidsekvensene, OS-12 og OS-24, designet og bestilt fra Sigma-Aldrich. Primerne ble levert i pulverisert form og ble ved ankomst løst opp i Ultra Pure Water til en konsentrasjon på 100 µM. Fra disse stamløsningene ble brukerløsninger laget ved fortynningen 1:10. Stamløsningene ble oppbevart ved -20 °C. Brukerløsningene ble oppbevart i kjøleskap. Sekvensene til primerene samt navn og hybridiseringstemperatur er vist i [Tabell 6](#).

Tabell 6 – Oversikt over designede degenererte primere. Primere ble designet basert på de partielle N-terminale sekvensene til OS-12 og OS-24 vist i 1.4.1. En nærmere beskrivelse av de degenererte nukleotidkodene er gitt i **Appendiks 3**.

Primer navn	Hybridiserings-temperatur (°C)	Sekvens (5' -3')	Peptid
Mm1	62,9	GGNACNAAAYGYGGNGTNGGNTATA	OS-12
Mm2	65,9	GGNACNAAAYGYGGNGTNGGNTACA	
Mm3	64,0	GGNACNAAAYGYGGNGTNGGNTATT	
Mm4	64,2	GGNACNAAAYGYGGNGTNGGNTACT	
Mm5	53,2	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGTTGT	
Mm6	55,2	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGCTGT	
Mm7	55,6	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGTTGC	
Mm8	57,6	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGCTGC	
Mm9	49,1	GGNAARTGYTTYACNACATGG	
Mm10	48,5	GGNAARTGYTTYACNACTTGG	
Mm11	51,6	GGNAARTGYTTYACNACGTGG	
Mm12	50,7	GGNAARTGYTTYACNACCGTT	
Mm13	60,3	TGYGAYAARTGYGGNGCAAAT	OS-12
Mm14	60,9	TGYGAYAARTGYGGNGCAAAC	
Mm15	57,1	TGYGAYAARTGYGGNGCTAAT	
Mm16	57,6	TGYGAYAARTGYGGNGCTAAC	
Mm17	62,7	TGYGAYAARTGYGGNGCGAAT	
Mm18	63,4	TGYGAYAARTGYGGNGCGAAC	
Mm19	62,6	TGYGAYAARTGYGGNGCCAAT	
Mm20	63,2	TGYGAYAARTGYGGNGCCAAC	
Mm23	57,4	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGYTGAAARAATTGTA	
Mm24	57,5	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGYTGAAARAACCTGTA	
Mm25	60,7	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGYTGAAARAATTGCA	
Mm26	60,8	GTNMGNTAYACNACNAARGTNTGYTGAAARAACCTGCA	
Mm27	67,4	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAAACAGC	
Mm28	67,4	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAAACTGC	
Mm29	70,7	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAAACGGC	
Mm30	70,7	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAAACCGC	
Mm31	67,7	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAGACAGC	
Mm32	67,7	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAGACTGC	
Mm33	71,1	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAGACGGC	
Mm34	71,1	MGNGCNGGNTAYAAYAAYGAGACCGC	

3.11.2 Genspesifikke primere

Basert på sekvenseringsresultatene fra 3' cDNAet til OS-12 og OS-24 ble genspesifikke primere designet for finne den resterende delen av cDNA-sekvensen (5' enden). Dette ble gjort ved å revers komplementere de opparbeidede sekvensene i BioEdit sequence alignment Editor

(Hall, 1999). Disse sekvensene ble så analysert med Primer3Plus verktøyet (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>) som velger ut gode primeralternativer fra DNA-sekvensen basert på satte parametere, som ønsket hybridiseringstemperatur eller lengde. Basert på verktøyets anbefalinger ble primere designet og bestilt inn fra Sigma-Aldrich. Primerne ble levert i pulverisert form, og stam- og brukerløsninger ble tillaget og lagret som tidligere beskrevet i avsnitt 3.11.1. Sekvensene til primerene samt navn og hybridiseringstemperatur er vist i **Tabell 7**.

Tabell 7 – Oversikt over designede genspesifikke primere. Primerene ble designet baser på sekvenseringsresultatene fra 3' cDNA-endene. Designet ble gjort ved hjelp av Primer3Plus verktøyet.

Primernavn	Hybridiserings-temperatur (°C)	Sekvens (5' -3')	Peptid
Mm21	66,9	ACCGTAGCCACCAAAACACTTG	OS-24
Mm22	67,5	AGAGTTCCTGTTGCAAACGCAC	
Mm35	63,6	CTTTGGTTTACCGTCCATTGT	OS-12
Mm36	65,1	CAGCTCCTTTCCAGCAAGTTC	

3.12 PCR for amplifisering av cDNA fra ønsket sekvens

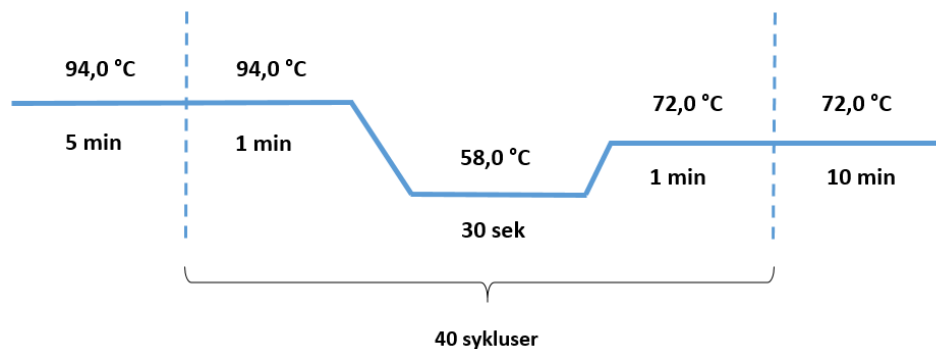
3.12.1 PCR av 3' cDNA ved hjelp av degenererte primere

Amplifiseringen av 3' endene, tilhørende de ønskede cDNA-sekvensene, ble gjort i en PCR-reaksjon hvor degenererte primere ble benyttet sammen med 3' cDNAet (avsnitt 3.10.1). PCR-reaksjoner ble kjørt med en reaksjonsmiks bestående av komponentene beskrevet i **Tabell 8**, med et totalt reaksjonsvolum på 25 µl. De forskjellige degenererte primerene benyttet er beskrevet i avsnitt 3.11.1.

Tabell 8 – Reaksjonskomponenter benyttet i PCR-reaksjonen for amplifisering av ønsket cDNA-sekvens fra 3' cDNAet.

Komponent	Mengde tilsatt (µl)
3' cDNA	1
G413 primer	0,5
Degenerert primer	1,5
dNTP miks (10 mM)	1
10X Buffer	2,5
Taq polymerase	0,3
Milli-Q vann	18,2

PCR-reaksjonene ble deretter kjørt i en 2720 Thermal Cycler (AB applied biosystems, USA) med programmet som beskrevet i **Figur 14**.



Figur 14 - Oppsett av PCR. Figuren viser PCR-programmet som ble benyttet for amplifisering av cDNA-sekvensene (både 3' enden og 5' enden) ved bruk av degenererte primere (3' enden) eller genspesifikke primere (5' enden).

3.12.2 PCR av 5' cDNA ved hjelp av genspesifikke primere

Amplifiseringen av 5' endene, tilhørende de ønskede cDNA-sekvensene, ble gjort ved hjelp av de genspesifikke primerene beskrevet i avsnitt **3.11.2**. Det ble kjørt PCR-reaksjoner for hver av primerene sammen med komponentene som beskrevet i **Tabell 9**. Som templat ble 5' cDNAet (avsnitt **3.10.2**) benyttet.

Tabell 9 – Reaksjonskomponenter benyttet i PCR-reaksjonen for amplifisering av ønsket cDNA-sekvens fra 5' cDNAet.

Komponent	Mengde tilsatt (µl)
5' cDNA	1
SMART oligo A primer	0,5
Genspesifikk primer	1,5
dNTP miks (10 mM)	1
10X Buffer	2,5
Taq polymerase	0,3
Milli-Q vann	18,2

PCR-reaksjonene ble deretter kjørt i en 2720 Thermal Cycler (AB applied biosystems, USA) med programmet som beskrevet i **Figur 14**.

3.12.3 Gel elektroforese av PCR-prøver

Etter endt PCR-reaksjon ble alle prøvene analysert ved gel elektroforese for å identifisere hvilke prøver som hadde gitt et PCR-produkt. Gel elektroforesen ble gjort etter samme fremgangsmåte som tidligere beskrevet i avsnitt 3.9.2. Prøver som viste et tydelig bånd på gelen under UV-lys ble betegnet som positive, og ble benyttet videre.

3.13 Ekstraksjon og rensing av PCR-produkter

For å isolere alt materialet tilhørende de forskjellige PCR-produktene, fra de positive prøvene, ble hele det resterende prøvematerialet fra PCR-reaksjonene separert ved gel elektroforese. Fremgangsmåten for gel elektroforesen var lik som tidligere beskrevet i avsnitt 3.9.2, med unntak av at et større volum prøvemateriale ble applisert. Gelen ble heller ikke analysert under det sterke UV-lyset til Bio image maskinen. Båndene ble i stedet visualisert under en svak UV-lampe i et mørkt rom, og gelen ble kuttet rundt båndene ved hjelp av en steril skalpell. Disse gelbitene ble overført til hvert sitt forhåndsveide eppendorfrør.

PCR-produktene i de forskjellige gelbitene ble rensert fra gelen ved bruk av QIAquick Gel extraction kit (250) fra QIAGEN. Til hvert av eppendorfrørene, med gelbitene i, ble 3 volum av Buffer QC tilsatt per gelvolum (100 mg ~ 100 µl). Prøvene ble deretter satt til inkubering ved 50 °C i 10 minutter, og ble ristet ca. hvert andre minutt for å hjelpe til med oppløsningen av gelbiten. Etter fullstendig oppløsning ble ett gelvolum av isopropanol tilsatt prøvene, og mikset før prøvene ble overført til hver sin QIAquick spin kolonne i en 2 ml oppsamlertube. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 10 000 G i 1 minutt (5417 R, Eppendorf AG, Tyskland), og materialet som ble samlet opp i oppsamlertubene ble kastet. Alle resterende sentrifugeringer ble gjort under de samme betingelsene. Kolonnene ble vasket ved at 0,75 ml buffer PE ble satt på kolonnen og sentrifugert. Materialet som gikk gjennom kolonnene ble kastet, før de ble sentrifugert nok en gang. Kolonnene ble deretter plassert i hvert sitt 1,5 ml eppendorfrør, og 30 µl Buffer EB ble tilsatt kolonnene etterfulgt av inkubering i 1 minutt i romtemperatur. Etter inkuberingen ble prøvene sentrifugert slik at PCR-produktet ble eluert ut i eppendorfrøret. DNA-konsentrasjonen til de rensede PCR-produktene ble deretter målt spektrofotometrisk ved NanoDrop som tidligere beskrevet i avsnitt 3.9.1, med det unntaket at EB buffer ble benyttet til blank måling. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C inntil videre bruk.

3.14 Ligering og transformasjon

3.14.1 Ligering av PCR-produkt inn i pGEM-T Easy vektor

Ligeringen av de rensede og isolerte PCR-produktene inn i en pGEM[®]-T easy vektor ble gjort ved hjelp av et pGEM[®]-T Easy vector system fra Promega. På grunn av lav DNA-konsentrasjon i de isolerte PCR-produktene ble så stor mengde som mulig av PCR-produktene benyttet i reaksjonene. Ligeringsreaksjonene ble satt opp med komponentene som beskrevet i **Tabell 10**, og ga et totalt reaksjonsvolum på 10 µl. Før bruk ble røret med pGEM[®]-T easy vektorene forsiktig sentrifugert for å samle komponentene i bunnen av røret. Hver av komponentene ble overført til et eppendorfrør, og ble mikset ved pipettering før prøvene ble satt til inkubering ved romtemperatur i 1,5 time for å la ligeringsreaksjonen gå.

Tabell 10 – Komponentene benyttet i ligeringsreaksjonene.

Reaksjonskomponenter	Mengde (µl)
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase	5
pGEM [®] -T easy vektor	0,6
PCR-product	3,7
T4 DNA ligase	0,7

3.14.2 Transformasjon

Produktene fra ligeringsreaksjonene ble videre benyttet til transformasjon av plasmid (vektor + PCR-produkt) inn i bakterieceller. Til transformasjonene ble One Shot TOP10 Chemically competent *E. coli* celler fra Invitrogen benyttet. Cellene ble tatt ut fra fyser (-80 °C) og satt på is for tining. I mellomtiden ble rørene med produktene fra ligeringsreaksjonene sentrifugert for å samle komponentene i bunnen av rørene. Et volum på 5 µl av ligeringsreaksjonsproduktene ble overført til hvert sitt rør med de tinte cellene. For å blande prøvene med cellene ble det forsiktig knipset på rørene. Prøvene ble deretter satt på is for inkubering i 20 minutter, før de ble overført til en vannbad (42 °C) i 45-50 sekunder for å gi cellene et varmesjokk. Prøvene ble så satt rett tilbake på is i 2 minutter før 950 µl romtemperert LB-medium ble tilsatt. Transformasjonskulturene ble så satt til inkubering ved 37 °C i 1 time ved resting. Etter inkuberingen ble bakteriekulturene strøket ut på to LA-plater hver, med 100 µg/ml ampicillin. På den ene platen ble 50 µl støket ut, mens 100 µl ble strøket ut på den andre. Platene ble så satt til inkubering over natten ved 37 °C. Dagen etter ble platene kontrollert for vekst.

3.14.3 Identifisering av kolonier med tilstedeværelse av klonede PCR-produkter

For å teste hvorvidt de forskjellige transformasjonskoloniene på platene inneholdt bakterier som hadde tatt opp plasmidene, med det ligerte PCR-produktene, ble PCR-reaksjoner kjørt på utvalgte kolonier. Kolonier, med god avstand til andre kolonier, ble valgt ut. RCR-reaksjonene ble satt opp og kjørt som tidligere beskrevet i avsnitt 3.12 med det unntaket at én koloni ble benyttet som templat istedenfor cDNA, samt at vannmengden ble justert opp til 19 µl. Den samme degenererte/genspesifikke primeren som ble benyttet for amplifisering av den nå ligerte sekvensen ble også benyttet her. Koloniene ble merket av på platen og overført til PCR-rør med hjelp av en pipettespiss.

PCR-produktene ble videre analysert på en 1 % agarosegel som tidligere beskrevet i avsnitt 3.9.2. Ved å se hvilke av PCR-reaksjonene som ga bånd kunne kolonier som inneholdt plasmidet med cDNA-sekvensen bestemmes. Kolonier med positivt resultat ble overført til rør med 5 ml LB-medium ved hjelp av en podenål og satt til dyrking over natten på risting ved 37 °C.

3.15 Isolering av plasmid

Transformasjonskoloniene dyrket opp i LB-medium over natten ble benyttet for isolering av plasmider. Bakteriecelleene ble først spunnet ned for å gi en cellepellet ved at 1,5 ml av bakteriekulturene ble overført til hvert sitt eppendorfrør og sentrifugert ved 6000 G i 1 minutt (5417 R, Eppendorf AG, Tyskland). Supernatanten ble tatt av og kastet.

For å isolere plasmidene ble et QIAprep Spin miniprep kit fra QIAGEN benyttet. Cellepelletene ble resuspendert i 250 µl buffer P1 og homogenisert ved vortexing. For å lysere cellene ble 250 µl buffer P2 tilsatt, og løsningene ble mikset ved vending av rørene 4-6 ganger. Et volum på 350 µl Buffer N3 ble deretter tilsatt, og løsningene ble umiddelbart mikset før de ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 10 minutter (IEC MicroMax, Heigar, Norge). Etter sentrifugeringen ble supernatantene overført til hver sin QIAprep spin kolonne, i en oppsamletube, ved pipettering. Kolonnene ble så sentrifugert i 1 minutt ved 13 000 rpm (IEC MicroMax, Heigar, Norge), og det oppsamlede materialet i tubene ble kastet. Alle de resterende sentrifugeringene ble gjort under samme betingelser. Et volum på 500 µl buffer PB ble tilsatt, før prøvene ble sentrifugert. Det oppsamlede materialet ble nok en gang kastet. Deretter ble 750 µl buffer PE tilsatt kolonnene, og kolonnene ble sentrifugert nok en gang.

Etter sentrifugeringen ble kolonnene overført til hvert sitt 1,5 ml eppendorfrør, og 40 µl buffer EB ble tilsatt midt på kolonnene etterfulgt av 1 minutt inkubering ved romtemperatur. Materialet i kolonnen ble så eluert ut ved å sentrifugere kolonnene. DNA-konsentrasjonen på de isolerte plasmidene, samt prøvenes renhet, ble målt spektrofotometrisk ved NanoDrop som tidligere beskrevet i avsnitt **3.9.1**. Målingene ble gjort med buffer EB som blank. Prøvene med de isolerte plasmidene ble oppbevart ved -20 °C inntil videre bruk.

3.16 Sekvensering av isolerte plasmid

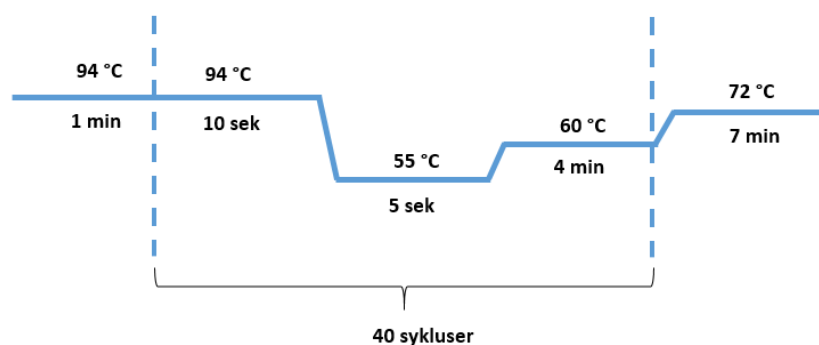
Prøvene med de isolerte plasmidene ble videre benyttet i en sekvenserings PCR for å klargjøre prøvene til sekvensering. Det ble totalt benyttet ca. 200 ng plasmid til hver reaksjon, sammen med de andre reaksjonskomponentene som beskrevet i **Tabell 11** til et totalt reaksjonsvolum på 10 µl.

Tabell 11 - Reaksjonskomponenter benyttet i sekvenserings PCR.

Reaksjonskomponenter	Mengde (µl)
Big Dye 3.0	1
5X sekvenserings buffer	2
T7 primer (1 µM)	1
Templat (plasmid)	X ^a
Vann	6-X

^a Avhengig av DNA konsentrasjonen på de isolerte plasmidene

PCR-reaksjonen ble kjørt i en 2720 Thermal cycler (AB applied biosystems, USA) med programmet som beskrevet i **Figur 15**.



Figur 15 - Oppsettet av sekvenserings PCR. Figuren viser PCR-programmet som ble benyttet for å klargjøre prøvene til sekvensering i en sekvenserings PCR.

Prøvene fra sekvenserings PCR ble levert inn for sekvensering hos sekvenseringsplattformen til instituttet for medisinsk genetikk ved det helsevitenskaplige fakultet (UiT- Norges arktiske universitet).

3.17 Bioinformatiske analyser

3.17.1 BioEdit

Sekvenseringsresultatene fra 3' cDNA og 5' cDNA (avsnitt 3.16) ble analysert med programvaren BioEdit Sequence alignment Editor (Hall, 1999) for å identifisere sekvensen som var satt inn i plasmidene. Delene av sekvensen tilhørende plasmidet ble fjernet slik at den innsatte sekvensen fra 3' cDNAet og 5' cDNAet kunne identifiseres. cDNAet sin 3' enden og 5' enden ble sekvenssammenstilt ved en ClustalW multiplum sekvenssammenstilling (Thompson *et al.*, 1994) for å finne den overlappende regionen mellom 3' enden og 5' enden av cDNA-sekvensene som hørte til den samme sekvensen. De to endene, 3' enden og 5' enden, tilhørende samme sekvens ble så slått sammen til en helhetlig cDNA-sekvens. Sekvenssammenstillingen ble gjort ved standard betingelsene.

3.17.2 Bestemmelse av kodende sekvens

De helhetlige cDNA-sekvensene ble analysert ved hjelp av Expert Protein Analysis system (ExpASY) sitt translasjonsverktøy (<http://web.expasy.org/translate/>) for å identifisere den kodende sekvensen. Verktøyet translerte cDNA-sekvensen til peptidsekvens i alle åtte leserammene, og den deduserte peptidsekvensen ble identifisert.

3.17.3 Predikasjon av signalpeptid

De deduserte peptidsekvensene ble analysert ved hjelp av SignalP 4.1 Serveren (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen *et al.*, 2011) for å indentifisere tilstedeværelsen og spaltningsposisjoner for eventuelle signalpeptider. Etter at signalpeptider var lokalisert ble de modne peptidsekvensene identifisert. De modne peptidsekvensene ble videre sekvenssammenstilt med de partielle N-terminale sekvensene for å kontrollere et samsvar mellom sekvensene. Dette ble gjort via en ClustalW multiplum sekvenssammenstilling i BioEdit (Thompson *et al.*, 1994).

3.17.4 Predikasjon av fysiske og kjemiske egenskaper

ProtParam verktøyet til ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005) ble benyttet for beregning av fysiske og kjemiske parametere, som molekylvekt, isoelektrisk punkt og aminosyresammensetningen til de modne peptidsekvensene. Søkene ble gjort på de modne peptidsekvensene fra de deduserte peptidsekvensene.

3.17.5 Slektssøk

Homologisøk i NCBI's database

Homologisøk ble gjennomført ved hjelp av Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) programvaren til National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1997). BLAST søkene gjennomført var protein-BLAST søk av typen position specific iterated (PSI)-BLAST, hvor de deduserte peptidsekvensene ble benyttet i søkene. Søkene ble gjennomført ved standard betingelser. En ClustalW multiplum sekvenssammenstilling (Thompson *et al.*, 1994) ble gjort i BioEdit mellom hver av de deduserte peptidsekvensene og peptidsekvensene fra peptidene fremkommet ved hvert av PSI-BLAST søkene.

Identifisering av proteinfamilie

De deduserte peptidsekvensene ble benyttet til slektssøk i European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) sin Pfam database (<http://pfam.xfam.org/>) og NCBI's conserved domain database (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) for å se om peptidene tilhørte noen kjent proteinfamilier. Begge søkene ble gjort under standardbetingelsene.

3.17.6 Predikasjon av peptidenes struktur

En predikasjon av potensielle disulfidbindinger til de modne peptidsekvensene fra de deduserte peptidsekvensene ble gjort ved hjelp av DiANNA 1.1 web server (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>; Ferrè og Clote, 2005a, 2005b, 2006).

Den tredimensjonale strukturen til de modne peptidsekvensene ble predikert ved hjelp av Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre²) verktøyet (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>; Kelley og Sternberg, 2009).

4. Resultater

4.1 Utbytte fra ekstrahering av materiale

Det ble totalt samlet inn materiale fra 34 voksne O-skjell. For vev som ga små mengder materiale (hemocytter, fot, munnpalp og byssustråder) ble alt materiale tørket, mens for vev som ga større mengde materiale ble kun en tilstrekkelig andel av materialet tørket inn og ekstrahert. **Tabell 12** gir en oversikt over startmengden materiale som ble benyttet til løsemiddelekstraksjonen samt mengden materiale gjenvunnet i vannfasene, de organiske fasene og SPE eluatene fra de forskjellige vevene. Ved ekstraksjon av kappe, gjeller og gonader oppsto det i tillegg til vannfasene og de organiske fasene en mellomfase under væske-væske separasjonen (se **Figur 16**). Denne ble samlet opp og behandlet likt som vannfasene, og ble videre ekstrahert ved SPE.

Fra hemocytterne ble det totalt samlet inn 0,44 gram materiale (tørrvekt). Etter SPE av den opparbeidede vannfasen ble det gjenvunnet 1 mg materiale i 10 % SPE eluatet, 16 mg materiale i 40 % SPE eluatet og 0,8 mg materiale i 80 % SPE eluatet.

Tabell 12 - Utbytte fra ekstraheringen. Tabellen gir en oversikt over mengden startmateriale for løsemiddelekstraksjonen (60 % ACN + 0,1 % TFA) samt gjenvunnet materiale i vannfasene, mellomfasene, de organiske fasene og de forskjellige SPE eluatene. Materialet er oppgitt i tørrvekt; gram (organisk fasene, vannfasene og mellomfasene) og milligram (SPE eluatene).

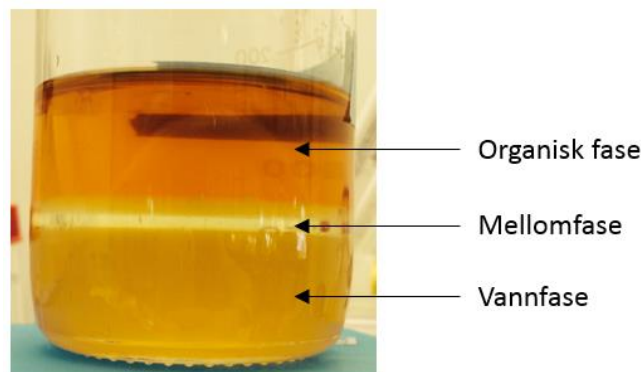
Vev	Tørrvekt av vev	Organisk fase	Vannfase	Mellom-fase	10 % SPE	40 % SPE	80 % SPE
	Gram tørrvekt				Milligram tørrvekt		
Hemocytter	0,44	0,01	0,16	-	1,0	16,0	0,8
Cellefri hemolymfe	12,10	0,15	11,69	-	12,0	5,0	2,0
Hemolymfe med celler	12,50	0,18	12,30	-	40,0	46,0	5,0
Kappe	19,60	0,36	4,94	-	185,0	109,0	30,0
				0,06	1,0 ^a	0,4 ^a	4,0 ^a
Gjeller	12,90	0,42	3,15	-	138,0	219,0	11,0
				0,52	25,0 ^a	16,0 ^a	7,0 ^a
Gonader	11,60	0,38	2,57	-	77,0	279,0	10,0
				0,18	10,0 ^a	4,0 ^a	3,0 ^a
Fot	3,10	0,07	0,68	-	27,0	18,0	5,0
Munnpalp	0,40	0,01	0,12	-	6,0	6,0	3,0
Byssustråder	7,30	0,12	1,00	-	8,0	5,0	1,0
Resterende materiale ^b	20,90	0,76	5,10	-	144,0	268,0	37,0

^a Mengde gjenvunnet material i SPE eluatene fra mellomfasen

^b Skallet var ekskludert

- Ingen mellomfase oppsto ved væske-væske separasjon

De største prosentvise mengdene gjenvunnet materiale fra vannfasene var fra hemolymfe med og uten celler med henholdsvis 98,4 og 96,6 %. Etter SPE av vannfasene hadde hemocytterne det høyeste utbyttet med 3,64 % i 40 % SPE eluatet. Gjenvunnet materiale i SPE eluatene var betydelig mindre enn i vannfasene, noe som indikerer at vannfasene inneholdt store mengder salter. Kun en liten andel (1,1 til 3,6 %) av utgangsmaterialet endte opp i den organiske fasen. En oversikt over prosentvis gjenvunnet materiale i det forskjellige ekstraktene og SPE eluatene er vist i **Appendiks 5**.



Figur 16 - Faseskille ved væske-væske separasjon. Bildet viser faseskillingen ved væske-væske separasjon i en av prøvene hvor en tredje fase (betegnet mellomfase) oppsto mellom den øvre organiske fasen og den nedre vannfasen. Væske-væske separasjonen ble gjort på materiale ekstrahert i 60 % ACN + 0,1 % TFA.

4.2 Antimikrobiell aktivitet

Den antimikrobielle aktiviteten til SPE eluatene og de organiske fasene ble testet mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum*. De forskjellige ekstraktene ble fortynnet i tofoldsfortynninger fra en konsentrasjon på 500 µg/ml til 3,9 µg/ml (med noen unntak), slik at MIC kunne bestemmes for de forskjellige ekstraktene. Disse resultatene er presentert i avsnittene under.

4.2.1 Antimikrobiell aktivitet i SPE eluatene fra vannfasene

En oversikt over MIC-verdiene til SPE eluatene fra vannfasene fra ulike organer/vev fra O-skjell er vist i **Tabell 13**. Alle vevene viste en antimikrobiell aktivitet i større eller mindre grad. Mot *C. glutamicum* viste totalt 26 av 30 SPE eluater antimikrobiell aktivitet. Det mest aktive av disse eluatene var 40 % SPE eluatet fra kappen, hvor en MIC-verdi på 15,6 µg/ml ble detektert. Videre viste 4 SPE eluater en MIC-verdi på 31,25 µg/ml, deriblant 10 og 40 % SPE eluatet fra hemocytterne.

Mot *E. coli* var aktiviteten noe lavere, med 9 aktive (MIC \leq 500 $\mu\text{g/ml}$) SPE eluater detektert. Det mest aktive eluatet var 40 % SPE eluatet fra hemocytterne, hvor en MIC-verdi på 62,5 $\mu\text{g/ml}$ ble detektert. Tre av eluatene, 40 % SPE eluatene fra cellefri hemolymfe, hemolymfe med celler og resterende materiale, viste aktivitet ved 125 $\mu\text{g/ml}$.

Tabell 13 - Antimikrobiell aktivitet i SPE eluatene fra de forskjellige organene/vevene. Den antimikrobielle aktiviteten ble testet mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum* i en tofolds fortynningsrekke hvor 500 $\mu\text{g/ml}$ var den høyeste konsentrasjonen testet og 3,9 $\mu\text{g/ml}$ var den laveste. MIC er i tabellen oppgitt i $\mu\text{g/ml}$, og er definert som den laveste konsentrasjonen hvor bakterievekst ikke var synlig ved visuell avlesning.

Prøve	Fraksjon (SPE eluat)	Antimikrobiell aktivitet (MIC; $\mu\text{g/ml}$)	
		<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Hemocytter	10 %	500 ^b	31,25 ^b
	40 %	62,5 ^b	31,25 ^b
	80 %	500 ^b	62,5 ^b
Cellefri hemolymfe	10 %	>500 ^{a,b}	>500 ^{a,b}
	40 %	125 ^b	31,25 ^b
	80 %	>500 ^{a,b}	>500 ^{a,b}
Hemolymfe med celler	10 %	>500 ^a	125
	40 %	125	62,5
	80 %	>500 ^a	31,25
Kappe	10 %	>500 ^a	125
	40 %	>500 ^a	15,6
	80 %	>250 ^a	62,5
Gjeller	10 %	>500 ^a	250
	40 %	500	62,5
	80 %	>500 ^a	62,5
Gonader	10 %	>500 ^a	125
	40 %	250	125
	80 %	>500 ^a	62,5
Fot	10 %	>500 ^a	250
	40 %	>500 ^a	125
	80 %	>500 ^a	125
Munnpalp	10 %	>500 ^a	125
	40 %	>500 ^a	62,5
	80 %	250	125
Byssustråder	10 %	>500 ^a	>500 ^a
	40 %	>500 ^a	250
	80 %	>500 ^a	>500 ^a
Resterende materiale	10 %	>500 ^a	125
	40 %	125	125
	80 %	>500 ^a	62,5

^a Ingen aktivitet sett ved høyest konsentrasjon i testen.

^b MIC ble lest av i dataprogrammet tilhørende EnVision.

4.2.2 Antimikrobiell aktivitet i SPE eluatene fra mellomfasene

Den antimikrobielle aktiviteten til SPE eluatene opparbeidet fra mellomfasene til gonadene, gjellene og kappen er vist i **Tabell 14**. Totalt 9 SPE eluater ble testet, hvorav 8 var aktive mot *C. glutamicum*. Mellomfasen til gonadene så ut til å være den mest aktive med MIC-verdier på 125, 31.25 og 62.5 µg/ml for henholdsvis 10, 40 og 80 % SPE eluatene.

Mot *E. coli* var aktiviteten noe lavere med tre aktive SPE eluater, hvorav 40 % SPE eluatet fra gonadene var det mest aktive med en MIC på 62,5 µg/ml.

Tabell 14 - Antimikrobiell aktivitet til SPE eluatene fra mellomfasene til kappe, gjeller og gonader. Den antimikrobielle aktiviteten ble testet mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum* i en tofolds fortynningsrekke hvor 500 µg/ml var den høyeste konsentrasjonen testet (med unntak av 40 % SPE eluatet fra kappen hvor 250 µg/ml var høyeste konsentrasjon), og 3,9 µg/ml var den laveste. MIC er i tabellen oppgitt i µg/ml, og er definert som den laveste konsentrasjonen hvor bakterievekst ikke var synlig ved visuell avlesning.

Prøve	Fraksjon (SPE eluat)	Antimikrobiell aktivitet (MIC; µg/ml)	
		<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Kappe	10 %	>500 ^a	>500 ^a
	40 %	>250 ^{a,b}	500 ^b
	80 %	>500 ^a	250
Gjeller	10 %	>500 ^a	125
	40 %	250	125
	80 %	>500 ^a	250
Gonader	10 %	500	125
	40 %	62,5	31,25
	80 %	>500 ^a	62,5

^a Ingen aktivitet sett ved høyest konsentrasjon i testen.

^b Testen ble utført ved inkludering i varmeskap ved 35 °C i 24 timer. Platene ble lest av visuelt.

4.2.3 Antimikrobiell aktivitet i de organiske fasene

Totalt 10 organiske faser ble testet for antimikrobiell aktivitet, og MIC-verdiene for disse er vist i **Tabell 15**. Fire av fasene viste aktivitet mot *C. glutamicum*, hvor gjellene var det mest aktive med en MIC på 62,5 µg/ml. På grunn av løselighetsproblemer, samt begrenset mengde materiale, ble hemocytterne løst til en konsentrasjon på 250 µg/ml. Den høyeste konsentrasjonen benyttet i testen ble dermed 125 µg/ml, hvor ingen aktivitet ble detektert mot verken *E. coli* eller *C. glutamicum*. Ingen av de organiske fasene viste en antimikrobiell aktivitet mot *E. coli* ved høyeste konsentrasjon testet.

Tabell 15 - Antimikrobiell aktivitet i de organiske fasene. Den antimikrobielle aktiviteten ble testet mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum* i en tofolds fortynningsrekke hvor 500 µg/ml var den høyeste konsentrasjonen testet og 3,9 µg/ml var den laveste. For hemocytterne var 125 µg/ml den høyeste konsentrasjonen testet. MIC er i tabellen oppgitt i µg/ml, og er definert som den laveste konsentrasjonen hvor bakterievekst ikke var synlig ved visuell avlesning.

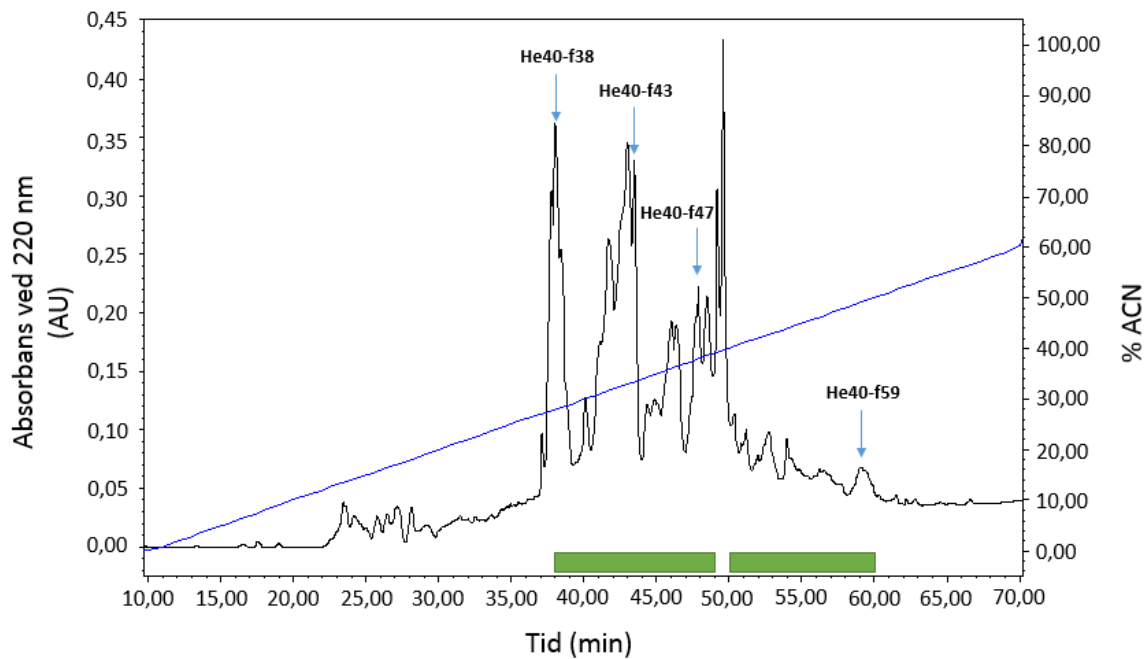
Prøve	Antimikrobiell aktivitet (MIC; µg/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
Hemocytter	>125 ^a	>125 ^a
Cellefri hemolymfe	>500 ^a	>500 ^a
Hemolymfe med celler	>500 ^a	>500 ^a
Kappe	>500 ^a	250
Gjeller	>500 ^a	62,5
Gonader	>500 ^a	>500 ^a
Fot	>500 ^a	>500 ^a
Munnpalp	>500 ^a	500
Byssustråder	>500 ^a	>500 ^a
Resterende materiale	>500 ^a	500

^a Ingen aktivitet sett ved høyest konsentrasjon i testen

4.3 Preparativ HPLC av SPE eluater

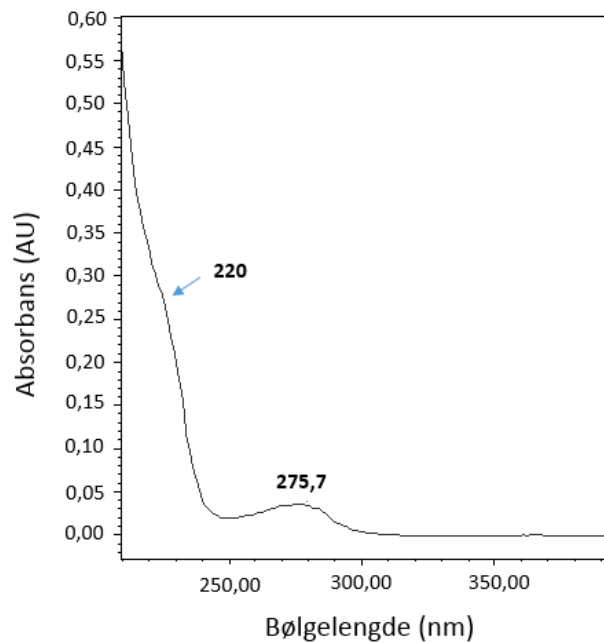
Siden det var forventet at hemocytterne var det materialet som hadde størst innhold av AMP, samt at 40 % SPE eluatet fra hemocytterne viste høy aktivitet, ble dette eluatet videre separert med prep RP-HPLC. Materialet ble kjørt på en C18 kolonne med en gradient på 0 til 60 % ACN over 86 minutter, og det eluerte materialet ble detektert av en PDA-detektor og samlet opp i 1 minutts-fraksjoner. UV-Vis kromatogrammet viser deteksjon av materiale som absorberer lys ved 220 nm (**Figur 17**), i tidsspennet 10 til 70 minutter. Kromatogrammet viser at hovedvekten av komponentene fra 40 % SPE eluatet fra hemocytterne ble eluert ut og detektert mellom 36 og 60 minutter inn i kjøringen. Det var også noen små mengder materiale som ble eluert ut og detektert mellom 22 til 30 minutter.

Fraksjonene samlet opp i tidsspennet 22-64 minutter ble valgt ut for antimikrobiell testing mot *C. glutamicum*. Fraksjonene i områdene 38 til 48 minutter samt området mellom 50 til 59 minutter viste antimikrobiell aktivitet, noe som innebærer at totalt 21 av de 42 fraksjonene som ble testet viste antimikrobiell aktivitet mot *C. glutamicum*.



Figur 17 – UV-Vis-kromatogram (lysabsorpsjon ved 220 nm) etter prep-RP-HPLC av 40 % SPE eluatet fra hemocytterne. Fraksjoneringen av 40 % SPE eluatet fra hemocytterne ble gjort ved hjelp av RP-HPLC på en C18 kolonne, med en ACN gradient som vist på den blå linja. Området merket med grønne bokser viser til hvilke fraksjoner som viste aktivitet mot *C. glutamicum*.

Et UV-Vis-spekter, valgt ut fra fraksjon 38, representerer de typiske UV-Vis-spektrene detektert i området med mest materiale. Dette spekteret er vist i **Figur 18**, og viser en skulder ved 220 nm og et topp rundt 275 nm. Dette indikerer at de detekterte komponentene er peptider/proteiner.



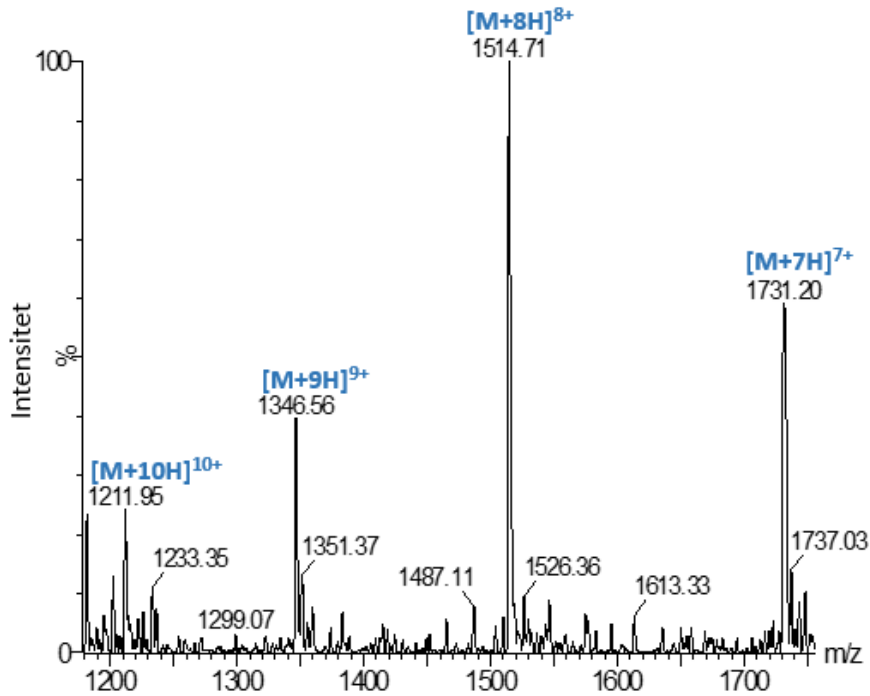
Figur 18 - UV-Vis-spekter fra en utvalgt aktiv HPLC-fraksjon (He40-f38). Spekteret representerer de typiske UV-Vis-spektrene sett i området med aktive fraksjoner, og indikerer tilstedeværelse av peptider/proteiner.

4.4 Innledende karakterisering av peptider

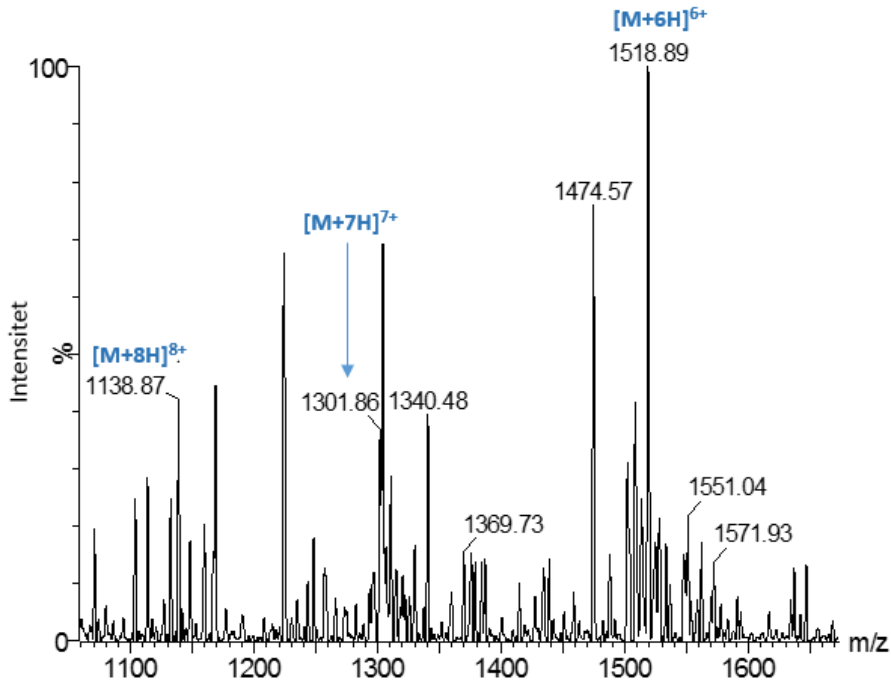
Med utgangspunkt i aktivitetsdata ble aktive HPLC-fraksjoner og SPE eluater analysert med HPLC-PDA-ESI-MS for å få et nærmere innblikk i hvilke komponenter som kunne være kilden til den observerte antimikrobielle aktiviteten. Alle de aktive HPLC-fraksjonene ble analysert, samt alle SPE eluatene som viste aktivitet ved 62,5 µg/ml eller lavere mot den Gram-positive bakterien *C. glutamicum* (med unntak av 80 % SPE eluatet fra «resterende materiale»). Hovedfokuset var å identifisere tilstedeværelsen av tidligere delvis karakteriserte peptider, men prøvene ble også analysert for påvisning av andre tilstedeværende peptider som potensielt kan stå bak den antimikrobielle aktiviteten som ble påvist.

4.4.1 Tilstedeværelsen av tidligere isolerte peptider i aktive HPLC-fraksjoner

To av HPLC fraksjonene fra 40 % SPE eluatet fra hemocytterne viste ESI-MS-spekter som indikerte tilstedeværelsen av tidligere detekterte peptider. Disse ESI-MS-spektrene fra fraksjon 38 (He40-f38) og fraksjon 47 (He40-f47) er vist i henholdsvis [Figur 19](#) og [Figur 20](#). I fraksjon He40-f38 ble fire relaterte ioner med m/z-verdiene 1211,95 $[M+10H]^{10+}$, 1346,56 $[M+9H]^{9+}$, 1514,71 $[M+8H]^{8+}$ og 1731,20 $[M+7H]^{7+}$ detektert, mens i fraksjon He40-f47 ble tre relaterte ioner med m/z-verdier 1138,87 $[M+8H]^{8+}$, 1301,86 $[M+7H]^{7+}$ og 1518,89 $[M+6H]^{6+}$ detektert. Molekylvektene til hver av disse komponentene ble beregnet til å være henholdsvis 12 110 Da for komponenten i fraksjon He40-f38 og 9105 Da for komponenten i fraksjon He40-f47, og samsvarer med molekulvektene til de tidligere detekterte peptidene OS-12 og OS-24. De tilhørende UV-Vis-spektrene samsvarer med spekteret vist i [Figur 18](#), og indikerer at komponentene er peptider.



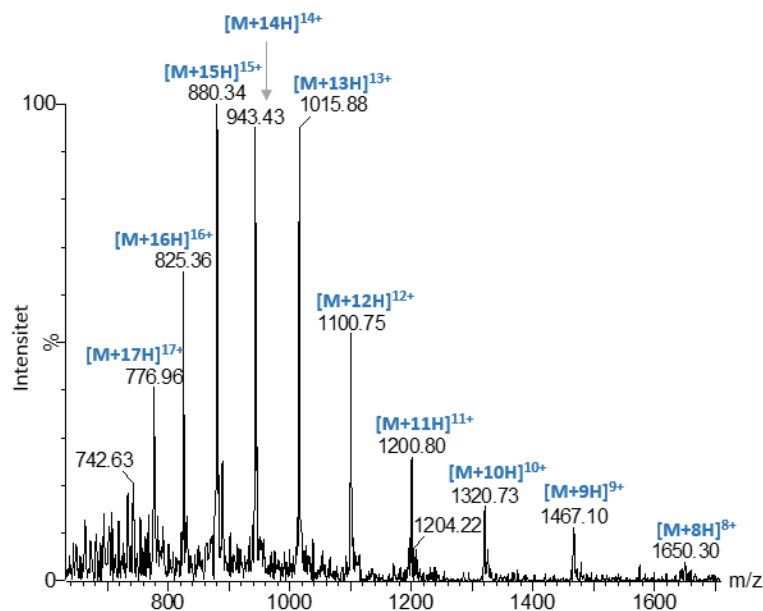
Figur 19 - ESI-MS-spekter fra fraksjon He40-f38. Figuren viser fire relaterte ioner samt deres sammensetning ($[M+nH]^{n+}$). Den gjennomsnittlige molekylvekten til det detekterte peptidet ble kalkulert til å være 12 110 Da. Dette peptidet avviker med ca. 10 Da fra det tidligere detekterte peptidet OS-12.



Figur 20 – ESI-MS-spekter fra fraksjon He40-f47. Figuren viser tre relaterte ioner samt deres sammensetning ($[M+nH]^{n+}$). Den gjennomsnittlige molekylvekten til det detekterte peptidet ble kalkulert til å være 9105 Da, og samsvarer med molekylvekten fra det tidligere detekterte peptidet OS-24.

4.4.2 Andre peptider detektert i aktive HPLC fraksjoner

I tillegg til at HPLC-fraksjonene viste tilstedeværelse av tidligere detekterte peptider, viste også flere fraksjoner tilstedeværelse av nye hittil ukjente peptider. Fraksjon nr. 59 (He40-f59) var den siste av de aktive HPLC-fraksjonene og viste tilstedeværelse av et peptid. Peptidets gjennomsnittlige molekylvekt ble beregnet til å være 13 194 Da ut fra ionene vist i ESI-MS-spekteret i **Figur 21**. Totalt 10 relaterte ioner ble detektert i spekteret, og hadde m/z-verdiene 776.96 $[M+17H]^{17+}$, 825.36 $[M+16H]^{16+}$, 880.34 $[M+15H]^{15+}$, 943.43 $[M+14H]^{14+}$, 1015.88 $[M+13H]^{13+}$, 1100.75 $[M+12H]^{12+}$, 1200.80 $[M+11H]^{11+}$, 1320.73 $[M+10H]^{10+}$, 1467.10 $[M+9H]^{9+}$ og 1650.30 $[M+8H]^{8+}$. ESI-MS-spekter fra flere aktive HPLC-fraksjoner er vist i **Appendiks 6**.



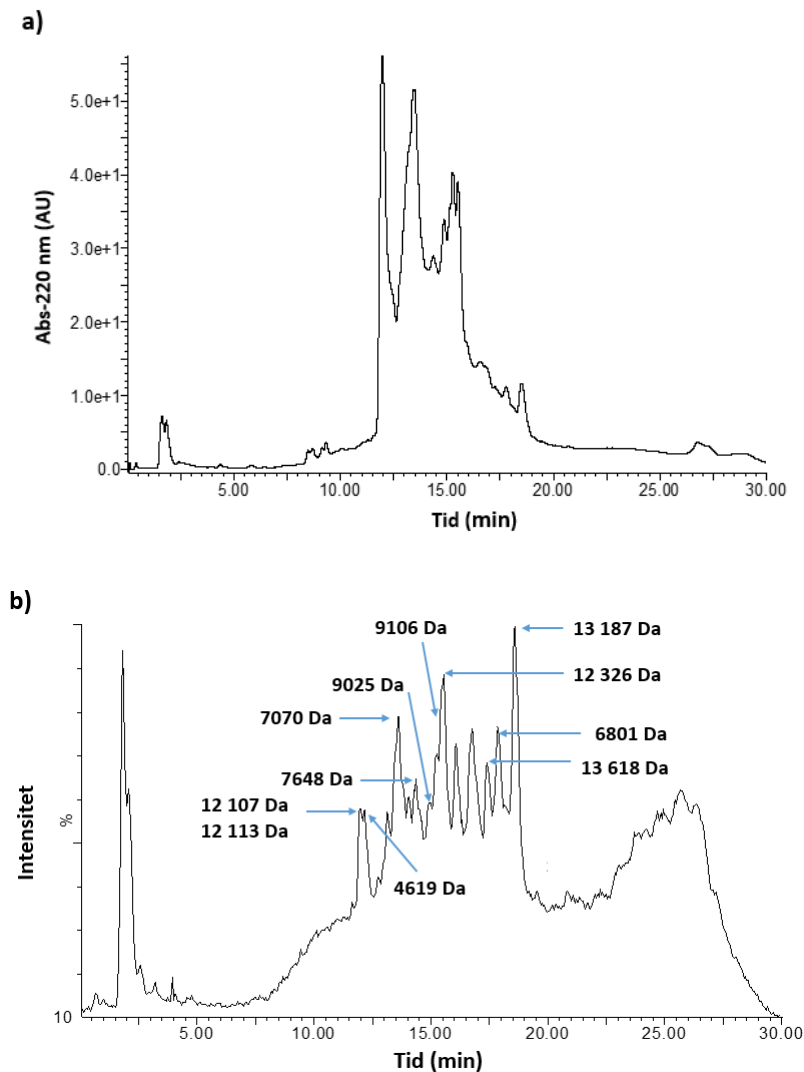
Figur 21 - ESI-MS-spekter for et peptid detektert i He40-f59. Figuren viser 10 relaterte ioner samt deres sammensetning ($[M+nH]^{n+}$). Den gjennomsnittlige molekylvekten til det detekterte peptidet ble kalkulert til å være 13 194 Da.

4.4.3 Peptider detektert i SPE eluater

Peptider i 40 % SPE eluatet fra hemocytene

Total ion strøm (total ion current; TIC) og UV-Vis-kromatogrammene fra HPLC-PDA-ESI-MS kjøringen av 40 % SPE eluatet fra hemocytter er vist i **Figur 22**. UV-Vis-kromatogrammet (**Figur 22a**) viser topper som reflekterer mengden detekterte komponenter som absorberer lys ved 220 nm gjennom kjøringen. Kromatogrammet viser at det hovedsakelig ble detektert komponenter som absorberte lys i området mellom ca. 11 og 19 minutter.

TIC-kromatogrammet (Figur 22b) viser til den samlede intensiteten av detekterte ioner til enhver tid gjennom hele kjøringsperioden. I det samme området hvor UV-Vis-kromatogrammet viste størst andel detekterte komponenter ble elleve peptider detektert. Massene til disse er merket av på den toppen hvor de ble detektert i det tilhørende ESI-MS-spekteret (ikke vist). Molekylvektene til disse peptidene er hovedsakelig spredt i et område mellom 7,0 til 13,6 kDa, men ett peptid på 4,6 kDa ble også detektert.



Figur 22 – UV-Vis- og TIC-kromatogrammene fra HPLC-PDA-ESI-MS kjøringen av 40 % SPE eluater fra hemocytterne. a) UV-Vis-kromatogrammet viser graden av deteksjonen av komponenter som absorberte lys ved 220 nm. b) TIC-kromatogrammet viser til intensiteten av detekterte masser til enhver tid gjennom kjøringen. På figuren er elleve peptider merket av på den toppen hvor de ble detektert i det tilhørende ESI-MS-spekteret (ikke vist).

Detekterte peptider i ESI-MS data fra andre SPE eluater

En rekke forskjellige peptider ble detektert i forskjellige SPE eluater som viste en MIC \leq 31,25 $\mu\text{g/ml}$. En generell oversikt over de mest fremtredende peptidene i de forskjellige eluatene er vist i **Tabell 16**. Alle detekterte peptider hadde en molekylvekt under 9 kDa, med unntak av peptidet detektert i 10 % SPE eluatet fra hemocytterne. Et peptid på 12 119 Da ble detektert, som det eneste peptidet, i dette eluatet. Denne molekylvekten kan også samsvare med det tidligere isolerte peptidet OS-12.

Fra 40 % SPE eluatet fra kappen ble det detektert fem forskjellige peptider, og molekylvekten til alle disse er vist i **Tabell 16**. Det ene av peptidene, på 5759 Da, ble også detektert i 80 % SPE eluatet fra hemolymfe med celler. Et peptid på 4619 Da ble detektert både i 40 % SPE eluatet til den cellefrie hemolymfen samt 80 % SPE eluatet til hemolymfen med celler. Det samme peptidet ble også detektert i 40 % SPE eluatet fra hemocytterne (**Figur 22b**).

Tabell 16 – Peptider detektert i SPE eluater med en antimikrobiell aktivitet \leq 31,25 $\mu\text{g/ml}$. Tabellen gir en oversikt over de mest fremtredende peptidene i de ulike SPE eluatene.

Prøve	Fraksjon (SPE eluat)	Molekylvekt på detekterte peptider (Da)
Hemocytter	10 %	12119
Cellefri hemolymfe	40 %	4430 4619 8191
Hemolymfe med celler	80 %	4619 5759 5762
Kappe ^a	40 %	5217 5759 6512 8088 8564

^a UV-Vis og TIC kromatogram er vist i **Appendiks 7**.

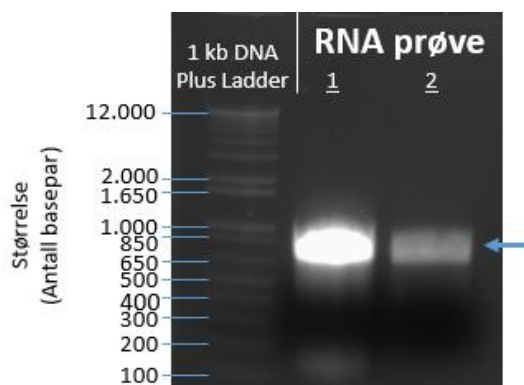
4.5 RNA fra hemocytter i O-skjell

RNA fra hemocytterne ble isolert for å få tilgang på alle mRNA-molekylene uttrykt i hemocytterne på det gitte tidspunktet for prøvetakningen. Dette var nødvendig for å videre kunne syntetisere cDNA. Det ble totalt tatt fire prøver til isoleringen (å 1 ml). Det isolerte RNAet ble analysert ved gel elektroforese på en 1% agarosegel for å bekrefte tilstedeværelsen av rRNA, og spektrofotometrisk ved NanoDrop for å bestemme RNA konsentrasjonene i prøvene samt å måle absorpsjon ved 260 og 280 nm for å bestemme A_{260}/A_{280} forholdet. To av prøvene, 1 og 3, hadde et A_{260}/A_{280} forhold på henholdsvis 2,03 og 2,02 og ble med det betegnet som rene RNA prøver (**Tabell 17**). De samme prøvene var også de som viste høyest RNA konsentrasjon på henholdsvis 892 og 731 ng/ μ l for prøve 1 og 3.

Tabell 17 – RNA-konsentrasjon på RNA isolert fra hemocytter samt graden av renhet i prøvene. Konsentrasjonen av RNA samt A_{260}/A_{280} forholdet til RNA-prøvene ble målt spektrofotometrisk ved NanoDrop.

Prøve	RNA konsentrasjon (ng/ μ l)	A_{260}/A_{280} forhold
1	892	2,03
2	284	1,95
3	731	2,02
4	218	1,93

Agarosegel elektroforese (1%) ble kjørt på prøve 1 og 2, og avbildningen av gelen er vist i **Figur 23**. Begge prøvene ga et bånd som indikerer tilstedeværelsen av rRNA. Prøve 1 viste en tydelig større tilstedeværelse av materiale i form av et kraftigere bånd.



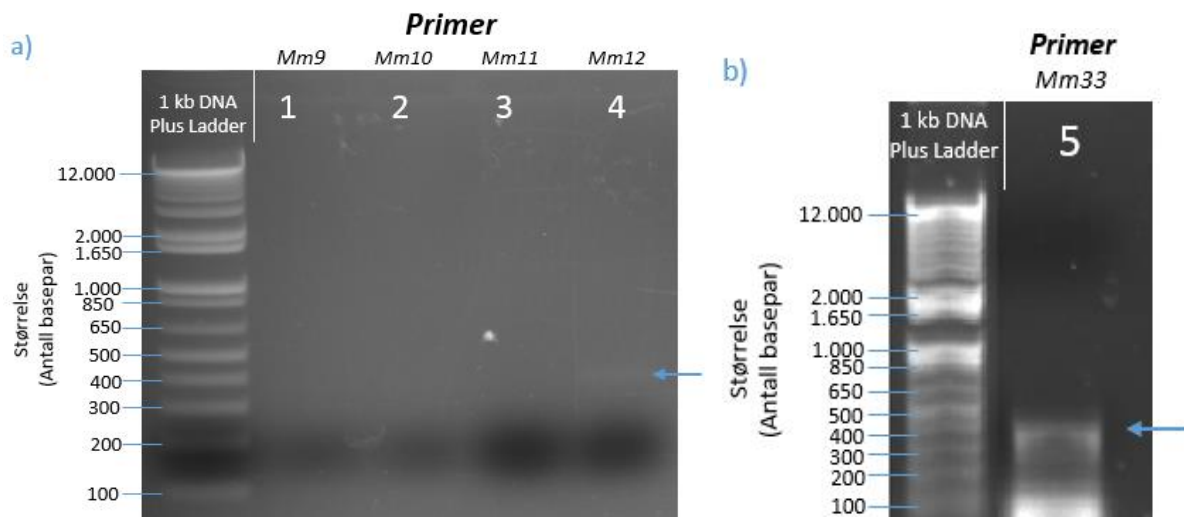
Figur 23 – Agarosegel bilde av RNA isolert fra hemocytter i O-skjell. Isolert RNA ble analysert ved 1% agarosegel elektroforese. En 1 kb DNA plus ladder ble benyttet som standard, og RNA-prøve 1 og 2 ble tilsatt i henholdsvis brønn 1 og 2. Båndene fra prøvene er angitt ved en pil. Siden det ble benyttet en DNA ladder og ikke en RNA ladder er størrelsen på båndene ikke nøyaktig.

4.6 Gensekvenser som koder for antimikrobielle peptider

Identifisering av 3' og 5' cDNA-endene, tilsvarende henholdsvis de C-terminale og N-terminale endene til de tidligere isolerte peptidene OS-12 og OS-24, ble gjort ved PCR amplifisering av cDNA ved bruk av henholdsvis degenererte primere (Tabell 6) og genspesifikke primere (Tabell 7). PCR-produkter, identifisert ved 1 % agarosegel elektroforese, ble videre klonet inn i vektorer, transformert inn i celler, og dyrket opp. Transformasjonskolonier med klonet produkt ble påvist ved å kjøre PCR av koloniene med påfølgende analyse med 1 % agarosegel elektroforese, og fra disse koloniene ble plasmid isolert og sekvensert.

4.6.1 PCR-produkter opparbeidet fra 3' cDNA ved hjelp av degenererte primere

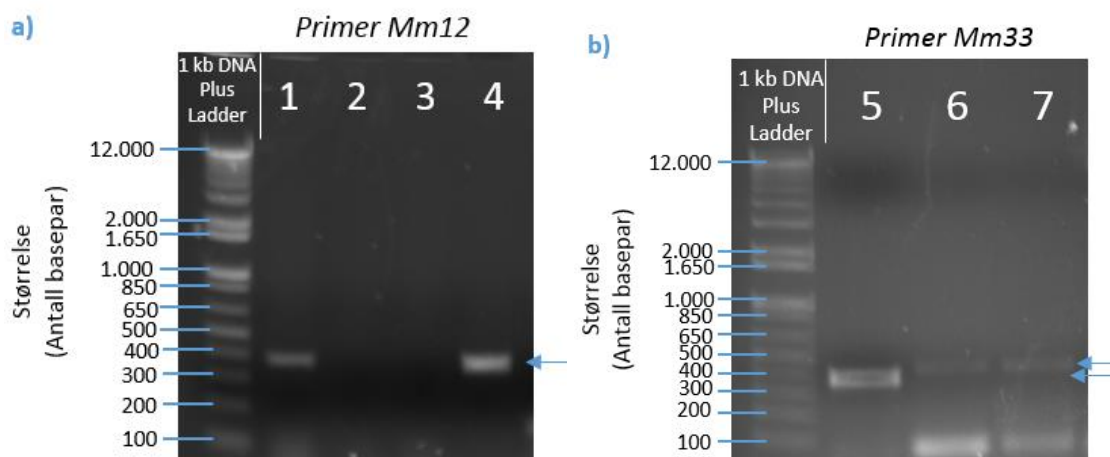
Totalt 5 forskjellige PCR-produkter fra amplifisering av 3' cDNA, ved bruk av degenererte primere, ble identifisert ved 1 % agarose gel elektroforese. Figur 24 viser avbildningen av to geler, og viser at to av primerene *Mm12* og *Mm33* ga et PCR-produkt, betegnet Mm12 og Mm33.



Figur 24 - Agarosegel bilder som påviser tilstedeværelsen av PCR-produkter fra 3' cDNA (tillaget fra isolert RNA fra hemocytene i O-skjell) ved bruk av degenererte primere. 1 % agarosegel elektroforesen ble kjørt med 1 kb DNA Plus Ladder som standard. PCR-prøvene hvor primerene *Mm9*, *Mm10*, *Mm11*, *Mm12* og *Mm33* var benyttet ble tilsatt i henholdsvis brønn 1, 2, 3, 4 og 5. Tilstedeværelsen av bånd i brønn 4 og 5 er merket med pil.

Transformasjonskolonier med klonet PCR-produkt

Transformasjonskolonier med tilstedeværelsen av samtlige av de klonede PCR-produktene ble påvist ved 1 % agarose gel elektroforese. Figur 25a og b viser avbildningen av to geler hvor kolonier med de klonede PCR-produktene Mm12 og Mm33 ble påvist.



Figur 25 – Påvisning av transformasjonskolonier med ligert og klonet PCR-produkt ved 1 % agarosegel elektroforese. En PCR-reaksjon ble kjørt med transformasjonskolonier som templat sammen med primeren tilhørende det klonede PCR-produktet. Gel elektroforesen ble kjørt med 1 kb DNA Plus Ladder som standard. a) PCR-prøvene fra fire forskjellige transformasjonskolonier med antatt ligert Mm12 ble tilsatt brønn 1-4. To bånd med lik størrelse er markert med pil. b) PCR-prøvene fra tre forskjellige transformasjonskolonier med antatt ligert Mm33 ble tilsatt brønn 5-7. Tre bånd med to forskjellige størrelser er markert med pil.

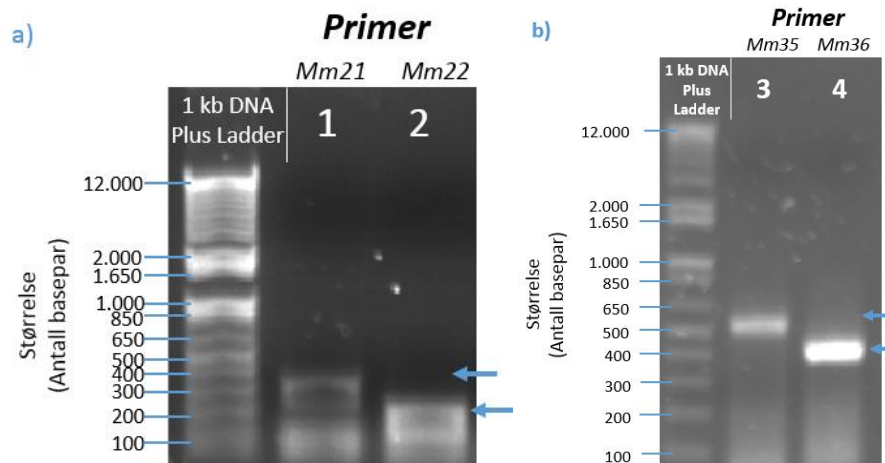
3' cDNA-sekvenser for peptidene OS-12 og OS-24

Sekvenseringen av plasmid med de ligerte PCR-produktene Mm33 og Mm12 førte til identifiseringen av 3' cDNA-endene tilhørende henholdsvis OS-12 og OS-24. De to 3' cDNA-sekvensene er vist i **Figur 26a** og **b**, og var 358 og 346 nukleotider lang for 3' cDNA-sekvensen tilhørende henholdsvis OS-12 og OS-24.

	1	AGG GCG GGG TAC AAC AAT GAG ACG GCT	AAA CTT GGA CCA TAC TGT ACC TGT ACT TAT GAC	60
	61	AGT GTT GGG GGA ACT TGC TGG AAA GGA GCT GCA TGC GAT ACC TGT GAT CCT GCC TAT GTC	120	
a)	121	GGA AAA ATT AAT GGA CTT CCT GTA TGT TGT AAA AAC TGT GAA AAA AGT GGA TTG TAC TTA	180	
	181	TCT GCA AAT TAT TGC TTT TGT TTA CAC AAT GGA CGG TAA ACC AAA AGA ACA TTA TTT TAT	240	
	241	TTA TCT CAA GTT TTG ATA TAC TAT CCA TCT ATG CTT CTC AGA ATA AAA TCT ACA TTT ATA	300	
	301	CAT CTT TAT ACT GCT TAG TAA TAA AAT AAT AAA AAT AAT	AAA AAA AAA AAA AAA AAA A	358
	1	GGG AAG TGC TTC ACA ACC TGG TCT AGA TGT TCT AGC TGG AGT GCG TTT GCA ACA GGA ACT	60	
	61	CTC TGG CTC AAC TGT AGT AGA TGT TGC CAA TGT AAA GGG AGA TCG GGA GGA AGC TGC AGG	120	
b)	121	TTG GTG TAC AAT GCA CAA GGC TGC TGG TTT GCG AAA AAG GCT TAT CAA TGC AAG TGT TTT	180	
	181	GGT GGC TAC GGT AGA CCC AAA CCT AGC TTC TGT GGA AGT AGA CCA AAC AGG TTT TTC TCT	240	
	241	TGC TAG AGC GGA ATG TAT CAA AGA CGA AAG GCT GAC TTA TTA AAT ACA TAT GTT GCA AAT	300	
	301	ATA ATA CAG TAA AGG AGA TAT ATA TGT ATA	AAA AAA AAA AAA AAA A	346

Figur 26 - 3' cDNA-sekvensen til OS-12 (a) og OS-24 (b) fra hemocytter i O-skjell opparbeidet ved bruk av henholdsvis primeren Mm33 og Mm12. Nukleotidene merket i rødt viser til området som samsvarer med primeren benyttet, mens nukleotidene merket i blått viser til sekvensens poly-A hale.

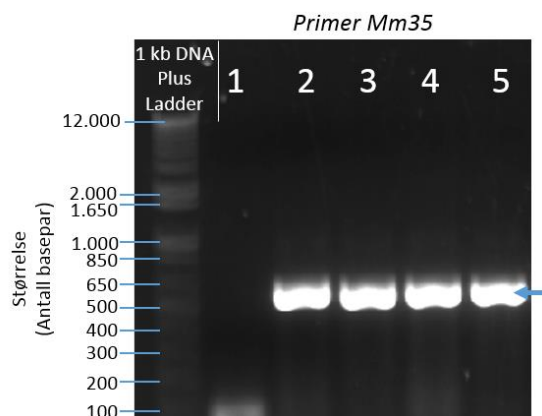
4.6.2 PCR-produkter opparbeidet fra 5' endene til cDNA ved hjelp av genspesifikke primere
 Avbildninger av 1 % agarosegelen viste tilstedeværelsen av PCR-produkter fra hver av PCR-reaksjonene hvor de forskjellige genspesifikke primerene ble benyttet (**Figur 27**). Tilstedeværelsen av disse PCR-produktene betegnet Mm21, Mm22, Mm35 og Mm36, etter hvilken primer de ble opparbeidet fra.



Figur 27 – Agarosegel bilder som påviser tilstedeværelsen av PCR-produkter fra 5' cDNA (tillaget fra isolert RNA fra hemocytene i O-skjell) ved bruk av genspesifikke primere. Gel elektroforesen ble kjørt med 1 kb DNA Plus Ladder som standard. PCR-prøvene hvor primerene *Mm21*, *Mm22*, *Mm35* og *Mm36* var benyttet ble tilsatt i henholdsvis brønn 1, 2, 3 og 4. Tilstedeværelsen av bånd i brønn 1-4 er merket med pil.

Transformasjonskolonier med klonet PCR-produkt

Gel elektroforese av transformasjonskoloniene viste tilstedeværelsen av samtlige klonede PCR-produkter (Mm21, Mm22, Mm35 og Mm36) i forskjellige kolonier. **Figur 28** viser avbildningen av en av gelene hvor fire kolonier med det klonede PCR-produktet Mm35 ble påvist.



Figur 28 – Påvisning av transformasjonskolonier med ligert PCR-produkt ved 1 % agarosegel elektroforese. En PCR-reaksjon ble kjørt med transformasjonskolonier som templat sammen med primeren tilhørende det klonede PCR-produktet (*Mm35*). Gel elektroforesen ble kjørt med 1 kb DNA Plus Ladder som standard. PCR-prøvene fra fem forskjellige transformasjonskolonier med antatt ligert Mm35 ble tilsatt brønn 1-5. Fire bånd med lik størrelse er merket med pil.

5' cDNA-sekvenser for peptidene OS-12 og OS-24

Sekvensering av plasmid med de klonede PCR-produktene Mm35 og Mm21, førte til identifisering av 5' cDNA-ene tilhørende henholdsvis OS-12 og OS-24. Disse sekvensene på henholdsvis 543 og 335 nukleotider, er vist i **Figur 29a** og **b**.

a)	1	AAG CAG TGG TAT CAA CSC AGA GTA CGC GGG GGT TTT GAA TTA TTG TGC AGT AAG ATA TCA	60
	61	GAC GTT TTT GTT GTT TGC AAC CAC AGC AGA TTG TCA ACA AGG AGT TGA AAG GAA TTA TAA	120
	121	GGA AAA TGA AAC CAT TCA TCT TCA TTT TAA GTA TTT CAG TCG CCC TGC TGT ACG TGG TTG	180
	181	ATT GTG GCA CAA ACT GTG GTG TTG GTT ATA GTG TGT GTA ACA AAT GTG GCA CCA ACA GTA	240
	241	AAG TTC TTG AGG TGG TGA TAA AGG GTG TGA GGT ACA CTA CAA AAG TTT GTT GTA AGA ACT	300
	301	GTA ACA AAC ACT TCA GGG CTG GCT ATA ACA ACG AAA CGG CTA AAC TTG GAC CAT ACT GTA	360
	361	CCT GTA CTT ATG ACA GTG TTG GGG GAA CTT GCT GGA AAG GAG CTG CAT GCG ATA CCT GTG	420
	421	ATC CTG CCT ATG TCG GAA AAA TTA ATG GAC TTC CTG TAT GTT GTA AAA ACT GTG AAA AAA	480
	481	GTG GAT TGT ACT TAT CTG CAA ATT ATT GCT TTT GTT TAC ACA ATG GAC GGT AAA CCA AAA	540
	541	GA	543
b)	1	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG GAC AAC TTG GAA TGC ACT TTA TAT TGG TCT	60
	61	TAA AAA AAG CAA AAT GAA AAC ATT CCT AGC TGT AGC TTT GGT GTT GGC ATT ATG TGG AAT	120
	121	TCA AAT AGT TCC TAC ATC CGC TGG GAA ATG TTT CAC AAC CTG GTC TAG ATG TTC TAG CTG	180
	181	GAG TGC GTT TGC AAC AGG AAC TCT CTG GCT CAA CTG TAG TAG ATG TTG CCA ATG TAA AGG	240
	241	GAG ATC GGG AGG AAG CTG CAG GTT GGT GTA CAA TGC ACA AGG CTG CTG GTT TGC GAA AAA	300
	301	GGC TTA TCA ATG CAA GTG TTT TGG TGG CTA CGG TA	335

Figur 29 - 5' cDNA-sekvensen til OS-12 (a) og OS-24 (b) fra hemocytter i O-skjell opparbeidet ved bruk av henholdsvis primeren Mm35 og Mm21. Området med nukleotidene markert i rødt viser området som samsvarer med primeren benyttet.

4.7 cDNA- og peptidsekvenser fra hemocytter i O-skjell

En helhetlig cDNA-sekvens for hver av de to peptidene ble til ved å slå sammen de to opparbeidede 3' og 5' cDNA-ene som tilhørte de samme peptidene (henholdsvis **Figur 26a** og **Figur 29a**, og **Figur 26b** og **Figur 29b**). For å skille cDNA- og peptidsekvensene opparbeidet i denne oppgaven fra de tidligere isolerte peptidene OS-12 og OS-24, blir cDNA- og peptidsekvensene opparbeidet i denne oppgaven videre betegnet som henholdsvis OS-12_2 og OS-24_2. En karakterisering av sekvensene til hver av disse følger i avsnittene under.

4.7.1 cDNA- og peptidsekvensen til OS-12_2

Den helhetlige cDNA-sekvensen til OS-12_2 (**Figur 30**) ble identifisert til å være 653 nukleotider lang når poly-A halen var ekskludert og inneholdt to ikke-translatert regioner (untranslated region; UTR) på 125 og 123 nukleotider for henholdsvis 5' UTR og 3' UTR. I området mellom disse ble en kodende sekvens på 405 nukleotider identifisert. En translasjon av dette området ga en dedusert peptidsekvens bestående av 135 aminosyrer. Denne sekvensen ble i likhet med cDNA-sekvensen betegnet OS-12_2, og ble videre analysert ved hjelp av SignalP 4.1 serveren for å detektere signalpeptider i sekvensen. Verktøyet viste tilstedeværelsen av en spaltningsposisjon i peptidsekvensen mellom aminosyre nr. 20

(cystein; C) og 21 (glycin; G), og viser til et 20 aminosyrer langt signalpeptid. Spaltningen av signalpeptidet gir opphav til en moden peptidsekvens bestående av 115 aminosyrer.

1		AA	2
3	GCAGTGGTATCAACSCAGAGTACGCGGGGTTTTGAATTATTGTG		47
48	CAGTAAGATATCAGACGTTTTTGTGTTTGCACCCACAGCAGATT		92
93	GTCAACAAGGAGTTGAAAGGAATTATAAGGAAAATGAAACCATTTC		137
1		<i>M K P F</i>	4
138	<i>ATCTTCATTTTAAGTATTTTCAGTCGCCCTGCTGTACGTGGTTGAT</i>		182
5	<i>I F I L S I S V A L L Y V V D</i>		19
183	<i>TGTGGCACAACTGTGGTGTGGTTATAGTGTGTGTAACAAATGT</i>		227
20	<i>C G T N C G V G Y S V C N K C</i>		34
228	GGCACCAACAGTAAAGTTCTTGAGGTGGTGATAAAGGGTGTGAGG		272
35	<u>G T N S K V L E V V I K G V R</u>		49
273	TACACTACAAAAGTTTTGTTGTAAGAACTGTAACAAACACTTCAGG		317
50	<u>Y T T K V C C K N C N K H F R</u>		64
318	GCGGGGTACAACAATGAGACGGCTAAACTTGGACCATACTGTACC		362
65	<u>A G Y N N E T A K L G P Y C T</u>		79
363	TGTACTTATGACAGTGTGGGGAACTTGCTGAAAAGGAGCTGCA		407
80	<u>C T Y D S V G G T C W K G A A</u>		94
408	TGCGATACCTGTGATCCTGCCTATGTGCGAAAAATTAATGGACTT		452
95	<u>C D T C D P A Y V G K I N G L</u>		109
453	CCTGTATGTTGTA AAAAAGTGTGAAAAAGTGGATTGTACTTATCT		497
110	<u>P V C C K N C E K S G L Y L S</u>		124
498	GCAAATTATTGCTTTTGTGTTTACACAATGGACGGTAAACCAAAGA		542
125	<u>A N Y C F C L H N G R</u> *		135
543	ACATTATTTTATTTATCTCAAGTTTTGATATACTATCCATCTATG		587
588	CTTCTCAGAATAAAATCTACATTTATACATCTTTATACTGCTTAG		632
633	TAATAAAATAATAAAAATAAT		653

Figur 30 – cDNA-sekvens og dedusert peptidsekvens tilhørende OS-12_2. Signalpeptidet er merket i kursiv og den modne peptidsekvensen til peptidet er markert med understrekning. Stoppkodonet er markert med *.

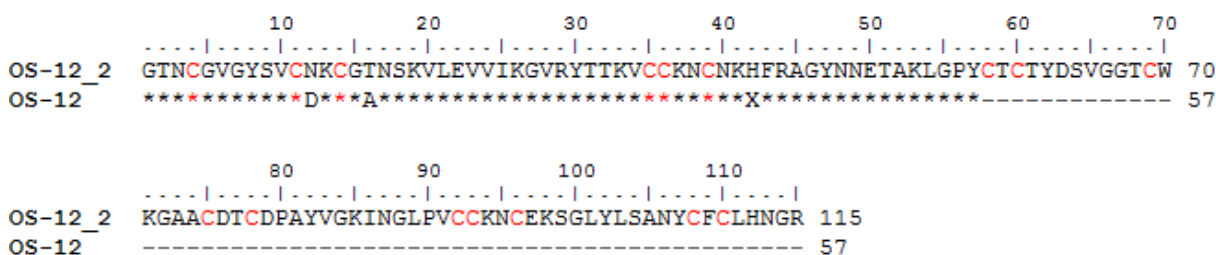
Den modne peptidsekvensen til peptidet ble videre analysert i ProtParam verktøyet til ExPASy for å kartlegge fysiske og kjemiske egenskaper til peptidsekvensen. Noen av de kalkulererte parameterne er vist i **Tabell 18**. Den teoretiske molekylvekten til peptidet ble beregnet til å være 12 337 Da med forbehold om at alle de 16 cysteinene i peptidsekvensen er bundet i disulfidbindinger. Peptidets isoelektriske punkt ble beregnet til å være 8,78, noe som gir peptidet en netto positiv ladning på 8 ved nøytral pH. Av de 115 aminosyrene i sekvensen er 43 hydrofobe aminosyrer, noe som utgjør 37,3 %. Alle disse karakteristikkene tyder på at peptidet er et antimikrobielt peptid. En nærmere oversikt over aminosyresammensetningen til peptidet er vist i **Appendiks 8**.

Tabell 18 – Oversikt over beregnede fysiske og kjemiske egenskaper for den modne peptidsekvensen til OS-12_2. Parameteren ble beregnet av ProtParam verktøyet til ExPASy, med unntak av antall hydrofobe aminosyrer (se [Appendiks 8](#)).

Parameter	Verdi
Molekylvekt	12 337 Da
Isoelektrisk punkt	8,78
Negativt ladde aminosyrer	6 (5,2 %)
Positivt ladde aminosyrer	14 (12,1 %)
Antall cysteiner	16 (13,9 %)
Antall hydrofobe aminosyrer	43 (37,3 %)

Sekvenssammenstilling av sekvenser fra Edman degradering og cDNA

For å se hvorvidt den modne peptidsekvensen til OS-12_2 stemte overens med den partielle N-terminale sekvensen til det tidligere isolerte peptidet OS-12 (avsnitt [1.4.1](#)), ble det gjort en ClustalW multiplum sekvenssammenstilling i BioEdit mellom disse to sekvensene. Denne sekvenssammenstillingen er vist i [Figur 31](#). Sekvensene skiller seg fra hverandre i tre posisjoner, hvorav den ene (posisjon 42) er en ukjent aminosyre (X) i den partielle sekvensen. I de to andre posisjonene (posisjon 12 og 16) inneholder den partielle sekvensen asparaginsyre (D) og alanin (A), mens den modne peptidsekvensen til OS-12_2 i de samme posisjonene inneholder henholdsvis asparagin (N) og treonin (T). Tar vi dette i betraktning, og det faktum at molekylvektene har en differanse på omtrent 217 Da, indikerer dette at cDNA-sekvensen identifisert i denne oppgaven ikke kan være den korrekte cDNA-sekvensen tilhørende det tidligere isolerte peptidet OS-12.



Figur 31 - Sekvenssammenstillingen av den modne peptidsekvensen til OS-12_2 og den N-terminale peptidsekvensen til det tidligere isolerte OS-12 peptidet. Områder merket med stjerne (*) indikerer posisjoner hvor aminosyrene er lik, mens bindestrek (-) indikerer en «gap» i sekvensen der hvor aminosyredata mangler i den N-terminale sekvensen.

Slektskap- og likhetssøk

Den deduserte peptidsekvensen til OS-12_2, ble benyttet til søk i en rekke forskjellige databaser for å få et nærmere innblikk i sekvensens slektskap og likhet i forhold til allerede kjente peptider. Søk gjort i EMBL-EBIs Pfam database og NCBI's CDD ga ingen resultater, noe som indikerer at peptidsekvensen til OS-12_2 ikke inneholder noen konserverte domener som samsvarer med noen hittil kjente proteinfamilier.

Den deduserte peptidsekvensen ble videre benyttet i et PSI-Blast søk, og fire av peptidene som framkom ved dette søket er listet opp i **Tabell 19**. For alle de fire peptidene lå E-verdiene og sekvenslikhetene mot OS-12_2 i et område på henholdsvis 4e-07 til 3e-06 og 37 til 27 %. Alle peptidene i tabellen har sitt opphav fra forskjellige snegler og går dermed under rekken bløtdyr i likhet med O-skjell (*M. modiolus*).

Tabell 19 - Peptider fremkommet ved et PSI-Blast søk mot den deduserte peptidsekvensen til OS-12_2. Tabellen angir fire av peptidene framkommet i søket, og viser til opprinnelses art, E-verdi, likhet og sekvenslengde på disse peptidene. NCBI referansen er lagt ved som link til NCBI's gen bank.

Proteinnavn	NCBI referanse sekvens	Opprinnelses art	E-verdi	Likhet med OS-12_2 (%)	Sekvens lengde ^a
Hypothetical protein LOTGIDRAFT 234488	XP_009060805.1	Lottia gigantea	4e-07	37 %	190
Unknown protein 15	ABY87405.1	Haliotis diversicolor	5e-07	27 %	186
Latent transforming growth factor beta binding protein	ABW90689.1	Haliotis diversicolor supertexta	5e-07	27 %	186
Predicted protein 1	ABY87373.1	Haliotis diversicolor	3e-06	28 %	186

^a Antall aminosyrer

En ClustalW multiplum sekvenssammenstillingen ble gjort i BioEdit mellom peptidsekvensen til OS-12_2 og to av sekvensene angitt i **Tabell 19**. De to siste, ABW90689.1 og ABY87373.1, ble valgt bort ettersom de var tilnærmet identisk med ABY87405.1. Sekvenssammenstillingen er vist i **Figur 32**. Sekvensene viste en viss likhet som hovedsakelig var å se fra posisjon 153 og utover. Dette området inneholdt ett tilnærmet lik cysteinmønster. Den resterende delen av sekvenssammenstillingen var mindre lik.

```

          10          20          30          40          50          60          70
OS-12_2      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|
XP_009060805.1 --MKPFIFILSISVALLYVVDCGTNCGVGYSVCNKCGTNSKVLEVVIKGVRYT-TKVCCKN-----CNKH 62
ABY87405.1    MSLPT*VAVAVVTAC***TSFPVSAQ*TCG*NSA*DSCTGDDVKNLILASGSSVR**P*----CRSRY 66

          80          90          100         110         120         130         140
OS-12_2      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|
XP_009060805.1 FRAGYNNETAKLGPYCTCTYDSVG----- 86
ABY87405.1    L**ASA*A*K--*AF***DFIR*VGTCLKGEQCNPLLHPAQAHLNGMPICQSASDKLAVNKIVHGGKVS 130
ABY87405.1    *NF*FLSSGQ---*F*N*NF*R*TGSARKGEECSVAGMTTYFRLNQMPTCRPDPLVAEHVRSNSDGSYIF 133

          150         160         170         180         190         200
OS-12_2      |-----|-----|-----|-----|-----|
XP_009060805.1 -----GTCWKGAACDCPAYVGKINGLPVCCKNCEKSGLYLSANYCFCLHNGR 135
ABY87405.1    FACQCAPRAPWT*D**Q*SQ*NS***G***SA***KL**A**Q*K**IIN*GSRE*NC*N- 190
ABY87405.1    NCEQ-----R*D**R*SQ*S**NQS***N***VN***S**DAY**R*GPG-KN*NC*RP 186

```

Figur 32 – Sekvenssammenstillingen av OS-12_2s peptidsekvens og to utvalgte peptidsekvenser framkommet ved et PSI-Blast søk. Sekvenssammenstillingen er en ClustalW multiplum sekvenssammenstilling gjort i BioEdit. Posisjoner som var lik er merket *, og områder med «gap» i sekvensen er merket med -.

4.7.2 cDNA- og peptidsekvensen til OS-24_2

cDNA-sekvensen til OS-24_2 er vist i sin helhet i [Figur 33](#). Sekvensens totale lengde ble identifisert til å være 471 nukleotider lang og inneholdt to UTR samt en kodende sekvens på henholdsvis 73 (5' UTR), 86 (3' UTR) og 312 nukleotider. Den deduserte peptidsekvensen, også denne betegnet OS-24_2, ble identifisert ved en translasjon av den kodende sekvensen. Den helhetlige lengden til denne ble identifisert til å være 104 aminosyrer lang. En analyse gjort ved hjelp av SignalP 4.1 serveren viste tilstedeværelsen av en spaltningssposisjon i peptidsekvensen mellom aminosyre nr. 23 (alanin; A) og 24 (glycin; G). En spaltningen i denne posisjonen gir opphav til et signalpeptid og en moden peptidsekvens på henholdsvis 23 og 81 aminosyrer.

OS-24_2s modne peptidsekvens ble videre analysert med ProtParam verktøy til ExPASy, og en oversikt over utvalgte fysiske og kjemiske egenskaper for OS-24_2 er vist i [Tabell 20](#). Peptidets molekylvekt ble beregnet til å være 9028 Da gitt at alle de 12 cysteinene inngår i disulfidbindinger. Av de 81 aminosyrene i peptidet er 13 positivt ladd og 32 hydrofobe aminosyrer. Disse karakteristikkene samsvarer med hva som er forventet av et antimikrobielt peptid. En oversikt over aminosyresammensettingen til peptidet er gitt i [Appendiks 8](#).


```

1   AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACAACCTTGGGAATGCA 46
47  CTTTATATTGGTCTTAAAAAAGCAAAATGAAAACATTCCTAGCT 91
1   M K T F L A 6
92  GTAGCTTTGGTGTGGCATTATGTGGAATTCAAATAGTTCCTACA 136
7   V A L V L A L C G I Q I V P T 21
137 TCCGCTGGGAAGTGCTTCACAACCTGGTCTAGATGTTCTAGCTGG 181
22  S A G K C F T T W S R C S S W 36
182 AGTGCGTTTGCAACAGGAACTCTCTGGCTCAACTGTAGTAGATGT 226
37  S A F A T G T L W L N C S R C 51
227 TGCCAATGTAAAGGGAGATCGGGAGGAAGCTGCAGGTTGGTGTAC 271
52  C Q C K G R S G G S C R L V Y 66
272 AATGCACAAGGCTGCTGGTTTGCGAAAAAGGCTTATCAATGCAAG 316
67  N A Q G C W F A K K A Y Q C K 81
317 TGTTTTGGTGGCTACGGTAGACCCAAACCTAGCTTCTGTGGAAGT 361
82  C F G G Y G R P K P S F C G S 96
362 AGACCAAACAGGTTTTTCTCTTGCTAGAGCGGAATGTATCAAAGA 406
97  R P N R F F S C * 104
407 CGAAAGGCTGACTTATTAATAACATATGTTGCAAATATAATACAG 451
452 TAAAGGAGATATATATGTAT 471

```

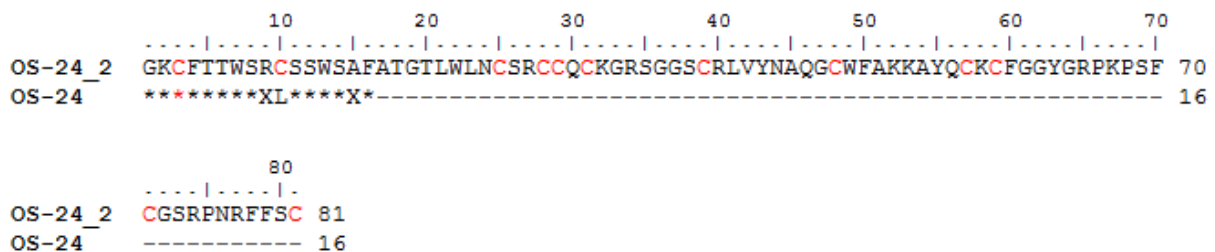
Figur 33 – cDNA- sekvens og dedusert peptidsekvensen tilhørende OS-24_2. Signalpeptidet er merket i kursiv og den modne peptidsekvensen til peptidet er markert med understrekning. Stoppkodonet er markert med *.

Tabell 20 - Oversikt over beregnede fysiske og kjemiske egenskaper for den modne peptidsekvensen til OS-24_2. Parameteren ble beregnet av ProtParam verktøyet til ExPASy, med unntak av antall hydrofobe aminosyrer (se **Appendiks 8**).

Parameter	Verdi
Molekylvekt	9028 Da
Isoelektrisk punkt	9,58
Antall negativ ladd aminosyrer	0
Antall positivt ladd aminosyrer	13 (16,0 %)
Antall cysteiner	12 (14,8 %)
Antall hydrofobe aminosyrer	32 (39,4 %)

Sekvenssammenstilling av sekvenser fra Edman degradering og cDNA

En sekvenssammenstilling ble gjort mellom den deduserte peptidsekvensen til OS-24_2 og den partielle N-terminale sekvensen til det tidligere isolerte OS-24 peptidet (avsnitt 1.4.1). Denne sekvenssammenstillingen er vist i **Figur 34**, og viser at den partielle sekvensen inneholder to ukjente aminosyrer som samsvarer med arginin (R) i posisjon 9 og alanin (A) i posisjon 15. I tillegg til dette er det én forskjell mellom sekvensene i posisjon 10, hvor den partielle aminosyresekvensen til OS-24 inneholder en leucin (L) mens den modne sekvensen til OS-24_2 inneholder en cystein (C). Denne forskjellen samt forskjellene i molekylvektene mellom disse to peptidene (9028 Da for OS-24_2 og 9,10 kDa for OS-24), indikerer at cDNA-sekvensen identifisert i denne oppgaven ikke er den korrekte cDNA-sekvensen tilhørende det tidligere isolerte peptidet OS-24.



Figur 34 - Sekvenssammenstillingen av den modne peptidsekvensen til OS-24_2 og den N-terminale peptidsekvensen til det tidligere isolerte OS-24 peptidet. Områder merket med stjerne (*) indikerer posisjoner hvor aminosyrene er like, mens bindestrek (-) indikerer en «gap» i sekvensen der hvor aminosyredata mangler i den N-terminale sekvensen til OS-24.

Slektskap- og likhetssøk

Søk gjort i EMBL-EBIs Pfam database og NCBI's CDD viste at peptidet med stor sannsynlighet tilhører macinfamilien med en E-verdi på henholdsvis $1.3e-12$ og $1.37e-9$. Dette er en familie som inneholder flere AMP, noe som styrker hypotesen om at OS-24_2 er et antimikrobielt peptid.

Et PSI-Blast søk gjort på den deduserte peptidsekvensen ga blant annet de fem peptidene listet opp i **Tabell 21**. For alle de disse peptidene lå E-verdiene og sekvenslikhetene mot OS-24_2 i et område på henholdsvis $4e-18$ til $3e-07$ og 39 til 48 %. Alle peptidene i tabellen har sitt opphav fra muslinger, hvorav to har sitt opphav fra arten *Mytilus galloprovincialis*, som i likhet med O-skjell (*M. modiolus*) tilhører familien Mytilidae. Fire av peptidene tilhører også macinfamilien.

Tabell 21 - Peptider fremkommet ved et PSI-Blast søk mot den deduserte peptidsekvensen til OS-24_2. Tabellen gir en oversikt over fem peptider oppnådd i søket, og viser til opprinnelses art, E-verdi, likhet og sekvenslengde på disse peptidene. I tillegg er NCBI referansen lagt ved som link til NCBI's gen bank.

Proteinnavn	NCBI referanse sekvens	Opprinnelses art	E-verdi	Sekvenslikhet med OS-24_2 (%)	Sekvens lengde ^a
Mytimacin-5	AHG59340.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	4e-18	47 %	105
Theromacin	ADK94899.1	<i>Hyriopsis cumingii</i>	1e-13	41 %	97
Mytimacin-2	CCC15016.1	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	2e-08	39 %	92
Antibacterial peptide	AFI24614.1	<i>Cyclina sinensis</i>	1e-07	48%	86
Hydramacin	AGM14601.1	<i>Ruditapes philippinarum</i>	3e-07	48 %	97

^a Antall aminosyrer

En ClustalW multiplum sekvenssammenstilling ble gjort i BioEdit mellom den deduserte peptidsekvensen til OS-24_2 og de fem utvalgte peptidsekvensene angitt i **Tabell 21**. Denne sekvenssammenstilling er vist i **Figur 35**. Sekvenssammenstillingen viste stor sekvenslikhet mellom OS-24_2 og de fem peptidene, deriblant et identisk område over fem aminosyrer hvor alle peptidene inneholdt sekvensen T-W-S-R-C. I tillegg til dette var flere av cysteinene lik i en rekke posisjoner. Den største likheten med hensyn på cysteiner var å se mellom OS-24_2 og mytimacin-5, hvor begge inneholdt 13 cysteiner og hadde et likt cysteinmønster for de 12 C-terminale cysteinene. Denne likheten gjelder kun ved introduksjonen av tre «gaps» i posisjonene 81, 82 og 100.



Figur 35 – Sekvenssammenstillingen av OS-24_2s peptidsekvens og fem utvalgte peptidsekvenser framkommet ved et PSI-Blast søk. Sekvenssammenstillingen er en ClustalW multiplum sekvenssammenstilling gjort i BioEdit. Posisjoner som var lik er merket *, og områder med «gap» i sekvensen er merket med -.

4.8 Strukturpredikasjon av antimikrobielle peptider fra O-skjell

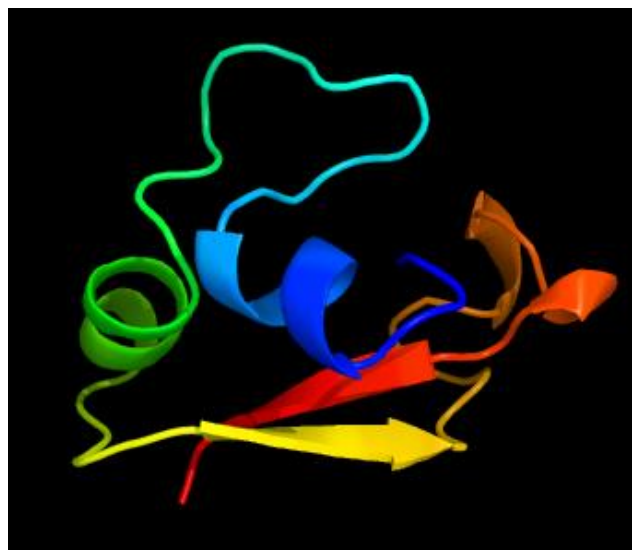
4.8.1 Strukturpredikasjon for OS-24_2

Den potensielle strukturen til peptidet OS-24_2 ble nærmere analysert ved hjelp av DiANNA 1.1 web server og Phyre² verktøyet for å anslå henholdsvis disulfidbindinger og 3D strukturen til peptidet. DiANNA verktøyet anslo en binding mellom alle de 12 cysteinene i den modne sekvensen hvor cysteinene nummerert C1-C5, C2-C8, C3-C9, C4-C10, C6-C7 og C11-C12 antas å være bundet sammen i disulfidbindinger. Dette er visualisert i **Figur 36**.



Figur 36 – Foreslåtte disulfidbindinger mellom cysteinene (C) i den modne peptidsekvensen til OS-24_2. DiANNA 1.1 web server ble benyttet for å anslå bindingen mellom cysteinene i peptider.

En uavhengig predikasjon av den tredimensjonale strukturen til OS-24_2 (som ikke bygger på predikasjonen av disulfidbindingene gjort av DiANNA) ble gjort ved hjelp av Phyre² verktøyet. Strukturen gitt av verktøyet ble basert på den kjente strukturen til det antimikrobielle peptidet hydramacin-1 (Fold library id: c2k35A) som har en likhet på 69 % med OS-24_2. Verktøyet ga en konfidensverdi på 100 %. Den anslåtte 3D strukturen er vist i **Figur 37**. Den sekundære strukturen ble anslått til å bestå av 35 % regioner med utstrakt struktur, 32 % α -helikser og 12 % β -flak.



Figur 37 - 3D struktur for OS-24_2 peptidet foreslått av predikasjonsprogrammet Phyre². Strukturen vist på figuren er merket i regnbuens farger fra den N-terminal til den C-terminale enden.

4.8.2 Strukturpredikasjon for OS-12_2

Den potensielle strukturen til OS-12_2 ble anslått ved hjelp av de samme verktøyene som benyttet for strukturpredikasjon av OS-24_2. DiANNA verktøyet anslo en binding mellom alle 16 cysteinene i OS-12_2, hvor cysteinene nummerert C1-C4, C2-C15, C3-C5, C6-C12, C7-C9, C8-C13 C10-C16 og C11-C14 er bundet sammen i disulfidbindinger. Disse bindingen er visualisert i **Figur 38**.



Figur 38 – Foreslåtte disulfidbindinger mellom cysteinene (C) i den modne peptidsekvensen til OS-12_2. DiANNA 1.1 web server ble benyttet for å anslå bindingen mellom cysteinene i peptidet.

Den tredimensjonale strukturen til det modne peptidet OS-12_2 ble anslått ved hjelp av Phyre² verktøyet. En struktur ble predikert basert på et signal protein (Fold library id: c3ho5B) med en dekning på 38 %, og en konfidensverdi på 49 %. På grunn av de lave verdiene ble det ikke sett som sannsynlig at strukturen er korrekt, og resultatet er dermed ikke vist.

5. Diskusjon

Behovet for nye antimikrobielle komponenter øker i takt med at antibiotikaresistens stadig er et voksende problem (WHO, 2001, 2014, Lewis, 2013). AMP er naturlig tilstede i det medfødte immunsystemet til en rekke forskjellige organismer, deriblant marine invertebrater (Reddy *et al.*, 2004, Sperstad *et al.*, 2011). Slike peptider har vist en lovende effekt på forskjellige mikroorganismer, inkludert antibiotikaresistente bakterier (Hancock og Patrzykat, 2002). Dette, og det faktum at AMP også virker på elementære målstrukturer i bakteriecellene, gjør de til interessante kandidater til utvikling av nye typer antibiotika (Zasloff, 2002, da Costa *et al.*, 2015).

I denne oppgaven er ekstrakter av forskjellige vev fra O-skjell testet for antimikrobiell aktivitet. Interessante vev ble videre analysert med HPLC-ESI-MS for å påvise tilstedeværelsen av tidligere isolerte AMP fra O-skjell samt hittil ukjente peptider. I tillegg er to cDNA-sekvenser som angivelig koder for AMP blitt identifisert ved isolering av RNA fra hemocytter i O-skjell. Disse samsvarer ikke med de tidligere isolerte peptidene fra O-skjell, men hadde en rekke karakteristika som likevel antyder at peptidene er antimikrobielle.

5.1 Ekstraksjon og utbytte av materiale fra hemocytter

Innsamlingen av materialet benyttet til ekstraksjonen ble gjort fra 34 voksne O-skjell, hvor hemolymfen og forskjellige vev ble separert. Ekstraksjonen fra hemocyttene ga et utbytte på 16 mg (3,64 %) i 40 % SPE eluatet. Ekstraksjonene ble gjort etter den samme fremgangsmåten som i et tidligere studium utført på O-skjell av Haug og medarbeidere (2004) ettersom dette studiet i etterkant har ført til isoleringen av tre AMP fra hemocytter fra O-skjell (upubliserte data; 1.4.1). Det høye utbyttet i 40 % SPE eluatet fra hemocyttene anses som lovende for påvisning av både tidligere isolerte og hittil ukjente AMP, ettersom de kjemiske egenskapene til AMP gjør at de hovedsakelig elueres ut i dette eluatet (Sperstad *et al.*, 2011).

5.2 Antimikrobiell aktivitet

Antimikrobiell aktivitet ble i denne oppgaven påvist i ekstrakter fra alle vevene testet fra O-skjell, noe som samsvarer med tidligere funn gjort av Haug og medarbeidere (2004). Av de to bakteriestammene som ble testet i denne oppgave, *C. glutamicum* og *E. coli*, var *C.*

glutamicum den mest sensitive, og samtlige vev testet viste antimikrobiell aktivitet mot denne bakteriestammen. Mot *E. coli* var aktiviteten generelt lavere for samtlige av vevene.

Det mest aktive materialet var fra hemocytterne, hvorav samtlige SPE eluater viste aktivitet mot både *C. glutamicum* (MIC \leq 62,5 $\mu\text{g/ml}$) og *E. coli* (MIC \leq 500 $\mu\text{g/ml}$). En lignende høy aktivitet i hemocytterne ble også sett i Haug og medarbeidere (2004) sitt studium. I tillegg til dette viste totalt 21 av 42 testede HPLC-fraksjoner fra 40 % SPE eluatet fra hemocytterne antimikrobiell aktivitet mot *C. glutamicum*. Dette vitner om at hemocytterne kan være rik på en rekke forskjellige antimikrobielle komponenter som elueres ut i forskjellige fraksjoner. Den detekterte antimikrobielle aktiviteten i hemocytterne antas å kunne skyldes komponenter tilhørende organismens immunsystem, som for eksempel AMP (Song *et al.*, 2010, Gerdol og Venier, 2015). AMP har vært påvist uttrykt i hemocytter fra en rekke forskjellige muslingarter (Mitta *et al.*, 1999b, Zhao *et al.*, 2010, Liao *et al.*, 2013), og har vært isolert fra både hemocytter og plasma (Mitta *et al.*, 1999a, Qin *et al.*, 2014). I tillegg til dette har AMP, som tidligere nevnt, også vært isolert fra hemocytter i O-skjell (upubliserte data; 1.4.1). Det er dermed sannsynlig at den påviste aktiviteten i hemocytterne, men også både i hemolymfen med og uten celler, kan skyldes AMP.

Det SPE eluatet som viste høyest antimikrobiell aktivitet var 40 % SPE eluatet fra kappen. Høy antimikrobiell aktivitet ble også sett i det tilsvarende SPE eluatet i Haug og medarbeidere (2004) sitt studium, sammen med en høy lysozymaktivitet. Det faktum at denne aktiviteten kun ble observert mot *C. glutamicum*, både i denne oppgaven og Haug og medarbeidere (2004) sitt studium, gjør det sannsynlig at denne aktiviteten kan skyldes lysozymer, ettersom lysozymer er spesielt aktiv mot Gram-positive bakterier (Gerdol og Venier, 2015). Lysozymer er viktige effektor molekyler i det medfødte immunsystemet (Song *et al.*, 2010), og lysozymaktivitet og lysozymer har tidligere vært påvist i en rekke marine muslinger (McHenry *et al.*, 1979, Nilsen *et al.*, 1999, Olsen *et al.*, 2003). Den observerte aktiviteten kan også skyldes AMP, ettersom flere AMP har vært påvist uttrykt i kappen hos muslinger (Gueguen *et al.*, 2006, Gerdol *et al.*, 2012).

En høy antimikrobiell aktivitet ble også påvist i SPE eluater fra gjeller, munnpalp, gonader og i det resterende materialet. Flere av disse er i kontakt med det ytre miljø og mikrober, og antimikrobiell aktivitet i slike vev antas ofte å skyldes komponenter som ikke er produsert av

organismen selv (Sperstad *et al.*, 2011). Lignende aktivitet ble observert i ekstrakter fra de vevene som ble testet i studiet til Haug og medarbeidere (2004), og dette kan styrke hypotesen om at komponentene stammer fra O-skjell. AMP har vært isolert fra gjeller fra den marine muslingen *Crassostrea gigas* (Seo *et al.*, 2013a, 2013b), og har også vært påvist uttrykt i fordøyelseskjertler, lukkemuskel og munnpalp i flere marine muslinger (Gerdol *et al.*, 2012, Adhya *et al.*, 2012). Det er dermed tenkelig at dette også kan være tilfellet i O-skjell. I tillegg til dette har eggmasser fra flere marine bløtdyr vist antimikrobiell aktivitet (Benkendorff *et al.*, 2001).

Helhetlig sett samsvarte den antimikrobielle aktiviteten i denne oppgaven med resultatene fra Haug og medarbeidere (2004) sitt studium. Denne høye aktiviteten i begge disse studiene er en sterk indikasjon på at O-skjell inneholder en rekke antimikrobielle komponenter, angivelig produsert av organismen selv.

5.3 Tilstedeværelse av tidligere isolerte antimikrobielle peptider

ESI-MS analyser av aktive HPLC-fraksjoner viste tilstedeværelsen av to forskjellige peptider i fraksjon He40-f38 og He40-f47, hvor molekylvektene ble beregnet til å være henholdsvis 12 110 Da og 9105 Da. MS-instrumentet hvor analysen ble utført er noe unøyaktig, og en usikkerhet på +/- 0,1 % bør tas i betraktning. Dette innebærer at begge disse detekterte peptidene samsvarer med molekylvektene til de tidligere isolerte peptidene OS-12 og OS-24 isolert fra O-skjell (Upubliserte data; 1.4.1), og kan potensielt sett være de samme peptidene. Likevel er ikke disse molekylvektene alene nok å kunne konkludere med hvorvidt disse peptidene er de samme som de tidligere isolerte peptidene fra O-skjell eller ei. Peptider vil inneholde et bestemt antall ulike aminosyrer som varierer i molekylvekt fra 75 Da for den minste og 204 Da for den største (Nelson og Cox, 2008). Det er dermed mulig at to forskjellige peptider har samme molekylvekt som sett her (+/- 0,1 %), uten at de har den samme primærstrukturen. Likevel var både peptidene detektert i denne oppgaven og de tidligere isolerte peptidene alle tilstede i 40 % SPE eluatet fra hemocytter (upubliserte data; 1.4.1), og er dermed en god indikasjon på at peptidene har relativt like kjemiske egenskaper.

Til tross for antatt tilstedeværelse av OS-12 og OS-24 i de opparbeidede prøvene, ble ikke cDNA-sekvensene deres identifisert via det molekylærbiologiske arbeidet utført i denne oppgaven. Derimot ble det identifisert to cDNA-sekvenser hvor molekylvekten til de modne

peptidsekvensene ble beregnet til å være ca. 12 337 og 9028 Da. Disse molekylvektene samsvarer ikke direkte med molekylvektene til de tidligere isolerte peptidene OS-12 og OS-24, på henholdsvis 12,12 og 9,10 kDa (upublisererte data; 1.4.1). Primærstrukturen til de modne peptidsekvensene dedusert fra cDNA-sekvensene avviker i enkelte posisjoner fra de partielle N-terminale sekvensene til OS-12 og OS-24 (se Figur 31 og Figur 34), noe som indikerer at dette ikke er de samme peptidene.

Grunnen til at vi ikke har klart å identifisere de korrekte cDNA-sekvensene tilhørende OS-12 og OS-24, til tross for den antatte tilstedeværelsen av peptidene i O-skjellene benyttet i denne oppgaven, kan skyldes en rekke faktorer. En av disse faktorene kan være at det isolerte RNAet ikke inneholder mRNA-molekylene tilhørende disse peptidene. Isoleringen av RNA ble gjort ca. 4 måneder etter prøvetakingen til ekstraksjonen av peptidene, og O-skjellene kan på dette tidspunktet ha endret uttrykningsprofilen sin. Slike endringer kan være et resultat av at organismene har tilpasset seg et nytt miljø, men kan også skyldes sesongmessige variasjoner eller forskjellige stressfaktorer. Studier utført på muslinger viser til en variasjon i hemolymfens antimikrobielle aktivitet som et resultat av variasjon på årstid, gytesesong samt forskjellige stressfaktorer (Mitta *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2009a, 2009b), noe som styrker denne antagelsen. I tillegg ble RNA kun isolert fra ett individ, og manglende uttrykning i dette individet er en mulighet. En annen mulighet kan imidlertid være at mRNA-molekylene ble isolert, men ikke lot seg identifisere via det molekylærbiologiske arbeidet. Her kan en rekke faktorer, som de degenererte primerene benyttet, uoptimal hybridiseringstemperaturer eller antall sykluser i PCR-reaksjonene spille inn. En rekke betingelser ble testet ut, uten at resultatene ble endret.

Denne oppgaven gir tvetydige resultater om hvorvidt de tidligere isolerte peptidene, OS-12 og OS-24, var tilstede i O-skjellene benyttet i denne oppgaven. Her vil videre arbeid, i form av isolering av peptidene detektert ved ESI-MS samt isolering av nytt RNA fra flere individer i kombinasjon med nye PCR-forsøk, være nødvendig.

5.4 OS-12_2 og OS-24_2, to nye antimikrobielle peptider i O-skjell

I denne oppgaven er det blitt karakterisert to antatte AMP basert på cDNA fra hemocytene i O-skjell. Ut fra de helhetlige cDNA-sekvensene ble to modne peptidsekvenser karakterisert til å være henholdsvis 115 og 81 aminosyrer lang for peptidene betegnet OS-12_2 og OS-24_2. Hvorvidt disse peptidene er antimikrobielle eller ei er ukjent ettersom de ikke har vært isolert

eller syntetisert, og testet for antimikrobiell aktivitet. Det vi derimot vet er at peptidsekvensene til disse to peptidene har høy sekvenslikhet med de tidligere isolerte peptidene, OS-12 og OS-24, og deres påviste partielle N-terminale sekvenser. Disse peptidene har vært isolert og antimikrobiell aktivitet er blitt påvist (upubliserte data; 1.4.1). Begge de identifiserte og karakteriserte peptidene i denne oppgaven er netto positivt ladd (ved nøytral pH), cysteinrike (henholdsvis 16 og 12 cysteiner) samt rik på hydrofobe aminosyrer. Dette samsvarer med de forventede karakteristikkene til et antimikrobielt peptid (Reddy *et al.*, 2004, Hancock *et al.*, 2006, Cruz *et al.*, 2014). OS-24_2 inneholder også fire tryptofaner som anses å være viktig for den antimikrobielle aktiviteten til AMP (Chan *et al.*, 2006). I tillegg til dette samsvarer den antatte molekylvekten og lengden til OS-24_2 med hva som er beskrevet for andre AMP hos muslinger (Gerdol *et al.*, 2012). Den antatte lengden og molekylvekten til OS-12_2 er derimot noe større enn hva som er forventet for et antimikrobielt peptid, men AMP av denne størrelsen har tidligere vært sett hos akvatiske invertebrater (Smith *et al.*, 2008). Alle disse karakteristikkene tatt i betraktning, og det faktum at begge peptidene viser høy sekvenslikhet med de N-terminale sekvensene til de tidligere isolerte antimikrobielle peptidene OS-12 og OS-24, er en god indikasjon på at peptidene kan være antimikrobielle.

De deduserte cDNA-sekvensene ser begge ut til å inneholde et signalpeptid som spaltes av og gir opphav til de modne peptidsekvensene. Dette er sett for en rekke andre AMP, både fra muslinger og andre marine invertebrater (Mitta *et al.*, 1999b, Stensvåg *et al.*, 2008, Sperstad *et al.*, 2009). Hvorvidt de modne peptidsekvensene inneholder noen andre post-translasjonelle modifikasjoner er ikke kartlagt. Slike modifikasjoner er anslått for flere AMP med opphav fra marine invertebrater (Shigenaga *et al.*, 1990, Mitta *et al.*, 1999b, Stensvåg *et al.*, 2008, Li *et al.*, 2010a), og vil være med på å endre den antatte molekylvekten til peptidene. Vi kan dermed ikke konkludere med at de antatte molekylvektene på 12 337 og 9028 Da er 100 % korrekt. Noe som likevel styrker hypotesen om at dette er de faktiske sekvensene til peptidene, er at ESI-MS data fra 40 % SPE eluatet viste tilstedeværelsen av to peptider på henholdsvis 12 326 Da og 9025 Da. Disse molekylvektene, med usikkerheten til MS-instrumentet på 0,1 % tatt i betraktning, samsvarer med de teoretiske molekylvektene. Dette er en god indikasjon på at de modne peptidene som det er kodet for ikke gjennomgår noen post-translasjonelle modifikasjoner ettersom disse peptidene kan være OS-12_2 og OS-24_2. Antallet hydrofobe aminosyrer sett i både OS-12_2 og OS-24_2 kan også samsvare med at

disse peptidene vil være tilstede i 40 % SPE eluatet til hemocytterne (Sperstad *et al.*, 2011). Det er derimot nødvendig å fullstendig isolere og analysere sekvensene til disse detekterte peptidene for å kunne gi en eventuell bekreftelse på denne antagelsen.

5.4.1 Peptidenes slektskap

BLAST homologisøk gjort på den deduserte peptidsekvensen til OS-24_2 viste et nært slektskap til flere kjente AMP, hvorav 4 av 5 er identifisert til å tilhøre macinfamilien (**Tabell 21**). Det samme konserverte domenet tilhørende denne familien ble også identifisert i OS-24_2s peptidsekvens ved søk i EMBL-EBIs Pfam database og NCBI's CDD, noe som ytterligere styrker antagelsen om at OS-24_2 er et antimikrobielt peptid. Macinfamilien inneholder en rekke forskjellige AMP som har vært påvist i igler (Tasiemski *et al.*, 2004, Schikorski *et al.*, 2008), snegler (Zhong *et al.*, 2013), nesledyr (Jung *et al.*, 2009) samt i muslinger fra både ferskvann (Xu *et al.*, 2010) og det marine miljø (Gerdol *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2014). Dette vitner om at maciner har en vid distribusjon blant forskjellige animalske rekker, og dermed kan antas å ha et gammelt evolusjonært opphav. Et av fellestrekkene til maciner er et høyt antall cysteiner hvorav de fleste inneholder 8 eller 10 cysteiner. Mytimacin-5, sett i *M. galloprovincialis*, inneholder derimot 12 cysteiner (Gerdol *et al.*, 2012, Gerdol og Venier, 2015), i likhet med OS-24_2. Dette peptidet var også det som hadde best E-verdi i BLAST søket på OS-24_2s peptidsekvens, noe som vitner om at mytimacin-5 (AHG59340.1) er det hittil kjente peptidet som er nærmest beslektet OS-24_2. Disse to peptidene viste høy sekvenslikhet, og har et område over 34 aminosyrer hvor totalt 25 aminosyrer er identiske. OS-24_2 viste også høy sekvenslikhet med de andre macinpeptidene framkommet fra BLAST søket. Alle sekvensene som ble sekvenssammenstilt (**Figur 35**) har en lik region over seks aminosyrer bestående av aminosyrene T-W-S-R-C-S. Det eneste unntaket er mytimacin-2 (CCC15016.1) hvor den siste aminosyren er en treonin (T). Siden både serin (S) og treonin er polare uladde aminosyrer vil de likevel ha tilnærmet like egenskaper (Nelson og Cox, 2008). Et slikt konservert domene som samsvarer for så mange forskjellige maciner kan antas å ha en viktig rolle for maciners aktivitet og struktur. Hydramacin-1 (isolert fra *Hydra magnipapillata*) er, så vidt vi vet, det eneste macinet hvor den tredimensjonale strukturen er kjent, og også dette peptidet har det samme konserverte domenet fra T til og med C. I likhet med mytimacin-2 har hydramacin-1 en treonin i den siste posisjonen. Dette området, fra W til T, inngår i en α -heliks i hydramacin-1 sekundærstruktur (Jung *et al.*, 2009), og styrker antagelsen om at dette

konserverte domenet er viktig for den sekundære strukturen til maciner. Alt disse likhetene mellom OS-24_2 og andre maciner er ytterligere med på å styrke antagelsen om at OS-24_2 er et macin, og dermed har et antimikrobielt potensiale.

Peptidet OS-12_2 ble derimot ikke anslått å tilhøre noen hittil kjent proteinfamilie, noe som vitner om at vi i denne oppgaven kan ha identifisert en ny proteinfamilie som angivelig tilhører et antimikrobielt peptid. BLAST søket utført på den deduserte peptidsekvensen viste kun fjernt beslektede peptider/proteiner (**Tabell 19**). Sekvenssammenstillingen mellom noen av disse og OS-12_2 (**Figur 32**) viste at OS-12_2 er lite lik de to andre peptidene/proteinene. Kun et område, etter at en stor «gap» er introdusert, viste en viss likhet. Likevel er det lite tenkelig at disse sekvensene har et nært slektskap til OS-12_2 ettersom de viste en lav sekvenslikhet til OS-12_2 ($\leq 37\%$) og var betydelig lengre. Det ene av proteinene i sekvenssammenstillingen (ABY87405.1), hadde nesten identisk sekvens med to andre av proteinene fremkommet i BLAST søket (ABY87373.1, ABW90689.1), hvorav det ene (ABW90689.1) er et «latent transforming growth factor beta binding protein». Dette samsvarer heller ikke med antagelsen om at OS-12_2 er et antimikrobielt peptid. Det vil derimot være mer interessant å se på sekvenssammenstillingen gjort mellom den partielle N-terminale sekvensen til OS-12 og den antatte modne sekvensen til OS-12_2. Av de 56 kjente aminosyrene til OS-12, samsvarte 54 av dem med OS-12_2 sin sekvens (**Figur 31**). Som nevnt tidligere er OS-12 kjent for å ha antimikrobiell aktivitet (upublisererte data; **1.4.1**). Det er dermed sannsynlig at disse to peptidene, OS-12_2 og OS-12, er to svært nært beslektede AMP som tilhører en familie som tidligere ikke er rapportert.

5.4.2 Strukturpredikasjoner av OS-12_2 og OS-24_2

Strukturpredikasjonen av OS-24_2 ble gjort ved hjelp av Phyre² (Kelley og Sternberg, 2009), og ble basert på den kjente tredimensjonale strukturen til hydramacin-1 (fold library id: c2k35A; Jung *et al.*, 2009). Ut fra dette ble strukturen til OS-24_2 anslått til å bestå av både α -helikser og β -flak (**Figur 37**). En slik struktur er sannsynlig, men hvorvidt OS-24_2s struktur vil være såpass lik hydramacin-1 sin struktur er usikkert. Dette fordi hydramacin-1 kun inneholder 8 cysteiner (Jung *et al.*, 2009), mens OS-24_2 inneholder 12 cysteiner. Ettersom cysteiner har en viktig rolle for peptidets tredimensjonale struktur (Bulet *et al.*, 1999, Powers og Hancock, 2003), er det tenkelig at den faktiske strukturen til OS-24_2 kan være noe annerledes. Det er

likevel sannsynlig at den første av α -heliksene er korrekt, ettersom denne er i et konservert område hvor 5 aminosyrer er identiske mellom OS-24_2 og hydramacin-1 sine primærstrukturer (Jung *et al.*, 2009). For resten av sekvensen til OS-24_2 er det større usikkerhet knyttet til hvorvidt denne strukturen stemmer eller ei. En predikasjon basert på mytimacin-5 ville vært mer sannsynlig, ettersom det er det eneste andre macinet med 12 cysteiner. I tillegg har de tilsynelatende et identisk cysteinmønster (C-C-C-CC-C-C-C-C-C-C), der kun cysteinene nr. 4 og 5 ligger ved siden av hverandre (Gerdol *et al.*, 2012). Strukturen til mytimacin-5 er, så vidt vi vet, ikke kjent. Gerdol og medarbeidere (2012) har derimot gjort en strukturpredikasjon på peptidet ved hjelp av Phyre² verktøyet, og i likhet med OS-24_2, ble denne basert på hydramacin-1 sin struktur. Den predikerte strukturen til OS-24_2 og mytimacin-5 ser derimot ikke ut til å være identisk, men begge ble predikert til å inneholde både α -helikser og β -flak i tilnærmet samme områder. Mens vi i denne oppgaven fikk oppgitt et høyt konfidensnivå (100 %) ved Phyre² predikasjonen, fikk Gerdol og medarbeidere (2012) kun oppgitt et konfidensnivå på 69 % ved sin predikasjon av mytimacin-5 struktur. Dette er noe som igjen skaper usikkerhet rundt hvordan den faktiske strukturen til OS-24_2 er.

I tillegg til dette har Gerdol og medarbeidere (2012) gjort en predikasjon av disulfidbindingene til mytimacin-5. Disse bindingene samsvarer ikke med predikasjonen av OS-24_2 sine bindinger gitt av DiANNA 1.1 web server (Ferrè og Clote, 2005a, 2005b, 2006). De predikerte disulfidbindingene til OS-24_2 er ansett som lite sannsynlige ettersom de ikke er basert på bindingene til et annet antimikrobielt peptid. Det er derimot tenkelig at OS-24_2 og mytimacin-5 vil ha en lik binding mellom cysteinene basert på det faktum at de har et likt cysteinmønster. En ny predikasjon, basert på predikasjonen av mytimacin-5 presentert av Gerdol og medarbeidere (2012), er derfor vist i **Figur 39**. Den eneste disulfidbindingen som er lik mellom denne predikasjonen og den gitt av DiANNA (**Figur 36**), er bindingen mellom cystein nr. 3 og 9. Denne predikasjonen anses som mer lovende, men også denne strukturen inneholder en viss usikkerhet.



Figur 39 - Foreslåtte disulfidbindinger i peptidet OS-24_2, basert på de predikerte bindingene mellom cysteinene til mytimacin-5 presentert av Gerdol og medarbeidere (2012).

I likhet med predikasjonen gjort av OS-24_2, anses predikasjonen av OS-12_2 også å være usikker ettersom den ikke er basert på en kjent struktur til et antimikrobielt peptid.

I dag er den tredimensjonale strukturen kun kjent for 13 % av de antimikrobielle peptidene registrert i APD (Wang, 2015). Siden de mest suksessfulle strukturpredikasjonene baserer seg på strukturen til lignende peptider/ proteiner (Kelley og Sternberg, 2009), er det tenkelig at det lave antallet kjente AMP-strukturer vanskeliggjør strukturpredikasjoner basert på bioinformatiske verktøy. Strukturen er antatt å være viktig for AMP sin virkning (Brogden, 2005, Cruz *et al.*, 2014), og det er derfor tenkelig at kun beslektede peptider med samme karakteristika og virkningsmekanismer vil kunne gi en tilnærmet nøyaktig strukturpredikasjon. Med alt dette tatt i betraktning kan vi konkludere med at de tredimensjonale strukturene og bindingene mellom cysteinene vist i denne oppgaven er svært spekulative. En fullstendig isolering og karakterisering av peptidene vil være nødvendig for å gi en endelig avklaring av peptidenes struktur.

5.5 Tilstedeværelse av hittil ukjente peptider i O-skjell

ESI-MS analysen av 40 % SPE eluatet fra hemocytterne viste tilstedeværelsen av karakteristiske UV-Vis-spekter (Figur 18) samt «bjelleformede» MS-spekter (eks. Figur 21), noe som indikerer at de detekterte komponentene er peptider (Crews *et al.*, 2010). Disse peptidene var av varierende størrelser, med 4,6 kDa for det minste og 13,6 kDa for det største. En rekke forskjellige AMP har tidligere vært påvist og beskrevet i forskjellige Mytilidae arter. Alt fra små peptider under 5 kDa (Charlet *et al.*, 1996, Hubert *et al.*, 1996, Mitta *et al.*, 1999a), til større peptider mellom 6 til 10 kDa (Gerdol *et al.*, 2012, Qin *et al.*, 2014). I tillegg er det også sett et antimikrobielt peptid på 11 kDa (Liao *et al.*, 2013). Dette vitner om en stor spredning på hvilke AMP størrelser som kan forventes å finnes i Mytilidae arter. Ingen av disse komponentene ser ut til å samsvare med molekylvektene til noen av de detekterte peptidene i denne oppgaven,

noe som virker lovende med tanke på at disse peptidene er nye og ikke tidligere har vært påvist.

Av de totalt 11 detekterte peptidene i dette eluatet hadde 5 peptider en størrelse over 12 kDa. AMP av denne størrelsen ser ikke ut til å være påvist i noen muslingarter tidligere. Når molekylvekten blir så stor vil det heller være snakk om proteiner enn peptider, som for eksempel lysozymer. Lysozymer og lysozym-lignende komponenter har vært påvist i flere marine muslinger med molekylvekter i området mellom 11 – 22 kDa (Nilsen *et al.*, 1999, Olsen *et al.*, 2003, Xue *et al.*, 2007). Det er dermed tenkelig at de detekterte peptidene kan være lysozymer. Lysozymaktivitet hos flere marine muslinger har derimot hovedsakelig vært å se i fordøyelseskjertler og stylen (McHenery *et al.*, 1979, Xue *et al.*, 2007), noe som igjen kan være en indikator at de detekterte peptidene/proteinene i hemocytene kanskje ikke er lysozymer. Som nevnt tidligere har AMP over 11 kDa vært påvist i andre akvatiske invertebrater (Smith *et al.*, 2008), og vi kan dermed ikke utelukke at noen av disse komponentene likevel kan være AMP. Her vil testing av lysozymaktivitet være fordelaktig for å gi et nærmere innblikk i hvorvidt disse peptidene/ proteinene kan være lysozymer eller ei, samt en videre isolering av peptidene/proteinene.

Et av SPE eluatene fra kappa viste, som tidligere nevnt, høyest detektert antimikrobiell aktivitet. ESI-MS fra dette eluatet (40 % SPE eluatet) viste tilstedeværelsen av fem forskjellige peptider med detektert molekylvekter mellom 5,2 og 8,5 kDa. To av disse ble detektert i andre SPE eluater eller HPLC-fraksjoner, og kan antas å skyldes komponenter med opphav fra hemolymfen. For de resterende fire peptidene, ser disse kun ut til å være tilstede i kappen. AMP med molekylvekter på 6.7, 8.8 og 9.1 kDa har vært påvist uttrykt i kappen til *M. galloprovincialis* (Gerdol *et al.*, 2012), men ingen av disse samsvarer med peptidene detektert i denne oppgaven. Preliminære litteratursøk indikerer heller ikke at AMP med disse molekylvektene er sett før. På grunn av den lave molekylvekten er det heller ikke tenkelig at disse peptidene er lysozymer ettersom molekylvektene til påviste lysozymer og lysozym-lignende komponenter i marine muslinger har vært over 11 kDa (Nilsen *et al.*, 1999, Olsen *et al.*, 2003, Xue *et al.*, 2007). Dette gjør den høye observerte aktiviteten mer interessant med hensyn på tilstedeværelsen av potensielle AMP.

Hvorvidt noen av disse peptidene, detektert i hemocytterne og kappen, bidrar til den observerte antimikrobielle aktiviteten i ekstraktene fra disse vevene, er ikke kartlagt ettersom ingen av peptidene er fullstendig isolert og testet alene. Her vil videre fraksjonering og separering være nødvendig for å kartlegge det antimikrobielle potensialet til disse peptidene. For peptidene detektert i HPLC-fraksjonene kan vi med større sannsynlighet si at peptidene var involvert i den observerte antimikrobielle aktiviteten, men heller ikke her kan vi konkludere med noe siden ingen av HPLC-fraksjonene var rene.

5.6 Videre arbeid

Det gjenstår fremdeles en god del ubesvarte spørsmål, og videre arbeid av dette prosjektet vil være nødvendig for å kunne gi nærmere svar på flere av disse. I første omgang er det interessant å isolere, syntetisere eller rekombinant fremstille peptidene OS-12_2 og OS-24_2, for å teste peptidene for antimikrobiell aktivitet. Videre vil det vært interessant å gjennomføre forskjellige virkningsmekanisme- og toksisitetsstudier dersom peptidene viser seg å være antimikrobielle.

En videre oppfølging av peptidene OS-12 og OS-24 er også fordelaktig, hovedsakelig ved oppfølging av det molekylærbiologiske arbeidet da dette forhåpentligvis vil kunne føre til identifisering av cDNA-sekvensene og de deduserte peptidsekvensene til peptidene. For disse peptidene er også virkningsmekanisme- og toksisitetsstudier svært interessant å gjennomføre ettersom deres antimikrobielle potensiale allerede er avdekket.

Det faktum at kappen har vist høy aktivitet både i dette og Haug og medarbeidere (2004) sitt studium, gjør det interessant å videre følge opp 40 % SPE eluatet fra kappen. I første omgang via ytterligere fraksjonering (prep HPLC) og eventuelt videre til isolering og karakterisering av cDNA-sekvenser dersom interessante potente peptider påvises.

6. Konklusjoner

I denne oppgaven ble antimikrobiell aktivitet påvist i samtlige vev testet fra O-skjell mot den Gram-positive bakterien *C. glutamicum*. Flere vev viste også antimikrobiell aktivitet mot den Gram-negative bakterien *E. coli*. Totalt sett viste hemocytterne den høyeste antimikrobielle aktiviteten av vevene testet.

ESI-MS analyser utført på HPLC-fraksjoner fra hemocytterne indikerte tilstedeværelsen av tidligere isolerte AMP fra O-skjell, i form av to peptider på henholdsvis 12 110 og 9105 Da. Disse ble derimot ikke påvist under det molekylærbiologiske arbeidet, og et videre arbeid vil her være nødvendig for å gjøre en fullstendig påvisning samt en karakterisering av gensekvensene som koder for disse tidligere isolerte peptidene.

Isolering av RNA fra hemocytterne i O-skjell førte til karakteriseringen av to cDNA-sekvenser som angivelig tilhører to antimikrobielle peptider som tidligere ikke har vært påvist. Av disse peptidene ble ett peptid, med en antatt molekylvekt på 9028 Da, identifisert til å tilhøre macinfamilien. Det andre peptidet, med en antatt molekylvekt på 12 337 Da, tilhørte ikke noen hittil kjent familie. De forskjellige karakteristikkene til disse peptidene, samt deres høye sekvenslikhet med tidligere isolerte antimikrobielle peptider fra O-skjell, er en sterk indikasjon på at peptidene kan være antimikrobielle. Et videre arbeid er derimot nødvendig for å bekrefte denne antagelsen.

Andre peptider som potensielt kan være antimikrobielle, ble også påvist i blant annet 40 % SPE eluatet fra hemocytterne og kappen. Et videre arbeid på dette kan være interessant for en eventuell isolering og påvisning av nye antimikrobielle peptider fra O-skjell.

7. Referanser

- Adhya, M., Jeung, H.-D., Kang, H.-S., Choi, K.-S., Lee, D. S. & Cho, M. 2012. Cloning and localization of MCdef, a defensin from Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 161(1), s. 25-31.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. 5. . utg. New York, USA: Garland Science.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), s. 3389-3402.
- APD. 2015. *Query Results: Mollusc*. Tilgjengelig: http://aps.unmc.edu/AP/database/query_input.php [08.01.2014].
- Benkendorff, K., Davis, A. R. & Bremner, J. B. 2001. Chemical Defense in the Egg Masses of Benthic Invertebrates: An Assessment of Antibacterial Activity in 39 Mollusks and 4 Polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2), s. 109-118.
- Benkendorff, K., Davis, A. R., Rogers, C. N. & Bremner, J. B. 2005. Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(1), s. 29-44.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), s. 42-51.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G. & Prinsep, M. R. 2012. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 29(2), s. 144-222.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G. & Prinsep, M. R. 2015. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 32(2), s. 116-211.
- Brogden, K. A. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro*, 3(3), s. 238-250.
- Brown, T. A. 2010. *Gene Cloning & DNA Analysis: An introduction*. 6. . utg. John Wiley & sons.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L. & Hoffmann, D. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4-5), s. 329-344.
- Chan, D. I., Prenner, E. J. & Vogel, H. J. 2006. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), s. 1184-1202.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A. & Bulet, P. 1996. Innate Immunity: ISOLATION OF SEVERAL CYSTEINE-RICH ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM

- THE BLOOD OF A MOLLUSC, MYTILUS EDULIS. *Journal of Biological Chemistry*, 271(36), s. 21808-21813.
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), s. 3670-3695.
- Crews, P., Rodriguez, J. & Jaspars, M. 2010. *Organic Structure Analysis*. 2. Utg. Oxford: Oxford University Press.
- Cruz, J., Ortiz, C., Guzmán, F., Fernández-Lafuente, R. & Torres, R. 2014. Antimicrobial Peptides: Promising Compounds Against Pathogenic Microorganisms. *Current Medicinal Chemistry*, 21(20), s. 2299-2321.
- Da Costa, J. P., Cova, M., Ferreira, R. & Vitorino, R. 2015. Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Applied microbiology and biotechnology*, s. 2023-2040.
- Davies, J. & Davies, D. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), s. 417-433.
- De Jesús Paniagua-Michel, J., Soto, J. O. & Morales-Guerrero, E. 2015. Drugs and Leads from the Ocean Through Biotechnology. *I: Hb25_Springer Handbook of Marine Biotechnology*. Springer, s. 711-729.
- Dinan, L. 2006. Dereplication and Partial Identification of Compounds. *I: Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (red.). Natural Products Isolation*. 2. utg. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Dolashka, P., Moshtanska, V., Borisova, V., Dolashki, A., Stevanovic, S., Dimanov, T. & Voelter, W. 2011. Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides*, 32(7), s. 1477-1483.
- Dorit, R. L., Walker, W. F. & Barnes, R. D. 1991. Molluscs. *I: FIELD, C. (red.). Zoology*. Philidelphia: Saunders College Publishing, s. 657-691.
- Ersson, B., Rydén, L. & Janson, J.-C. 2011. Introduction to Protein Purification. *I: Janson, J.-C. (red.). Protein Purification. Principles, High Resolution, Methodes, and Applications*. 3. utg. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. Inc.
- Ferrè, F. & Clote, P. 2005a. DiANNA: a web server for disulfide connectivity prediction. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl 2), s. W230-W232.
- Ferrè, F. & Clote, P. 2005b. Disulfide connectivity prediction using secondary structure information and diresidue frequencies. *Bioinformatics*, 21(10), s. 2336-2346.
- Ferrè, F. & Clote, P. 2006. DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic acids research*, 34(suppl 2), s. W182-W185.
- Fox, J. L. 2013. Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature biotechnology*, 31(5), s. 379-382.

- Fritzgerald-Hayes, M. & Reichsman, F. 2010. *DNA and Biotechnology*. 3. Utg. Elsevier inc.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. E., Wilkins, M., Appel, R. & Bairoch, A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *I*: Walker, J. (red.). *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press, s. 571-607.
- Gerdol, M., De Moro, G., Manfrin, C., Venier, P. & Pallavicini, A. 2012. Big defensins and mytimacins, new AMP families of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 36(2), s. 390-399.
- Gerdol, M. & Venier, P. 2015. An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish & Shellfish Immunology*(0). Tilgjengelig: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.02.013> [In press]
- Ghisalberti, E. L. 2008. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. *I*: Colegate, S. M. & Molyneux, R. J. (red.). *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination*. 2. utg. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Griffiths, A. J. F. 2012. *Introduction to genetic analysis*. 10. utg. New York, USA: Freeman and company.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Terán, L. M. 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*, 135(1), s. 1-11.
- Gueguen, Y., Herpin, A., Aumelas, A., Garnier, J., Fievet, J., Escoubas, J.-M., Bulet, P., Gonzalez, M., Lelong, C., Favrel, P. & Bachère, E. 2006. Characterization of a Defensin from the Oyster *Crassostrea gigas*: RECOMBINANT PRODUCTION, FOLDING, SOLUTION STRUCTURE, ANTIMICROBIAL ACTIVITIES, AND GENE EXPRESSION. *Journal of Biological Chemistry*, 281(1), s. 313-323.
- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *I*: *Nucleic acids symposium series*, 1999, s. 95-98.
- Hancock, R. E. & Sahl, H.-G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 24(12), s. 1551-1557.
- Hancock, R. E. W. 2000. *Hancock Laboratory Methods*: Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, British Columbia, Canada. Tilgjengelig: <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/methodsall.html> & <http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/methods/MICDETERMINATIONBYMICROTITREBROTHDILUTIONMETHOD.html> [20.05.2015].
- Hancock, R. E. W., Brown, K. L. & Mookherjee, N. 2006. Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology*, 211(4), s. 315-322.
- Hancock, R. E. W. & Patrzykat, A. 2002. Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides: From Natural to Novel Antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2(1), s. 79-83.

- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø. M., Sandsdalen, E. & Styrvold, O. B. 2004. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2), s. 112-119.
- Houssen, W. E. & Jaspars, M. 2006. Isolation of Marine Natural Products. I: Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (red.). *Natural Products Isolation*. 2. utg. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Hubert, F., Noël, T. & Roch, P. 1996. A Member of the Arthropod Defensin Family from Edible Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry*, 240(1), s. 302-306.
- Hågvar, E. B. 2010. *Det zoologiske mangfoldet: Dyregruppernes systematikk, bygning og levevis*. 3. utg. Universitetsforlaget
- Janson, J.-C. & Jönsson, J. Å. 2011. Introduction to Chromatography. I: Janson, J.-C. (red.). *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods, and Applications*. 3. utg. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. Inc.
- Jung, S., Dingley, A. J., Augustin, R., Anton-Erxleben, F., Stanisak, M., Gelhaus, C., Gutschmann, T., Hammer, M. U., Podschun, R., Bonvin, A. M. J. J., Leippe, M., Bosch, T. C. G. & Grötzinger, J. 2009. Hydramacin-1, structure and antibacterial activity of a protein from the basal metazoan Hydra. *The Journal of biological chemistry*, 284(3), s. 1896-1905.
- Karleskint, G., Turner, R. & Small, J. 2013. *Introduction to marine biology*. 4. utg. Brooks/cole, Cengage Learning.
- Kelley, L. A. & Sternberg, M. J. E. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protocols*, 4(3), s. 363-371.
- Latif, Z. 2006. Isolation by Preparative High-Performance Liquid Chromatography. I: Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (red.). *Natural Products Isolation*. 2. utg. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Lee, Y., Whang, I., Shin, J. L. & De Zoysa, M. 2014. First molluscan antimicrobial peptide hydramacin in Manila clam: molecular characterization and expression analysis. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(6), s. 447-452.
- Lewis, K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 12(5), s. 371-387.
- Li, C., Haug, T., Moe, M. K., Styrvold, O. B. & Stensvåg, K. 2010a. Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 34(9), s. 959-968.
- Li, C., Haug, T. & Stensvåg, K. 2010b. Antimicrobial peptides in Echinoderms. *Invertebrate survival journal*, 7, s. 132-140.

- Li, Y., Qin, J. G., Li, X. & Benkendorff, K. 2009a. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*, 286(1–2), s. 64-71.
- Li, Y., Qin, J. G., Li, X. & Benkendorff, K. 2009b. Spawning-dependent stress responses in Pacific oysters *Crassostrea gigas*: A simulated bacterial challenge in oysters. *Aquaculture*, 293(3–4), s. 164-171.
- Liao, Z., Wang, X.-C., Liu, H.-H., Fan, M.-H., Sun, J.-J. & Shen, W. 2013. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 34(2), s. 610-616.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clark, D. P. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*. 12. utg. Pearson Education.
- Marr, A. K., Gooderham, W. J. & Hancock, R. E. W. 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current Opinion in Pharmacology*, 6(5), s. 468-472.
- Mayer, A. & Glaser, K. 2014. The marine pharmacology and pharmaceuticals pipeline in 2013 (657.17). *The FASEB Journal*, 28(1 Supplement). [Kun abstract].
- Mayer, A. M. S., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., McIntosh, J. M., Newman, D. J., Potts, B. C. & Shuster, D. E. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(6), s. 255-265.
- Mchenery, J. G., Birkbeck, T. H. & Allen, J. A. 1979. The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 63(1), s. 25-28.
- Mecklenburg, C. W., Møller, P. R. & Steinke, D. 2011. Biodiversity of arctic marine fishes: taxonomy and zoogeography. *Marine Biodiversity*, 41(1), s. 109-140.
- Mishra, B. & Wang, G. 2012. The Importance of Amino Acid Composition in Natural AMPs: An Evolutional, Structural, and Functional Perspective. *Frontiers in Immunology*, 3, s. 221.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrinda, E. A., Boudry, P. & Roch, P. 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(4), s. 381-393.
- Mitta, G., Hubert, F., Noël, T. & Roch, P. 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), s. 71-78.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. & Roch, P. 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *Journal of Cell Science*, 112(23), s. 4233-4242.
- Moen, F. E. & Svensen, E. 2008. *Dyreliv i havet*. 5. utg. Kom forlag.

- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L. & Saludes, J. P. 2009. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov*, 8(1), s. 69-85.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2008. *Lehninger: Principles of biochemistry*. 5. utg. New York: W.H. Freeman and company
- Newman, D. & Cragg, G. 2014. Marine-Sourced Anti-Cancer and Cancer Pain Control Agents in Clinical and Late Preclinical Development. *Marine Drugs*, 12(1), s. 255-278.
- Nicolas, P. 2009. Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS Journal*, 276(22), s. 6483-6496.
- Nilsen, I. W., Øverbø, K., Sandsdalen, E., Sandaker, E., Sletten, K. & Myrnes, B. 1999. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *FEBS letters*, 464(3), s. 153-158.
- Olivera, B. M., Gray, W. R., Zeikus, R., Mcintosh, J. M., Varga, J., Rivier, J., De Santos, V. & Cruz, L. J. 1985. Peptide neurotoxins from fish-hunting cone snails. *Science*, 230(4732), s. 1338-1343.
- Olsen, Ø. M., Nilsen, I. W., Sletten, K. & Myrnes, B. 2003. Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(1), s. 107-115.
- Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C. & Franco, O. L. 2010. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal*, 24(5), s. 1320-1334.
- Perez Espitia, P. J., De Fátima Ferreira Soares, N., Dos Reis Coimbra, J. S., De Andrade, N. J., Souza Cruz, R. & Alves Medeiros, E. A. 2012. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), s. 187-204.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G. & Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Meth*, 8(10), s. 785-786.
- Powers, J.-P. S. & Hancock, R. E. W. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides*, 24(11), s. 1681-1691.
- Qin, C.-L., Huang, W., Zhou, S.-Q., Wang, X.-C., Liu, H.-H., Fan, M.-H., Wang, R.-X., Gao, P. & Liao, Z. 2014. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), s. 362-370.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D. & Aranha, C. 2004. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24(6), s. 536-547.
- Reid, R. G. & Sarker, S. D. 2006. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. I: Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (red.). *Natural Products Isolation*. 2. utg. Totowa, NJ, USA: Humana Press.

- Sanduja, R., Weinheimer, A., Euler, K. & Alam, M. 1985. Unusual occurrence of fulvoplumierin, an antibacterial pigment, in the marine mollusk *Nerita albicilla*. *Journal of natural products*, 48(2), s. 335-336.
- Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. 2006. Natural Product Isolation. I: Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (red.). *Natural Product Isolation*. 2. utg. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Sarker, S. D. & Nahar, L. 2006. Hyphenated Techniques. I: Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. (red.). *Natural Products Isolation*. 2. utg. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
- Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Leippe, M., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Macagno, E., Salzet, M. & Tasiemski, A. 2008. Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(2), s. 1083-1095.
- Seo, J.-K., Lee, M. J., Go, H.-J., Kim, G. D., Jeong, H. D., Nam, B.-H. & Park, N. G. 2013a. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Immunology*, 53(1-2), s. 88-98.
- Seo, J.-K., Lee, M. J., Nam, B.-H. & Park, N. G. 2013b. cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(2), s. 480-488.
- Shigenaga, T., Muta, T., Toh, Y., Tokunaga, F. & Iwanaga, S. 1990. Antimicrobial tachyplesin peptide precursor. cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). *Journal of Biological Chemistry*, 265(34), s. 21350-4.
- Smith, V. J., Fernandes, J. M. O., Kemp, G. D. & Hauton, C. 2008. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(7), s. 758-772.
- Song, L., Wang, L., Qiu, L. & Zhang, H. 2010. Bivalve Immunity. I: Söderhäll, K. (red.). *Invertebrate Immunity*. Serie: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer US, s. 44-65. Tilgjengelig: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_3
- Sperstad, S. V., Haug, T., Blencke, H.-M., Styrvold, O. B., Li, C. & Stensvåg, K. 2011. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnology Advances*, 29(5), s. 519-530.
- Sperstad, S. V., Haug, T., Vasskog, T. & Stensvåg, K. 2009. Hyastatin, a glycine-rich multi-domain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Molecular Immunology*, 46(13), s. 2604-2612.
- Steckbeck, J. D., Deslouches, B. & Montelaro, R. C. 2014. Antimicrobial peptides: new drugs for bad bugs? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(1), s. 11-14.

- Stensvåg, K., Haug, T., Sperstad, S. V., Rekdal, Ø., Indrevoll, B. & Styrvold, O. B. 2008. Arasin 1, a proline–arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3), s. 275-285.
- Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautière, P.-E. & Salzet, M. 2004. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum*. *The Journal of biological chemistry*, 279(30), s. 30973-30982.
- Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6, Supplement 1), s. S3-S10.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), s. 4673-4680.
- Tunkijjanukij, S., Mikkelsen, H. V. & Olafsen, J. A. 1997. A heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 117(2), s. 273-286.
- Wang, G. 2015. Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides. I: ZHOU, P. & HUANG, J. (red.). *Computational Peptidology*. Serie: Methods in Molecular Biology. Springer New York, s. 43-66. Tilgjengelig: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-2285-7_3
- Wang, G., Li, X. & Wang, Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl 1), s. D933-D937.
- Wang, Z. & Wang, G. 2004. APD: the antimicrobial peptide database. *Nucleic acids research*, 32(suppl 1), s. D590-D592.
- WHO. 2001. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. Tilgjengelig: http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy_English.pdf?ua=1
- WHO. 2014. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Tilgjengelig: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
- Wilson, K. & Walker, J. 2005. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 6. utg. Cambridge: Cambridge University Press.
- Xu, Q., Wang, G., Yuan, H., Chai, Y. & Xiao, Z. 2010. cDNA sequence and expression analysis of an antimicrobial peptide, theromacin, in the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 157(1), s. 119-126.
- Xue, Q.-G., Itoh, N., Schey, K., Li, Y.-L., Cooper, R. & La Peyre, J. 2007. A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cellular and molecular life sciences*, 64(1), s. 82-95.

- Yeaman, M. R. & Yount, N. Y. 2003. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, 55(1), s. 27-55.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), s. 389-395.
- Zhao, J., Li, C., Chen, A., Li, L., Su, X. & Li, T. 2010. Molecular Characterization of a Novel Big Defensin from Clam *Venerupis philippinarum*. *PLoS ONE*, 5(10), s. e13480.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W. & Xu, W. 2007. Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Molecular Immunology*, 44(6), s. 1198-1208.
- Zhong, J., Wang, W., Yang, X., Yan, X. & Liu, R. 2013. A novel cysteine-rich antimicrobial peptide from the mucus of the snail of *Achatina fulica*. *Peptides*, 39(0), s. 1-5.

Appendiks

Appendiks 1

Forkortelser for aminosyrer

Tabell I – Oversikt over aminosyrene. Tabellen gir en oversikt over aminosyrer med fullt navn samt en bokstav og tre bokstav forkortelsene deres. I tillegg er aminosyrene delt inn i undergrupper basert på deres kjemiske egenskaper, og molekylvekten til hver enkelt aminosyre er oppgitt i Da.

Aminosyregruppe	Aminosyre	Forkortelse		Molekylvekt (Da)
Upolare alifatiske sidegrupper	Glycin	G	Gly	75
	Alanin	A	Ala	89
	Prolin	P	Pro	115
	Valin	V	Val	117
	Leucin	L	Leu	131
	Isoleucin	I	Ile	131
	Metionin	M	Met	149
Aromatiske sidegrupper	Fenylalanin	F	Phe	165
	Tyrosin	Y	Tyr	181
	Tryptofan	W	Trp	204
Polare uladde sidegrupper	Serin	S	Ser	105
	Treonin	T	Thr	119
	Cystein	C	Cys	121
	Asparagin	N	Asn	132
	Glutamin	Q	Gln	146
Positivt ladde sidegrupper	Lysin	K	Lys	146
	Histidin	H	His	155
	Arginin	R	Arg	174
Negativt ladde sidegrupper	Asparaginsyre	D	Asp	133
	Glutaminsyre	E	Glu	147

Informasjonen er hentet fra Nelson og Cox (2008).

Appendiks 2

Müller Hinton (MH) plater

Følgende oppskrift benyttes for å lage MH-plater:

21 gram	Müller Hinton	(Becton Dickinson, Frankrike)
20 g	Agar	(Sigma-Aldrich)
1000 ml	Milli-Q vann	(Millipore Corp., USA)

Løsningen ble homogenisert ved bruk av en magnetrører før den ble autoklavert. Mediet ble så overført til plater/petrisåler ved hjelp av en platemaskin som fordelte ca. 20 ml medium i hver skål. Platene fikk stå over natten i romtemperatur for å stivne, og ble deretter pakket inn i plateposert og oppbevart i på 4°C frem til brukstidspunktet.

Müller Hinton (MH) medium

Følgende oppskrift ble benyttet for tillaging av MH-medium:

21 g	Müller Hinton	(Becton Dickinson, Frankrike)
1000 ml	Milli-Q vann	(Millipore Corp., USA)

Løsningen ble homogenisert ved omrøring med hjelp av en magnet. Mediet ble deretter overført til kulturrør eller flasker for å gi henholdsvis kulturrør med 5 ml MH-medium og flasker med 50 eller 100 ml MH-medium. For tillaging av kulturrør med MH-medium ble 5 ml av løsningen pumpet over i rørene for å gi rett mengde. Korkene ble deretter satt på. For tillaging av flasker ble rett mengde målt opp og overført til flaskene og korkene ble satt på. Rørene og flaskene ble så autoklavert, og ble deretter oppbevart ved 4 °C frem til brukstidspunktet.

Luria Agar (LA) plater med ampicillin (100 µg/ml)

Følgende oppskrift ble benyttet for tillaging av LA-plater med ampicillin:

10 g	Pepton	(Merck KGaA, Darmstad, Tyskland)
5 g	Gjær ekstrakt	(Sigma-Aldrich)
10 g	NaCl	(Sigma-Aldrich)
1000 ml	Destillert vann	
1 ml	1 M NaOH	
15 g	Agar	(Sigma-Aldrich)
1 ml	Ampicillin	

Løsningen ble homogenisert ved omrøring med hjelp av en magnet før det ble autoklavert. Etter autoklaving ble løsningen satt tilbake på magnetrøring for å forhindre at løsningen stivnet. Et volum på 1 ml ampicillin ble deretter tilsatt per liter løsning når løsningen hadde nådd en passende temperatur (≤ 60 °C). Mediet ble deretter overført til petriskåler ved hjelp av platemaskinen som fordelte ca. 20 ml medium i hver skål. Platene fikk stå over natten i romtemperatur for å stivne, og ble deretter pakket inn i plateposert og oppbevart i på 4 °C frem til brukstidspunktet.

Luria broth (LB) medium

Følgende oppskrift ble benyttet for tillaging av LB-medium:

10 g	Pepton	(Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland)
5 g	Gjærekstrakt	(Sigma-Aldrich)
10 g	NaCl	(Sigma-Aldrich)
1000 ml	Destillert vann	
1 ml	1 M NaOH	

Løsningen ble homogenisert ved omrøring med hjelp av en magnet. Mediet ble deretter overført til kulturrør eller flasker for å gi henholdsvis kulturrør med 5 ml LB-medium og flasker med 50 eller 100 ml LB-medium. For tillaging av kulturrør med LB-medium ble 5 ml av løsningen pumpet over i rørene for å gi rett mengde. Korkene ble deretter satt på. For tillaging av flasker ble rett mengde målt opp og overført til flaskene og korkene ble satt på. Rørene og flaskene ble så autoklavert, og ble deretter oppbevart ved 4 °C frem til brukstidspunktet.

Tris-acetate-EDTA (TAE) Buffer

Følgende oppskrift ble benyttet for tillaging av en 50X TAE stamløsning:

242 g	Trizma base	(Sigma-Aldrich, USA)
57 ml	Eddiksyre	(Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland)
100 ml	0,5M EDTA (pH 8,0)	(EDTA (Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland), Milli-Q vann og NaOH pellets (Sigma-Aldrich))

For å kunne lage 10x TAE buffer må 0,5M EDTA (pH 8,0) først tillages. Deretter kan 50x TAE buffer lages ved å blande løsningen med materialene i tabellen. Løsningen tilsettes så 1000 ml milli-Q vann, og gir opphav til 50x TAE stamløsningen. Fra denne kan 1x TAE buffer lages ved å blande 50X TAE stamløsningen med milli-Q vann i et 1:4 forhold.

Appendiks 3

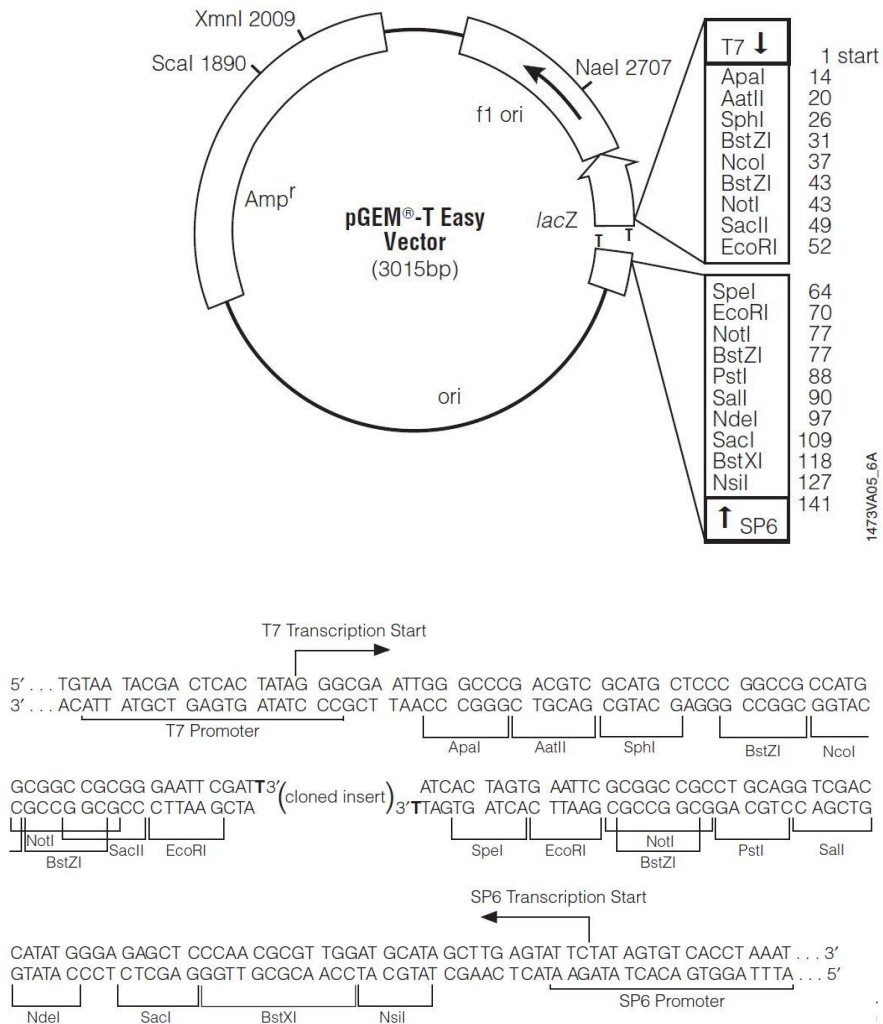
Forklaring av degenererte nukleotidkoder benyttet i oppgaven

Tabell II – Forklaring av degenererte nukleotidkoder benyttet i de degenererte primerene i oppgaven. Tabellen gir en oversikt over hvilke nukleotider hver av de degenererte nukleotidkodene tilsvarer.

Degenerert nukleotid kode	Nukleotider den degenererte nukleotidkoden tilsvarer
N	A/C/G/T
Y	C/T
M	A/C
R	A/G

Appendiks 4

Vektoren benyttet i ligeringsreaksjonene.



Figur I - pGEM-T Easy Vector fra Promega (Madison, USA) benyttet for kloning av PCR-produktene. Den øverste figuren viser vektorens «kart», mens den nederste figuren viser sekvensen til vektoren i området før og etter «insert»-området.

Appendiks 5

Prosentvis utbytte fra ekstrahering av materiale

Tabell III - Prosentvis utbytte fra ekstraheringen. Tabellen gir en oversikt over prosentvis gjenvunnet materiale i vannfasene, mellomfasene (fra vevene hvor det oppsto), de organiske fasene og de forskjellige SPE eluatene. Prosentene er basert på mengden startmateriale benyttet i løsemiddelekstraksjonen (60 % ACN + 0,1 % TFA).

Vev	Tørrvekt av vev	Organisk fase	Vannfase	Mellom-fase	10 % SPE	40 % SPE	80 % SPE
Hemocytter	100	2,27	36,36	-	0,23	3,64	0,18
Cellefri hemolymfe	100	1,24	96,61	-	0,10	0,04	0,02
Hemolymfe med celler	100	1,44	98,40	-	0,32	0,37	0,04
Kappe	100	1,84	25,20	-	0,94	0,56	0,15
				0,30	0,01 ^a	0,00 ^a	0,02 ^a
Gjeller	100	3,26	24,42	-	1,07	1,70	0,09
				4,03	0,19 ^a	0,12 ^a	0,05 ^a
Gonader	100	3,28	22,16	-	0,66	2,41	0,09
				1,55	0,09 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a
Fot	100	2,26	21,94	-	0,87	0,58	0,16
Munnalp	100	2,50	30,00	-	1,50	1,50	0,75
Byssustråder	100	1,64	13,70	-	0,11	0,07	0,01
Resterende materiale ^b	100	3,64	24,40	-	0,69	1,28	0,18

^a Mengde gjenvunnet material i SPE eluatene fra mellomfasen

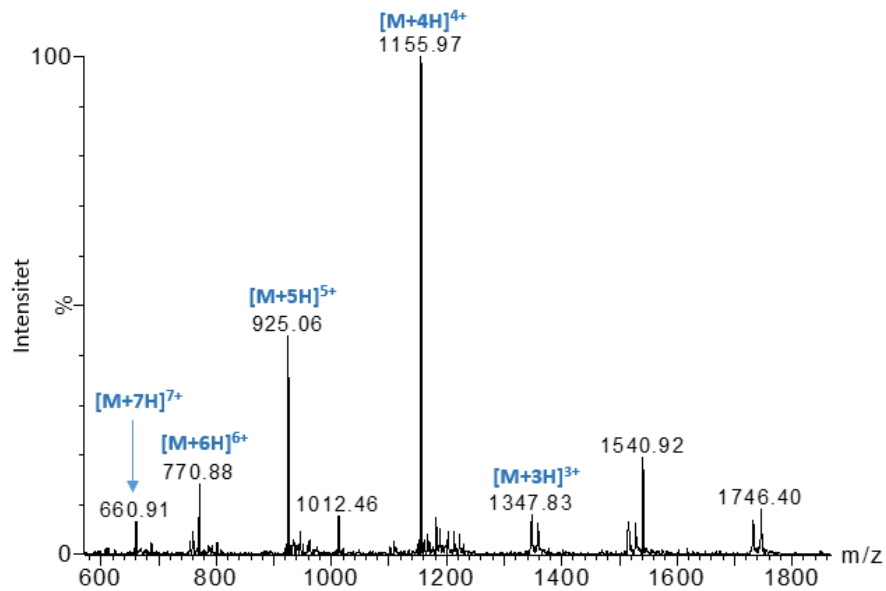
^b Skallet var ekskludert

- Ingen mellomfase oppsto ved væske-væske separasjon

Appendiks 6

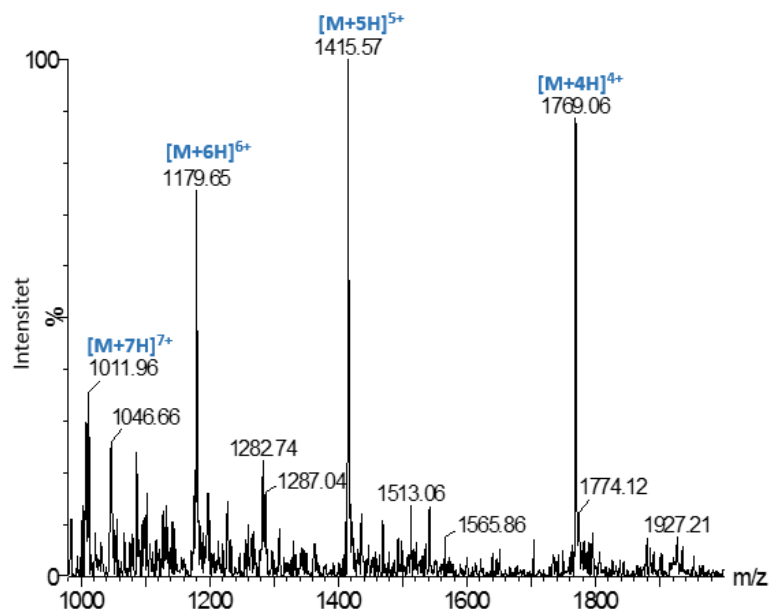
Detekterte peptider i aktive HPLC-fraksjoner

He40-f38



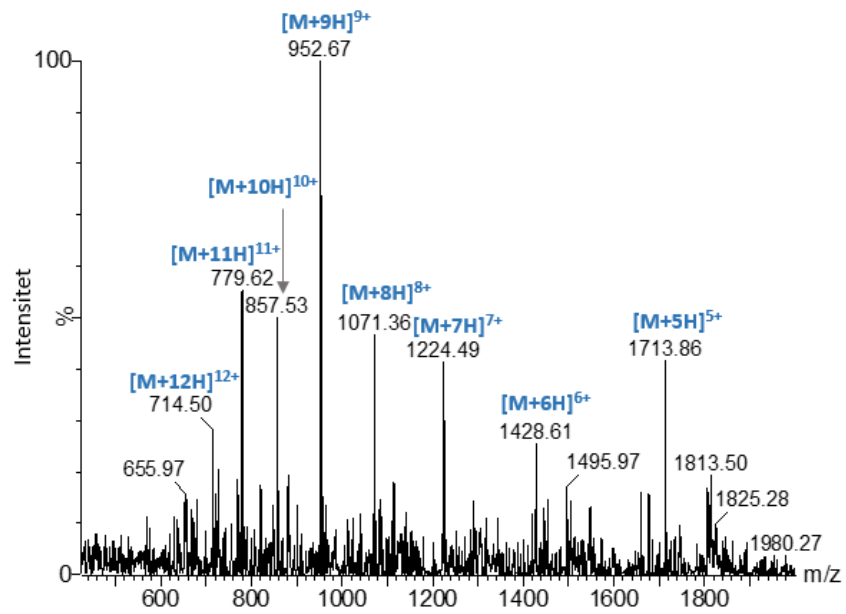
Figur II - ESI-MS-spekter fra fraksjon He40-f38. Figuren viser fem relaterte ioner samt deres sammensetning ($[M+nH]^{n+}$). Den gjennomsnittlige molekylvekten til komponenten ble kalkulert til å være 4619 Da.

He40-f43



Figur III - ESI-MS-spekter fra HPLC fraksjon He40-f43. Figuren viser fire relaterte ioner samt deres sammensetning ($[M+nH]^{n+}$). Den gjennomsnittlige molekylvekten til det detekterte peptidet ble kalkulert til å være 7073 Da.

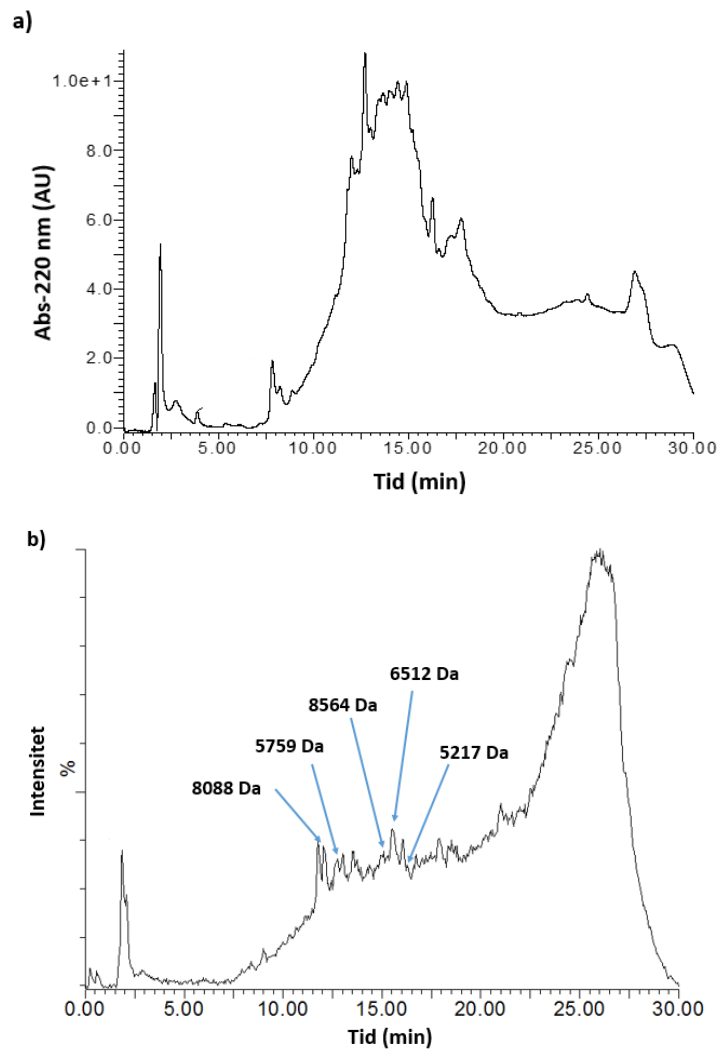
He40-f47



Figur IV - ESI-MS-spekter fra fraksjon He40-f47. Figuren viser åtte relaterte ioner samt deres sammensetning ($[M+nH]^{n+}$). Den gjennomsnittlige molekylvekten til det detekterte peptidet ble kalkulert til å være 8564 Da.

Appendiks 7

Peptider detektert i 40 % SPE eluatet fra kappen



Figur V - UV-Vis- og TIC-kromatogrammet fra HPLC-ESI-MS kjøringen av 40 % SPE eluatet fra kappen. a) UV-Vis-kromatogrammet viser graden av deteksjonen av komponenter som absorberer lys ved 220 nm. b) TIC-kromatogrammet viser til intensiteten av detekterte masser til enhver tid gjennom kjøringen. På figuren er fem peptider merket av på den toppen hvor de ble detektert i det tilhørende MS-spekteret (ikke vist). De detekterte komponentene hadde en molekylvekt i området mellom 5,2 til 8,5 Da.

Appendiks 8

Aminosyresammensetningen til de to modne peptidene OS-12_2 og OS-24_2

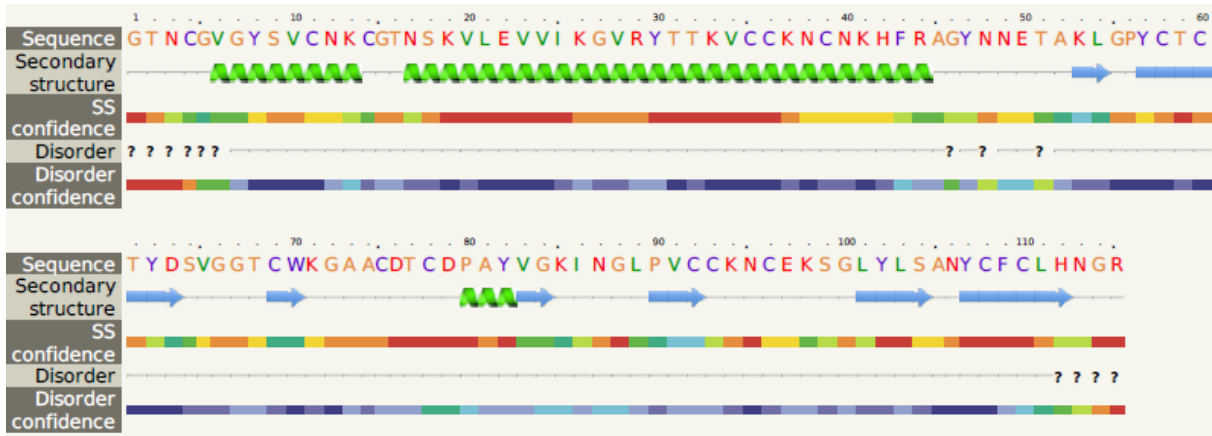
Tabell IV - Aminosyresammensetning for OS-12_2 og OS-24_2. Tabellen gir en oversikt over aminosyresammensetningen til de to modne peptidsekvensene til OS-12_2 og OS-24_2, og gir en oversikt over både antallet og prosent av hver aminosyre. Dataene i tabellen er gitt ved analyse i ProtParam verktøyet til ExpASy.

Aminosyre	OS-12_2		OS-24_2	
	Antall aminosyrer	Prosent av aminosyrer (%)	Antall aminosyrer	Prosent av aminosyren (%)
Alanin* (A)	6	5,2	5	6,2
Arginin (R)	3	2,6	7	8,6
Asparagin (N)	11	9,6	3	3,7
Asparaginsyre (D)	3	2,6	0	0,0
Cystein* (C)	16	13,9	12	14,8
Glutamin (Q)	0	0,0	3	3,7
Glutaminsyre (E)	3	2,6	0	0,0
Glycin (G)	14	12,2	10	12,3
Histidin (H)	2	1,7	0	0,0
Isoleucin* (I)	2	1,7	0	0,0
Leucin* (L)	6	5,2	3	3,7
Lysin (K)	11	9,6	6	7,4
Metionin* (M)	0	0,0	0	0,0
Fenylalanin* (F)	2	1,7	7	8,6
Prolin (P)	3	2,6	3	3,7
Serin (S)	5	4,3	10	12,3
Treonin (T)	9	7,8	4	4,9
Tryptofan* (W)	1	0,9	4	4,9
Tyrosin (Y)	8	7,0	3	3,7
Valin * (V)	10	8,7	1	1,2

* Hydrofobe aminosyrer: definert etter APD sin definisjon på hydrofobe aminosyrer (Wang, 2015). Antall/prosent av hydrofobe aminosyrer er beregnet manuelt fra verdiene i tabellen.

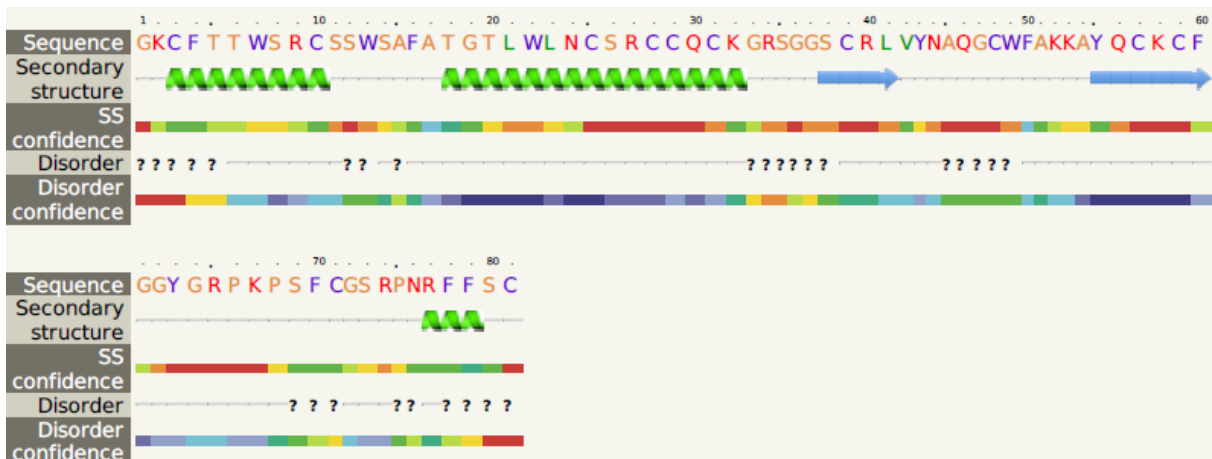
Appendiks 9

Strukturpredikasjon av OS-12_2 gjort av Phyre²

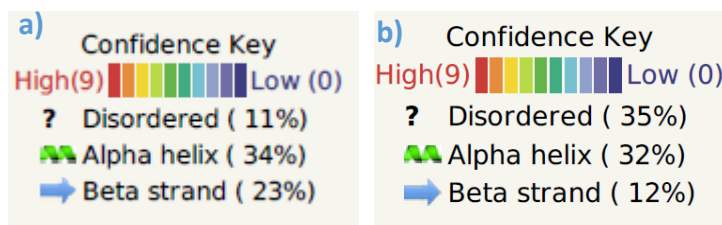


Figur VI - Strukturpredikasjon for OS-12_2. Figuren gir en oversikt over den predikerte sekundærstrukturen til OS-12_2 gjort av Phyre².

Strukturpredikasjon av OS-24_2 gjort av Phyre²



Figur VII - Strukturpredikasjon for OS-24_2. Figuren gir en oversikt over den predikerte sekundærstrukturen til OS-24_2 gjort av Phyre².



Figur VIII – Oversikt over prosentvis fordeling av sekundærstrukturer. a) Prosentvis fordeling mellom de forskjellige sekundærstrukturene i OS-12_2. b) Prosentvis fordeling mellom de forskjellige sekundærstrukturene i OS-24_2s struktur.