

**Antibakteriell aktivitet i vev fra *Paralithodes camtschatica*  
(kongekrabbe) og *Lithodes maja* (trollkrabbe)  
- en sammenligning av to ulike ekstraksjonsmetoder**

**Av Guro Kristine Edvinsen**



Mastegradsoppgave i fiskerifag (60 studiepoeng)  
Studieretning marine næringsmidler

Institutt for marin bioteknologi  
Norges fiskerihøgskole  
Universitetet i Tromsø  
Mai 2008



## **Forord**

Denne masteroppgaven i fiskerifag ble utført ved institutt for marin bioteknologi (IMAB) ved Norges fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø, høsten 2006 og våren 2008. Veileder har vært førsteamanuensis Tor Haug og biveileder Klara Stensvåg.

Jeg vil først takke Tor Haug som har stilt opp og hjulpet med små og store ting underveis, både på laben og med oppgaveskrivingen. Han har vært svært tålmodig og tar seg alltid tid til å hjelpe. Også en stor takk til biveileder Klara Stensvåg for hjelp under skriveprosessen og for veiledning i en tidligere semesteroppgave, som vekket min nysgjerrighet angående bioprospektering. Jeg ønsker også å takke de andre på ”Bioprospekteringsgruppa”, spesielt Victoria Paulsen og Margey Tadesse som har hjulpet meg underveis.

Må også få takke min flotte familie som alltid stiller opp for meg. Spesielt min tålmodige mann Einar som har støttet og oppmuntret meg gjennom masteroppgaven og min lille sønn William, som virkelig har gitt meg et annet perspektiv på ting og litt annet å tenke på enn skolearbeid.

Tromsø, mai 2008

Guro Kristine Edvinsen



## Sammendrag

Forskjellige vev fra to krepsdyrarter, *Paralithodes camtschatica* og *Lithodes maja*, ble testet for antibakteriell aktivitet. Frysetørkede prøver ble ekstrahert med to forskjellige ekstraksjonsmetoder, løsemiddelekstraksjon (60 % Acetonitril + 0,1 % Trifluoreddiksyre) og syreekstraksjon (20 % eddiksyre) og videre ekstrahert og konsentrert ved fast fase ekstraksjon (SPE). Proteinkonsentrasjonen i prøvene ble målt og prøvene ble testet for antibakteriell aktivitet. Antibakteriell aktivitet mot *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Corynebacterium glutamicum* og *Staphylococcus aureus* ble funnet i ekstrakter fra flere vev. Det ble funnet høyest antibakteriell aktivitet i ekstrakter fra celler (hemocytter) ved begge ekstraksjonsmetoder og fra begge arter. Det ble også funnet høy antibakteriell aktivitet i ekstrakter fra gjeller. *E. coli* var generelt den minst sensitive mikroorganismen mens *C. glutamicum* var den mest sensitive. Proteinmålingene viste en korrelasjon mellom proteininnhold og antibakteriell aktivitet. Det var høy proteinkonsentrasjon i prøver med høy antibakteriell aktivitet.

## Abstract

Different tissues from two crustacean species, *Paralithodes camtschatica* and *Lithodes maja* were tested for antibacterial activity. Dried samples were extracted with two different extraction methods, solvent extraction (60 % acetonitrile containing 0,1 % trifluoroacetic acid) and acid extraction (20 % acetic acid) and further extracted and concentrated with solid phase extraction (SPE). The protein concentrations of the samples were measured and the samples were tested for antibacterial activity. Antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Vibrio anguillarum*, *Corynebacterium glutamicum* and *Staphylococcus aureus* was detected in extracts from several tissues. The highest antibacterial activity was detected in extracts from cells (haemocytes) with both extraction methods and from both species. It was also detected high antibacterial activity in extracts from gills. *E. coli* was the least sensitive micro-organism, while *C. glutamicum* was the most sensitive. The protein measurements showed a correlation between protein concentration and antibacterial activity. High antibacterial activity was detected in samples with high protein content.



# Innholdsfortegnelse

<b>INNHALDSFORTEGNELSE .....</b>	<b>1</b>
<b>1 INNLEDNING.....</b>	<b>2</b>
1.1 Bakgrunn .....	2
1.2 Antimikrobielle peptider.....	3
1.3 Antimikrobielle forbindelser fra marine invertebrater .....	6
1.4 Metodevalg for karakterisering av nye antibakterielle stoffer.....	10
1.5 Problemstilling og mål for oppgaven .....	11
<b>2 MATERIALER OG METODER .....</b>	<b>12</b>
2.1 Reagenser og kjemikalier .....	12
2.2 Eksperimentelle dyr og prøvetaking .....	12
2.3 Ekstraksjon og separasjon av antibakterielle faktorer .....	13
2.4 Fast fase ekstraksjon .....	14
2.5 Proteinmålinger.....	15
2.6 Dyrking av bakterier og antibakteriell testing.....	15
<b>3 RESULTATER.....</b>	<b>18</b>
3.1 Prøveutbytte i SPE eluater .....	18
3.2 Proteininnhold.....	20
3.3 Antibakteriell aktivitet .....	22
<b>DISKUSJON.....</b>	<b>26</b>
Konklusjon.....	29
<b>REFERANSER.....</b>	<b>30</b>

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Den store bruken av antibiotika over lengre tid har resultert i multiresistente bakteriestammer over hele verden og dette har blitt et alvorlig medisinsk problem (Marshall et al. 2003). Stadig flere bakteriestammer utvikler resistens mot konvensjonelle antibiotika. For eksempel er det estimert at halvparten av alle stammer av *Staphylococcus aureus* som er funnet på mange medisinske institusjoner, er resistente mot antibiotika som methicillin (Roder et al. 1999). Klassiske antibiotikum hemmer som regel biokjemiske reaksjoner som er helt nødvendige for bakteriens overlevelse eller celledeling. For å unngå virkningen av antibiotika, kan bakteriene mutere. Som regel er det tilstrekkelig med mutasjon av kun ett gen for å oppnå resistens. Dermed kan resistens oppstå kort tid etter at et nytt antibiotikum er tatt i bruk (Roch 2004). Det jobbes derfor stadig med å utvikle nye typer antibiotika med nye virkningsmekanismer (Tincu et al. 2004).

Naturlig forekommende antimikrobielle peptider blir ofte kalt ”naturlige antibiotika” på grunn av at de er aktive mot et bredt spekter av mikroorganismer. De har svært selektiv giftighet samt at det er vanskelig for bakterier å utvikle resistens mot disse peptidene (Tincu et al. 2004). For å unngå de fysiske virkningsmekanismene til antimikrobielle peptider, må nemlig bakterier reorganisere membranen. Dette involverer å mutere ca. 100 gener, noe som er svært komplisert (Roch 2004). Antimikrobielle peptider har dessuten som oftest en svært rask virkning og vil angripe bakteriene før de har mulighet til å utvikle resistens (Battison et al.). I kliniske fase I og fase II forsøk som er utført har antimikrobielle peptider som er blitt testet vist en begrenset resistens for de bakteriestammer som er testet (Zasloff 2002).

Det marine miljø er en enorm kilde for biodiversitet. Havet dekker 71 % av jordoverflaten og inneholder rundt halvparten av den totale globale biodiversiteten. Det marine miljø kan derfor bli en enorm ressurs for utviklingen av nye antimikrobielle forbindelser (Tincu et al. 2004). Marine invertebrater innbefatter mer enn 96 % av de hittil kjente dyreartene og inkluderer en enorm diversitet av organismer, som spenner fra encellede protozoer til de mer komplekse pigghuder og protokordater (Haug 2004).



## 1.2 Antimikrobielle peptider

Antimikrobielle peptider er blant de viktigste komponentene i det medfødte immunforsvaret. De er utbredt i store deler av naturen og finnes i insekter, planter, pattedyr, vertebrater og invertebrater (Brown et al. 2006). De er å finne i de fleste vev, spesielt i sekret på epiteloverflater og i høye konsentrasjoner i hvite blodceller og hemocytter (Battison et al. 2008).

### *Egenskaper til antimikrobielle peptider*

Antimikrobielle peptider er definert som molekyler som vanligvis er mindre enn 10 kDa, som har antimikrobielle egenskaper og som raskt angriper invaderende mikroorganismer (Tincu et al. 2004). Mange antimikrobielle peptider er aktive mot et flertall bakterier og/eller aktive mot sopp, kapslede virus, protozoer og noen kreftceller (Patrzykat et al. 2003). De beste antimikrobielle peptidene dreper følsomme bakterier *in vitro* med konsentrasjoner ned til 0,25 til 4 µg/ml (Hancock et al. 1998). Noen peptider har også god aktivitet mot meget resistente bakterier, som multiresistente *Pseudomonas aeruginosa*, meticillin-resistente *Staphylococcus aureus* og *Stenotrophomonas maltophilia*. Det er for eksempel vist at noen antimikrobielle peptider er like aktive mot meticillin-resistente *S. aureus* som de er mot meticillin-sensitive stammer (Hancock 2001). De fleste antimikrobielle peptider har en amfipatisk struktur (en hydrofil og en hydrofob del) som forenkler deres egenskap til å feste seg til, destabilisere og/eller penetrere den cytoplasmiske membranen til mikroorganismer (Stensvåg et al. 2008). De fleste antimikrobielle peptider er også kationiske, det vil si at de har en netto positiv ladning ved fysiologisk pH. Dette på grunn av at de har et høyere innhold av aminosyrene arginin og lysin (positivt ladde) enn aminosyrene aspartamsyre og glutaminsyre (negativt ladde) (Bulet et al. 2004).

Peptidene kan variere i størrelse, struktur og aktivitet, men de fleste har en størrelse på mellom 12 og 50 aminosyrer og med cirka 50 % hydrofobiske aminosyrer (Brown et al. 2006). Størstedelen av disse peptidene blir syntetisert som prepro-peptider bestående av en N-terminal signalsekvens, et pro-segment og et C-terminal kationisk peptid som utviser antimikrobiell aktivitet etter at det er splittet fra resten av proteinet (Reddy et al. 2004). Cirka 900 eukaryote antimikrobielle peptider er karakterisert i dag (Stensvåg et al. 2008), og majoriteten av disse kommer fra pattedyr, insekter og amfibier (Smith et al. 2008). Generelt blir den antimikrobielle aktiviteten til peptidene bestemt ved å måle minimums

hemningskonsentrasjon (MIC), som er den laveste konsentrasjonen av stoffet som reduserer vekst av mikroorganismer med mer enn 50 %.

Strukturmessig kan de antimikrobielle peptidene grovt deles inn i tre hovedgrupper (se tabell 1):

- Lineære  $\alpha$ -heliks peptider uten cystein
- Lineære peptider med en utvidet struktur, karakterisert med et høyt innhold av én eller flere aminosyrer (som oftest prolin, tryptofan eller histidin).
- Peptider med disulfidbindinger, som gir  $\beta$ -flak eller en løkkestruktur (Hancock et al. 1998)

**Tabell 1 Antimikrobielle peptider, struktur og distribusjon (Haug 2004)**

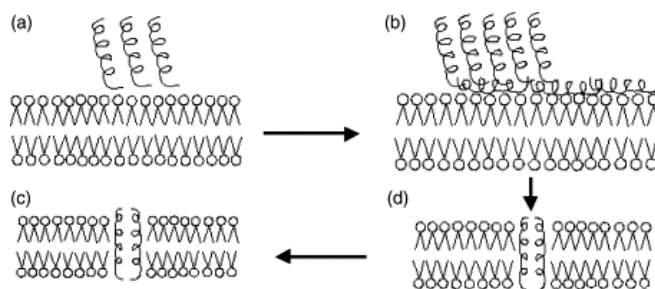
Gruppe	Struktur	Peptid	Kilde
1	Lineær, $\alpha$ -heliks	Maganin 2	Froskeskinn
		Clavanin A	Kappedyr, hemocytter
	Lineær, 2 $\alpha$ -heliks	Cecropin A	Insekt, hemolymfe
2	Lineær med overrepresentasjon én eller flere aminosyrer	Bactenecin 7 (Pro-rik)	Okse, neutrofiler
		Holotricin 3 (Gly-rik)	Insekt, hemolymfe
		Histatin 1 (His-rik)	Primatspytt
		Indolicidin (Trp-rik)	Okse, neutrofiler
3	1-disulfid, syklisk	Bactenecin	Okse, neutrofiler
		Ranalexin	Froskeskinn
	2-disulfid $\beta$ -sheet	Protegrin 1	Grise, leukocytter
		Tachyplesin 1	Hesteskokrabe, hemocytter
	3-disulfid $\beta$ -sheet	HNP-1 ( $\alpha$ -defensin)	Menneske, neutrofiler
		HBD-2 ( $\beta$ -defensin)	Menneskeepitel
	3-disulfid $\beta$ -sheet + $\alpha$ -heliks	Phormecin (Insekt-defensin)	Insekt, hemolymfe
	3-disulfid $\beta$ -sheet + 2 $\alpha$ -helikser	Thionin ( $\gamma$ -thionin)	Plante
	4-disulfid $\beta$ -sheet + $\alpha$ -heliks	AFP-1 (Plante-defensin)	Plante
		MGD-1	Mollusk, hemolymfe
3-disulfid syklisk	RTD-1 ( $\theta$ -defensin)	Primat, leukocytter	

### *Antibakterielle virkningsmekanismer*

Den eksakte virkemåten til antimikrobielle peptider er omdiskutert. Man tror at den amfipatiske strukturelle ordningen til peptidene innehar en viktig rolle i virkningsmekanismene som bryter ned cellemembranen (Reddy et al. 2004). Da de fleste

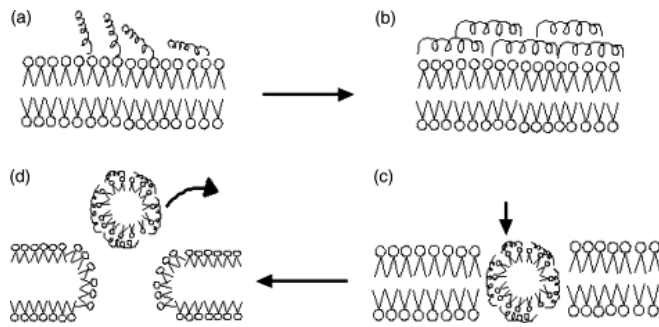
antimikrobielle peptider er positivt ladde, tenker en seg at peptidene har den egenskapen at de binder seg elektrostatiske til negativt ladde strukturer i overflaten hos bakteriene. Hos Gram-negative bakterier er den negative komponenten lipopolysakkarider i ytre cellevegg. Hos Grampositive bakterier er det diskutert om denne initiale bindingen finner sted mellom peptid og teikonsyre og/eller lipoteikonsyre i peptidoglykanlaget (Vorland 2001).

Det finnes flere modeller som beskriver virkningsmekanismene til antimikrobielle peptider. To av disse modellene kalles **tønnestavmodellen** og **teppemodellen**. I tønnestavmodellen (se figur 1) plasserer lineære  $\alpha$ -heliks peptider seg parallelt med membranens plan med den hydrofobe siden av heliksen mot membranen. Flere peptidmonomerer samler seg på overflaten av membranen før peptidene trenger inn til den hydrofobe lipidkjernen til cellemembranen. De lager dermed en kanal gjennom cellemembranen. De hydrofile sidene av heliksene vender inn mot kanalen mens de hydrofobe sidene vender ut mot cellemembranen og lipidene som omgir kanalen. Kanalens størrelse øker ettersom flere peptider kommer til. Formasjon av kanaler kan føre til at cytoplasmaets bestanddeler lekker ut og cellen dør (Birkemo 2004).



**Figur 1.** Tønnestavmodellen. Peptidmonomerene i en  $\alpha$ -heliks konfirmasjon binder seg til membranen (a). Flere peptidmolekyler binder seg til cellemembranen (b). Deretter trenger peptidheliksene seg inn til den hydrofobe kjernen til membranen og lager en kanal (c). Progressiv rekruttering av flere peptider øker kanalens størrelse som fører til at cytoplasma materiale lekker ut (d) og dermed vil cellen dø (Reddy et al. 2004).

I teppemodellen (figur 2) binder kationiske peptider seg til fosfolipidene i membranen og dekker den som et teppe. Peptidene organiseres så på overflaten slik at den hydrofile delen er orientert mot fosfolipidene. Deretter roterer de slik at den hydrofobe delen er orientert i retning av den hydrofobe membranen. Dette fører til nedbrytning av cellemembranens integritet (Yang 2003).



**Figur 2.** Teppemodellen. Peptidmonomerene binder seg til fosfolipidene i membranen (a), Peptidmonomerene justeres så på overflaten slik at den hydrofile delen er orientert mot fosfolipidene (b). Deretter reorienterer peptidene seg slik at de vender mot den hydrofobe cellemembranen (c). Dette fører til nedbrytning av membranen (d) (Reddy et al. 2004).

Disse modellene og andre modeller fastslår at antimikrobielle peptider virker på bakteriemembraner og danner porer/kanaler eller aggregerer på membranoverflaten og forårsaker permeabilitet og tap av membranintegritet. Dette fører til enten cellelysering direkte eller det nedsetter membranens barrierefunksjon, noe som framskynder celledød (Haug 2004).

Membranen hos eukaryote celler består i hovedsak av lipider som ikke har noen nettoladning. Dermed vil ikke de kationiske antimikrobielle peptidene binde seg til eukaryote cellemembraner (Patrzykat et al. 2003). Dette vil si at de ikke vil være toksiske for menneskeceller. Dessuten har et stort antall studier vist at noen av de kationiske antimikrobielle peptidene, som er giftige for bakterier men ikke normale pattedyrceller, har et bredt spekter av cytotoxisk aktivitet mot kreftceller (Hoskin et al. 2008).

Kationiske antimikrobielle peptider representerer en av de mest originale anti-infeksiøse molekylene som er oppdaget i løpet av de siste 25 årene. De innehar mange av de ønskede egenskaper for et nytt antibiotikum: aktivitet mot både Gram-negative og Gram-positive bakterier, dreper bakterier raskt, er upåvirket av klassiske antibiotikas mutasjonsresistens, velger ikke lett resistente varianter, kan ha synergieffekt med klassiske antibiotikum og andre medfødte immunforsvarsprosesser og nøytraliserer endotoksiner (Roch 2004).

### 1.3 Antimikrobielle forbindelser fra marine invertebrater

Marine invertebrater mangler det adaptive immunforsvaret og er dermed helt avhengige av det medfødte immunforsvaret for å bekjempe patogene mikrober. Deres forsvar mot infeksjoner baserer seg hovedsakelig på fagocytose og destruksjon av patogene organismer

ved bruk av flere forskjellige kjemiske mekanismer, inkludert antimikrobielle peptider (Roch 2004). I havet kan det være opp mot  $10^6$  bakterier/ml og  $10^9$  virus/ml sjøvann. For at marine invertebrater skal overleve i dette miljøet må deres medfødte immunforsvar være både effektivt og robust (Tincu et al. 2004). Det er blitt isolert antimikrobielle peptider fra flere marine invertebrater. Antimikrobielle peptider er spesielt utbredt i organer som tarm og respirasjonsorganer, som er spesielt utsatt for angrep av patogene mikroorganismer (Tincu et al. 2004). Svamper (*Porifera*) og nesledyr (*Cnidaria*) har vært de rekkene innen marine invertebrater som hittil har vært de rikeste kildene til bioaktive forbindelser, inkludert antibakterielle forbindelser. Det er på grunn av den høye forekomsten av cytotoxiske egenskaper at disse er så interessante og ikke så mye på grunn av forekomst av antimikrobielle forbindelser. Cytotoxiske egenskaper tyder nemlig på potensielle antitumorforbindelser (Haug 2004). I tillegg til svamper og nesledyr er det fra rekkene *Echinodermata*, *Arthropoda* og *Mollusca* i hovedsak funnet nye antimikrobielle komponenter fra det marine miljø (Haug 2004). Leddyr (*Arthropoda*) er en enorm dyregruppe hvor antall beskrevne arter nærmer seg én million. Likevel er det ikke gjort så mye undersøkelser for å finne antimikrobielle forbindelser i leddyr. Blant leddyrene er det krepsdyr (*Crustacea*) som er den dominerende dyregruppa i havet. Antimikrobielle peptider fra krepsdyr ble først isolert i 1995. Det første av disse peptidene som ble rensset og karakterisert, ble isolert fra hemocytene til strandkrabben *Carcinus maenas* (Brockton et al. 2007) Dette peptidet går under gruppen peptider kalt crustiner og er sammen med en gruppe peptider kalt penaeidiner, de to dominerende gruppene antimikrobielle peptider fra krepsdyr (Stensvåg et al. 2008). Crustiner er ca. 7-14 kDa, cysteinrike og forekommer vidspredt i dekapoder (Smith et al. 2008). Penaeidiner er kationiske antimikrobielle peptider på 5-7 kDa, karakterisert ved en prolinrik aminoterminal domene og en cysteinrik carboxyl terminus domene (Gueguen et al. 2006; Smith et al. 2008). Penaeidiner ble først påvist i rekearten *Litopenaeus vannamei* og har siden blitt karakterisert fra en rekke rekearter (Bachere et al. 2004).

Krepsdyr har et åpent sirkulasjonssystem (hemolymfe) som både brukes for blodcellesirkulasjon og nærings- og hormondistribusjon gjennom kroppen. Dette vil si at hemocytene ikke er innskrenket av blodårer, men de sirkulerer fritt gjennom vev og gjennom dyrets indre organer. Hemocytene er ikke bare involvert i forsvarsreaksjoner, de kan ta del i utbedring av skader og reparering av skall, næringstransport, fordøyelse og utskillellesprosesser (Bachere et al. 2004). Det har i flere undersøkelser vist seg at hemocytene kan inneholde mye antimikrobielle peptider. Fra krabben *Hyas araneus* har

Stensvåg et al. (2008) isolert og karakterisert et antimikrobielt peptid med 37 aminosyrer, som er navngitt arasin-1. Den høyeste andelen arasin ble funnet i hemocytterne (Stensvåg et al. 2008). Også hos skorpioner (Bulet et al. 2004), reker (Bachere et al. 2004), hummer (Battison et al.) og flere andre krabbearter (Haug et al. 2002; Brockton et al. 2007) er det funnet store mengder antimikrobielle peptider i hemocytterne.

#### Kort om *Paralithodes camtschatica* (Kongekrabbe)



**Figur 3** *Paralithodes camtschatica* (kopiert fra [http://www.imr.no/visste\\_du/arter/kongekrabbe](http://www.imr.no/visste_du/arter/kongekrabbe) 20.05.08)

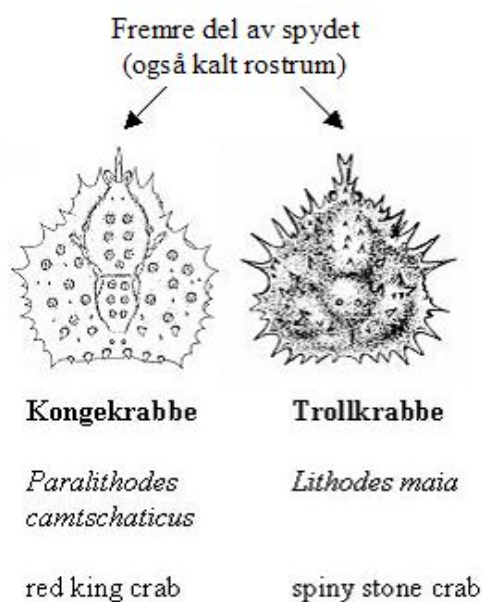
*P. camtschatica* tilhører klassen krepsdyr (*Crustacea*) og ordenen tifotkreps (*Decapoda*). I Europa ble arten opprinnelig satt ut ved Kolahalvøya (1961-69). Den har i løpet av 90-tallet bredt seg vestover til Finnmark og delvis Troms. Arten kan ha en benvidde på opptil 1,8 meter og en vekt på mer en 7 kilo. I dens naturlige leveområder har man funnet indivier på opptil 10 kg og en ryggskjoldlengde på ca. 22 cm. Som alle tifotkreps har *P. camtschatica* fem par gangføtter, men det femte beinparet er redusert og ligger skjult under bakre del av ryggskjoldet. Det fremste beinparet er modifisert til store klør. Ryggskjoldet og beina er utstyrt med regelmessige pigger, som er ganske lange og spisse på unge individer, men mindre utpreget på voksne krabber. Kjønnene kan skilles på formen og størrelsen på bakkroppen. Egg- og sædlederne ender i kjønnsåpninger ved henholdsvis tredje og femte beinpar

## Kort om *Lithodes maja* (trollkrabbe)



**Figur 4** *Lithodes maja* (kopierte fra [http://www.bioresurs.uu.se/myller/hav/havfaktaarter\\_copy.htm](http://www.bioresurs.uu.se/myller/hav/havfaktaarter_copy.htm) 20.05.08)

*L. maja* tilhører også klassen Crustacea og ordenen Decapoda. Den har en utbredelse fra den engelske kanal og nordover til Grønland. Den er funnet langs hele norskekysten. Kroppen er brun eller oransje og er dekket av forholdsvis lange spisse pigger. Også *L. maja* har fem par gangføtter, hvor det femte beinparet er redusert og ligger skjult under bakre del av ryggskjoldet og det fremste beinparet er modifisert til store klør. Store individer av denne arten kan forveksles med små individer fra *P. camtschatica* (Moen et al. 2003). For å skille de to artene kan man se på spydet foran på ryggskjoldet. Hos *P. camtschatica* består den fremre delen av spydet av en enkelt spiss, mens det hos *L. maja* er todelt og gaffelformet (Havforskningsinstituttet 2007) (se figur 5).



**Figur 5** Illustrasjon av skallet til *Paralithodes camtschatica*, til venstre, og *Lithodes maja*, til høyre (Kopiert fra [http://www.imr.no/visste\\_du/arter/kongekrabbe](http://www.imr.no/visste_du/arter/kongekrabbe) 20.05.08)

## 1.4 Metodevalg for karakterisering av nye antibakterielle stoffer

### Løsemiddel- og syreekstraksjon

Acetonitril (ACN) er et løsemiddel som ofte brukes til ”grovekstraksjon” av biologisk materiale. Løsemiddelekstraksjon ved bruk av 60 % ACN og 0,1 % Trifluoreddiksyre (TFA) har i flere tilfeller blitt benyttet for å isolere antibakterielle komponenter. Dette inkluderer krepsdyr (Haug et al. 2002; Stensvåg et al. 2008), vev fra musling (Haug et al. 2004)

Syreekstraksjon har også i flere tilfeller blitt brukt til å isolere antibakterielle komponenter. Dette inkluderer hummerarten *Homarus americanus* (Battison et al. 2008), muslingarten *Mytilus edulis* (Mercado et al. 2005) og rekearten *Penaeus vannamei* (Destoumieux et al. 1997).

### Fast fase ekstraksjon (SPE Solid-phase extraction)

Fast fase ekstraksjon er en ekstraksjonsmetode som blir brukt for å fjerne faste eller uopløselige forbindelser fra prøver. Metoden brukes for å konsentrere og rense prøver før analyse med konvensjonelle metoder. Fast fase ekstraksjon kan brukes for å isolere analyter fra en rekke prøver, som blod, urin, vannprøver, drikkevarer, jordprøver og vevsprøver fra dyr



(Sigma-Aldrich 1998). Den har blitt rapportert å ha fordeler over andre ekstraksjonsmetoder på grunn av hastigheten, reproduserbarheten og effektiviteten (Kamysz et al. 2004)

### *Proteinkonsentrasjonsmålinger*

Det finnes flere metoder for å bestemme proteininnhold i prøver. En av dem mest brukte metodene er en BCA-test (Krieg et al. 2005). Metoden baseres på det faktum at kobber-ionet  $\text{Cu}^{2+}$  blir redusert til  $\text{Cu}^+$  av proteiner i en basisk løsning. BCA (bicinchoninic acid) binder seg til reduserte kobber-ioner og da vil sammensetning skifte farge. Jo høyere proteinkonsentrasjon, jo sterkere farge. Absorbansen til løsningen blir målt og proteinkonsentrasjonen blir bestemt ved hjelp av en standardkurve. Standardkurven blir laget av proteinmålinger av forskjellige konsentrasjoner av et kjent protein, bovin serum albumin (BSA). Denne metoden kan brukes til å måle proteinkonsentrasjoner på mellom 20  $\mu\text{g/ml}$  til 2000  $\mu\text{g/ml}$  (Pierce Biotechnology 2003).

## **1.5 Problemstilling og mål for oppgaven**

Det har tidligere blitt påvist antibakteriell aktivitet i vev fra *P. camtschatica* (Haug et al. 2002). Fra den beslektede krabbearten *Lithodes maja* er det ikke gjort noen undersøkelser av en slik karakter. Det er også i tidligere forsøk blitt benyttet ulike ekstraksjonsmetoder for ekstraksjon av antibakterielle faktorer, men det er lite data på sammenligninger av ulike metoder. Hensikten med denne oppgaven er tredelt og kan defineres som:

- å påvise og sammenligne antibakteriell aktivitet i celler/vev fra *Paralithodes camtschatica* og *Lithodes maja*.
- Å sammenligne to ulike ekstraksjonsmetoder
- Å undersøke om det er korrelasjon mellom antibakteriell aktivitet og proteinkonsentrasjon i prøvene.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Reagenser og kjemikalier

- Acetonitril (HPLC-grade; SDS, Peypin, Frankrike)
- Trifluoreddiksyre (Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits)
- Eddiksyre (
- Mueller-Hinton medium (Difco Laboratories, Detroit, USA)
- MilliQ-vann (Millipore Corp., USA)

### 2.2 Eksperimentelle dyr og prøvetaking

Levende organismer av *L. maja* ble fanget på kysten av Troms høsten 2006 og oppbevart i tanker med sirkulerende sjøvann. Organismene (9 individer, gjennomsnittsvikt 601 g) ble avlivet ved å tappe dem fullstendig for hemolymfe (utblødning). Organismene ble veid og målt. Hemolymfen ble så trukket ut ved bruk av en sprøyte stukket inn i den myke membranen som befinner seg ved basis der klør og ben er festet. Gjeller ble deretter dissekert ut. Hemolymfen ble sentrifugert ved 800 x g ved 4 °C i 20 minutter for å separere hemocytter (celler) fra plasma (cellefri plasma). I enkelte tilfeller koagulerte hemolymfen direkte ved prøvetaking, noe som vanskeliggjorde celleseparasjon. Det ble derfor opparbeidet fire forskjellige prøver:

- Gjeller
- Hemolymfe med celler
- Hemolymfe uten celler
- Celler

Vevene ble overført til glasskolber og veid. De ble så frosset ned (-86 °C) over natten og deretter tørket i frysetørker. Prøvene ble veid etter tørking (se tabell 2).

Det ble utlevert ferdig frysetørkede prøver fra *P. camtschatica*. Levende organismer hadde blitt fanget på Finnmarkskysten våren 2006 og de ulike vevsprøvene var blitt opparbeidet på samme måte som hos *L. maja*. Tabell 3 viser mengden frysetørket materiale.

**Tabell 2 Mengde frysetørket materiale fra *P. camtschatica***

Vev	Løsemiddelekstraksjon	Syreekstraksjon
	Tørrvekt (g)	Tørrvekt (g)
Celler	14,28	15,06
Hemolymfe u/celler	20,10	15,95
Hemolymfe m/celler	9,61	9,36
Gjeller	10,54	9,61

**Tabell 3 Mengde prøve *L. maja***

Vev	Løsemiddelekstraksjon	Syreekstraksjon
	Tørrvekt (g)	Tørrvekt (g)
Celler	0,706	*
Hemolymfe u/celler	1,31	2,03
Hemolymfe m/celler	1,64	1,39
Gjeller	5,11	4,74

\*For lite materiale til å utføre begge ekstraksjonsmetodene, derfor ble kun løsemiddelekstraksjon utført på denne prøven.

### 2.3 Ekstraksjon og separasjon av antibakterielle faktorer

Prøvene ble ekstrahert ved bruk av to ulike ekstraksjonsmetoder: løsemiddelekstraksjon (væske/væske-ekstraksjon) og syreekstraksjon.

#### *Løsemiddelekstraksjon*

X gram vev (se tabell 2 og 3) ble ekstrahert med 10 volum (v/w tørrvekt) 60 % Acetonitril + 0,1 % Trifluoreddiksyre over 24 timer ved +4 °C på omrøring. Løsningene som inneholdt celle/vev rester, ble så sentrifugert (5 minutter, 3000 rpm) og supernatant pipettert av. Nye 10 volum 60 % ACN + 0,1 % TFA ble tilsatt det resterende materialet og dette ble ekstrahert over nye 24 timer ved + 4 °C på omrøring. Supernatant ble pipettert av og blandet med supernatanten fra første 24 timers ekstraksjon. Det ble da dannet to faser i supernatanten, en organisk ACN-rik fase på toppen og en vannfase under med høyt innhold av salt.

Supernatanten ble satt på fryserom (- 20 °C) i 1-2 timer og de to fasene ble skilt ved pipettering. Fasene ble så dampet inn i vakuumsentrifuge (Maxi Dry Lyo, Heto Lab., Danmark). De inndampede prøvene ble veid og løst i destillert vann til en konsentrasjon på 100 mg/ml.

#### *Syreekstraksjon*

X gram vev (se tabell 1 og 2) ble ekstrahert med 10 volum (v/w tørrvekt) 20 % Eddiksyre over 24 timer ved + 4 °C på omrøring. Løsningene som inneholdt celle/vev rester, ble så sentrifugert (5 minutter, 3000 rpm) og supernatant pipettert av. Nye 10 volum 20 % Eddiksyre ble tilsatt det resterende materialet og dette ble ekstrahert over nye 24 timer ved + 4 °C på omrøring. Supernatant ble pipettert av og blandet med supernatanten fra første 24 timers ekstraksjon. Prøvene ble så dampet inn i vakuumsentrifuge (Maxi Dry Lyo, Heto Lab., Danmark). De inndampede prøvene ble veid og løst i destillert vann til en konsentrasjon på 100 mg/ml.

## **2.4 Fast fase ekstraksjon**

For å skille ut salt fra vannfasene og prøvene ekstrahert med syre ble prøvene ekstrahert ved bruk av fast fase ekstraksjon (solid phase extraction (SPE)). Det ble brukt 35 cc Sep-Pak C-18 SPE-kolonner (5 eller 10 g kolonnemateriale) (Water Associates, MA, USA). Først ble kolonnene ekvilibrert med 30 ml ACN og deretter med 30 ml 0,05 % TFA. Prøvematerialet ble satt på og materiale so ikke ble bundet til kolonnematerialet gikk rett gjennom kolonna. Kolonnene ble så vasket med 50 ml 0,05 % TFA. Retardert materiale ble så eluert stegvis ut med å tilføre en stadig sterkere konsentrasjon av ACN i 0,05 % TFA:

- 30 ml 10 % ACN + 0,05 % TFA
- 30 ml 40 % ACN + 0,05 % TFA
- 30 ml 80 % ACN + 0,05 % TFA

Dette ga tre eluater som videre navngis:

- 10 % SPE eluat
- 40 % SPE eluat
- 80 % SPE eluat

Eluatene ble dampet inn i vakuumsentrifuge. Prøvene ble veid og prosentvis mengde av utgangsmengde (tabell 2 og 3) ble beregnet. Prøvene ble deretter løst i destillert vann til en konsentrasjon på 20 mg/ml (10 mg/ml dersom det var begrenset med materiale).

## 2.5 Proteinmålinger

Det ble målt proteininnhold i alle eluatene ved bruk av BCA Protein Assay Kit (Pierce, Bonn, Tyskland). Analysen ble utført etter fabrikantens instruksjoner (Pierce Biotechnology 2003), og satt opp i mikroplater (96 brønner, NUNC plater). Det ble laget firefolds fortyninger av alle prøvene (10 → 0,00244 mg/ml) på forhånd. 10 µl av hver prøve ble tilsatt mikroplatene i to paralleller. Det ble også tilsatt 10 µl av 8 standarder (bovine serum albumin BSA) i to paralleller, med proteinkonsentrasjoner på 0-1500 µg/ml. En BCA arbeidsløsning ble laget ved å blande 50 deler arbeidsløsning A og 1 del arbeidsløsning B. 200 µl av den ferdige arbeidsløsningen ble tilsatt hver prøve i mikroplaten. Platen ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter. Absorbansen ved 562 nm ble lest av i en plateleser. En standardkurve ble laget ved å plote standardverdiene (BSA). Standardkurven ble så brukt til bestemme proteinkonsentrasjonen til prøvene.

## 2.6 Dyrking av bakterier og antibakteriell testing

Bakteriestammer fra bioprospekteringsgruppa, IMAB, NFH som ble benyttet var:

Gram-negative:

- *Escherichia coli* ATCC25922
- *Listonella anguillarum* AL104

Gram-positive:

- *Corynebacterium glutamicum* CCUG 27702
- *Staphylococcus aureus* ATCC 9144

Bakteriene ble sådd ut på Mueller Hinton (MH) plater og inkubert ved romtemperatur i 1-2 døgn. En koloni fra hver bakterie ble så dyrket i rør med 5 ml MH medium over natten ved risting i romtemperatur. 20 µl av bakterieløsningen ble overført til nye rør med 5 ml MH medium. Dette ble inkubert videre ved romtemperatur ved risting i ca. to timer.

OD-verdien (ved 600 nm) til de fire totimers kulturene ble avlest for å finne bakterietettheten og deretter ble det overført bakterier (3-20 µl) til nytt MH-medium slik at bakteriebruksløsningene hadde en bakterietetthet på  $2.5\text{-}3 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$  (1250-1500 bakterier per brønn på 50 µl) ved start av inkubering (se tabell 4).

**Tabell 4 Mengde bakteriekultur som overføres til 5 ml MH medium for å oppnå en bakteriebruksløsning på ca. 1250-1500 bakterier pr 50 µl (beregnet ut fra samsvar mellom en avlest OD<sub>600</sub> verdi og dyrking, telling og beregning av levende bakterier i kulturen; colony forming units (CFU))**

<b>OD-verdi (600 nm)</b>	<b>Mengde bakteriesuspensjon som skulle overføres</b>
0,003 – 0,010	20 µl
0,010 – 0,030	10 µl
0,030 – 0,075	5µl
0,075 – 0,100	4 µl
0,100 – 0,150	3 µl

Fraksjonene ble veid og løst ut i sterilt milliQ H<sub>2</sub>O til en utgangskonsentrasjon på 20 mg/ml (10 mg/ml der det var begrenset med materiale). Også de organiske ekstraktene ble testet.

Det blir brukt Honeycombs mikrotiterplater (Labsystems, Finland) med 100 brønner på hver plate og alle fraksjonene ble fortynnet i tofolds fortynningsrekker på platene. Fraksjonene ble fortynnet åtte ganger, dermed hadde fraksjonene utgangskonsentrasjon fra 10→0,035 mg/ml mg/ml. Først ble fortynningsrekkene som beskrevet over laget, deretter ble bakteriebruksløsningen tilsatt.

Til hver brønn ble det tilsatt:

- 50 µl fraksjon
- 50 µl bakteriebruksløsning

Som negativ kontroll ble bakteriebruksløsningen inkubert med sterilt milliQ H<sub>2</sub>O og som positiv kontroll ble bakteriene inkubert med Cecropin P1 (0,5 µg/ml) som var fremstilt syntetisk (Kjuul et al. 1999).

.Det ble også sjekket at mQ-vannet og MH-mediet var sterilt ved å ha en brønn med kun MH medium og milliQ-vann og fra dette observerte at det ikke ble noen vekst.

Mikrotiterplatene ble så inkubert i en automatisk plateavleser, Bioscreen C (Labsystems, Finland) for avlesning av OD-verdi (420-580 nm) hver andre time i 72 timer (20 °C). Prøvene ble sett på som aktive dersom OD-verdien til bakteriekulturen var mindre enn 50 % av den negative kontrollen etter 72 timer. De ble angitt som MIC (minimums hemmingskonsentrasjon) i mg/ml.

## 3 Resultater

### 3.1 Prøveutbytte i SPE eluater

Mengde tørrstoff i SPE eluatene og prøveutbytte (gjenvunnet materiale av utgangsmateriale (se tabell 1 og 2)) vises i tabell 5 (*P. camtschatica*) og tabell 6 (*L. maja*).

#### *P. camtschatica*

Ved løsemiddelekstraksjon ble det størst utbytte av tørrstoff i 40 % ACN SPE eluat fra celler (6,5 %). Det ble minst tørrstoffutbytte etter 80 % ACN eluering uavhengig av vevstype.

Fast fase ekstraksjon av celleprøver (syreekstraksjon) ga også et høyt utbytte (3,11 %), men likevel halvparten sammenlignet med tilsvarende utbytte fra løsemiddelekstraksjon. En 80 % SPE eluering av hemolymfe uten celler ga det beste tørrstoffutbyttet (5,93 %) av samtlige ekstrakter fra syreekstraksjon. Tørrstoffutbyttet fra 80 % SPE eluatet (syreekstraksjon) fra gjeller var også høyt (3,1 %). Det minste utbyttet var fra 80 % ACN eluat av fast fase ekstraksjon av syreekstraksjon fra celler (0,02 %). Dette var like lite for tilsvarende prøve fra løsemiddelekstraksjon for celler

#### *L. maja*

Ved løsemiddelekstraksjon ble det størst utbytte av tørrstoff i 40 % SPE eluat fra gjeller (4,04 %). Det minste utbyttet var i 80 % SPE elutatet fra hemolymfe med celler (0,18 %). Generelt sett var det høyest utbytte i 40 % SPE eluatene.

Ved syreekstraksjon ble det høyest utbytte (8,85 %) i 80 % SPE eluat fra hemolymfe med celler. Det var forholdsvis høyt utbytte i alle SPE eluatene fra hemolymfe med celler. Det minste utbyttet var i 80 % SPE eluat fra gjeller (0,14 %). Generelt sett var det høyere utbytte i eluatene ekstrahert med syre.



**Tabell 5 Mengde tørrstoff i SPE-eluat og ekstrakter fra *P. camtschatica* og mengde gjenvunnet materiale fra utgangsmateriale (prosent (w/w %))**

Vev	SPE eluat (% ACN)	Løsemiddelekstraksjon		Syreekstraksjon	
		Mengde tørrstoff	Gjenvunnet materiale (w/w)	Mengde tørrstoff	Gjenvunnet materiale (w/w)
Celler	10	116 mg	0,81 %	118 mg	0,78 %
	40	930 mg	6,51 %	468 mg	3,11 %
	80	2,2 mg	0,02 %	2,7 mg	0,02 %
Hem u/celler	10	116 mg	0,58 %	79 mg	0,50 %
	40	65,8 mg	0,33 %	104,8 mg	0,66 %
	80	56,3 mg	0,28 %	946 mg	5,93 %
Hem m/celler	10	167 mg	1,74 %	101	1,08 %
	40	118 mg	1,23 %	101	1,08 %
	80	54,6 mg	0,57 %	165 mg	1,76 %
Gjeller	10	47 mg	0,45 %	69, 6 mg	0,72 %
	40	134 mg	1,27 %	100,8 mg	1,04 %
	80	15 mg	0,14 %	301, 7 mg	3,1 %

**Tabell 6 Mengde tørrstoff i SPE-eluatet og mengde gjenvunnet materiale (% w/w) fra utgangsmateriale fra *L. maja***

Vev	Eluat (% ACN)	Løsemiddelekstraksjon		Syreekstraksjon	
		Mengde tørrstoff	Mengde gjenvunnet materiale (w/w)	Mengde tørrstoff	Mengde gjenvunnet materiale (w/w)
Celler	10	13,7 mg	1,94 %		
	40	8 mg	1,13 %		
	80	9 mg	1,27 %		
Hem u/celler	10	6,7 mg	0,51 %	5,3 mg	0,26 %
	40	15,1 mg	1,15 %	14,7 mg	0,72 %
	80	3,3 mg	0,25 %	57,6 mg	2,84 %
Hem m/celler	10	6,6 mg	0,40 %	26,1 mg	1,88 %
	40	9 mg	0,55 %	34,7 mg	2,50 %
	80	3 mg	0,18 %	123 mg	8,85 %
Gjeller	10	47,3 mg	0,93 %	15,2 mg	0,32 %
	40	206,4 mg	4,04 %	42,5 mg	0,90 %
	80	126,6 mg	2,48 %	6,7 mg	0,14 %

### 3.2 Proteininnhold

Proteinkonsentrasjonen til prøvene vises i tabell 7 (*P. camtschatica*) og tabell 8 (*L. maja*). I prøvene fra *p. camtschatica* hadde celler de høyeste proteinkonsentrasjonene. Her inneholdt 10 % SPE eluatet 111 % protein og 40 % SPE eluatet 59,5 % protein (løsemiddelekstraksjon). 10 % SPE eluatet fra syreekstraksjon inneholdt 55,7 % protein mens 40 % SPE eluatet fra inneholdt 81,6 % protein. Generelt sett inneholdt 40 % SPE eluatene mest protein og, foruten celleprøvene, så var det 10 % SPE eluatene som inneholdt minst protein. Prøvene som var ekstrahert med løsemiddel hadde høyere proteinkonsentrasjon enn prøvene som var ekstrahert med syre.

**Tabell 7 Proteininnhold i ekstraktene fra *P. camtschatica***

Vev	Eluat (% ACN)	Løsemiddelekstraksjon		Syreekstraksjon	
		Proteinkons. pr 10 mg/ml	Proteinkons. % av total mengde	Proteinkons. pr 10 mg/ml	Proteinkons. % av total mengde
Celler	10	11,1	111 %	5,57 mg/ml	55,7 %
	40	5,95	59,5 %	8,16 mg/ml	81,6 %
	80	0,028	0,28 %	0,17 mg/ml	1,7 %
Hemolymfe u/celler	10	0,187 mg/ml	1,87 %	0,20 mg/ml	2,0 %
	40	3,29 mg/ml	32,9 %	2,63 mg/ml	26,3 %
	80	0,460 mg/ml	4,6 %	0,34 mg/ml	3,4 %
Hemolymfe m/celler	10	0,14 mg/ml	1,4 %	0,24 mg/ml	2,4 %
	40	1,27 mg/ml	12,7 %	0,78 mg/ml	7,8 %
	80	1,03 mg/ml	10,3 %	0,53 mg/ml	5,3 %
Gjeller	10	0,684 mg/ml	6,84 %	0,048 mg/ml	0,48 %
	40	2,11 mg/ml	21,1 %	0,99 mg/ml	9,9 %
	80	0,48 mg/ml	4,8 %	0,18 mg/ml	1,8 %

I prøvene fra *L. maja* (se tabell 8) hadde gjeller 40 % SPE eluat (syreekstraksjon) det høyeste proteininnholdet med 53,6 % protein. Den tilsvarende prøven ekstrahert med løsemiddel inneholdt mindre protein (15,1 %). Celler 40 % SPE eluat (løsemiddelekstraksjon) hadde også en høy proteinkonsentrasjon (43,7 %). Generelt inneholdt 40 % SPE eluatene meste protein. Det var litt forskjellig fra prøve til prøve om det var 10 eller 80 % SPE eluatene som inneholdt minst protein. Prøvene ekstrahert med løsemiddel hadde generelt et høyere proteininnhold enn prøvene ekstrahert med syre.

**Tabell 8 Proteininnhold i ekstrakter fra *L. maja***

Vev	Eluat (% ACN)	Løsemiddelekstraksjon		Syreekstraksjon	
		Proteinkons. pr 10 mg/ml prøvemateriale	Proteinkons. % av total mengde	Proteinkons. mg/ml	Proteinkons. % av total mengde
Celler	10	2,45 mg/ml	24,5 %		
	40	4,37 mg/ml	43,7 %		
	80	0,38 mg	3,8 %		
Hemolymfe u/celler	10	0,26 mg/ml	2,6 %	0,16 mg/ml	1,6 %
	40	0,37 mg/ml	3,7 %	0,58 mg/ml	5,8 %
	80	*	*	0,64 mg/ml	6,4 %
Hemolymfe m/celler	10	0,62 mg/ml	6,2 %	0,11 mg	1,1 %
	40	2,11 mg/ml	21,1 %	0,58 mg/ml	5,8 %
	80	0,23 mg/ml	2,3 %	0,21 mg/ml	2,1 %
Gjeller	10	0,31 mg	13,1 %	0,79 mg/ml	7,9 %
	40	0,51 mg	15,1 %	5,36 mg/ml	53,6 %
	80	0,42 mg/ml	4,2 %	2,14 mg/ml	21,4 %

\* Ikke testet pga for lite materiale

### 3.3 Antibakteriell aktivitet

Resultatet viser at *in vitro* antibakteriell aktivitet ble funnet i både *P. camtschatica* og *L. maja* og i alle vev fra disse. Tabell 9 viser antibakteriell aktivitet i prøver fra *P. camtschatica* mens tabell 10 viser antibakteriell aktivitet i prøver fra *L. maja*. Av de fire forskjellige bakteriene som ble testet var det generelt den Gram-negative *E. coli* som var minst sensitiv og den Gram-positive *C. glutamicum* som var mest sensitiv.

#### *P. camtschatica*

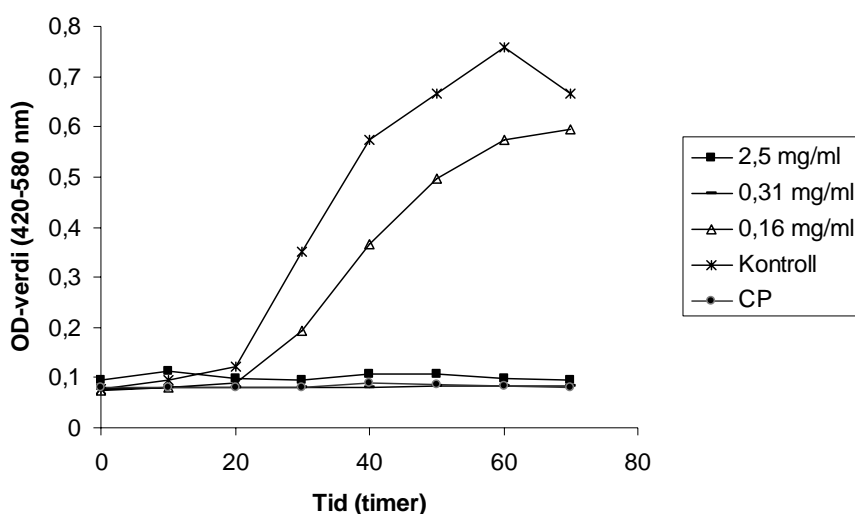
I de ulike vevene testet fra *P. camtschatica* var det tydelig mest aktivitet i celler, der det var høy aktivitet både prøver fra løsemiddelekstraksjon og syreekstraksjon. Den høyeste aktiviteten var i 10 og 40 % SPE fraksjonene, hvor det var påvist antibakteriell aktivitet med en MIC-verdi på 0,04 mg/ml (Celler 10 % SPE, løsemiddelekstraksjon og syreekstraksjon mot *C. glutamicum* og celler 40 % SPE syreekstraksjon mot *L. anguillarum*). Figur 6 viser

tidsforløpet til den antibakterielle effekten av 10 % celleekstrakt ved forskjellige konsentrasjoner mot *E. coli*. Prøvene med konsentrasjon på 2,5 og 0,31 mg/ml utviser en fullstendig hemming av bakterieveksten fra 0 til 72 timer mens prøven med konsentrasjon på 0,16 mg/ml hemmer bakterieveksten i en liten grad (sett i forhold til kontrollen).

I de andre vevene (både ved løsemiddel- og syreekstraksjon) var det imidlertid minst aktivitet i 10 % eluatene. I prøvene hemolymfe uten celler og hemolymfe med celler ble det funnet aktivitet i både 40 og 80 % SPE fraksjoner (begge ekstraksjonsmetodene).

I ekstrakter fra gjeller ble det også funnet høy antibakteriell aktivitet, fortrinnsvis i 40 % og 80 % SPE eluatene. I 80 % SPE eluat fra gjeller ble det registrert en MIC på 0,16 mg/ml (løsemiddelekstraksjon) mot *S. aureus*. De organiske ekstraktene hadde ingen antibakteriell aktivitet.

Det var liten forskjell mellom de to ekstraksjonsmetodene som ble brukt på resultatene for celler, hemolymfe uten celler og hemolymfe med celler. Ekstraktene ekstrahert med syre så imidlertid ut til å ha en litt bedre antibakteriell aktivitet. For gjelleprøvene derimot så det ut til å være stor forskjell på antibakteriell aktivitet i prøver fra de to ekstraksjonsmetodene. Prøvene fra løsemiddelekstraksjon hadde en klart bedre antibakteriell aktivitet. Her var det aktivitet i 10, 40 og 80 % SPE eluatene mot alle bakteriene mens fra syreekstraksjon var det antibakteriell aktivitet i noen 40 og 80 %.



**Figur 6** Antibakteriell aktivitet for 10 % SPE eluadet ved tre forskjellige konsentrasjoner (2,5, 0,31 og 0,16 mg/ml) fra celler ekstrahert med løsemiddel, fra *P. camtschatica* mot *E. coli*. Målt i OD-verdi (420-580 nm) etter tid (timer). Negativ kontroll er bakterie + vann og en positiv kontroll er Cecropin P1 (CP).

**Tabell 9 Antibakteriell aktivitet uttrykt som MIC (minimum hemmingskonsentrasjon) (mg/ml) i ekstrakter fra *Paralithodes camtschatica* mot *Escherichia coli* (E.c), *Corynebacterium glutamicum* (C.g), *Vibrio anguillarum* (L.a) og *Staphylococcus aureus* (S.a)**

Vev	Eluat (% ACN)/ Bakterie→	Løsemiddelekstraksjon				Syreekstraksjon			
		<i>E. c</i>	<i>L. a</i>	<i>C. g</i>	<i>S. a</i>	<i>E. c</i>	<i>L a</i>	<i>C. g</i>	<i>S. a</i>
Celler	10	0,31	0,31	0,04	0,63	0,63	0,16	0,04	0,04
	40	1,25	0,16	0,16	0,31	0,63	0,04	0,16	0,16
	80	5	0,16	0,16	0,31	-	5	5	2,5
	Organisk	-	-	-	-				
Hem u/celler	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	5	0,63	5	5	5	2,5	10
	80	-	-	2,5	-	5	1,25	0,31	-
	Organisk	-	-	-	-				
Hem m/celler	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	10	-	-	5	10	-	10
	80	-	5	5	10	-	5	-	0,63
	Organisk	-	-	-	-				
Gjeller	10	5	5	10	10	-	-	-	-
	40	0,63	0,63	0,31	1,25	-	5	0,31	-
	80	1,25	0,63	0,31	0,16	-	-	0,63	10
	Organisk	-	-	5	-				

### *L. maja*

I de ulike vevene testet fra *L. maja* (tabell 9) ble det funnet høyest antibakteriell aktivitet i prøver fra gjeller (syreekstraksjon). Her ble det funnet en antibakteriell aktivitet i 40 % SPE ekstraktet helt ned i en MIC på 0,02 mg/ml mot *C. glutamicum*. Det ble hos *L. maja*, som hos *P. camtschatica*, funnet høyest antibakteriell aktivitet i 40 % eluatene. Unntaket var hemolymfe uten celler (løsemiddelekstraksjon), hvor det kun ble funnet aktivitet i 80 % eluatene. Også i celler ble det funnet en høy antibakteriell aktivitet, men kun i 10 og 40 % SPE eluatene fra løsemiddelekstraksjon. Her ble det ikke utført syreekstraksjon på grunn av for lite materiale.

Ved en sammenligning av de to ekstraksjonsmetodene var det forskjeller på aktiviteten mellom dem. Dette kunne sees tydeligst i prøvene fra hemolymfe uten celler. I prøvene fra løsemiddelekstraksjon var det kun aktivitet i 80 SPE eluatene, mens i prøvene fra syreekstraksjon var det mest aktivitet i 10 og 40 % SPE eluatene. De organiske ekstraktene hadde ingen antibakteriell aktivitet.

**Tabell 10 Antibakteriell aktivitet vist som MIC (minimumshemmingskonsentrasjon) (mg/ml) i ekstrakter fra *Lithodes maja* mot *Escherichia coli* (*E.c*), *Corynebacterium glutamicum* (*C.g*), *Vibrio anguillarum* (*L.a*) og *Staphylococcus aureus* (*S.a*)**

Vev	Eluat (% ACN)/ Bakterie→	Løsemiddelekstraksjon				Syreekstraksjon			
		<i>E. c</i>	<i>L. a</i>	<i>C. g</i>	<i>S. a</i>	<i>E.c</i>	<i>L a</i>	<i>C. g</i>	<i>S. a</i>
Celler	10	1,25	-	0,08	5	*			
	40	2,5	0,63	0,63	2,5				
	80	-	-	-	-				
	Organisk	-	-	-	-				
Hem u/celler	10	-	-	-	-	10	-	10	5
	40	-	-	-	-	10	-	10	10
	80	1,25	1,25	0,31	0,16	-	-	-	10
	Organisk	-	-	-	-				
Hem m/ celler	10	-	-	0,63	-	-	-	-	-
	40	-	5	0,31	5	-	10	2,5	5
	80	-	-	5	0,63	-	-	-	10
	Organisk	-	-	-	-				
Gjeller	10	10	5	0,63	-	-	5	5	5
	40	-	10	1,25	-	2,5	1,25	0,04	-
	80	-	-	-	-	-	1,25	0,31	-
	Organisk	-	-	10	-				

\*Ikke testet på grunn av for lite materiale

## Diskusjon

Vev (celler, hemolymfe med celler, hemolymfe uten celler og gjeller) fra to krabbearter, *P. camtschatica* og *L. maja*, ble ekstrahert med to forskjellige ekstraksjonsmetoder (løsemiddel- og syreekstraksjon) og videre ekstrahert og konsentrert ved fast fase ekstraksjon. Den antibakterielle aktiviteten til prøvene ble testet mot to Gram-positive (*Corynebacterium glutamicum* og *Staphylococcus aureus*) og to Gram-negative (*Escherichia coli* og *Vibrio anguillarum*) bakterier. Resultatene viser antibakteriell aktivitet *in vitro* i alle vevene som ble testet og mot alle bakteriene. Antibakteriell aktivitet har tidligere blitt beskrevet i flere krepsdyrarter (Haug et al. 2002; Bulet et al. 2004; Tincu et al. 2004; Brockton et al. 2007; Battison et al. 2008).

Det ble utført to ulike ekstraksjonsmetoder, løsemiddelekstraksjon og syreekstraksjon. Ved løsemiddelekstraksjon ble materialet ekstrahert med 60 % ACN + 0,1 % TFA. Tidligere forskning har vist at dette kan brukes til å ekstrahere både peptider (Douglas et al. 1994) og komponenter av ikke-protein natur (Moore et al. 1993). Løsemiddelekstraksjon har dessuten også i tidligere forsøk blitt brukt til å ekstrahere antibakterielle komponenter fra vev fra *P. camtschatica* (Haug et al. 2002). Ved syreekstraksjon ble materialet ekstrahert med 20 % eddiksyre. Syreekstraksjon er en mye brukt ekstraksjonsmetode. Blant annet har Battison et al. ekstrahert hemocytter fra *Homarus americanus* med 10 % eddiksyre og 5 µg/ml aprotinin (protein utvunnet fra lungevev fra storfe). Også flere andre forsøk er gjort hvor eddiksyre er blitt brukt som ekstraksjonsmedium (Destoumieux et al. 1997; Mercado et al. 2005). Ved fast fase ekstraksjon blir forbindelser separert basert på deres hydrofobisitet. Siden antibakteriell aktivitet ble funnet i 10, 40 og 80 % fraksjoner er det sannsynligvis flere faktorer som gir antibakteriell aktivitet.

Haug et al. (2002) har tidligere beskrevet antibakteriell aktivitet i vev fra *P. camtschatica*. Da ble det påvist høyest aktivitet i 80 % SPE eluat fra hemocytter. I dette forsøket ble det også påvist høyest aktivitet i celler/hemocytter, med høy antibakteriell aktivitet i både 10, 40 og 80 % SPE eluatene. Aktiviteten i hemolymfe uten celler (plasma) stemmer også overrens med aktiviteten Haug et. al (2002) fant i plasma. I dette forsøket ble det funnet aktivitet i 40 og 80 % SPE eluatene (løsemiddelekstraksjon) mot *C. glutamicum*. Det samme fant Haug et al. (2002). Det ble funnet høy antibakteriell aktivitet i prøver fra gjeller. Haug et al. (2002) fant



svært liten antibakteriell aktivitet i gjeller fra *P. camtschatica* i sine forsøk. Det er mulig at den høye aktiviteten i gjellene kan skyldes en pågående mikrobiell infeksjon. I så tilfelle vil nemlig den antibakterielle aktiviteten i gjeller stamme fra hemocytter (Haug et al. 2002). I vev fra *L. maja* var den høyeste antibakterielle aktiviteten i celler, 10 og 40 % SPE eluater (løsemiddelekstraksjon) og i gjeller, 40 og 80 % SPE eluater (syreekstraksjon). Det var ingen antibakteriell aktivitet i 80 % SPE eluatet fra celler (løsemiddelekstraksjon). Dette kan tyde på at det er andre komponenter som har antibakteriell aktivitet i celler hos *L. maja* enn hos *P. camtschatica*. I hemolymfe uten celler fra *L. maja* ble det i 10 og 40 % SPE eluatene (løsemiddelekstraksjon) ikke funnet noen antibakteriell aktivitet, mens det var antibakteriell aktivitet i 80 % SPE eluatet mot alle bakteriene. I de samme prøvene ved syreekstraksjon ble det ikke funnet lite antibakteriell aktivitet i 80 % SPE eluatet og litt mer i 10 og 40 % SPE eluatene. Dette tyder på at de to ekstraksjonsmetodene har ekstrahert ulike typer antibakterielle komponenter.

Dersom man sammenligner de to artene hadde generelt vevene fra *P. camtschatica* en høyere antibakteriell aktivitet. Begge artene hadde høyest aktivitet i celler og gjeller. Det er tidligere funnet antibakteriell aktivitet i hemocytter hos flere krepsdyr (Chisholm et al. 1995; Destoumieux et al. 1997; Haug et al. 2002; Brockton et al. 2007; Battison et al. 2008). Det er også tidligere funnet antibakteriell aktivitet i gjeller fra krabbearten *H. araneus* (Haug et al. 2002). Imidlertid hadde *P. camtschatica* høyest antibakteriell aktivitet i gjeller ekstrahert med løsemiddel mens *L. maja* hadde høyest antibakteriell aktivitet i gjeller ekstrahert med syre. Dessverre var det for lite materiale til å utføre begge ekstraksjonsmetodene på celler fra *L. maja*. Dermed er det ikke mulig å sammenligne disse.

Det ble også utført proteinmålinger på alle prøvene ved bruk av BCA-metoden. I prøvene fra *P. camtschatica* ble det påvist høyest proteinkonsentrasjon i 40 % SPE eluatene fra alle vev og ved begge ekstraksjonsmetoder. Et unntak var i SPE eluatene fra løsemiddelekstraksjon. Her ble det funnet en proteinkonsentrasjon på 111 % i 10 % ACN SPE eluatet. Grunnen til dette kan være flere men det bør nevnes at Albumin ble brukt som standard, dermed var alle proteinkonsentrasjonene korrelert til dette. Bruk av andre proteinstandarder ville dermed gitt et annet resultat, men den innbyrdes fordelingen av proteininnholdet i prøvene ville vært den samme. De høyeste proteinkonsentrasjonene ble funnet i celleprøvene. Det var også disse prøvene som hadde høyest antibakteriell aktivitet. Dette kan dermed tyde på at de

antibakterielle komponentene i celler kan være av peptid- eller proteinnatur. Dette stemmer overrens med tidligere forsøk hvor antibakterielle peptider er isolert fra cellene (Brockton et al. 2007; Battison et al. 2008; Stensvåg et al. 2008). Forholdet mellom proteininnhold og antibakteriell aktivitet korrelerte generelt sett for alle vevene. Det var høyest antibakteriell aktivitet i 10 og 40 % SPE ekstraktene. Det var også her den høyeste proteinkonsentrasjonen ble funnet. Dersom man sammenligner proteinkonsentrasjonen mellom prøver ekstrahert med de to ekstraksjonsmetodene, var det slik at prøvene ekstrahert med løsemiddelekstraksjon generelt hadde litt høyere proteinkonsentrasjon enn prøvene ekstrahert med syre. Dette stemte også overrens med den antibakterielle aktiviteten. Dette kunne sees spesielt godt i prøvene fra gjeller. Her ble det funnet antibakteriell aktivitet med en MIC på 5 mg/ml fra 10 % SPE eluatene fra *P. camtschatica* ekstrahert med løsemiddel. Proteininnholdet her var 6,84 %. I den samme prøven ekstrahert med syre var det ingen antibakteriell aktivitet. Her var proteininnholdet lavt, 0,48 %. Det samme kunne også for 40 % SPE eluatene. Her var det en god antibakteriell aktivitet mot alle bakteriene (laveste MIC 0,31 mg/ml) i prøvene fra løsemiddelekstraksjon. Proteininnholdet var her 21,1 %. I den samme prøven med syreekstraksjon var det kun antibakteriell aktivitet mot to av bakteriestammene (laveste MIC var også her 0,31 mg/ml) og proteininnholdet var her lavere, 9,9 %. I prøvene fra *L. maja* kunne man se den samme tendensen. 40 % SPE eluatene ga de høyeste proteinkonsentrasjonene. Den høyeste proteinkonsentrasjon som ble målt i prøver fra *L. maja* var 53,6 % i 40 % SPE eluatet fra gjeller ekstrahert med syre. Det var også her det ble funnet høyest antibakteriell aktivitet, ekstraktet hemmet vekst av alle bakteriene og hadde en MIC på 0,04 mg/ml mot *C. glutamicum*. 80 % SPE eluatet her hadde også høy antibakteriell aktivitet mot to av bakteriene (laveste MIC 0,31 mg/ml) og hadde en proteinkonsentrasjon på 21,4 %. 10 % SPE eluatet hadde en lavere antibakteriell aktivitet (MIC 5 mg/ml) og hadde også en lavere proteinkonsentrasjon (7,9 %). Den samme korrelasjonen mellom proteininnhold og antibakteriell aktivitet kunne ses for de andre prøvene.

Det har tidligere blitt påvist høyest aktivitet i 40 % ACN fraksjoner i hemocytter fra muslingartene *Mytilus edulis* (Mercado et al. 2005) og *Modiolus modiolus* (Haug et al. 2004).

Siden noe av hemolymfen koagulerte vanskeliggjorde dette arbeidet med å skille celler fra plasma. Det har i tidligere studier blitt påstått at aktivitet som er funnet i plasma ikke trenger være plasma-basert men kan være forårsaket av celler (Chisholm et al. 1995).

I tidligere studier (Haug et al. 2002; Haug et al. 2004; Stensvåg et al. 2008) har *C. glutamicum* vist seg å være den mest sensitive bakterien. Dette kunne klart sees her også. *E. coli* var den minst sensitive bakterien og dette resultatet har også vært tidligere for antibakteriell aktivitet i reker (Destoumieux et al. 1997) og andre krepsdyr (Haug et al. 2002).

## Konklusjon

Det ble funnet antibakteriell aktivitet i vev fra de to krepsdyrartene *P. camtschatica* og *L. maja*. Spesielt høy aktivitet ble funnet i celler, noe som samsvarer med andre forsøk utført på krepsdyr. En sammenligning av antibakteriell aktivitet i de to artene tyder på at det kan være forskjellige vev som har antibakteriell aktivitet i *P. camtschatica* og *L. maja*. En sammenligning av de to ekstraksjonsmetodene tyder også på at de ekstraherer forskjellige antibakterielle komponenter. Proteininnholdet i vevene samsvarte med den antibakterielle aktiviteten, jo høyere antibakteriell aktivitet jo høyere proteininnhold. Dette kan tyde på at den antibakterielle aktiviteten skyldes peptider/proteiner. Men, videre rensing av aktive faktorer må gjøres for å finne nøyaktig ut hva den antibakterielle aktiviteten skyldes.

## Referanser

- Bachere, E., Y. Gueguen, M. Gonzalez, J. de Lorgeril, J. Garnier & B. Romestand (2004). "Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*." Immunological Reviews **198**(1): 149-168.
- Battison, A. L., R. Summerfield & A. Patrzykat (2008). "Isolation and characterisation of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*." Fish & Shellfish Immunology **In Press, Corrected Proof**.
- Birkemo, G. A. (2004). Identification and Biochemical Characterization of Antimicrobial Peptides in Fish. Department of Molecular Biosciences, Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Oslo, University of Oslo. **Philosophiae Doctor**: 37.
- Brockton, V., J. A. Hammond & V. J. Smith (2007). "Gene characterisation, isoforms and recombinant expression of carcinin, an antibacterial protein from the shore crab, *Carcinus maenas*." Molecular Immunology **44**(5): 943-949.
- Brown, K. L. & R. E. W. Hancock (2006). "Cationic host defense (antimicrobial) peptides." Current Opinion in Immunology **18**(1): 24-30.
- Bulet, P., R. Stocklin & L. Menin (2004). "Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates." Immunological Reviews **198**(1): 169-184.
- Chisholm, J. R. S. & V. J. Smith (1995). "Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **110**(1): 39-45.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A. VanDorsselaer, J. Rodriguez & E. Bachere (1997). "Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda)." Journal of Biological Chemistry **272**(45): 28398-28406.
- Douglas, P. C., S. Durell, W. L. Maloy & M. Zasloff (1994). "Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana Catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, Polymyxin." The journal of biological chemistry **269**(14): 10849-10855.
- Gueguen, Y., J. Garnier, L. Robert, M.-P. Lefranc, I. Mougenot, J. de Lorgeril, M. Janech, P. S. Gross, G. W. Warr & B. Cuthbertson (2006). "PenBase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature." Developmental & Comparative Immunology **30**(3): 283-288.
- Hancock, R. E. W. (2001). "Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials." The Lancet Infectious Diseases **1**(3): 156-164.
- Hancock, R. E. W. & R. Lehrer (1998). "Cationic peptides: a new source of antibiotics." Trends in Biotechnology **16**(2): 82-88.

Haug, T. (2004). Marine bioprospecting: Marine invertebrates and algae - A potential source for the discovery of novel antibiotics. Department of Marine Biotechnology. Tromsø, Norwegian College of Fishery Science. **Doctor scientiarum**: 49.

Haug, T., A. K. Kjuul, K. Stensvag, E. Sandsdalen & O. B. Styrvold (2002). "Antibacterial activity in four marine crustacean decapods." Fish & Shellfish Immunology **12**(5): 371-385.

Haug, T., K. Stensvag, O. M. Olsen, E. Sandsdalen & O. B. Styrvold (2004). "Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*." Journal of Invertebrate Pathology **85**(2): 112-119.

Havforskningsinstituttet. (2007, 20.05.07). "Kongekrabbe. Generell biologi." from [http://www.imr.no/visste\\_du/arter/kongekrabbe/biologi](http://www.imr.no/visste_du/arter/kongekrabbe/biologi).

Hoskin, D. W. & A. Ramamoorthy (2008). "Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes **1778**(2): 357-375.

Kamysz, W., M. Okroj, E. Lempicka, T. Ossowski & J. Lukasiak (2004). "Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction." Acta Chromatographica **14**: 180-186.

Kjuul, A. K., E. E. Bullesbach, S. Espelid, R. Dunham, T. O. Jorgensen, G. W. Warr & O. B. Styrvold (1999). "Effects of cecropin peptides on bacteria pathogenic to fish." Journal of Fish Diseases **22**(5): 387-394.

Krieg, R. C., Y. Dong, K. Schwamborn & R. Knuechel (2005). "Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **65**(1): 13-19.

Marshall, S. H. & G. Arenas (2003). "Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology." Electronic Journal of Biotechnology **6**(2): 271-284.

Mercado, L., P. Schmitt, S. H. Marshall & G. Arenas (2005). "Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: A new source for antimicrobial peptides." Electronic Journal of Biotechnology **8**(3).

Moen, F. E. & E. Svensen (2003). Dyreliv i havet. Nord-Europeisk marin fauna. Krisitiansund, Kom Forlag A/S.

Moore, K. S., S. Wehrli, H. Roder, M. Rogers, J. N. Forrest, D. McCrimmon & M. Zasloff (1993). "Squalamine: An aminosterol antibiotic from the shark." Proc. Natl. Acad. Sci. **90**: 1354-1358.

Patrzykat, A. & S. E. Douglas (2003). "Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials." Trends in Biotechnology **21**(8): 362-369.

Pierce Biotechnology, I. (2003). "Instructions, BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit."

- Reddy, K. V. R., R. D. Yedery & C. Aranha (2004). "Antimicrobial peptides: premises and promises." International Journal of Antimicrobial Agents **24**(6): 536-547.
- Roch, P. (2004). "What can we learn from marine invertebrates to be used as Complementary Antibiotics." Complementary and Alternative Approaches to Biomedicine **546**: 391-403.
- Roder, B. L., D. A. Wandall, N. Frimodt-Moller, F. Espersen, P. Skinhoj & V. T. Rosdahl (1999). "Clinical Features of Staphylococcus aureus Endocarditis: A 10-Year Experience in Denmark." Arch Intern Med **159**(5): 462-469.
- Sigma-Aldrich. (1998). "Guide to Solid Phase Extraction." from <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
- Smith, V. J., J. M. O. Fernandes, G. D. Kemp & C. Hauton (2008). "Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans." Developmental & Comparative Immunology **32**(7): 758-772.
- Stensvåg, K., T. Haug, S. V. Sperstad, Ø. Rekdal, B. Indrevoll & O. B. Styrvold (2008). "Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, Hyas araneus." Developmental & Comparative Immunology **32**(3): 275-285.
- Tincu, J. A. & S. W. Taylor (2004). "Antimicrobial peptides from marine invertebrates." Antimicrob Agents Chemother **48**(10): 3645-54.
- Vorland, L. (2001). "Naturlig forekommende antimikrobielle peptider - lovende nye antibiotika, eller ris til egen bak." Tidsskrift for Den norske lægeforening **121**: 3191-6.
- Yang, N. (2003). Structural features of amphipathic membrane active peptides: their potential to modulate antitumor activity ant tumor cell specificity versus antimicrobial activity. Department of Biochemistry, Institute of Medical Biology, Faculty of Medicine. Tromsø, University of Tromsø. Doctor scientarium: 50.
- Zasloff, M. (2002). "Antimicrobial peptides of multicellular organisms." Nature **415**(6870): 389-395.