

**Masteroppgave i farmasi**

**Isolering og karakterisering av  
antibakterielle forbindelser i sjøstjernene:  
*Urasterias linckii*, *Solaster endeca* og  
*Crossaster papposus***

**Av Thong H. Ngo**



**Avdeling for legemiddekjemi**

**Institutt for farmasi**

**Det medisinske fakultet**

**Universitetet i Tromsø**

## **Forord**

Denne oppgaven ble utført ved institutt for marin bioteknologi, Norge fiskerihøgskole, og institutt for farmasi, Universitetet i Tromsø, i perioden oktober 2008 til mai 2009.

Veiledere for oppgaven har vært Einar Jensen (professor ved UIT), Terje Vasskog (forsker ved UIT) og Tor Haug (1. amanuensis ved NFH).

Mange har fortjent en takk i forbindelse med oppgaven min:

Først og fremst vil jeg takke veilederne mine, Einar, Terje og Tor for hjelp, nyttige tips og lærerike tilbakemeldinger i alle fasene i masteroppgaven.

Takk til Toril Anne Grønset for hjelp med trypsinering og LC-MS/MS-analyse.

Takk til alle som har hjulpet meg på NFH, for hjelp med bakteriedyrking og aktivitetstesting.

Takk til mamma, pappa, mine brødre og Minh-Anh for støtte og motivasjon gjennom hele studietida.

Til slutt men ikke minst en hilsen til mine venner som har skapt hyggelige tider under studieoppholdet i Tromsø.

Tromsø, mai 2009

Thong H. Ngo

## Forkortelser:

ACN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielle peptider
Da	Dalton
ESI	Elektrospray ionisering
FMN	Flavin Mononukleotid
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (høyeffektiv væskekromatografi)
IFA	Institutt For Farmasi
LC	Liquid Chromatography (væske kromatografi)
MH	Mueller Hinton
MS	Mass Spectrometry (massespektrometri)
m/z	masse over ladning forhold
NFH	Norges fiskerihøgskole
OD	Optical Density (Optisk tetthet)
PDA	Photodiodearray (fotodiodearray)
Q	Quadropol
Qui	Quinovose
RN	Riboflavin
RP	Reverse phase (omvendt fase)
SPE	Solid Phase Extraction (fastfase ekstraksjon)
TFA	Trifluoroacetic acid (trifluoreddikesyre)
TOF	Time of Flight
UV	Ultraviolet (Ultrafiolett)
Xyl	Xylose

## Sammen drag

Antibakteriell aktivitet mot Gram positive og Gram negative bakterier er påvist i ekstrakter av celler og plasma fra *Solaster endeca*, *Crossaster papposus* og *Urasterias Linckii*. Det har også blitt påvist antibakteriell aktivitet mot Gram negative bakterier i ekstrakter av hel kropp fra *Solaster endeca* og *Crossaster papposus*. Materialet ble grovekstrahert med 60 % Acetonitril, videre ble vannfase og organisk fase ble separert. Ved hjelp av fastfase ekstraksjon ble vannfasen fraksjonert med 0,05 % trifluoreddiksyre i Acetonitril med trinnvis økende volumprosent. Bioaktive-eluateer fra fastfase ekstraksjonen ble videre separert på omvendt fase HPLC-kolonne med samme mobilfase bestående av Acetonitril/vann med 0,05 % trifluoreddiksyre og. Analyse av aktive HPLC-fraksjoner ble utført ved ESI-MS i positiv modus, og MS/MS-analyse ble utført på Q-TOF. ESI-MS analyse av en HPLC-fraksjon fra *S. endeca* celler indikerte at man har et antibakteriell peptid på rundt 12315 Da. Etter trypsinering og påfølgende LC-MS/MS analyse ble sekvens av 2 peptidfragmenter bestemt.

UV-spekter (fra HPLC separasjonen) og MS-spekter av fraksjonene fra hel kropp *S. endeca* og *C. papposus* indikerer tilstedeværelse av Riboflavin lignende substanser med antibakteriell aktivitet. Fra aktive HPLC-fraksjoner fra helkropp *C. papposus* fikk man 3 forbindelser med masse på 2338, 2485 og 3094 Da.

# Innholdsfortegnelse

1 Innledning .....	7
1.1 Bakgrunn .....	7
1.2 Legemidler og antimikrobielle midler fra havet .....	7
1.3 Asteroidea (Sjøstjerner).....	8
1.4 Antimikrobielle forbindelser fra Asteroidea.....	10
1.5 Antimikrobielle peptider .....	12
1.6 Hensikt .....	15
1.7 Valg av metoder.....	16
1.7.1 Fastfase- ekstraksjon.....	16
1.7.2 Testing av antibakteriell aktivitet .....	17
1.7.3 Høyeffektiv væskrokromatografi (HPLC).....	18
1.7.4 Massespektrometri.....	18
2 Materiale og metode .....	21
2.1 Kjemikalier .....	21
2.2 Innsamling av prøvemateriale.....	21
2.3 Ekstraksjon .....	21
2.3.1 Grovekstraksjon.....	21
2.3.2 Fast fase ekstraksjon .....	22
2.4 Test av antibakteriell aktivitet .....	23
2.4.1 Bakteriedyrking .....	23
2.4.2 Antibakteriell testing på Bioscreen/Envision .....	23
2.4.4 Antibakteriell testing på agarplater.....	24
2.5 Separasjon ved hjelp av HPLC .....	25
2.5.1 Utstyr.....	25
2.5.2 Eksperimentelt .....	25
2.6 MS-analyse .....	26

2.6.1 Utstyr.....	26
2.6.2 Eksperimentelt .....	26
3 Resultater og diskusjon.....	30
3.1 Antibakteriell aktivitet.....	30
3.2 Analyse ved hjelp av HPLC og MS .....	33
3.2.1 <i>U. linckii</i> plasma 40 % SPE .....	33
3.2.2 <i>S. endeca</i> celler 40 % SPE .....	35
3.2.3 <i>S. endeca</i> kropp 40 % SPE.....	37
3.2.4 <i>C. papposus</i> kropp 40 % SPE.....	41
4 Konklusjon .....	48
5 Referanser .....	51

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

I alle tider har mennesket kjempet mot bakteriefremkallende infeksjoner, og fremdeles pågår denne kampen. Bakteriene kan tilpasse seg forskjellige livsbetingelser og er veldig tilpasningsdyktige. Antibiotika er et av våre viktigste legemidler som dreper eller hemmer vekst av bakteriene. Sulfonamidene var 1930-årenes klart viktigste medikamenter, mens penicillin ble 1940-årenes vidundermedisin (1). Antibakterielle midler angriper bakteriene på forskjellige måter; blant annet ved å interferere i celleveggsyntesen, proteinsyntesen, nukleinsyresyntesen, metabolske veier og/eller cellemembranfunksjonen (2). Et økende problem ved bruken av antibiotika er at mikroben utvikler resistens. Antibiotikaresistens oppstod allerede på 1940-tallet (3) og siden den tid har resistens blitt et problem blant de fleste bakterier som gir utbrudd av infeksjoner på sykehus. Gonokokkene var de første bakteriene som utviklet resistens. Mot slutten av 1950-årene var de fleste *Staphylococcus aureus*-stammene resistente mot datidens tilgjengelige antibiotika – penicillin, erytromycin, streptomycin og tetrasykliner (1). Utviklingen har nå gått så langt at det overfor visse typer bakterier ikke lenger finnes effektive antibiotika å benytte. Når effektiv behandling som følge av antibiotikaresistens ikke finnes (eller forsinkes) vil dette medføre økt dødelighet, økt sykkelighet og økte samfunnskostnader. Utvikling av antibiotikaresistens er derfor en alvorlig trussel mot mennesket og samfunnet. Når vi sammenligner resistenssituasjonen i Norge med andre land er problemene moderate, men problemene øker (4). Etter hvert som verden har fått bedre teknologisk utstyr har nye mikroorganismer blitt påvist som årsak til både kjente og ukjente sykdomsbilder (1). Når det gjelder utvikling av nye, effektive antibiotika er det bare moderat optimisme, til tross for økt kunnskap om biokjemi og genetikk (5). Oppdagelsen av nye antibiotika, videreutvikling og modifisering av gamle antibiotika er derfor veldig viktig i vår tid.

## 1.2 Legemidler og antimikrobielle midler fra havet

På grunn av resistensproblematikken blant våre tradisjonelle antibiotika er det blitt prøvd forskjellige måter for å finne nye legemidler og lead compounds, og tradisjonelle kilder har vært planter fra den tropiske regnskog og terrestriske mikroorganismer. I den senere tid har også marine organismer blitt prospektert. Havet dekker mer enn 70 % av jordens overflate,

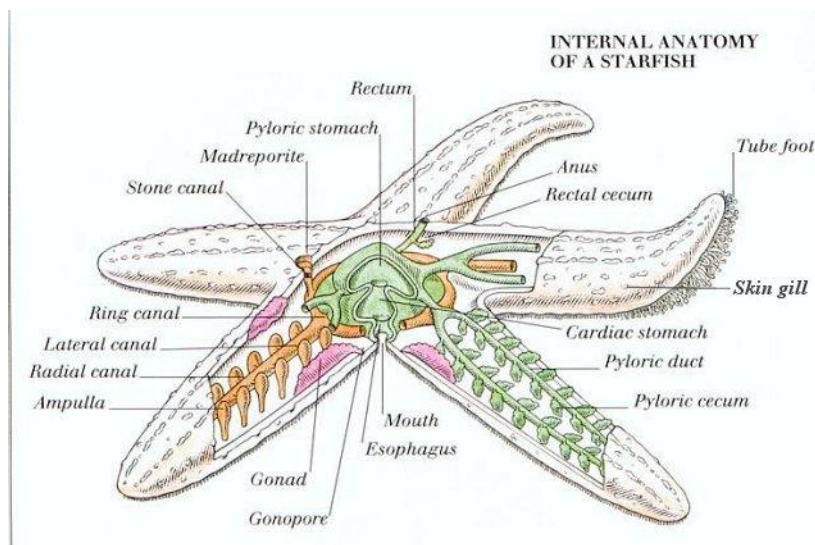
det er blitt beskrevet mer enn 200 000 arter av planter og dyr i havet. Ulike forskningsgrupper har vist at marine organismer kan være kilde til forskjellige legemidler, blant dem antibakterielle legemidler, men også antivirale (anti HIV), anticancer, antifungale og antiinflammatoriske midler. Det har blitt isolert mer enn 15 000 ulike marine forbindelser fra bakterier, sopp, alger, svamp, mollusker, pigghuder og andre marine organismer i tidsperioden 1965 til 2005 (6), så havet er en lovende kilde for nye legemidler og idésubstanser. Det er i midlertidig ikke blitt utviklet så mange nye legemidler fra noen av disse forbindelsene enda, men det har blitt utviklet medisin blant annet mot herpes infeksjon (Ara-C) og kreft (Ara-A) fra forbindelser isolert fra marine svamper. En rekke forbindelser (som har blitt isolert fra ulike marine organismer) er i dag i utviklingsfaser (fase 1,2 eller 3), og noen har kommet i klinisk fase (7). Et eksempel av forbindelser som har kommet langt i utviklingsstadiet er, Salinosporamide (anticancer) i fase 2 (8). Ecteinascidin 743/Trabectedin (Yondelis®,) (9, 10) som virker mot kreft, Ziconotide (Prialt®) (10, 11) mot neuropatisk smerte er alle tilgjengelige legemidler på markedet. Stoffer med antibakteriell aktivitet som kan nevnes er Squalamine som er den først aminosterol som er isolert fra *Squalas acanthias* (en type småhai). Squalamine er aktiv mot *S. aureus*, men har også antiangiogenesis og antitumor egenskaper (12). Stoffet er i dag i klinisk fase og testes ut mot ”non-small-cell” lungekreft (13). Cribrostatiner, som er isolert fra svampen *Cribrorhynchus sp.*, er aktive mot både Gram negative og Gram positive bakterier (14). Pestalone, som er isolert fra brunalgen *Pestalotia*, har antibakteriell aktivitet mot meticillin-resistent *S. aureus*, og vankomycin-resistent *Enterococcus faecium* (15). Det kan også nevnes andre stoffer som har antibakteriell aktivitet, som Jorumycin, en isokinolon alkaloid isolert fra bløtdyret *Jorunna funebris* (16), og antibakterielle diterpen bromosphaerone fra algen *Spaerococcus coronopifolius* (17). Sjeldne marine organismer er ikke godt egnet til bioprospektering, da store innsamlinger av disse artene til forsøk kan føre til utrydding av artene.

### **1.3 Asteroidea (Sjöstjerner)**

Sjöstjerner (figur 1) tilhører en av klassene i *Phylum Echinodermata* (pigghuder), og det finnes omtrent 2000 ulike arter i verdens hav. Sjøstjernene finnes bare i havet, lever vanligvis på bunnen. og kjennetegnes ved en pentamer radialsymmetri. De blir skilt med basis i formen på armene, og mønster på kroppen (18). Sjøstjernene kroppsoverflate er dekt av en velutviklet hud, et epitellev, og de ytre organene kan være forskjellige bevegelige organer, som pigger med ledd, gripetenger, åndeblærer og sugeskåler. Nervesystemet til disse dyrene



er spesielle, de har verken hode eller hjerne, og nervesystemet er utstyrt med strenger som løper langs midten av armene. De mangler også enhetlig respirasjonsorgan og sirkulasjonssystem. Munnen ligger på undersida, og kobles til et kort spiserør og en magesekk, der de buskformede fordøyelseskjertlene munner ut. Endetarmen (på de sjøstjernene som har en), ligger på oversida. Kort sagt består fordøyelsessystemet til sjøstjerner av munn og mage (18, 19). Skjelettet hos sjøstjernene består stort sett av kalsiumkarbonat, og de har et enestående vannkanalsystem-organ. Hos sjøstjernene har hver enkelt sugefot sitt eget vannreservoar, som blir fylt med væske fra vannkanalsystemet. Vannkanalsystemet står i forbindelse med dyrets utsida gjennom en spesiell silplate, madreporplaten. Vannkanalsystemet sine oppgaver er bevegelse, transport av næring og restprodukter, og føre oksygen og karbondioksid til og fra vevene i kroppen. Blodvæsken (coelomvæsken) inneholder også mange type blodceller. Disse cellene er hovedsakelig amøbeliknende coelomocytter, som brukes til ekskresjon, leging av sår, reparasjon, og regenerering av kroppsdeler som har gått tapt.



**Figur 1. Anatomi av en sjøstjerne (20)**

Sjøstjerner er kjøtteterer, og lever vanligvis av muslinger, fisk, krepsdyr, og sjøstjernene av artene *Solaster* og *Crossaster* kan også spise andre type sjøstjerner som for eksempel korstrollet *Asterias rubens* (21).

Sjøstjerner har en utmerket regenererings kapasitet. Dersom en arm er skadet, kan den gi slipp på den, og en ny arm vil da vokse ut igjen (18, 19). Hvis den felte armen ikke blir spist av andre dyr, kan den utvikle seg til en helt ny, komplett sjøstjerne (19). Sjøstjerne innen

klassene *Solaster sp.* og *Crossaster sp.* kan i praksis deles i to, og etter det vil begge delene regenerere den manglete side og armene (18). Sjøstjerner produserer en slimete sekresjon fra skinnet som de jakter og lammer byttet sitt med (22). Sjøstjerner inneholder saponiner, mengde og typer varierer med årstiden. Det produseres mest saponiner om våren og i begynnelsen av sommeren (23).

*Solaster endeca* – gul solstjerne, finner man fra de Britiske øyer i sør til Spitsbergen og Grønland i nord. Denne arten har vanligvis 9-10 (7-13) armer, fargen er gul til mørk fiolett. Overflaten er dekt med små pigger, og kan bli opptil 35 cm i diameter, men vanligvis 20 cm i diameter. De lever vanligvis i gjørmet grus med steinblokker, steiner som er dekket av slam, og i semi-eksponerte omgivelser, med en dybde helt ned til 450 meter, vanligvis 30-40 meter (18).

*Crossaster papposus* – rød solstjerne, finner man i den nordlige delen av Nord Atlanteren, fra de Britiske øyer til Arktis. Dyret har vanligvis 11-13 (8-14) armer, har lange og smale pigger på overflaten. Fargen er vanligvis rød, med noen områder som er gulaktige. Arten finnes i områder med stein, sand, musling og østers, vanligvis på 10-50 meters dybde (18).

*Urasterias linckii*, finnes fra Nova Scotia i Vest Atlanteren til nord i Norge. Arten har vanligvis 5 armer, som er lange og fleksible, med pigger, og fargen er fiolett. Man finner arten vanligvis på havets bunn i gjørmete eller sandgjørmete områder, på en dybde som varierer fra 5-2000m (24).

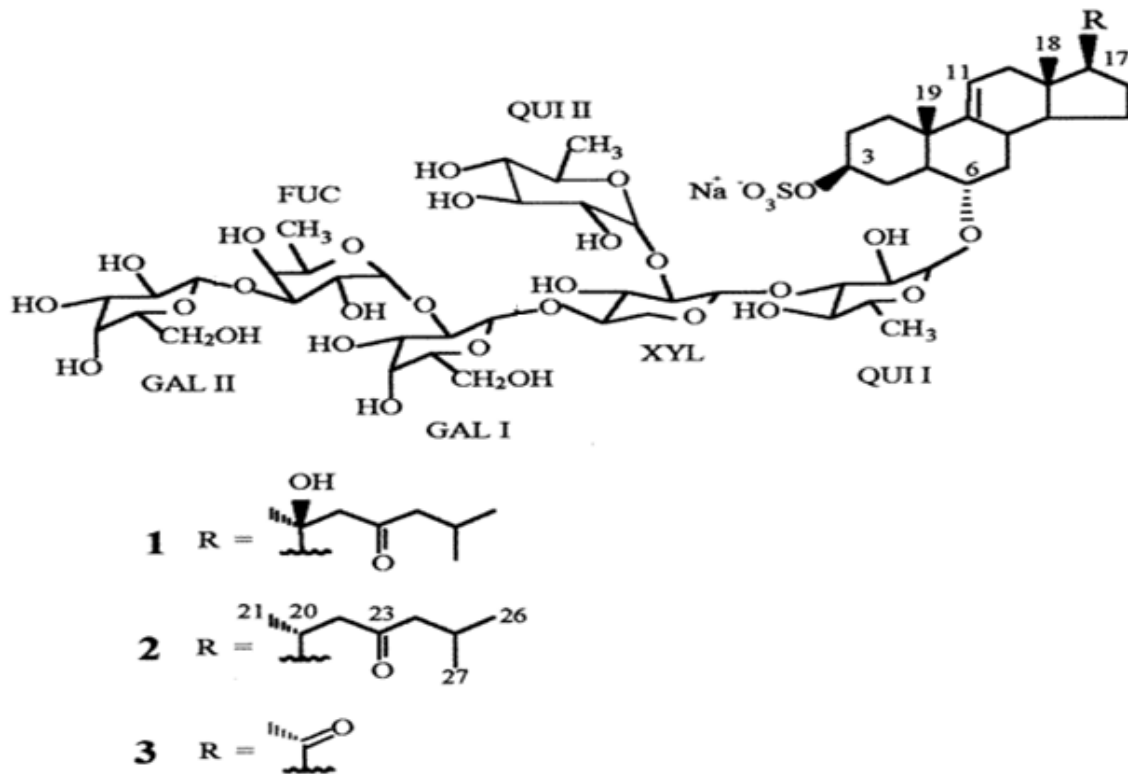
## 1.4 Antimikrobielle forbindelser fra Asteroidea

I 1960 forsøkte Hashimoto og Yasumoto å oppbevare sjøstjerner i akvariet, og de oppdaget at vannet som etter hvert inneholdt døde sjøstjerner skummet veldig. De undersøkte dette nærmere, noe som førte til isolering av saponiner (som hadde både hemolytisk og toksisk aktivitet). Saponiner er glykosider med høy molekylvekt (1000-1500 Da), som inneholder sukkerdel(er) som er koblet til en triterpen eller steroid aglykon (25) Etter denne oppdagelsen har et stort antall saponiner blitt karakterisert fra marine organismer (22).

Steroidale oligoglykosider er de dominerende metabolittene fra sjøstjerner. Steroidale glykosider fra sjøstjerner blir delt inn i tre strukturelle grupper: <sup>1)</sup> sulfatert steroidale

glykosider (asterosaponiner), <sup>2)</sup> sykliske steroidale glykosider og <sup>3)</sup> polyhydroksysteroid-glykosider (26).

**Asterosaponiner** er sulfaterte glykosider og er penta- og hexaglykosider med  $\Delta^{9(11)-3\beta,6\alpha}$ -dihydroksysteroidal aglykon; sulfatgruppen er lokalisert på C-3 og oligosakkaridkjeden (5-6 sukkerenheter) med glukosidbinding på C-6 (Se figur 2).



Figur 2. Asterosaponiner fra *Anasterias minuta*: (1) Versicoside A, (2) Anasteroside A, (3) Anasteroside B. Gal = D-galaktose; Fuc = D-fucose; Qui = D-quinovose; Xyl = D-xylose (27).

Monosakkaridenhetene i asterosaponiner er i pyranose form med  $\beta$ -isomer konfigurasjon ( $\alpha$  for arabinose) (28). Et forgreinings punkt er alltid lokalisert på den andre monosakkaridenheten som går ut ifra aglykonet (28, 29). Det er også blitt funnet asterosaponiner som har to forgreininger, isolert fra sjøstjernen *Asterina pectinifera*, *Patiria miniata* og andre som tilhører familien Asteriidae (29). Oligosakkariddelen inkluderer fukose (6-deoxygalaktose), quinovose (6-deoxyglukose) og ofte xylose, galaktose eller glukose. Selv om asterosaponiner har flere biologiske effekter, er ikke virkningsmekanismen helt klarlagt. Sidekjeden på aglykonet, sammen med sukkerdelen og tilstedeværelsen av sulfatgruppen, kan spille en rolle.

**Steroidale sykliske glykosider** er funnet i arten *Echinaster sp.* Disse saponinene har en annerledes struktur en asterosaponiner, strukturen inneholder ingen sulfatgruppe, og har en anionisk ladning på grunn av glukuronsyre-enheten. De inneholder  $\Delta^7,3\beta,6\beta$ -dihydroksysteroidal kjerne, og trisakkaridkjeden er syklisert mellom C-3 og C-6 på aglykonet, noe som gir en makrosyklisk ring som minner om kroneeter (29).

**Polyhydroksysteroider-glykosider** består av et polyhydroksylert steroidalglykon med en karbohydratdel som vanligvis er dannet av en eller to monosakkarider, ofte bundet sammen. Det vanligste monosakkarid er D-xylose, i pyranose form, og er ofte metylert i posisjon 2 og/eller 4 (29). Glykosyleringsposisjonen er C-24, men flere glykosider har sukkerdelen bundet til C-3, C-6, C-28 eller C-29 (30).

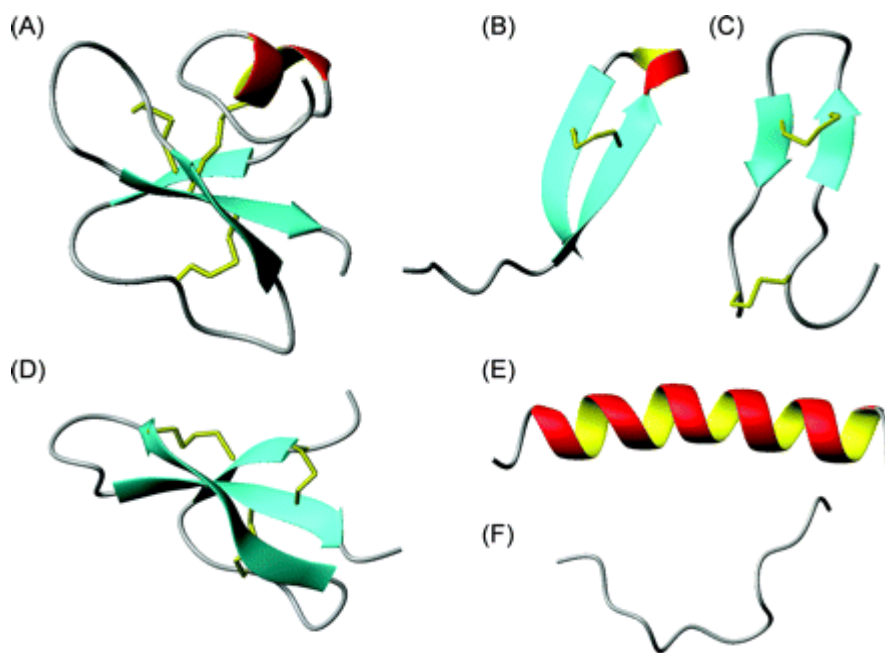
Det er blitt karakterisert mer enn 250 steroidale forbindelser, og det er isolert sekundære metabolitter fra rundt 80 sjøstjerne arter (30). Ekstrakter og rene saponiner fra sjøstjerner har et bredt spektrum av biologisk aktivitet. Det er blitt observert at asterosaponiner er cytotoksiske, hemolytiske (31, 32), antivirale (32, 33), antifungale (27, 32, 34), og har antibakteriell aktivitet (31, 32, 35). Sjøstjerner inneholder også polyhydroksysteroider, som enten er sulfatert eller ikke-sulfatert, med forskjellige oksiderings- og alkylerings- mønstre i sidekjeden (29). Mange sulfaterte steroider som er isolert fra sjøstjerner har forholdsvis god antiviral aktivitet mot HIV-1 og HIV-2 (29).

Det er også blitt funnet antibakteriell aktivitet som ikke er forårsaket av saponiner i sjøstjerner, blant annet lysozym lignende aktivitet fra sjøstjernen *Asterias rubens* (36).

## 1.5 Antimikrobielle peptider

Antimikrobielle peptider (AMP) ble oppdaget ved at en gruppe i Sverige undersøkte hvordan insekter kunne drepe bakterier (37), mens en annen gruppe i California studerte hvordan fagocytter hos pattedyr dreper bakterier inne i fagolysomet (38). Begge gruppene beviste at det var peptider som drepte bakteriene. Etter dette ble det raskt oppdaget at både planter, insekter og dyr inneholdt slike aktive peptider. AMP finnes i en rekke organer i mennesker som for eksempel luftveier, tarm, hud og hvite blodceller (39, 40). Et mangfold av levende organismer produserer antimikrobielle peptider som er en del av deres uspesifikke immunsystem (39, 41).

Det finnes to definisjoner på antimikrobielle peptider. Hancock & Scott definerer AMP til å være positivt ladete peptider som inneholder mellom 12 til 50 aminosyrer, og med ca.50 % hydrofobiske aminosyrer (40). Ganz & Lehrer har en bredere definisjon som inkluderer positivt ladete peptider med mindre enn 100 aminosyrer (42). De mest dominerende strukturer er amfifile peptider med to til fire  $\beta$ -tråder, amfipatiske  $\alpha$ -helikser, loop strukturer og utstrakte strukturer (43, 44), se figur 3.

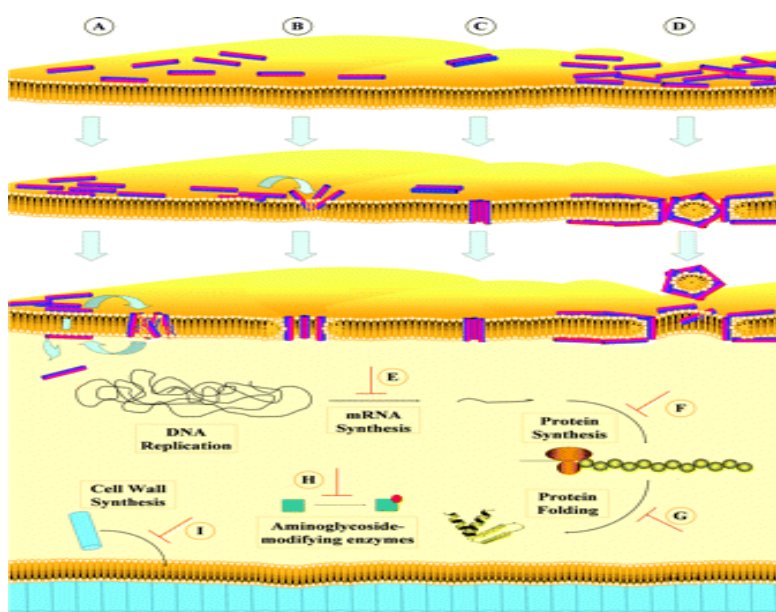


Figur 3. Strukturelle klasse av antimikrobielle peptider. A) Mikset struktur av menneske  $\beta$ -defensin-2; B) loop thanatin; C)  $\beta$ -Sheeted polyphemusin; D) kanin nyre defensin 1; E)  $\alpha$ -heliks magainin-2; F) utstrakt indolicidin (45).

AMP er som sagt en del av forsvarssystemet i levende organismer, og har et vidt spektrum av aktivitet inkludert aktivitet mot bakterier, sopp, noen parasitter og virus, og noen har til og med vist aktivitet mot kreftceller (40, 46).

Virkningsmekanismen til AMP mot bakterier er ikke helt klarlagt, men det finnes noen teorier. Av de vanligste teoriene er ”aggregat modellen”, ved hjelp av micelle-lignende komplekser av peptider og lipider krysser AMP membranen ved at de hoper seg opp og forandrer retning uten å ta i bruk noe som helst detaljert orientering (47, 48), se figur 4A. Den andre teorien er ”toroidal pore modellen” hvor peptidene setter seg inn loddrett på membranen ved at den hydrofile delen av peptidet binder seg til fosfolipid gruppene, mens den hydrofobe delen binder seg til lipid kjernen (47, 48), se figur 4B. Den tredje teorien

”tønnestav modellen”, hvor peptidene aggregerer loddrett i cytoplasmamembranen og danner en pore. Disse peptidene er amfipatiske, det vil si at de inneholder både vannløselige og fettløselige enheter. For at den vannløselige delen skal vende inn i porene må den fettløselige delen stå ut mot cytoplasmamembranen. Dette fører til at både vannløselige stoffer og vann kan gå gjennom porene (49), se figur 4C. I den siste teorien, ”teppe-modellen”, legger peptidene seg ned parallelt med cytoplasmamembranen med sin fettløselige del nedsunket i membranen. Plasmamembranen begynner å bukle, og vil til slutt brytes opp når nok peptider er sunket ned i cytoplasmamembranen og former miceller og membranporer (50), se figur 4D.



Figur 4. Virkningsmekanismen til AMP, (A) Aggregat modell, (B) toroidal modell, (C) tønnestavmodell, og (D) teppemodell (45).

De fleste AMP er aktive ved interaksjon med bakteriens cellemembran, men noen peptider kommer over cellemembranen og hoper seg opp i cellen, hvor de har forskjellige mål som fører til celledreping. Nye aktive angrepsområder for AMP som er blitt oppdaget er inhibering av nukleinsyresyntesen, proteinsyntesen, enzymaktiviteten, og celleveggsyntesen (51).

I forskjellige databaser hvor informasjonen om AMP har blitt samlet, har ANTIMIC ca. 1700 sekvenser (52), AMSDb inneholder 804 AMP fra eukaryotisk opprinnelse (53), Peptaibol inneholder rundt 300 modifiserte AMP fra sopp organismer (54), og APD inneholder detaljerte informasjon om 525 AMP (55). AMP synes å være lite påvirket av antibiotika-resistens (40), men strukturen til de naturlige forekommende peptidene kan legge en

begrensning på deres anvendelsesområde. De fleste peptidene består av mer enn 20 aminosyrer, noe som gjør at de egner seg dårlig som orale preparater. Peptidene blir ofte inaktivert av salter, og man vet ikke hvor godt de penetrerer vev og i hvor stor grad de vil forbli ubundet i serum. De blir også relativt lett inaktivert av proteaser, derfor har forskningen dreid seg om å utvikle topikale preparater.

Det har hittil vært liten suksess med AMP som legemidler. De som har kommet lengst i prosessen er to indolicin-baserte AMP varianter, MBI-226 og MX-594AN, som har blitt utviklet av Migenix (tidligere Micrologix). Disse to peptidene brukes til å behandle kateter relaterte infeksjoner og kviser. MBI-226 (Omiganin) viste gode resultater på sekundær endepunkt etter fase 3 utprøving, mens resultatet på primær endepunktet var ikke godt nok, så Migenix har fått godkjenning fra FDA til å repetere fase 3 utprøving (56). I 2003 ble MX-594AN utprøvd i fase 2b, og viste signifikante reduksjoner av kviser sammenlignet med kontrollgruppa (56). Cutanea Life Sciences fikk alle rettighetene for MX-594AN (56) i slutten av 2005 (57). Andre AMP som kan nevnes og som har kommet i ulike utprøvningsfaser er blant annet hLF-11 (AM-Pharma Holding BV) som har vist god effekt mot osteomyelitis (58) og andre bakterielle infeksjoner (59) (ferdig med fase 1), P113 (Demegen, Pittsburgh, PA) har fullført klinisk utprøving fase 2 hos HIV pasienter (60).

Det finnes andre AMP som har blitt prøvd ut, men som har mislykkes i kliniske tester, andre er under forskjellige utprøvningsfaser (det ble her nevnt noen få), men uansett er potensialet der for utvikling av AMP til nye legemidler.

## 1.6 Hensikt

I tidligere studier utført ved Institutt for Marin Bioteknologi, Norges fiskerihøgskole, har det blitt påvist antibakterielle forbindelser i ekstrakter fra en rekke marine organismer, som for eksempel svamper (61), pigghuder (62), krepsdyr (63) og bløtdyr (64).

Hensikten med denne oppgaven er :

- 1) Undersøke om sjøstjernene *Solaster endeca*, *Crossaster papposus* og *Urasterias linckii* inneholder antibakterielle forbindelser ved hjelp av Bioscreen/Envision
- 2) Undersøke om eventuell påvist aktivitet skyldes antimikrobielle peptider
- 3) Isolere (vha. HPLC) og utføre innledende karakterisering (vha massespektrometri, UV-spektrometri) av aktive komponenter.

## 1.7 Valg av metoder

Det har tidligere blitt påvist og isolert antibakterielle forbindelser i arter som sjøpølse, pyntekrabbe og svamper ved NFH. I denne oppgaven skal man finne antibakteriell aktivitet i noen arter sjøstjerner, og det brukes de samme metodene som tidligere brukt på NFH.

Metodikken baserer seg på en grovekstraksjon av prøvematerialet med en blanding av acetonitril/vann og tilsatt trifluoreddiksyre. Videre i prosessen blir stoffene separert på fastfase-ekstraksjon (omvendt fase, se punkt 1.7.1), med en blanding av vann/acetonitril som mobilfase, og med trinnvis økende prosentandel av ACN. Dette gir da en viss separasjon av stoffer med ulike hydrofobisitet. Fastfase-eluatene blir så testet for antibakteriell aktivitet mot både Gram negative og Gram positive bakterier. Man kan måle aktiviteten på forskjellige måter, turbiditetsmålinger i mikrotiterplater, agarplate-diffusjon og bioautografi på tynnsjiktplate. Ved turbiditetsmålinger i mikrotiterplater er det mulig å teste flere prøver samtidig, den gir gode og raske resultater, er lett å bruke, og er også den vanligste metoden i dag. Derfor ble denne metoden også brukt i denne oppgaven. Det ble også testet for antibakteriell aktivitet på agarplater, når ekstraktene ikke lot seg tørke fullstendig og/eller når ekstraktene var veldig sterkt farget (= høy OD). Ved antibakteriell aktivitet i SPE-eluatene ble disse videre separert ved hjelp av HPLC. HPLC fraksjonene ble deretter testet for antibakteriell aktivitet.

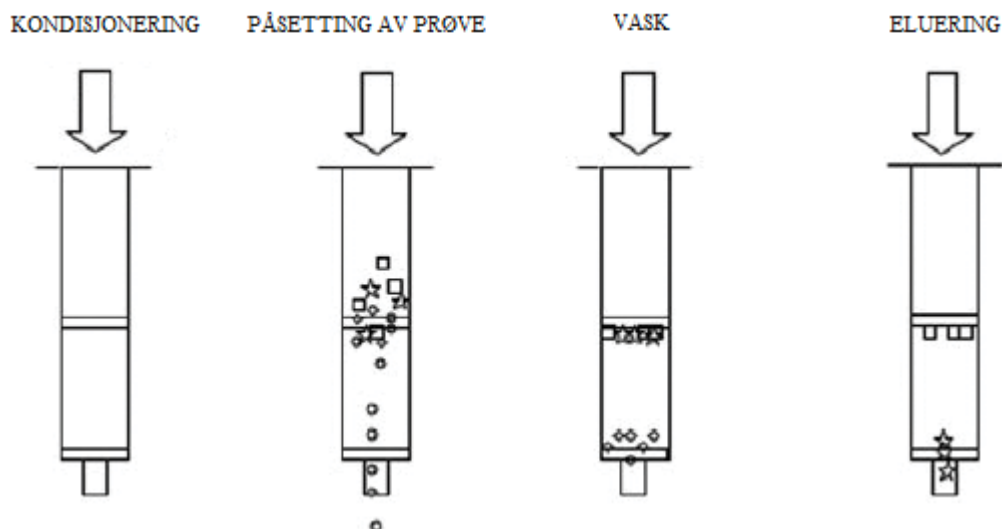
### 1.7.1 Fastfase- ekstraksjon

Fastfase ekstraksjon (SPE) er et alternativ til væske-væske ekstraksjon. SPE gir normalt både opprensing og oppkonsentrering av prøveløsningen. I SPE suges prøveløsningen gjennom en sorbent. Målet er at analyttene retarderes på sorbenten, mens forurensinger vaskes ut (men som oftest er mye forurensninger igjen på kolonnen), deretter ekstraheres analytten ut av sorbenten. Basis for ekstraksjonen er stoffers ulike evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff (sorbent) og en væske. Dette forutsetter at det faste stoffet har funksjonelle grupper på overflaten som gir interaksjon med stoffet. Det finnes forskjellige varianter av sorbenter og valget av er avhengig av hva slags interaksjoner som ønskes under ekstraksjonen. I SPE er sorbenten pakket i ekstraksjonskolonner.



Fastfase-ekstraksjon består alltid av fire hovedtrinn (figur 5), disse er:

- Kondisjonering av sorbent:  
Løsemiddel (metanol eller acetonitril) suges gjennom kolonnen, må ikke suges til kolonnen er tørket. I denne prosessen blir de funksjonelle gruppene aktivert og det aktive overflatearealet økes.
- Påsetting av prøve:  
Prøven suges gjennom kolonnen, langsomt nok til at analyttmolekylene kan holdes tilbake via interaksjoner mellom sorbent og analytt.
- Utvasking av forurensninger:  
Forbindelser som ikke har sterk nok interaksjon med sorbenten vaskes ut av kolonnen, mens analytten fortsatt sitter igjen.
- Eluering av analytten:  
Analytten elueres ut med en selektivt passende væske som selektivt bryter interaksjoner mellom sorbent og analytt.



Figur 5. De fire hovedtrinnene i fastfase ekstraksjon, kondisjonering, påsetting av prøve, vask og eluering.

### 1.7.2 Testing av antibakteriell aktivitet

Testing av bakteriell aktivitet ble på utført på Microbiology Reader Bioscreen (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) og Envision HTS Microplate reader (PerkinElmer®). Turbiditeten ble målt i brønnene hver time eller annen hver time i løpet av 24 timer, for å finne ut om bakteriene hadde vokst eller ikke. Ut fra OD-verdiene som ble målt, ble disse verdiene plottet mot tid, og man fikk da vekstkurver for hver enkelt brønn. For at en prøve skulle regnes som

aktiv (baktericid/bakteriostatisk), måtte turbiditeten til prøven som ble testet være <50 % av vekstkontrollen (bakterie + medium) ved det aktuelle tidspunktet.

Det ble også testet for antimikrobiell aktivitet på agarplater.

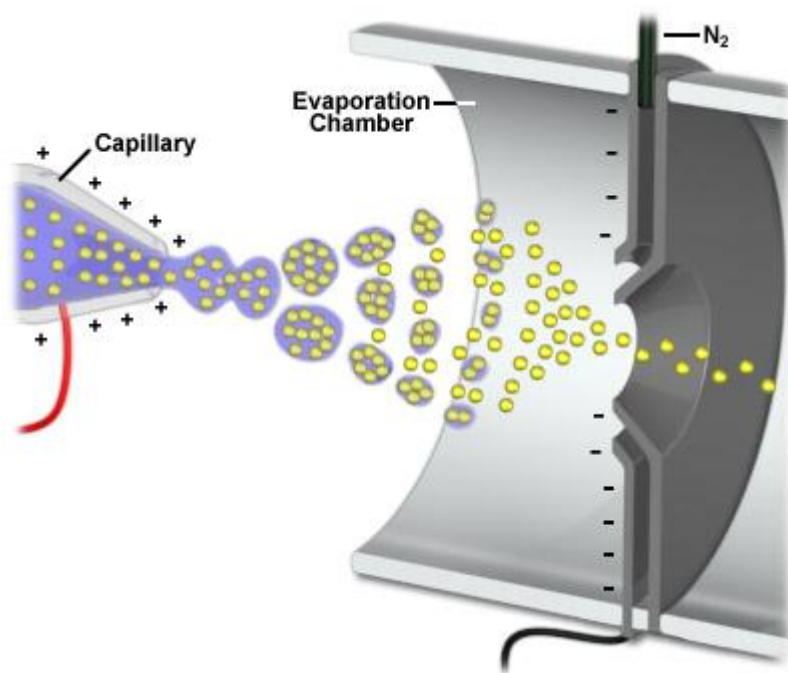
### **1.7.3 Høyeffektiv væskekromatografi (HPLC)**

Engelsk navn på væskekromatografi er High Performance Liquid Chromatography som forkortes til HPLC. Kromatografi er en samlebetegnelse på en type separasjonsmetode som benyttes til å skille stoffer fra hverandre. I kromatografi har vi to faser: en fase som er i bevegelse (mobilfasen) og en fase som er i ro (stasjonær fase). Ved HPLC benytter man vanligvis kolonner av 5-25cm lange stålrør pakket med stasjonærfase. For at separasjonen skal skje, blir analytten pumpet sammen med mobilfasen gjennom kolonnen, hvor mobilfasen har en konstant hastighet. Er det flere stoffer i prøven og dersom stasjonærfasen retarderer de ulike stoffene forskjellige, vil stoffene transporteres gjennom kolonnen med forskjellige hastighet. Stoffene kommer da ut av kolonnen på forskjellige tidspunkter og blir separert. I denne oppgaven blir det brukt omvendt fase kromatografi hvor stasjonærfasen er C18 materiale og mobilfasen er en løsning som består av ACN, vann og TFA, og forholdet mellom disse endres i løpet av analysen (gradient). Væskestrømmen føres gjennom en detektor som gir et elektronisk signal for stoffene som kommer ut. Signalene blir fra detektoren behandlet enten i en datamaskin med egnet programvare eller en integrator. Resultatene skrives ut som kromatogrammer. Det finnes flere ulike detektorer som UV-detektor, fluorescens-detektor, elektrokjemisk detektor, brytningsindex-detektor og massespektrometret. I denne oppgaven ble det brukt fotodiodearray (PDA) – detektor til å måle absorbansen. Ved å bruke diodearraydetektoren kan man ta opp et fullt real time UV-spektrum av forbindelsene, som kan indikere hvilke kromoforer forbindelsene inneholder. Man kan også lett endre bølgelengden, slik at hvert stoff kan detekteres ved optimal bølgelengde.

### **1.7.4 Massespektrometri**

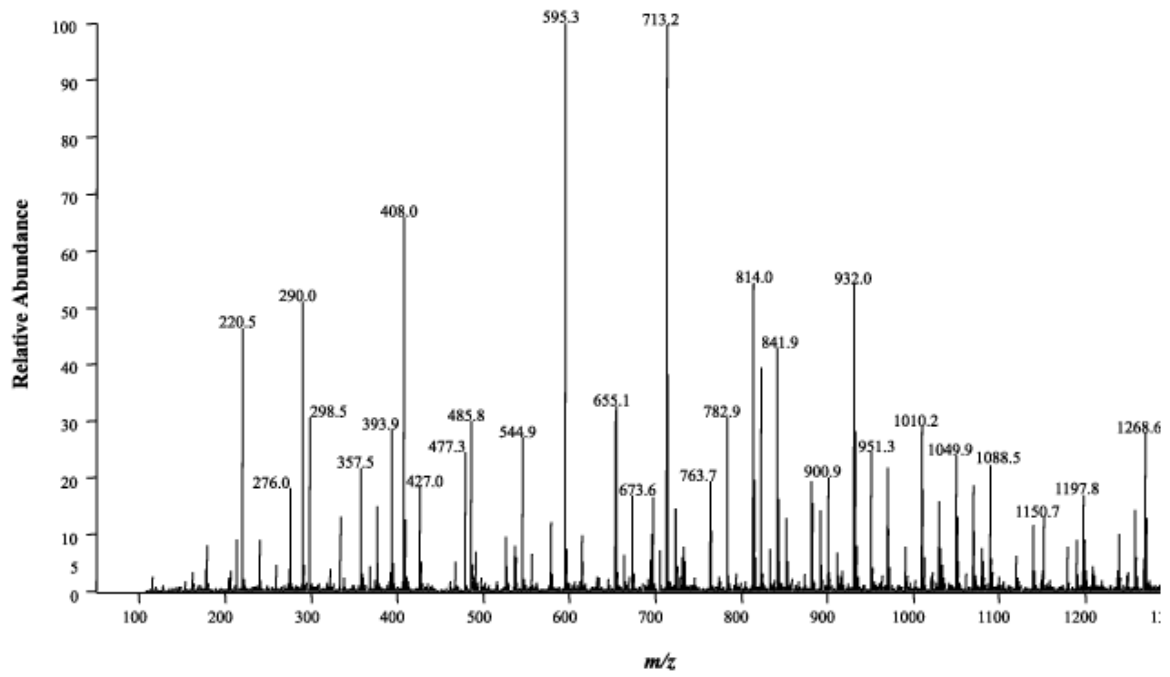
Massespektrometri (MS) er en analysemetode som brukes til både kvantitative analyser og kvalitative analyser (identifikasjon). MS benyttes ofte i analyser av legemidler i biologiske prøver. Det finnes mange ulike måter å ionisere organiske forbindelser. I denne oppgaven blir det benyttet elektro spray ionisering (ESI) for MS - analyse.

I ESI-MS blir det produsert ioniserte molekyler i gassform fra væsker, se figur 6. Væsken som analyseres pumpes gjennom et kapillær rør som det er lagt en spenning på (3-6 kV). Dette fører til at det blir dannet en sky av små ladede dråper. Varm tørregass blir tilført dråpene før de når inlet til selve massefilteret, dette fører til at væsken fordamper fra overflaten. Ettersom væsken fordamper vil dråpene krympe og til slutt nå et punkt hvor frastøtningkrefter mellom like ladninger i dråpen blir for stor, dette fører til at dråpene sprenge og det frigjøres ioniserte analytter.



Figur 6. Elektrospray ionisering (65)

Disse ionene føres videre inn i masse analysatoren ved hjelp av elektrisk spenning. Her blir ionene separert etter forholdet mellom masse ( $m$ ) og ladning ( $z$ ). Det finns mange ulike massefiltre, i denne oppgaven er det brukt massefilter av quadropol (Q) type og Time Of Flight (TOF) type. Resultatet fra en massespektrometrisk analyse registreres i et massespektrum hvor relativ intensitet av ioner plottes i et massespekter som funksjon av  $m/z$ , se figur 7.



Figur 7. Eksempel på MS-spekter (66)

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Kjemikalier

Acetonitrile (ACN, Gradient grade, Liquid chromatography, MERCK, Darmstadt, Germany)

Trifluoroacetic acid (TFA, Sequence analysis test, FLUKA Chemie AG, Buchs, Switzerland)

Milli-Q water (Millipore Corp., Massachusetts, USA)

Formic Acid (Analytic grade, Merck, Darmstadt, Germany)

Methanol (Gradient grade, FLUKA Chemie AG, Buchs, Switzerland)

### 2.2 Innsamling av prøvemateriale

Plasma og blodceller fra sjøstjerne artene *Solaster endeca*, *Crossaster papposus* og *Urasterias linckii* var allerede innsamlet og frysetørket. På grunn av for lite prøvemateriale ble det i begynnelsen av prosjektet samlet mer prøvemateriale fra en sjøstjerne av arten *C. papposus*, og høsten 2008 ble det samlet materiale fra 15 *S. endeca* og en *C. papposus*. Prøvematerialet ble samlet ved at blodet (coelomvæske) ble tappet i sentrifugrør, deretter ble de sentrifugert med 3000 runder per minutt i 5 minutter slik at celler og plasma ble separert. Prøvene ble så fryst ned til -80 °C og videre frysetørket.

Vinteren 2009 ble 2 hele kropper av *S. endeca* og 2 hele kropper av *C. papposus* frysetørket og ble videre brukt til å finne aktive forbindelser.

### 2.3 Ekstraksjon

#### 2.3.1 Grovekstraksjon

Frysetørket materiale ble ekstrahert med 10 volum (v/w tørrvekt) 60 % ACN + 0,1 % TFA i 24 timer på kjølerom med omrøring. Etter 24 timer dannet ekstraktene to faser; en organisk fase og en vannfase, og disse fasene ble skilt på best mulig måte med en pipette. Deretter ble materialet grovekstrahert videre i 24 timer med samme betingelser som tidligere. Fasene ble skilt etter ca. 24 timer, og slått sammen med fasene fra 1 gangs ekstraksjon. Fasene ble satt på fryserom i 1-2 timer (noe som gir en mer effektiv fase-skillelse) og en siste separasjon ble utført. Fasene lå på fryserommet inntil inndamping. Fasene ble vakuumsentrifugert i 50ml

Nunc-rør, som ble veid på forhånd slik at man vet hvor mye tørrstoff det er igjen etter tørking. Pelleten ble fryst ned og tatt vare på.

**Tabell 1. Oversikt over mengde tørrstoff i ulike ekstrakter og fraksjoner.**

Art	Materiale	Råmateriale Tørrstoff (gram)	Org. Ekstraksjon (gram)	Vann. Ekstraksjon (gram)	SPE (mg)		
					10 %	40 %	80 %
<i>S. endeca</i>	Plasma	9,29	0,04	8,77	0,01	0,01	0,04
	Blodceller	1,12	0,03	0,36	0,02	0,03	0,03
	Hel kropp	30,50	*	8,63	0,22	0,50	0,20
<i>C. papposus</i>	Plasma	6,20	0,15	5,03	0,01	0,01	0,02
	Blodceller	0,16	0,02	0,05	0,01	0,02	0,01
	Hel kropp	32,70	*	5,72	1,09	1,50	0,29
<i>U. linckii</i>	Plasma	6,80	0,01	6,51	0,09	0,04	0,01
	Blodceller	0,49	0,04	0,23	0,01	0,03	0,01

\* Ikke fullstendig tørket og/eller sterkt farget

### 2.3.2 Fast fase ekstraksjon

I denne oppgaven ble det benyttet C18 SPE-kolonner (Waters Sep-Pak®, C18). Ekstraksjonen er basert på hydrofob interaksjon mellom analytt og sorbent.

Etter løsemiddelestraksjon og fase-separasjon løses de inndampede prøvene i 0,05 % TFA til en konsentrasjon på 100 mg/ml. Prøvene ble videre satt på enten 1, 5 eller 10 g C-18 SPE-kolonner koblet til vakuu. Kolonnestørrelse ble valgt på bakgrunn av hvor mye prøvemateriale (gram tørrvekt) som skulle ekstraheres. Ved bruk av 1 grams kolonner, ble kolonnene kondisjonert med 10 ml ACN, deretter ble de ekvilibrert med ca. 8ml 0,05 % TFA. Prøvene ble satt på og kolonnene ble vasket med 10 ml 0,05 % TFA. Retardert stoff ble videre eluert med 10 ml 10% ACN, 40% ACN og 80% ACN (med 0,05% TFA) i hver sin fraksjoner. Ekstraksjon ved bruk av 10 grams kolonner ble utført på samme måte, men her ble det brukt 30 ml ACN for kondisjonering, 30 ml 0,05 % TFA for ekvilibrering, 50 ml 0,05 % TFA for vask og 35 ml av de ulike elueringsvæskene.

SPE- eluatene ble tørket ved hjelp av vakuu sentrifuge og veid før testing av antibakteriell aktivitet. Tabell 1 viser hvor mye mengder tørrstoff man fikk ekstrahert.

## 2.4 Test av antibakteriell aktivitet

### 2.4.1 Bakteriedyrking

Eluatene fra fastfase-ekstraksjon ble testet mot 4 ulike bakteriestammer; 2 Gram positive (*Corynebacterium glutamicum* og *Staphylococcus aureus*) og 2 Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Tørrstoff av eluatene ble løst i Milli-Q vann, til en konsentrasjon på 40 mg/ml. Bakteriestammene ble sådd ut på Mueller Hinton (MH) plater og inkubert ved romtemperatur i 1-2 dager. En koloni fra hver bakterie ble så dyrket i reagensrør med 5 ml MH-medium (ferdiglagd) over natt på risting ved 37 °C. Neste dag ble det overført 20 µl av bakterielløsningen til nye 5 ml reagensrør med MH-medium som ble inkubert ved risting i 37 °C i ca. 2 timer, slik at vi fikk ”friske og levedyktige” bakterier i eksponensiell vekstfase. For hver av bakteriesuspensjonene ble OD<sub>600</sub> målt, og ut av disse OD-verdiene (tabell 2) ble det lagd en ny standard suspensjon med fast bakterietetthet (ca. 2,5-3 x 10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup>). Antall bakterier per 50 µl (per brønn) blir ca. 1250-1500 ved start av inkuberingen.

**Tabell 2. Mengde bakteriesuspensjon som trengs for å få bakterietetthet på ca. 2,5-3 x 10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup>**

OD <sub>600</sub> -verdier	Mengde bakteriesuspensjon som blandes i ny 10ml 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

Dersom OD-verdien lå høyere enn 0,150, ble 1 ml overført til 10 ml sentrifugerør med MH-medium og ristes godt, og ny OD-verdi ble målt.

### 2.4.2 Antibakteriell testing på Bioscreen/Envision

Testing av antimikrobiell aktivitet mot *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* og *C. glutamicum*, ble utført i mikrotiterplater (100-brønners Honeycomb-plate, Labsystems Oy, Helsinki, Finland) som kjøres på Bioscreen C plateleser, eller i 96 brønners mikrotiterbrett, som kjøres på Envision platelaser. Begge maskinene måler turbiditeten i brønnene. Bioscreen har en ”wide band” filter for turbiditetsmålinger (450-580 nm). ”Wide band” brukes ofte i arbeid innen

mikrobiologi, fordi resultater ikke blir påvirket ved farge forandringer i mediet eller prøvematerialet. Envision målet turbiditeten i brønnene ved 600 nm.

Fra de tre artene av sjøstjerner ble SPE-eluatene 10 %, 40 % og 80 % plasma/celler og organisk fase testet mot de nevnte bakteriene. Utgangskonsentrasjonen til eluatene fra celler og plasma var 10 mg/ml, men ble fortynnet 2 folds nedover i rekken, slik at i mikrotiterplatene ble konsentrasjonene i (50 µl): 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,63 mg/ml, 0,31 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml og 0,02 mg/ml. Mens utgangskonsentrasjonen til eluatene fra kropp var 50 mg/ml og ble fortynnet 2 folds nedover i rekken. I alle brønner ble det deretter tilsatt 50 µl bakteriesuspensjon i MH-medium med fast bakterietetthet. Som vekstkontroll var det bare tilsatt 50 µl vann og 50 µl bakteriemedium, som man videre kunne bruke til å sammenligne OD-verdiene i testprøvene. Mikrotiterplatene (med lokk på) ble plassert i Microbiology Workstation Bioscreen C, inkubert ved 37 °C i 24 timer med risting før hver avlesning, og avlesning annen hver time.

På grunn av kapasitetsproblemer ble enkelte analyser utført på Envision plateleser. Ved bruk av Envision ble fortynningene 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,63 mg/ml, 0,31 mg/ml, 0,16 mg/ml, 0,08mg/ml, ellers var oppsettet lik som for mikrotiterplater på Bioscreen. Ved bruk av envision plateler ble platene laminert med teip direkte over brønnene, og det ble stukket hull i teipen i hver brønn for å hindre kondensering. Platene ble plassert i maskinene (uten lokk), inkubert i 24 timer, med risting før avlesning ble innstilt, og med avlesning hver time i 24 timer.

#### **2.4.4 Antibakteriell testing på agarplater**

Prøvene som ikke lot seg tørke fullstendig etter SPE og/eller som var sterkt farget, ble testet på agarplater (prøvene merket med stjerne \* i tabell 1). Bakteriene ble strøket ut på agarplatene med en konsentrasjon lik den som utføres ved mikrotiterplate-test, deretter ble det laget små brønner i platen hvor en liten del av prøven som skulle testes ble tilsatt. Etter at prøven var tilsatt ble agarplaten satt i kjøleskapet (+4 °C) i 24 timer, slik at prøven kunne diffundere ut i platen, mens bakteriene ble ”hemmet”. Etter 24 timer ble platen tatt ut og lagt i varmeskap ved 37 °C, slik at bakteriene kunne begynne å vokse. Resultatet ble avlest dagen etter, dersom man så at det var en klar sone hvor bakteriene ikke vokste, ble dette tolket som at prøven hadde aktivitet.



## 2.5 Separasjon ved hjelp av HPLC

### 2.5.1 Utstyr

Injektor : 717 autosampler (Waters Corp., Millford)

Degasser: In-Line Degasser AF (Waters)

Pumpe: 600E (Waters)

Detektor: 2996 photodiodearray (Waters)

Software: Millennium<sup>98</sup> V4.0

Fraksjonssamler: FC 204 fraction collector (Gilson Inc., Middleton, IL)

Kolonne: Sunfire<sup>TM</sup>, Prep C18, 10 x 250; 5 µm, Waters.

### 2.5.2 Eksperimentelt

De mest aktive SPE-eluatene (40 % SPE og 80 % SPE fra *S. endeca* celler, 40 % SPE fra *C. papposus* celler, 40 % ACN fra *U. lickenii* plasma, og 40 % ACN fra *S. endeca* kropp og *C. papposus* kropp) ble videre separert på HPLC.

Til videre fraksjonering av de nevnte prøvene ble det brukt Sunfire<sup>TM</sup>, Prep C18, 10 x 250; 5 µm, kolonne fra Waters (kolonne 1), elueringshastigheten var 4 ml/min og det ble samlet 1 minutt fraksjoner med fraksjonssamler.

Det ble injisert 500 µl løsning av hver av SPE-eluatene 40 % ACN *S. endeca* celler, *C. papposus* celler og *U. lickenii* plasma, og prøvene ble kjørt i 60 minutter med bruk av en lineær mobilfasegradient bestående 0-60 % ACN.

På HPLC ble det også injisert 500 µl av 80 % ACN SPE-eluat av *S. endeca*, med en 60 minutters lineær mobilfasegradient med 20 % til 80 % ACN.

Av SPE-eluat 40 % ACN *S. endeca* kropp og *C. papposus* kropp ble det injisert 2000 µl med prøve, og prøvene ble kjørt over 60 minutter med en lineær mobilfasegradient av 0-60 % ACN.

Alle HPLC-fraksjonene ble tørket, løst i 300 µl Milli-Q vann og testet for antibakteriell aktivitet. Aktive HPLC-fraksjoner ble tatt vare på, for videre MS-analyse. Dersom det ikke var nok stoff til MS-analysen etter aktivitetstesting, ble det kjørt HPLC enda en gang av samme prøve. Kromatogram og spektra fra 1. kjøring og 2. kjøring ble sammenlignet og de aktive toppene ble tatt ut og løst i 300 µl MilliQ-vann og MS-analyse ble utført, uten at disse ble direkte testet for antibakteriell aktivitet.

**Tabell 3. Innstillinger for metode ved HPLC**

Fraksjon	40 %	80 %
Metode	A	B
Injeksjonsvolum	500 µl (celler og plasma) 2000 µl (kropp)	500 µl (celler og plasma)
Kolonne	Kolonne 1	Kolonne 1
Mobilfase A	0,05 % TFA i MilliQ-vann	0,05 % TFA MilliQ-vann
Mobilfase B	80 % ACN + 0,05 % TFA	80 % ACN + 0,05 % TFA
Mobilfase gradient	0-60 % ACN, Lineær gradient 0-75 % B over 60 min	20-80 % ACN Lineær gradient 25-100 % B over 60 min
Mobilfase flow	4 ml/min	4 ml/min

## 2.6 MS-analyse

### 2.6.1 Utstyr

Quattro LC quadropol MS (Micromass)

Pump #11 (Harvard apparatus)

Software: Masslynx XT (Micromass) versjon 3.4

### 2.6.2 Eksperimentelt

Etter antibakteriell testing av HPLC-separerte fraksjoner, ble fraksjonene som viste antibakteriell aktivitet videre analysert på ESI-MS med betingelser som angitt i tabell 4. Det ble brukt cone voltage i området 30 – 50, for å få best mulig spektra fra analysen.

**Tabell 4. Betingelser for MS-analyse av antibakterielle fraksjoner.**

Betingelser	Singel-MS
Løsemiddel	300-600 µl Milli-Q vann, 40 µl ACN og 20 µl maursyre
Flow (µl/min)	20
ESI-modus	Positiv
Capillary (kV)	3,20
Cone (V)	20-60
Extractor (V)	4
RF lens (V)	0,3
Source Temp. (°C)	100
Desolvation Temp. °C	250
Resolution (LM1 og HM1)	15
Resolution (LM2 og HM2)	14,5
Ion energy (1 og 2)	1
Entrance	30
Collision	2
Exit	30
Multiplier (V)	600
Run duration (min)	3,5 – 6
Scan time (sek)	1,2
Inter scan time	0,1
Start mass (m/z)	50
End mass (m/z)	2000

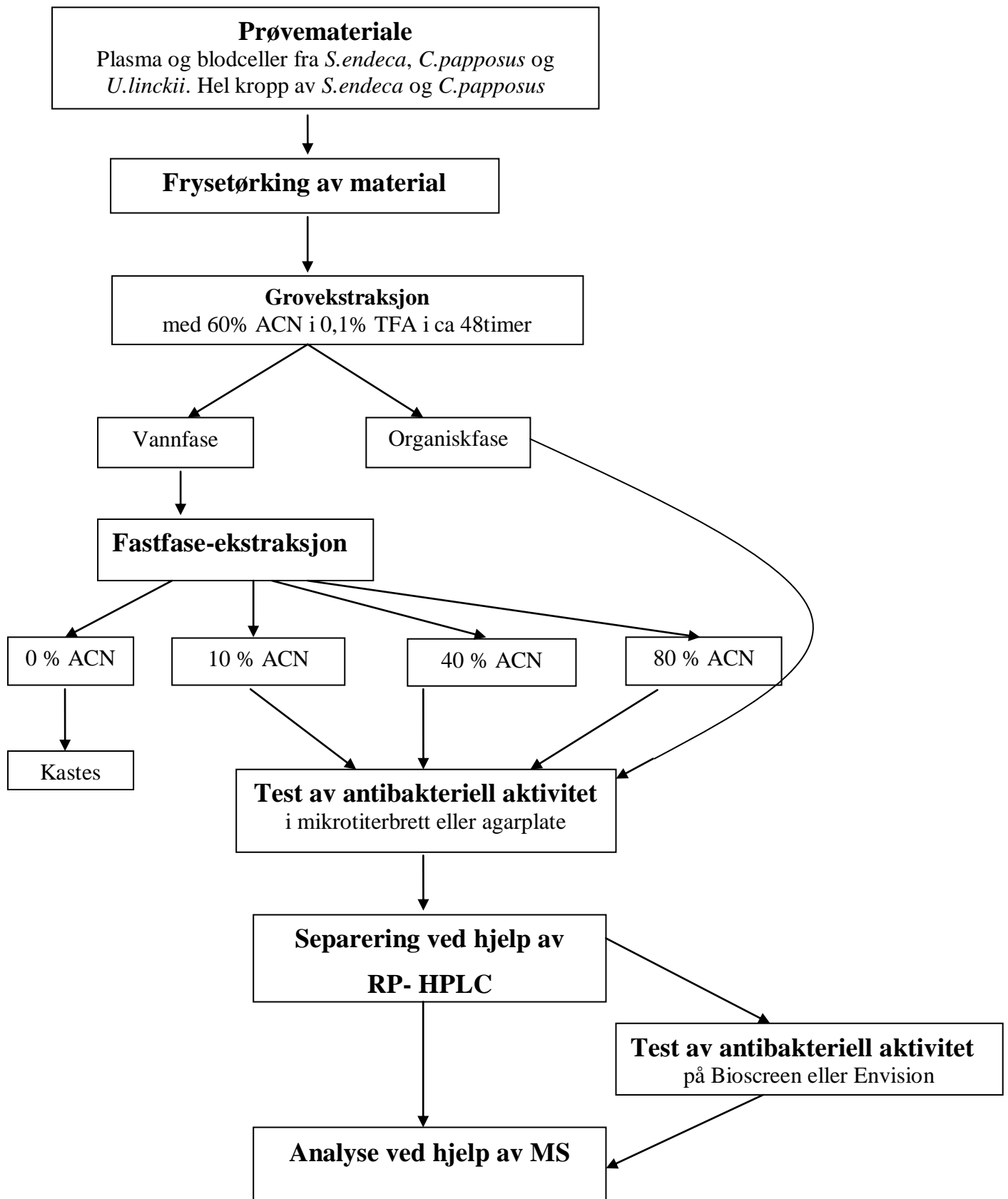
Basert på ESI-MS analysen, ble aktuelle fraksjoner videre analysert på Q-TOF i full scan mode. Aktuelle ioner (m/z -verdi) ble deretter analysert ved hjelp av MS/MS.

Kollisjonsenergi ble systematisk endret til det ble vurdert at aktuelt ion ble fragmentert i passende grad. Innstillingene er angitt i tabell 5.

**Tabell 5. Optimale betingelser for MS – MS/MS - analyse av antibakterielle fraksjoner.**

Betingelser	Singel-MS	MS/MS
Løsemiddel	400 µl Milli-Q vann, 200 µl metanol og 20 µl maursyre	400 µl Milli-Q vann, 200 µl metanol og 20 µl maursyre
Flow (µl/min)	5	5
ESI-modus	Positiv	Positiv
Capillary (kV)	3,0	3,0
Cone (V)	-	10-100
Rf lens 1 (V)	65	65
Rf lens 2 (V)	1,0	1,0
Source Temp. (°C)	30	30
Desolvation Temp. (°C)	130	130
Resolution LM	10,0	10,0
Resolution HM	10,0	10,0
Collision	10 – 60	10 – 60
Ion energy 1	1,8	1,8
Steering	-1,01	-1,01
Entrance	65	65
Prefilter	6,4	6,4
Multiplier (V)	650	650
MCP	2200	2200
Run duration (min)	1-3	2 – 5
Scan time (sek)	1,2	1,2
Inter scan time	0,1	0,1
Start mass (m/z)	50	50
End mass (m/z)	2000	2000

Figur 8 gir en forenklet oversikt over metodene som er beskrevet i avsnittene 2.2 – 2.6.



Figur 8. Oversikt over metodikk brukt i studiet.

## 3 Resultater og diskusjon

Prøvematerialer har blitt samlet, frysetørket, og ekstrahert med 60 % ACN + 0,1 % TFA. På grunn av høyt saltinnhold i prøvene ble det dannet 2 faser; en organisk fase og en vannfase. Videre ble vannfasene separert ytterligere til 10, 40 og 80 % SPE-eluatere, ved hjelp av fastfase ekstraksjon, eluatene og organiske faser ble testet for antibakteriell aktivitet på mikrotiterplater og agarplater.

### 3.1 Antibakteriell aktivitet

Tabell 6 viser hvilke SPE-eluatere og hvilke organiske faser fra celler og plasma fra *U. linckii*, *C. papposus*, og *S. endeca* som viser antibakteriell aktivitet. Tallene viser den laveste konsentrasjon (i tørrstoff) som gir aktivitet. De fleste av SPE-eluatene har antibakteriell aktivitet mot en eller flere bakterier som de ble testet mot, men med ulike tørrstoff konsentrasjoner.

Det ble påvist noe aktivitet i de organiske fasene fra de ulike artene, hovedsakelig rettet mot *C. glutamicum*, bare *S. endeca* plasma organisk fase gav i tillegg aktivitet mot *P. auruginosa*. Ingen av SPE-eluatene eller de organiske fasene gav aktivitet mot den Gram positive *S. aureus*, men noen gav aktivitet mot den Gram positive *C. glutamicum*.

De fleste 40 % og 80 % SPE-eluatene som ble ekstrahert fra celler er aktive mot de fleste av bakteriene som de ble testet mot, unntatt *S. aureus*. Prøven som var mest aktiv var *S. endeca* celler 40 % SPE, som viste aktivitet mot *E. coli* og *P. auruginosa* med et tørrstoff konsentrasjon på henholdsvis 0,02 mg/ml (den laveste konsentrasjonen som ble testet) og 0,16 mg/ml.

De prøvene som var mest aktive mot *C. glutamicum* var *S. endeca* plasma og *U. Linckii* plasma 10 % og 40 % SPE-eluat som gav aktivitet ved et tørrstoff konsentrasjon på 0,63 mg/ml.

**Tabell 6. Antibakteriell aktivitet av ekstraktene fra *S. endeca*, *C. papposus* og *U. linckii* celler og plasma, mot bakteriene *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. glutamicum* og *S. aureus*.**

Organ	Fraksjon (% ACN)	Antibakteriell aktivitet (mg/ml)			
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Urasterias linckii</i> celler	10	-	-	5	-
	40	2,5	2,5	5	-
	80	2,5	-	-	-
	Org	-	-	1,25	-
<i>Urasterias linckii</i> plasma	10	-	-	0,63	-
	40	-	-	0,63	-
	80	-	1,25	1,25	-
	Org	-	-	-	-
<i>Crossaster papposus</i> celler	10	-	2,5	5	-
	40	-	0,31	5	-
	80	5	0,63	-	-
	Org	-	-	5	-
<i>Crossaster papposus</i> plasma	10	-	-	-	-
	40	-	-	5	-
	80	-	-	-	-
	Org	-	-	5	-
<i>Solaster endeca</i> celler	10	2,5	0,16	1,25	-
	40	1,25	0,02	5	-
	80	0,16	0,04	-	-
	Org	-	-	-	-
<i>Solaster endeca</i> plasma	10	-	-	-	-
	40	-	-	-	-
	80	-	-	-	-
	Org	5	-	0,63	-

Tall: indikerer laveste konsentrasjon som gir antibakteriell aktivitet.

- : ingen aktivitet ved høyeste konsentrasjon testet (5 mg/ml)

Fra tabell 7, kan vi se hvilke SPE-eluatere og organiske ekstrakter fra kropp av *C. papposus* og *S. endeca* som gir antibakteriell aktivitet mot *E. coli* og *P. aeruginosa*. Prøvene ble ikke testet mot de Gram positive bakteriene, *C. glutamicum* og *S. aureus*, på grunn av dyrkingsproblemer med disse bakteriene ved test-tidspunktet. Som man kan se fra tabell 7 er *S. endeca* kropp 10 og 40 % SPE aktive mot begge Gram negative bakteriene, mens 80 % SPE ikke gav noe aktivitet. Det ser ut som *E. coli* er mer følsom for SPE-eluatene enn *P. aeruginosa*, hvor 10 og 40 % SPE gir aktivitet ved konsentrasjoner på henholdsvis 12,5 mg/ml og 25 mg/ml. Alle SPE-eluatene (10, 40 og 80 %) fra *C. papposus* gav aktivitet mot begge bakteriene. Laveste konsentrasjon som gir aktivitet mot bakteriene er 25 mg/ml. De organiske prøvene fra *S. endeca* og *C. papposus* kropp, som ble testet på agarplate mot *E. coli* og *P. aeruginosa* hadde ingen aktivitet mot noen av bakteriene.

**Tabell 7. Antibakteriell aktivitet av ekstraktene fra *S. endeca* og *C. papposus* kropp mot bakteriene *P.aeruginosa*, og *E. coli*.**

Organ	Fraksjon (% ACN)	Antibakteriell aktivitet (mg/ml)	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
<i>Crossaster papposus</i> kropp	10	25	25
	40	25	25
	80	25	50
	Org	-#	-#
<i>Solaster endeca</i> kropp	10	25	12,5
	40	25	12,5
	80	-	-
	Org	-#	-#

Tall: indikerer laveste konsentrasjon som gir antibakteriell aktivitet.

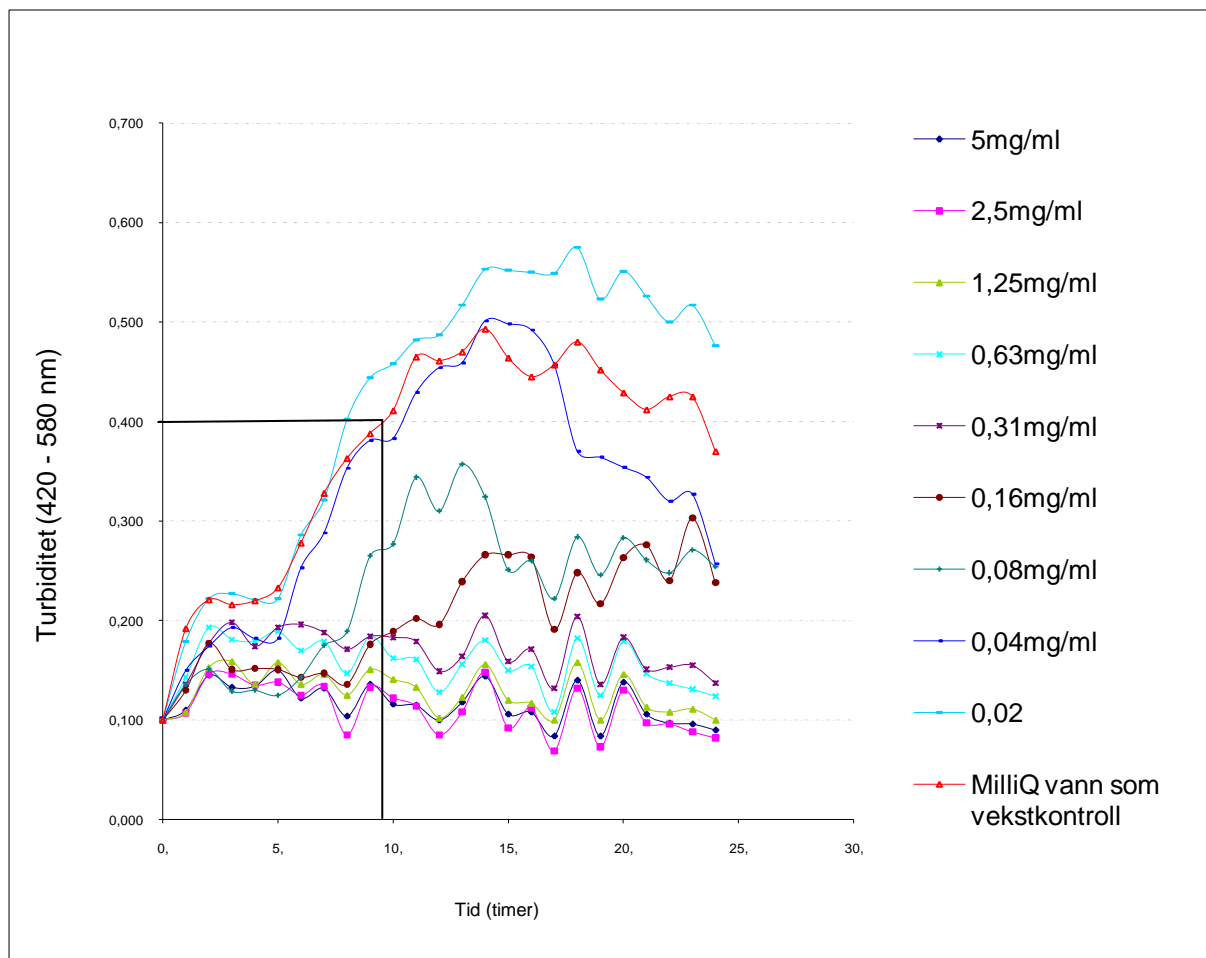
- : ingen aktivitet ved høyeste konsentrasjon testet

# : prøvene ble testet på agarplater.

For å avgjøre hvorvidt en prøve er aktiv eller ikke, sammenligner man OD-verdiene til de test-prøvene (kurvene) med verdiene til vekstkontrollen, og dersom OD-verdien for test-prøven er mindre enn 50 % av kontrollen i området der kurven er brattest og i ferd med å ”flate ut”, tolket man disse som aktive (markert med svart linje på figur 9).

Av de eluatene som har antibakteriell aktivitet ved lave konsentrasjoner, kan man tydelig se av vekstkurvene at aktiviteten avtar med konsentrasjonen. Figur 9, viser vekstkurver for 10 % SPE-eluat av *S. endeca* celler, i en fortyningsserie som er testet mot *E. coli*. Testen gjøres over 24 timer, hvor turbiditet ved 420-580 nm ble avlest hver time. Det er fullstendig hemming av bakterien i de høyeste konsentrasjonene (5,0 – 0,31 mg/ml). Ved konsentrasjonene 0,16 mg/ml og 0,08 mg/ml ser man av kurven at substansen ikke lenger hemmer bakteriene fullstendig. OD-verdiene på disse ble sammenlignet med vekstkontrollen (ved OD lik ca. 0,4) og man tolket at konsentrasjonen ved 0,16 mg/ml hadde antibakteriell aktivitet, mens 0,08 mg/ml konsentrasjonen (som hemmet bakterien) ble tolket som at den ikke hadde aktivitet. Man kan sammenligne de laveste konsentrasjonene (0,04 mg/ml og 0,02 mg/ml) med vekstkontrollen og ser at bakteriene vokser like raskt som i kontrollen, dette ble klart tolket som ingen aktivitet.





Figur 9. Vekstkurver *S. endeca* celler 10 SPE % over 24 timer der turbiditet ved 420-580nm ble avlest hver time. Konsentrasjonene er oppgitt i milligram tørrvekt per milliliter. Svart linje markerer tidspunktet med sammenligning av OD-verdiene.

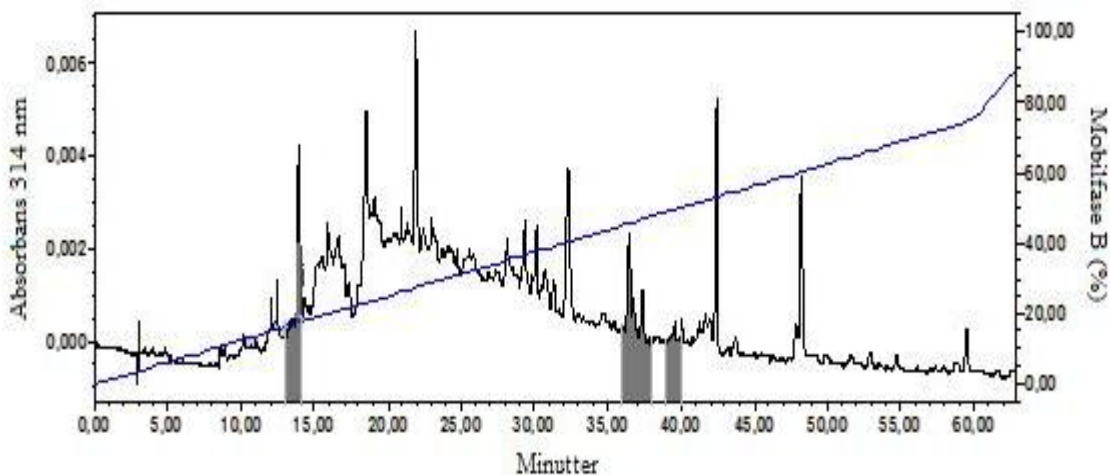
## 3.2 Analyse ved hjelp av HPLC og MS

Aktive SPE-eluatere ble separert på HPLC og fraksjonene ble testet for aktivitet. Aktive HPLC-fraksjoner har videre blitt analysert ved hjelp av ESI-MS og MS/MS.

### 3.2.1 *U. linckii* plasma 40 % SPE

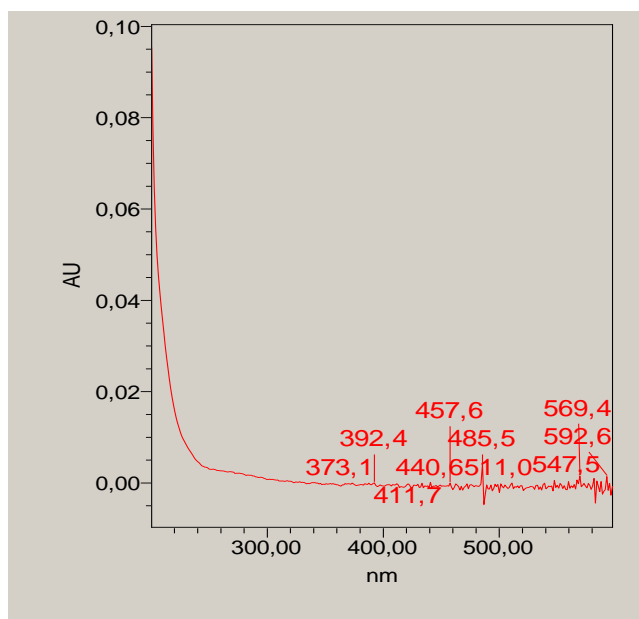
HPLC-analysen etter metode A (tabell 3) gav kromatogrammet som vist i figur 10.

Aktivitetstesting viser at hemming av bakterien *C. glutamicum* kommer i fraksjon 14, 36, 37 og 39 (markert grått). Antibakteriell aktivitetstesting ble utført bare mot *C. glutamicum* siden dette var den eneste bakterien som SPE-eluatet hadde aktivitet mot. Aktiviteten er spredt på fraksjoner med ulike retensjonstider, noe som kan tyde på at aktiviteten skyldes flere forbindelser. De aktive HPLC-fraksjonene ble analysert ved hjelp av ESI-MS, men resultatet fra MS-analysen gav spektra med svært svake signaler, som var vanskelig å tolke.



Figur 10. HPLC-kromatogram til *U. linckii* plasma 40 % SPE. Grått felt viser aktive fraksjoner.

UV-spekteret til de aktive fraksjonene viser at absorpsjonen faller raskt i området 200-220 nm uten senere maksima. Aromatiske aminosyrer absorberer vanligvis ved 280 nm, dette indikerer at de aktive fraksjonene ikke er peptider med aromatiske aminosyrer. Figur 11 viser et eksempel på hvordan spektrene til de aktive fraksjonene så ut.

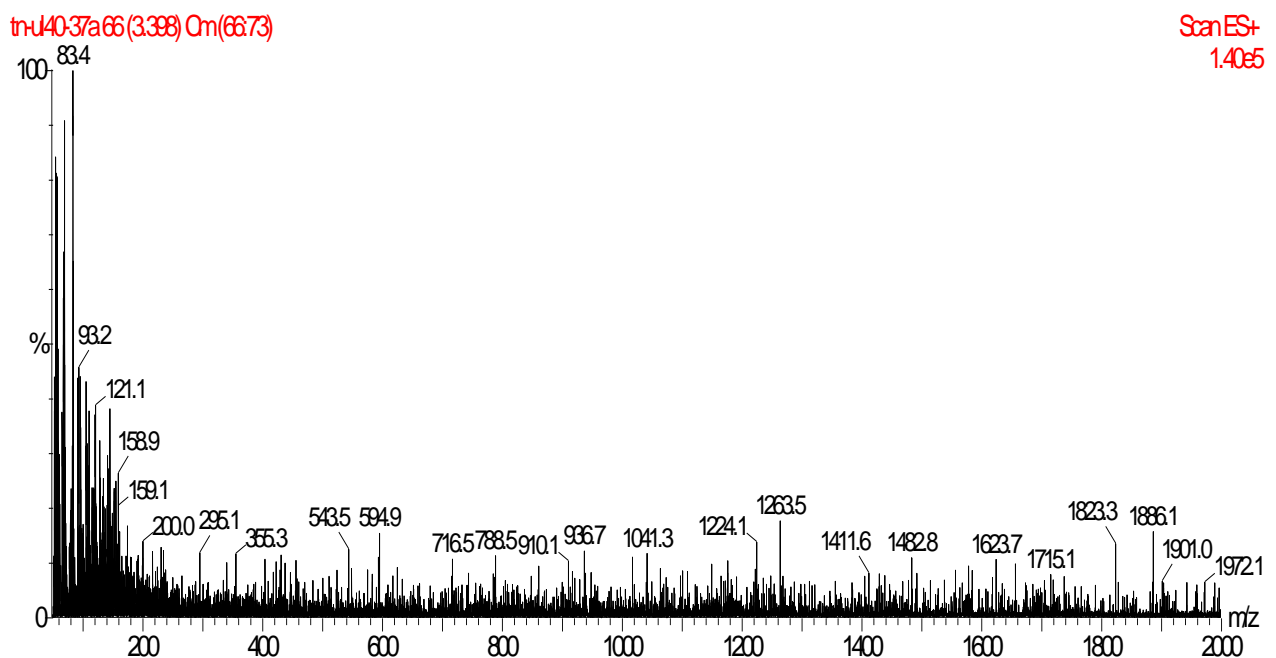


Figur 11. UV-spekteret til HPLC-fraksjon 14 fra *U. linckii* plasma 40 % SPE

Det ble lett etter asterosaponiner ved ioner med  $m/z$ -verdier mellom 1000 – 1500. Asterosaponiner har en molekylvekt i området 1000-1500 Da, og inneholder sukkerkjeder hvor de vanligste suktermolekylene er deoksyheksosor med molekylvekt 150, heksososer med molekylvekt 164, og pentoser med molekylvekt 180. Ved fragmentering i

massespektrometri vil dette gi massetap på henholdsvis 132, 146 og 162, men fra MS-spektrene fant man ikke fragmenteringsmønsteret til asterosaponiner.

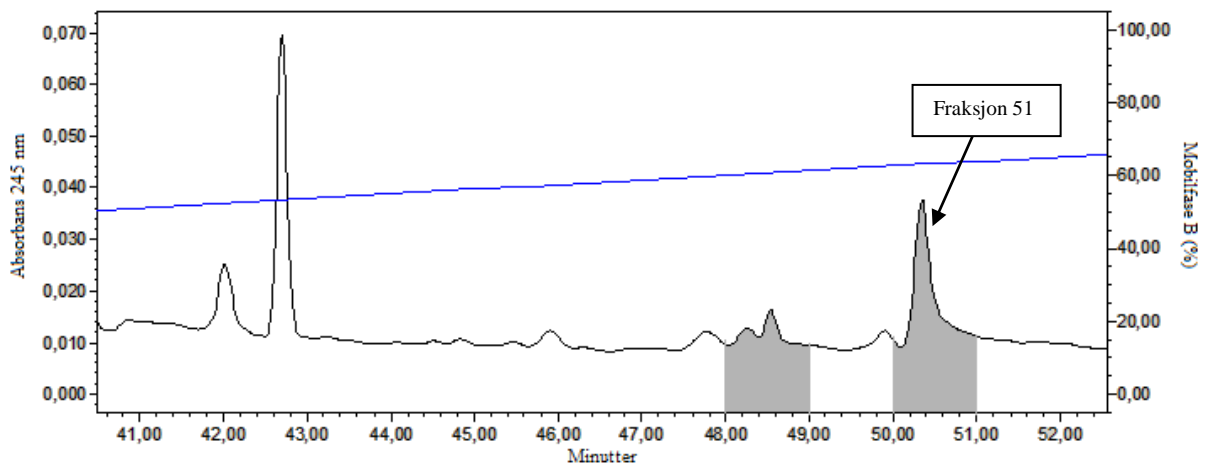
I *U. linckii* plasma 40 % SPE er det aktive forbindelser, og ved separasjon ved hjelp av HPLC gir noen fraksjoner antibakteriell aktivitet. Ut fra resultater fra MS-analysen (ESI-MS positiv mode) var det derimot ingen tolkbare data, se eksempel figur 12. Grunnen kan være at fraksjonene hadde for lav konsentrasjon for MS-analysen, eller at de aktive stoffene ikke lot seg ionisere. En mulighet for å få mer detaljert informasjon om aktive forbindelser i denne sjøstjerne-arten, blir å samle inn mer materiale, gjøre prosessen om igjen, og i tillegg analysere aktive fraksjoner på ESI-MS i negativ modus.



Figur 12. MS-spekteret til HPLC-fraksjon 37 fra *U. linckii* plasma 40 % SPE

### 3.2.2 *S. endeca* celler 40 % SPE

Figur 13 viser HPLC-kromatogrammet til *S. endeca* i det aktive området, aktive områder er markert med gråfarge i kromatogrammet. HPLC-fraksjonene 49 og 51 fra *S. endeca* celler 40 % SPE gav antibakteriell aktivitet mot *E. coli*. Aktive HPLC-fraksjoner ble analysert ved hjelp av MS, men spektrum for fraksjon 49 var for dårlig til å kunne tolkes. Fraksjon 51 (med pil i HPLC-kromatogrammet) hadde flere ioner med m/z verdier i området 700-1400.



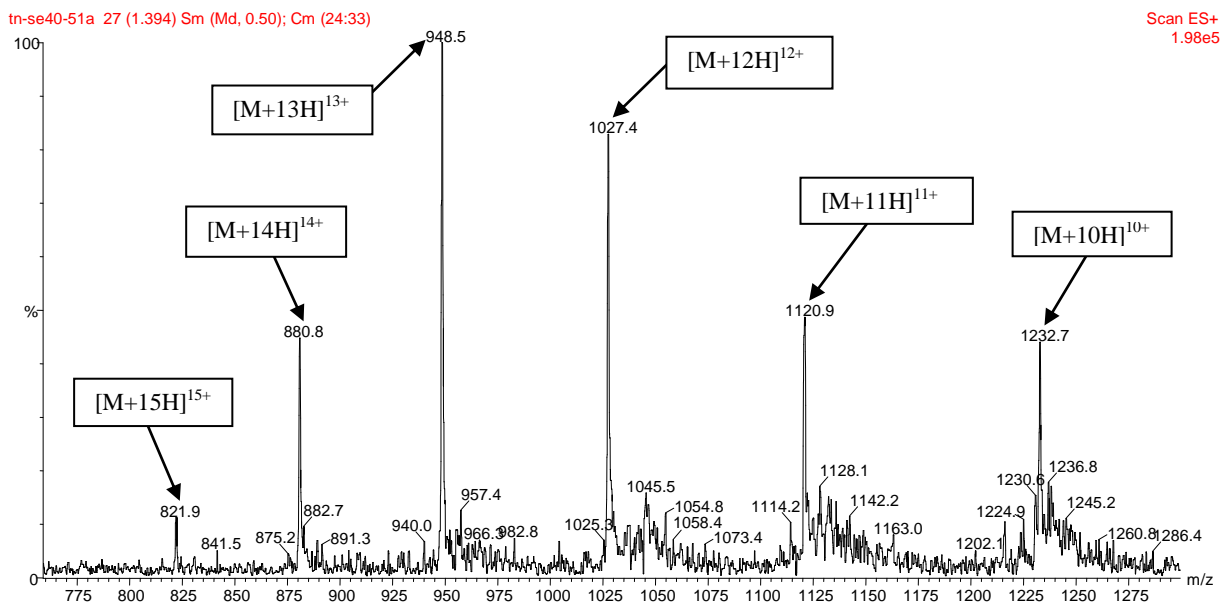
**Figur 13.** Forstørrelse av HPLC-kromatogrammet fra *S. endeca* celler 40 % SPE i det aktive området. Aktivt området er markert med grått. Absorbans ved 245, blå linje markerer mobilfasen. Pilen viser fraksjon 51.

I ESI-MS vil peptider med molekylvekt  $> 1000$  generelt ha 2 eller flere ladninger slik at de  $m/z$ -verdier som observeres vil ligge i området 500 - 2000, uansett hvor stort peptidet er. For et gitt peptid, vil enkeltpeptidene ha ulikt antall ladninger. Dette fører til at for et gitt peptid vil en observere et cluster av  $m/z$ -verdier. Ut fra dette clusteret kan molekylvekt av peptidet enkelt beregnes. Dette er et viktig fenomen ved ESI-MS analyse, som gjør det mulig å detektere forbindelser med molekylvekt  $>2000$  Da.

Figur 14 viser MS-spekteret til HPLC fraksjon 51 *S. endeca* celler 40 % SPE. Fra spekteret kan man se flere ioner med forskjellige relativ intensitet,  $m/z$ -verdien på 948,5 gir høyere relativ intensitet enn nærliggende ioner. Ut fra den relative intensiteten, danner ionene en normalfordelingskurve, noe som tyder på at ionene er relatert til hverandre. Dette gjelder ionene med  $m/z$ -verdiene 821,9, 880,6, 948,5, 1027,2, 1120,9 og 1232,7. Ut fra dette clusteret av  $m/z$ -verdier ble det beregnet at polypeptidet har en molekylvekt på 12315.

Denne fraksjonen ble videre trypsinert og analysert ved hjelp av LC-MS/MS. Resultatet fra prosessen ble videre søkt mot databaser for identifisering av proteinene i prøven. Fra dette fikk man sekvensen til to peptidfragmenter som bestod av:

- 1) VVEALSPR
- 2) LAETFDGK



Figur 14. MS-spekteret fra HPLC-fraksjon 51 *S. endeca* celler 40 % SPE. Pilene peker på molekylionene som er relatert til hverandre.

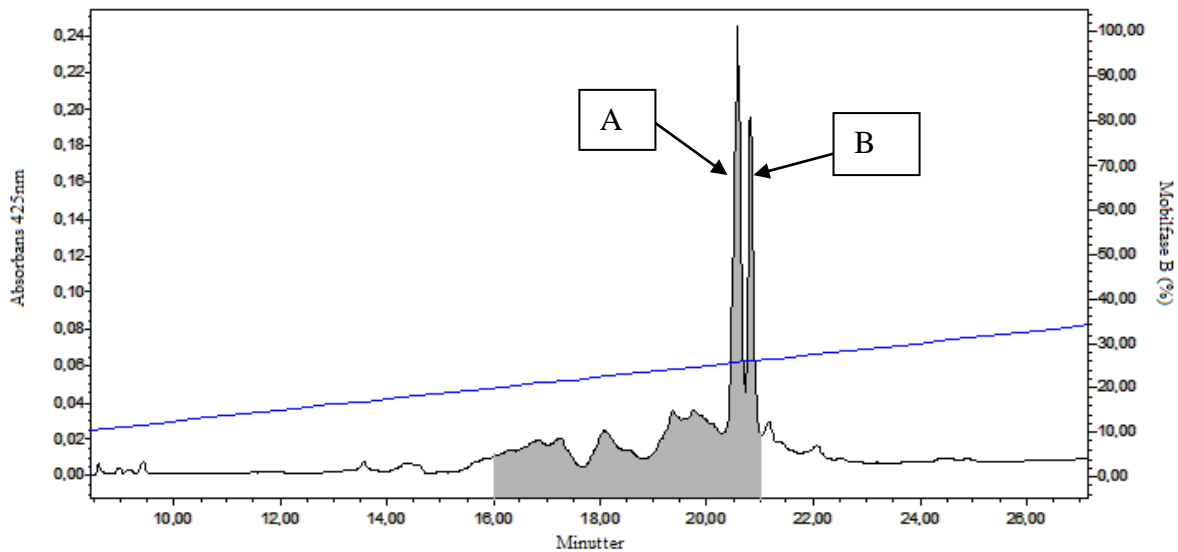
Trypsinering og MS/MS-analysen gav oss bare deler av sekvensen, dette kan ikke si så mye om det antibakterielle peptidet eller om disse delene gir antibakteriell effekt. Ut fra beregninger har sekvens 1 nettoladning +1, mens sekvens 2 har en nettoladning på null. Peptider som har en negativ nettoladning har sannsynligvis som regel ingen antibakteriell aktivitet, mens peptider med nettoladning lik +1 og null kan ha antibakteriell aktivitet. De fleste antimikrobielle peptider har en nettoladning mellom 3+ til 8+ (67). Grunnen til at vi ikke fikk hele peptid-sekvensen, kan være fordi at identifiseringen av proteinene var søkt mot kjente proteiner i databasen(e) og/eller at det var for lite stoff som ble analysert. Dersom man ville jobbe videre med dette molekylet kreves det mer av det aktuelle stoffet.

HPLC-fraksjon 51 har vist antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, inneholder et peptid der en del av sekvensen er oppklart. Resultatet fra MS-analysen tyder at peptidet har en masse på  $12315 \pm 0,39$  Da.

### 3.2.3 *S. endeca* kropp 40 % SPE

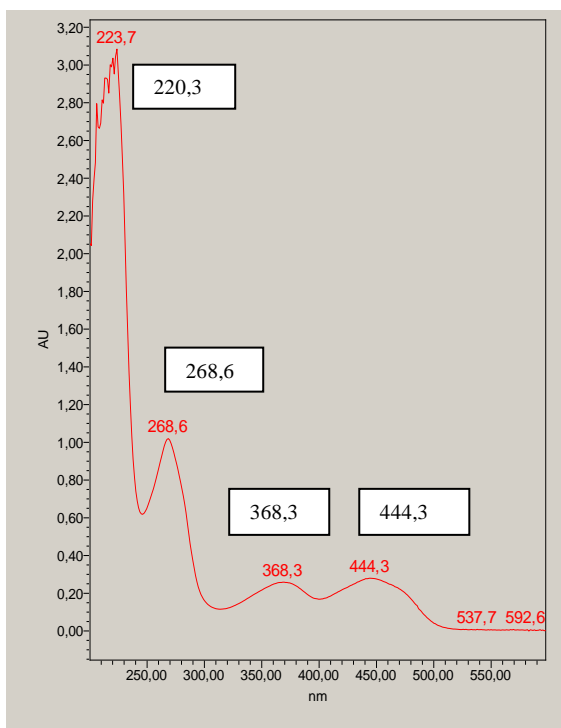
HPLC fraksjonene fra *S. endeca* 40 % SPE-eluat kropp ble testet mot *E. coli* og *P. aureginosa*. Fraksjonene som gav veksthemming mot disse bakteriene var eluert ut mellom 16 og 21 minutter, markert med gråfargede felt på figur 15. Aktiviteten var sterkest mot *P. aureginosa* hvor alle fraksjonene mellom 16 og 21 gav fullstendig hemming av bakterien.

Man fikk fullstendig hemming av *E. coli* i fraksjonene 20 og 21, mens i fraksjon 18 og 19 kunne man se at de hemmet bakterien i starten, men at bakterien tydelig klarte å vokse etter 12-15 timer. Fraksjonene 16 – 21 var før antibakteriell aktivitetstesting tilsatt 400 µl Milli-Q vann, og alle prøvene var brunaktig etter oppløsning i vannet, unntatt fraksjon 21 som var gulaktig. Fraksjonene 16 – 21 ble videre analysert ved hjelp av ESI-MS i positiv modus. På grunn av lite stoff i HPLC-fraksjonene ble det ikke utført ESI-MS i negativ modus.

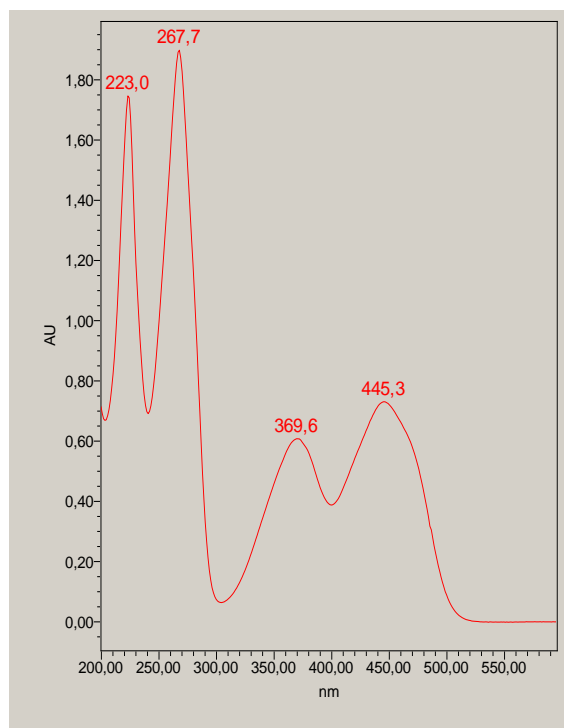


**Figur 15.. HPLC-fraksjonering fra *S. endeca* kropp 40 % SPE, ved absorbans 425 nm. Grå fargede felt markerer hvilke fraksjoner som har antibakteriell aktivitet. Blå linje markerer innhold av ACN i mobilfasen.**

Ut fra HPLC-kromatogrammet (figur 15) ser man at fraksjon 21 ikke er helt ren, området er markert grått. UV-spekteret til fraksjon 21 topp A (figur 16), viste absorbans-maksima ved henholdsvis 223,7, 268,6, 368,3 og 444,3 nm, topp B (figur 16) hadde også absorbans-maksima på 220,2, 268,6, 368,3 og 444,3 nm. UV-spektrene har lik absorbans tendens som riboflavin løst i 0,1 M PO<sub>4</sub> (pH 7), som har absorbans maksimum ved 220-225, 266, 371, 444, 475 nm (68, 69). Andre riboflavin analoger har også lignende absorbans maksimum som riboflavin (68). Man kan sammenligne figur 17 (UV-spekteret fra ren Riboflavin) og figur 16, og man kan se at de nesten har lik absorbans tendens. UV-spektret blir påvirket av det løsemidlet de er løst i, vår prøve var løst i ACN/vann/TFA, mens referansen er løst i PO<sub>4</sub>. Forskjeller i absorbans kan også være på grunn av at den analyserte prøven er uren, mens referanse Riboflavin er ren. Dette tyder på at fraksjonen kan inneholde flere riboflavin lignende substanser.



**Figur 16.** UV-spekteret fra HPLC fraksjon 21 *S. endeca* kropp 40 % SPE, røde tall fra topp A og tall i boks fra topp B

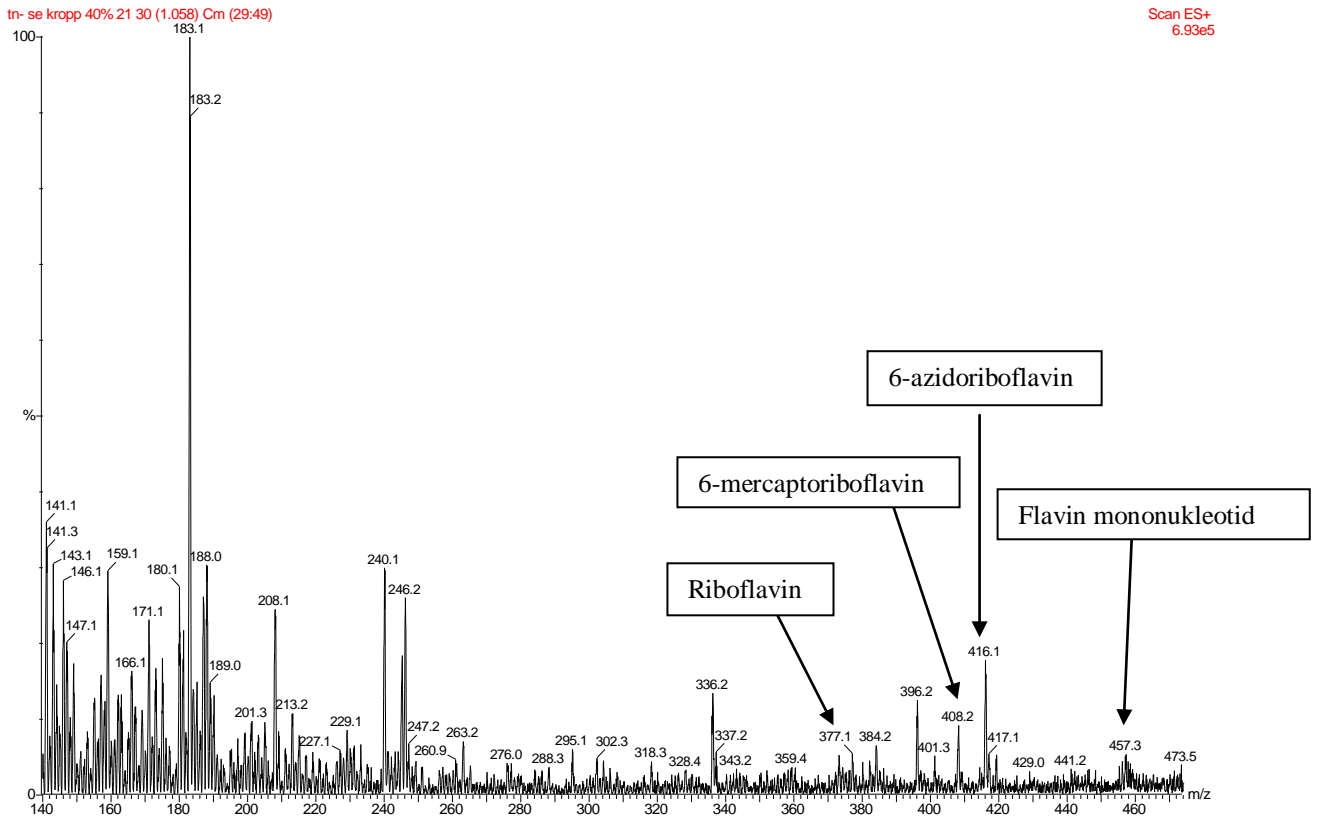


**Figur 17.** UV-spekteret til ren Riboflavin

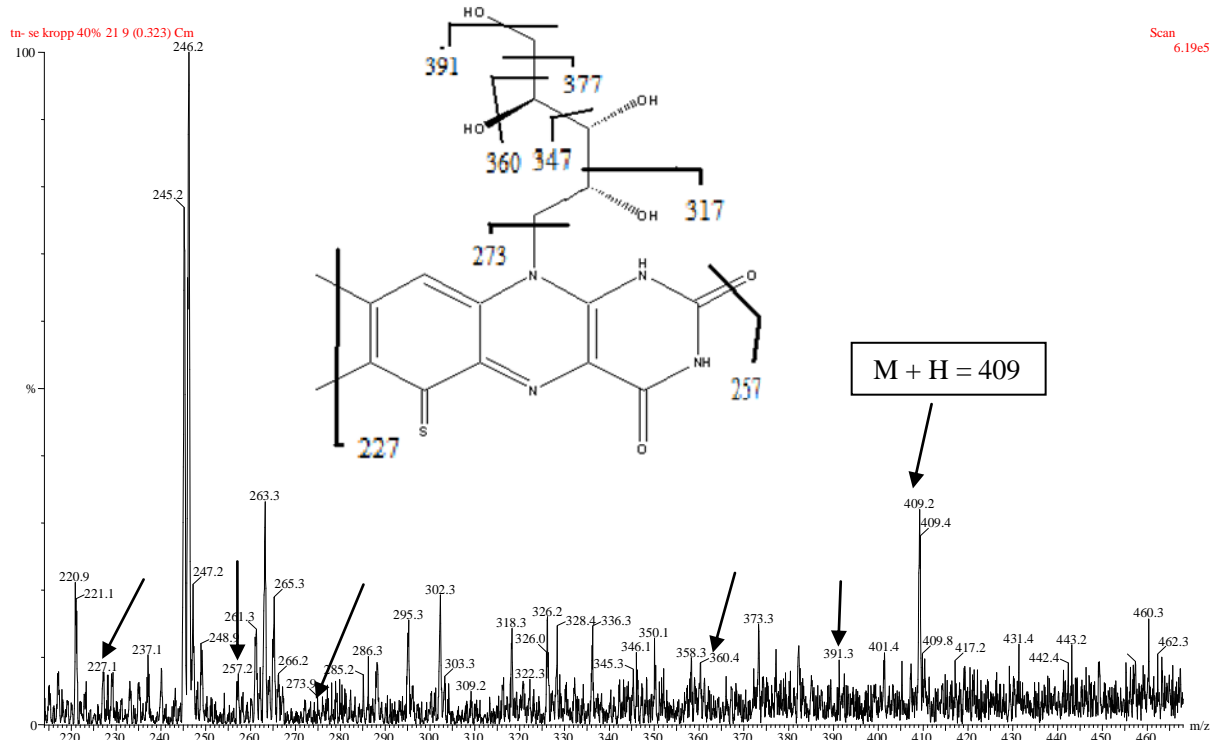
Ved en nærmere sjekk av MS-spekteret til fraksjon 21 *S. endeca* kropp 40 % SPE (figur 18), ble det observert flere aktuelle ionetopper med masseverdier som kan være protonert Riboflavin (377 m/z), 6-mercaptoriboflavin (408 m/z), protonert 6-azidoriboflavin (416), protonert Flavin mononukleotid (457 m/z, med en fragmenterings ion på 359 m/z = M - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), disse forslagene er markert med piler i MS-spekteret.

Fra MS-spekteret (figur 19) har det blitt prøvd å finne fragmenteringsmønsteret til

6-mercaptoriboflavin, som har en masse på 408 (M + H = 409). Fragmenteringsmønsteret er ikke helt tydelig, men har flere topper som kan tyde på fragment ioner fra 6-mercaptoriboflavin. Ionet med m/z-verdi 273 kan tilsvare massen minus sidekjeden, mens ionet med m/z-verdi 391,3 kan være molekylet minus en OH-gruppe. Man må være forsiktig med å tolke dette som 6-mercaptoriboflavin, selv om man kan finne flere fragment ioner som passer. Men på grunn av at ionene som blir tolket som fragment ioner, har såpass lav relativ intensitet, kan det også være støynivået som blir tolket som fragment ioner fra 6-mercaptoriboflavin.



Figur 18. MS-spekter til HPLC fraksjon 21 *S. endeca* kropp 40 % SPE. Piler markerer RN og RN analoger



Figur 19. Ms-spekter fra HPLC fraksjon 21 40 % *S. endeca* kropp med fragmenteringsmønster til 6- mercaptoriboflavin



Riboflavin (RN) og Flavin mononukleotid (FMN) har tidligere vist at de ved lave konsentrasjoner hemmer den Gram negative bakterien *Cardiobacterium hominis* (70). Når vekst medium er utsatt for lys som inneholder RN og indol ved lave konsentrasjoner, blir det produsert fotoprodukter som er svært giftige for *Salmonella typhimurium* og andre bakterier (71). Det har blitt vist at HPLC fraksjon 21 *S. endeca* kropp hemmer *E. coli* og *P. aureginosa*. Fra UV-spekteret til HPLC fraksjon 21 og MS-spekteret med diverse fragmenteringsioner gir dette en indikasjon på at det er noe riboflavin lignende substanser i fraksjonen. Man skal derfor ikke utelukke at RN, FMN og riboflavin analoger har antibakteriell aktivitet mot *E. coli* og *P. aureginosa*.

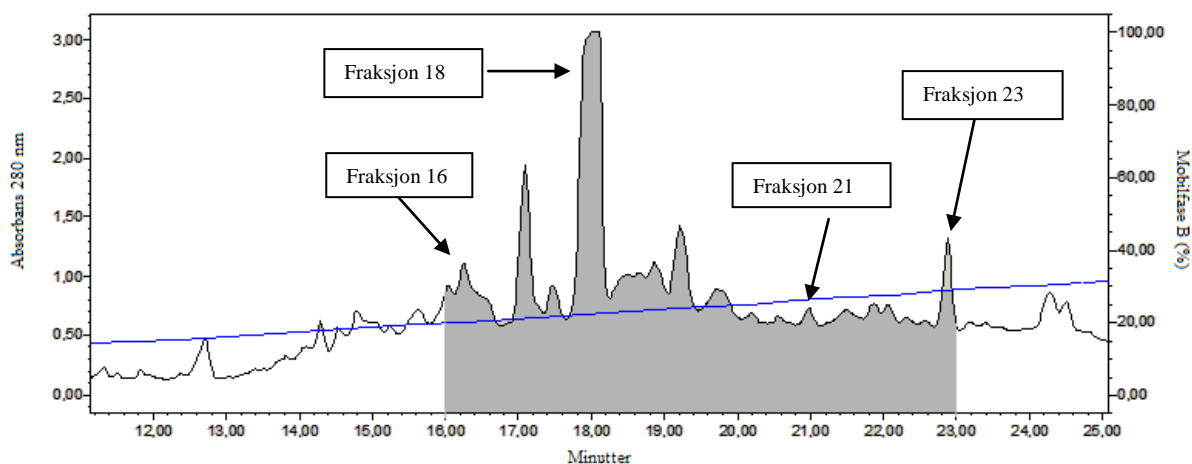
Fra MS-spekteret til fraksjon 21, kan man ikke bekrefte eller avkrefte at riboflavin analoger er tilstede. MS-spekteret fra denne prøven gav ikke gode resultater, noe som kan skyldes at det ikke var nok stoff i prøven som ble analysert, og/eller at prøven ikke var ren nok. Dersom man vil finne ut mer om den kjemiske struktur kan man bruke  $^{13}\text{C}$ -NMR og  $^1\text{H}$ -NMR. En utfordring blir da å samle inn større mengder av stoffet.

Fraksjonene 16-20 ble også analysert på ESI-MS, men ut fra MS-spekterene kunne man ikke foreslå noe forbindelse.

### **3.2.4 *C. papposus* kropp 40 % SPE**

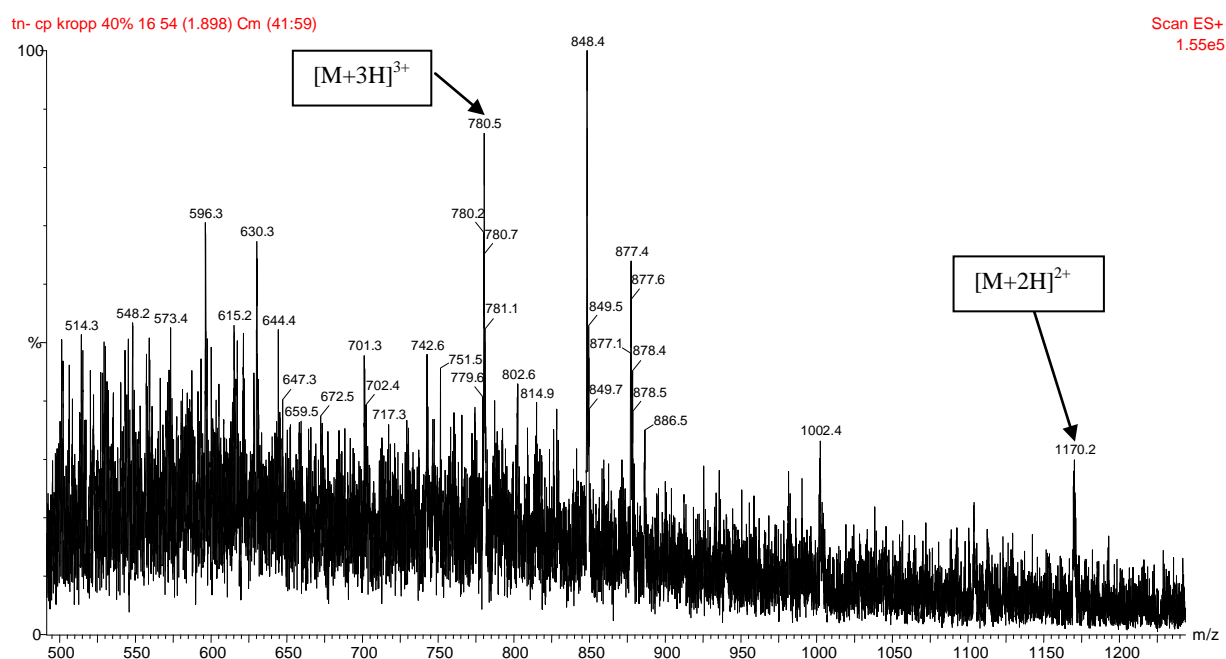
Fraksjonen *C. papposus* kropp 40 % SPE fra ble videre separert ved hjelp av HPLC og testet mot bakteriene *E. coli* og *P. aureginosa*. Figur 20 viser kromatogrammet fra separasjonen med de aktive områdene markert grått. HPLC-fraksjonene mellom 16 – 20 hadde aktivitet mot *E. coli*, fraksjon 21 hadde også aktivitet mot denne bakterien, men var aktiviteten svakere enn de andre. Mot *P. aureginosa* var det også flere fraksjoner som gav aktivitet, der kunne man se svak hemming av bakterien i fraksjon 15, mens fraksjonene 16 – 23 hemmet bakterien fullstendig. Alle de aktiv HPLC-fraksjonene ble videre analysert på ESI-MS i positiv modus og negativ modus.

Fra ESI-MS analysen av aktive HPLC-fraksjoner i positiv modus, fikk man mest informasjon fra fraksjonene 16, 18, 21 og 23, disse fraksjonene er markert med piler i kromatogrammet (figur 20)



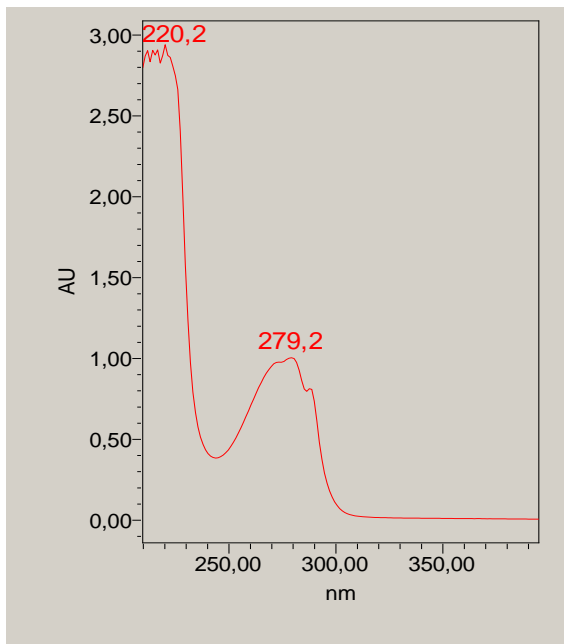
Figur 20. HPLC kromatogram fra *C. papposus* kropp 40 % SPE, ved absorbans 280 nm. Grå fargede felt markerer hvilke områder fraksjonene har antibakteriell aktivitet. Blå linje markerer mobilfasen. Piler peker på de aktive fraksjonene 16, 18, 20 og 23

Fra MS-spekteret til HPLC-fraksjon 16 (figur 21), kunne man finne massen til hovedmolekylet. MS-spekteret viser flere ioner som er relatert til hverandre, blant annet ionene med  $m/z$ -verdiene 1170,5 og 780,1 (merket med pil i figuren). Ut fra disse 2 molekyllionene ble det beregnet at peptidet har en molekylvekt på 2338 Da. For å bekrefte massen på molekylet beregnet også maskinen at molekylet hadde en masse på  $2338 \pm 3,15$  Da. UV-spekteret viser ingen absorbans maksima ved 280 nm, dette indikerer at molekylet ikke er et peptid med aromatiske aminosyrer.



Figur 21. MS-spekter til HPLC-fraksjon 16 *C. papposus* kropp 40 % SPE, piler markerer de ionene som er relatert til hverandre

Det var en mistanke om at fraksjon 18 inneholdt peptider, ut fra UV-spekteret (figur 22) som man kan se har en absorptans på 220 nm og med en senere absorptans maksima på 279 nm, som er vanlig for peptider med aromatiske aminosyrer. Fra MS-spekteret til denne prøven (ikke vist) så man to ioner som var relatert til hverandre, ut fra dette ble masse beregnet til å være rundt 2485 Da. Det ble derfor rensset opp mer av denne prøven ved hjelp av HPLC.



Figur 22. UV-spekter til HPLC fraksjon 18 *C. papposus* kropp 40% SPE

Resultat fra den påfølgende aktivitetstesting viste seg at fraksjonen hadde mistet sin antibakterielle aktivitet. Etter første HPLC-separasjon viste fraksjon 18 at den hadde aktivitet, men etter videre separering, hadde den mistet aktiviteten. Det har vist seg tidligere at dette ikke er helt uvanlig. Dette kan være på grunn av at det ikke var nok av den aktuelle forbindelsen i prøven, forbindelsen kan ha blitt ødelagt av proteaser i prøven, eller at det var flere forbindelser fra første HPLC-separasjon som til sammen utgjorde den antibakterielle effekten.

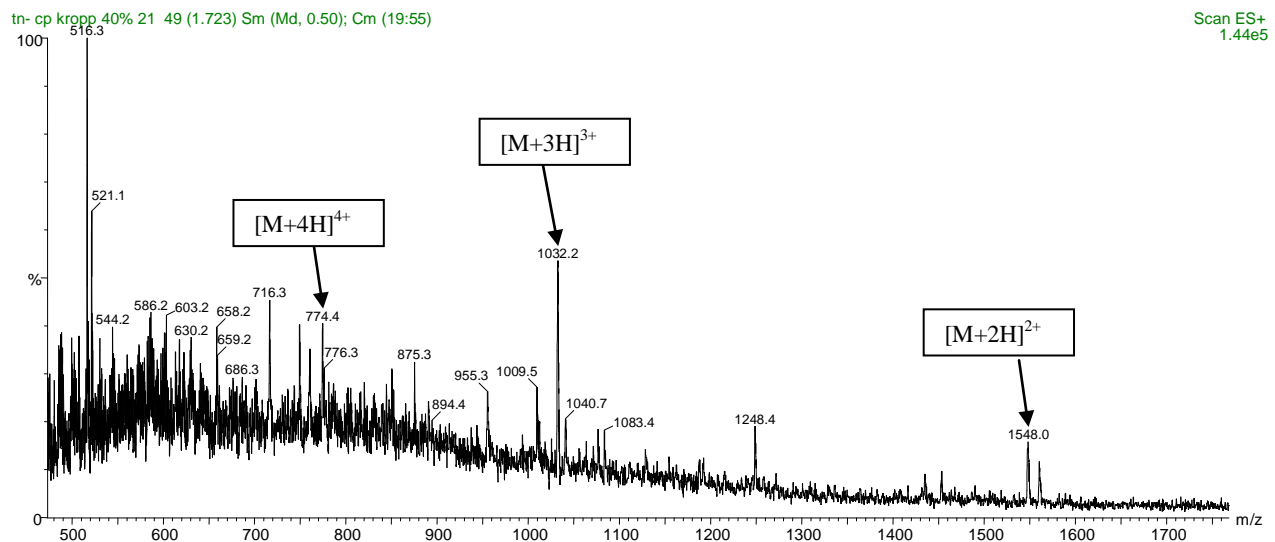
Prøven ble allikevel sendt til videre analyse ved bruk av trypsinering og påfølgende MS/MS-analyse av peptidfragmenter. Prøven ble videre søkt mot SwissProt database hvor man fikk sekvensen til tre peptidfragmenter som bestod av aminosyrene:

- 1) ALVVDNGSGMCK
- 2) SPTVIALR
- 3) VVEALSPR

Ved å summere disse sekvensene blir massen 2883 Da, det er ca. 400 Da mer enn massen til peptidet fra MS-spekteret. Ingen av sekvensene til peptidfragmentene overlapper hverandre, dette indikerer at prøven inneholder mer enn et peptid. Man kan derfor ikke si hvilken av disse sekvensene som er en del av det antimikrobielle peptidet.

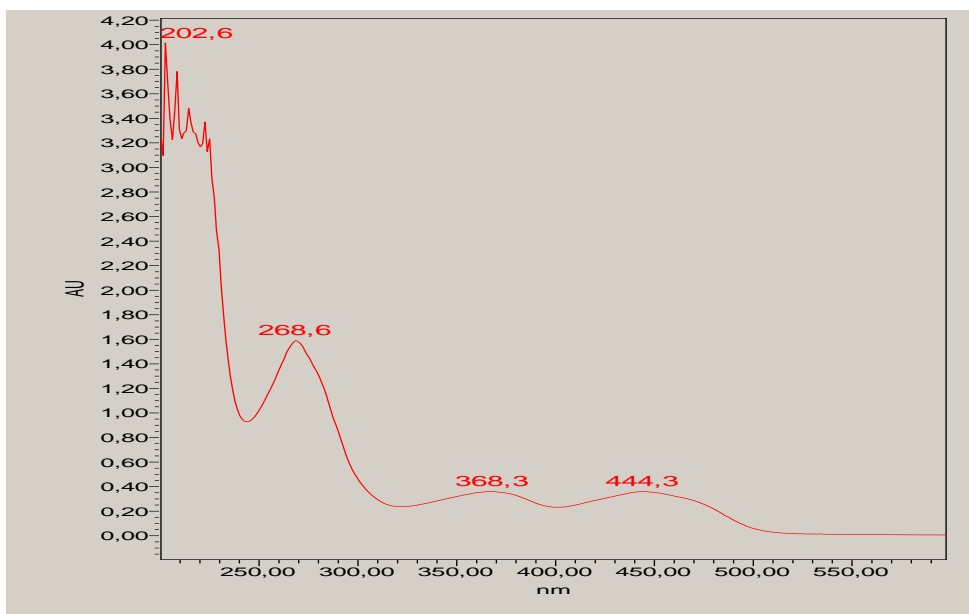
Disse peptidsekvensene har ladninger på henholdsvis 0, +1 og 0. Antall ladninger på peptidsekvensene sier at de kanskje har antibakteriell aktivitet. Men siden dette bare er deler av sekvensen, vet man ikke om de resterende aminosyrene er positivt eller negativt ladet, som kan ha innvirkning på deres antibakterielle aktivitet.

Fra MS-spekteret til HPLC-fraksjon 21 (figur 23), fant man også her molekylioner som er relatert til hver andre, med  $m/z$ -verdier på 1548, 1032, og 774,6. Fra disse  $m/z$ -verdiene ble massen til molekylet beregnet til å være rundt 3094 Da. UV-spekteret indikerer at molekylet ikke er relatert til peptider med aromatiske aminosyrer, dersom ingen absorbans-maksima ved 280 nm vises.



Figur 23. MS-spekter til HPLC-fraksjon 21 *C. papposus* kropp 40 % SPE, relaterte ioner er markert med pil

De aktive HPLC-fraksjonene fra *C. papposus* kropp som allerede var løst i 400  $\mu$ l Milli-Q vann, hadde alle en brunaktig farge, men fraksjon 23 skilte seg ut som var gulaktig. Ved nærmere undersøkelse av UV-spekteret (figur 24) fant man flere topper med absorbans maksimum på 202,6, 268,6, 368,3 og 444,3 nm. UV-spekteret ligner på spektret til Riboflavin, og fraksjon 21 SE kropp 40 % SPE. Dette tyder på at fraksjon 23 fra *C. papposus* kropp 40 % SPE kan inneholde noe Riboflavin lignende forbindelser.

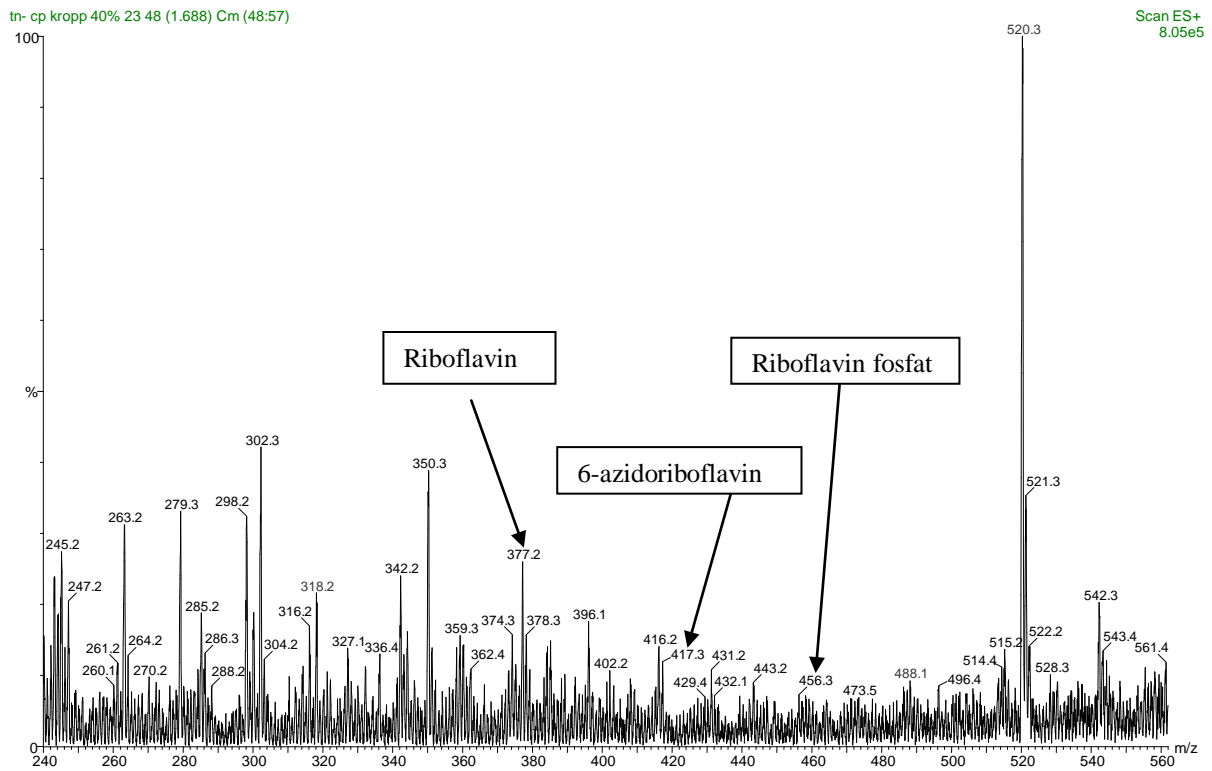


Figur 24. UV-spekter til HPLC fraksjon 23 *C. papposus* kropp 40 % SPE

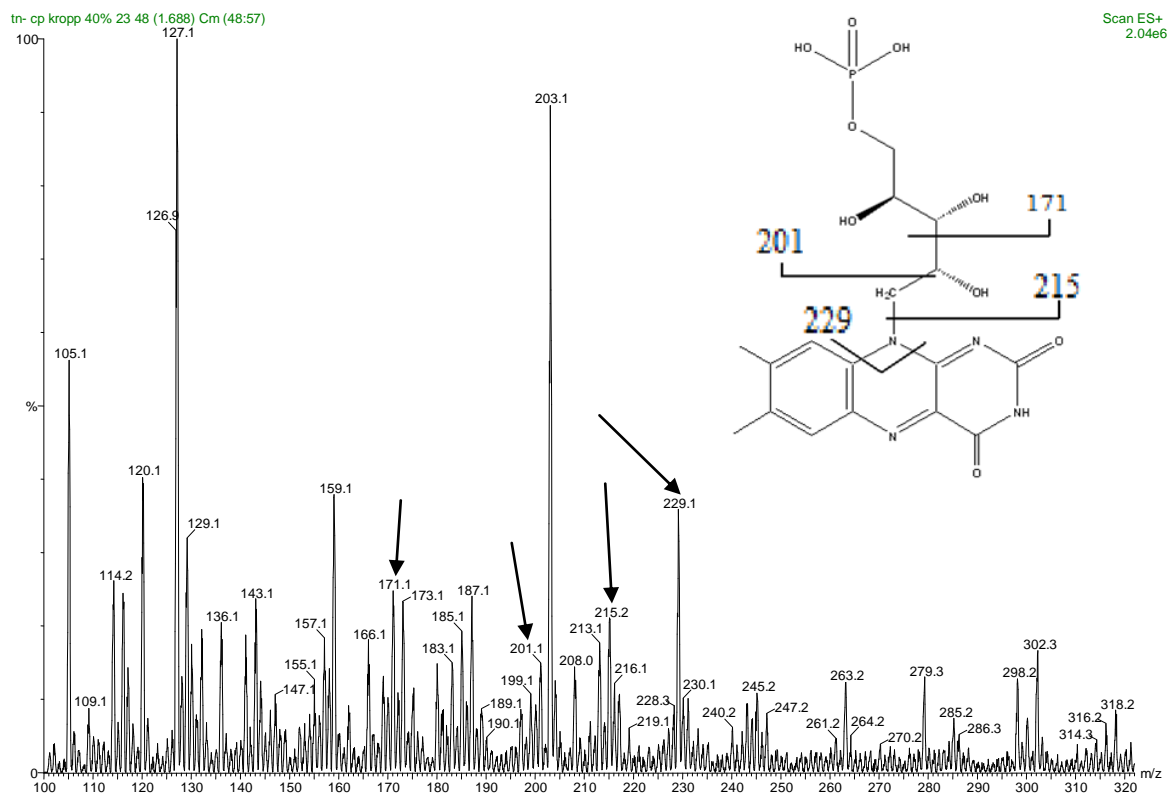
Fra MS-spekteret (figur 25) kan man se et signal med  $m/z$ -verdi lik 520. Dette stemmer overens med massen til 7-bromo-Flavin mononukleotid (7-Br-FMN) (72). Men fra MS-spekteret kan man utelukke at man har 7-Br-FMN i prøven, hadde man hatt denne forbindelsen som har molekylvekt på 520, ville man også i MS-spekteret fått en lik intens topp med  $m/z$ -verdi på 522. Brom har atommasse på 79, og isomeren på 81 forekommer nesten like ofte, man ville derfor ved massespektrometri fått 2 like intense ioner med massedifferanse på 2 enheter.

Fra MS-spekteret ser man en svært svakt signal med  $m/z$ -verdi 456 som kan tilsvare Riboflavin fosfat. Figur 26 viser fragmenteringsmønster av sidekjeden til Riboflavin fosfat, ionet med  $m/z$ -verdi 215 (se figur 26) som gir relativt sterkt signal tilsvare massen av sidekjeden, men fragmentioner av Lumichrome synes ikke i spekteret. Det kan ikke fastslås at vi har Riboflavin fosfat ut fra MS-spekteret, men spekteret indikerer at vi har en forbindelse som kan inneholde sidekjeden til Riboflavin fosfat. Toppene varierer i relativt intensitet, flere forbindelser i prøven kan gi flere ulike ioner med sterkere intensitet enn fragmenterings ioner fra den forbindelsen man er ute etter, dette fører til at ionenes relative intensitet blir veldig lave, og gir små topper i MS-spekteret.

Ionenene med  $m/z$ -verdiene 377 (protonert RN), 417 (protonert 6-azido-RN) og 456 (RN-fosfat) markert med pil i MS-spekteret (figur 25), kan tilsvare RN og RN analoger,



Figur 25. Ms-spekter 240 m/z – 560 m/z HPLC fraksjon 23 *C. papposus* kropp 40 % SPE, piler markerer masser som kan være RN og RN analoger



Figur 26. Ms-spekter 100 m/z – 320 m/z HPLC fraksjon 23 *C. papposus* kropp 40 % SPE med strukturen til Riboflavin fosfat og fragmenteringsmønster

ESI-MS analysen av aktive HPLC-fraksjoner i negativ modus, gav lite brukbare resultater. Den mest intense toppen fra HPLC-fraksjon 19 (MS-spekter ikke vist) var på  $m/z$  625,58. Det er derfor ganske sannsynlig at aktiviteten i fraksjonen kan tilskrives denne forbindelsen. Fra de andre MS-spektrene (ikke vist) av de ulike HPLC-fraksjonene som hadde aktivitet gav få svake signaler. Man kunne finne flere ioner med differanse på 132, 146 eller 162, noe som kan tilsvare fragmentering av ulike suktermolekyler. Disse prøvene kan derfor inneholde asterosaponiner med en eller flere sukkerdeler koplet til aglykonet. Men på grunn av at den relativt lave intensiteten, kan man ikke med sikkerhet si at det er fragmenteringer av suktermolekyler. For å avgjøre dette kreves det mer materiale og renere analyseprøver av de aktuelle forbindelsene.

Det har tidligere blitt funnet asterosaponiner i *C. papposus* (73), så denne sjøstjerne-arten inneholder garantert asterosaponiner, men ut fra MS-spektrene i dette studiet er det ikke mulig å bekrefte tilstedeværelse av asterosaponiner. Ved bruk av ulike MS-teknikker kan man beregne molekylvekten og informasjon om sukkerkjeden gjennom fragmentering. Som oftest blir den endelige strukturen til asterosaponiner bestemt ved  $^1\text{H-NMR}$  og  $^{13}\text{C-NMR}$  (30).

Fra ESI-MS analysen ble flere ioner videre analysert ved hjelp av MS/MS. Fra fraksjon 20 (spekteret ikke vist) ble  $m/z$ -verdien 600,2 analysert videre og ut fra MS/MS-spekteret har man molekylionet med  $m/z$ -verdi 600,16, og flere intense fragmenteringsioner. Flere av disse har massedifferanse som er lik monopeptider eller dipeptider, og det prøves her å gi et forslag til hvilke aminosyrer peptidet kan bestå av. Antar vi at ionene med  $m/z$  verdier på 600,16, 414,09, 258,03, 155,03 gir masse tap på henholdsvis 186u, 156u, 103u, og siste  $m/z$ -verdi på 155u, kan massetapene tilsvare Lysin + Glycin, Arginin, Cystein, og Glycin + Prolin. Ut fra MS/MS-spekteret er det flere intense topper, og beregner man differanse mellom disse ionene, får man ulike massetap som kan tilsvare andre peptider. Man kan derfor ikke med sikkerhet si at denne forbindelsen inneholder de aminosyrene som er foreslått.

De andre fraksjonene (16, 17, 18, 20, 21 og 23) som også ble analysert på MS/MS viste lignende resultater som nevnt ovenfor, det kunne foreslås flere forskjellige aminosyre sekvenser til hver prøve.

## 4 Konklusjon

Det er blitt påvist at ekstrakter av celler/plasma fra *U. linckii*, *C. papposus* og *S. endeca* og ekstrakt av helkropp *C. papposus* og *S. endeca* har antibakteriell aktivitet mot en eller flere av bakteriene *E. coli*, *P. aureginosa* og *C. glutamicum*. Vannfase-ekstrakter av artene ble videre rensert ved hjelp av fastfast-ekstraksjon og eluert med 10, 40 og 80 % ACN. SPE-eluatene av artene ble testet for antibakteriell aktivitet ved hjelp av turbiditetsmålinger i mikrotiterplater, det samme ble organisk fase fra et tidligere grovekstraksjonstrinn, 2 organiske faser ble testet på agarplater. Eluatene viste aktivitet mot en eller flere av bakteriene, men med til dels forskjeller i konsentrasjon (mg/ml), de organiske fasene gav ingen aktivitet mot noen av bakteriene. De mest aktive SPE-eluatene ble separert videre på RP-HPLC og analysert ved hjelp av ESI-MS: 40 % *U. linckii* plasma, 40 % *S. endeca* celler og kropp, og 40 % kropp *C. papposus*.

Flere fraksjoner fra HPLC-separeringen av *U. linckii* 40 % plasma viste antibakteriell aktivitet mot *C. glutamicum*. Aktiviteten var spredt med forskjellige retensjonstider, noe som tyder på forskjellige forbindelser. Men ut fra UV-spekteret og MS-analysen var ikke noe av resultatene tolkbare.

Antimikrobielle peptider ble funnet i HPLC-fraksjon 51 40 % *S. endeca* celler som hadde aktivitet mot *E. coli*. Fra MS-spektrene ble det funnet flere ioner som hadde sammenheng, massen til peptidet ble beregnet til å være 12315 Da. Denne fraksjonen ble videre trypsinert og videre analysert for mer detaljert informasjon, ut fra prosessen fikk man sekvens til 2 peptidfragmenter:

- 1) VVEALSPR
- 2) LAETFDGK

HPLC-fraksjonen 21 av *S. endeca* kropp 40 % SPE var aktiv mot *E. coli* og *P. aureginosa*. Basert på fargen til løsningen og UV-spekteret, kunne man se flere absorbans maksima som indikerer at den aktive forbindelsen i fraksjonen er et Riboflavin lignende stoff. MS-spekteret viste flere ioner med m/z verdier i området 350- 460 kunne tolkes som Riboflavin analoger.



Fra HPLC-fraksjon 18 *C. papposus* kropp 40 % SPE, ble massen til det antimikrobielle peptidet beregnet til å være 2485 Da. Fra trypsineringsprosessen og videre analyse ved hjelp av LC-MS/MS fikk man sekvensene:

- 1) ALVVDNGSGMCK
- 2) SPTVIALR
- 3) VVEALSPR

Fraksjonen inneholder trolig flere peptider, man kan derfor ikke si hvilken av disse sekvensene som tilhører det antimikrobielle peptidet.

Fra en av de aktive HPLC-fraksjoner av *C. papposus* kropp 40 % SPE, indikerte UV-spekteret at en forbindelse av Riboflavin lignende struktur var tilstede.

Ut fra MS-analysen av andre aktive HPLC-fraksjoner ble det beregnet at 2 av de forbindelsene har masser på 2338 Da og 3094 Da.

Et av problemene i studiet synes å være at det ikke var nok materiale og nok av det aktuelle stoffet for analysene. For å kunne gå videre med disse sjøstjernene kreves det mer stoff, renere prøver til analyse, noe som kan være tidskrevende og ressurskrevende. Selv om disse sjøstjernene inneholder aktive forbindelser, er det kanskje ikke verdt å satse videre på. Grunnen er at lite materiale ble utvunnet fra relativt mange sjøstjerner, og for å oppnå den antibakterielle aktivitet kreves høye konsentrasjoner (mg/ml) av den aktuelle prøven. Det vil også være tidskrevende å utføre strukturoppklaring på antibakterielle peptider med masse over 2000 Da.

Erfaringer som er gjort hittil viser at det er en lang vei før noen av disse aktive forbindelsene i disse sjøstjernene kan bli legemidler. Selv om de viser antibakteriell aktivitet *in vitro*, kreves det strukturoppklaring og flere forsøk, og den antibakterielle aktiviteten *in vivo* kan være helt annerledes. Det blir sannsynligvis ikke utviklet legemidler av noen av disse forbindelsene som er analysert i denne oppgaven, men den gir et eksempel på at marine organismer inneholder interessante forbindelser, og det marine miljø er de stor kilde til nye aktive forbindelser.



## 5 Referanser

1. C. Solberg. Mikroorganismene slår tilbake - infeksjonssykdommene i de siste 50 år.
2. C. Mims, H.M. Dockrell, R.V. Goering, I. Roitt, Wakelin D., and Z. M. Medical Microbiology. (2004).
3. <http://www.sft.no/publikasjoner/kjemikalier/1513/TA1513.html>.
4. N.-V. NORM. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway, 2007.
5. E. Høiby, D. Vestrheim, D. Caugant, and K. Gammelsrud. Bakteriell resistens mot antibiotika. Tidsskrift for Den norske legeforening (2008).
6. J.W. Blunt, B.R. Copp, W.P. Hu, M.H.G. Monroe, and P.T. Northcote. Marine Natural Products. NatProdRep. 24: (2007).
7. N. Fusetani (ed.). Drugs from the Sea, Karger, Basel, 2000.
8. *Rabiya S. T.* Salinosporamide A, Second-Generation Proteasome Inhibitor, Possible Alternative to Bortezomib in Pancreatic Cancer Models, More Effective & Less Toxic. Oncology Times (2006).
9. C. Forni, M. Minuzzo, E. Viridis, E. Tamborini, M. Simone, M. Tavecchio, E. Erba, F. Grosso, A. Gronchi, P. Aman, P. Casali, M. D'Incalci, S. Pilotti, and R. Mantovani. Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. Mol Cancer Ther. 8:449-457 (2009).
10. Felleskatalogen 2009, Felleskatalogen AS, OSLO, 2009.
11. L.R. Webster, R. Fisher, S. Charapata, and M.S. Wallace. Long-term intrathecal ziconotide for chronic pain: an open-label study. J Pain Symptom Manage. 37:363-372 (2009).
12. R. Singh, M. Sharma, P. Joshi, and D.S. Rawat. Clinical status of anti-cancer agents derived from marine sources. Anticancer Agents Med Chem. 8:603-617 (2008).
13. R.S. Herbst, L.A. Hammond, D.P. Carbone, H.T. Tran, K.J. Holroyd, A. Desai, J.I. Williams, B.N. Bekele, H. Hait, V. Allgood, S. Solomon, and J.H. Schiller. A phase I/IIA trial of continuous five-day infusion of squalamine lactate (MSI-1256F) plus carboplatin and paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 9:4108-4115 (2003).
14. R.K. Pettit, B.R. Fakoury, J.C. Knight, C.A. Weber, G.R. Pettit, G.D. Cage, and S. Pon. Antibacterial activity of the marine sponge constituent cribrostatin 6. J Med Microbiol. 53:61-65 (2004).
15. M. Cueto, P.R. Jensen, C. Kauffman, W. Fenical, E. Lobkovsky, and J. Clardy. Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. J Nat Prod. 64:1444-1446 (2001).
16. J.W. Lane, Y. Chen, and R.M. Williams. Asymmetric total syntheses of (-)-jorumycin, (-)-renieramycin G, 3-epi-jorumycin, and 3-epi-renieramycin G. J Am Chem Soc. 127:12684-12690 (2005).
17. M. Donia and M.T. Hamann. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. Lancet Infect Dis. 3:338-348 (2003).
18. F.E. Moen. Marine fish & invertebrates of Northern Europe, KOM, 2004.
19. L. Sømme. Virvelløse dyr, Dyr i verdens natur, Bertmark Norge AS, 2003.
20. <http://universe-review.ca/R10-33-anatomy.htm>.
21. S. Semb-Johansson. Verdens dyr, Virvelløse dyr II, Nesledyr - Ormer - Bløtdyr - Krepsdyr - Pigguder, J.W. Cappelens Forlag AS, 1988.
22. K. Hostettmann and A. Marston. Saponins, Cambridge University Press, 1995.
23. A.M. Mackie, H.T. Singh, and J.M. Owen. Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms. Comp Biochem Physiol B. 56:9-14 (1977).
24. M.A. Clark and M.E. Downey. Starfishes of the Atlantic, Chapman & Hall, 1992.
25. K. Hostettmann and A. Marston. Chemistry & pharmacology of natural products, Saponins, Cambridge University Press, 1995.

26. L. Minale, C. Pizza, R. Riccio, and F. Zollo. *Natural Products and Biological Activities*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1986.
27. H.D. Chludil, A.M. Seldes, and M.S. Maier. Antifungal steroidal glycosides from the patagonian starfish *anasterias minuta*: structure-activity correlations. *J Nat Prod.* 65:153-157 (2002).
28. V. D'Auria, M. Lorizzi, L. Minale, and R. Riccio. Starfish Saponins Part 40. Structures of Two New 'Asterosaponins\*' from the Starfish *Patiria minia*: Patirioside A and Patirioside B. *JChem Soc Perkin Trans* (1990).
29. L. Minale, M.V. D'Auria, L.G. Paloma, M. Iorizzi, A. Zampella, and F. Zollo. Bioactive metabolites from echinoderms and Porifera. *Gazzetta Chimica Italiana.* 127:771-778 (1997).
30. M. Iorizzi, S. De Marino, and F. Zollo. *Steroidal oligoglycosides from the Asteroidea*, Bentham Science Publishers, 2001.
31. L. Andersson, L. Bohlin, M. Iorizzi, R. Riccio, L. Minale, and Moreno-Lopez W. Biological activity of saponins and saponins-like compound from starfish and brittle-stars, *Toxicon* 1989.
32. D.S. Bhakuni and D.S. Rawat. *Bioactive Marine Natural Products*, Springer, 2005.
33. Y. Shimuzu. Antiviral substances in starfish, 1971.
34. D.H. Choi, S. Shin, and I.K. Park. Characterization of antimicrobial agents extracted from *Asterina pectinifera*. *Int J Antimicrob Agents.* 11:65-68 (1999).
35. Y. Hashimoto. *Marine Toxins and Other Bioactive Marine Metabolites*. Japan Scientific Societies (1979).
36. J. Jolles and P. Jolles. The lysozyme from *Asterias rubens*. *Eur J Biochem.* 54:19-23 (1975).
37. H.G. Boman and D. Hultmark. Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol.* 41:103-126 (1987).
38. R.I. Lehrer, A.K. Lichtenstein, and T. Ganz. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol.* 11:105-128 (1993).
39. L.H. Vorland. Naturlig forekommende antimikrobielle peptider- lovende nye antibiotika eller ris til egen bak. *Tidsskrift for Den norske legeförening.* 26: (2001).
40. R.E. Hancock and M.G. Scott. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8856-8861 (2000).
41. R.E. Hancock and R. Lehrer. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol.* 16:82-88 (1998).
42. T. Ganz and R.I. Lehrer. Defensins. *Curr Opin Immunol.* 6:584-589 (1994).
43. H.G. Boman. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol.* 13:61-92 (1995).
44. R.E. Hancock. Peptide antibiotics. *Lancet.* 349:418-422 (1997).
45. H. Jensen, P. Hamill, and R. Hancock. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 19: (2006).
46. W. Kamysz, M. Okroj, and J. Lukasiak. Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol.* 50:461-469 (2003).
47. K. Matsuzaki. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta.* 1376:391-400 (1998).
48. K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, and K. Miyajima. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry.* 35:11361-11368 (1996).
49. G. Ehrenstein and H. Lecar. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys.* 10:1-34 (1977).
50. Y. Pouny, D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, and Y. Shai. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry.* 31:12416-12423 (1992).
51. K.A. Brogden. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 3:238-250 (2005).

52. M. Brahmachary, S.P. Krishnan, J.L. Koh, A.M. Khan, S.H. Seah, T.W. Tan, V. Brusic, and V.B. Bajic. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res.* 32:D586-589 (2004).
53. A.S. database. [www.bbcm.units.it/](http://www.bbcm.units.it/).
54. L. Whitmore and B.A. Wallace. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Res.* 32:D593-594 (2004).
55. Z. Wang and G. Wang. APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* 32:D590-592 (2004).
56. <http://www.migenix.com/product.html>.
57. [http://www.migenix.com/newsreleases/120805\\_2.pdf](http://www.migenix.com/newsreleases/120805_2.pdf).
58. C. Faber, H.P. Stallmann, D.M. Lyaruu, U. Joosten, C. von Eiff, A. van Nieuw Amerongen, and P.I. Wuisman. Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis model. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2438-2444 (2005).
59. P.H. Nibbering, E. Ravensbergen, M.M. Welling, L.A. van Berkel, P.H. van Berkel, E.K. Pauwels, and J.H. Nuijens. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect Immun.* 69:1469-1476 (2001).
60. L. Zhang, J. Parente, S.M. Harris, D.E. Woods, R.E. Hancock, and T.J. Falla. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:2921-2927 (2005).
61. M. Tadesse, B. Gulliksen, M.B. Strom, O.B. Styrvoid, and T. Haug. Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *J Invertebr Pathol.* 99:286-293 (2008).
62. T. Haug, A.K. Kjuul, O.B. Styrvoid, E. Sandsdalen, O.M. Olsen, and K. Stensvag. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invertebr Pathol.* 81:94-102 (2002).
63. K. Stensvåg, T. Haug, S. Sperstad, V., , Ø. Rekdal, B. Indrevoll, and O.B. Styrvoid. Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. Elsevier (2007).
64. T. Haug, K. Stensvåg, Ø. Olsen, M., Sandsdalen E., and Styrvoid O.B. Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. Elsevier (2004).
65. [http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/images/ionization\\_esi.jpg](http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/images/ionization_esi.jpg).
66. <http://www.scielo.br/img/revistas/jbchs/v15n5/21975f1.gif>.
67. The Antimicrobial Peptide Database.
68. [www.medicinescomplete.com](http://www.medicinescomplete.com).
69. R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott, and K.M. Jones. *Data for Biochemical Research*, Oxford University Press.
70. I.J. Slotnik and M. Dougherty. Unusual toxicity of riboflavin and flavin mononucleotide for *Cardiobacterium hominis*. (1965).
71. C.A. Chelala and Margolin P. Bactericidal photoproducts in medium containing riboflavin plus aromatic compounds and MnCl<sub>2</sub>. *Canadian Journal of Microbiology* (1983).
72. [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=191560&loc=ec\\_rcs](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=191560&loc=ec_rcs).
73. G.B. Elyakov, T.A. Kuznetsova, Stonik V.A., and V.V. Mikhailov. New trends of marine biotechnology development. *Pure & Appl Chern*, (1994).