

# **Antimikrobielle forbindelser i kongsnegl (*Buccinum undatum*) og neptunsnegl (*Neptunea despecta*)**

**Lindsey Leigh Beecher Martinsen**

*Masteroppgave i marin bioteknologi (60 stp)*

*Mai 2017*



## Forord

Denne masteroppgaven i marin bioprospektering ble utført ved Norges fiskerihøgskole (NFH), Fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), UiT, Norges arktiske universitet. Veiledere har vært førsteamanuensis Tor Haug og professor Klara Stensvåg.

Først og fremst vil jeg takke veilederne mine for muligheten til å jobbe med en spennende masteroppgave og for veiledning underveis i skriveprosessen. Jeg vil også rette en stor takk til Ida Kristine Hansen for fantastisk veiledning på lab og støtten gjennom alle opp- og nedturene det siste året. Takk for at du har vist stor tålmodighet og for at du alltid stiller opp, det setter jeg utrolig stor pris på! Jeg vil også takke resten av bioprospekteringsgruppen for hjelp på laben og tilbakemeldinger underveis i masteren.

Og en stor takk til alle mine medstudenter gjennom de siste fem årene. Dere har gjort studietiden i Tromsø helt fantastisk både på og utenfor universitetet, studietiden hadde ikke vært det samme uten dere!

Takk til familien min for at dere viser interesse for det jeg holder på med, og for at dere alltid har troen på meg. Og til slutt vil jeg takke min kjære samboer Lars, som alltid har stilt opp for meg og gitt meg motivasjon gjennom hele studietiden. Dette hadde ikke gått uten deg!

Lindsey Leigh Beecher Martinsen

Tromsø, mai 2017

## Sammendrag

Det økende antall patogene bakteriestammer som utvikler resistens mot dagens kommersielle antibiotika er en av de største truslene mot den globale helsen i vår tid. Infeksjonssykdommer som tidligere kunne behandles med antibiotika har nå nesten blitt umulige å behandle, det er derfor et umiddelbart behov for nye typer antibiotika med nye virkningsmekanismer enn det som allerede eksisterer på markedet. Marine invertebrater er utsatt for høye konsentrasjoner av både patogene og ikke-patogene mikroorganismer, og er derfor avhengig av et velutviklet og robust forsvarssystem som blant annet inkluderer antimikrobielle forbindelser. Marine invertebrater kan derfor være en kilde til å finne nye antimikrobielle forbindelser som kan utvikles til antibiotika.

Målet for denne masteroppgaven var å påvise antibakteriell aktivitet, samt isolere og karakterisere antibakterielle forbindelser i ulike preparater fra de marine gastropodene; kongsnegl (*Buccinum undatum*) og neptunsnegl (*Neptunea despecta*). Frysetørket biologisk materiale ble ekstrahert med 60% acetonitril + 2% maursyre, og ekstraktene ble separert i en vannfase og en organisk fase. Vannfasen ble videre separert med fast fase ekstraksjon på en C<sub>18</sub> kolonne. Eluatene fra fast fase ekstraksjon og de organiske fasene ble testet for antibakteriell aktivitet mot *Escherichia coli* og *Corynebacterium glutamicum*. Aktive forbindelser ble videre isolert og innledende karakterisert ved revers-fase høytrykksvæskekromatografi og høyopløselig massespektrometri.

Høy antibakteriell aktivitet ble påvist i flere av ekstraktene (fra begge artene), deriblant hemocytter, vev og egg (kun *B. undatum*), der ekstrakter av hemocytterne viste den høyeste antibakterielle aktiviteten. Innledende karakterisering med massespektrometri indikerer tilstedeværelse av flere ulike antimikrobielle komponenter, blant annet peptider, lipider og lavmolekylære forbindelser.

## Summary

The increased number of pathogenic bacteria that develops resistance towards commercial antibiotics is one of the most serious threats to the human health worldwide. Infections that previously could be treated with antibiotics have now become almost impossible to treat, it is therefore an urgent need to develop new types of antibiotics with different modes of action than what already exist on the market. Marine invertebrates are constantly exposed to high levels of pathogenic and non-pathogenic microorganisms, and therefore rely on a well-developed and effective immune system which includes antimicrobial compounds. Marine invertebrates can therefore be a good source for finding new antimicrobial compounds that can be developed into new antibiotics.

The aim of this master project was to search for antibacterial activity, and isolate and characterize antibacterial compounds in different tissues of the marine Gastropoda common whelk (*Buccinum undatum*) and neptune whelk (*Neptunea despecta*). Freeze-dried samples were extracted with 60% acetonitrile containing 2% formic acid and separated into an aqueous phase and an organic phase. The aqueous phase was further separated with solid phase extraction on C<sub>18</sub> cartridges. The eluates from solid phase extraction and the organic phases were subsequently tested for antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. Active extracts were further separated and characterized with high performance liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry.

Antibacterial activity was detected in several of the extracts, including hemocytes, tissue and eggs (*B. undatum*), where the extracts from the hemocytes showed the highest antibacterial activity. Initial characterization with mass spectrometry indicates the presence of several different bioactive components, including peptides, lipids and low molecular compounds.

# Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Summary .....	III
Forkortelser .....	VI
1 Innledning.....	1
1.1 Antibiotika og resistensutvikling.....	1
1.2 Naturprodukter som kilde til nye antibiotika.....	3
1.3 Antimikrobielle peptider .....	5
1.4 Marin bioprospektering .....	6
1.5 Utfordringer knyttet til utvinning av marine naturprodukter.....	7
1.6 Marine snegler (Gastropoder) .....	8
1.6.1 Anatomi .....	8
1.6.2 Immunforsvar .....	9
1.7 Snegler i ordenen Neogastropoder .....	10
1.7.1 Bioaktive forbindelser fra mollusker og Neogastropoder .....	11
1.8 Bioaktivitetsledet rensing for å finne nye bioaktive naturprodukter .....	13
1.8.1 Ekstraksjon av naturprodukter.....	14
1.8.2 Bioaktivitet screening.....	14
1.8.3 Kromatografisk separasjon.....	15
1.8.4 Massespektrometri.....	17
1.8.5 Dereplikering.....	18
1.9 Mål for oppgaven .....	19
2 Materialer og metoder .....	20
2.1 Studiedesign .....	20
2.2 Materialer .....	21
2.2.1 Kjemikalier og medier.....	21
2.2.2 Bakterier .....	21

2.2.3	Biologisk materiale.....	21
2.3	Prøvetaking.....	21
2.4	Ekstraksjon og grovseparasjon.....	22
2.4.1	Løsemiddel ekstraksjon.....	22
2.4.2	Fast fase ekstraksjon.....	23
2.5	Separasjon ved revers-fase høytrykks-væskekromatografi (RP-HPLC).....	23
2.6	Karakterisering ved massespektrometri (LC-ESI-MS).....	24
2.7	Bakteriedyrking.....	24
2.8	Antibakteriell testing.....	25
2.9	Minste inhiberende konsentrasjon (MIC) assay.....	26
3	Resultater.....	27
3.1	Utbytte av ekstraksjon av det biologiske materialet.....	27
3.2	Antibakteriell aktivitet i ekstrakter.....	29
3.3	Isolering og innledende karakterisering av aktive komponenter.....	32
3.3.1	Neptunsnegl - 40% SPE fra vev.....	32
3.3.2	Neptunsnegl - 10% SPE fra hemocytter.....	36
3.3.3	Kongsnegl - 40% SPE fra vev.....	38
3.3.4	Kongsnegl - 80% SPE fra egg.....	41
4	Diskusjon.....	45
4.1	Utbytte av ekstraksjon.....	45
4.2	Antibakteriell aktivitet.....	46
4.3	Innledende karakterisering av aktive forbindelser.....	49
4.4	Videre arbeid.....	54
5	Konklusjoner.....	55
	Referanser.....	56

## Forkortelser

<b>ACN</b>	Acetonitril
<b>AMP</b>	Antimikrobielle peptider
<b>DAD</b>	Diode array detector
<b>FA</b>	Maursyre (formic acid)
<b>FDA</b>	U. S. Food and Drug Administration
<b>HPLC</b>	Høytrykks-væskekromatografi (high performance liquid chromatography)
<b>HR-MS</b>	Høyopløselig massespektrometri (high-resolution mass spectrometry)
<b>LC-ESI-MS</b>	Væskekromatografi elektrospray ionisering massespektrometri (liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry)
<i>m/z</i>	Masse-til-ladning (mass-to-charge)
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>MIC</b>	Minste inhiberende konsentrasjon (minimal inhibition concentration)
<b>MS</b>	Massespektrometri (mass spectrometry)
<b>OD</b>	Optisk tetthet (optical density)
<b>Q-TOF</b>	Quadrupole time-of-flight
<b>RI</b>	Brytningsindeks (refractive index)
<b>RP-HPLC</b>	Revers-fase høytrykks-væskekromatografi (reversed-phase high performance liquid chromatography)
<b>SPE</b>	Fast fase ekstraksjon (solid phase extraction)
<b>TFA</b>	Trifluoreddiksyre (trifluoroacetic acid)
<b>UV-Vis</b>	Ultrafiolett-synlig lys (ultraviolet-visible)



# 1 Innledning

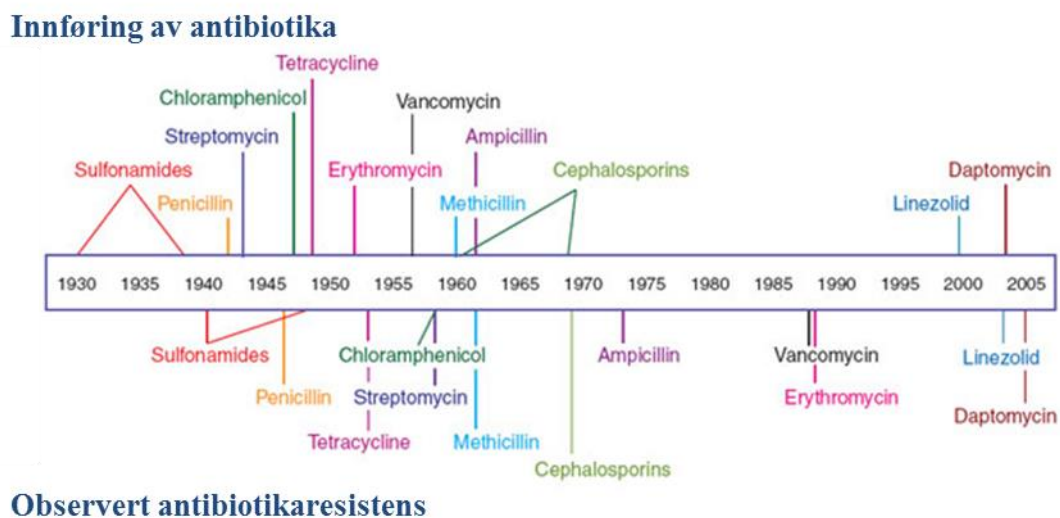
## 1.1 Antibiotika og resistensutvikling

Antibiotika har gjennom historien vært en av de viktigste bidragsyterne til moderne medisin (Arias & Murray, 2015), blant annet ved å redusere barnedødelighet og øke forventet levealder. Antibiotika er avgjørende for å kunne gjennomføre medisinske behandlinger som kirurgi, organtransplantasjon og kreftbehandlinger (Mandal *et al.*, 2014; Rossolini *et al.*, 2014; Blair *et al.*, 2015). Den økende bruken av antibiotika har imidlertid ført til en sterk økning av antall resistente bakteriestammer, noe som vil si at de ikke lenger er sensitive mot tradisjonelle antibiotika. Verdens helseorganisasjon (WHO) anser dette som en av de største utfordringene for den globale helsen (WHO, 2016).

Antibiotika er en fellesbetegnelse på forbindelser som kan hemme eller drepe mikroorganismer (Yazdankhah *et al.*, 2013). De fleste antibiotika har begrenset levetid, og innføring av nye antibiotika vil over tid selektere for patogene bakteriestammer (Penesyan *et al.*, 2015). Resistensmekanismer kan variere avhengig av type antibiotika, men involverer ofte en eller flere av følgende mekanismer; endre målet for antibiotikumet i bakteriecellen, enzymatisk modifisering eller degradering av antibiotikumet, eller begrense akkumuleringen av antibiotikumet inne i bakteriecellen. Antibiotika binder spesifikt til et mål i bakteriecellen med høy affinitet og hemmer aktiviteten til målmolekylet. Endring av målmolekylet i bakteriecellen vil hindre en effektiv binding og dermed motvirke virkningsmekanismen til antibiotikumet. Modifisering eller degradering av antibiotikumet kan føre til redusert eller tapt aktivitet av antibiotikumet. Dette har blitt observert i flere antibiotikaklasser, deriblant  $\beta$ -laktamer der enzymet  $\beta$ -laktamase inaktiverer antibiotikumet ved å hydrolysere  $\beta$ -laktamringen. Redusert akkumulering av antibiotika i bakteriecellen kan foregå ved to ulike mekanismer; ved å endre permeabiliteten til legemidlet i bakteriemembranen eller ved aktiv pumping av legemidlet ut av bakteriecellen (Poole, 2002).

Etter introduksjonen av penicillin tok det kun syv år før halvparten av isolerte stammer av *Staphylococcus aureus* var resistente (Penesyan *et al.*, 2015). Det samme har blitt observert for andre typer antibiotika, der resistente bakteriestammer har blitt isolert i løpet av relativt kort tid etter at de var tatt i bruk (figur 1). I 2004 var mer enn 70% av alle patogene

bakteriestammer resistente mot minst en av antibiotikaene på markedet (Penesyán *et al.*, 2015). Antibiotika som tidligere har blitt brukt med gode resultater mot enkelte patogene bakterier, vil etter hvert miste effektiviteten overfor de samme bakteriene. Det betyr at infeksjonssykdommer som tidligere har blitt behandlet med antibiotika ikke lenger kan behandles. Infeksjonssykdommer har på verdensbasis blitt den nest vanligste dødsårsaken, og bare i Europa og USA estimeres det at ca. 50 000 mennesker dør årlig på grunn av antibiotikaresistente bakterier (von Nussbaum *et al.*, 2006; Arias & Murray, 2015; Blair *et al.*, 2015).



**Figur 1. Utvikling av antibiotikaresistens.** Oversikt over innføring (over tidslinjen) og observert resistens (under tidslinjen) av antibiotika i perioden fra 1930 til 2005. Figuren er modifisert fra Clatworthy *et al.* (2007).

Penicillin var det første antibiotikumet som ble innført som et legemiddel på begynnelsen av 40-tallet, og var starten på gullalderen (1945-1965) for forskning og utvikling av antibiotika (Livermore *et al.*, 2011). Senere, da de mye brukte antibiotikaene streptomycin, kloramfenikol og tetrasyklin ble utviklet, ble det mulig å behandle vanlige infeksjonssykdommer (Penesyán *et al.*, 2015). Siden 40-tallet har flere ulike typer antibiotika, både naturlige og syntetiske, med ulike virkningsmekanismer blitt utviklet og brukt i behandling av mikrobielle sykdommer. Utviklingen av nye antibiotika har imidlertid stoppet opp, og nesten alle antibiotikaklassene som brukes i dag ble oppdaget før 1970. Etter 1970 har kun tre nye klasser antibiotika nådd markedet; karbapenemer (1985), oxazolidinoner (2000) og lipopeptider (2003). De fleste nye antibiotikaene på markedet etter 70-tallet har vært kjemiske modifiseringer av allerede eksisterende klasser av antibiotika (Butler & Buss, 2006;

Livermore *et al.*, 2011). Denne tilnærmingen vil imidlertid ikke være ideell for å løse problematikken med antibiotikaresistens. Strategien kan øke effektiviteten, men det utsetter også bakteriene for et begrenset arsenal av antibakterielle strategier (virkningsmekanismer) (Davies & Davies, 2010; Sperstad *et al.*, 2011).

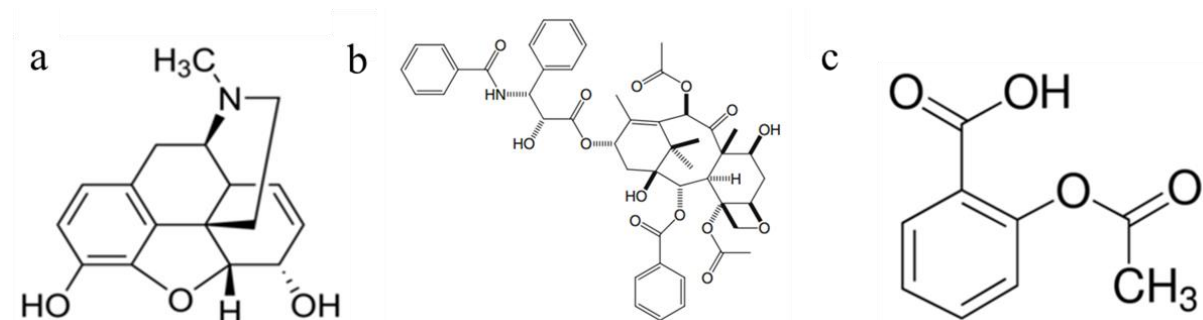
Et økende antall patogene bakteriestammer som utvikler resistens mot dagens kommersielle antibiotika, kombinert med at det ikke har blitt utviklet nye typer antibiotikaklasser, er en av de største truslene mot folkehelsen i vår tid (Livermore *et al.*, 2011; Yazdankhah *et al.*, 2013). Det er derfor et umiddelbart behov for utvikling av nye typer antibiotika med ulik virkningsmekanisme enn de som allerede eksisterer på markedet (Butler & Buss, 2006).

## **1.2 Naturprodukter som kilde til nye antibiotika**

Naturen kan være en god inspirasjon for utvikling av nye antimikrobielle forbindelser med alternative virkningsmekanismer (Sarker & Nahar, 2012). Bioaktive forbindelser med opphav fra naturen har vært en viktig kilde for utvikling av legemidler. Et stort antall dyr, planter og bakterier har blitt undersøkt for innhold av slike forbindelser med mulige applikasjoner innen farmasøytisk industri (Henkel *et al.*, 1999; Horta *et al.*, 2015). Mennesket har gjennom alle tider utnyttet naturen for å overleve, blant annet gjennom utnyttelse av naturstoffer til medisinsk bruk. De eldste skrifter indikerer at naturprodukter ble utnyttet i Mesopotamia helt tilbake til 2400 f.Kr., der blant annet olje fra seder- og sypress trær, lakris, myrra og valmueolje ble benyttet som medisiner (Newman *et al.*, 2000; David *et al.*, 2015). WHO estimerer at 75% av verdens befolkning fremdeles er avhengig av tradisjonell plantebasert medisin som en del av det primære helsetilbudet (Sarker & Nahar, 2012).

Produkter med opphav fra naturen kan betegnes som naturprodukter, og inkluderer hele organismer, deler av organismer, ekstrakter fra organismer eller rene komponenter isolert fra organismer. I legemiddelsammenheng refererer begrepet ofte til sekundærmetabolitter. Dette er forbindelser som produseres for å øke overlevelsessjansen, samt å gi den produserende organismen fordeler utover den umiddelbare overlevelsen (Samuelsson & Bohlin, 2009; Sarker & Nahar, 2012). Disse sekundærmetabolittene tilhører flere ulike kjemiske klasser inkludert terpenener, peptider, alkaloider, steroider og mange uidentifiserte og ikke-kategoriserte strukturer (Houssen & Jaspars, 2012; Horta *et al.*, 2015). Slike molekyler har vist seg å være et godt utgangspunkt for utvikling av nye legemidler ettersom ca. 70% av

moderne legemidler har opprinnelse fra naturprodukter (Samuelsson & Bohlin, 2009; Newman & Cragg, 2016). Eksempler på vellykkede legemidler utviklet fra naturprodukter er morfin fra valmuen *Papaver somniferum* (figur 2a), Taxol® fra barken av barlinden *Taxus brevifolia* (figur 2b), og Aspirin fra barken av treet *Salix alba* (figur 2c) (Samuelsson & Bohlin, 2009; Sarker & Nahar, 2012).



**Figur 2. Strukturer av tre legemidler utviklet fra naturprodukter.** Morfin (a), Taxol® (b) og Aspirin (c) utvunnet fra naturprodukter. Strukturer er hentet fra henholdsvis Samuelsson & Bohlin (2009), Gray *et al.* (2012) og Grabley & Thiericke (1999).

Naturprodukter kan brukes som utgangspunkt for utvikling av nye legemidler på tre ulike måter; 1) tas i bruk som legemiddel direkte uten videre modifiseringer, eksempel på dette er kreftmedisinen vincristine isolert fra blomsten *Catharanthus roseus*, 2) ved å gi kjemiske byggeklosser for syntese av mer komplekse molekyler, eksempel på dette er diosgenin fra planten *Dioscorea floribunda* som er utgangspunkt for videre syntese av flere hormoner, eller 3) ved å indikere nye virkningsmekanismer som utgangspunkt for syntese av nye analoger, eksempel på dette er penicillin fra soppen *Penicillium notatum* (Sarker & Nahar, 2012).

Naturprodukter er ofte mer kjemisk komplekse forbindelser med en større kjemisk diversitet sammenlignet med syntetiske og semi-syntetiske forbindelser, noe som gir en større sannsynlighet for å finne nye typer molekyler. Naturprodukter inneholder også et høyere antall kirale sentre, ringstrukturer og høyere tetthet av funksjonelle grupper slik at de får en høyere ligandaffinitet og er mer spesifikk til biologiske mål (som generelt ikke oppnås for syntetiske forbindelser). Forbindelser som har utviklet seg i samspill med deres biologiske mål gjør dem spesielt interessante for utvikling av nye legemidler (Butler & Buss, 2006; Molinari, 2009; Singh & Culberson, 2010; Montaser & Luesch, 2011).

### 1.3 Antimikrobielle peptider

Antimikrobielle peptider (AMP) kan drepe eller hemme veksten av mikroorganismer og er derfor ansett som en av de viktigste komponentene i det medfødte immunforsvaret hos både vertebrater og invertebrater. Denne egenskapen utgjør et stort potensial for utvikling av nye typer antibiotika (C. Li *et al.*, 2008; Guilhelmelli *et al.*, 2014).

AMP karakteriseres ved en kort aminosyresekvens, bestående av mellom 6-50 aminosyrer. Den største gruppen AMP er kationiske og virkningsmekanismen er relatert til den positive ladningen (Hwang & Vogel, 1998). Den kationiske ladningen fører til at peptidene binder seg til anioniske strukturer på bakteriecelleoverflaten via elektrostatiske bindinger. Hos Gram-negative bakterier antas det at peptidene binder til lipopolysakkarider i den ytre celleveggen, mens hos Gram-positive bakterier antas det at den elektrostatiske bindingen skjer til teikonsyre eller lipoteikoinsyre i peptidoglykanlaget (Rana *et al.*, 1991; Vorland *et al.*, 1999). De fleste AMP er i tillegg amfipatiske i sin aktive form, med både hydrofile og hydrofobe domener. Dette medfører at peptidet både kan binde til lipidkomponenter (hydrofobe) og fosfolipidgrupper (hydrofile) (Tincu & Taylor, 2004; Bahar & Ren, 2013; Mandal *et al.*, 2014). De fleste kationiske peptider har som virkningsmekanisme å danne porer i cellemembranen eller på andre måter påvirker cellemembranen. Utvikling av resistens mot kationiske peptider antas å være mindre sannsynlig ettersom målet er den cytoplasmiske membranen, bakteriene er da avhengig av å omstrukturere og/eller endre sammensetningen av lipider i membranen, noe som er en kostbar løsning for bakterien (Zasloff, 2002; Marr *et al.*, 2006).

Et eksempel på et AMP som har vist seg effektivt overfor antibiotikaresistente bakterier er nisin, isolert fra melkesyrebakterien *Lactococcus lactis*. Mekanismen til nisin involverer hemming av peptidoglykan syntesen og dannelse av porer i bakeriemembranen. Blant annet meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) og vankomycinresistente enterokokker (VRE) har vist seg å være sensitive mot nisin (Brumfitt *et al.*, 2002).

Kationiske peptider kan være spesielt lovende til human bruk siden disse i liten grad vil skade eukaryote celler. Cellemembranen til eukaryote celler inneholder mest nøytrale (ikke ladde) fosfolipider som vil føre til at AMP ikke i like stor grad vil kunne interagere og danne

porer i cellemembranen. Det behøves derfor ofte en høyere konsentrasjon for å drepe eukaryote celler sammenlignet med bakterieceller (Ganz & Lehrer, 1999).

## 1.4 Marin bioprospektering

Havet dekker over 70% av jordens overflate og har en unik biodiversitet med nesten 300 000 kjente arter. Denne diversiteten representerer et enormt potensial for utvikling av nye legemidler (Pomponi, 1999; Kennedy *et al.*, 2010; Costello *et al.*, 2013). De fleste legemidler utviklet fra naturprodukter har et terrestrisk opphav. Det marine miljø har til sammenligning blitt mye mindre utforsket, spesielt arktiske områder, noe som gir et stort potensial for å finne helt nye forbindelser i disse områdene (Samuelsson & Bohlin, 2009; Montaser & Luesch, 2011; Cragg & Newman, 2013).

Marin bioprospektering kan defineres som systematisk leting etter biologisk aktive komponenter og deres gener fra organismer i det marine miljøet, med formål å utvikle kommersielle produkter (Artuso, 2002). Organismer med opphav fra marine miljøer møter på flere særegne fysiske og kjemiske utfordringer sammenliknet med organismer fra terrestriske habitater. Dette inkluderer variasjon i trykk, salteksposering, lys, pH og tilgang til oksygen (Horta *et al.*, 2015). For å håndtere slike variasjoner, samt unngå å bli spist, infisert av patogene mikroorganismer eller bli overgrodd, har mange marine organismer utviklet et kjemisk forsvar bestående av blant annet sekundærmetabolitter. Det har blitt påvist en rekke biologiske aktiviteter fra marine organismer inkludert anticancer, antimikrobiell, antioksidant, antiinflammatorisk og antidiabetes aktivitet (Dunlap & Yamamoto, 1995; Schwartzmann *et al.*, 2001; Yasuhara-Bell & Lu, 2010; Mayer *et al.*, 2011).

Flere legemidler har blitt utviklet med utgangspunkt i marine sekundærmetabolitter. Fra 1965 til 2015 har mer enn 16 000 marine komponenter blitt isolert og mer enn 300 patenter på stoffer med opphav i det marine miljøet blitt godkjent (Horta *et al.*, 2015). Per april 2016 var syv legemidler med opprinnelse fra marine organismer godkjent av FDA (U. S. Food and Drug Administration) og 24 potensielle legemidler var i fase I, II eller III i klinisk testing (Mayer, 2016).

## 1.5 utfordringer knyttet til utvinning av marine naturprodukter

Antimikrobielle forbindelser fra havet har potensial som ny type antibiotika, men det er også knyttet en del utfordringer til utvinning av disse naturproduktene. En utfordring med isolering og karakterisering av marine naturprodukter er at mange marine organismer kan være vanskelig å identifisere. Feil eller ufullstendig taksonomisk bestemmelse kan føre til feil antagelse om den kjemiske sammensetningen til en organisme, noe som kan gi problemer ved valg av isoleringsmetode. Korrekt taksonomisk bestemmelse er også essensielt for re-innsamling av mer materiale for videre analyser (Houssen & Jaspars, 2012).

En annen stor utfordring ved å ta utgangspunkt i naturprodukter er begrensninger i tilgang på biologisk materiale. For å kunne gjennomføre prekliniske og kliniske studier, samt videreutvikling av potensielle legemidler er det nødvendig med en kontinuerlig tilførsel av biomasse. Med andre ord: mer materiale til testing av bioaktivitet. «Supply issue» er en av de største utfordringene innen utvikling av legemidler fra naturprodukter (Montaser & Luesch, 2011).

De mest aktive komponentene forekommer oftest kun i små mengder i marine naturprodukter, noe som gjør ekstraksjon og isolering utfordrende siden tilstedeværelsen av aktive komponenter kan være under deteksjonsgrenser i tester som benyttes (Houssen & Jaspars, 2012). Konsentrasjonen av aktive forbindelser i marine invertebrater er ofte mindre enn  $10^{-6}\%$  av våtvekten, noe som gir et lavt utbytte av de aktive komponentene (Sperstad *et al.*, 2011). Dette krever en høy biomasse for isolering av de bioaktive komponentene. Et eksempel på denne utfordringen er isoleringen av antitumor-forbindelsen spongistatin 4. Fra 2,5 tonn av den marine svampen *Spirastrella spinispirulifera* var det kun mulig å isolere 10,7 mg spongistatin 4. Et annet eksempel er antitumor peptidet dolastatin 10. For å utvinne 1 mg ble det benyttet nesten 2 tonn av sneglen *Dolabella auricularia*, en prosess som tok over 10 år (Houssen & Jaspars, 2012). Ved så lave konsentrasjoner av et aktivt stoff er det begrenset hvor mye av en organisme man kan samle inn uten å påvirke økosystemet. I tillegg er det også knyttet en økonomisk utfordring til dette (Pomponi, 1999).

Andre utfordringer knyttet til isolering av marine naturprodukter er at ekstrakter ofte inneholder ustabile forbindelser som er sensitive for varme, lys, luft og pH, noe som kan føre til degradering av de aktive komponentene under isoleringsprosessen (Houssen & Jaspars,

2012; Sarker & Nahar, 2012). Andre faktorer som kan påvirke oppdagelsen av nye naturstoffer er for eksempel sesongvariasjoner, geografiske variasjoner, temperaturforandringer, ulike livsstadier, kjønn og sykdommer. Dette kan gjøre det vanskelig å re-isolere forbindelser ved henting av mer biomasse (Sperstad *et al.*, 2011). Et eksempel på en slik variasjon ble observert ved er isoleringen av et 20 kDa antimikrobielt protein fra krabben *Scylla serrata*, der det bioaktive proteinet kun ble isolert fra hannkrabber (Jayasankar & Subramoniam, 1999). Et annet eksempel på variasjoner som kan påvirke uttrykket av bioaktive komponenter er endringer i temperatur, strandkrabben *Carcinus maenas* øker for eksempel uttrykket av det antimikrobielle peptidet carcinin ved 5 °C og 20 °C, som er nedre og øvre temperaturgrense for denne arten (Brockton & Smith, 2008).

## **1.6 Marine snegler (Gastropoder)**

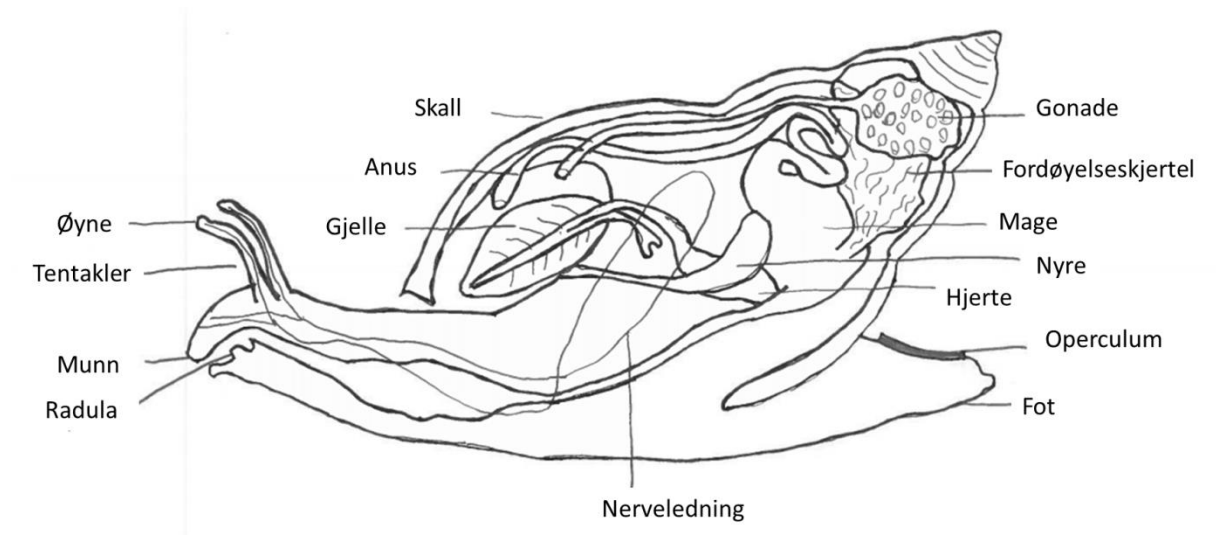
Snegler (Gastropoda) er en klasse av bløtdyr (Mollusca) og er etter insekter den nest mest artsrike klassen av virvelløse dyr og inneholder mellom 40 000-150 000 nålevende arter som finnes på land, i ferskvann og i havet (Loker, 2010; Sømme, 2016). I Norge finnes det ca. 500 sneglearter hvor de fleste er marine (Hågvar, 1998). Marine mollusker utnyttes i dag blant annet til humant konsum. Kommersielt høstes det ca. 10 millioner tonn mollusker årlig, der muslinger og blekksprut utgjør mesteparten, mens gastropoder utgjør kun ca. 2% av det totale høstingsvolumet (Ab Lah *et al.*, 2016).

### **1.6.1 Anatomi**

Gastropoder har en karakteristisk inndeling av kroppen i et hode, en flat fot og en innvollssekk. De skiller seg fra andre arter av mollusker ved at de indre organene er asymmetriske (Hågvar, 1998). Generell anatomi til snegler er vist i figur 3. De fleste sneglearter har et spiralsnodd skall som sneglen kan trekke seg helt eller delvis inn i og dermed beskytte den myke delen av kroppen. I tillegg har de fleste marine snegler operculum ytterst på foten som fungerer som et lokk som stenger åpningen i skallet når sneglen er trukket inn. Den myke delen av sneglen består av en flat muskuløs fot som sneglen bruker som bevegelsesorgan. Snegler har et tydelig avsatt hode ytterst på foten med ett eller to par tentakler som brukes som sanseorgan, og øyne som enten sitter ved siden av eller ytterst på tentaklene. På undersiden av hodet har gastropoder en munn med en raspetunge (radula). Denne tannlignende strukturen bruker sneglene til å raspe opp mat. På oversiden av foten ligger innvollssekken som blant annet inneholder fordøyelse-, sirkulasjon-, respirasjon- og



formeringsorganer som oftest er kveilet opp i en spiralform. Snegler har et åpent sirkulasjonssystem som vil si at blodvæsken (hemolymfen) flyter fritt fra hjertet og ut i kroppshulen, og har direkte kontakt med vev og organer istedenfor å være omkranset av blodårer (Lindner, 1976; Hågvar, 1998). Gastropoder deles inn i tre underklasser basert på om de har lunger eller gjeller og plassering av disse; lungesnegler (Pulmonata), forgjellesnegler (Prosobranchia) og bakgjellesnegler (Opisthobranchia) (Hågvar, 1998).



**Figur 3. Taksonomisk inndeling av gastropoder.** Figuren illustrerer en forgjellesnegl, der ulike bestanddeler av sneglen er merket. Figuren er basert på Buchsbaum *et al.* (1987).

### 1.6.2 Immunforsvar

Snegler er i likhet med andre marine invertebrater avhengig av et godt immunforsvar på grunn av det høye nivået av bakterier ( $10^6$  bakterier/ml) og virus ( $10^9$  virus/ml) som finnes i sjøvann (Tincu & Taylor, 2004). Marine invertebrater innehar ikke et adaptivt immunsystem (hukommelsesceller) som vi kjenner fra høyerestående dyr, men har i stedet et velutviklet og robust medfødt immunforsvar. Det medfødte immunforsvaret involverer både humoral og cellulær respons. Cellulær immunitet er mediert av hemocytter (blodceller) som inkluderer mekanismer som koaguleringsreaksjoner, fagocytose og innkapsling. Humoral immuniteten involverer hemolymfe-baserte bioaktive forbindelser som blant annet kan være antimikrobielle peptider, lektiner og koaguleringsfaktorer som beskytter organismen mot mikroorganismer. Disse bioaktive forbindelsene produseres som oftest av hemocytter (Miyata *et al.*, 1989; Tincu & Taylor, 2004; Loker, 2010; Otero-González *et al.*, 2010).

## 1.7 Snegler i ordenen Neogastropoder

Ordenen neogastropoder tilhører underklassen forgjellesnegler og er en svært variert gruppe snegler bestående av 20 familier med ca. 16 000 ulike arter. De fleste neogastropoder lever i havet, mens noen få lever i ferskvann, der de fleste er rovdyr eller åtseletere. Ordenen inkluderer blant annet undergruppene kongsnegler (Buccinidae), piggsnegler (Muricidae), valesnegler (Volutidae) og kjeglesnegler (Conoidea) (Lindner, 1976; Cunha *et al.*, 2009). To vanlige sneglearter langs norskekysten er neogastropodene kongsnegl og neptunsnegl.

### **Kongsnegl (*Buccinum undatum*)**

Kongsnegl (*Buccinum undatum*, Linnaeus, 1758) (figur 4) tilhører rekke Mollusca (bløtdyr), klasse Gastropoda (snegle) og orden Neogastropoda. Kongsnegl er utbredt i Europa fra Island og Nord-Norge til Biscayabukten. Arten er vanlig langs hele norskekysten og rundt de Britiske øyene. Kongsnegl er en av de største snegleartene langs kysten og skallet kan bli opptil 110 mm langt med en skallbredde på opptil 68 mm. Arten kjennetegnes av et ru spiralformet skall med spiralsnodde lister med kraftige ribber nedover. Den forekommer på både hard- og bløtbunn fra noen få meters dyp og ned til 1200 meter (Moen & Svensen, 2008). Kongsneglen er et rovdyr og spiser blant annet børsteormer, krepsdyr, muslinger og åtsler (Hågvar, 1998). Det har tidligere blitt påvist antimikrobiell aktivitet i ekstrakter fra kongsnegl både mot Gram-positive og Gram-negative bakteriestammer, det er imidlertid ikke beskrevet hvilke forbindelser som er ansvarlig for bioaktiviteten (Defer *et al.*, 2009).



#### **Taksonomi:**

**Rekke:** Mollusca

**Klasse:** Gastropoda

**Orden:** Neogastropoda

**Familie:** Buccinidae

**Genus:** Buccinum

**Figur 4. Kongsnegl** © Erling Svensen.

## Neptunsnegl (*Neptunea despecta*)

Neptunsnegl (*Neptunea despecta*, Linnaeus, 1758) (figur 5) tilhører rekke Mollusca (bløtdyr), klasse Gastropoda (snegle) og orden Neogastropoda. Neptunsnegl er vanlig i store deler av det nordlige Atlanterhavet og finnes rundt Shetlandsøyene, Island, Arktis og langs hele norskekysten. De er i hovedsak observert på bløtbunn fra 10-1200 m dyp. Arten er en av Norges største snegler og kan bli opptil 200 mm lang. De kjennetegnes ved markerte og noen ganger knudrete spiralkjølger (Moen & Svensen, 2008). Det er ikke funnet publisert materiale som beskriver antimikrobiell aktivitet i neptunsnegl.



### **Taksonomi:**

**Rekke:** Mollusca

**Klasse:** Gastropoda

**Orden:** Neogastropoda

**Familie:** Buccinidae

**Genus:** Neptunea

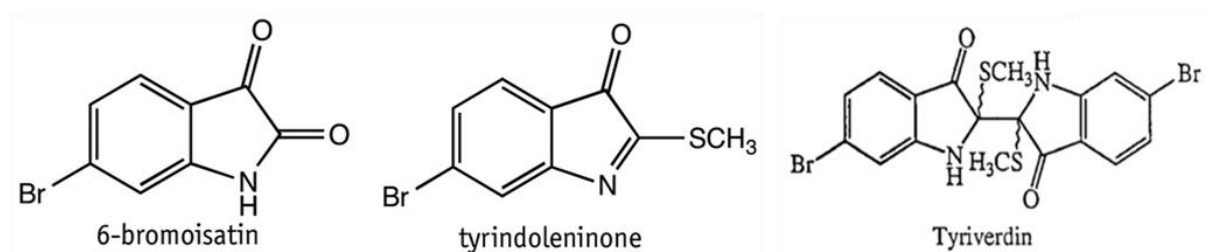
Figur 5. Neptunsnegl © Erling Svensen.

### **1.7.1 Bioaktive forbindelser fra mollusker og Neogastropoder**

Antimikrobielle peptider har tidligere blitt karakterisert fra en rekke marine invertebrater (Lee *et al.*, 1997; Mitta *et al.*, 2000; Ovchinnikova *et al.*, 2006; Stensvåg *et al.*, 2008; Solstad *et al.*, 2016). Fra mollusker har rundt 20 ulike AMP familier blitt karakterisert der hovedfokuset har vært på muslinger. Antimikrobielle peptider i gruppen gastropoder er derimot mindre undersøkt (Cheng-Hua *et al.*, 2009; Otero-González *et al.*, 2010). Antimikrobiell aktivitet i gastropoder ble første gang påvist fra glykoproteiner i *Aplysia kurodai* på 1980-tallet. Siden 80-tallet har en rekke antimikrobielle forbindelser blitt påvist og karakterisert fra bløtdyr, inkludert glykoproteiner (Yamazaki *et al.*, 1990; Iijima *et al.*, 2003) og antimikrobielle peptider (Park *et al.*, 2012; Dolashka *et al.*, 2016; Seo *et al.*, 2016).

Litteratursøk avdekker at antimikrobielle peptider og proteiner fra orden Neogastropoder i liten grad er beskrevet tidligere. Fra hemolymfen til piggsneglen *Rapana venosa* ble flere prolin-rike peptider med antimikrobiell aktivitet både mot Gram-positive og Gram-negative bakterier isolert (Dolashka *et al.*, 2011). Fra samme art ble også proteinene hemocyanin subunit RvH1-b og RvH1-e isolert fra hemolymfen, men disse viste kun lav antimikrobiell aktivitet mot den Gram-positive bakterien *Staphylococcus aureus* (Dolashka *et al.*, 2016). Peptidet conolysin-mt isolert fra giftkanalen til kjeglesneglen *Conus mustelinus* har en cytolytisk virkningsmekanisme, men peptidet viste også lav antibakteriell aktivitet mot *Escherichia coli* og *S. aureus* (Biggs *et al.*, 2007). Peptidet molluskin amplifisert fra cDNA fra kongsneglearten *Bullia vittata*, har fysiske og kjemiske likheter med tidligere karakteriserte bioaktive peptider og kan derfor tenkes å ha antimikrobiell aktivitet (Sathyan *et al.*, 2012).

I tillegg til antimikrobielle peptider og proteiner har også andre lavmolekylære bioaktive molekyler blitt isolert fra mollusker, inkludert steroler, terpen, makrolider og fettsyrederivater, alkaloider (Ichiba & Higa, 1986; Perez *et al.*, 1986; de Nys *et al.*, 1996; Alam & Thomson, 1998). Fra ordenen neogastropoder har det tidligere blitt isolert en rekke halogenerte lavmolekylære bioaktive forbindelser. Fra piggsneglen *Dicathais orbita* har tre antibakterielle indol-forbindelser blitt isolert og karakterisert; 6-bromoisatin, tyrindoleninone og tyriverdin (figur 6). Forbindelsene har vist antibakteriell aktivitet mot både humane og marine patogene bakterier (Benkendorff *et al.*, 2000).



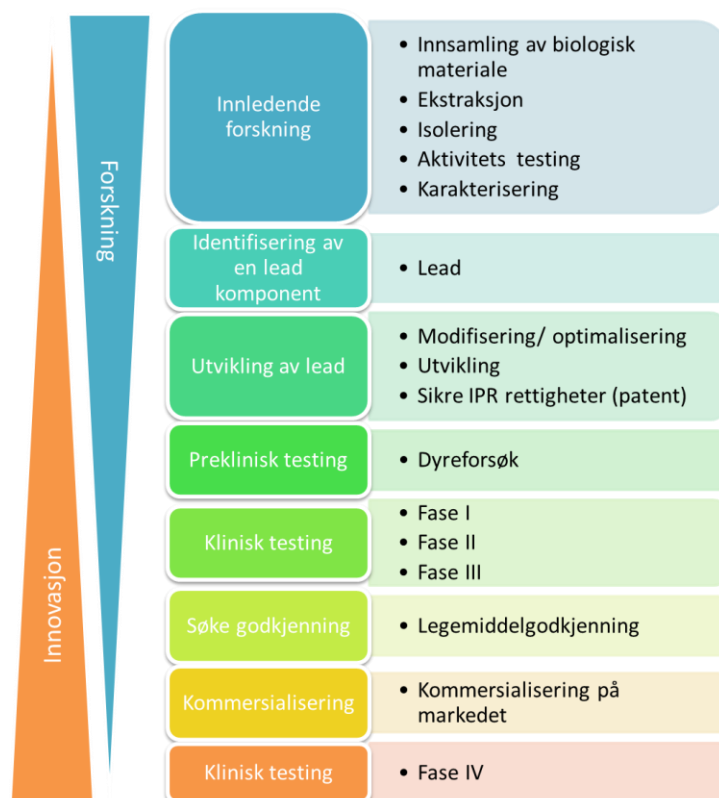
**Figur 6. Antimikrobielle forbindelser isolert fra neogastropoder.** Struktur til de antimikrobielle beslektede bromerte forbindelsene 6-bromoisatin, tyrindoleninone og tyriverdin isolert fra den australske purpursneglen *Dicathais orbita*. Strukturene er hentet fra Benkendorff *et al.* (2000).

Fukuyama *et al.* (1998) isolerte tre antibakterielle indolequinone;(6-methoxyindole-4,7-quinone, 5-methoxyindole-4,7-quinone og 5-methylindole-4,7-quinone) fra piggsneglen *Drupella fragum*. Fra piggsneglen *Purpura pansa* ble den antibakterielle forbindelsen 2,3,4-trimethyl-5-(4-methyl-cyclohexyl)-2,4 pentadiene karakterisert av Perez *et al.* (1988). Det er

tidligere også påvist at umettede fettsyrer isolert fra egg fra neogastropoder innehar bakterolytisk aktivitet mot marine patogene bakterier. Antibakteriell aktivitet ble blant annet påvist i palmitoleinsyre (C16:1), oljesyre (C18:1), linolsyre (C18:2) og arakidonsyre (C20:4) (Benkendorff *et al.*, 2005).

## 1.8 Bioaktivitetsledet rensing for å finne nye bioaktive naturprodukter

Utvikling av nye legemidler med utgangspunkt i naturprodukter er en lang og omfattende prosess som er skissert i figur 7. Bioprospektering involverer flere ulike trinn som starter med innsamling av biologisk materiale og påvisningen av en «hit», til å definere en «lead» og videre utvikling av lead i ulike stadier fram til klinisk utprøving, godkjenning og kommersialisering. Fokuset i denne oppgaven er på den innledende forskningen, fra innsamling og bearbeiding av biologisk materiale til påvisning, isolering og karakterisering av bioaktive forbindelser.



Figur 7. Skjematisk fremstilling av utviklingsprosessen for et legemiddel fra innsamling av biologisk materiale til kommersialisering.

Det er tatt utgangspunkt i en bioaktivitetsledet rensestrategi (bioassay-guided purification) for isolering av bioaktive naturprodukter. Bioaktivitetsledet rensing er en moderne strategi som forfølger en gitt bioaktivitet ved isolering av aktive forbindelser fra et biologisk materiale (Sarker & Nahar, 2012). Generelle prinsipper for ekstraksjon, isolering og innledende karakterisering av antimikrobielle forbindelser fra marine naturprodukter er beskrevet kort i de neste avsnittene.

### **1.8.1 Ekstraksjon av naturprodukter**

Ekstraksjon er et av de første stegene for å undersøke den kjemiske sammensetningen til et naturprodukt. Før ønskede komponenter kan isoleres må de først ekstraheres fra det biologiske materialet. Ekstraksjonsstrategi bestemmes på bakgrunn av opphavet til materialet og hvilke komponenter som ønskes isolert. Ekstraksjonsmetoder kan variere fra enkle løsemiddelekstraksjoner til mer sofistikerte systemer som bruker trykk, ultralyd, varme og mikrobølgeenergi (Seidel, 2012). Løsemiddelekstraksjon er en enkel metode som brukes til å ekstrahere ut sekundærmetabolitter fra et biologisk materiale. Ekstraksjonsmetoden tar ofte utgangspunkt i homogenisert tørket materiale for å oppnå en økt overflate i forhold til løsemiddelet. Deretter brukes løsemidler med ønskede polare egenskaper, etterfulgt av omrøring, henstand og deretter filtrering eller sentrifugering som gjentas flere ganger. Etter ekstraksjon dampes løsemiddelet av fra ekstraktet ved temperaturer under 35 °C for å unngå degradering av komponentene. Dette er en enkel metode som krever lite utstyr, men som til gjengjeld krever relativt mye energi for å dampe av løsemiddel. Denne metoden er derfor ikke egnet i en industriell sammenheng (Bugni *et al.*, 2010; Houssen & Jaspars, 2012; Seidel, 2012).

### **1.8.2 Bioaktivitet screening**

Målet med bioaktivitetsledet rensing er å følge aktive forbindelser i fraksjoner og påvise bioaktivitet. Det er derfor viktig at ekstraktene testes mellom hvert renseseg for å identifisere fraksjoner med ønsket bioaktivitet og samtidig ekskludere de fraksjonene som er uten bioaktivitet. I «bioassay» brukes biologiske systemer for å detektere aktivitet, for eksempel antibakteriell, antiviral, anticancer og antidiabetes aktivitet. Det er ingen begrensning i antall bioassay som det biologiske materialet kan testes mot, men begrensningen ligger ofte i mengden tilgjengelig materiale, konsentrasjon av aktive forbindelser og deteksjonsgrensen i assay. Antibakteriell aktivitet kan undersøkes *in vitro* på laboratoriet ved å blande bakterier og

test-fraksjoner, og deretter se på graden av veksthemning opp mot positive og negative kontroller (Sarker & Nahar, 2012).

### **1.8.3 Kromatografisk separasjon**

Kromatografisk separasjon separerer komponenter i en prøve på bakgrunn av stoffenes fysiske eller kjemiske egenskaper som for eksempel ladning, størrelse, polaritet eller isoelektrisk punkt. Væskekromatografisk separasjon baserer seg på at komponentene i prøven fordeler seg med ulik affinitet mellom to faser, en mobilfase og en stasjonærfase. Mobilfasen transporteres gjennom stasjonærfasen og forbindelser med høy affinitet til mobilfasen vil elueres ut først, mens forbindelser med høyere affinitet til den stasjonære fasen vil eluere ut senere. Forbindelser med lignende egenskaper oppnår lignende eluering og havner i samme eller nærliggende fraksjoner (Janson & Jönsson, 2012).

Ved separasjon av naturprodukter er det vanlig å benytte revers-fase væskekromatografi (RP-LC) for separasjon. I RP-LC vil stasjonærfasen bestå av et upolart materiale, for eksempel C<sub>12</sub>- eller C<sub>18</sub>- materiale, og en mobilfase som kan endres fra hydrofil til hydrofob karakter. Dette medfører at hydrofile forbindelser elueres ut først, og etter hvert som mobilfasen øker til mer hydrofob karakter, vil mer lipofile forbindelser eluere ut (Bugni *et al.*, 2010; Latif & Sarker, 2012).

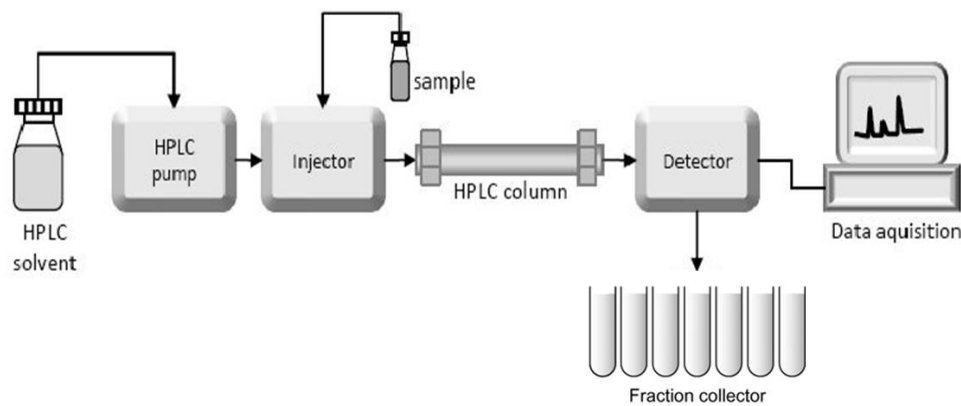
#### **Fast fase ekstraksjon (SPE)**

Fast fase ekstraksjon (SPE) er en lavtrykksvæskekromatografisk metode som brukes for å grovseparere og oppkonsentrere prøvene etter deres kjemiske eller fysiske egenskaper. Prøvene settes på en kolonne (stasjonærfase) og retarderte forbindelser elueres stegvis ved å endre karakteren til mobilfasen. Råekstraktet, for eksempel fra løsemiddelekstraksjon, inneholder en blanding av mange ulike komponenter. De bioaktive forbindelsene er ofte i lave konsentrasjoner, noe som gjør det utfordrende å isolere tilstrekkelig av de aktive komponentene slik at de kan detekteres (Sarker & Nahar, 2012). SPE vil øke sannsynligheten for deteksjon av bioaktive forbindelser og skille de aktive stoffene med hensyn på polaritet fra andre bestanddeler i råekstraktet.

Dette er spesielt viktig ved arbeid med marine prøver siden disse har et høyt saltinnhold som må fjernes før aktivitetstesting for å unngå falske positive (Houssen & Jaspars, 2012).

## Høytrykks-væskrokromatografi (HPLC)

Preparativt høytrykks-væskrokromatografi (prep-HPLC) er en separeringsteknikk som brukes for å separere enkeltforbindelser i komplekse prøver. Molekylene blir separert på bakgrunn av deres kjemiske egenskaper i forhold til mobil- og stasjonærfasen på samme måte som i fast fase ekstraksjon. Forskjellen mellom prep-HPLC og andre kromatografiske metoder uten høyt trykk er partikkelstørrelsen på materialet i den stasjonære fasen. Vanlig partikkelstørrelse i en prep-HPLC kolonne er 3-10  $\mu\text{m}$ , noe som gir stor evne til å separere komponenter i en løsning. Et prep-HPLC system består i hovedsak av en injeksjonsenhet, en pumpe som blander og pumper mobilfasene gjennom en kolonne (med stasjonærfase), en detektor, en fraksjonssamler og et datasystem (figur 8) (Latif & Sarker, 2012).



**Figur 8. Illustrasjon av et preparativt HPLC-system.** Prep HPLC-system bestående av en pumpe, injeksjonsenhet, kolonne, detektor, fraksjonssamler og datasystem. Figuren er modifisert fra Czaplicki (2013).

Mobilfasen pumperes kontinuerlig gjennom stasjonærfasen, og det er vanlig å benytte en mobilfase-gradient. Dette vil gi bedre separasjon av forbindelsene fremfor en trinnvis eluering som er vanlig å benytte i for eksempel SPE. Eluerte forbindelser går via en detektor som detekterer forbindelsene som «topper» i et kromatogram, noe som både gir en kvalitativ og kvantitativ informasjon om forbindelsene i ekstraktet. En av de mest brukte detektorene i prep-HPLC er UV-Vis DAD (ultraviolet-visible diode array detector), som detekterer forbindelser som absorberer lys i det ultrafiolette-synlige spekteret (200-600 nm). Detektoren kan enten stilles inn på en bestemt bølgelengde eller absorbere lys over flere bølgelengder samtidig (Latif & Sarker, 2012). En annen detektor som er vanlig å benytte ved prep-HPLC er RI (refractive index) detektor. RI detektoren måler brytningsindeksen til komponenter som elueres ut av kolonnen i forhold til mobilfasen. Ulempen ved en RI detektor er at den kun kan

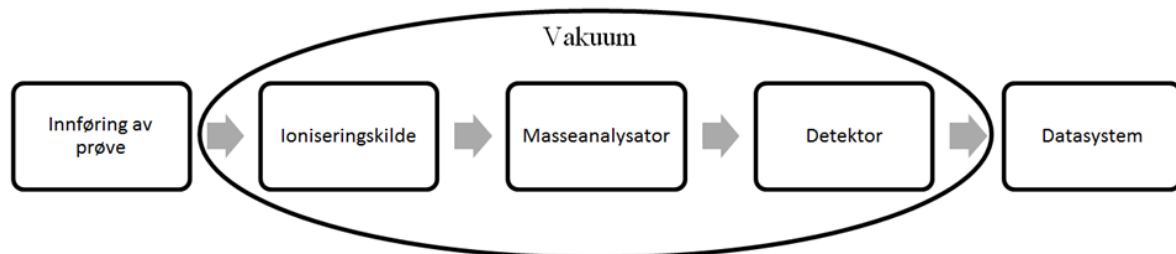


benyttes ved bruk av en konstant mobilfase (isokratisk). Etter separasjon og deteksjon av forbindelser samles fraksjoner opp ved bruk av en fraksjonssamler (Latif & Sarker, 2012).

#### 1.8.4 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analytisk metode som brukes for å detektere og identifisere molekylvekten til ukjente komponenter ved å ionisere og deretter separere og detektere ionene etter deres masse-til-ladnings ( $m/z$ ) forhold. MS er en sensitiv metode som kan detektere ned til mikrogram av en ukjent komponent. Metoden er derimot avhengig av at komponentene lar seg ionisere for at de skal detekteres, forbindelser som ikke lar seg ionisere kan dermed ikke påvises med MS (Houssen & Jaspars, 2012).

Massespektrometri består i hovedsak av fem ulike deler; et inntakssystem, en ioniseringskilde, en masseanalysator, en detektor og et datasystem som illustrert i figur 9. Prøven overføres i prinsippet først til gassform, og deretter ioniseres molekylene. Ioniseringen kan enten resultere i positivt eller negativt ladede forbindelser. Til slutt separeres og detekteres de ladede ionene i henhold til forholdet mellom deres masse og ladning ( $m/z$ ) (de Hoffmann & Stroobant, 2007).



**Figur 9. Illustrasjon av hovedkomponenter i et massespektrometer.** Massespektrometri bestående av en innføringsenhet, ioniseringskilde, masseanalysator, detektor og dataenhet som kan bearbeide signaler. Deler av MS systemet er under konstant vakuum (illustrert med en sirkel). Figuren er basert på Watson & Sparkman (2008).

Det finnes en rekke ulike typer ioniseringsmetoder som kan benyttes. Elektrospray ionisering (ESI) er en av de vanligste som brukes for å undersøke peptider/proteiner. Prøven pumpes gjennom et kapillær med et elektrisk felt som produserer ladede «dråper». Disse dråpene fordampes ved hjelp av høy temperatur og vakuum til mindre og sterkt ladede dråper som til slutt resulterer i ioniserte forbindelser. Ladningen på molekylene er enten positiv eller negativ, alt etter hvilken ESI-modus som benyttes (de Hoffmann & Stroobant, 2007; Kebarle & Verkerk, 2009).

En masseanalysator separerer deretter ionene etter deres masse-til-ladning forhold gjennom anvendelse av et elektrisk og et magnetisk felt. Det finnes flere ulike typer masseanalysatorer, en av disse er quadrupole (Q). En quadrupole består av fire staver som er arrangert parallelt med retningen på ionestrømmen. Motstående staver kobles sammen med en likespenning og en radiofrekvens, som gir et oscillerende elektrostatisk område mellom stavene. Avhengig av likespenningen og radiofrekvensen vil kun ioner med spesifikke  $m/z$ -verdier passere gjennom det elektriske feltet og videre til detektoren (Lampman *et al.*, 2010). En annen type masseanalysator er Time-of-flight (TOF). TOF separerer molekyler og måler  $m/z$  basert på tiden ionene bruker fra ioniseringskilden til detektoren gjennom et rør (flight tube). Ionene tvinges gjennom flight tube ved bruk av et høyt akselerasjons potensial (V). Tiden ionene bruker fra ioniseringskilden til detektoren avhenger av massen og ladningen til molekylet siden lengden på flight tube og spenningen (V) holdes konstant (Downard, 2004).

Etter separasjon av ioner i masseanalysatoren går ionene til detektoren som detekterer  $m/z$ -verdier og forekomsten av ionene. Et datasystem integrerer og overfører disse signalene og illustrerer dette i et massespekter (de Hoffmann & Stroobant, 2007).

### **1.8.5 Dereplikering**

Dereplikering er en hurtig identifisering av allerede kjente komponenter og har blitt en viktig del av screening etter nye naturprodukter. Metoden brukes for å påvise tidligere kjente forbindelser, for på et tidlig stadium kunne holde et fokus på karakterisering av nye forbindelser eller bioaktiviteter. Dereplikering kan utføres gjennom hele isoleringsprosessen, og består ofte av en kombinasjon av flere ulike metoder, som separasjon, spektrometrisk deteksjon og databasesøk. Metoder som HPLC koblet med UV-Vis DAD detektor og massespektrometri kan gi viktig informasjon før selve isoleringsprosessen starter. Disse teknikkene kombinert med databasesøk kan gi en rask avklaring på om forbindelsen er beskrevet tidligere (Corley & Durley, 1994; Bradshaw *et al.*, 2001).

## 1.9 Mål for oppgaven

Hovedmålet i dette studiet er å påvise tilstedeværelse av antibakterielle komponenter med et fokus på antibakterielle peptider i de to marine gastropodene kongsnegl (*Buccinum undatum*) og neptunsnegl (*Neptunea despecta*), samt å utføre innledende karakterisering av de aktive forbindelsene.

Hypotesen er at disse organismene produserer antibakterielle forbindelser siden de lever i områder med høyt innhold av mikroorganismer, slik at de er avhengig av et effektivt antibakterielt forsvar som beskytter dem mot patogene bakterier.

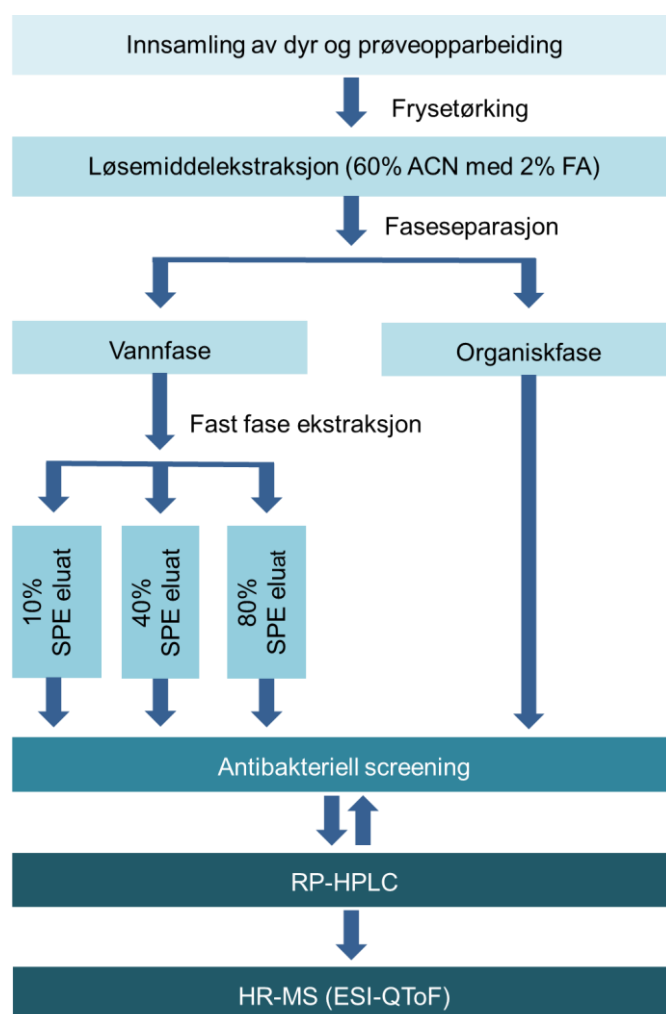
For å teste hypotesen ble følgende delmål satt opp:

- Påvise antibakteriell aktivitet i ulike ekstrakter av de to snegleartene.
- Isolere antibakterielle forbindelser ved å benytte kromatografiske teknikker og følge aktiviteten i fraksjoner.
- Karakterisere og identifisere forbindelser i aktive fraksjoner ved hjelp av massespektrometri.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Studiedesign

Antibakterielle forbindelser fra kongsnegl og neptunsnegl ble studert ved metoder illustrert i flytdiagrammet i figur 10. Frysetørket biologiske materiale ble ekstrahert og grovseparert ved løsemiddelekstraksjon og fast fase ekstraksjon (SPE). De organiske fasene og SPE-eluatene ble videre testet for antibakteriell aktivitet. Aktive fraksjoner ble separert med revers-fase høytrykks-væskekromatografi (RP-HPLC), og HPLC-fraksjoner ble testet for antibakteriell aktivitet. Aktive fraksjoner ble videre analysert med høyopløselig massespektrometri (HR-MS) for innledende karakterisering av aktive forbindelser.



**Figur 10.** Flytdiagram over metoder benyttet i oppgaven. Prinsippene for metodene er delvis omtalt i innledningen.

## 2.2 Materialer

### 2.2.1 Kjemikalier og medier

Acetonitril HPLC-grade  $\geq 99,9\%$ , maursyre 98%, trifluoreddiksyre 99% og glyserol  $\geq 86\%$  var fra Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland). Vann LC-MS Chromasolv® og acetonitril LC-MS Chromasolv® var fra Honeywell (Rolle, Sveits). Oksytetrasyklinhydroklorid  $\geq 95\%$  var fra Calbiochem (California, USA). Milli-Q vann ble produsert av vannrenseutstyr fra Millipore Corp. (Massachusetts, USA).

Medier benyttet i oppgaven er tillaget ved Norges Fiskerihøgskole. Mueller Hinton (MH) medium ble laget av 21 g/l Mueller Hinton (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankrike) i Milli-Q vann. Mueller Hinton (MH) agar ble laget av 21 g/l Mueller Hinton og 20 g/l agar (Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland) i Milli-Q vann.

### 2.2.2 Bakterier

Bakterier benyttet til antibakteriell testing var den Gram-negative bakteriestammen *Escherichia coli* (ATCC 25922) og den Gram-positive bakteriestammen *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032). Stamkulturer av bakteriestammene ble oppbevart ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  i en stamløsning bestående av 20% glyserol og 80% MH-medium.

### 2.2.3 Biologisk materiale

Levende organismer av sneglene kongsnegl ( $n=33$ ) og neptunsnegl ( $n=14$ ) ble samlet inn med teiner av R/V Hyas utenfor kysten av Tromsø i februar 2016. Dyrene ble oppbevart i tanker med sirkulerende sjøvann uten fôring frem til prøvetaking i perioden februar til april 2016.

## 2.3 Prøvetaking

Hemolymfe ble tappet ut av foten på sneglene ved bruk av en 19G, 1½, 1,1 x 40 mm kanyle (BD Microlance, Drogheda, Irland) og deretter oppbevart på is. Hemolymfen ble sentrifugert ved 4000 rpm (Multifuge 1S-R Heraeus, Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  i 20 minutter for å separere hemocytene fra plasma (cellefri hemolymfe). Under tapping av hemolymfen slapp sneglen en blank væske (exudat) som også ble samlet opp. Noen av kongsneglene la egg i tankene som også ble undersøkt. Skallet på sneglene ble deretter fjernet og sneglene (vev) ble frosset ned hele på  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vev, samt plasma, hemocytter, exudat og egg ble deretter frysetørket ved bruk av en VirTis (SP Scientific, New York, USA) frysetørker. Frysetørkede prøver ble oppbevart på -20 °C frem til ekstraksjon.

## 2.4 Ekstraksjon og grovseparasjon

### 2.4.1 Løsemiddel ekstraksjon

Frysetørket materiale (tabell 1) ble malt opp ved bruk av en morter og tilsatt 10 x volum (v/w tørrvekt) (hemocytter fra neptunsnegl ble ekstrahert med 20 x volum) 60% acetonitril (ACN) med 2% maursyre (FA) og satt til omrøring i 24 timer (200 rpm) på 4 °C. Supernatanten ble dekantert og løsningsene som inneholdt vevs-rester ble sentrifugert ved 3000 rpm (Multifuge 1S-R Heraeus, Thermo Scientific, Osterode, Tyskland) i 5 minutter. Videre ble supernatanten pipetert av og oppbevart på kjølerom til neste dag. Ekstraksjonene ble gjentatt på det resterende materialet med nye 10 x volum (v/w tørrvekt) 60% acetonitril med 2% maursyre over nye 24 timer. Supernatanten ble dekantert og blandet med ekstraktet fra de første 24 timers ekstraksjonene. Resterende pellet ble kastet. Ekstraktene ble deretter satt ved -20 °C i ca. 2 timer for å oppnå et effektivt fase-skille. Vannfasene (salt-rik fase, nederst) og de organiske fasene (ACN-rik fase, øverst) ble separert og overført til 50 ml Falcon-rør og vakuuminndampet med en Scan Speed 40 vakuumsentrifuge utstyrt med en Cooling Trap kjølefelle (Scanvac, Lynge, Danmark) og en MD 4 membran-vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim, Tyskland). Effektiviteten (prosentvis utbytte) av ekstraksjonen ble beregnet. Vannfasene ble deretter løst i 1% FA til en konsentrasjon på 100 mg/ml tørrstoff. De organiske fasene ble fryst inntil aktivitetstesting ble utført.

**Tabell 1. Mengde frysetørket materiale (g) av 33 kongsnegler og 14 neptunsnegler benyttet til løsemiddelekstraksjon.**

Prøve	Kongsnegl (g)	Neptunsnegl (g)
Vev	30,03	30,25
Plasma	11,24	2,23
Hemocytter	1,80	0,45
Exudat	3,99	2,86
Egg	30,12	-

## 2.4.2 Fast fase ekstraksjon

Fast fase ekstraksjon (SPE) ble utført med bruk av en Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) for å fjerne salt fra vannfasen. Det ble tatt i bruk både 2 g og 10 g Sep-Pak® C<sub>18</sub> SPE kolonner (Waters, Dublin, Irland) avhengig av vekten til prøvene. Kolonnene ble først kondisjonert med 10/30 ml ACN og ekvilibrert med 10/30 ml 1% FA. Vannfasen ble deretter satt på kolonnen og ikke-retardert materiale ble vasket ut med 10/30 ml 1% FA og slått sammen med vaskefasen. Retardert materiale ble stegvis eluert ut med 10/30 ml 10, 40 og 80% ACN med 1% FA. SPE-eluatene ble deretter overført til 50 ml Falcon-rør og vakuuminndampet. Eluatene blir omtalt videre i oppgaven som 10, 40 og 80% SPE-eluater.

## 2.5 Separasjon ved revers-fase høytrykks-væskekromatografi (RP-HPLC)

SPE-eluater ble separert ved bruk av Agilent 218 Purification System (Agilent Technologies, California, USA) bestående av en ProStar 410 Autosampler, PrepStar pumpe, 440-LC fraksjonssamler, 1260 Infinity DAD detektor, og databehandlingsprogrammet OpenLAB CDS. Det ble brukt en kolonne av typen XBridge™ BEH300 Prep C<sub>18</sub> (5 µm, 10x250 mm) (Waters, Dublin, Irland). Detektoren registrerte absorbans av lys med bølgelengder mellom 200-600 nm. Mobilfasene besto av Milli-Q vann og acetonitril, begge med 0,05% trifluoreddiksyre (TFA), og en flow på 6 ml/min. Fraksjonssamleren ble programmert til å samle opp minuttfraksjoner. En oversikt over betingelser som ble benyttet for fraksjonering av de ulike SPE-eluatene er listet opp i tabell 2.

Tabell 2. Betingelser (gradient og flow) som ble benyttet for separasjon av de ulike SPE-eluatene.

SPE-eluat	Lineær gradient	Flow
10%	0-30% ACN over 30 minutter	6 ml/min
40%	5-65% ACN over 60 minutter	6 ml/min
80%	10-80% ACN over 70 minutter	6 ml/min

Aktive HPLC-fraksjoner ble forsøkt opprenset ved å utføre gjentatte RP-HPLC der toppene ble samlet for hånd. HPLC systemet som ble benyttet til rensing av aktive HPLC-fraksjoner er produsert av Waters (Waters Associates, Millipore Corp., Massachusetts, USA) og består av

en XBridge® Peptide BEH C<sub>18</sub> kolonne (10 µm, 4,6 x 250 mm), 2695 Separations Module og databehandlingsprogrammet Millennium v 4.00. Detektoren 2996 Photodiode Array registrerte absorbans mellom 200-600 nm. Mobilfaseløsningene besto av Milli-Q vann og acetonitril, begge med 0,05% TFA, og det ble benyttet en flow på 1 ml/min. Eluatene ble kjørt med samme gradient som beskrevet tidligere (tabell 2).

## 2.6 Karakterisering ved massespektrometri (LC-ESI-MS)

Aktive SPE- og HPLC-fraksjoner ble analysert med væskkromatografi elektropray ionisering massespektrometri quadropole time-of-flight (LC-ESI-MS-Q-TOF) som innledende karakterisering av de aktive komponentene. LC-ESI-MS systemet er produsert av Agilent Technologies (Agilent Technologies, California, USA) bestående av 1290 Infinity, 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC-MS med Zorbax Extend C<sub>18</sub> kolonne (1,8 µm, 2,1 x 50 mm) og databehandlingsprogrammet MassHunter. Mobilfasene besto av vann LC-MS Chromasolv® og acetonitril LC-MS Chromasolv®, begge med 0,1% FA, og en flow på 0,4 ml/min ble benyttet. En oversikt over betingelser som ble benyttet for videre karakterisering av de ulike SPE-eluatene, er listet opp i tabell 3. Det ble benyttet ESI+ mode (deteksjon av positive ioner).

**Tabell 3. Oppsett for LC-MS gradientene som ble benyttet for de ulike HPLC-fraksjonene.**

SPE-eluat	Lineær Gradient	Flow
10%	5-38% ACN over 33 minutter	0,40 ml/min
40%	5-55% ACN over 50 minutter	0,40 ml/min
80%	5-90% ACN over 60 minutter	0,40 ml/min

Rensede fraksjoner ble sendt til Tromsø University Proteomics Platform (TUPP) for peptidsekvensering ved bruk av LC-MS/MS teknologi og søkt opp mot sekvensdatabaser.

## 2.7 Bakteriedyrking

Nedfryste bakteriestammer av *E. coli* og *C. glutamicum* ble sådd ut på Mueller Hinton (MH) agarplater og inkubert ved romtemperatur i 1-3 dager. Etter inkubering ble platene oppbevart ved 4 °C i opptil to uker. Etter to uker ble nye bakterier sådd ut fra -80 °C.



En bakteriekoloni av hver bakteriestamme ble plukket med en steril podenål og overført til 10 ml sterile dyrkningsrør m/lokk med 5 ml MH-medium. Dyrkningsrørene ble inkubert med risting ved 1000 rpm i romtemperatur over natt. Neste dag ble 20 µl av overnatte-kulturene overført til nye sterile dyrkningsrør med 5 ml MH-medium og inkubert ytterligere i 2 timer ved romtemperatur med risting for å få kulturene i eksponentiell vekstfase. Bakterietettheten ble målt med optisk tetthet (OD) ved 600 nm på et spektrofotometer (BioMate 3, Thermo Spectronic, New York, USA) og justert til en OD-verdi som har vist seg å tilsvare ca.  $2,5-3,0 \times 10^4$  bakterieceller per ml ved å overføre x µl bakterieløsning til 10 ml MH-medium i henhold til tabell 4. Denne bakterieløsningen ble videre benyttet i antibakteriell screening.

**Tabell 4. Tilpasning av bakteriekonsentrasjon.** Forholdet mellom OD<sub>600</sub> og volum av kultur i 10 ml som har vist seg å tilsvare en bakteriekonsentrasjon på  $2,5-3,0 \times 10^4$  bakterieceller per ml.

Bakteriekultur i eksponential vekst (OD <sub>600</sub> )	Bakteriekultur (µl) overført til 10 ml MH-medium*
0,003-0,010	20
0,010-0,030	10
0,030-0,075	5
0,750-0,100	4
0,100-0,150	3

\*Basert på kintallstelling av CFU/ml i 2 timers bakteriestammene fra tidligere OD<sub>600</sub> målinger utført ved NFH.

## 2.8 Antibakteriell testing

Antibakteriell testing ble utført i 96 brønners mikrotiter plater (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark). Til hver brønn ble det tilsatt 50 µl prøveløsning eller materiale fra HPLC-fraksjoner og 50 µl bakteriesuspensjon til en sluttkonsentrasjon på totalt  $1,25-1,5 \times 10^4$  bakterieceller/ml i hver brønn. Milli-Q vann ble brukt som negativ vekstkontroll og oksytetrasyklin (40 µM) ble brukt som positiv inhiberingskontroll.

Før avlesning ble platene dekket med forseglingsfilm (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark) og det ble stukket hull over hver brønn for å unngå kondens. Antibakteriell aktivitet ble registrert ved bruk av EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer, Turku, Finland) over 48 timer ved 35 °C. Prøvene ble automatisk ristet i 15 sekunder før hver avlesning og absorbansen ble avlest ved 595 nm hver time. Vekstkurver ble automatisk generert og positiv

aktivitet ble definert som absolutt (nær 100%) veksthemning sammenlignet med vekstkurve for negativ kontroll.

## 2.9 Minste inhiberende konsentrasjon (MIC) assay

Minste inhiberende konsentrasjon (MIC) er definert som den laveste konsentrasjonen av prøvene som ikke gav bakterievekst. Vakuuminndampede prøver ble løst i Milli-Q vann til en konsentrasjon i henhold til tabell 5 (videre kalt stamløsning). Prøver som ikke lot seg tørke ble dampet inn så mye som mulig og benyttet direkte som stamløsning.

**Tabell 5. Tilpassing av stamløsningskonsentrasjon.** Konsentrasjoner (mg/ml) tillaget i ulike stamløsninger for ekstrakter i forhold til mengde stoff (mg) tilgjengelig etter ekstraksjon.

Mengde prøve (mg)	Stamløsning (mg/ml)*
> 50	40
25-50	20
10-25	10
3-10	5
< 3	2,5

\*Utgangskonsentrasjoner av stamløsninger for aktivitetstesting.

Til en 96 brønners mikrotiter plate (Thermo Scientific, Roskilde, Danmark) ble det i de første brønnene tilsatt 50 µl stamløsning og 50 µl Milli-Q vann, og deretter fortynnet syv ganger i to-folds fortynningsrekke, slik at alle brønnene til slutt inneholdt 50 µl prøvemateriale. Testen ble videre utført som beskrevet i 2.8.

## 3 Resultater

### 3.1 Utbytte av ekstraksjon av det biologiske materialet

De to marine molluskene kongsnegl og neptunsnegl var utgangsmateriale for tillagning av ulike preparater fra vev, hemocytter, plasma, exudat og egg (kun fra kongsnegl). Det biologiske materialet ble ekstrahert med løsemiddelekstraksjon (60% ACN + 2% FA) som resulterte i organiske faser og vannfaser. Tørrstoffmengden og utbytte etter løsemiddelekstraksjonen er fremstilt i tabell 6.

**Tabell 6. Utbytte av løsemiddelekstraksjon av kongsnegl og neptunsnegl.** Tørrstoff (g) og utbytte (%) av startmaterialet av kongsnegl og neptunsnegl før ekstraksjon, samt gjenvunnet materiale i vannfasene og de organiske fasene.

Type materiale	Ekstrakt	Kongsnegl		Neptunsnegl	
		Tørrstoff (g)	Utbytte (%)	Tørrstoff (g)	Utbytte (%)
Vev	Utgangsmateriale	30,03	100	30,25	100
	Vannfase	5,75	19,14	4,14	13,67
	Organisk fase	Ikke tørt*	-	Ikke tørt*	-
Plasma	Utgangsmateriale	11,24	100	2,23	100
	Vannfase	4,63	41,18	1,25	56,14
	Organisk fase	0,99	8,79	0,120	5,38
Hemocytter	Utgangsmateriale	1,80	100	0,45	100
	Vannfase	0,06	3,44	0,06	13,11
	Organisk fase	0,02	1,22	0,002	0,42
Exudat	Utgangsmateriale	3,99	100	2,86	100
	Vannfase	3,51	87,89	2,31	80,70
	Organisk fase	0,44	11,10	0,40	13,88
Egg	Utgangsmateriale	30,12	100	-	-
	Vannfase	4,88	16,20	-	-
	Organisk fase	Ikke tørt*	-	-	-

\*Materialet lot seg ikke tørke ved vakuumsentrifugering.

- ikke tilgjengelig utgangsmateriale for undersøkelse.

Utbyttet i vannfasene etter løsemiddelekstraksjonen varierte fra 3% til 88% i begge organismene. Lavest prosentvis mengde gjenvunnet materiale var i hemocyttene, med absolutt lavest fra kongsnegl som kun gav et utbytte på 3,44%, noe som tilsvarer 0,06 g tørrstoff. Det

høyeste prosentvise utbytte fra vannfasen var i exudatet fra kongsnegl med 87,89%, noe som tilsvarer 3,51 g tørrstoff.

Gjenvunnet materiale i de organiske fasene var betydelig mindre enn vannfasene, og utbyttet varierte fra 0,42% i hemocytterne til 13,88% i exudatet. Det laveste prosentvis mengde gjenvunnet materiale fra de organiske fasene var i hemocytter fra neptunsnegl med 0,42% som tilsvarer 0,002 g. Det høyeste utbyttet ble observert i exudatet med 13,88%, noe som tilsvarer 0,40 g tørrstoff. De organiske fasene fra vev fra begge arter og egg fra kongsnegl lot seg ikke tørke fullstendig ved vakuumsentrifugering, tørrvekt og utbytte kunne dermed ikke beregnes.

Vannfasene ble videre ekstrahert med fast fase ekstraksjon (SPE) og retardert materiale ble stegvis eluert med 10, 40 og 80% ACN (SPE-eluatere). Tørrstoffmengden etter fast fase ekstraksjon er fremstilt i tabell 7. Etter SPE av vannfasene var gjenvunnet materiale betydelig redusert i alle SPE-eluatene. Det laveste utbyttet ble observert i plasma fra kongsnegl, der tørrstoffet hadde blitt redusert fra 11,24 g til 0,012 g, noe som tilsvarer et utbytte på 0,11%. Det høyeste utbyttet ble observert i hemocytter fra neptunsnegl, der mengde tørrstoff var redusert fra 0,45 g til 0,05 g, noe som tilsvarte et utbytte på 5,33%.

**Tabell 7. Utbytte av fast fase ekstraksjon av kongsnegl og neptunsnegl.** Tørrstoff (mg) i 10, 40 og 80% SPE-eluatene etter fast fase ekstraksjon av vannfasene.

Type materiale	Kongsnegl Tørrstoff (mg)			Neptunsnegl Tørrstoff (mg)		
	10% SPE	40% SPE	80% SPE	10% SPE	40% SPE	80% SPE
<b>Vev</b>	123	178	22	111	186	45
<b>Plasma</b>	1	10	1	10	3	1
<b>Hemocytter</b>	1	13	27	3	19	2
<b>Exudat</b>	1	19	1	1	42	7
<b>Egg</b>	33	103	4	-	-	-

- ikke tilgjengelig utgangsmateriale for undersøkelse.

De organiske fasene og SPE-eluatene fra kongsnegl og neptunsnegl ble videre screenet for antibakteriell aktivitet mot de to bakteriestammene *E. coli* og *C. glutamicum*.

### 3.2 Antibakteriell aktivitet i ekstrakter

Den antibakterielle aktiviteten i SPE-eluatene og de organiske fasene ble testet i to-folds fortyngningsrekker mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum* for å bestemme den laveste konsentrasjonen av ekstraktene som hemmet bakterievekst. Resultatene er fremstilt i tabell 8. På grunn av relativt lite stoff av noen av prøvene ble ekstraktene testet i ulike utgangskonsentrasjoner. Hemmingsgraden til prøvene ble vurdert ved å sammenligne vekstkurvene til ekstraktene med positiv og negativ vekstkontroll.

Antibakteriell aktivitet ble detektert i alle de ulike preparatene med unntak av exudat. Fra vev ble det registrert aktivitet i alle SPE-eluatene og de organiske fasene fra både kongsnegl og neptunsnegl overfor både *E. coli* og *C. glutamicum*. Det mest aktive av disse eluatene var fra neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet med en MIC-verdi på 0,16 mg/ml mot begge bakteriestammene. Egg fra kongsnegl viste aktivitet i alle ekstraktene mot begge bakteriestammene der det mest aktive eluatet var 80% SPE-eluatet med en MIC-verdi på 0,16 mg/ml mot *E. coli* og en MIC-verdi på 0,04 mg/ml mot *C. glutamicum*. De organiske fasene av vev og egg fra kongsnegl som ble testet med utgangspunkt i ufortynnet løsning, viste aktivitet i alle to-folds fortyngningene mot begge bakteriestammene helt ned i en fortyngning på 1/128.

I hemocyt-prøvene ble det registrert aktivitet i 10% og 40% SPE-eluatet fra begge artene og organisk fase fra neptunsnegl mot både *E. coli* og *C. glutamicum*. Eluatet med høyest aktivitet var neptunsnegl 10% SPE-eluatet med aktivitet i alle fortyngningene som ble testet (lavest konsentrasjon testet var 0,01 mg/ml). I plasma ble antibakteriell aktivitet kun detektert mot *C. glutamicum* i 40% SPE-eluatet fra kongsnegl. I de organiske fasene fra sneglene, var 40% SPE-eluatet fra kongsnegl det mest aktive med en MIC-verdi på 1,25 mg/ml. Exudat var den eneste av preparatene som ble testet der antibakteriell aktivitet ikke ble detektert mot de to bakteriestammene.

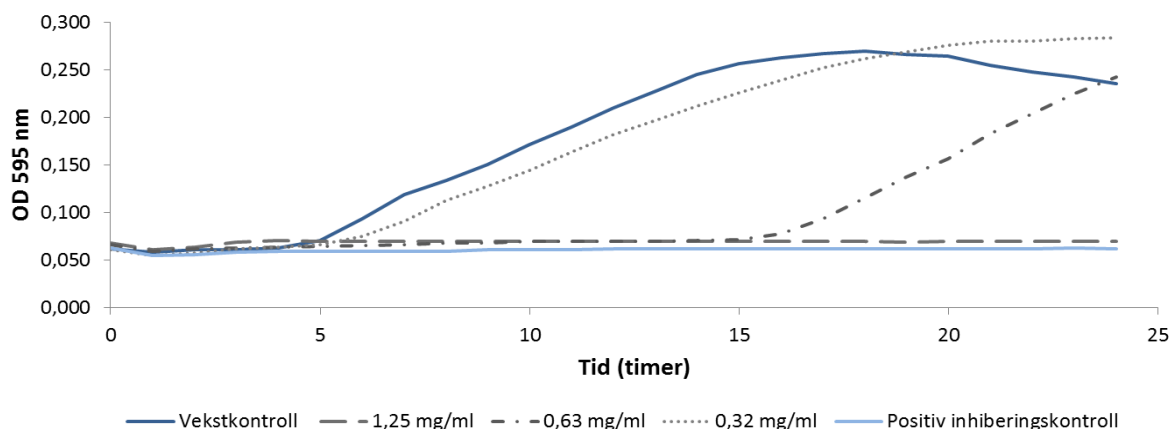
**Tabell 8. Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatene og de organiske fasene fra kongsnegl og neptunsnegl.** Den antibakterielle aktiviteten ble testet i to-folds fortynningsrekker mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum*. For prøver som lot seg tørke er MIC definert som den laveste konsentrasjonen (mg/ml) som hemmet bakterievekst.

Type materiale	Ekstrakt	Antibakteriell aktivitet (MIC; mg/ml)			
		Kongsnegl		Neptunsnegl	
		<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. glutamicum</i>
<b>Vev</b>	10% SPE	1,25	0,32	0,63	≤ 0,16
	40% SPE	1,25	0,32	≤ 0,16	≤ 0,16
	80% SPE	0,63	0,16	0,32	0,32
	organisk	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
<b>Plasma</b>	10% SPE	0,63	> 0,63	> 1,25	> 1,25
	40% SPE	> 1,25	1,25	> 0,63	> 0,63
	80% SPE	> 0,63	> 0,63	> 0,63	> 0,63
	organisk	> 10	10	> 10	5
<b>Hemocytter</b>	10% SPE	0,32	0,08	≤ 0,01	≤ 0,01
	40% SPE	2,5	2,5	1,25	1,25
	80% SPE	> 5	> 5	> 0,63	> 0,63
	organisk	> 2,5	> 2,5	0,04	0,16
<b>Exudat</b>	10% SPE	> 0,63	> 0,63	> 0,63	> 0,63
	40% SPE	> 2,5	> 2,5	> 5	> 5
	80% SPE	> 0,63	> 0,63	> 1,25	> 1,25
	organisk	> 10	> 10	> 10	> 10
<b>Egg</b>	10% SPE	1,25	0,32	-	-
	40% SPE	1,25	0,16	-	-
	80% SPE	0,16	0,04	-	-
	organisk	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	-	-

- Ikke tilgjengelig materiale for testing.

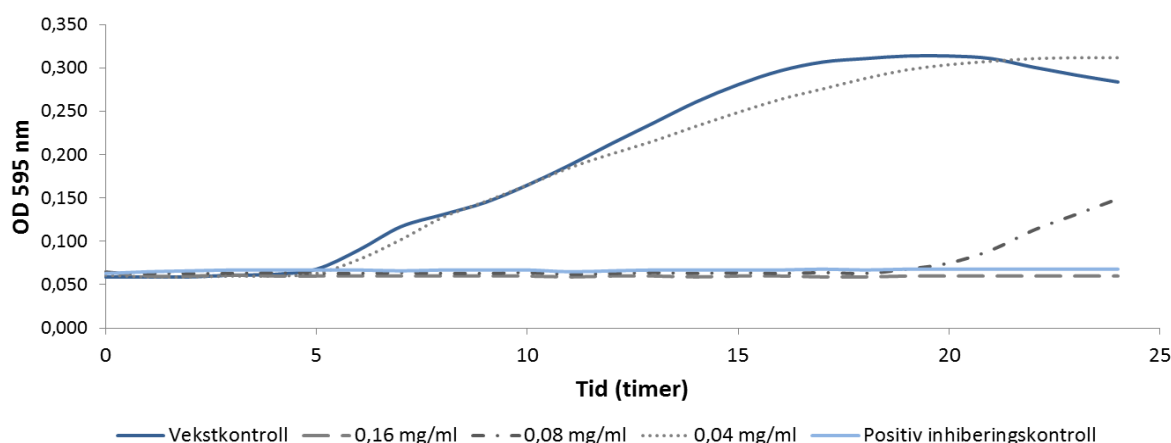
+<sup>a</sup> Ekstraktene lot seg ikke tørke ved vakuumsentrifugering og konsentrasjonen kunne ikke beregnes. Ekstraktet testet i ufortynnet løsning viste aktivitet i 7 x to-folds fortykning som tilsvarer en fortykning på 1/128.

Vekstkurven for *E. coli* etter tilsetning av kongsnegl vev 40% SPE-eluatet i ulike konsentrasjoner er vist i figur 11. Bakterieveksten ble fullstendig hemmet ved 1,25 mg/ml etter 24 timers inkubering. En konsentrasjon på 0,63 mg/ml gir en forsinket bakterievekst, mens 0,32 mg/ml ikke gir noen effekt sammenlignet med vekstkontrollen.



**Figur 11. Antibakteriell aktivitet i kongsnegl vev 40% SPE-eluatet.** Eluatet ble testet mot *E. coli* dyrket i MH-medium. Optisk tetthet (595 nm) ble avlest hver time i 24 timer. Vekstkontrollen besto av en bakteriekultur med  $1,25-1,5 \times 10^4$  bakterieceller/ml ved starttidspunkt. Positiv inhiberingskontroll var oksytetrasyklin ( $40\mu\text{M}$ ), kongsnegl vev 40% SPE-eluatet ble testet i konsentrasjonene 1,25 mg/ml, 0,63 mg/ml og 0,32 mg/ml.

Vekstkurver for *E. coli* etter tilsetning av kongsnegl egg 80% SPE-eluatet i ulike konsentrasjoner er vist i figur 12. Bakterieveksten ble fullstendig hemmet ved 0,16 mg/ml etter 24 timers inkubering, mens 0,08 mg/ml gir en forsinket bakterievekst.



**Figur 12. Antibakteriell aktivitet i kongsnegl egg 80% SPE-eluatet.** Eluatet ble testet mot *E. coli* dyrket i MH-medium. Optisk tetthet (595 nm) ble avlest hver time i 24 timer. Vekstkontrollen besto av en bakteriekultur med  $1,25-1,5 \times 10^4$  bakterieceller/ml ved starttidspunkt. Positiv inhiberingskontroll var oksytetrasyklin ( $40\mu\text{M}$ ), kongsnegl egg 80% SPE-eluatet ble testet i konsentrasjonene 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml og 0,04 mg/ml.

Med utgangspunkt i antibakteriell aktivitetsdata og mengde tilgjengelig testmateriale ble kongsnegl vev 40% SPE-eluatet og egg 80% SPE-eluatet, og neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet og hemocytter 10% SPE-eluatet, tatt videre til isolering og innledende karakterisering av aktive komponenter med RP-HPLC og LC-ESI-MS.

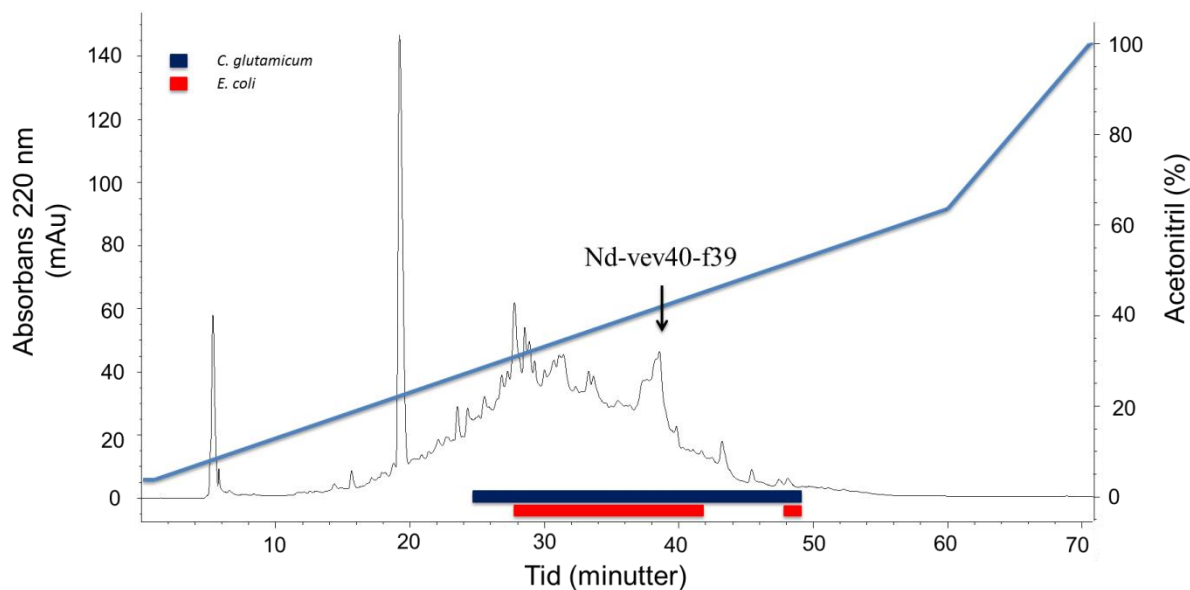
### **3.3 Isolering og innledende karakterisering av aktive komponenter**

De fire SPE-eluatene valgt ut for videre undersøkelser ble fraksjonert med prep RP-HPLC. HPLC-fraksjoner som viste innhold av forbindelser (absorbans ved bølgelengde 220 nm), ble re-testet for antibakteriell aktivitet mot *E. coli* og *C. glutamicum*. Aktive RP-HPLC-fraksjoner ble videre undersøkt med LC-ESI-MS som en del av den innledende karakteriseringen. Kongsnegl egg 80% SPE-eluatet og neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet ble på grunn av lite tilgjengelig testmateriale undersøkt direkte på LC-ESI-MS. Resultatene fra innledende karakterisering er presentert enkeltvis for hvert eluat i de neste avsnittene.

#### **3.3.1 Neptunsnegl - 40% SPE fra vev**

For å identifisere bioaktive komponenter fra neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet, ble eluatet fraksjonert med RP-HPLC med en lineær gradient bestående av 5-65% ACN i mobilfasen, kjørt over 60 minutter på en C<sub>18</sub> kolonne. Kromatogrammet i figur 13 viser eluerte komponenter detektert ved 220 nm som ble samlet opp i minuttfraksjoner. Hovedmengden av komponentene ble eluert mellom 18-50 minutter og ble tatt videre til antibakteriell testing mot *E. coli* og *C. glutamicum*. Fraksjonene med retensjonstider på 29-42 min og 49 min var aktive mot *E. coli*, og minuttfraksjonene fra 26-49 var aktive mot *C. glutamicum*. De aktive HPLC-fraksjonene ble testet i ulike konsentrasjoner mot *E. coli* og *C. glutamicum* for å bestemme den mest potente fraksjonen for videre undersøkelser.

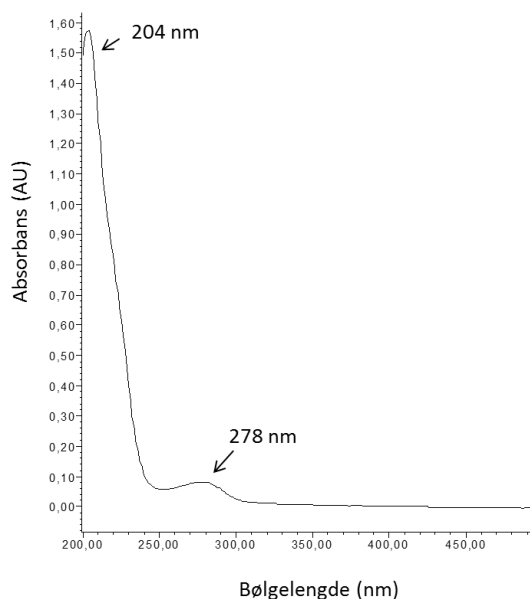




**Figur 13. UV-Vis kromatogram (220 nm) av neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet fra RP-HPLC og antibakteriell aktivitet.** Utgangsekstraktet ble separert med fast fase ekstraksjon ved å benytte en Sep-Pak® C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 40% ACN og deretter videre separert ved RP-HPLC ved å benytte en C<sub>18</sub> kolonne. En lineær gradient på 5-65% ACN i 60 minutter med en flow på 6 ml/min ble benyttet. HPLC-fraksjoner som viste aktivitet mot *C. glutamicum* og *E. coli* er indikert med blå og røde felt. Pilen indikerer fraksjon nr. 39 (kalt Nd-vev40-f39) som videre ble separert og karakterisert.

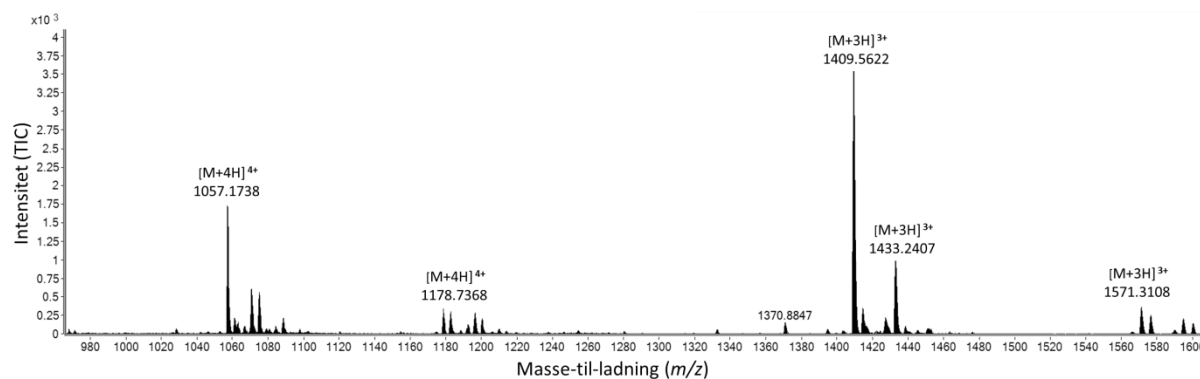
### Nd-vev40-f39

Fraksjon 39 (38-39 minutter) (Nd-vev40-f39) fra neptunsnegl var en av de mest aktive HPLC-fraksjonene og ble derfor valgt ut til videre isolering og karakterisering. For å samle inn mer materiale ble ytterligere to runder med prep RP-HPLC kjørt på vev 40% SPE-eluatet med samme betingelser. UV-Vis spekteret av fraksjon 39 er vist i figur 14, der maks absorbans ble registrert ved 204 nm og 278 nm.



**Figur 14. UV-Vis spekter av fraksjon 39 neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet (Nd-vev40-f39).** Pilene angir absorbans topper av fraksjonen ved 204 nm og 278 nm.

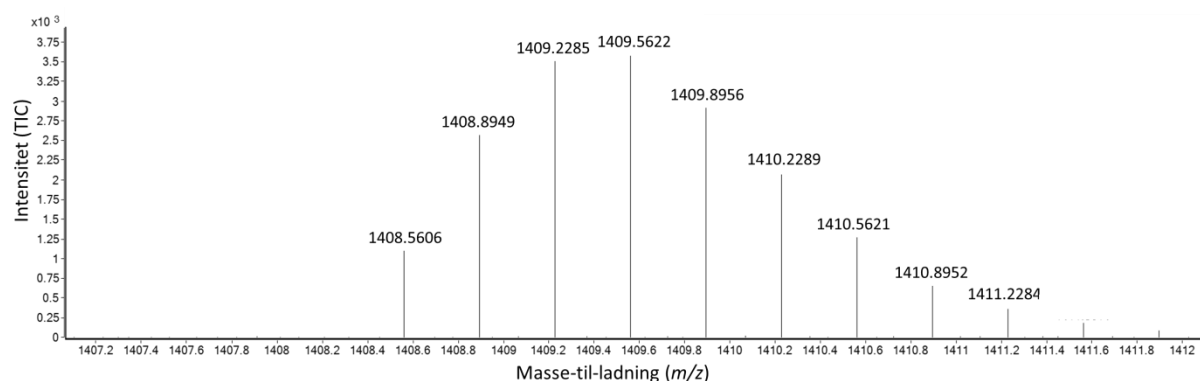
HPLC-fraksjonen ble videre analysert med HR-MS for å undersøke renheten og identifisere komponenter i fraksjonen. MS-spekteret viste innhold av flere komponenter (data ikke vist). I et forsøk på å få en renere prøve ble den bioaktive HPLC-fraksjonen 39 videre re-fraksjonert med RP-HPLC, der nye fraksjoner ble samlet for hånd. LC-ESI-MS spekteret av fraksjon 39 (figur 15) viser at en semi-renset fraksjon ble oppnådd etter flere runder med RP-HPLC.



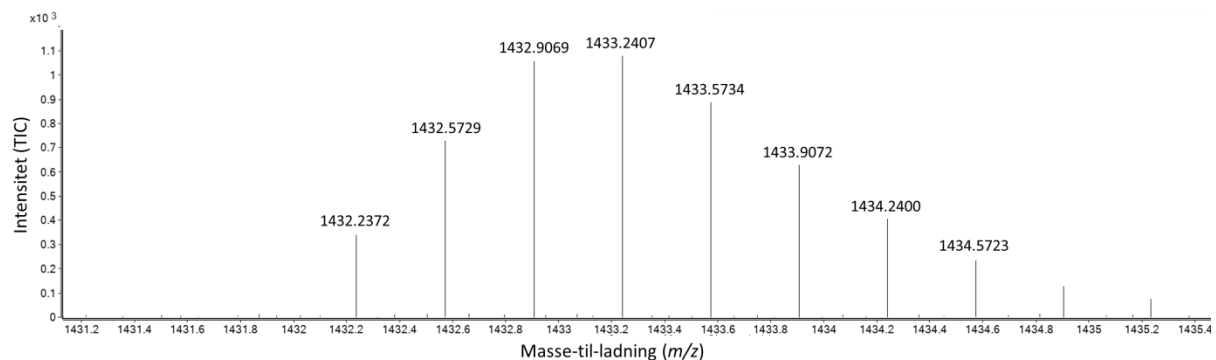
**Figur 15. LC-ESI-MS spekter av fraksjon 39 neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet (Nd-vev40-f39).** Utsnitt av  $m/z$ -verdier med sammensetningen ( $[M+nH]^{n+}$ ), der M er masse, H er proton, og n er antall positive ladninger.

HR-MS ble brukt til å beregne den monoisotopiske massen til forbindelsene i fraksjon 39. Figur 16 viser utsnitt av  $m/z$ -verdiene relatert til  $[M+3H]^{3+}$ -ioneklusteret til forbindelsen med høyest intensitet (forbindelse 1) og figur 17 utsnitt av  $m/z$ -verdiene relatert til  $[M+3H]^{3+}$ -ioneklusteret til forbindelse 2. Fraksjonen inneholdt fire forbindelser i et 6:2:1:0,5 forhold, der

de monoisotopiske massene ble beregnet til henholdsvis 4222, 4294, 4708 og 4779 Da. En oversikt over  $m/z$ -verdiene og kalkulerede monoisotopiske masser er angitt i tabell 9.



**Figur 16.** HR-MS spekter av  $m/z$ -verdiene relatert til  $[M+3H]^{3+}$ -ionekusteret til forbindelse 1 i fraksjon 39 neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet (Nd-vev40-f39). Den monoisotopiske  $m/z$ -verdien 1408,56 ble benyttet til å beregne monoisotopisk masse.



**Figur 17.** HR-MS spekter av  $m/z$ -verdiene relatert til  $[M+3H]^{3+}$ -ionekusteret til forbindelse 2 i fraksjon 39 neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet (Nd-vev40-f39). Den monoisotopiske  $m/z$ -verdien 1432,24 ble benyttet til å beregne monoisotopisk masse.

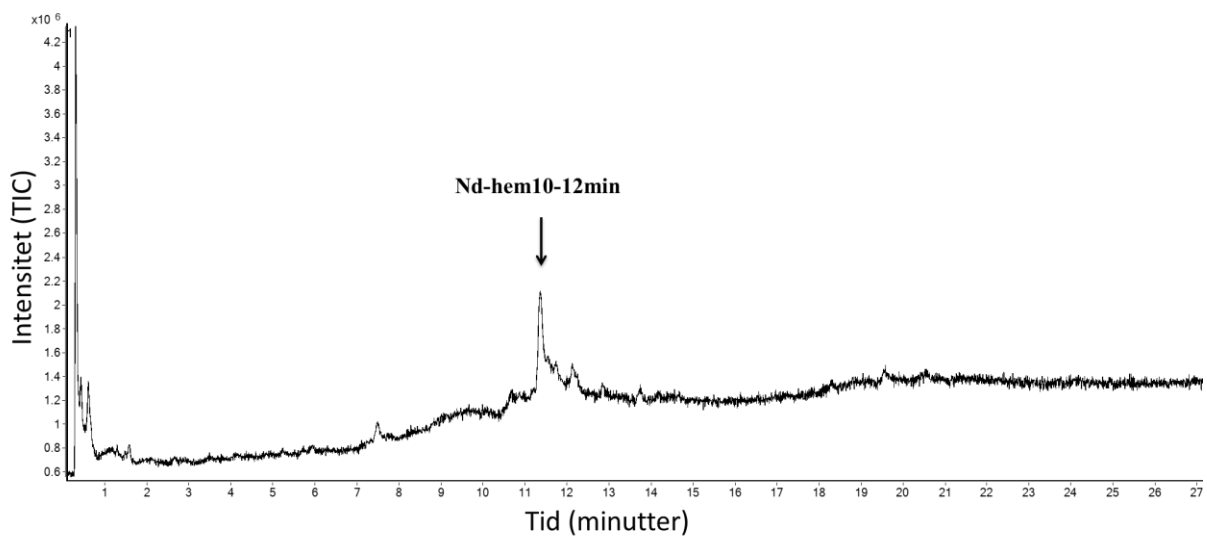
**Tabell 9.** Forbindelser detektert med HR-MS i neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet (Nd-vev40-f39). Oversikt over de mest fremtredende forbindelsene detektert i Nd-vev40-f39, med prosentvis fordeling i fraksjonen, monoisotopiske  $m/z$ -verdier ( $[M+3H]^{3+}$  og  $[M+4H]^{4+}$ ) og kalkulerede monoisotopiske masser (Da).

Forbindelse (% andel i fraksjonen)	$m/z$ -verdi, som tilsvarer $[M+3H]^{3+}$	$m/z$ -verdi, som tilsvarer $[M+4H]^{4+}$	Kalkulert monoisotopisk masse (Da)
Forbindelse 1 (60%)	1408,56	1056,67	4222,66
Forbindelse 2 (20%)	1432,24	1074,43	4293,70
Forbindelse 3 (10%)	1570,32	1177,98	4707,92
Forbindelse 4 (5%)	1593,99	1195,74	4778,94

Den semi-rensede fraksjonen Nd-vev40-f39 ble sendt til aminosyresekvensering med bruk av LC-MS/MS teknologi, men det ble ikke oppnådd sekvensdata.

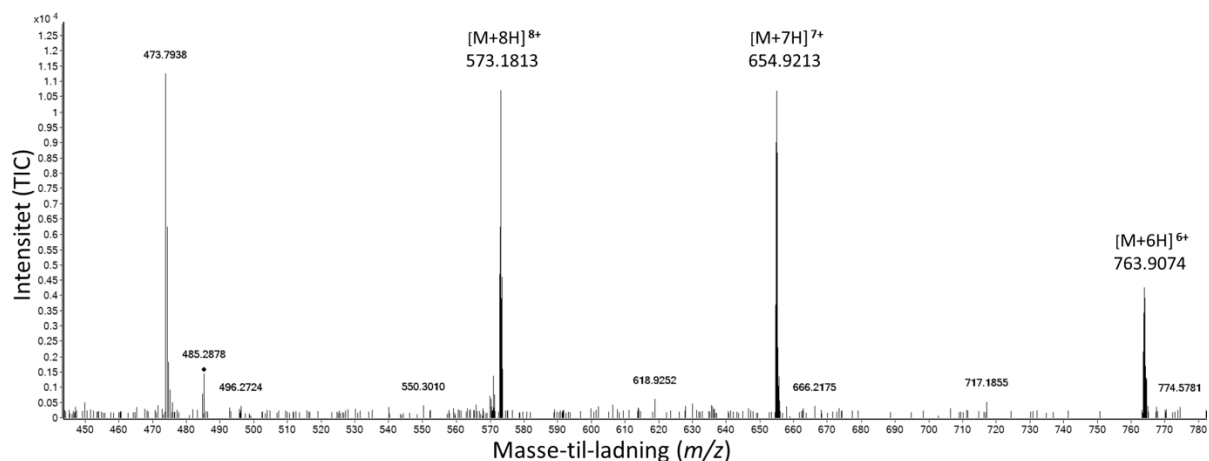
### 3.3.2 Neptunsnegl - 10% SPE fra hemocytter

Høyest antibakteriell aktivitet ble detektert i neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet, med MIC-verdi på mindre enn 0,01 mg/ml både mot *E. coli* og *C. glutamicum*. Med bakgrunn i lite tilgjengelig materiale etter aktivitetstesting ble eluatet undersøkt direkte på LC-ESI-MS. Det ble benyttet en C<sub>18</sub> kolonne med en lineær gradient fra 5-38% ACN over 35 minutter. Kromatogrammet er vist i figur 18. HR-MS ble brukt for innledende karakterisering av eluatet.



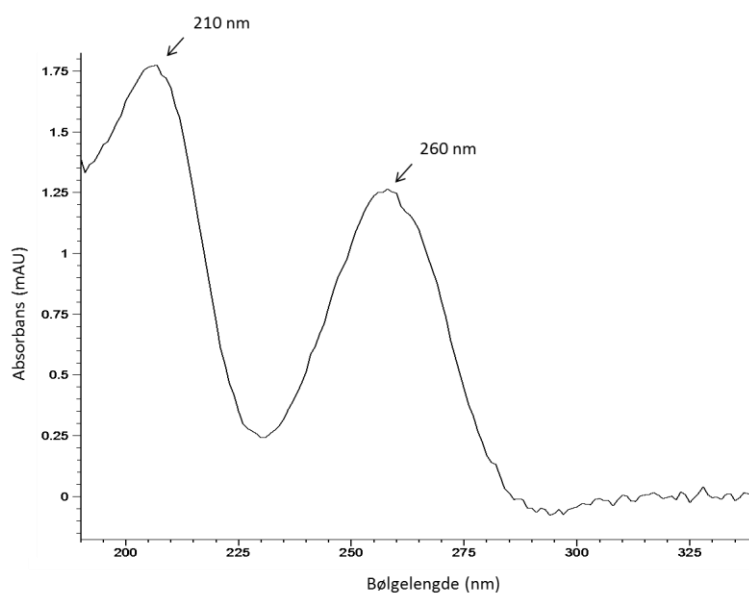
**Figur 18. LC-ESI-MS kromatogram av neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet.** Utgangsekstraktet ble separert med fast fase ekstraksjon ved å benytte en Sep-Pak® C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 10% ACN. En lineær gradient på 5-38% ACN i 30 minutter med en flow på 0,40 ml/min ble benyttet. Pilen indikerer fraksjonen som videre ble karakterisert.

Undersøkelser med LC-ESI-MS viser at eluatet inneholder en hovedkomponent med retensjonstid på ca. 11,4 minutter (Nd-hem10-12min), LC-ESI-MS spekteret av forbindelsen er vist i figur 19.



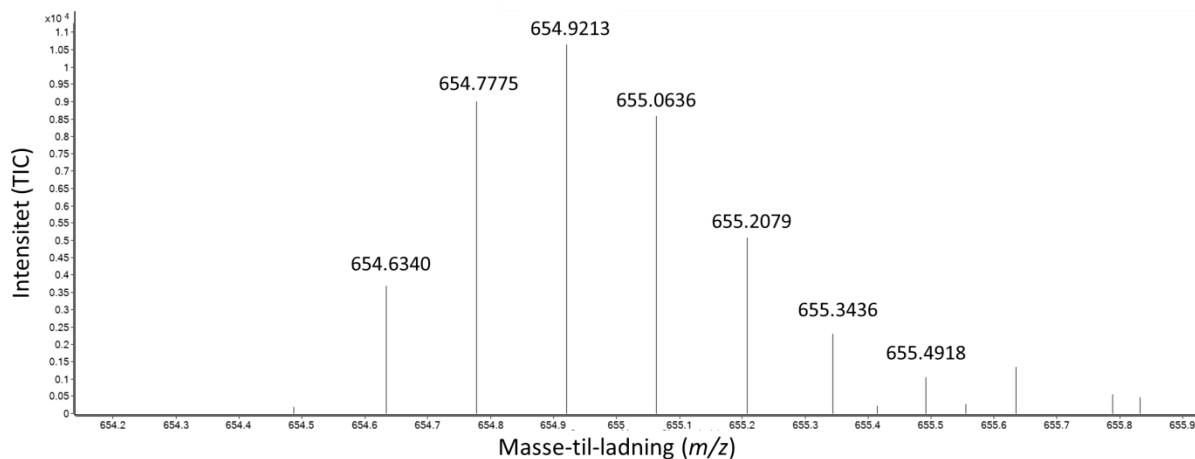
**Figur 19. LC-ESI-MS spekter av neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet 11,4 minutter (Nd-hem10-12min).** Utsnitt av  $m/z$ -verdier til tre relaterte ioner med deres sammensetning ( $[M+nH]^{n+}$ ), der M er masse, H er proton og n antall positive ladninger.

UV-Vis spekteret av Nd-hem10-12min er vist i figur 20, der maks absorbans ble registrert ved 210 nm og 260 nm.



**Figur 20. UV-Vis spekter av neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet 11,4 min (Nd-hem10-12min).** Pilene angir absorbans topper av fraksjonen ved 210 nm og 260 nm.

Nd-hem10-12min ble videre undersøkt med HR-MS for å beregne den monoisotopiske massen til forbindelsen. Figur 21 viser utsnitt av  $m/z$ -verdiene relatert til  $[M+7H]^{7+}$ -ioneklusteret til forbindelsen. Den monoisotopisk massen ble beregnet til 4575 Da. En oversikt over  $m/z$ -verdier og kalkulerte monoisotopiske masser er oppgitt i tabell 10.



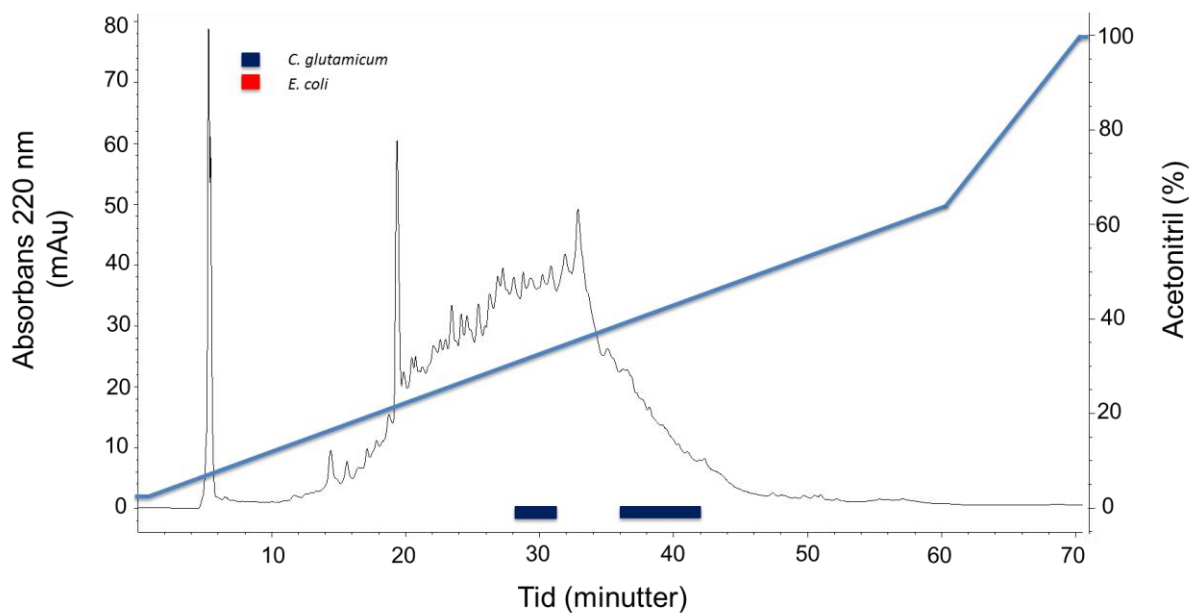
**Figur 21.** HR-MS spekter av  $m/z$ -verdiene relatert til  $[M+7H]^{7+}$ -ioneklusteret til forbindelsen i neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet 11,4 min (Nd-hem10-12min). Den monoisotopiske  $m/z$ -verdien 654,63 ble benyttet til å beregne monoisotopisk masse.

**Tabell 10.** Forbindelser detektert med HR-MS i neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet 11,4 min (Nd-hem10-12min). Oversikt over de mest fremtredende forbindelsene detektert i Nd-hem10-12min, med prosentvis fordeling i fraksjonen, monoisotopiske  $m/z$ -verdier ( $[M+6H]^{6+}$ ,  $[M+7H]^{7+}$  og  $[M+8H]^{8+}$ ) og kalkulerte monoisotopiske masser (Da).

Forbindelse	$m/z$ -verdi, som tilsvarer $[M+6H]^{6+}$	$m/z$ -verdi, som tilsvarer $[M+7H]^{7+}$	$m/z$ -verdi, som tilsvarer $[M+8H]^{8+}$	Kalkulert monoisotopisk masse (Da)
Forbindelse 1	763,57	654,63	572,93	4575,37

### 3.3.3 Kongsnegl - 40% SPE fra vev

For å identifisere bioaktive komponenter fra kongsnegl vev 40% SPE-eluatet, ble eluatet fraksjonert med RP-HPLC med en lineær gradient bestående av 5-65% ACN i mobilfasen, kjørt over 60 minutter på en  $C_{18}$  kolonne. Figur 22 viser eluert materiale detektert ved 220 nm, samlet opp i minuttfraksjoner. Hovedmengden av komponentene i eluatet ble eluert mellom 15-45 minutter og fraksjoner fra dette området i kromatogrammet ble testet for antibakteriell aktivitet. Ingen av fraksjonene viste antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, men fraksjonene 29-31 og 37-42 viste antibakteriell aktivitet mot *C. glutamicum*. De aktive fraksjonene ble videre undersøkt med HR-MS.



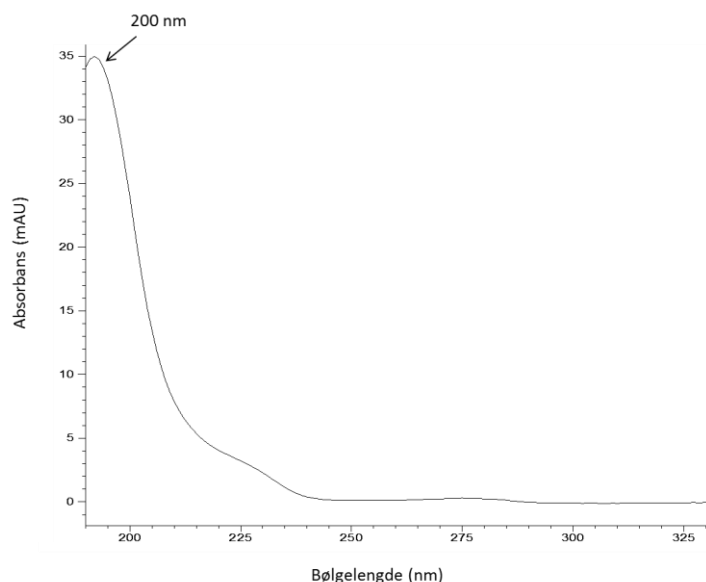
**Figur 22. UV-Vis kromatogram (220 nm) av kongsnegl vev 40% SPE-eluatet fra RP-HPLC og antibakteriell aktivitet.** Utgangsekstraktet ble separert med fast fase ekstraksjon ved å benytte en Sep-Pak® C<sub>18</sub> kolonne og eluert ut med 40% ACN og deretter videre separert ved RP-HPLC ved å benytte en C<sub>18</sub> kolonne. En lineær gradient på 5-65% ACN i 60 minutter med en flow på 6 ml/min ble benyttet. HPLC-fraksjoner som viste aktivitet mot *C. glutamicum* og *E. coli* er indikert med blå og røde felt.

Innledende karakterisering med LC-ESI-MS avdekket flere forbindelser i de aktive HPLC-fraksjonene, de mest fremtredende forbindelsene i de ulike HPLC-fraksjonene er oppsummert i tabell 11. Detekterte lavmolekylære forbindelser hadde monoisotopiske masser på mellom 0,5-0,6 kDa, og detekterte høymolekylære forbindelser hadde monoisotopiske masser på mellom 2,9-5,7 kDa.

**Tabell 11. Forbindelser detektert i aktive RP-HPLC fraksjoner fra kongsnegl vev 40% SPE-eluatet.** Tabellen gir en oversikt over kalkulererte monoisotopiske masser (Da) for de mest fremtredende forbindelsene i de aktive HPLC-fraksjonene fra kongsnegl vev 40% SPE-eluatet.

HPLC-fraksjon	Kalkulererte monoisotopiske masser (Da)
29	588,95 + 512,27
30	552,30 + 5662,48
31	489,79 + 463,92
37	4313,35 + 4340,25
38	3367,91 + 4341,34
39	3395,89
40	156,97 + 4110,55
41	2251,22 + 506,28
42	3126,58 + 2251,22

Et UV-Vis spekter (figur 23), valgt ut fra en av de aktiv HPLC-fraksjonene, representerer et typiske UV-Vis spekter for HPLC-fraksjoner der høymolekylære forbindelser var til stede. UV-Vis spekteret viser maks absorbans registrert ved 200 nm. De aktive HPLC-fraksjonene (29-31 og 37-42) ble ikke videre fulgt opp.

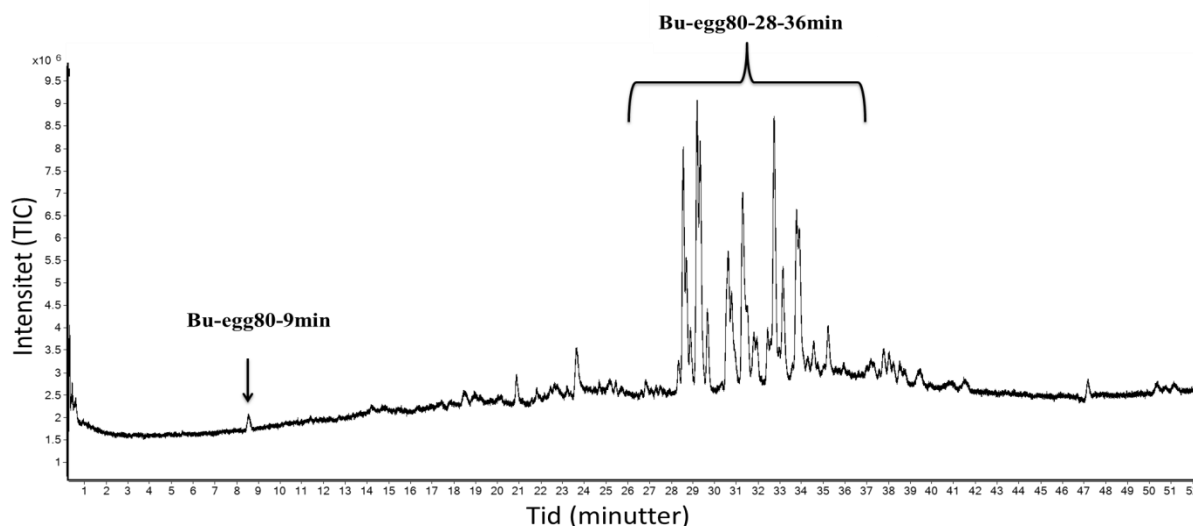


**Figur 23. UV-Vis spekter av kongsnegl vev 40% SPE-eluatet.** Pilen angir absorbans topp av fraksjonen nær 200 nm.



### 3.3.4 Kongsnegl - 80% SPE fra egg

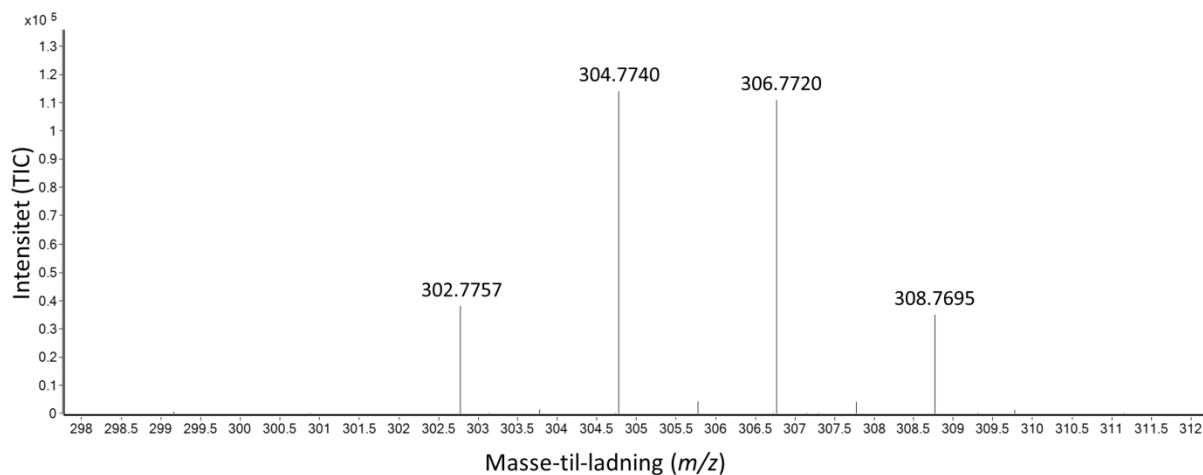
Kongsnegl egg 80% SPE-eluatet var en av de mest aktive eluatene med en MIC-verdi på 0,16 mg/ml mot *E. coli* og 0,04 mg/ml mot *C. glutamicum*. Eluatet ble undersøkt direkte på LC-ESI-MS på grunn av lite tilgjengelig materiale. Det ble benyttet en C<sub>18</sub> kolonne med en lineær gradient på 5-90% ACN i mobilfasen over 60 minutter. Kromatogrammet er vist i figur 24. HR-MS ble brukt for innledende karakterisering av aktive komponenter i eluatet.



**Figur 24.** LC-ESI-MS kromatogram av kongsnegl egg 80% SPE-eluatet. Utgangsekstraktet ble separert med fast fase ekstraksjon ved å benytte en Sep-Pak® C<sub>18</sub> kolonne og eluerte ut med 80% ACN. En lineær gradient på 5-90% ACN i 60 minutter med en flow på 0,40 ml/min ble benyttet. Pilene indikerer fraksjoner som videre ble karakterisert.

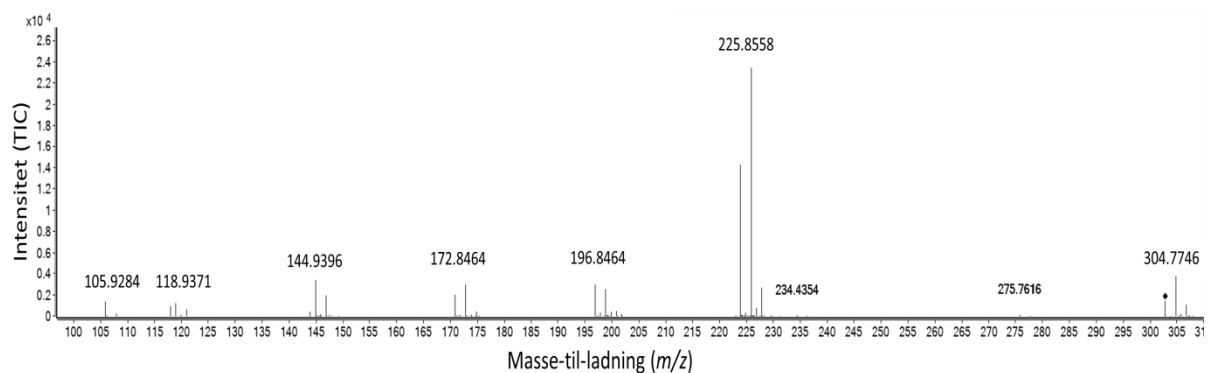
#### **Bu-egg80-9min**

Ved undersøkelse med LC-ESI-MS av kongsnegl egg 80% SPE-eluatet ble det identifisert en forbindelse med retensjonstid på ca. 8,5 minutter (Bu-egg80-9min), med en maksimum *m/z*-verdi på 304,77. HR-MS spekter av forbindelsen er vist i figur 25. MassHunter estimerte molekylformelen til å være C<sub>3</sub>HBr<sub>3</sub>N<sub>2</sub>.



**Figur 25. HR-MS spekter av forbindelsen med  $m/z$ -verdien 304,77 fra kongsnegl egg 80% SPE-eluatet 8,5 min (Bu-egg80-9min).**

LC-MS/MS spekteret til forbindelsen med  $m/z$ -verdi på 304,77 er vist i figur 26, og fragmenteringen til forbindelsen er oppsummert i tabell 12. Fragmentene med høyest intensitet er fragmentene med  $m/z$ -verdiene 304,7746 ( $^{79}\text{Br}$ ,  $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$ ,  $\text{M}^+$ ), 225,8558 ( $^{79}\text{Br}$ ,  $^{81}\text{Br}$ ,  $\text{M}^+ - \text{Br}$ ) og 144,9396 ( $^{79}\text{Br}$ ,  $\text{M}^+ - 2\text{Br}$ ).



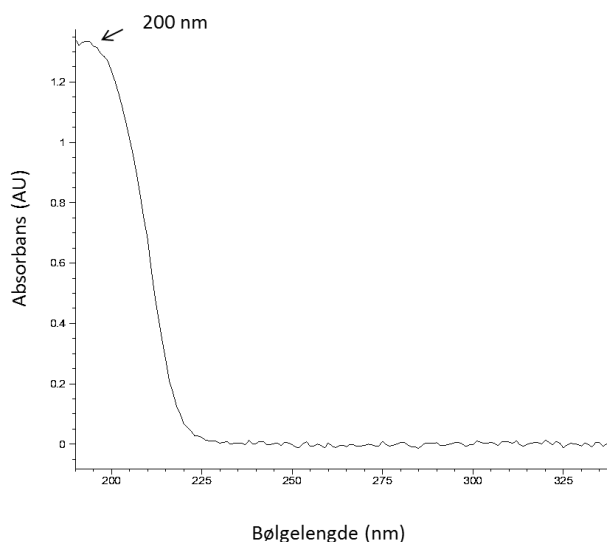
**Figur 26. LC-MS/MS spekter av forbindelsen med  $m/z$ -verdi 304,77 fra kongsnegl egg 80% SPE-eluatet 8,5 min (Bu-egg80-9min).**

**Tabell 12. Fragmentering av forbindelsen med  $m/z$ -verdi 304,7746 fra kongsnegl egg 80% SPE-eluatet 8,5 min (Bu-egg80-9min) med LC-MS/MS.** Tabellen gir en oversikt over  $m/z$ -verdiene til fragmentene med høyest intensitet, elementsammensetning, teoretiske monoisotopiske masser (Da) og beregnet feilmargin (ppm).

Målt $m/z$ -verdi [M+H]	Fordeling av Br-isotoper	Element-sammensetning [M+H]	Teoretisk masse (Da) [M+H]	Feilmargin (ppm)
304,7746	79, 79, 81	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	304,7764	-0,6
225,8558	79, 81	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	225,8565	3,1
196,8464	79, 79	C <sub>2</sub> HBr <sub>2</sub> N	196,8476	6,1
172,8414	79, 81	CHBr <sub>2</sub>	172,8425	5,2
144,9396	79	C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> BrN <sub>2</sub>	144,9401	3,4
118,9371	79	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> BrN	118,9371	0,0
105,9284	79	CHBrN	105,9292	7,6

### Bu-egg80-28-36min

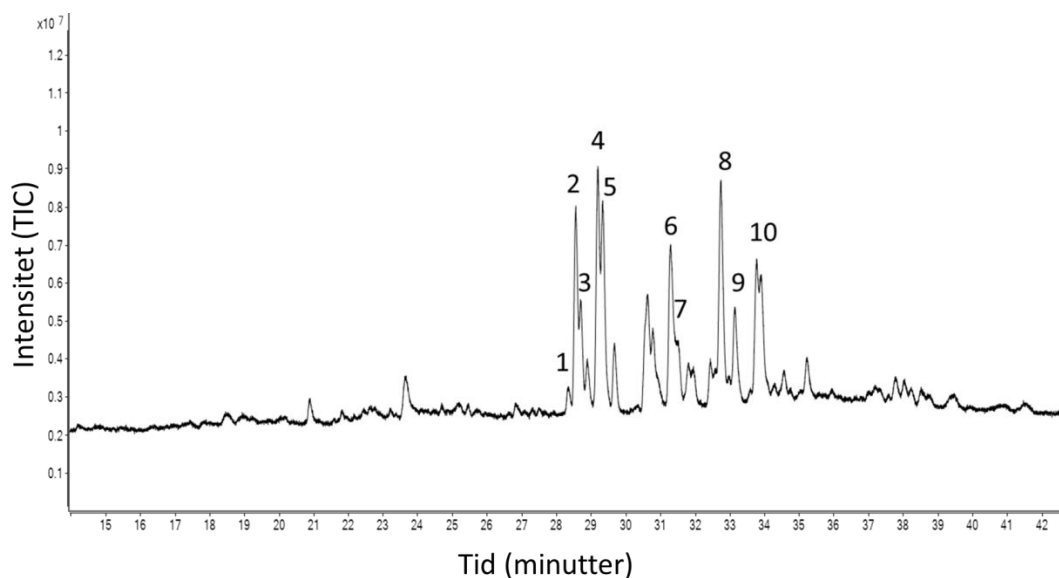
Hovedmengden av komponentene i kongsnegl egg 80% SPE-eluatet ble detektert mellom 28-36 minutter (Bu-egg80-28-36min). UV-Vis spekteret fra Bu-egg80-28-36min (figur 27) viser maks absorbans ved 200 nm.



**Figur 27. UV-Vis spekter av kongsnegl 80% SPE-eluatet 28-36 min (Bu-egg80-28-36min).** Pilen indikerer maks absorbans av fraksjonen nær 200 nm.

For å undersøke forbindelsene i Bu-egg80-28-36min ble  $m/z$ -verdiene søkt opp mot databasen LIPID MAPS. De ti mest fremtredende forbindelsene er markert i LC-ESI-MS

kromatogrammet i figur 28 og oppsummert i tabell 13 med foreslått komponentsammensetning fra databasesøk av  $m/z$ -verdiene.



**Figur 28.** Forstørret LC-ESI-MS kromatogram fra kongsnegl egg 80% SPE-eluatet 28-36 min (Bu-egg80-28-36min). De ti mest fremtredende komponentene i eluatet er markert.

**Tabell 13.** Identifiserte komponenter i toppene eluert ut mellom 28-36 minutter i kongsnegl 80% SPE-eluatet (Bu-egg80-28-36min). Forbindelsene er nummerert etter rekkefølgen i eluatet, med målt  $m/z$ -verdi, antatt elementsammensetning, antatt komponentsammensetning, teoretisk masse (Da) og beregnet feilmargin (ppm). Lysofosfatidylcholine (LPC) og lysofosfatidylethanolamine (LPE), komponentsammensetningen er angitt som (c:n), der (c) indikerer antall karbonatomer og (n) antall dobbeltbindinger i fettsyrekjeden.

Forbindelse nr.	Målt $m/z$ -verdi [M+H]	Element-sammensetning [M+H]	Antatt komponent sammensetning	Teoretisk masse (Da) [M+H]	Feilmargin (ppm)
1	542,3254	C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC 20:5	542,3247	-1,3
2	500,2785	C <sub>25</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>7</sub> P	LPE 20:5	500,2777	-1,6
3	542,3254	C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC 20:5	542,3247	-1,3
4	500,2785	C <sub>25</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>7</sub> P	LPE 20:5	500,2777	-1,6
5	454,3300	C <sub>22</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>6</sub> P	LPC 14:0	454,3297	-0,7
6	502,2941	C <sub>25</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> P	LPE 20:4	502,2934	-1,4
7	520,3410	C <sub>26</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC 18:2	520,3403	-1,3
8	496,3409	C <sub>24</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC 16:0	496,3403	-1,2
9	522,3565	C <sub>26</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC 18:1	522,3560	-1,0
10	544,3380	C <sub>28</sub> H <sub>51</sub> NO <sub>7</sub> P	LPC 20:4	544,3403	4,2

## 4 Diskusjon

De to marine gastropodene kongsnegl og neptunsnegl ble i denne oppgaven undersøkt for tilstedeværelse av antibakterielle forbindelser. Det biologiske materialet ble separert i ulike preparater (vev/celler/væsker) og deretter ekstrahert med løsemiddelekstraksjon og separert i vannfaser og organiske faser. Vannfasene ble videre separert med fast fase ekstraksjon for å fjerne salt. Retardert materiale ble stegvis eluert ut med økende mengde acetonitril (10, 40 og 80%), noe som ga tre SPE-eluatere av ulik polaritet fra hvert preparat. SPE-eluatene og de organiske fasene ble screenet for antibakteriell aktivitet mot den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum*. Eluater med god antimikrobiell aktivitet ble videre separert og delvis karakterisert ved bruk av RP-HPLC og LC-ESI-MS. Det ble påvist antibakteriell aktivitet i flere av ekstraktene, der opphavet til aktiviteten ser ut til å stamme fra ulike typer komponenter, deriblant peptider, lavmolekylære forbindelser og lysosofolipider.

### 4.1 Utbytte av ekstraksjon

Kongsnegl og neptunsnegl ble separert i ulike preparater (vev, hemolymfe, hemocytter, exudat og egg) og ekstrahert ved løsemiddelekstraksjon (60% ACN + 2% FA). Tidligere har løsemiddelekstraksjon med 60% ACN tilsatt syre vist seg godt egnet til ekstraksjon av bioaktive peptider og ikke-peptider fra marine invertebrater (Haug *et al.*, 2002; Iijima *et al.*, 2003; Haug *et al.*, 2004; Tadesse *et al.*, 2008; Solstad *et al.*, 2016). Metoden ble derfor benyttet som ekstraksjonsmetode i denne oppgaven.

Etter løsemiddelekstraksjonen var en betydelig mengde av det opprinnelige biologiske materialet ikke løst opp, noe som gir et begrenset ekstraksjons-utbytte. Marine ekstrakter er komplekse løsninger og består av en blanding av forbindelser med ulike kjemiske egenskaper. I denne oppgaven ble det brukt en ekstraksjonsløsning bestående av vann og acetonitril, begge polare løsemidler. Bruk av kun to løsemidler kan imidlertid resultere i at ikke alt løses opp, og man kan dermed risikere at flere komponenter ikke blir ekstrahert. For å løse opp en større andel av det biologiske materialet kan en kombinasjon av flere løsemidler med ulike polare egenskaper benyttes for å ekstrahere ut en større diversitet av komponenter (Seidel, 2012). Imidlertid vil forbindelser som ikke er løselig i acetonitril og/eller vann ha et dårligere

utgangspunkt for medisinsk anvendelse, da de fleste legemidler må kunne løses (transporteres) i et vandig miljø (Savjani *et al.*, 2012).

Løsemiddelekstraktene ble separert i vannfaser og organiske faser, der vannfasene videre ble separert med fast fase ekstraksjon. Etter løsemiddelekstraksjonen ble det observert et høyere prosentvis utbytte i vannfasene sammenlignet med de organiske fasene for alle ekstraktene. Etter videre separasjon av vannfasene var gjenvunnet materiale i SPE-eluatene betydelig lavere sammenlignet med utgangsmaterialet. Det høye utbyttet i vannfasene og deretter tap av materiale i SPE-eluatene kan skyldes et høyt saltinnhold, noe som er forventet i marine ekstrakter (Houssen & Jaspars, 2012). Fast fase ekstraksjon fjerner salt og andre polare forbindelser fra ekstraktet og vil dermed gi et redusert utbytte i SPE-eluatene. En del hydrofobe forbindelser vil også kunne sitte fast på SPE-kolonnene dersom 80% ACN ikke er tilstrekkelig for å eluere dem ut, noe som også kan bidra til et redusert utbytte.

Det lave utbyttet som ble observert etter ekstraksjonsprosessene kan medføre utfordringer dersom forbindelser skal isoleres og videre karakteriseres. Et lavt utbytte gir et større behov for å samle inn mer biomasse, som i noen tilfeller kan påvirke økosystemet negativt (Houssen & Jaspars, 2012). Ved et lavt ekstraksjonsutbytte må det derfor vurderes om det er hensiktsmessig å studere ekstraktene videre. Selv om mulige aktive forbindelser kan syntetiseres kjemisk eller semi-syntetisk må strukturen først bestemmes, noe som krever tilgang til ytterligere materiale som kan være en utfordring.

## **4.2 Antibakteriell aktivitet**

De organiske fasene og SPE-eluatene ble screenet for antibakteriell aktivitet med MIC-assay for å bestemme den laveste konsentrasjonen av ekstraktene som hemmet bakterievekst. Det ble påvist *in vitro* antibakteriell aktivitet i alle de ulike preparatene med unntak av exudatene. Resultatene indikerer derfor tilstedeværelsen av antibakterielle forbindelser i flere ulike deler av sneglene, deriblant vev, hemocytter og egg. I kongsnegl ble den høyeste antibakterielle aktiviteten detektert i egg 80% SPE-eluatet og i hemocytter 10% SPE-eluatet, i neptunsnegl ble den høyeste antibakterielle aktiviteten detektert i hemocytter 10% SPE-eluatet og i vev 40% SPE-eluatet. Siden antibakteriell aktivitet ble påvist i 10, 40 og 80% SPE-eluatene, kan man anta at det finnes flere ulike aktive komponenter med ulike polare egenskaper som er opphavet til den observerte aktiviteten.

Av de to bakteriestammene som ble benyttet i antibakteriell screening var *C. glutamicum* generelt den mest sensitive bakteriestammen. Den samme tendensen har tidligere blitt observert i andre studier av antibakteriell aktivitet mot *E. coli* og *C. glutamicum* (Haug *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2004; Stensvåg *et al.*, 2008; Tadesse *et al.*, 2008). Ekstrakter aktive mot kun *C. glutamicum* ble derfor vurdert som mindre interessante sammenlignet med ekstrakter som var aktive mot begge bakteriestammene. Fordelen med å inkludere sensitive bakterier er at små mengder av aktive komponenter kan detekteres.

Det er tidligere ikke blitt isolert antimikrobielle forbindelser fra kongsnegl, men antibakteriell aktivitet har blitt beskrevet. Defer *et al.* (2009) påviste antibakteriell aktivitet i 40% og 80% SPE-eluatet fra kongsnegl. Organismen ble i sin helhet ekstrahert med syreekstraksjon og fast fase ekstraksjon, og deretter testet for antibakteriell aktivitet mot et utvalg bakteriestammer. I likhet med dette studiet ble det påvist god antibakteriell aktivitet både mot Gram-positive og Gram-negative bakteriestammer i flere SPE-eluatet.

Neptunsnegl viser en generell høyere antibakteriell aktivitet i ekstraktene som ble undersøkt, noe som kan indikere at neptunsnegl inneholder mer potente eller flere aktive komponenter. Det er ikke funnet publisert materiale som beskriver at antimikrobiell aktivitet tidligere er påvist i *Neptunea* arter, noe som gjør ekstraktene fra neptunsnegl veldig interessante for videre undersøkelser av bioaktive komponenter.

Den høyeste antibakterielle aktiviteten i dette studiet ble påvist i neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet. Det var forventet å finne høy aktivitet i dette ekstraktet på bakgrunn av at hemocytter er en viktig komponent i det medfødte immunforsvaret hos gastropoder. Resultatet fra dette studiet underbygger tidligere funn (Hubert *et al.*, 1996; Haug *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2004), at hemocytter kan inneholde svært interessante komponenter. Disse komponentene er det sannsynlig at organismen produserer selv siden de befinner seg i blodcellene og dermed ikke er utsatt for kontaminering fra omgivelsene.

Kongsnegl og neptunsnegl plasma SPE-eluatene viste kun i liten grad antibakteriell aktivitet. Tidligere har det blitt påvist antibakteriell aktivitet fra både plasma og hemocytter fra marine invertebrater (Hubert *et al.*, 1996; Anderson & Beaven, 2001; Haug *et al.*, 2002; Ganz, 2003; Dolashka *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2014). Den lave aktiviteten observert i plasma kan skyldes at det i hovedsak er hemocytterne som inneholder de aktive komponentene i blodet, og ved

separasjon av hemocytterne vil plasma kun i mindre grad vise antibakteriell aktivitet. Det samme har blitt observert i andre marine invertebrater, der hemocytter har blitt separert fra hemolymfen (Hubert *et al.*, 1996; Haug *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2004). Koagulering/utfelling av hemolymfen under prøvetaking kan gjøre det utfordrende å skille plasma og hemocytter, dermed kan aktivitet påvist i plasma opprinnelig stamme fra hemocytterne (Chisholm & Smith, 1995). Et lavt utbytte av plasma resulterte i dette studiet til at eluatene kun ble testet i lave konsentrasjoner, og man kan derfor ikke utelukke at plasma kan være aktivt ved høyere testkonsentrasjoner.

Høy antimikrobiell aktivitet ble påvist i alle eluatene fra vev fra begge sneglene. Vevet er i direkte kontakt med det ytre miljøet og kan dermed inneholde forbindelser som ikke er produsert av organismen selv (Sperstad *et al.*, 2011). Det har tidligere også blitt påvist at snegler kan lagre og oppkonsentrere metabolitter fra dietten som en del av det kjemiske forsvaret mot mikroorganismer. Disse metabolittene har tidligere gitt opphavet til målt bioaktivitet i blant annet nakensnegler og sjøharer (Cimino *et al.*, 1983; Pawlik *et al.*, 1988; Pawlik, 1993; de Nys *et al.*, 1996). Det kan derfor tenkes at den påviste bioaktiviteten kan være produsert av andre organismer enn sneglene.

Egg fra kongsnegl viste god antibakteriell aktivitet mot begge bakteriene, der MIC-verdien varierte fra 0,04-1,25 mg/ml. Egg er i likhet med vev direkte utsatt for omgivelsene og det kan derfor tenkes at den observerte antibakterielle aktiviteten ikke er produsert av sneglen selv. I tidligere undersøkelser har det blitt påvist at aktivitet observert i egg har opphav fra symbiose med mikroorganismer (Gil-Turnes *et al.*, 1989; Gil-Turnes & Fenical, 1992). De fleste mollusker har imidlertid ikke yngelpleie og det kan derfor tenkes at eggene kan inneholde komponenter som beskytter dem mot patogene mikroorganismer. Antimikrobiell aktivitet har tidligere blitt observert i ekstrakter fra flere andre marine mollusker som styrker hypotesen om at disse forbindelsene er produsert som et forsvar mot mikroorganismer (Kamiya *et al.*, 1984; Kisugi *et al.*, 1989; Benkendorff *et al.*, 2000; Benkendorff *et al.*, 2001).

Ingen av SPE-eluatene fra exudatene viste antibakteriell aktivitet. Exudatet var en blank væske som sneglene slapp under tapping av hemolymfen og det ble spekulert i om dette kunne være en forsvarsmekanisme (utskillelse av bioaktive komponenter). Innsiden av skallet til sneglen vil imidlertid inneholde en god del sjøvann, og det kan tenkes at exudatene som ble



frigitt under prøvetakingen i hovedsak besto av dette. På grunn av lite utgangsmateriale og et lavt utbytte etter ekstraksjonene ble eluatene kun testet i lave konsentrasjoner, derfor kan det ikke utelukkes at også disse har en antibakteriell aktivitet ved høyere testkonsentrasjoner.

Bioaktive forbindelser kan være labile og ødelegges lett i en renseprosess. I tillegg kan enzymer, peptider og proteiner kunne degraderes under prøveopparbeidelse. Tilsetning av enzym-inhibitorer ved prøvetaking kan hindre eventuell degradering. I dette forsøket ble det ikke tilsatt enzym-inhibitorer til prøvene, derfor kan man ikke utelukke at utbytte og aktivitet har blitt redusert som følge av enzymatisk degradering. Tilsetning av enzyminhibitorer kan vurderes ved ytterligere innsamling av mer råstoff for videre undersøkelser av bioaktive peptider/proteiner i sneglene.

Sneglene ble ikke stimulert før prøvetaking og antibakteriell screening, og man kan dermed anta at uttrykket og/eller produksjon av påviste bioaktive forbindelser er konstant. Disse forbindelsene kan derfor være en del av det medfødte forsvarssystemet mot patogene mikroorganismer.

### **4.3 Innledende karakterisering av aktive forbindelser**

Aktive SPE-eluatet ble videre isolert og karakterisert med revers-fase høytrykks-væskeskromatografi (RP-HPLC) og høyoppløselig massespektrometri (HR-MS). Med utgangspunkt i antibakteriell aktivitetsdata og mengde tilgjengelig materiale ble vev 40% SPE-eluatet og egg 80% SPE-eluatet fra kongsnegl og hemocytter 10% SPE-eluatet og vev 40% SPE-eluatet fra neptunsnegl valgt for videre analyser. Enkelte ekstrakter med høyere antibakteriell aktivitet ble ikke undersøkt videre på grunn av lite tilgjengelig materiale.

Neptunsnegl vev 40% SPE-eluatet viste antibakteriell aktivitet i flere av HPLC-fraksjonene mot både *E. coli* og *C. glutamicum*. Fraksjon 39 (Nd-vev40-f39) var en av de mest aktive av HPLC-fraksjonene og ble derfor valgt for mer inngående karakterisering. UV-Vis spekteret av fraksjon Nd-vev40-f39 viste maks absorbans ved 204 nm og 278 nm, noe som indikerer tilstedeværelsen av peptider/proteiner. UV-absorbans mellom 180-220 nm indikerer tilstedeværelse av peptidbindinger, mens absorbans av lys mellom 250-300 nm indikerer tilstedeværelse av aromatiske aminosyrer som tyrosin, fenylalanin, og spesielt tryptofan (Liyanage *et al.*, 2014). Tryptofan er en viktig aminosyre for AMP siden aminosyrens biokjemiske egenskaper tillater den å interagere og dermed trenge inn og/eller perforere

bakteriemembraner (Bi *et al.*, 2013). Etter ytterligere separering av HPLC-fraksjonen ble en semi-renset fraksjon oppnådd. HR-MS av den rensede fraksjonen viste en typisk «bjelleform» på isotopfordelingen, noe som er karakteristisk for peptider/proteiner (de Hoffmann & Stroobant, 2007). Beregnede monoisotopiske masser på de mest fremtredende peptidene i fraksjonen var henholdsvis 4223, 4294, 4708 og 4779 Da. Differansen i massene mellom de to første og de to siste verdiene er lik 71 Da, noe som kan skyldes innhold av en ekstra alanin i de største peptidene.

Forsøk på å sekvensere peptider i fraksjon 39 med LC-MS/MS var mislykket og gav ingen resultater. Dette kan skyldes at fraksjonen ikke var ren nok, eller at det var for lite materiale i prøven. Manglende resultat kan også skyldes at peptidene i prøven hadde lav homologi med kjente peptider i søkbare databaser. Dette er ikke et ukjent fenomen, da de fleste peptid-databaser i hovedsak er bygd opp av sekvenser fra terrestriske organismer. Marine peptider kan i tillegg inneholde en rekke modifiserte aminosyrer (Tasiemski *et al.*, 2007; Rajanbabu *et al.*, 2015), noe som gjør treffsikkerheten i databaser enda mer usikker.

HR-MS av de aktive HPLC-fraksjonene fra kongsnegl vev 40% SPE-eluatet viste tilstedeværelse av både høymolekylære og lavmolekylære forbindelser. UV-Vis spekteret av de aktive HPLC-fraksjonene med tilstedeværelse av høymolekylære forbindelser viste absorpsjon ved 200 nm, noe som kan indikere tilstedeværelse av peptider (Liyanage *et al.*, 2014). Antimikrobielle peptider har tidligere blitt påvist i flere marine invertebrater (Tincu & Taylor, 2004). Peptidenes kjemiske egenskaper tilsier at de i hovedsak vil elueres ut i 40% SPE-eluatet (Sperstad *et al.*, 2011), noe som stemmer godt overens med resultatene fra dette studiet der de fleste peptidene ble observert i vev 40% SPE-eluatene. Litteratursøk indikerer at *Buccinidae* arter tidligere ikke har blitt undersøkt for tilstedeværelse av antimikrobielle peptider. På bakgrunn av god antibakteriell aktivitet kombinert med at forbindelsene ikke er beskrevet tidligere gjør disse forbindelsene svært interessante. Om peptidene detektert i ekstraktene er opphav til aktiviteten kan ikke bestemmes med sikkerhet ettersom peptidene ikke ble fullstendig isolert og testet for aktivitet. Videre undersøkelser av disse peptidene er derfor nødvendig for å fastslå om de er opphavet til den observerte aktiviteten.

LC-ESI-MS indikerer tilstedeværelse av flere peptider i vev 40% SPE-eluatene fra begge sneglene. Tilstedeværelsen av flere peptider samtidig kan tyde på at de virker synergistiske

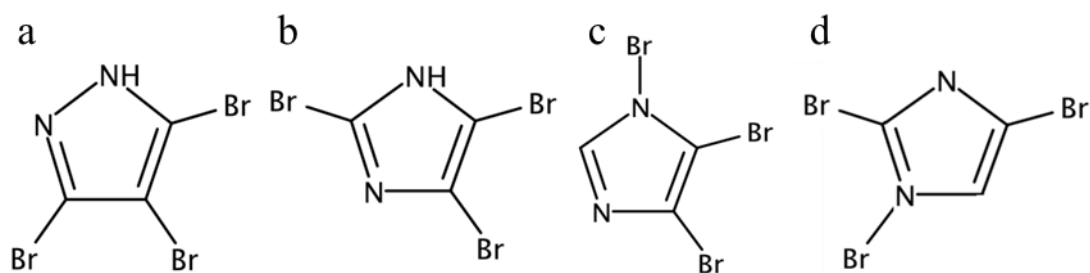
eller additive til hverandre. Synergi oppstår når den kombinerte effekten av flere forbindelser er større enn effekten av de individuelle forbindelsene alene. Kationiske AMP har tidligere vist god aktivitet alene, men det er også vist at aktiviteten kan forsterkes av andre faktorer. Synergi kan blant annet oppstå mellom ulike peptider eller andre komponenter som lactoferrin, lysozymer og andre proteiner i organismen (Gudmundsson & Agerberth, 1999). Tidligere studier av marine invertebrater har vist at disse kan produsere et arsenal av ulike AMPer (Sperstad *et al.*, 2011), og at disse kan interagerer synergistisk med hverandre (Iwanaga *et al.*, 1998; Gueguen *et al.*, 2009). Under fraksjonering kan forbindelser som virker synergiske sammen, separeres, og dermed fjerne/reduere aktiviteten som opprinnelig ble målt i ekstraktene. Dette kan for eksempel forklare tapet av aktivitet observert i HPLC-fraksjonering av kongsnegl vev 40% SPE-eluatet. Eluatet viste god antibakteriell aktivitet mot både *E. coli* og *C. glutamicum* før RP-HPLC, men ingen av HPLC-fraksjonene var aktive mot *E. coli* etter fraksjoneringen.

Flere peptider med lignende polare egenskaper (som eluerte ut omtrent samtidig under RP-HPLC) ble observert i begge 40% SPE-eluatene fra vev, dette gjør det utfordrende å isolere enkeltpeptider. For å bedre kunne separere forbindelser med lignende polaritet kan mobilfasegradienten endres for å optimalisere separeringen. I dette studiet ble det benyttet en lineær gradient med en økning på 1% acetonitril i minuttet. Det er vanlig å benytte en gradient mellom 0,5-1% stigning i minuttet til innledende isolering. For å optimalisere separasjonen kan gradienter ned til 0,05-0,1% acetonitril stigning per minutt benyttes (Carr, 2002). Andre parametere som kan endres for å optimalisere separasjonen av enkeltkomponenter er pH i mobilfaseløsningene. Peptider er ofte sensitive overfor pH-endringer på grunn av protonering/deprotonering av sure/basiske sidekjeder. Endring i pH kan endre retensjonstiden for peptider og kan brukes til å optimalisere isoleringen. I tillegg kan ulike kolonner med ulike egenskaper brukes til å optimalisere isoleringen av enkeltkomponenter (Carr, 2002). Andre kromatografiske metoder kan også brukes for å separere komponenter basert på andre fysiske og kjemiske egenskaper enn polaritet, for eksempel størrelse, isoelektrisk punkt eller ladning.

Neptunsnegl hemocytter 10% SPE-eluatet var eluatet med høyest påvist antibakteriell aktivitet. HR-MS analyse av eluatet viste en hovedkomponent med monoisotopisk masse på 4575 Da. UV-Vis spekteret viste høy absorbans rundt 210 nm og 260 nm, noe som indikerer

tilstedeværelse av peptider/proteiner. Det er dermed sannsynlig at den påviste aktiviteten i 10% SPE-eluatene fra neptunsnegl kan skyldes et antimikrobielt peptid. Hemocytter er en viktig del av sneglens forsvarssystem og AMP har tidligere blitt beskrevet i hemocytter fra flere marine invertebrater (Charlet *et al.*, 1996; Iwanaga *et al.*, 1998; Mitta *et al.*, 1999; Haug *et al.*, 2002; Haug *et al.*, 2004).

Under innledende karakterisering av egg 80% SPE-eluatet fra kongsnegl ble flere mulige bioaktive komponenter påvist. Blant annet en forbindelse med  $m/z$ -verdi på 304,77 og retensjonstid på ca. 8,5 minutter, der den relative intensiteten av isotoptoppene indikerer en tri-bromert forbindelse (Lampman *et al.*, 2010). På bakgrunn av molekylvekten, estimert elementsammensetning og fragmenteringen i LC-MS/MS kan det antas at forbindelsen er en imidazole-ring med tre brom-atomer bundet til ringen, og at fire mulige strukturformler kan passe til forbindelsen (figur 29).



**Figur 29. Strukturer passende til  $m/z$ -verdi 304,77.** Mulige strukturer (a) 3,4,5-Tribromo-1H-pyrazole, (b) 2,4,5-Tribromo-1H-imidazole, (c) 1,2,3-tribromo-1H-imidazole og (d) 1,2,4-Tribromo-1H-imidazole. Strukturene er hentet fra (Benkendorff *et al.*, 2004) og fra SciFinder.

LC-MS/MS spekteret til forbindelsen ble sammenlignet med teoretiske spektre (mulige fragmenteringer) til de fire alternative strukturerne. Det var ikke mulig å konkludere med hvilke strukturer som samsvarer med forbindelsen, siden de fire strukturerne har relativt likt fragmenteringsmønster. For å fastslå strukturen til forbindelsen må ytterligere analyser benyttes, der den mest aktuelle er NMR, men til det trengs det mer rensset materiale.

Forbindelser med  $m/z$ -verdi på 304,77 har tidligere blitt påvist i egg fra tre piggsnegler; *Trunculariopsis trunculus*, *Ceratostoma erinaceum* og *Trophon geversianus*. Benkendorff *et al.* (2004) påviste antibakteriell aktivitet for denne forbindelsen mot både Gram-positive og Gram-negative bakteriestammer (*E. coli*, *S. aureus* og *Pseudomonas aeruginosa*), noe som også ble observert i dette studiet.

Hovedmengden av komponenter i kongsnegl egg 80% SPE-eluatet eluerte ut mellom 28-36 minutter. UV-Vis spekteret av disse komponentene viste kun absorpsjon ved lave bølgelengder, med en maks absorpsjon rundt 200 nm, noe som kan indikere tilstedeværelse av lipider. Lipider absorberer kun lys ved bølgelengder mellom 200-210 nm på grunn av manglende innhold av kromatoforer i deres struktur (Larsen, 1992). Masse-til-ladning ( $m/z$ ) verdiene til de ti mest fremtredende forbindelsene ble søkt opp og funnet i databasen LIPID MAPS som lysosofolipider. Ytterligere undersøkelser (MS og/eller NMR) må imidlertid utføres for å gjøre en endelig identitets-bestemmelse. De antatte lysosofolipidene detektert i 80% SPE-eluatet har tidligere blitt identifisert i ekstrakter fra blant annet hailever (Chen & Li, 2007) og fra blekksprut (Sinanoglou & Miniadis-Meimaroglou, 2000) ved bruk av LC-ESI-MS. Resultatene deres stemmer godt overens med  $m/z$ -verdier målt i dette studiet og kan sannsynliggjøre at forbindelsene er lysosofolipider.

Det har tidligere blitt påvist at lysosofolipider har antimikrobiell aktivitet, der to ulike virkningsmekanismer er foreslått. En virkningsmekanisme innebærer reorganisering av membranstrukturen som kan føre til oppløsning av bakteriemembranen. Denne mekanismen er blitt observert for *S. aureus*, og mykobakterier der bakteriene dør umiddelbart ved lysering (Mårdh & Taylor-Robinson, 1973; Kondo & Kanai, 1985). En annen virkningsmekanisme innebærer at lysosofolipider autolyserer bakteriecellene ved induksjon av aktiviteten til autolytiske enzymer, denne mekanismen har blitt observert i *Bacillus subtilis* (Tsuchido, 1994). For å bestemme om lysosofolipidene er opphavet til aktiviteten observert i eluatet må enkeltforbindelser isoleres og testes for antibakteriell aktivitet.

Variasjoner i årstid, alder, kjønn, lokalisasjon og andre forhold kan gi variasjoner i hva organismen uttrykker og hvilke komponenter i organismen som kan detekteres. Slike variasjoner kan gi problemer ved re-isolering av aktive komponenter for videre undersøkelser. Tidligere studier utført på mollusker har vist at sesongvariasjoner i gyteperioder og stressfaktorer kan påvirke uttrykket av bioaktive komponenter (Mitta *et al.*, 2000; Roch, 2002; Y. Li *et al.*, 2009a, 2009b).

## 4.4 Videre arbeid

Det gjenstår fremdeles mye arbeid for å kunne identifisere komponentene som er ansvarlig for den antibakterielle aktiviteten som ble detektert i kongsnegl og neptunsnegl. Enkeltkomponenter i de aktive fraksjonene må videre isoleres og karakteriseres, og antibakterielle peptider må sekvenseres. Mange av ekstraktene med høy antibakteriell aktivitet ble i dette studiet ikke videre undersøkt, og det kan derfor være interessant å studere disse videre. Det faktum at det tidligere har blitt identifisert potente antimikrobielle forbindelser i flere marine invertebrater, samtidig som at kongsnegl og neptunsnegl i liten grad er undersøkt, gjør disse sneglene meget interessante for videre analyser.

Videre burde de aktive forbindelsene testes mot humane celler for å kartlegge eventuell toksisitet. Dersom forbindelsene er toksiske mot vanlige celler vil de i mindre grad være egnet som antibiotika/legemiddel. Flere biologiske tester, blant annet virkningsmekanisme-studier, burde også utføres for å bestemme om aktiviteten er spesifikk eller om forbindelsen angriper flere ulike mål i cellene. For å unngå potensielle bivirkninger burde legemidler være mest mulige spesifikke mot sine mål.

## 5 Konklusjoner

Hovedmålet i dette studiet var å påvise antibakterielle komponenter i ulike preparater fra de to marine gastropodene kongsnegl og neptunsnegl, samt utføre innledende karakterisering av aktive komponenter.

Hovedkonklusjoner fra studiet er følgende:

- Antibakteriell aktivitet ble påvist i alle vevstypene (med unntak av exudat) mot både den Gram-negative bakterien *E. coli* og den Gram-positive bakterien *C. glutamicum*, høyest antibakteriell aktivitet ble påvist i hemocytter og egg.
- Bioaktive forbindelser i fast fase ekstraktene som videre ble separert med RP-HPLC ble kun delvis isolert.
- Innledende karakterisering med massespektrometri indikerer tilstedeværelse av flere ulike antimikrobielle komponenter, blant annet peptider, lipider og lavmolekylære forbindelser.
- Videre studier av de mulige aktive komponentene er nødvendig for å identifisere opphavet til aktiviteten som er påvist, samt evaluere deres potensial som framtidig «drug leads» for utvikling av nye antibiotika.

## Referanser

- Ab Lah, R., Smith, J., Savins, D., Dowell, A., Bucher, D., & Benkendorff, K. (2016). Investigation of nutritional properties of three species of marine turban snails for human consumption. *Food Science & Nutrition*, 5(1), 14-30.
- Alam, M., & Thomson, R. H. (1998). *Handbook of Natural Products from Marine Invertebrates*. Amsterdam, Nederland: Harwood Academic Publisher.
- Anderson, R. S., & Beaven, A. E. (2001). Antibacterial activities of oyster (*Crassostrea virginica*) and mussel (*Mytilus edulis* and *Geukensia demissa*) plasma. *Aquatic living resources*, 14(6), 343-349.
- Arias, C. A., & Murray, B. E. (2015). A new antibiotic and the evolution of resistance. *New England Journal of Medicine*, 372(12), 1168-1170.
- Artuso, A. (2002). Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. *World Development*, 30(8), 1355-1368.
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1543-1575.
- Benkendorff, K., Bremner, J. B., & Davis, A. R. (2000). Tyrian purple precursors in the egg masses of the Australian muricid, *Dicathais orbita*: A possible defensive role. *Journal of chemical ecology*, 26(4), 1037-1050.
- Benkendorff, K., Davis, A. R., & Bremner, J. B. (2001). Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: an assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaetes. *Journal of invertebrate pathology*, 78(2), 109-118.
- Benkendorff, K., Davis, A. R., Rogers, C. N., & Bremner, J. B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316(1), 29-44.
- Benkendorff, K., Pillai, R., & Bremner, J. B. (2004). 2, 4, 5-tribromo-1 h-imidazole in the egg masses of three muricid molluscs. *Natural product research*, 18(5), 427-431.
- Bi, X., Wang, C., Ma, L., Sun, Y., & Shang, D. (2013). Investigation of the role of tryptophan residues in cationic antimicrobial peptides to determine the mechanism of antimicrobial action. *Journal of Applied Microbiology*, 115(3), 663-672.
- Biggs, J. S., Rosenfeld, Y., Shai, Y., & Olivera, B. M. (2007). Conolysin-Mt: a *conus* peptide that disrupts cellular membranes. *Biochemistry*, 46(44), 12586-12593.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.
- Bradshaw, J., Butina, D., Dunn, A. J., Green, R. H., Hajek, M., Jones, M. M., Lindon, J. C., & Sidebottom, P. J. (2001). A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. *Journal of natural products*, 64(12), 1541-1544.
- Brockton, V., & Smith, V. J. (2008). Crustin expression following bacterial injection and temperature change in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(9), 1027-1033.
- Brumfitt, W., Salton, M. R. J., & Hamilton-Miller, J. M. T. (2002). Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), 731-734.
- Buchsbaum, R., Buchsbaum, M., Pearse, J., & Pearse, V. (1987). *Animals without backbones* (3. ed.). Chicago, USA: University of Chicago Press
- Bugni, T. S., Harper, M. K., McCulloch, M. W. B., & Witson, E. L. (2010). Advances in Instrumentation, Automation, Dereplication and Prefractionation. In A. D. Buss & M.



- S. Butler (eds.), *Natural product Chemistry for Drug Discovery*, ch.9, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Butler, M. S., & Buss, A. D. (2006). Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, *71*(7), 919-929.
- Carr, D. (2002). *The Handbook of Analysis and Purification of Peptides and Proteins by Reversed-Phase HPLC* (3. ed.). California, USA: Vydac Hesperia.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (1996). Innate immunity Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(36), 21808-21813.
- Chen, S., & Li, K. W. (2007). Mass spectrometric identification of molecular species of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine extracted from shark liver. *Journal of agricultural and food chemistry*, *55*(23), 9670-9677.
- Cheng-Hua, L., Jian-Min, Z., & Lin-Sheng, S. (2009). A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. *Molluscan Research*, *29*(1), 17-26.
- Chisholm, J. R., & Smith, V. J. (1995). Comparison of antibacterial activity in the hemocytes of different crustacean species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *110*(1), 39-45.
- Cimino, G., De Rosa, S., De Stefano, S., Sodano, G., & Villani, G. (1983). Dorid nudibranch elaborates its own chemical defense. *Science*, *219*(4589), 1237-1238.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology*, *3*(9), 541-548.
- Corley, D. G., & Durley, R. C. (1994). Strategies for Database Dereplication of Natural Products. *Journal of natural products*, *57*(11), 1484-1490.
- Costello, M. J., Bouchet, P., Boxshall, G., Fauchald, K., Gordon, D., Hoeksema, B. W., Poore, G. C., van Soest, R. W., Stöhr, S., & Walter, T. C. (2013). Global coordination and standardisation in marine biodiversity through the World Register of Marine Species (WoRMS) and related databases. *PloS one*, *8*(1), e51629.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *1830*(6), 3670-3695.
- Cunha, R. L., Grande, C., & Zardoya, R. (2009). Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology*, *9*(1), 210.
- Czaplicki, S. (2013). *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*: INTECH Open Access Publisher.
- David, B., Wolfender, J.-L., & Dias, D. A. (2015). The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, *14*(2), 299-315.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417-433.
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications* (3. ed.). West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- de Nys, R., Steinberg, P. D., Rogers, C. N., Charlton, T. S., & Duncan, M. W. (1996). Quantitative variation of secondary metabolites in the sea hare *Aplysia parvula* and its host plant, *Delisea pulchra*. *Marine Ecology Progress Series*, *130*, 135-146.
- Defer, D., Bourgougnon, N., & Fleury, Y. (2009). Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture*, *293*(1-2), 1-7.

- Dolashka, P., Dolashki, A., Beeumen, J. V., Floetenmeyer, M., Velkova, L., Stevanovic, S., & Voelter, W. (2016). Antimicrobial activity of molluscan hemocyanins from helix and rapana snails. *Current pharmaceutical biotechnology*, 17(3), 263-270.
- Dolashka, P., Moshtanska, V., Borisova, V., Dolashki, A., Stevanovic, S., Dimanov, T., & Voelter, W. (2011). Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides*, 32(7), 1477-1483.
- Downard, K. (2004). *Mass Spectrometry: A foundation Course*. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry
- Dunlap, W. C., & Yamamoto, Y. (1995). Small-molecule antioxidants in marine organisms: Antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 112(1), 105-114.
- Fukuyama, Y., Iwatsuki, C., Kodama, M., Ochi, M., Kataoka, K., & Shibata, K. (1998). Antimicrobial indolequinones from the mid-intestinal gland of the muricid gastropod *Drupella fragum*. *Tetrahedron*, 54(34), 10007-10016.
- Ganz, T. (2003). The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and comparative biology*, 43(2), 300-304.
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (1999). Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today*, 5(7), 292-297.
- Gil-Turnes, M. S., & Fenical, W. (1992). Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. *The Biological Bulletin*, 182(1), 105-108.
- Gil-Turnes, M. S., Hay, M. E., & Fenical, W. (1989). Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science*, 246(4926), 116.
- Grabley, S., & Thiericke, R. (1999). The impact of Natural Products on Drug Discovery. In S. Grabley & R. Thiericke (eds.), *Drug Discovery from Nature*, ch.1, Berlin, Tyskland: Springer.
- Gray, A. I., Igoli, J. O., & Edrada-Ebel, R. (2012). Natural Products Isolation in Modern Drug Discovery Programs. In S. D. Sarker & L. Nahar (eds.), *Natural Products Isolation*, 3. ed., ch.20, New York, USA: Humana Press.
- Gudmundsson, G. H., & Agerberth, B. (1999). Neutrophil antibacterial peptides, multifunctional effector molecules in the mammalian immune system. *Journal of immunological methods*, 232(1), 45-54.
- Gueguen, Y., Bernard, R., Julie, F., Paulina, S., Delphine, D.-G., Franck, V., Philippe, B., & Evelyne, B. (2009). Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular immunology*, 46(4), 516-522.
- Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. d. S., Silva-Pereira, I., & Kyaw, C. M. (2014). Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in microbiology*, 4, 63-74.
- Haug, T., Kjuul, A. K., Stensvåg, K., Sandsdalen, E., & Styrvold, O. B. (2002). Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & shellfish immunology*, 12(5), 371-385.
- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø. M., Sandsdalen, E., & Styrvold, O. B. (2004). Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of invertebrate pathology*, 85(2), 112-119.
- Henkel, T., Brunne, R. M., Müller, H., & Reichel, F. (1999). Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, 38(5), 643-647.

- Horta, A., Alves, C., Pinteus, S., & Pedrosa, R. (2015). The marine origin of drugs. In L. M. Botana & A. Alfonso (eds.), *Phycotoxins, Chemistry and Biochemistry*, 2 ed., ch.13, Chichester, England: Wiley Blackwell.
- Houssen, W. E., & Jaspars, M. (2012). Isolation of Marine Natural Products. In S. D. Sarker, Z. Latif, & A. I. Gray (eds.), *Natural Products Isolation*, 3. ed., ch.14, New York, USA: Humana Press.
- Hubert, F., Van Der Knaap, W., Noël, T., & Roch, P. (1996). Cytotoxic and antibacterial properties of *Mytilus galloprovincialis*, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (bivalve molluscs) hemolymph. *Aquatic living resources*, 9(2), 115-124.
- Hwang, P. M., & Vogel, H. J. (1998). Structure-function relationships of antimicrobial peptides. *Biochemistry and Cell Biology*, 76(2-3), 235-246.
- Hågvar, E., B. (1998). *Det zoologiske mangfoldet* (2 ed.). Oslo, Norge: Universitetsforlaget.
- Ichiba, T., & Higa, T. (1986). New cuparene-derived sesquiterpenes with unprecedented oxygenation pattern from the sea hare *Aplysia dactylomela*. *The Journal of organic chemistry*, 51(17), 3364-3366.
- Iijima, R., Kisugi, J., & Yamazaki, M. (2003). A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*. *Developmental & Comparative Immunology*, 27(4), 305-311.
- Iwanaga, S., Kawabata, S.-i., & Muta, T. (1998). New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and function. *The journal of biochemistry*, 123(1), 1-15.
- Janson, J.-C., & Jönsson, J. Å. (2012). Introduction to Chromatography. In J.-C. Janson (Ed.), *Protein purification: principles, high resolution methods, and applications*, 3. ed., Vol. 151, ch.1, New Jersey, USA: John Wiley & Sons.
- Jayasankar, V., & Subramoniam, T. (1999). Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(2), 253-259.
- Kamiya, H., Muramoto, K., & Ogata, K. (1984). Antibacterial activity in the egg mass of a sea hare. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 40(9), 947-949.
- Kebarle, P., & Verkerk, U. H. (2009). Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass spectrometry reviews*, 28(6), 898-917.
- Kennedy, J., Flemer, B., Jackson, S. A., Lejon, D. P., Morrissey, J. P., O'gara, F., & Dobson, A. D. (2010). Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Marine drugs*, 8(3), 608-628.
- Kisugi, J., Hirokazu, O., Kamiya, H., & Yamazaki, M. (1989). Biopolymers from Marine Invertebrates. X.: Mode of Action of an Antibacterial Glycoprotein, Aplysianin E, from Eggs of a Sea Hare, *Aplysia kurodai*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 37(11), 3050-3053.
- Kondo, E., & Kanai, K. (1985). Mechanism of bactericidal activity of lysolecithin and its biological implication. *Japanese journal of medical science & biology*, 38(4), 181.
- Lampman, G. M., Pavia, D. L., & Vyvyan, J. R. (2010). *Spectroscopy* (4 ed.). California, USA: Brooks/Cole.
- Larsen, N. G. (1992). Glycolipid Analysis in Wheat Grains. In H.-F. Linskens & J. F. Jackson (eds.), *Seed Analysis*, ch.12, New York, USA: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Latif, Z., & Sarker, S. D. (2012). Isolation of Natural Products by Preparative High performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). In S. D. Sarker & L. Nahar (eds.), *Natural Products Isolation*, 3 ed., ch.10, New York, USA: Humana Press

- Lee, I. H., Cho, Y., & Lehrer, R. I. (1997). Styelins, Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides from the Solitary Tunicate, *Styela clava*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 118(3), 515-521.
- Li, C., Haug, T., Styrvold, O. B., Jørgensen, T. Ø., & Stensvåg, K. (2008). Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(12), 1430-1440.
- Li, Y., Qin, J. G., Li, X., & Benkendorff, K. (2009a). Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). *Aquaculture*, 286(1–2), 64-71.
- Li, Y., Qin, J. G., Li, X., & Benkendorff, K. (2009b). Spawning-dependent stress responses in pacific oysters *Crassostrea gigas*: A simulated bacterial challenge in oysters. *Aquaculture*, 293(3–4), 164-171.
- Lindner, G. (1976). *Snegler og muslinger fra alle hav* Oslo, Norge: Cappelen.
- Livermore, D. M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J., Norrby, R., & Tillotson, G. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 1941-1944.
- Liyanage, M. R., Bakshi, K., Volkin, D. B., & Middaugh, R. C. (2014). Ultraviolet Absorption Spectroscopy of Peptides. In A. E. Nixon (Ed.), *Therapeutic Peptides* ch.15, Massachusetts, USA: Humana Press.
- Loker, E., S. (2010). Gastropod immunobiology. In K. Söderhäll (Ed.), *Invertebrate immunity*, ch.2, Uppsala, Svergie: Springer.
- Mandal, S. M., Roy, A., Ghosh, A. K., Hazra, T. K., Basak, A., & Franco, O. L. (2014). Challenges and future prospects of antibiotic therapy: from peptides to phages utilization. *Frontiers in pharmacology*, 5, 105.
- Marr, A. K., Gooderham, W. J., & Hancock, R. E. W. (2006). Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Current opinion in pharmacology*, 6(5), 468-472.
- Mayer, A. M. S. (2016). Marine Pharmaceuticals: The Clinical Pipeline. 04.2016. Retrieved from <http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., & Fusetani, N. (2011). Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 153(2), 191-222.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrzynda, E. A., Boudry, P., & Roch, P. (2000). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(4), 381-393.
- Mitta, G., Hubert, F., Noel, T., & Roch, P. (1999). Myticin, a novel cysteine - rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry*, 265(1), 71-78.
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., & Shimonishi, Y. (1989). Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *Journal of biochemistry*, 106(4), 663-668.
- Moen, F. E., & Svensen, E. (2008). *Dyrelivet i havet* (5 ed.). Kristiansund, Norge: Kom forlag.

- Molinari, G. (2009). Natural products in drug discovery: present status and perspectives. In C. A. Guzmán & G. Z. Feuerstein (eds.), *Pharmaceutical Biotechnology*, pp. 13-27ch.2, New York, USA: Springer.
- Montaser, R., & Luesch, H. (2011). Marine natural products: a new wave of drugs? *Future medicinal chemistry*, 3(12), 1475-1489.
- Mårdh, P.-A., & Taylor-Robinson, D. (1973). The differential effect of lysolecithin on mycoplasmas and acholeplasmas. *Medical microbiology and immunology*, 158(3), 219-226.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, 17(3), 215-234.
- Otero-González, A. J., Magalhães, B. S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D. A., Dias, S. C., & Franco, O. L. (2010). Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal*, 24(5), 1320-1334.
- Ovchinnikova, T. V., Balandin, S. V., Aleshina, G. M., Tagaev, A. A., Leonova, Y. F., Krasnodembsky, E. D., Men'shenin, A. V., & Kokryakov, V. N. (2006). Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 348(2), 514-523.
- Park, S.-C., Kim, J.-Y., Lee, J.-K., Hahm, K.-S., & Park, Y. (2012). Antibacterial action of new antibacterial peptides, Nod1 and Nod2, isolated from *Nordotis discus discus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(27), 6875-6881.
- Pawlik, J. R. (1993). Marine invertebrate chemical defenses. *Chemical Reviews*, 93(5), 1911-1911.
- Pawlik, J. R., Kernan, M. R., Molinski, T. F., Harper, M. K., & Faulkner, D. J. (1988). Defensive chemicals of the Spanish dancer nudibranch *Hexabranchus sanguineus* and its egg ribbons: macrolides derived from a sponge diet. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 119(2), 99-109.
- Penesyanyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20(4), 5286-5298.
- Perez, G. R. M., Hernandez, A. G., & Stawinski, T. M. (1988). Antibiosis of *Purpura pansa*. *Herba Polonica*, 34(1-2), 81-84.
- Perez, G. R. M., Stawinski, T., & Osnaya, M. D. R. (1986). Litorine: a new macrolide antimicrobial isolated from *Littorina aspera*. *Drugs under experimental and clinical research*, 13(4), 191-194.
- Pomponi, S. A. (1999). The bioprocess–technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, 70(1–3), 5-13.
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 55-64.
- Qin, C.-L., Huang, W., Zhou, S.-Q., Wang, X.-C., Liu, H.-H., Fan, M.-H., Wang, R.-X., Gao, P., & Liao, Z. (2014). Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish & shellfish immunology*, 41(2), 362-370.
- Rajanbabu, V., Chen, J.-Y., & Wu, J.-L. (2015). Antimicrobial Peptides from Marine Organisms. In S.-K. Kim (Ed.), *Handbook of Marine Biotechnology*, ch.31, Berlin, Tyskland: Springer.

- Rana, F. R., Macias, E. A., Sultany, C. M., Modzrakowski, M. C., & Blazyk, J. (1991). Interactions between magainin 2 and *Salmonella typhimurium* outer membranes: effect of lipopolysaccharide structure. *Biochemistry*, 30(24), 5858-5866.
- Roch, P. (2002). Behaviour of defense peptides in environmentally stressed mussels. *Revue de médecine vétérinaire*, 153(7), 517-520.
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., & Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Current opinion in pharmacology*, 18, 56-60.
- Samuelsson, G., & Bohlin, L. (2009). *Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy* (6 ed.). Stockholm, Svergie: Swedish Pharmaceutical Press.
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2012). An Introduction to Natural Products isolation. In S. D. Sarker & L. Nahar (eds.), *Natural Products Isolation*, 3. ed., ch.1, New York, USA: Humana Press.
- Sathyan, N., Philip, R., Chaithanya, E., & Anil Kumar, P. (2012). Identification and molecular characterization of molluskin, a histone-H2A-derived antimicrobial peptide from molluscs. *ISRN Molecular Biology*, 2012.
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN pharmaceuticals*, 2012, 195727.
- Schwartsmann, G., da Rocha, A. B., Berlinck, R. G. S., & Jimeno, J. (2001). Marine organisms as a source of new anticancer agents. *The Lancet Oncology*, 2(4), 221-225.
- Seidel, V. (2012). Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. In S. D. Sarker & L. Nahar (eds.), *Natural Products Isolation*, 3. ed., ch.2, New York, USA: Humana Press.
- Seo, J.-K., Go, H.-J., Kim, C.-H., Nam, B.-H., & Park, N. G. (2016). Antimicrobial peptide, hdMolluscidin, purified from the gill of the abalone, *Haliotis discus*. *Fish & shellfish immunology*, 52, 289-297.
- Sinanoglou, V. J., & Miniadis-Meimaroglou, S. (2000). Phospholipids in Mediterranean cephalopods. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(3-4), 245-255.
- Singh, S. B., & Culberson, J. C. (2010). Chemical Space and the Difference Between Natural Products and Synthetics. In A. D. Buss & M. S. Butler (eds.), *Natural Product Chemistry for Drug Discovery*, ch.2, Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry.
- Solstad, R. G., Li, C., Isaksson, J., Johansen, J., Svenson, J., Stensvåg, K., & Haug, T. (2016). Novel Antimicrobial Peptides EeCentrocins 1, 2 and EeStrongylocin 2 from the Edible Sea Urchin *Echinus esculentus* Have 6-Br-Trp Post-Translational Modifications. *PloS one*, 11(3), e0151820.
- Sperstad, S. V., Haug, T., Blencke, H.-M., Styrvold, O. B., Li, C., & Stensvåg, K. (2011). Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery. *Biotechnology Advances*, 29(5), 519-530.
- Stensvåg, K., Haug, T., Sperstad, S. V., Rekdal, Ø., Indrevoll, B., & Styrvold, O. B. (2008). Arasin 1, a proline–arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(3), 275-285.
- Sømme, L. S. (2016). *Snegler Store norske leksikon*.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M. B., Styrvold, O. B., & Haug, T. (2008). Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of invertebrate pathology*, 99(3), 286-293.
- Tasiemski, A., Schikorski, D., Le Marrec-Croq, F., Pontoire-Van Camp, C., Boidin-Wichlacz, C., & Sautière, P.-E. (2007). Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing

- bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(8), 749-762.
- Tincu, J. A., & Taylor, S. W. (2004). Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3645-3654.
- Tsuchido, T. (1994). Induction of cell autolysis of *Bacillus subtilis* with lysophosphatidylcholine. *Applied microbiology and biotechnology*, 41(1), 106-109.
- von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., & Häbich, D. (2006). Antibacterial natural products in medicinal chemistry—exodus or revival? *Angewandte Chemie International Edition*, 45(31), 5072-5129.
- Vorland, L. H., Ulvatne, H., Rekdal, Ø., & Svendsen, J. S. (1999). Initial binding sites of antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 31(5), 467-473.
- Watson, T., & Sparkman, D. O. (2008). *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation* (4 ed.). Hoboken, USA: Wiley.
- WHO. (2016). Antibiotic resistance. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>
- Yamazaki, M., Ohye, H., Kisugi, J., & Kamiya, H. (1990). Bacteriostatic and cytolytic activity of purple fluid from the sea hare. *Developmental & Comparative Immunology*, 14(4), 379-383.
- Yasuhara-Bell, J., & Lu, Y. (2010). Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, 86(3), 231-240.
- Yazdankhah, S., Lassen, J., Midtedt, T., & Solberg, C. O. (2013). Historien om antibiotika *Tidsskrift for den norske legeforening*, 133, 2502-2507.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415(6870), 389-395.