

Effekt av alginat på legumain, en protease involvert i kreftutvikling

Hong Hoa Thi Truong



Masteroppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap/ Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskapelig fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

24.09.2012

Veiledere:

Anne Berit Samuelsen, Lise Berven, Rigmor Solberg og Harald Thidemann Johansen

Forord

Min masteroppgave ble gjennomført ved avdeling for den farmasøytisk biovitenskap og avdeling for kjemi ved Universitet i Oslo. Gjennom arbeidet med masteroppgaven har jeg fått mye hjelp og bidrag fra avdelings personer, som har gjort at jeg har fullført min oppgave på best mulige måte. Jeg vil gjerne takke disse personene:

Først av alt, min hovedveileder Anne Berit Samuelsen, for hennes betydelig hjelp, med veldig god veiledning både praktisk og teoretisk. Jeg har fått mye gode råd og detaljerte forklaringer på det jeg lurte på, samtidig som hun alltid har vært tilgjengelig for mine spørsmål. Dette setter jeg veldig pris på!

Stor takk til stipendiat Lise Berven, som også har vært en god veileder for min oppgaven og mye hjelp jeg har fått av deg på cellelab. Veiledere Rigmor Solberg, Harald Thidemann Johansen for deres hjelp til korrekturlesing og innspill til oppgaven.

Ingeniørene på 3. Avdeling, Hoai Thi Nguyen, Suthajini Yogarajah og Ellen Hanne Cohen og andre som har hjulpet med meg GC-, HPAEC-PAD kjøring og har tatt seg tid til mine spørsmål under hele labperioden. Takke Avdeling 3 som har vært et stort bidrag til trivsel og godt arbeidsmiljø for meg!

Jeg vil også takke for godt samarbeid fra professorene ved Institutt for Bioteknologi i NTNU, Professor Gudmund Skjåk-Bræk og Dr.Finn Ackermann. Og stipendiat Anders Moe ved det Institutt for Molekylær Biovitenskap, UiO.

Og over alt familien min og venner, for deres kjærighet og oppmuntringer gjennom alle disse årene på farmasistudiet!

Oslo, september 2012

Sammendrag

Bakgrunn: Alginat er en kjent polymer som har vært mye utnyttet kommersielt, men også i legemiddelbransjen de siste årene. Alginat er et løselig kostfiber som gir immunrespons ved cellestimulering. Mange studier har vist en tendens til at kosthold med mye kostfiber gir lavere insidens tykktarms-endetarmskreft. En tidligere masteroppgave ved forskningsgruppen har vist at legumainaktivitet ble påvirket av alginat ved *in vitro* eksperimenter, både ved direkte autoaktivering prolegumain og ved stimulering av makrofagceller. Denne oppgaven bygget videre på dette og effekten av alginat på legumain ble nærmere studert, der legumain er en cysteinprotease som har vist relasjon til kreftutvikling.

Metoder: Det ble brukt forskjellige metoder for å karakterisere alginat M-60 med innhold av 60 % mannuronsyre og M-100 med 100 % mannuronsyre. Monosakkaridsammensetningen til disse alginatene ble bestemt ved metanolyse, GC, og NMR og de ble også redusert for å bestemme ladningenes betydning. Det ble utviklet en metode for å fremstille så ren alginatoligomere som mulig, ved anvendelse av alginatlyase for å degradere alginatet og deretter fraksjonering av prøvene på ionebytterkolonnen. Fraksjonene ble videre analysert på HPLC, HPAEC-PAD og MS for å bestemme størrelsen til oligomerene. Ikke redusert- og redusert M-60 og M-100, alginatlyasebehandlet M-60, og i tillegg M-75 og M-94 ble videre testet for evne til å påvirke legumainaktivitet. To ulike forhold ble studert; Stimulering av makrofager (RAW 246.7-celler) i kultur eller direkte inkubering av prolegumain sammen med de ulike alginatprøvene for å undersøke deres evne til å stimulere autoaktivering av prolegumain.

Resultat: NMR-metode gav en mer nøyaktig bestemmelse av monosakkaridsammensetning til alginat i forhold til GC-metoden. Alginatdegraderingsprosessen ved behandling med alginatlyasen ble vellykket med i både buffer og vann, og vann ble derfor benyttet for å slippe å gjøre desalting. Ved direkte autoaktivering prolegumain gav de ubehandlede alginatene M-60, M-75, M-94 og M-100 øking i legumainaktiviteten. Alginat M-100 og M-94 gav mest stimulering av prolegumain autoaktivering med 7 ganger høyere legumainaktiviteten enn kontroll, mens M-60 gav 6 ganger høyere og M-75 gav 5 ganger høyere legumainaktivitet. Reduserte M-100 ga ingen stimulering av legumain autoaktivering, mens redusert M-60 og M-60 ikke fjernet borat gav 5 ganger høyere legumainaktivitet. Sammenlignet med kontrollen

gav lyasebehandlet M-60-fraksjoner B2 og C4 ingen effekt, mens fraksjon B3 gav 20 % høyere og fraksjon C5 gav 40 % høyere legumainaktivitet ved autoaktiveringsforsøk.

I celleforsøk gav ubehandlet alginat M-60 veldig varierende resultater. I to forsøk stimulerte den økning legumainaktivitet, men i et forsøk gjorde den ikke. M-75 og M-94 gav en hemmende effekt, der M-75 gav 50 % og M-94 gav 90 % lavere legumainaktivitet enn kontroll. M-100 gav ingen effekt. Reduserte M-60 og M-100 og de lyasebehandlede-M-60-fraksjonene gav en hemmende effekt av legumainaktivitet. Redusert M-100 gav 30 % mindre legumainaktivitet enn kontroll, men M-60 gav 50 % mindre aktivitet. Lyasebehandlet M-60-fraksjon gav 10-30 % lavere legumainaktivitet enn kontroll.

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Sammendrag.....	III
1 Introduksjon	1
1.1 Kostfiber	1
1.2 Kostfiber i sammenheng med tarmkreft	2
1.3 Alginat	3
1.4 Alginatlyaser til degradering av alginat.....	7
1.5 Tidlige studier om effekt av alginat i sammenheng med kreft	9
1.6 Makrofager.....	10
1.7 Legumain	11
2 Mål med oppgaven	14
3 EKSPERIMENTELL DEL	15
3.1 KJEMIKALIER OG REAGENSER	15
3.2 METODEOVERSIKT.....	17
3.3 GENERELLE METODER.....	19
3.3.1 Innveiing.....	19
3.3.2 Vann	19
3.3.3 Alginat	19
3.3.4 pH-justering	19
3.3.5 Oppløsning av alginate.....	19
3.3.6 Deteksjon av klorid	20
3.3.7 Frysetørking.....	20
3.4 KARAKTERISERING AV ALGINAT	20
3.4.1 Metanolyse.....	20
3.4.2 M-100 standardkurve for metanolyse.....	21
A. Bestemmelse av M-100 renhet, vektbasert	22
B. Standardkurven av M-100.....	22
3.4.3 Gass kromatografi (GC)	22
3.4.4 Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR)	23
3.5 TILLAGING AV ALGINAT- OLIGOSAKKARIDER.....	24
3.5.1 Degradering av alginat med alginatlyase.....	24

3.5.2	Ionebytterfraksjonering av lyasebehandlet M-60	26
	Prinsipp:	26
3.5.3	Fenol- svovelsyretest	30
3.5.4	Desalting av fraksjoner	31
3.6	BESTEMME INNHOLD AV LYASEBEHANDLET M-60-FRAKSJON	33
3.6.1	HPAEC-PAD	33
3.6.2	ESI-MS	35
3.7	KARBOKSYLSYREREDUKSJON	36
3.7.1	Fjerning av borat	37
3.7.2	Ionerbyttekarakterisering av M-60 og M-100 før og etter reduksjon	37
3.8	CELLEFORSØK.....	39
3.8.1	Celledyrking.....	39
3.8.2	Splitting av celler	39
3.8.3	Celletelling.....	40
3.8.4	Utsåing av celler.....	40
3.8.5	Stimulering med alginatprøver	40
3.8.6	Opsamling av kondisjonert medium og lysing av celler	40
3.9	MÅLING AV ENZYMAKTIVITET	41
3.9.1	Måling av totalprotein	41
3.9.2	Legumainassay i cellelysat	41
3.9.3	Legumainassay utenfor celler (autoaktivering)	42
4	Resultat.....	44
4.1	KARAKTERISERING AV ALGINATPRØVENE	44
4.1.1	Monosakkaridesammensetning	44
4.1.2	¹ H-NMR-analyse av M-60, M-75 og M-94.....	47
4.2	TILLAGING AV ALGINAT- OLIGOSAKKARIDER.....	48
4.2.1	Degradering av M-60 med alginatlyase	48
4.2.2	Ionebytterfraksjonering av M-60- oligosakkrider.....	51
4.3	KARBOKSYLSYREREDUKSJON	65
4.3.1	Ionebyttekarakterisering av redusert M-60 og - M-100.....	65
4.3.2	¹³ C-MNR-analyse av redusert M-60 og -M-10.....	67
4.4	EFFEKT AV ALGINAT PÅ AUTOAKTIVERING AV PROLEGUMAIN	68

4.4.1	Betydningen av alginats konsentrasjon og struktur ved autoaktivering av prolegumain.....	68
4.4.2	Betydningen av inkuberingstiden med alginat ved autoaktivering av prolegumain.....	69
4.4.3	Betydning av alginats ladninger ved autoaktivering av prolegumain	69
4.4.4	Betydning av alginats størrelse for autoaktivering av prolegumain.....	71
4.5	EFFEKT AV ALGINAT PÅ LEGUMAINAKTIVITET I RAW 264.7- CELLER..	72
4.5.1	Betydning av alginats konformasjon og ladning ved stimulering av RAW 264.7 celler.....	72
4.5.2	Betydning av alginats størrelse ved stimulering av RAW 264.7 celler.....	73
5	Diskusjon.....	75
5.1	KARAKTERISERING AV ALGINATPRØVENE	75
5.1.2	Monosakkaridesammensetning	75
5.2	TILLAGING AV ALGINAT- OLIGOSAKKARIDER.....	76
5.2.1	Degradering av M-60 med alginatlyase	76
5.2.2	Ionebytterfraksjonering av lyasebehandlet M-60	76
5.3	KARBOKSYLSYREREDUKSJON	77
5.3.1	Ionebytterkarakterisering av redusert M-60 og - M-100.....	77
5.4	AUTOAKTIVERING	78
5.4.1	Betydning av alginats konsentrasjon, struktur og inkuberingstid av alginat for autoaktivering av prolegumain	79
5.4.2	Betydning av ladningen på alginat for autoaktivering av prolegumain	80
5.4.3	Betydning av alginats størrelse for autoaktivering prolegumain	81
5.5	CELLEFORSØK.....	82
5.5.1	Betydning av alginatkonformasjon ved stimulering på RAW 264.7 celler.....	82
5.5.2	Betydning av alginatladning ved stimulering av RAW 264.7 celler	83
5.5.3	Betydning av alginatstørrelse ved stimulering på RAW 264.7 celler	83
6	Konklusjon	85
7	Veien videre	87
	Litteraturlist.....	88

Forkortelser

AEP	Asparaginyln endopeptidase
AC	Apoptotisk celle
APS	Ammoniumpersulfat
CCNFSDU	Codex Commission on Nutrition and Foods for Special Diet
CD200L	“C-type lectin Dectin-200 ligand”
CR3	Komplementreseptor 3
DEAE	Dietylamoetanol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
EDTA	Etylen-diamin-tetra-acetat
ECM	Ekstracellulær matriks
FBS	Føtalt bovint serum
FID	Flammeionisasjonsdetektor
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GAS6	”growth arrest specific gene” 6
GC	Gas chromatography
HCD	Høyere energikollisjonsdissosiering
HEK	Human embryonic kidney
HMG B1	Kromatin komponent
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography- Pulsed Amperometric Detection
HPLC	High pressure liquid chromatography
HSP	”heat-shock” proteiner
IC	immunkompleks med nukleinsyre
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Karbodiimid	1-sykloheksyl-3-(2-morfolino) karbodiimid-meto-p-toluensulfonat
MES	2- (N-morfolino) etansulfonsyre
MHC	Major histocompatibility complex
MMP	Matriksmetalloprotease
MS	Massespektroskopi
NaOAc	Natriumacetat
Na₂SO₄	Natriumsulfat
Na₂EDTA	Dinatrium-EDTA
NF-κB	“Nuclear factor kappa B“
PRS	Fosfatidylserin reseptor
RAGE	”receptor for advanced glycation product”
RI	Refraktiv indeks
RON	”Recepteur d'Origine nantis” reseptor
SR	”scavenger” reseptor
TGF	Transforming vekstfaktor
TLR	Toll-like reseptor
TMS	Trimetylsilyl
TRIZMA	Tris (hydroksymetyl) aminometan

1 Introduksjon

1.1 Kostfiber

Hva som er kostfiber, eller definisjonen til kostfiber er definert noe ulikt og det har vært behov for en harmonisert og mer detaljert definisjon av kostfiber. EU og Codex Commission on Nutrition and Foods for Special Diet (CCNFSDU) har foretatt sine definisjoner på hver sin måte. CCNFSDU definerte kostfiber med mest fokus på fysiologiske egenskaper ved de ulike fiberkomponentene, samt analysemetoder [1]. EU har en lignende definisjon, men i tillegg kreves det vitenskapelig dokumentasjon for den fordelaktige fysiologiske virkningen for både spiselige karbohydratpolymerer og syntetiske. Norske næringsdirektiv har definerte kostfiber med utgangspunkt i EUs definisjon, som en karbohydratpolymere med tre eller flere monomerenheter, som verken fordøyes eller absorberes i tynntarmen hos mennesker. Kostfiber som finnes i mat kan enten være naturlige eller syntetiske, men de må være fordøyelig eller og har vist fysiologiske effekter til fordel for helse.

Kostfiber er samlebetegnelse for en kompleks blanding av stoffer med ulike kjemiske og fysiske egenskaper, som har ulike typer fysiologiske effekter. De kan inndeles i uløselige fibergrupper som inngår i plantecelleveggen, eller vannløselige fibre som komponenter finnes mye i frukt og grønnsaker [2, 3]. Mange studier har vist at ved høyt inntak av naturlige kostfiber kan bringe frem viktige fysiologiske positive effekter, for eksempel:

- forbedringer i gastrointestinal sykdom
- forbedringer i glukosetoleranse og insulinresponsen
- reduksjon av hyperlipidemi, hypertensjon og hjerte-kar sykdom
- reduksjon i risikoen for å utvikle enkelte kreftformer, feks. tykktarm- og endetarmskreft
- økt metthetsfølelse og dermed en viss grad av vektkontroll

Disse gunstige effektene av kostfiber er basert på resultatene av mange studier, som ble gjort på ulike typer fiber som finnes i kostholdet, og komponenter som finnes i disse fibre [2, 4, 5].

Inntak av kostfiber i dag er vesentlig forandret i forhold til 200 år siden. Nedgang av kostfiber inntak er blant årsakene som kan være medvirkende til økende forekomst av sykdommer som

diabetes, hjerte-kar sykdommer og kreft i den vestlige verden. Norske helsemyndigheten har gitt en kostholds anbefaling for fiber inntak på 25-35 gram hver dag [6].

1.2 Kostfiber i sammenheng med tarmkreft

Forskningen på kostfiber i sammenheng med kreft begynte på 1970-tallet, da Burkitt la fram en hypotese som fremhever at et høyt inntak av kostfiber kan forhindre tarmkreft [7]. Denne hypotesen er basert på hans observasjon, der den afrikanske befolkning viser lavere insidens av tykktarmskreft i sammenlignet med den vestlige befolkningen. Burkitt mente at den lavere insidensen skyldes miljøfaktorer heller enn genetiske faktorer. Kostholdet i den vestlige verden inneholder mindre kostfiber i sammenlignet med mindre utviklede steder i Afrika

Etter Burkitts tiden ble det gjort mange studier relatert til kostfiber og relasjonens til tykktarms- og endetarmskreft. I 2003 ble det publisert en studie basert på spørreundersøkelser om kosthold med deltakere fra 10 europeiske land, som ble fulgt opp i flere år med tanke på tykktarms- og endetarmskreft. Det viste seg at fare for å utvikle tykktarms- og endetarmskreft var redusert med 40 % ved fordoblet inntak av kostfiber [8]. I et annet observasjonsstudium vises at de som hadde høyest fiberinntak hadde 27 % lavere insidens for tarmpolypper enn de med lavest fiberinntak, og særlig fiber fra fullkorn og frukt hadde positiv effekt [9]. Det ble også gjort en større sammenslutnings analyse, en tvers-studie som inkludert flere kohort studier med lang oppfølging i 6-20 år. Den inneholder en sammenligning mellom studiene om høyest og lavest kostfiberinntak, og kjønn spesifikke forskjeller ved kostfiberinntak. Uansett gav resultatet ikke noe mer konkludert svar [10]. Med flere andre krevende oppfølgings studier gav det igjen ingen signifikant konklusjon om relasjonen mellom kostfiber og tykktarms- og endetarmskreft. Siden studiene som regel er kohort- og epidemiologiske er det derfor vanskelig å bevise at alle kriterier er fulgt. Samtidig er beregningsmetodene for kostfiberinntak veldig varende fra studie til studie. Det blir også vanskelig å sammenligne studiene når det er variasjoner i mengden kostfiber og hvilke fibre som skal inntas, siden kostfiber er en svært heterogen gruppe substanser med tanke på biologisk aktivitet.

Noen diskusjoner om fiber effekt antas at ved minskning av fiberinntak fører det til økt forbrukt av raffinerte karbohydrater, dermed reduseres tarmaktivitet, transittid, fekal vekt, og konsistens i tarmen. Avføring blir mer konsentrert og oppholder seg lenger i tarmen slik at

bakterier i tarmen øker i antall og fører til mer degradering av gallsalter. Dette kan bidra til økt dannelse av karsinogener, og dermed økt faren for tumor i tykktarmen [11]. En annen studie påviser at kostfiber blir brutt ned av tykktarmens bakterier og det fremmer produksjon av noen typer gasser, kort kjedede fettsyrer som butyrat, propionat og acetat. Disse fettsyrekjedene senker p-verdien i tarmen, noe som er fordelaktig med tanke på å hemme vekst av patogene bakterier, og dette antas å være positivt for økt næringsopptak og blodtilførsel til celler i tarmveggen. Dette gjelder spesielt butyrat [12], som i tillegg har vist seg å inducere apoptose, hemmer proliferasjon av kreftceller og fremmer proliferasjon av friske celler, dermed kan den være viktig for å forhindre utvikling av kreft [13].

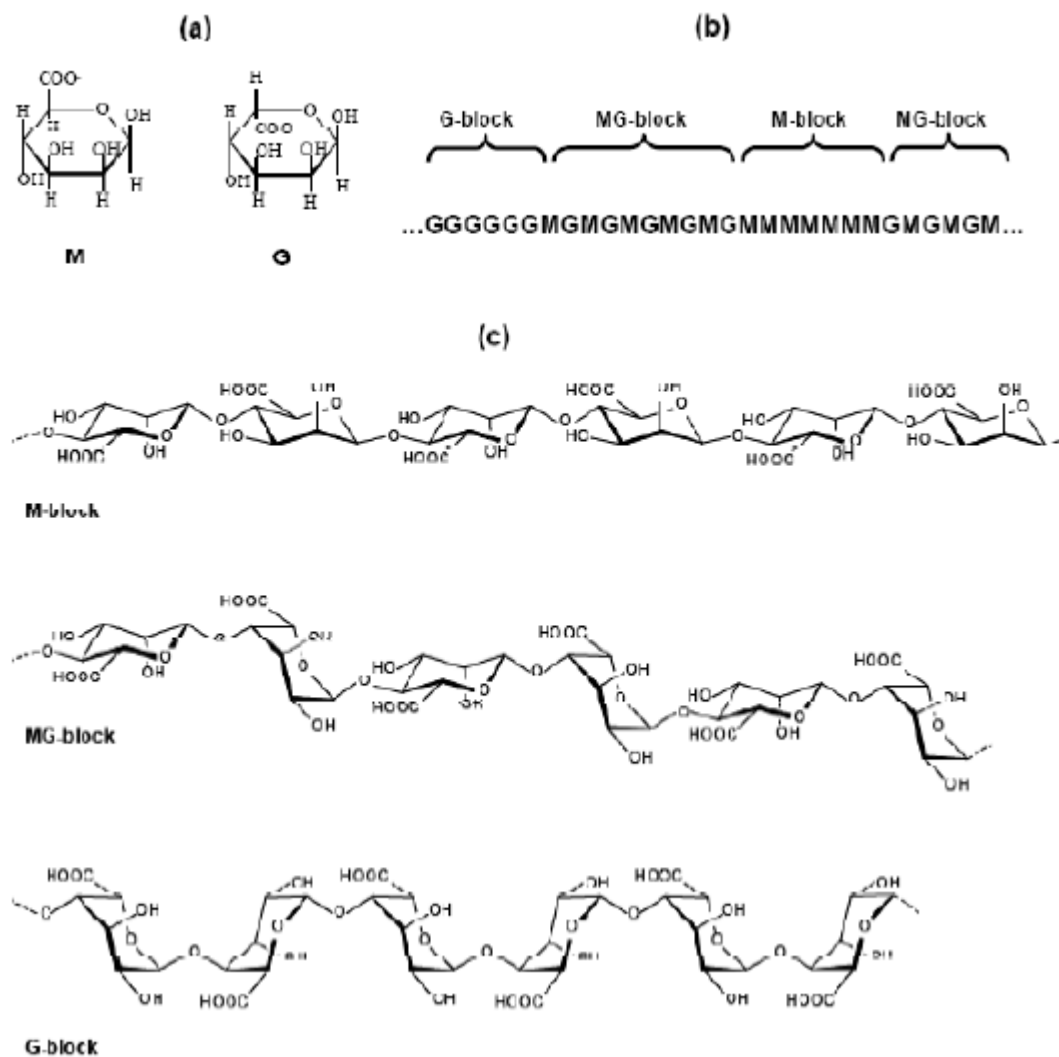
Tykktarms- og endetarmskreft er ikke bare en av de vanligste kreftformene på verdensbasis, men også den hyppigste kreftformen i Norge. Dette er en stor bekymring for det norske helsevesenet, siden kreftformens insidensrate viser en markant økning for begge kjønn i de siste 50 årene. Dette er faktisk høyere enn det som er observert i andre nordiske land, og derfor blir Norge rangert som det landet i Europa med høyest forekomst og dødelighet for denne kreftformen [3]. Årsakene til økningen i forekomster er stort sett ukjent men trolig sterkt knyttet til livstil, inkludert kostholdet.

1.3 Alginat

Alginat er en lang karbohydratpolymer som har vært mye forsket på i en årrekke pga. deres kjemiske og biologiske egenskaper. I dag er alginater etablert som en av de mest anvendbare Biopolymer til industriell forbruk. De blir mye brukt i tekstilbransjen som tekstiltrykk, i matindustrien som fortykningsmiddel, og innen farmasøytiske applikasjoner [14]. Det har vært en merkbar økning i antall alginatapplikasjoner de siste årene, mest bemerkelsesverdig er anvendelsen i den biomedisinske terapien [15-18].

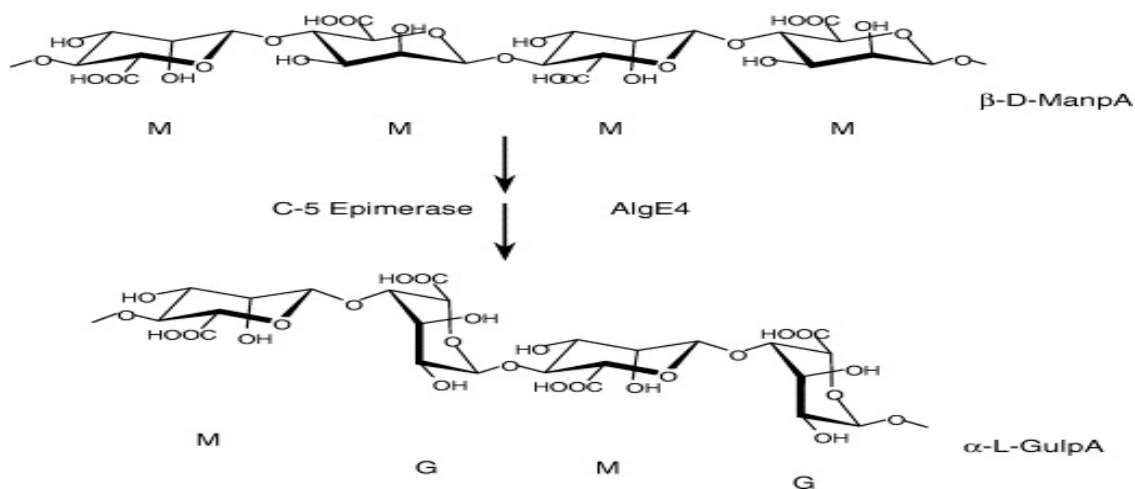
Alginat er lineære kopolymere bestående av α -L-guluronsyre (G) og β -D-mannuronsyre (M) monomere som er bundet til hverandre ved (1 \rightarrow 4) glykosidbindinger. Det uforgreinte polysakkaridet kan bli dannet av kontinuerlige M-blokk, G-blokk eller vekslende MG-blokker [19]. Konformasjon til disse blokkene er forskjellig på grunn av at sammensetningen og sekvensene av monomeren varierer, noe som gir resulterende polymeren med forskjellige kjemiske og biologiske egenskaper [20]. M-blokker er en homopolyme med kopling av mannuronsyre-enheter i ekvatoriale bindinger som resulterer i en flat kjedekonformasjon. I

G-blokker er guluronsyre bundet aksialt. Dette gir strukturen ”kløfter” som har mest betydning for gelsdanning på grunn av evner til kompleksbinding med ioner. MG-blokker er en sammensatt av vekslende aksialt-ekvatoriale og ekvatoriale-aksiale glykosidbindinger som gir polymerkjedens fleksibilitet [14]. pKa-verdiene til M og G er henholdsvis 3,38 og 3,65 noe som gjør polymeren negativt ladet ved fysiologisk pH [21].



Figur 1.1: Alginatstruktur. (a) Haworth formel for M = β -D-mannuronsyre og G = α -L-guluronsyre. (b) Komposisjon av G-, M- og MG-blokker. (c) M-, G- og MG-blokker. M-blokker har en flat struktur på grunn av diekvatoriale bindinger mellom monomerene. G-blokker er bundet sammen via diaksiale bindinger, noe som gir en "eggeboks-struktur" hvor divalente kationer kan binde og danne gel. Alternierende sekvenser er også vist å binde divalente ioner. Figur hentet fra [22].

Biosyntese av alginat ble første gang studert av Lin og Hassid, Hellebust og Haug, Madgwick et al. Det ble først vist at alginat ble dannet som en homopolymer kun bestående av β -D-mannuronate (M). Senere ble det oppdaget en C-5 epimerisering, som er en konformasjonsendring i C-5, slik at M blir til G. Endringen skjer fra en mannuronsyre 4C_1 -konformasjon til en guluronsyre 1C_4 -konformasjon [23-27] vist i Figur 1.1. Det finnes epimerase som katalyserer M-blokker til G-blokker, feks. C-5 epimerase AlgE6, epimerase som kan konvertere M-blokk til vekslende MG-blokk er C-5 epimerase AlgE4, vist i Figur 1.2 [28, 29].



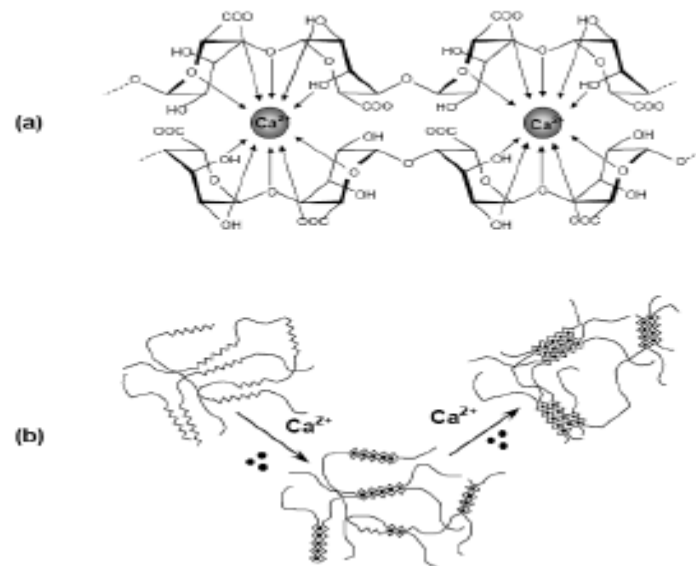
Figur 1.2. Epimerisering av M-blokk til MG-blokk ved katalysering av AlgE4[25]

Kommersiell utnyttelse av alginat er hovedsakelig relatert til alginats gelings evne. Alginat har en effektiv evne til å binde toverdige kationer til å danne hydrogel, for eksempel Ca^{2+} , Sr^{2+} og Ba^{2+} , der Ca^{2+} er mest brukte kation til å indusere gelsdannelse av alginat [30].

Tendensen til geldannelse er sterkt avhengig av alginats sammensetning, antall G-blokker i polymer og typer kation. Kryssbinding av divalente ioner kan skje hos G-, M- og MG-blokker men G-blokk viser å gi sterkest gel [31].

Alginats gel er bygget opp av et nettverk av chelat-bindinger av molekyler som omtales som en såkalt "egg-boks"-modell, som er vist i Figur 1.3. G-sekvensene i polysakkaridkjeden blir regnet som den viktigste strukturelle hydrogeldannelsen, på grunn av sin spiralformede kjede som egner seg til å binde toverdige ioner med andre G-sekvenser. To motstående spiralformede kjeder av G-sekvenser binder seg diaksial med hverandre, slik at de kan akkumulere de divalente ionene. M- og MG-blokker danner gel ved diekvatorial og ekvatorial-aksial binding, som gir konformasjonen mindre evner til å fange inn ioner. Viktigst

for gelsdannelse er karboksylsyregruppene med negative ladninger, men også hydroksylgruppene og glykosidbindingene i G-blokkene. Innholdet av G-enheter og lengden på sekvensene har betydning for geling og gelstyrken. Temperatur og pH er fysiske faktorer som spiller en viktig rolle for gel danning [30].



Figur 1. 3. Binding av divalente ioner (Ca^{2+}) til alginat – eggeboksmodellen. (a) Koordinering av Ca^{2+} til bindingssteder hos G-blokker. (b) Dannelse av gel nettverk ved assosiasjon av alginatkjeder [22].

Alginat er hovedsakelig syntetisert av brunalger som spesielt norskekysten er naturlig rik på. Syntetisering kommer også fra bakterier, f.eks. *Azotobacter* og *Pseudomonas* [19, 32, 33]. Det er påvist litt forskjell av alginat fra *Pseudomonas* i forhold til andre kilder ved at den er helt fri for G-blokk. Sammenhengen mellom alginatets struktur, altså fordelingen og mengden av blokker som MM, GG og MG, og dets funksjon, viser seg å være forskjellig fra art til art. Derfor kan det være nødvendig å bestemme alginatets egenskap før utnyttelse. Dette kan gjøres ved å bestemme deres viskositet, polymekjedets lengde, M- og G-blokk fordelingsmønsteret, acetyleringsgrad og monomere sammensetninger [34].

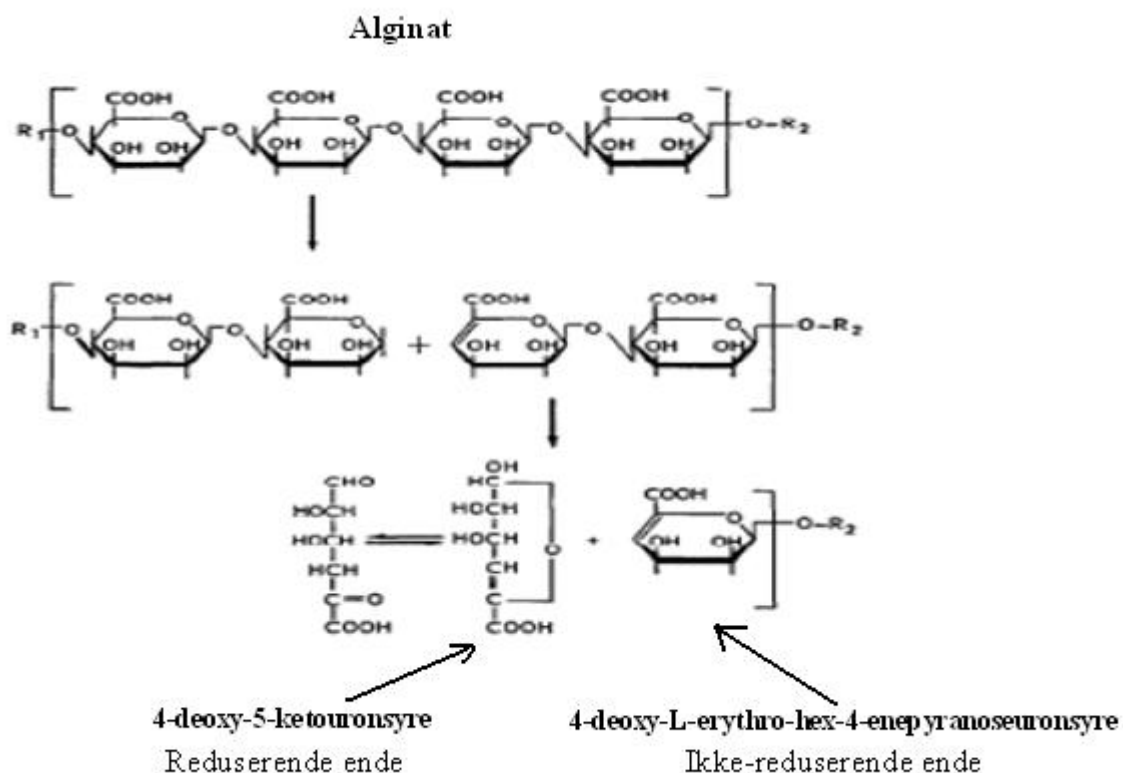
Alginat som er mye brukt i den vestlige verden i dag har typiske egenskaper knyttet til stabiliserende, viskositetsdannende og gelsdannelse. Innen farmasi har alginat flere anvendelsesområder. Den ble brukt som matriks for innkapsling av medisin, matriks for kontrollfrisetting av legemidler, sårhelings plaster, anti-refluks terapi feks. Gaviscon (R), og

spesielt i biomedisin ved transplantasjon og celleterapi [15, 16, 18, 35]. I den celleterapi blir alginats gelsevne utnyttet til immobilisering av levende celler som videre kan transplanteres *in vivo*, til behandling av f.eks. diabetes, skjoldbruskkjertel sykdom [36]. Her virker alginat som en selektiv barriere for å beskytte transplanterte celler fra vertens immunsystem.

1.4 Alginatlyaser til degradering av alginat

Alginat lyaser ble først beskrevet av Preiss og Ashwell, som en polysakkaridlyase med egenskap til å depolymerisere alginat via en β -eliminerasjonsreaksjon [37, 38], siden da har det blitt funnet alginat lyaseaktivitet i en rekke organismer, både bakterier og høyere marine organismer [39]. Enzymet karakteriserer som enten en mannuronsyre-lyase (M-lyase) (EC 4.2.2.3) eller guluronsyre-lyase (G-lyase) (EC 4.2.2.11) og katalyserer en β -elimineringssreaksjon der alginatkjeden brytes og danner en umettet 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enepyranooseuronsyre på den ikke-reduserende enden, som kan absorbere UV-lys ved 230nm [40]. Når kjedene brytes helt ned til monomerer dannes det monosakkaridet 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseuloseuronsyre (også kjent som 4-deoxy-5-ketouronsyre), se Figur 1.4 [38]. Dette produktet dannes både fra M og G, og det er derfor ikke mulig å identifisere hvilken uronsyre sluttproduktet stammer fra.

Mange alginatlyaser er substratspesifikke, og kutter kun glykosidbindinger mellom to bestemte monomere, som M-M eller G-G, men det finnes også alginat lyaser som kan kutte flere ulike glykosidbindinger [39, 41, 42]. Dermed blir ulike alginat lyaser definert ut i fra sin preferanse for glykosidbindingen mellom de ulike monomerne. F.eks. har GG-lyase en større evne til å bryte bindinger mellom G-G og G-M enn mellom M-enheter. Tilsvarende har M-lyase større evne til å bryte bindinger mellom M-M og M-G enn mellom G-enheter [43].



Figur 1.4. Enzymatisk degradering av alginat til monomeren 4-deoxy-5-ketouronsyre på den reduserende ende og umettet 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranoseuronsyre på den ikke-reduserende enden. En β -eliminajonsreaksjon av β -(1 \rightarrow 4)-polyguluronsyre [38].

Om ekstracellulære lyaser kan bryte alginatet helt ned til monomere eller til korte oligomere med flere uronsyrer er fortsatt usikkert. Noen studier tyder på at endeproduktene fra alginat lyaser er en blanding av korte oligomere med ulik lengde [39, 44] men det har også blitt vist at alginat lyaser kan bryte alginatkjeder helt ned til umettede monomere [38]. Mest sannsynlig vil dette variere fra lyaser til lyaser, avhengig av hvilken organisme de er syntetisert fra, da ulike lyaser vil kutte alginatkjeden forskjellig og produsere ulike endeprodukter [39, 44]

Behandling av alginat med spesifikke alginatlyaser, kan være en mulig metode for å studere alginatstrukturen, og for å finne ut om oligomere som blir dannet etter degradering inneholder M-, G- eller MG-blokk i sine polymerkjeder. Umettet 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranoseuronsyre som dannes av alginat etter alginatlyasebehandling har vist å gi biologisk effekt. Disse biologiske aktivitetene inkluderer suppresjon av fibroblast spredning og kollagen syntese i huden [45], stimulering av endotelcellevekst og migrasjon [46],

stimulering av humane keratinocyte vekst [47], hemmer Th2-utvikling og IgE sekresjon gjennom å indusere IL-12 sekresjon [48].

1.5 Tidlige studier om effekt av alginat i sammenheng med kreft

Det har blitt gjennomført mange studier av alginat, og det har vært påvist effekt i flere biologiske aktiveringer. I en studie om effekt av alginat på stimulering av makrofag cellelinjen (RAW 264.7), ble det funnet at alginat kan forårsake inflammasjon gjennom NF- κ B signalisering. Dette fører til produksjon av proinflammatoriske cytokiner som IL-1 β , IL-6, IL-12 og TNF- α [49]. Denne stimulasjonens effekt øker ved innholdet av M-enheter og molekylstørrelse [50]. Alginat har også vært rapportert å ha antitumor aktivitet på sarkoma 180-cellelinjen *in vivo*. Mus ble injisert med sarkoma i bukhulen, og alginat fra fem forskjellige brunalger med ulikt innhold av M-, G-enheter, men omtrent samme molekylvekt ble testet for antitumoreffekt. Det viser seg at antitumoreffekt av alginat øker med innholdet av M-blokker [51]. I en studie ble det funnet at alginat etter degradering av alginatlyase, induserer aktivt cytokin produksjon, mens udegradert alginat og alginat som ble syrehydrolysert ikke gav samme effekt. Det var spesielt guluron-oktamer (G8) og mannuron-heptamer (M7) som gav mest aktivitet. Dobbelbindingene mellom C4 og C5 som ble dannet etter alginat lyasebehandling kan trolig førte til denne effekten [52]. Det ble foreslått at alginat kan aktivere celler ved å binde seg til Toll-like reseptorer TLR-2 og TLR4 som induserer produksjon av TNF- α . Antistoffer mot disse reseptorene hemmes effektivt av G8- og M7 [53]. Men en ulempe med dette er at LPS også er en stimulerings faktor for TNF- α ved interagering med TLR [54].

Resultater fra en tidligere masteroppgave viser at alginat M-60 med innhold av 60% mannuronsyre og M-100 med innhold av 100% mannuronsyre hadde en stimulerende effekt på legumain både ved direkte autoaktivering av prolegumain og i celleforsøk på RAW 264.7-celler [55]. Men ettersom alginatene ble redusert eller behandlet med alginatlyase gav prøvene mindre legumainaktivitet i sammenlignet med ubehandlet alginatene. Ved celleforsøk for å finne ut av maktrixmetalloprotease (MMP) – produksjon som er viktige mediatorene for degradering av ekstracellulær matriks (ECM), ble ulike alginatprøvene stimulert på RAW 264.7-celler. Det ble observert at M-60 og lyasebehandlede M-60 prøvene gav mest utskillelse av MMP-9, mens M-100 gav minst MMP-9 produksjon.

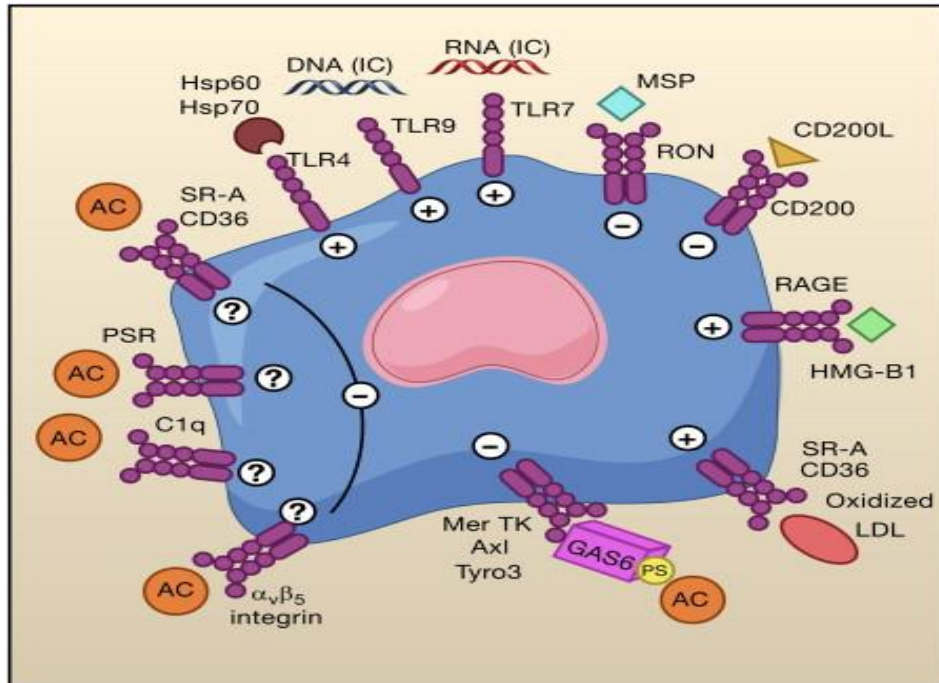
Det er svært interessant å finne ut mer om fordøyelses prosess til alginat i tarmen, slik at polymerens effekt i relasjon til tykktarms- og endetarmskreft kan bli bedre forstått. Alginat er en løselig kostfiber derfor den vil sannsynligvis ikke tas opp gjennom tarmveggen men fermenteres i tykktarmen. Men denne teorien er fortsatt usikkert. Relatert til studier om beta - (1,3)-glukaner, som er også en løselig kostfiber ble det indikasjon på at den kan tas opp fra Peyerske plakker i tynntarmen, med mikrofoldseller (M-celler) som er assosiert med immunceller B-celler, T-celler og dendrittiske celler [56] . Disse cellene har egne reseptorer for makromolekyler som fører til transportert av makromolekyler inn i Peyerske plakker slik at en immunrespons settes i gang. I tillegg kan mindre polysakkaridet også ta opp i makrofager og fraktes med lymfesystemet til lymfatiske organer [57]. Det gjenstår å finne ut om tas opp via de Peyerske plakkene.

1.6 Makrofager

Både alginat med lange polymerkjeder og alginat-oligomer med lav molekylvekt har i mange studier vist biologisk aktivitet (innledning 1.5). I henhold til celleforsøk, vil alginats stimulering av TNF α sannsynligvis via TLR2 og TLR4 på makrofager, hemme Th2-utvikling og IgE sekresjon gjennom å inducere IL-12 sekresjon, det påvist også alginats stimulering av vekst og migrasjon i endotelceller (innledning 1.4-1.5). Det har vært omtalt at reseptorer på makrofagers overflate kan gjenkjenne alginat og skape en immunrespons. Forklaringen til effekt av alginat kan derfor være en alginat-reseptors interaksjon, der mekanismen starter med at alginat blir bundet til en eller flere typer reseptorer på makrofagoverflaten og stimulerer celler. I oppgaven ble effekt av alginat studert med fokus på makrofager (RAW-celler) for å få klarhet i legumainaktivitet. Derfor er det mer interessant for oss å se nærmere på mulige reseptorer som kan være target.

Reseptor på makrofagceller er delt i to hovedgrupper, antistoffer opsonin som er fagocytose styrkende komponenter og forsterker fagocytose, og ikke-opsonin som ikke har noe med fagocytose eller celleadhesjon å gjøre. Figur 1.5 viser noen av makrofagreseptorene som er funnet og vært mye studert, spesielt deres egenskap til cellostimulering. De er ”scavenger” reseptor (SR), ”Toll-like” reseptor (TLR), komplementreseptor 3 (CR3), ”vitronectin” reseptor (VnR, $\alpha_v\beta_5$ intergin), ”receptor for advanced glycation products ” (RAGE), fosfatidylserin reseptor (PSR), og noen andre reseptorer som ikke er vist på bildet er β 2-glykoprotein- I, ”CD91-calreticulin” reseptor kompleks. Noen av dem er vist å være

målmolekyl for visse kostfibre, f.eks. beta-glukan binder til CR3, TLR- 2 og 6 og C-type lectin Dectin-1” reseptorer og forårsaker TNF α -frisetting [58]. Det er mulig at alginat også kan muligens stimulere celler via disse reseptorene.



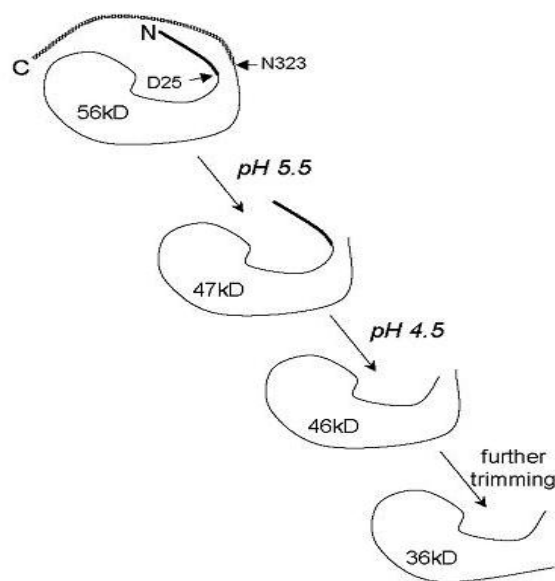
Figur 1.5. Endogent ligander og deres interaksjon med makrofagreseptorer ved stimulering av inflammasjon. Reseptor-ligand interaksjoner: De som fremmer makrofagaktivering er merket med (+), men de som er involvert i resolusjon av inflammasjon er kjent med (-). AC = apoptotisk celle; IC = immunkompleks med nukleinsyre, SR = ”scavenger” reseptor; TLR = Toll-like reseptor; HSP = ”heat-shock” proteiner; RON = ”recepteur d’Origine nantis” ; CD200L = ”C-type lectin Dectin-200 ligand”; HMG-B1 = kromatin komponent; RAGE = ”receptor for advanced glycation products”; PRS = fosfatidylserin reseptor; GAS6 = ”growth arrest specific gene” 6, $\alpha_v\beta_5$ intergin = ”vitronectin” reseptor [59].

1.7 Legumain

Legumain er et proteolytisk enzym som tilhører cystein endopeptidase C13 familien. Enzymet kutter spesifikt C-terminalt for aminosyren asparagin og derfor kalles det også for asparaginyln endopeptidase (AEP) [60]. Det er vist å være høyt uttrykk av enzymet i tumor ved mange typer kreft, inkludert tykktarmskreft [61].

Legumain er syntetisert som et inaktiv preproprotein som inneholder 433 aminosyrer [62], og det må skje en autoaktivering for at proenzymet kan bli aktivt. Prosessen starter med spalting av C-terminalen rett etter asparagin 323 (Asn-323), og deretter spaltning av N-terminalen rett etter asparaginsyre 25 (Asp-25). Figur 1.6 viser en skisse over autoaktivering og prosessering av prolegumain. Molekylstørrelsen blir redusert fra 56 kDa til 47/46 kDa og tilslutt 46/36 kDa. Den vanlig observerte aktive formen for legumain som dannes under direkte autoaktivering av prolegumain er på 46 kDa, men ved *in vivo* ville man istedet fått en aktivt form på 36 kDa. Dette kommer av at den endelige prosesseringen som vil skje *in vivo* er avhengig av andre lysosomale enzymer som feks. cathepsiner [63]. Det er spaltningen ved pH under 5 som gjør at legumain blir aktivt. Legumain- autoaktivering prosessen er fremdeles mye diskutert, og forsket på. Det er vist at *in vitro* autoaktivering akselerert ved pH 4 [63, 64]. Siden det kan tenkes at pH-miljøet er ganske likt med pH i endosomale/ lysosomale vesikler der autoaktivering til prolegumain foregår *in vivo*.

Legumain er uttrykt både intracellulært, spesielt i lysosomer, og på celleoverflaten til kreftceller og kreftassosierte endotelceller hvor det er kolokalisert med intergriner [64].



Figur 1.6. Autoaktivering og prosessering av prolegumain [60, 63]

Enzymet har vist seg å ha en rekke biologiske funksjoner. Det antas at celler som uttrykker mye legumain på overflaten har invasive og metastaserende egenskaper da legumain prosesserer cathepsin L, en av de protease som er relasjon til kreftutvikling, og legumain

aktiverer proMMP-2, en av de viktige mediatorene for degradering av ekstracellulær matriks (ECM) [60, 65]. Intracellulært bidrar legumain blant annet til prosessering av endogene proteiner og bakterielle peptider for MHC klasse II-presentasjon[66]. Det mikrobielle antigenet tetanustoksin er et eksempel på antigen som blir prosessert til peptider av legumain og kompleksbinder med MHC klass II [67]. Legumain har også vist seg å være involverte i inhibering av osteoklastdifferensiering og benresorpsjon [68, 69].

I en *in vivo*- undersøkelse på mus som mangler legumain viste det seg at legumainmangelen førte til forstørrelse av lysosomene i nyrecellene, da den normale prosesseringen av proteiner ikke fant sted og proteiner ble akkumulert i lysosomene. Disse musene gikk også betydelig ned i vekt. Denne observasjon bidrar til å bekrefte at legumain spiller en viktig rolle for lysosomal degradering av proteiner [64].

2 Mål med oppgaven

Denne oppgaven er en fortsettelse av et tidligere Masterprosjekt [55] og et pågående Ph.d prosjekt (Lise Berven). Resultatene som er funnet fra den tidligere masteroppgaven som er nevnt i 1.5, viste effekt av alginat på legumainaktivitet på *in vitro* både autoaktivering og celleforsøk. I celleforsøk ble det utført på cellelinje RAW 264.7, og legumainaktivitet ble bestemt i cellelysate etter stimulering med alginatprøvene. Resultatene som er funnet ble bare vist en gang, derfor er det viktig å gjøre videre eksperimenter for å verifisere resultatene. Denne gangen blir i tillegg alginater M-75 og M-94 testet på både autoaktivering og celleforsøk.

Sentrale årsaker til alginats effekt på legumainaktiviteten er fortsatt uvisse. Målet med denne oppgaven er akkurat det å studere effekt av alginat på alginatstimulerte celler i sammenligning med effekt av alginat ved direkte prolegumain autoaktivering. Sammensetningen til alginat skal først nøye studeres, og videre testes på celler (RAW 264.7 makrofager) og direkte på prolegumain autoaktivering.

Mål for oppgaven:

- Karakterisere alginat m.h.p. sammensetning og ladning
- Isolering av rene fraksjoner med hensyn på molekylvekt (oligomere)
- Studere struktur-aktivitetsforhold av alginats evne til stimulering av prolegumain autoaktivering med hensyn på betydningen av alginats konsentrasjon, molekylstørrelse, sammensetning, ladning og inkuberingstid med alginat.
- Å bestemme hvilken betydning molekylstørrelsen, sammensetning og ladning av alginat har for evne til å påvirke RAW 264.7- cellenes aktivitet til legumain.

3 EKSPERIMENTELL DEL

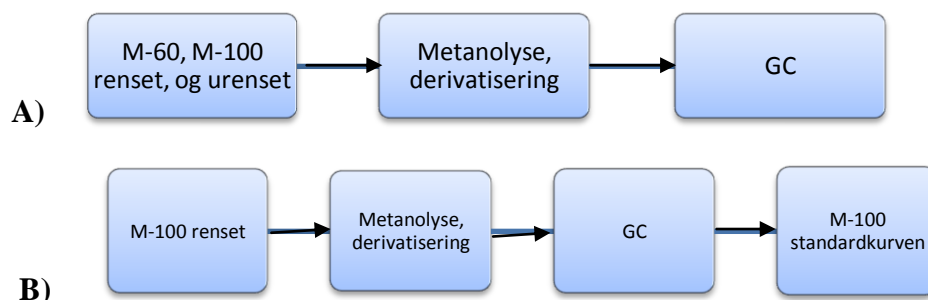
3.1 KJEMIKALIER OG REAGENSER

Kjemikalie	Produsent
3-[(3-Kolanidopropyl) dimetylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich
Alginat lyase (EC 4.2.2.3 fra <i>Flavobacterium</i> sp.)	Sigma-Aldrich
Benzylloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin (Z-Ala-Ala-Asn-AMC)	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
Bovint serum albumin	Thermo Scientific
Coomassieblå	Bio- Rad
Di-natrium EDTA (Na ₂ EDTA)	FERAK LABORET GMBH
Di-natriumhydrogenfosfatdihydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
D-mannitol	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle medium *1) medium	Invitrogen
DMSO (Dimetylsulfoksid)	Sigma-Aldrich
Eddiksyre (100%)	Merck
Etanol	Arcus
Fenol	Merck
Føtalt kalveserum (FBS)	PAA Laboratories
Glyserol	Merck
Glysin	VWR international
Heksan	Sigma-Aldrich
Human Legumain Affinity Purified Polyclonal Ab, Goat IgG, AF2199	R&D system
Karbodiimid (1-sykloheksyl-3-(2-morfolino) karbodiimid-meto-p-toluen sulfonat)	Sigma-Aldrich
MES (2-(N-morfolino) etansulfonsyre)	Sigma-Aldrich
Metanol	Merck
Metanolisk HCl 3M	Supelco analytical
M-60	Sigma-Aldrich, isoert fra brunalger (ikke spesifikk hvilke arter)
M-75	Institutt for bioteknologi, NTNU, Trondheim. Isolert fra fruktlegemer til <i>Ascophyllum nodosum</i> (grisetang)
M-94	Institutt for bioteknologi, NTNU, Trondheim. Isolert fra en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

M-100	Institutt for bioteknologi, NTNU, Trondheim. Isolert fra en epimerase-negativ AlgG minus- mutant av <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenfosfatmonohydrat	Merck
Natriumhydroksid (NaOH)	BDH AnalaR®
Natriumklorid (NaCl)	AnalaR® Normapur
Natriumsulfat	NMD
Oktanol	BDH Chemicals Ltd
PBS (Phosphate-buffered saline)	Invitrogen
Penicillin (100 U/ml) - Streptomycin (100 µg/mL)	Sigma-Aldrich
Pyridin	Merck
Rekombinant human legumain	R&D
Saltsyre (HCl)	Prolabo
Sølvnitrat	Merck
Svovelsyre	Merck
Tris (hydroksymetyl aminometan)	AnalaR NormaPur
Tris (hydroksymetyl aminometan)	Pharmacia Biotech

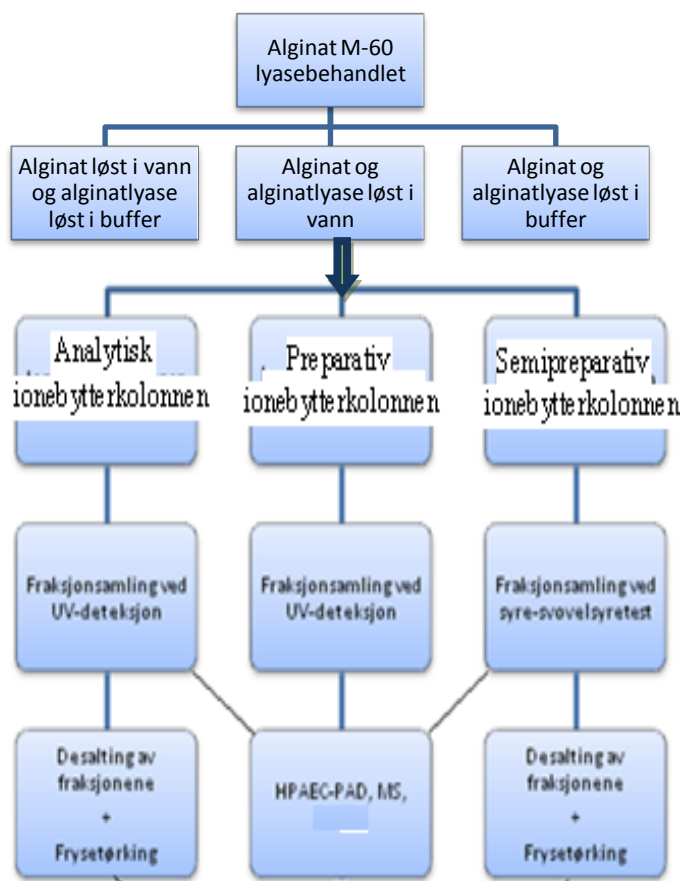
3.2 METODEOVERSIKT

- **Karakterisering av alginat**



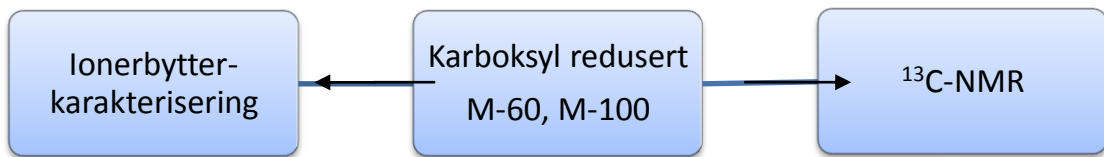
Figur 3.1: Metode-modell til bestemmelse av monosakkaridsammensetning av alginat **A)** og tillaging av M-100 standardkurven **B)**

- **Tillaging av alginat-oligosakkarider**



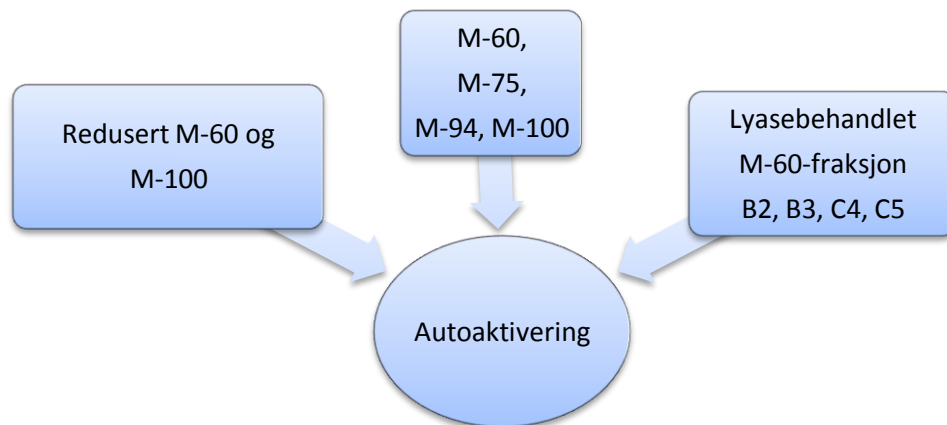
Figur 3.2: Fremstilling av alginat-oligomer. M-60 ble degradert med alginatlyase og videre fraksjonert på ionbytterkolonnene og deretter analyse på HPAEC-PAD og MS.

- **Karboksylderuksjon**



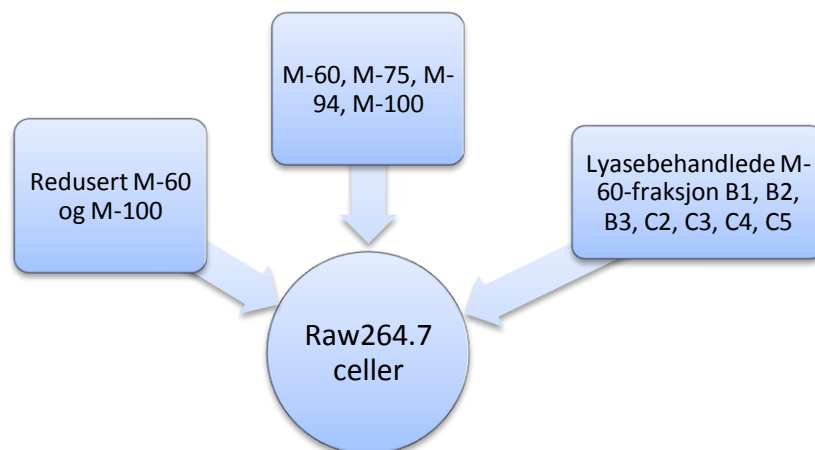
Figur 3.3: Reduserte M-60, M-100 renses og blir analysert på ionerbytterkolonnen og ¹³C-NMR

- **Autoaktivering og celleforsøk**



Figur 3.4: Ubehandlet M-60, M-75, M-95, M-100, reduserte M-60, M-100, og lyasebehandlet M-60-fraksjon B2, B3, C4, C5 ble teste på autoaktivering

- **Celleforsøk**



Figur 3.5: Ubehandlet M-60, M-75, M-95, M-100, reduserte M-60, M-100, og lyasebehandlet M-60-fraksjon B1, B2, B3, C3, C4, C5 ble stimulert på RAW264.7 celler for måling av legumainaktivitet.

3.3 GENERELLE METODER

3.3.1 Innveiing

Til innveiing av stoff ble det brukt Sartorius analysevekt og en Mettler overskålsvekt.

3.3.2 Vann

Vannet som ble brukt i forsøkene er destillert vann.

3.3.3 Alginat

I denne oppgaven anvendes det 4 type alginater: M-60, M-75, M-94, og M-100 rensset og urensset. M-60 inneholder 60 % av mannuronsyre, M-75 inneholder 75 % mannuronsyre, M-94 inneholder 94 % av mannuronsyre og M-100 inneholder 100 % mannuronsyre. M-60 som er kjøpt fra Sigma som utvinnes fra brunalger. De andre alginatene er laget fra professor Gudmund Skjåk-Bræk ved NTNU, Trondheim. Han har isolert M-75 fra fruktlegemer til *Ascophyllum nodosum* (grisetang), M-94 fra *Pseudomonas Aeruginosa* og M-100 fra en epimerase-negativ AlgG minus-mutant av *Pseudomonas fluorescens*.

3.3.4 pH-justering

pH-meter (Mettler Toledo, Seven Easy) ble brukt til å justere pH. Kalibrering av pH-meteret ble brukt var pH-buffer 4 og 7 (Hamilton Duracal Buffer, Hamilton Bonanduz AG Switzerland).

3.3.5 Oppløsning av alginat

Alginat blir fuktet først med etanol slik at overflaten til stoffet blir større, og dermed løses lettere i vann eller i vandige løsningen som er egnet til forsøket. Alginat ble løst ved omrysting, men uten oppvarming.

3.3.6 Deteksjon av klorid

Reagenser:

- Vandig løsning av AgNO_3 (sølvnitrat)

Dette er en metode som blir brukt til å detektere om klorid finnes i løsning. Reagens AgNO_3 blir dryppet i prøven slik at hvis det er NaCl i prøven, vil det reagere med reagensen og danne AgCl (sølvklorid) som gir hvit utfelling.

3.3.7 Frysetørking

Utførelse:

- Metanolbad: Hetofrig, Heto Birkerød Danmark
- Frysetørker: Christ Alpha 1-4
- Pumpe: Chemistry hybrid pump RC5, Vacuubrand Wertheim Germany

Prøvene ble rundfrost i metanolbad ved -20°C , eller frosset ned i fryser før frysetørking. Prøvene som skulle frysetørke inni fryseren, ble overført til begerglass og dekket til med plastikkfilm, og ble små stukket hull i filmen med en kanyle, eller bli den rundfryse i en rundkolbe for frysetørking utenpå.

3.4 KARAKTERISERING AV ALGINAT

3.4.1 Metanolyse

Prinsipp:

Metanolyse ble anvendt for å bestemme monosakkaridsammensetningen i alginat M-60, M-100 rensset og urensset, på grunn av at metoden førte til mindre destruksjon av karbohydrater sammenlignet med vandig syrehydrolyse [70]. I denne prosessen katalyserer saltsyre spaltningen av glykosidbindinger i karbohydratpolymeren i et vannfritt metanolmiljø, og gir sammen med metanol metylglykosider. Ettersom metylglykosidene er lite flyktige, må prøven derivatiseres med trimetylsilyl (TMS). Hensikten med derivatisering er å gjøre prøven flyktig og termisk stabil slik at den blir bedre egnet for GC. Under derivatiseringen omdannes

polare grupper til upolare grupper, fordi polare grupper som f.eks. karboksylsyregrupper, nedsetter prøvens flyktighet og absorberer til overflatene slik at prøven elueres som brede topper med haledannelse [71].

Reagenser:

- Intern standard (1 µg/µL mannitol i vannfri metanol)
- Vannfri metanol (metanol som er nyåpnet)
- 3 M HCl i vannfri metanol (leverandør)
- TMS reagens (Vannfri pyridin, heksametyldisilazan, trimetylklorasilan, 5:2:1)

Utførelse:

Det ble veid 1 mg av prøve i metanolyserør, som deretter ble dekket med plastikkfilm og lagde små hull i plastikkfilmen ved hjelp av en kanyle. Metanolyserørene ble tørket i vakuumeksikator over fosforpentoksid i varmeskap ved 40 °C i 1-2 døgn. Etter tørkingen ble det tilsatt 1 mL 3M metanolisk HCl og 100 µL intern standard til hvert av metanolyserørene. Det ble brukt syrevaskede SMI rør til uttak av intern standard. Metanolyserørene ble satt i varmeskapet ved 80 °C og etter 15 minutter ble korkene til metanolyserørene skrudd godt igjen for å hindre fordamping av metanol. Deretter ble rørene inkubert videre ved 80 °C i 20-24 timer. Etter inkubering ble prøvene tørket under N₂ gass, og vasket 3 ganger med 200 µL vannfri metanol for å fjerne rester av saltsyre. Prøvene ble tørket under N₂ gass mellom hver vask. Etterpå ble prøvene tørket ytterligere i vakuumeksikator i 1 time ved romtemperatur. Det ble tilsatt 250 µL TMS-reagens og mikset ved hjelp av vortex. Prøvene fikk stå ½ time i romtemperatur og sentrifugert før 1 µL supernatant ble tatt ut for analyse på GC [70].

3.4.2 M-100 standardkurve for metanolyse

Prinsipp:

For å bestemme innhold av mannuronsyre i M-60 og M-100, når mannuronsyre ikke er kommersielt tilgjengelig, ble det laget en M-100 standardkurve. Den ble gjort ved metanolyse av M-100 i forskjellige konsentrasjoner og standardkurven ble laget ut i fra forholdet mellom de ulike mengdene M-100 og areal under kurven i GC.

A. Bestemmelse av M-100 renhet, vektbasert

Det ble først gjort en bestemmelse av renhet til M-100 basert på vekten. Det ble lagd 2 prøver:

- 1) Metanolyserør "M-100": Røret ble merket og veies nøyaktig. Etter på ble det veid inn nøyaktig 3,00 mg M-100, og røret ble dekket over med plastikkfilm. Røret ble tørket i eksikator ved 40°C 1-2 døgn
- 2) Metanolyserør "blank": Røret ble merket og tørkes i eksikator ved 40°C 1-2 døgn samme med "M-100" røret

Metanolyse ble utført som beskrevet i 3.3.1, men det ble brukt 1,5 mL 3M HCl MeOH, og intern standard ble ikke tilsatt her.

B. Standardkurven av M-100

Standardkurven av M-100 skal inneholde nøyaktig små mengder av M-100, derfor ble det lagd en stamløsning av M-100 som det blir tatt ut kjente volumer fra.

Laget en nøyaktig 2mg/ml stamløsning ved å veie 10,0 mg av M-100, og løses opp i totalt 5,0 mL vann. Det ble tatt ut nøyaktig 8 forskjellige mengder: 1,4 mg, 1,2 mg, 1,0 mg, 0,8 mg, 0,6 mg, 0,4 mg, 0,2 mg 0,1 mg av stamløsningen som ble overført til hvert sitt metanolyserør. Disse rørene ble frysetørket og deretter utført metanolyse som beskrevet i 3.3.1.

3.4.3 Gass kromatografi (GC)

Prinsipp:

GC ble anvendte til å detektere komponenter i prøven, ved at komponentene ble separert basert på deres affinitetsgrad til stasjonærfasen. Separasjoner skjer ved høyt trykk og temperatur der prøven som skal kjøre GC må være flyktig. Er ikke prøven flyktig, må den derivatiseres før analyse. Ved GC blir prøvekomponentene løst i en gassfase og fraktet gjennom en veldig liten kapillærkolonne, der innsiden er dekket med den stasjonære fasen. Komponenter i prøven som har høy affinitet til den stasjonære fasen vil bli lenger i kolonnen og elueres senere enn de med mindre affinitet til den stasjonære fasen. Affinitetsgraden til den stasjonære fasen er styrt av molekylets struktur, egenskaper og kjemien til den stasjonære fasen som blir brukt [72].

Reagenser:

- Heksan til vask av kanyle

Utførelse:

Gasskromatografi ble utført på en Thermo Scientific Focus gasskromatograf med flammeionisasjonsdetektor (FID) og split/splitless-injektor.

Kolonne: Restek kapillærkolonne (30 m, 0,32 mm indre diameter) med 0,25 µm filmtykkelse.

Bærergass: Helium

Flow: Konstant trykk 0,70 bar

Injeksjonsvolum: 1 µL

Injektortemperatur: 250 °C

Detektortemperatur: 300 °C

Temperaturprogram: Initielt 140 °C, deretter økning med 1 °C/min til 170 °C, videre økning med 6 °C/min til 250 °C.

Programvare: Chromeleon versjon 6.8.

Supernatant (1 µL) fra de metanolyserte og derivatiserte prøvene ble injisert manuelt i gasskromatografens injektor, og elueringsprogrammet ble startet. Det er på forhånd laget standardkurver for en rekke monosakkarider: arabinose, ribose, rhamnose, xylose, mannose, galaktose, glukose, glukuronsyre og galakturonsyre, men ikke av mannuronsyre og guluronsyre. M-100 standardkurven som ble laget brukes til å finne ut mengde av mannuronsyre i M-60 prøven.

3.4.4 Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (NMR)

Prinsipp:

NMR ble anvendt til å bestemme sammensetningen og de sekvensielle parameterne i alginat, siden bruk av ¹H-, og ¹³C-NMR spektroskopi kan gi mer nøyaktigere for sammensetningen av monod-frekvenser mannuronsyre og guluronsyre (G, M), de fire nærmeste nærliggende diadefrekvensene (MM, MG, GM, GG) og triadefrekvensene med G i senter (GGG, GGM, MGG,

MGM). Den gradvise bruk av stadig kraftigere NMR-apparater gjorde at en kunne se flere naboenheter i alginatmoleylet samtidig, slik at en nå rutinemessig kan registrere flere naboenheter i kjeden, og derved beregne fordelingen på henholdsvis MG-, M- og G-blokker. NMR-metoden for å bestemme for analyse av den gjennomsnittlige blokkstrukturen i en alginatprøve ble utviklet av Grasdalen og medarbeiderene hans [73-75]. Prøvene ble analysert av Dr. Finn Ackermann.

Utførelse:

Metoden innebærer følgende, først ble prøven løst i D₂O og videre analysert på en Bruker Advance 300/ 400 Hz. Før NMR-analyse ble prøven mildt hydrolysert altså en oppkapping av alginatkjedene. Dette hjelper også for å redusere viskositeten av prøven. Etter på ble den tilsatt en chelator som binder og hindrer at eventuelle divalente kationer i løsningen virker sammen med polymeren som da vil bli gele. NMR analysen skjer ved høy temperatur 80-90°C for å redusere viskositet, øke oppløsningen og for å skifte løsemiddeltoppen vekk fra anoder regionen som er interesse på spektra. Det ble gjort signalprosessering og estimering av intensiteten av relevante NMR-signal. Sekvensielle til alginat ble beregnet av Dr. Finn Ackermann.

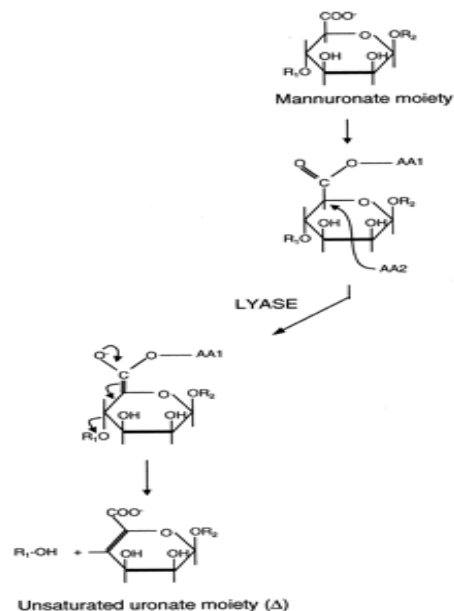
3.5 TILLAGING AV ALGINAT- OLIGOSAKKARIDER

3.5.1 Degradering av alginat med alginatlyase

Prinsipp:

Alginatlyasen som anvendes i oppgaven er bestilt fra Sigma og den er utvunnet fra *Flavobacterium sp.* kilden. Alginatlyaser ble brukt i denne oppgave til degradering av alginat for å fremstille alginat- oligosakkarider . I studien om karakterisering av alginatlyase fra forskjellige kilder, ble det nevnt at alginatlyase fra *Flavobacterium multivolum* er en spesifikt G-lyase som degraderes homopolymerisk (poly G) og heteropolymerisk (G/M) alginat til å fremstille poly M- blokk fra M-60 [41]. I en annen studie ble det også vist at lyase som er utvunnet fra en blandet kultur av gram–negative bakterier *Flavobacterium*, *Alvaligenes* og *Bacillus*, har en spesifikk egenskap til degradering av både homopolymerisk poly M og poly G, der aktiviteten er mest effektiv ved pH 8,0 og temperatur 40°C. Enzymaktiviteten kreves også ikke divalent kationer, reduksjons reagenser eller EDTA [76, 77]. Degradering foregår

ved β -eliminering, der dobbeltbinding mellom C4 og C5 blir dannet og ringene blir behold, se Figur 3.6 . Degraderingsprosessen blir fulgt ved hjelp av UV-måling ved 235 nm, fordi dobbeltbindingene som ble dannet absorberer UV-lys [78, 79].



Figur 3.6. Reaksjonsmekanisme der lyase degraderer alginat [79].

Reagenser:

- Fosfatbuffer 0,1 M pH 6,3: a) 1,0 L 0,2 M Na_2HPO_4
 b) 1,0 L 0,2 M NaH_2PO_4

Det ble blandet 50,0 mL a) og 50,0 mL b) og tilsatt 25 mL vann før pH ble justert til 6,3.

Vann ble tilsatt til 200,0 mL

- Alginatlyase fra *Flavobacterium* sp. E.C.4.2.2.3
- Biochrom UV spektrofotometer med programvaren Acquire Reaction Kinetics versjon 1.00 fra Biochrom Acquire software.

Utførelse:

M-60 (15 mg) ble løst i 15 mL 0,1 M fosfatbuffer. Det ble løst 2 mg alginatlyase i 20 mL 0,1 M fosfatbuffer. Det ble gjort UV-måling på 3 paralleller av alginatløsningen med 3 mL løsning i kvartkyvette. Fosfatbuffer ble brukt som referanse. Første måling av absorbans ved 235 nm ble foretatt uten enzym (tid=0). Deretter ble det tilsatt 100 μL enzymløsning i hver av parallellene, som ble blandet med en plastikkspatel. Videre ble absorbans målt hvert minutt i 24 timer, ved romtemperatur.

Samme som overnevnt, ble det også undersøkt om enzymet hadde effekt når alginat ble løst i vann i stedet for buffer. Degraderingsprosessen viste seg å fungere bra med alginat og alginatlyase i vann, derfor ble det gjort en mer kvantitativ bestemmelse. M-60 150 mg ble løst opp i 150 mL vann og 10 mL alginatlyases løsningen. Prøven stod i ca. 19 timer før absorbansmåling ved 235 nm med kvartkyvetter for å kontrollere at enzymet hadde virket. Deretter ble prøven kokte ved 100⁰C i ca. 5 min for å denaturere enzymet. Enzymet ble denaturt ved 19 timer, fordi det på dette tidspunktet ikke lenger er enzymaktivitet. Prøven ble fraksjonert videre til ionebytterkolonnen for å isolere rene oligomere som blir dannet etter degraderingen.

3.5.2 Ionebytterfraksjonering av lyasebehandlet M-60

Prinsipp:

Denne metoden ble anvendt for fraksjonering av alginat-oligosakkarider som ble dannet etter degradering av alginat med alginatlyasen. Etersom glykosidbindinger i polymeren ble kuttet opp ble det dannet forskjellige oligosakkarider i ulike størrelse, slik at oppgaven blir å separere disse oligosakkariderene.

Ionebyttekromatografi separerer molekyler etter antall og fordeling av ladninger tilgjengelige for interaksjoner med den stasjonære fasen. Prinsippet er reversibel adsorpsjon av ladete molekyler til immobiliserte ionbyttegrupper som har motsatt ladning. De ladete gruppene i den stasjonære fasen assosierer med ioner med motsatt ladning (motioner) i den mobile fasen. Disse motionene kan reversibelt byttes ut med andre ioner med samme ladning fra prøven. Den stasjonære fasen som ble brukt i dette forsøket var en uløselig matriks anionbytter, som har positivt ladete grupper kovalent bundet til seg. De ladete gruppene har affinitet til å assosiere med negativt ladde ioner i den mobile fasen. I dette forsøket ble NaCl-løsning brukt som mobilfase, Cl⁻ var motioner som bundet til stasjonær fasen, og kunne bytte ut negativt ladete ioner som var karboksylsyrergrupper i prøven.

Under forsøket vil de negative ionene fra prøven bytte plass med Cl⁻ionene og binde reversibelt til den stasjonære fasen. Ubundet substanser vil bli vasket vekk fra kolonnen. Stoffet som er bundet til den stasjonære fasen i kolonnen blir fjernet ved å øke saltkonsentrasjonen, det vil si ved økende ionestyrke, slik at molekylene blir frigjort fra

kolonnen i rekkefølgen av deres bindingsstyrke. De molekylene som er svakest bundet til matriksen blir eluert først. Prøven blir altså separert etter molekylenes ladning [71].

Reagenser:

- 1 M NaCl- løsning
- Vann
- Etanol 20 %

NaCl-løsning og vann ble brukt til gradient og vann, etanol ble brukt til vask av kolonne. Alle løsningene ble filtrert med 0,45 µm, overført til 1 L glassflaske og gasset med heliumgass før bruk.

Utførelse:

Pumpe: FPLC Pump P-500, Pharmacia Biotech
Injektor: Valve IV-7, Pharmacia
Fraksjonssamler: Fraction Collector Frac-100, Pharmacia
Elueringsmiddel: Pumpe A: vann
Pumpe B: 1 M NaCl-løsning

Prøven ble først kjørt på en analytisk ionebytterkolonne (5 mL) som viste å gi en fin fraksjonering av oligomer. Ulempe er at kolonnen er for liten til å kunne fraksjonere større mengde av stoffet. Derfor ble det prøvd ut på en preparativ ionebytterkolonne (138 mL), men det endte med at UV-detektor ikke klare å detektere fraksjoneringer, absorbansmåler er over deteksjons terskel til UV-apparaten. Det ble testet ut på en semipreparativ ionebytterkolonne som er seriekoplet av 5 analytiske ionebytterkolonnen. Utprøving ved denne kolonnevolum viste seg å fungere bra. Nedenfor er beskrivelse av de ionebytterkolonnen som er ble anvendt.

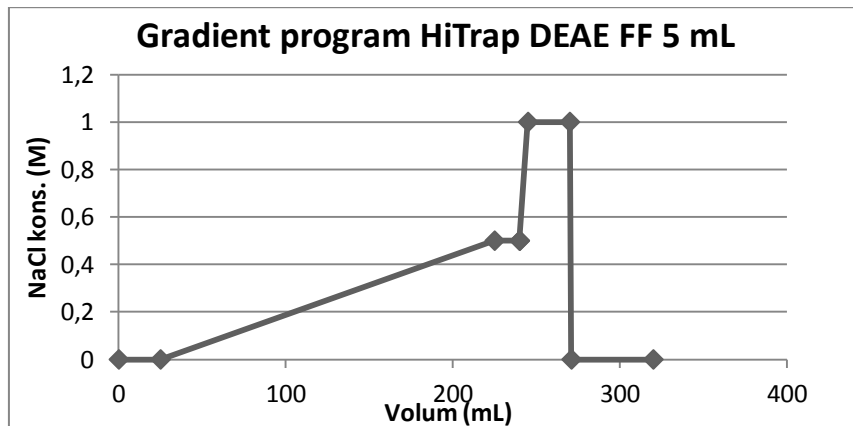
A. Analytisk ionebytterkolonne (5 mL):

Kolonne: HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia
Deteksjon: UV- måling Pharmacia Fine Chemicals, målt absorbans ved 280 nm.
Flow: 5 mL/min
Fraksjonsstørrelse: 2,5 mL
Loop: 5 mL

Prøvekonsentrasjon: 3 mg/mL

Totalt Totalt mengde: 90 mg

Gradient: Gradient begynner fra 0 mL og går over 48 kolonnevolum (240ml) fra 0-0,5 M NaCl. Deretter blir prøven eluert helt ut med 1M NaCl se Figur 3.7. Fraksjoner ble samlet opp fra 25 mL.



Figur 3.7. Illustrasjon av NaCl konsentrasjon gjennom elueringen, med 5 mL kolonnevolum, typer HiTrap DEAE Sepharose FF kolonne på FPLC system. Gradienten (0-0,5 M NaCl) startet etter 25 mL og går opptil 225 mL før gradienten endte. Kolonnen ble regenerert med 1 M NaCl i 5 minutter og deretter vasket med vann inntil programmet stoppet etter 320 mL.

B. Preparativ ionebytterkolonne (138 mL):

Kolonne: DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia

Deteksjon: Fenolsvovelsyretest

Flow: 1mL/min

Fraksjonsstørrelse: 3 mL

Loop: 10 mL

Prøvekonsentrasjon: 3 mg/mL

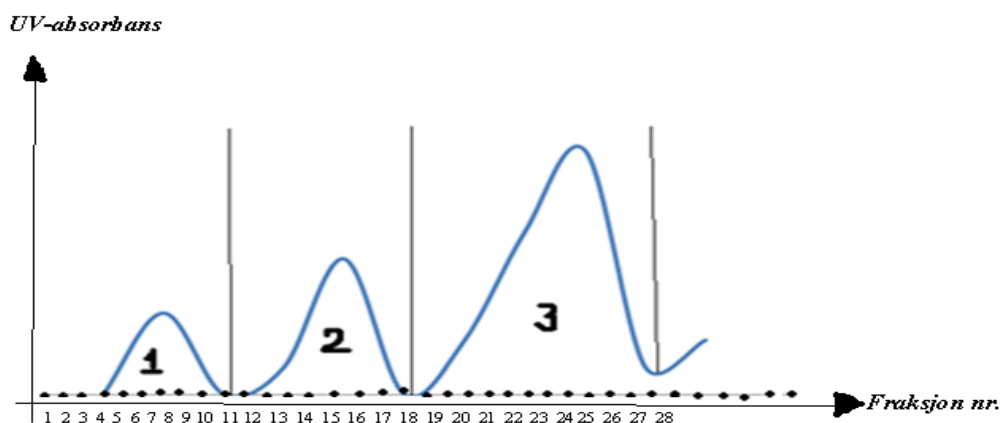
Prøvemengde: 150 mg

Gradient: Gradient begynner ved 0 mL og går over ca. 2 kolonnevolum (280mL) fra 0-0,4 M NaCl. Deretter blir prøven eluert helt ut med 1M NaCl. Fraksjoner ble samlet opp fra 0 mL.

C. Semipreparativ ionebytterkolonne (5x5mL):

Kolonne: HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia
Deteksjon: UV- måling Pharmacia Fine Chemicals, målt absorbans ved 280 nm.
Flow: 3mL/min
Fraksjonsstørrelse: 5 mL
Loop: 5 mL og 3,25 mL
Prøvekonsentrasjon: 3 mg/mL
Prøvemengde: 150 mg
Gradient: Gradient begynner fra 0-500 mL tilsvarer 20 kolonnevolum, fra 0-0,5M NaCl. Deretter blir prøve eluert helt ut med 1M NaCl. Fraksjoner ble samlet opp fra 50 mL

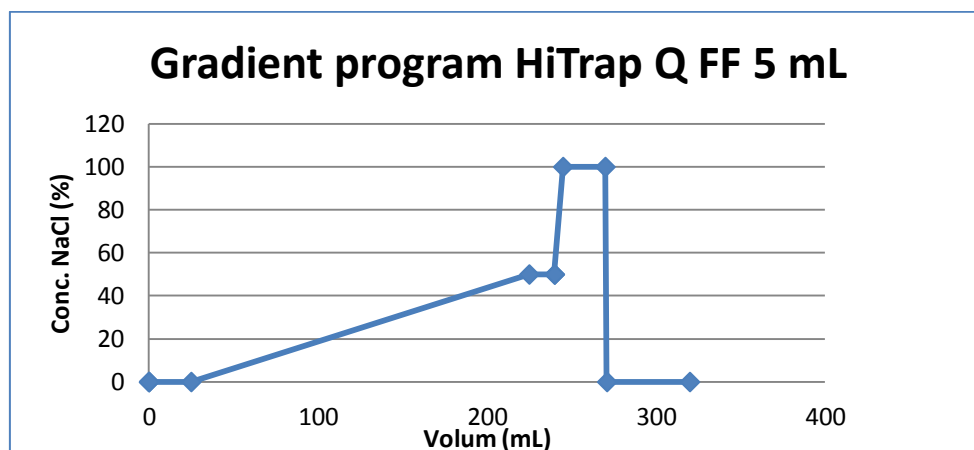
UV- deteksjon som er koblet til ione-bytterkolonnen detekterer prøven som elueres ut ved ulike NaCl konsentrasjon. Fraksjoner som inneholder karbohydrater vil gi et utslag på UV-detektor, og ut i fra UV-deteksjonsresultatet, ble fraksjonene samlet opp for hver topp, se Figur 3.8.



Figur 3.8. Illustrasjon av UV-deteksjon, der elueringen av prøven blir separert til 3 topper. Herved kan antall fraksjoner (er merket med numrene på x-aksen) av toppene bli bestemt og samlet opp til videre arbeid.

D. Sterk ionebytterkolonnen (5mL)

Kolonne: HiTrap Q Fast Flow, Pharmacia
Deteksjon: UV- måling Pharmacia Fine Chemicals, målt absorbans ved 280 nm.
Flow: 5mL/min
Fraksjonsstørrelse: 2,5 mL
Loop: 2 mL
Prøvekonsentrasjon: 2 mg/mL
Totalt Totalt mengde: 6 mg
Gradient: Gradient begynner fra 0 mL og går over 48 kolonnevolum (240ml) fra 0-0,5 M NaCl. Deretter blir prøven eluert helt ut med 1M NaCl
Fraksjoner ble samlet opp fra 25 mL til 245 mL (totalt 98 fraksjoner), se Figur 3.9.



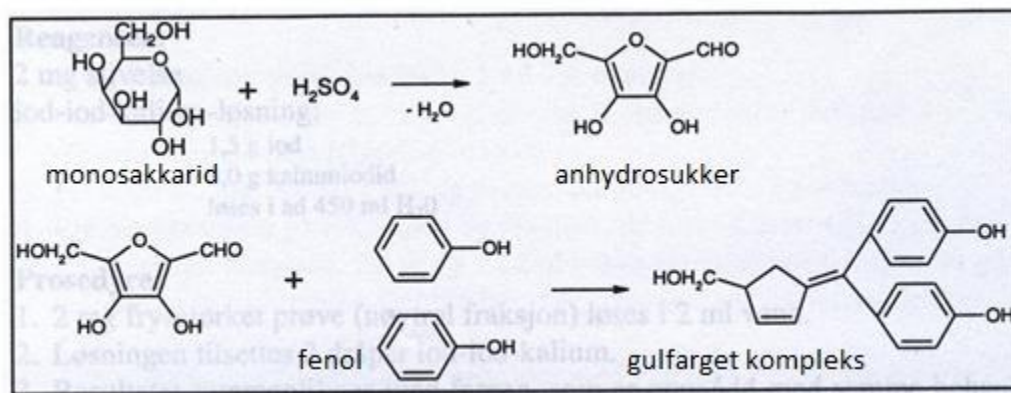
Figur 3.9. Illustrasjon av NaCl konsentrasjon gjennom elueringen, med 5 mL kolonnevolum, typer HiTrap Q FF kolonne. Gradienten (0-0,5 M NaCl) startet etter 25 mL og går opptil 225 mL før gradienten endte. Kolonnen ble regenerert med 1 M NaCl i 5 minutter og deretter vasket med vann inntil programmet stoppet etter 320 mL.

3.5.3 Fenol- svovelsyretest

Prinsipp:

Denne metoden ble anvendt med den hensikt å separere karbohydrater som blir eluert når UV-detektoren ikke klarte å identifisere toppene. Metoden går ut på at karbohydratene

reagerer med konsentrert svovelsyre og danne anhydrosukker, deretter reagerer de med fenol og danner gulfarget kompleks [80], se Figur 3.10.



Figur 3.10: Kjemisk reaksjon ved fenol-svovelsyretest [81].

Reagenser:

- Konsentrert svovelsyre
- 4 % fenol

Utførelser:

Det ble overført 200 μ L av hver fraksjon til et glassrør og tilsatt 200 μ L 4% fenol og 1mL konsentrert svovelsyre. Blandingen ble mikset godt opp ved hjelp av vortex. La prøven i henstand i ½ time i romtemperatur, gul farge indikerte at det var karbohydrater i løsningen. Etterpå ble 200 μ L av prøvene fra hvert rør overført til en flatbunnet 96-brønners mikrotiterplate for måling av absorbans ved hjelp av en mikroplateleser [80] (Wallac Victor 1420 Multilabel counter, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences eller iMark™ Microplate reader, Bio- Rad). Ut i fra verdier av absorbans-målinger laget vi en karbohydratprofil av elueringen og derfra kan fraksjoner slås sammen.

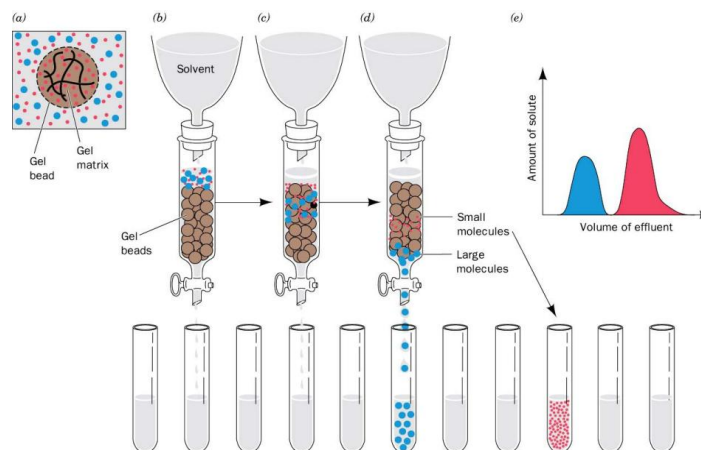
3.5.4 Desalting av fraksjoner

Prinsipp:

Etter ionebyttet blir fraksjonene av oligomerene desaltet ved gelfiltrering. Ved denne metoden kan vi fjerne salter i prøver etter ionebytter-kolonnen, siden NaCl blir brukt i ionerbytte -

kolonnen til å eluere ut prøven. Det er viktig at prøven er helt saltfri før den kan testes videre på celleforsøk.

Desalting ved gelfiltering er en metode der molekyler i løsningen blir skilt i henhold til forskjellige molekylstørrelser når de passere gjennom en kolonne som er pakket med et kromatografisk medium som er gel. Kolonnen som ble brukt var pakket med Sephadex® G-25, en kryssbundet dekstran gel med epiklorohydrin som dannet et 3-dimensjonelt nettverk [82]. Gel matriks har et porestørrelse som er sammenlignbare med størrelsen til molekylene vi ønsker å skille. Vann blir brukt som elueringsmiddel, og driver prøven gjennom kolonnen. Store molekyler vil eluere ut først på grunn av de ikke diffunderer inn i gelen, men små molekyler eluere ut senere på grunn av den vil diffundere mer inn i gelen. I dette forsøk vil polysakkarisder i prøven komme ut først og og frie salter etter. Elueringen ble fulgt med en refraktiv indeks (RI)-detektor slik at det viser elueringsprofil, se Figur 3.11.



Figur 3.11: Oversikten over gelfiltering der store molekyler forlater kolonnen først, etterfulgt av mindre molekyler. Elueringsprofil viser 2 toppe, den blå toppen identifiserer store molekyler som kommer ut først, mens den røde toppen identifiserer små molekyler som kommer ut senere[83].

Reagenser:

- Vann
- Etanol 20 %

Alle løsninger ble filtrert med 0,45 µm og gasset med heliumgass.

Utførelse:

Kolonne:	HiPrep Desalting, GE Healthcare
Kolonnestørrelse:	26/10, dvs. 26 mm bred og 10 cm høy
Kolonnevolum:	53 mL
Pumpe:	PUMP-P50, Pharmacia Biotech
Injektor:	Valve IV-7
Detektor:	Refractive index detector (Shimadzu RID-6A)
Fraksjonssamler:	Pharmacia LKB-SuperFrac
Programvare:	Chromeleon versjon 7
Elueringsmiddel:	Vann, filtrert med 0,45 µm og degasset med heliumgass
Flow:	3 - 5 mL/min
Fraksjonsstørrelse:	1,5 - 2,5 mL
Antall fraksjoner:	50
Loop:	5 mL
Prøvekonsentrasjon:	3 mg/mL

Prøven ble filtrert 0,45 µm og injisert i injektoren. En slange ble koblet til kolonnens utløp og til fraksjonssamleren, slik at prøven ble samlet opp i fraksjoner. RI-detektoren som var koblet til pc og RI-profilen etter eluering, viste to topper der den første toppen er mest sannsynlig prøven, karbohydrater, mens den andre toppen er salt. Ut ifra kurven kan man beregne hvilke fraksjoner som inneholdt karbohydrater. For sikkerhet ble skyld fraksjonene også testet med AgNO₃, for å dobbelt kontrollere om fraksjonene inneholder salt (se metode 3.2.5). Fraksjonene ble overført til rundkolben, ble fryste ned og frysetørker (se metode 3.2.6).

3.6 BESTEMME INNHOLD AV LYASEBEHANDLET M-60-FRAKSJON

3.6.1 HPAEC-PAD

Prinsipp:

HPAEC-PAD (High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection) er en metode basert på at karbohydrater i prøven ioniseres i et sterkt alkalisk miljø,

slik at de blir mottakelige for separering i en ionebytterkolonne. Denne ble brukt til å få en indikasjon på sammensetning av de isolerte fraksjonene [72].

HPAEC-PAD består av et reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne og detektor (PAD, Pulsed Amperometric Detection). Mobilfasen forskyver prøven gjennom kolonnen ved hjelp av trykk fra pumpen. Systemet blir utstyrt med en forkolonne plassert foran separasjonskolonnen (hovedkolonnen) for å filtrere bort partikler som ellers kunne ha tettet og skadet selve hoved kolonnen. Systemet blir koplet til en datamaskin med programvare (Chromeleon versjon 6.80), dermed når den separerte prøven har passert kolonnen vil konsentrasjonen måles i detektoren og verdiene blir videre behandlet i programvaren [84]. Separasjonen av karbohydrat skjer i hovedkolonnen som er belagt med et anionbyttermateriale som er en uløselig matriks av polymer-materiale. Molekyler med negativ ladning binder seg midlertidig til den positivt ladede matriksen i kolonnen. Molekyler som binder seg svakest til matriksen vil passere raskest gjennom kolonnen og dermed bli detektert først .

Utførelse:

Kolonne:	CarboPak® PA100 (4 x 250 mm), BioLC®, Dionex Corporation
Forkolonne:	CarboPak® PA-100 (4 x 50 mm), BioLC®, Dionex Corporation
Pumpe:	Dualpump ICS-3000, Dionex
Autoinjektor:	AutoSample, Dionex
Detektor:	PAD (Pulsed Amperometric Detection)
Elueringsmiddel:	100 mM NaOH og 100 mM NaOH/ 1000 mM NaOAc
Gradient:	0,5 min 20 mM NaOAc, 5-60 min 20-600 mM NaOAc
Flow:	0,5 mL/ min
Injeksjonsvolum:	50,0 µL
Programvare:	Chromeleon © Dionex Corporation, versjon 6,8

Fraksjonene ble fortynnet til en passende konsentrasjon 1mg/ml og deretter filtrert med 0,45 µm filter før den ble injisert i kolonnen.

3.6.2 ESI-MS

Prinsipp:

Prøvene blir sendt til Biologisk avdeling for å kjøre på MS. Hensikt med MS metode her er å bestemme innhold av oligomere i de lyasebehandlet M-60 fraksjonene, om hvor ren er disse fraksjonene.

Massespektrometri (MS) er en sensitiv, analytisk metode for å bestemme massen av molekyler og atomer, og detektering av disse separerte ionene, og utføres ved hjelp av et massespektrometer. Massespektrometeret består av 3 deler, en ionekilde hvor ioner blir generert, en masseanalysator som separerer ioner etter masse-til-ladnings forholdet (m/z) og en detektor som både kvalitativt og kvantitativt detekterer ioner [85]. Produktet fra MS eksperimenter blir grafisk fremstilt i spektre som viser masse-til-ladnings forholdet (m/z) mot mengden av detekterte ioner. Det finnes mange ulike måter å generere, separere og detektere ioner og det finnes derfor mange ulike massespektrometeret med forskjellige egenskaper. En nyttig funksjon av massespektre er evnen til å avdekke strukturformelen av molekyler. Ved å spesifikt isolere utvalgte molekyler i masse analysatoren for deretter å fragmentere eller bryte fra hverandre det isolerte molekylet til mindre biter, kan den molekylære strukturen kartlegges ved å studere mønsteret av fragmenter. Siden fragmentering er en veldig anvendbar metode har ulike måter å fragmentere molekyler på blitt utviklet.

Utførelse:

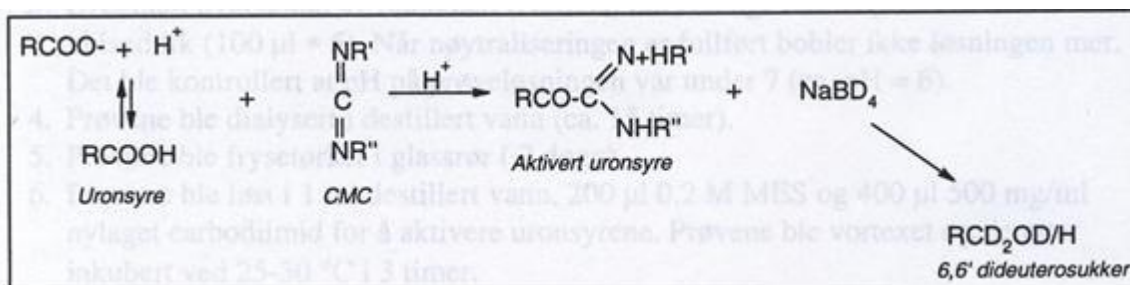
MS-analyse ble utført av avdelingsingeniør Anders Moen ved Institutt for Molekylær Biovitenskap UiO, med en LTQ Orbitrap XL massespektrometer (Thermo Fischer scientific). Frysetørkede fraksjoner av lyasebehandlet M-60 ble løst i 1 ml vann, slik at konsentrasjon ble 1mg/ml. 200 µl av løsningene ble fortynnet videre til 1 ml vann. Videre ble det tatt ut 225 µL av 0,2 mg/mL løsningene og tilsatt 225 µL ACN og 50 µL 1% maursyre (0,1mg/ml) Prøvene B4, C1 og C2 ble laget til konsentrasjon 0,5 mg/ml. Prøvene ble ionisert ved elektropray ionisering (ESI) i ionekilden [86-89]. I ESI går molekylene fra løsning via mindre og mindre dråper til gassfase. I denne prosessen overføres protoner i løsningen til egnete posisjoner på molekylet som dermed blir ionisert. De genererte molekylionene ble deretter fragmentert ved hjelp av Higher-energy C-trap dissociation (HCD) i et kollisjonskammer [90]. Ved HCD kolliderer molekylionene i høy hastighet med en inaktiv gass slik at bindingene brytes. Både

molekylionene og fragmentene ble analysert i en orbitrap masse anlysator. I orbitrap analysatoren oscillerer ionene i et konstant elektrisk felt og frekvensen av denne oscilleringen er avhengig av m/z på ionene [91, 92].

3.7 KARBOKSYLSYREREDUKSJON

Prinsipp:

Metoden brukes for å redusere karboksylsyregrupper på alginat, for videre å teste hvilken betydning ladningene har for protease aktivering på celleforsøk. Før reduksjon blir frie uronsyrer aktivert med karbodiimid, deretter blir de redusert med natriumborhydrid for å gi nøytrale karbohydrat-monomerer, som vist på Figur 3.12 [93].



Figur 3.12: Reaksjon der uronsyre blir aktivert av karbodiimid og deretter redusert av natriumborhydrid

Reagenser:

- Konsentrert HCl
- 0,2 M MES (2-(N-morfolino)etansulfonsyre) (pH 4,75)
- Karbodiimid (1-sykloheksyl-3-(2-morfolino) karbodiimide-meto-p-toluen sulfonate)
- 2 M TRIZMA (Tris(hydroksymetyl) aminometan) (pH 9,0)
- Natriumborhydrid
- NaOH (0,05 M og 1,5 M)
- 100% eddiksyre
- Oktanol

Utførelse

Alginat (100 mg) ble løst i 50 mL vann til 2 mg/mL. Det ble tilsatt 4 mL 0,2 M MES (2-(N-morfolino)etansulfonsyre). Det ble tilsatt 8 mL nylaget løsning av 500 mg/mL karbodiimid, der karbodiimid ble løst opp med destillert vann, og varmet opp for at stoffet løser seg opp. Løsningen ble ristet og innkubert i 3 timer ved 25-30 °C. Etter innkubering ble det tilsatt 20 mL 2 M TRIZMA (Tris (hydroksymetyl) aminometan) og 10 dråper oktanol for å hindre skumming, og den ble avkjølt på is. Deretter ble 20 mL 70 mg/mL natriumborhydrid tilberedt ferskt med 0,05 M NaOH og tilsatt i løsningen, som så ble inkubert i kjøleskap (4 °C) over natt. Overskudds reduktant ble fjernet ved forsiktig tilsetning av 10 mL 100% eddiksyre til pH under 7 (ca pH 6). Prøven ble dialysert med hyppig vannskifting i 2 døgn, dialyse-slangen er type Mw cut-off 12-14 000. Deretter ble prøven dampet litt i rotavapor før den ble frysetørket (3.2.4) [93]. Borat ble fjernet i prøven (metode 3.5.1) etter dialysering, siden dialyse er ikke tilstrekkelig for å fjerne borat.

3.7.1 Fjerning av borat

På grunn av kompleksdannelsen mellom borsyre og OH-grupper på karbohydrat, blir det brukt eddiksyre til å bryte kompleksdanningene som deretter vaskes bort med metanol. Prøven ble vasket 5 ganger med eddiksyre: metanol (1:10) og dampet inn på rotavapor mellom hver vask. Deretter ble det vasket 4 ganger med metanol med påfølgende inndamping, helt til det ikke luktet eddiksyre lenger [94].

3.7.2 Ionerbyttekarakterisering av M-60 og M-100 før og etter reduksjon

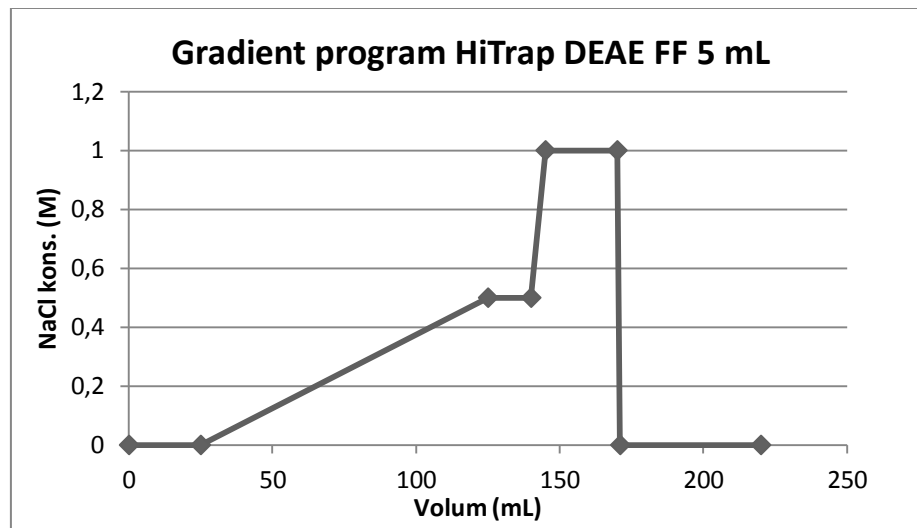
Metoden ble anvendt til å finne ut om M-60 og M-100 gir ladningsforskjell før og etter reduksjon. Prinsippet og reagensene anvendt er de samme som 3.5.2.

Utførelse:

Kolonne:	HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia
Deteksjon:	UV- måling Pharmacia Fine Chemicals, malt absorban ved 280 nm.
Deteksjon:	Fenol-svovelsyretest (metode 3.5.3)
Flow:	5 mL/min
Fraksjonsstørrelse:	2,5 mL
Loop:	2 mL
Prøvekonsentrasjon:	2 mg/mL

Totalt Totalt mengde: 4mg

Gradient: Gradient begynner fra 0 mL og går over 25 kolonnevolum (125ml) fra 0-0,5 M NaCl. Deretter blir prøven eluert helt ut med 1M NaCl se Figur 11. Fraksjoner ble samlet opp fra 25 mL, se Figur 3.13.



Figur 3.13: Illustrasjon av NaCl konsentrasjon gjennom elueringen, med 5 mL kolonnevolum, typer HiTrap DEAE Sepharose FF kolonne på FPLC system. Gradienten (0-0,5 M NaCl) startet etter 25 mL og går opptil 125 mL før gradienten endte. Kolonnen ble regenerert med 1 M NaCl i 5 minutter og deretter vasket med vann inntil programmet stoppet etter 225 mL.

Det ble laget 2mg/ml konsentrasjon av prøvene: M-60 før- og etter reduksjon, M-100 før- og etter reduksjon. I utgangspunkt som i metode 3.5.4, ble prøvene filtrert først og deretter injisert i injektor. Programmen ble lagt inn slik at den styrte både NaCl-gradient (figur 11), pumpene og fraksjonssamleren. Etter elueringen ble eluatet testet med fenol-svovelsyretest (metode 3.5.3) for å lage en karbohydratprofil.

3.8 CELLEFORSØK

3.8.1 Celledyrking

Cellelinjen som ble brukt var RAW264.7-celler, en makrofag-lignende cellelinje fra mus (American Type Culture Collection) [95]. Forsøkene ble utført aseptisk i LAF-benk med vertikal laminær luftstrøm for å forhindre mikrobiell kontaminering av cellekulturene.

RAW 264.7 cellene ble oppbevart på flytende nitrogen. De ble tint opp på vannbad ved 37°C i ca. 60 sekunder til det var en liten isklump igjen. Det ble overført 1 mL cellesuspensjon til en 75cm² Costar dyrkingflaske, og tilsatt 9 mL vekstmedium. Flasken ble inkubert ved 37 °C og 5 % CO² over natt. Dagen etter ble cellene spunnet ned ved sentrifugering medium ble sugd av og nytt medium ble tilsatt. Vekstmediet består av:

- 500 mL DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) med 4 mM L-glutamin og 4,5 g/L glukose.
- 10 mL natriumbikarbonat
- 50 mL FBS (Føtalt bovint serum)
- 5 mL penicillin (1000 U/mL)/ streptomycin (10 mg/mL)

3.8.2 Splitting av celler

Celle ble splittet når de var tette for at de skulle få bedre levevilkår. RAW264.7-cellene ble splittet ved at mediet ble fjernet og 3 mL nytt medium ble overført til celleflasken. Cellene fra flaskebunn ble løsnet opp ved hjelp av en celskraper og 7 mL medium ble deretter tilsatt. For å løsne eventuelle celleklumper ble løsningen pipettert opp og ned 10-15 ganger. 1 mL av cellesuspensjon og 12 mL nytt medium ble overført til ny celleflaske, som ble merket med navn, dato og passasjennummer. Passasjennummer er antall ganger cellene ble splittet. Celle splitting ble gjort ca. hver 3. dag.

3.8.3 Celletelling

Celletelling er nødvendig for å bestemme konsentrasjon av celler som skal brukes i celleforsøket. Cellesuspensjon (10-15 μL) ble blandet med lik mengde tryptanblått, og antall celler ble talt i en automatisk celleteller (Countess Counter). Resultatet ble automatisk gitt som antall levende celler, antall døde celler, % viabilitet og totalt antall celler.

3.8.4 Utsåing av celler

Cellene ble sådd ut i 6-brønners cellekulturplater. Volumet som ble brukt var 2 mL/ brønn og den ønskede cellekonsentrasjonen var 100 000 celler/ mL, dvs. 200 000 celler/ brønn. Etter celletelling ble celsuspensjonen fortynnet i medium for å kunne så ut riktig cellekonsentrasjon og volum i brønnene. Cellene ble innkubert i 3 dager ved 37°C og 5 % CO₂.

3.8.5 Stimulering med alginatprøver

Det ble laget 2mg/ mL alginatløsning av M-60, M-100 før og etter reduksjon, M-75, M-94 i og de lyasebehandlede alginatene. Alginatprøvene ble løst i serumfritt medium ved 37°C vannbad. De inkuberte cellene ble vasket 1 gang med serumfritt medium, og serumfritt medium ble også brukt som kontroll. Cellene ble inkubert i 2 dager ved 37 °C og 5 % CO₂.

3.8.6 Oppsamling av kondisjonert medium og lysering av celler

Kondisjonert medium fra cellene ble forsiktig sugd av. Cellene ble løsnet med 1 mL 1 × PBS og overført til eppendorfrør. Rørene ble sentrifugert og supernatanten fjernet. Cellepellete ble løst i 1 mL PBS, sentrifugert og supernatanten fjernet igjen. Vasking med PBS ble gjort en gang til før 500 μL lysisbuffer ble tilsatt. Lysisbufferen ble pipettert opp og ned for å lysere cellene.

For å være sikker på at cellene var lyserte, måtte cellene gjennomgå en fryse-tine prosess. Cellene ble nedfrosset ved -70 °C i ca. 15 minutter og tint opp igjen på varmeblokk ved 30 °C. Fryse-tine prosessen ble gjentatt to ganger før lysatene ble sentrifugert ved 10 000 × g i 10 minutter ved 4 °C, og supernatant ble overført til nye eppendorfrør. Cellelysatene ble oppbevart nedfrosset eller på is før legumainaktivitetsanalyse.

3.9 MÅLING AV ENZYMAKTIVITET

3.9.1 Måling av totalprotein

Etter lysering av cellene ble det målt totalprotein i cellelysaten. Dette ble gjort ved å blande 10 µL cellelysat med 200 µL Bio-Rad protein Assay som var fortynnet i 1:5 i vann. Prøvene ble satt i henstad i 5 minutter. Wallac Victor 1420 counter, Perkin Elmer Life and Analytical Sciences ble slått på i mellomtiden. Proteinmåling ble gjort i dette apparatet. Coomassie Brilliant Blue G-250 Bio-Rad-reagenset har en blå farge som vil endre til rød farge når reagenset binder seg til Bovint serum albumin (BSA). Dette forårsaker en økning i absorpsjonsmaksimum fra 465 til 595 nm. Albumin ble brukt som proteinstandard, og det ble laget en standardkurve fra 50-300 µg/mL.

3.9.2 Legumainassay i cellelysat

Prinsipp:

Legumains aktivitet kan kvantifiseres ved å måle spaltningen av det spesifikke peptidsubstratet Z-Ala-Ala-Asn-NHMeC karboksyterminalt for Asn. Prøven ble først fortynnet i legumainassay-buffer. Bufferen inneholder et reduksjonsmiddel som gjør at prolegumain blir aktivt legumain. Legumain vil spalte peptidsubstratet og økningen i fluorescens fra spaltningsproduktet NHMeC blir målt i en mikroplateleser. Dette blir gjort ved at prøven blir belyst med bølgelengde 360 nm og NH₂MeC vil emittere lys med bølgelengde på 460 nm. Analysen består av flere målinger med et bestemt intervall, slik at resultatet viser endring i fluorescens per tidsenhet ($\Delta F/s$) [96].

Reagenser:

- Assaybuffer (pH 5,8):
 - 39,5 mM sitronsyre
 - 121,0 mM Na₂HPO₄
 - 1,0 mM Na₂EDTA
 - 0,01 % CHAPS (3-[(3Kolamidopropyl) dimetylammonio]-1- propansulfonat)
 - 1 mM DTT (ditiotretiol)

- Substratløsning: - Z- Ala- Ala- Asn- NHMec løst i 2,5 mM DMSO
(dimetylsulfoksid)
- 34 μ M assaybuffer (pH 5,8)

Utførelse:

- Mikroplateleser: Wallac Victor 1420 Multilabel counter,
Perkin Elmer Life and Analytical Sciences
- Mikrotiterplate: Corning Incorporated
- Programvare: Workout

Ved legumainassay benyttes sorte 96-brønners mikrotiterplater (Corning Incorporated). 20 μ L prøve ble pipettert på brønnen, og lysisbuffer ble brukt som blindprøven med samme volum som prøve. Det ble innstilt et program i plateleseren som først autoinjiserer 100 μ L assaybuffer og prøven ble blandet. Etter 10 minutter ble 50 μ L substratløsning autoinjisert og fluorescensmålingene startet. Temperatur ble innstilt på 30 C. Det ble tatt 10 målinger med 3 minutters pause mellom hver måling.

3.9.3 Legumainassay utenfor celler (autoaktivering)

Prinsipp:

I disse forsøkene ble bufferbytte brukt for å oppnå et surt medium som etterlignet det sure miljøet i lysosomene slik at prolegumain kunne autoaktiveres. Kolonnen som ble brukt var pakket med Sephadex® G-25 medium av samme type som ble benyttet tidligere (beskrevet i kapitlet 3.5.4 under “desalting av fraksjoner”) og eluerer ved hjelp av tyngdekraften.

Kolonnen var verken koblet til pumpe, detektor eller fraksjonssamler slik at eluatet ble samlet opp manuelt under eluering. Kolonnen hadde et filter på toppen som gjorde at elueringen stoppet ved kontakt med luft. Dermed kunne ikke kolonnen tørke ut. Mediet som ble brukt hadde høyt innhold av prolegumain og var fra en monoklonal stabil legumain- transfektert HEK (human embryonic kidney) 293 cellelinje (kalt M38L). Etter eluering ble prolegumain eluert ut med den sure bufferen (pH 4), og autoaktivering startet.

Reagenser:

- Buffer til vasking av kolonne: 200 mM natriumacetat + 4 mM Na₂EDTA (pH 4)
- Kondisjonert medium fra: M38L

Utførelse:

Kolonne: Column PD-10 Pharmacia (volum = 9,1 mL, høyde = 5 cm)

Kolonnen ble vasket med 25 mL buffer før 2,5 mL kondisjonert medium ble tilsatt. Da elueringen stoppet, ble det tilsatt ytterligere 3,5 mL buffer og eluatet ble samlet opp i et 15 mL Falconrør. Prøvene ble videre målt ved hjelp av legumainassay på Wallac Victor 1420 counter (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) som beskrevet 3.9.2.

4 Resultat

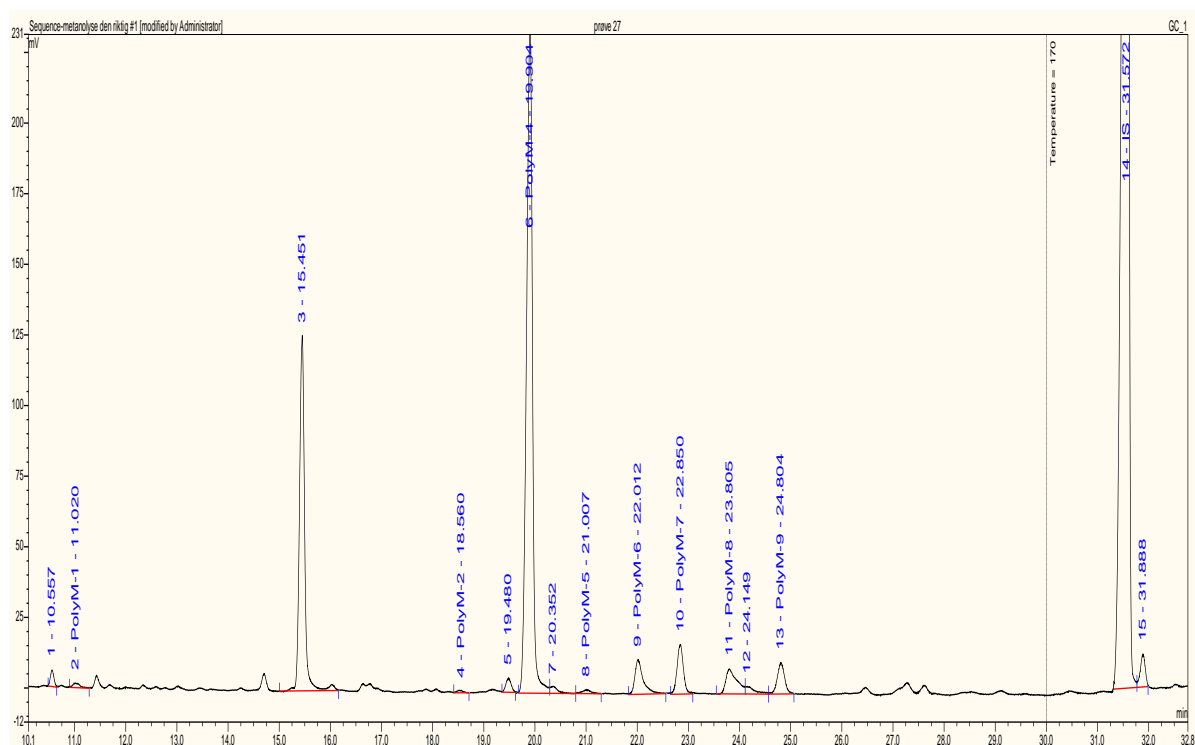
4.1 KARAKTERISERING AV ALGINATPRØVENE

4.1.1 Monosakkaridesammensetning

Monosakkaridsammensetning av alginatprøvene ble bestemt ved metanolyse og GC metode.

Figurene nedenfor viser GC-kromatogram til M-100 urenset, M-100 rensset, og M-60.

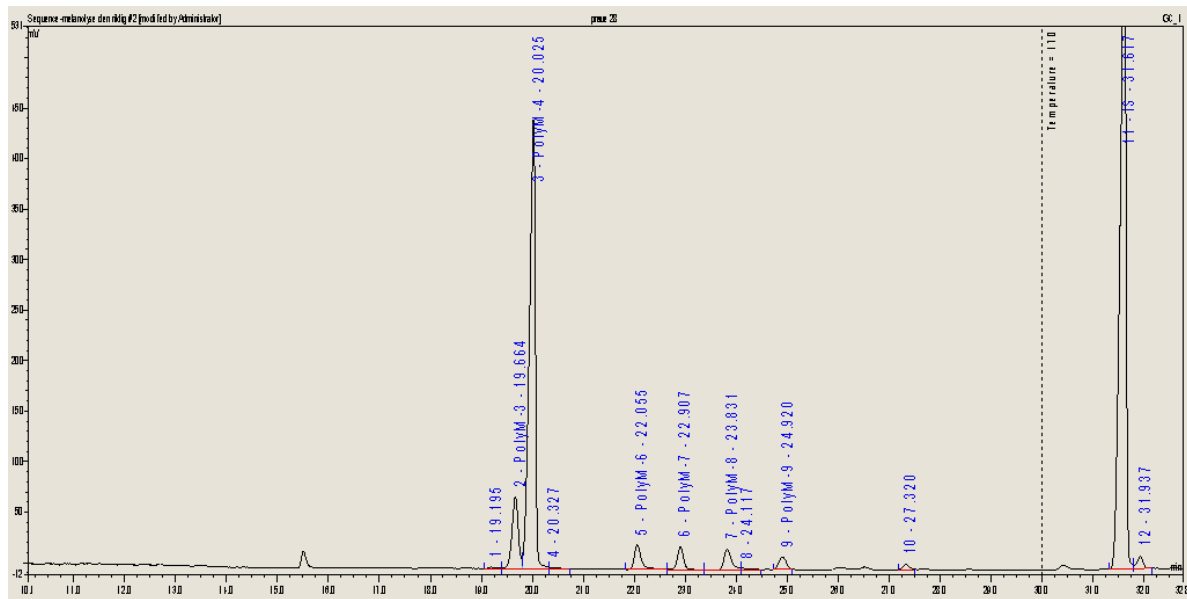
Mannitol ble brukt som intern standard i dette forsøk og den kommer ut ved 31,5 minutter.



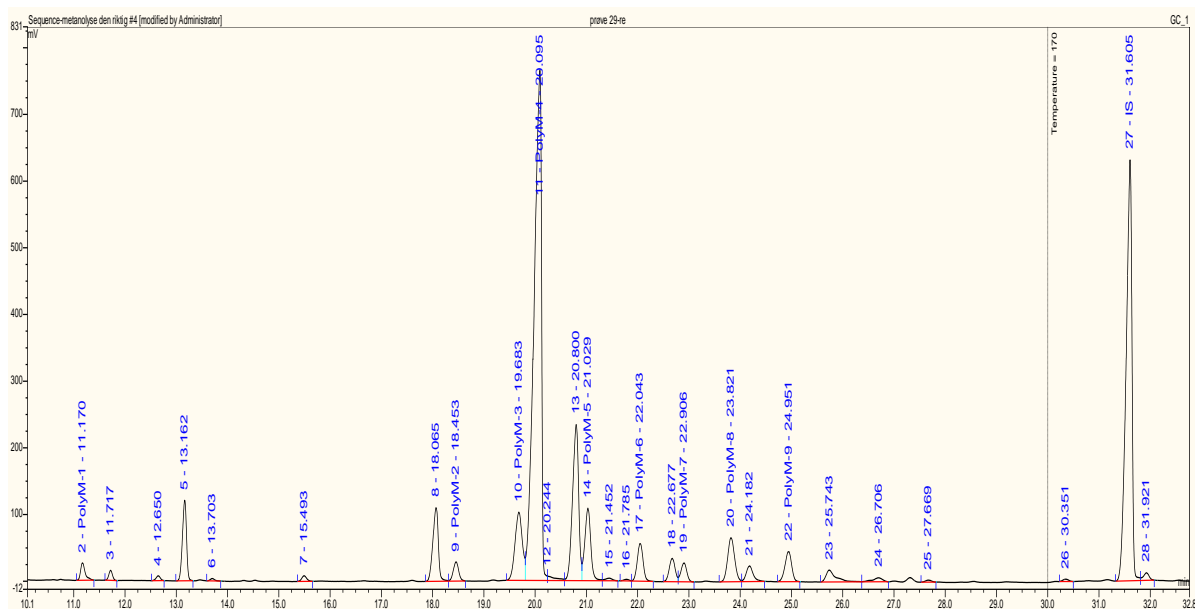
Figur 4.1: Gasskromatogram av urenset M-100 etter metanolyse og TMS derivatisering. Den største toppen ved retensjonstid rundt 20 minutter og små topper ved 11,0-, 18,5-, 21,0-, 22,0-, 22,8-, 23,8-, 24,8 minutter er fra mannuronsyre. Toppen ved 16 minutter kan være en annen type monosakkarider eller kontaminering. Intern standard topp er ved 31,5 minutter.

Figur 4.1 viser urenset M-100 som eluert ut med en hoved topp ved retensjonstid rundt 20 minutter og små topper ved 22,0-, 22,8-, 23,8-, 24,8 minutter. Alginat M-100 rensset inneholder alle de samme toppene som M-100 urenset, se Figur 4.2. Det som skiller mellom de to alginatene er toppen ved 16 minutter, som finnes seg i M-100 urenset men ikke M-

100 renset. Dette kan tyde på at det er noen monosakkarider som bare finnes i M-100 urenset, eller bare kontaminering.



Figur 4.2: Gasskromatogram av renset M-100 etter metanolyse og TMS derivatisering. Den største toppen ved retensjonstid rundt 20 minutter og små toppen ved 19,6-, 22,0-, 22,9-, 23,8-, 24,9 minutter er fra mannuronsyre. Intern standard topp er ved 31,6 minutter.

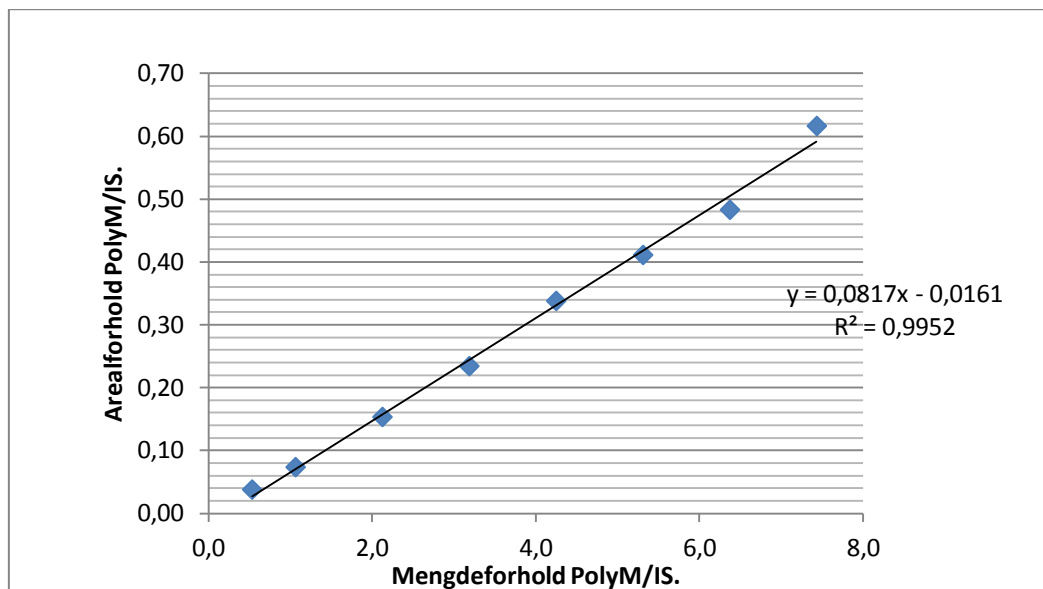


Figur 4.3: Gasskromatogram av M-60 etter metanolyse og TMS derivatisering. Mannuronsyretoppene ved 11,1-, 18,4-, 19,6-, 20,0-, 21,0-, 22,0-, 22,9-, 23,8-, og 24,9 minutter. Toppene ved 13,1-, 18,0-, 20,8-, 22,0-, 24,1 minutter antagelig fra guluronsyre. Resten av de små toppene igjen kan galaktose, mannose, ved 25,7-, 26,7-, 27,6- minutter.

GC-kromatogrammet av M-60 består av mange topper, se Figur 4.3. Dette er fordi M-60 inneholder både mannuronsyre og guluronsyre, som har vært beskrevet i metoden (3.3.3). Mannuronsyretoppene ble identifisert ved 11,1-, 18,4-, 19,6-, 20,0-, 21,0-, 22,0-, 22,9-, 23,8-, og 24,9 minutter jfr. Figur 4.3. Dermed er toppene ved 13,1-, 18,0-, 20,8-, 22,0-, 24,1 minutter antagelig fra guluronsyre. De resterende små toppene kan være galaktose eller mannose, ved 25,7-, 26,7-, 27,6- minutter.

4.1.2 Tillaging av M-100 standarkurve for metanolyse

M-100 standardkurven ble laget ved metanolysemetode av M-100 med forskjellige konsentrasjoner. Arealforholder av M-100 og intern standard (IS) ble plottet mot mengdeforhold M-100/ IS. for å få en lineær standardkurve, se Figur 4.4.



Figur 4.4: Beregnet standardkurve for M-100 med forskjellige konsentrasjoner av M-100. På y-aksen er arealforholdene av M-100 og IS ved ulike mengde av M-100. På x-aksen er mengdeforhold av M-100 og IS i området 0-1,6 mg. Tillaging av standardkurven er utført ved metanolyse og GC.

Likningen i figuren ble brukt som standard til å beregne mengder mannuronsyre i M-60 basert på vekt, når standard til mannuronsyre ikke er kommersielt tilgjengelig, se Figur 4.5 og tabell 1.

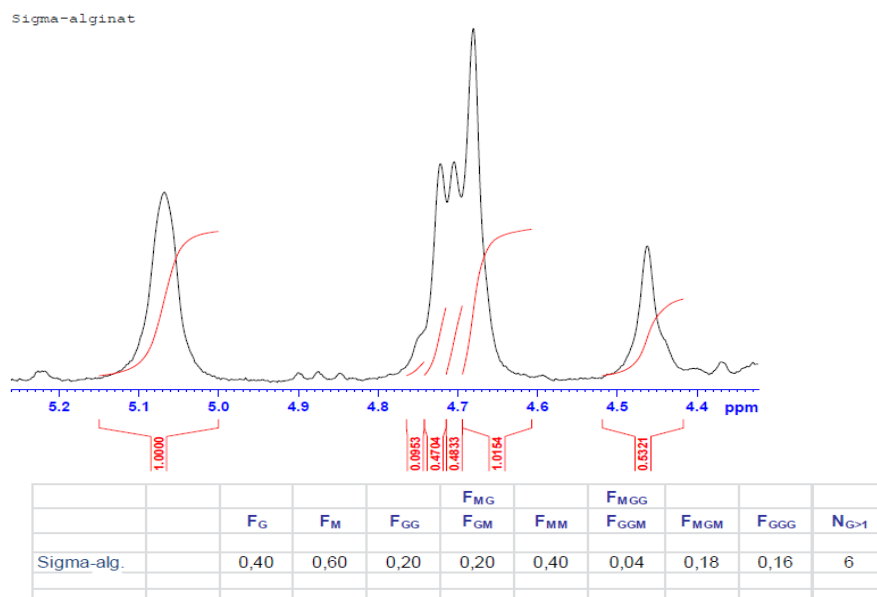
Tabell 1. Estimert monnosakkaridsammensetning i M-60 og M-100 i prosent av den total sukkermengden bestemt ved metanolyse. Mannuronsyreinnhol er beregnet ut fra likningen fra standardkurven M-100.

	Urenset M-100 (%)	Renset M-100 (%)	M-60 (%)
Mannuronsyre	99,59	99,38	78,11
Guluronsyre	i.d.*	i.d.*	19,94
Mannose	i.d.*	i.d.*	0,78
Galaktose	0,41	0,62	1,17

*i.d. = ikke detektert

4.1.2 $^1\text{H-NMR}$ -analyse av M-60, M-75 og M-94

Monosakkaridsammensetning i M-60 ble bestemt ved $^1\text{H-NMR}$ -analyse av. Figur 4.6 viser $^1\text{H-NMR}$ spekter av M-60. I tillegg til M-60 ble det også gjort $^1\text{H-NMR}$ -analyse på M-75 og M-94, og mengde mono-, diade-, og triade-frekvens ble beregnet i prosent, se tabell 2.



Figur 4.5 : $^1\text{H-NMR}$ spektrum av M-60.

$^1\text{H-NMR}$ -analysen til M-60 fra Sigma viste at den bestod av 40 % guluronsyre (F_G) og 60 % (F_M) av mannuronsyre. Resultatet er ikke overensstemmende med det vi fikk ved metanolyse, hvor det ble funnet at M-60 inneholdt 20% guluronsyre og 80% av mannuronsyre. I M-75 ble

det funnet 6 % mannuronsyre, 94 % guluronsyre. M-94 ble det detektert 25 % guluronsyre og 75 % mannuronsyre.

Tabell 2. Monosakkridsammensetning i M-60, M-75 og M-94 beregnet ut ifra $^1\text{H-NMR}$. Beregning av mengde i prosent av den totale sukkermengde.

	FG/M (mono-frekvens)		FMG (diade-frekvens)			FMGG (triade-frekvens)		
	FG	FM	FGG	FGM	FMM	FGGM	FMGM	FGGG
M-60	40%	60%	20%	20%	40%	4%	18%	16%
M-75	25%	75%	0%	5%	88%			
M-94	6%	94%	20%	6%	70%			
SUM	100%							

Frekvenser i alginatene ble også analysert på $^1\text{H-NMR}$, se tabell 2. M-75 inneholder ingen G-blokker (FGG) mens andel G-blokker er den samme i M-60 og M-94. M-75 vist å ha størst andel M-blokker (FMM). M-75 og M-94 ble ikke utført detektering på triaden-frekvens.

4.2 TILLAGING AV ALGINAT- OLIGOSAKKARIDER

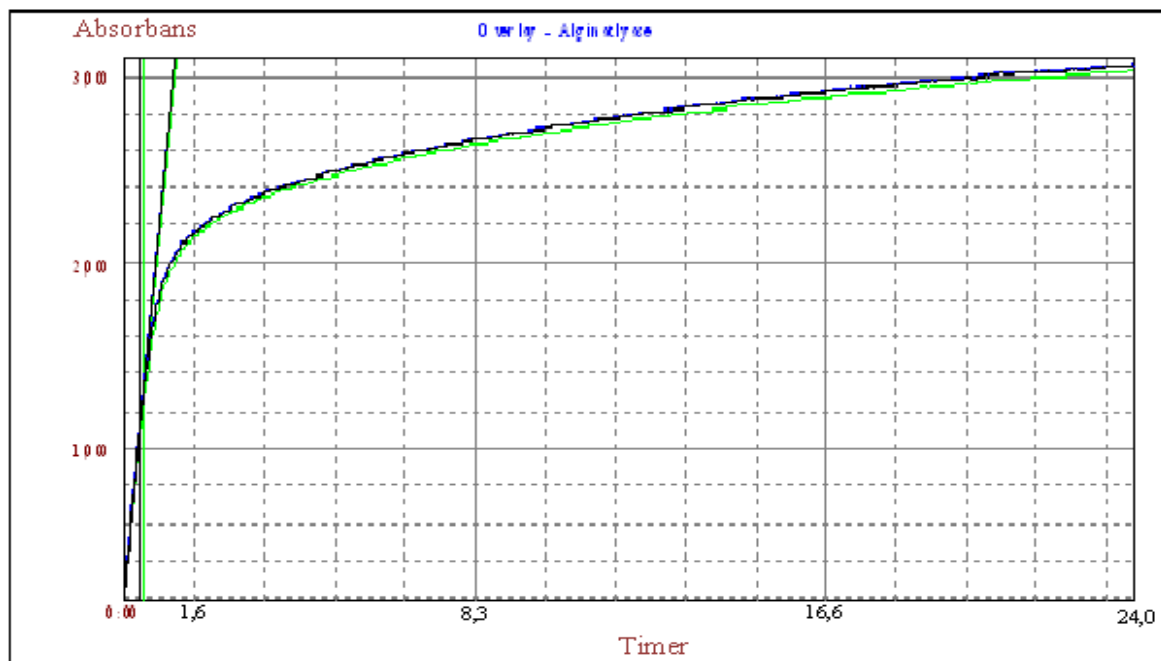
4.2.1 Degradering av M-60 med alginatlyase

Alginatlyasen degraderer M-60 til oligosakkarider ved å bryte opp glykosidbindinger. Degraderingen skjer ved β -eliminering, slik at det dannet en dobbeltbinding mellom C4 og C5. Dobbeltbindingen absorberer UV-lys ved 230 nm derfor ble prøven målt absorbans ved denne bølgelengden. Det ble gjort tre utprøvinger som har nevnt i metode 3.4.1, der hver degraderingsprosess går over 24 timer, for å sjekke om når enzymaktivitet blir metta.

A. Alginat og alginatlyase ble løst i buffer

Figuren 4.6 viser at enzymaktiviteten er størst den første halvannen time, men minsker etterhvert, opptil 24 timer. Det kan være pga. lite substrat igjen at det ikke skjer så stor

endring i konsentrasjon og derfor begynner kurven å flate ut. Den maksimale målte absorbans er ca. 3150.

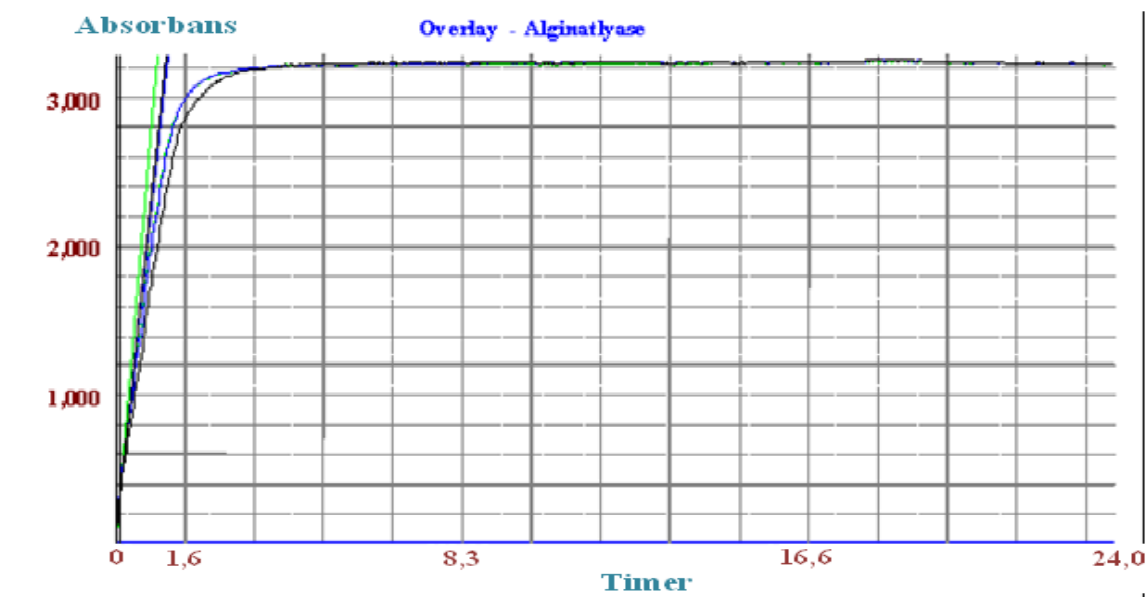


Figur 4.6: UV- måling ved 235 nm av M-60 under degradering med alginatlyase, der alginat og alginatlyase ble løst i buffer ved pH 6,3

B. Alginat er løst i vann og alginatlyase løst i buffer

For å undersøke nærmere på bufferkapasitet har noe betydning for enzymaktiviteten, byttet vi ut buffer med vann i alginatprøven. Alginat ble løst i vann og enzymet fortsatt løst i buffer.

Enzymreaksjon viser å være forskjell enn det vi hadde fått i A. Resultatet av UV-målingen på figur 4.7, viser en voldsom enzymaktivitet i den første halvannen time, og ved 5 timer oppnår den maksimale absorbans på 3400, før kurven jevne seg utover til 24 timer. Degraderingen skjer ut til å stoppe helt opp etter 5 timer, kurven stabiliserer seg.

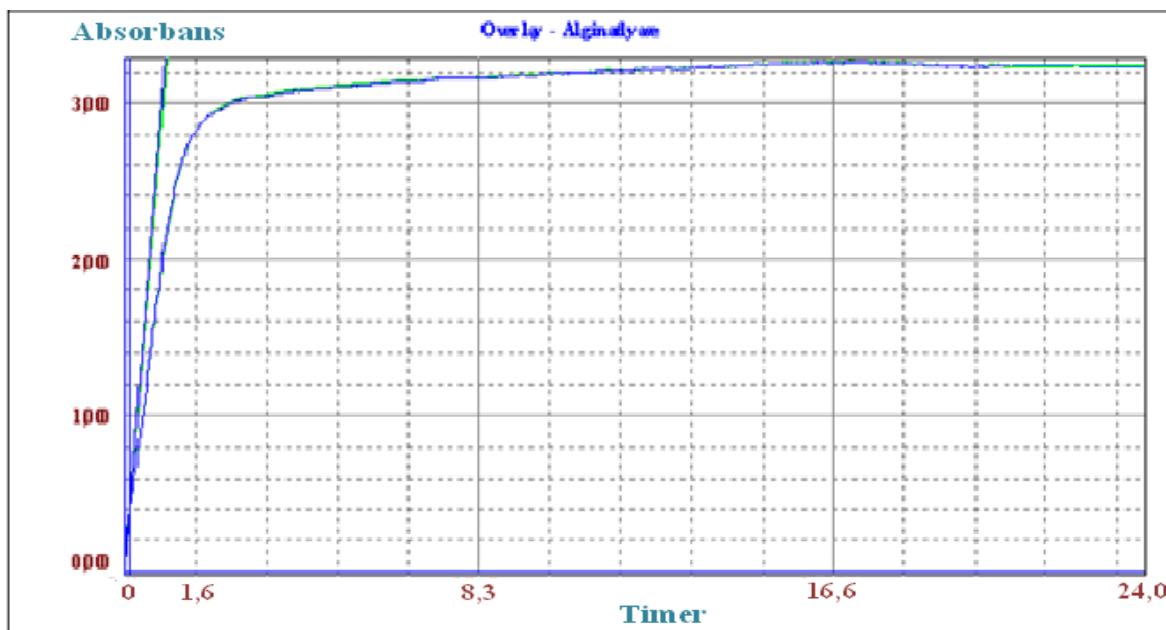


Figur 4.7: UV- måling ved 235 nm av M-60 under degradering med alginatlyase, der alginat er løst i vann og alginatlyase løst i buffer pH 6,3

C. Alginat og alginatlyase løst i vann

Det ble videre undersøke om enzymaktiviteten vil gå uansett om buffer er ikke tilsatt. Dette er fordi vi vil helst ikke ha saltet i prøven, for da trenges ikke vi å desalte prøven før ionebytterkolonnen.

Resultatet av alginat og alginatlyase løst i vann, viser at det meste av enzymaktiviteten skjer i den første halvannen time av degraderingsprosessen, deretter forsetter degradringen i liten grad til den begynner å jevnes ut etter 16 timer, se Figur 4.8. Den optimal enzymaktivitet er rundt 19 timer og den maksimal absorbanmåling ble målt ved ca. 3200. Siden alginat og alginatlyase viser å fungere bra, valgte vi å benytte disse betingelsene til videre eksperimenter.



Figur 4.8: UV-måling ved 235 nm av M-60 under degradering med alginatlyase, der alginat er løst i vann og alginatlyase også er løst i vann.

4.2.2 Ionebytterfraksjonering av M-60- oligosakkrider

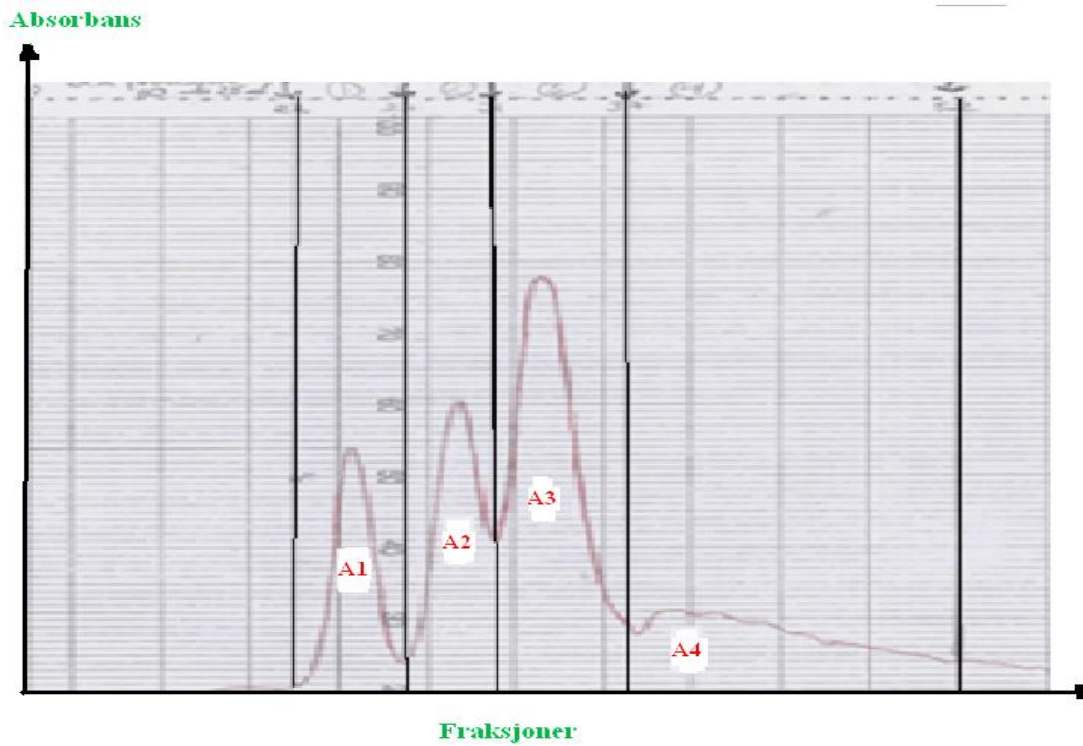
Prøven av alginat og alginatlyase løst i vann ble inkubert i romtemperatur i rundt 19 timer for optimal enzymaktivitet (den tiden enzymaktivitet stoppet helt opp), før den ble kokt opp ved 100°C i 5 min. for denaturering av enzym. For å isolere rene oligosakkrider forsøke vi å fraksjonere prøven på ionebytterkolonnen.

Mange prosedyrer ble prøvd ut på ionebytterkolonnen for å fremstille så rene alginat-oligosakkaridfraksjoner som mulig. Det ble først kjørt på en liten kolonne 5 mL volum (analytisk ionebytterkolonne).

4.2.2.1 Analytisk ionebytterkolonne

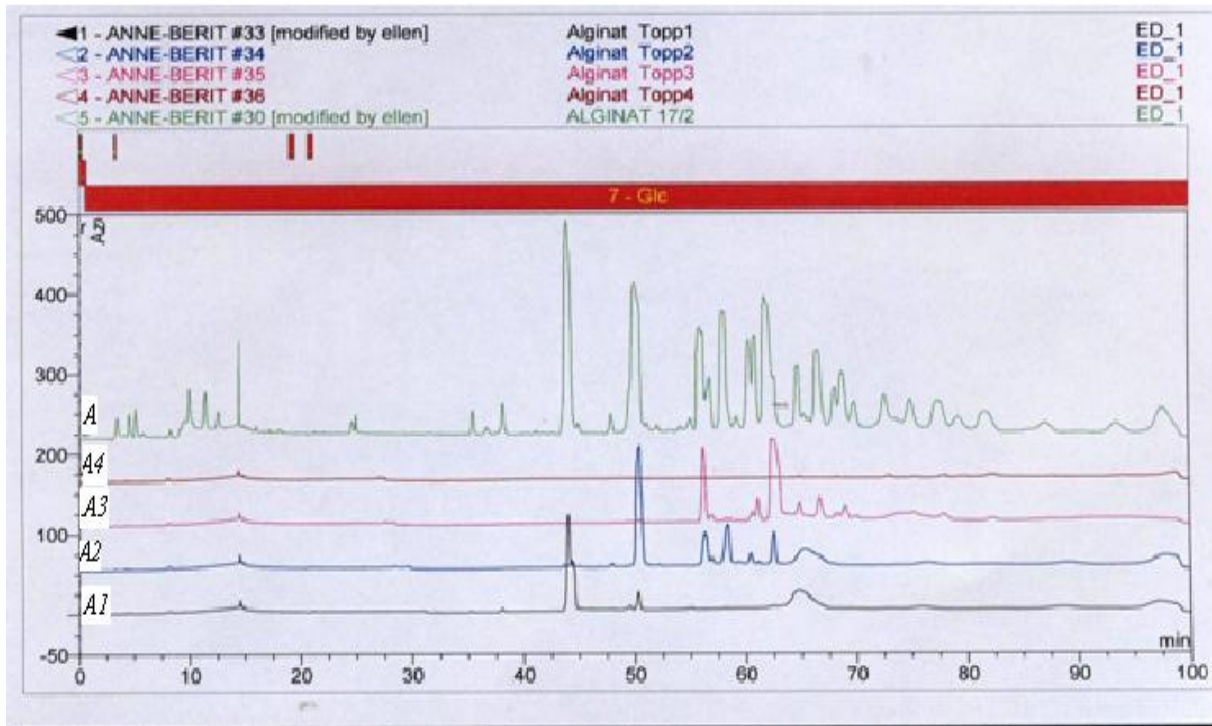
Kolonnen som ble brukt var HiTrap DEAE Sepharose Fast Flow. UV-detektor var koplet til ionebytterkolonnen, og de målte absorbansen til de oligosakkarider som ble eluert ut ved ulike saltkonsentrasjoner. Prøven ble målt absorbans ved 280 nm. Separasjonen skjer på basis av ladningstetthet som har sammenheng med oligomerens størrelse. Derfor kortest oligosakkaridekjeder med den minste molekylvekten ble eluert ut først, deretter oligosakkarider med større molekylvekt og lengre polymekjeder.

Elueringen viste 3 klare separerte topper, og den ble delt opp i fire fraksjoner, som blir kalt for fraksjoner A1, A2, A3, A4, som vist på Figur 4.9. Det er de tre store fraksjoner og det området som kommer ut etter fraksjonen A3. Gradient begynte fra 0- 0,5 M NaCl.



Figur 4.9: Elueringsprofil av M-60 etter behandling med alginatlyase og fraksjonering på en Sepharose fast flow kolonnen (5mL). Elueringen blir delt opp i 4 fraksjoner, som blir kalt fraksjon A1, -A2, -A3, -A4, som er merket på figuren, utført ved UV-detektor.

Fraksjonene A1,-A2, -A3, -A4 ble videre analysert på en HPAEC-PAD for å finne ut om det er mange ulike oligosakkarider i fraksjonene, se Figur 4.9. Her skjer det en separasjon av oligosakkarider basert på ladningstetthet, derfor har stoffet som eluert ut tidligst minst molekylvekt og er etterfulgt av stoffer med større molekylvekt. Prøven av alginat etter behandling av alginatlyase, men som ikke har vært fraksjonert på ionebytterkolonnen ble også analysert på HPAEC-PAP. Dette er for å sammenligne prøven før og etter alginat-oligosakkaridene ble separert, se Figur 4.10.



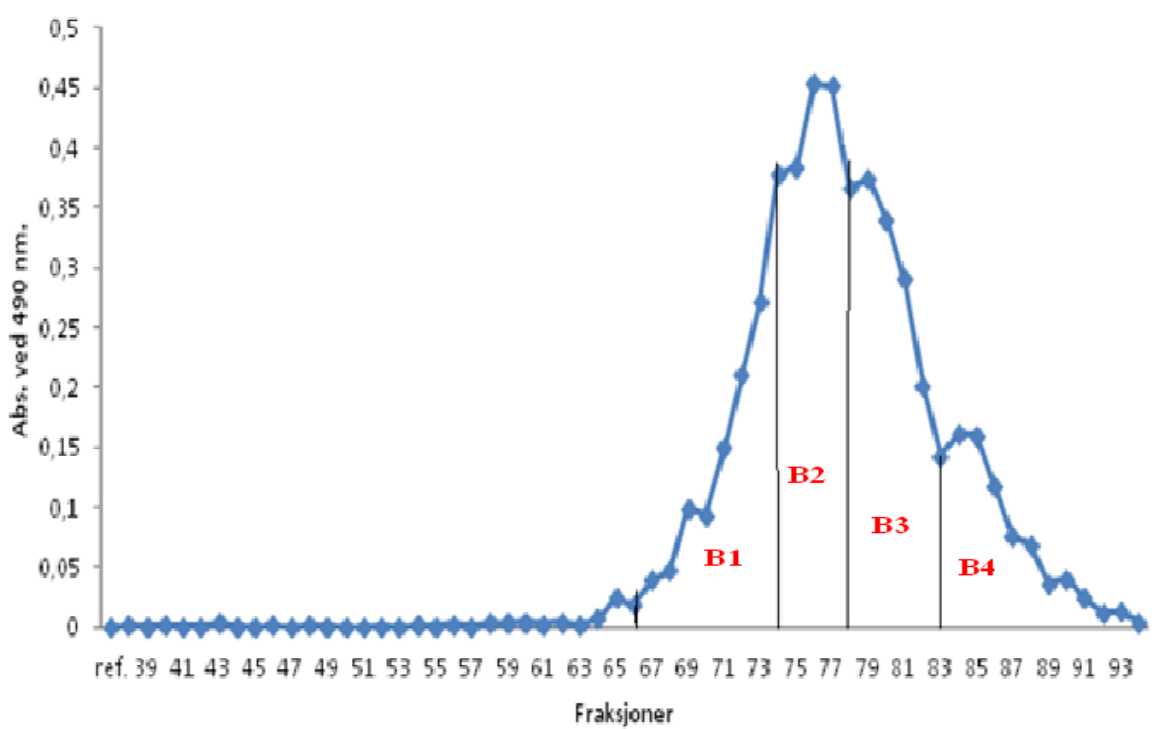
Figur 4.10: HPAEC-PAD av lyasebehandlet M-60. Ufraksjonert lyasebehandlet M-60 (A). Etter ionebytterkolonnen ble behandlet alginat prøven separert til 4 fraksjoner: Fraksjon A1, -A2, -A3, -A4 som er merket på venstre siden av figuren.

Kromatogram viser at fraksjon A1 har en stor topp, som kommer ut ved 44 minutter. Fraksjon A2 har en stor topp av oligosakkarid som kommer ut ved 50 minutter, og flere små toppen ved 56-62 min. Fraksjonen inneholder den samme topp som A3 ved tiden 52 min., dette kan forklares ved at de to ikke grunnlinje separert på ionebytterkolonnen, ser Figur 4.9. Fraksjon 4 har ingen spesiell topp, her er det ikke noe særlig karbohydrater til stede. Lyasebehandlet M-60 før separasjon på ionebytterkolonnen er merket med (A) på figuren. Det er flere toppen her, og den har som forventet de samme toppene som de andre fraksjonene. Elueringen er basert på ladningstetthet, derfor stoffet med minst molevekt blir eluert ut først siden de har minst ladninger. Det stemmer med at fraksjon 1 blir eluert ut tidligere enn fraksjon 2, og fraksjon 2 eluerer ut tidligere enn fraksjon 3. Fraksjon 2 viser å inneholde noen av de samme oligosakkaridene som fraksjon 3, ved elueringstid 60-70 minutter.

Vi sender ikke fraksjonene til MS-analyse pga. dette er bare en test for å se om prøven blir separert. Derfor er vi ikke interessert i å vite hva de fraksjonene inneholder, når som de ikke skal bruke til autoaktivering og celleforsøk.

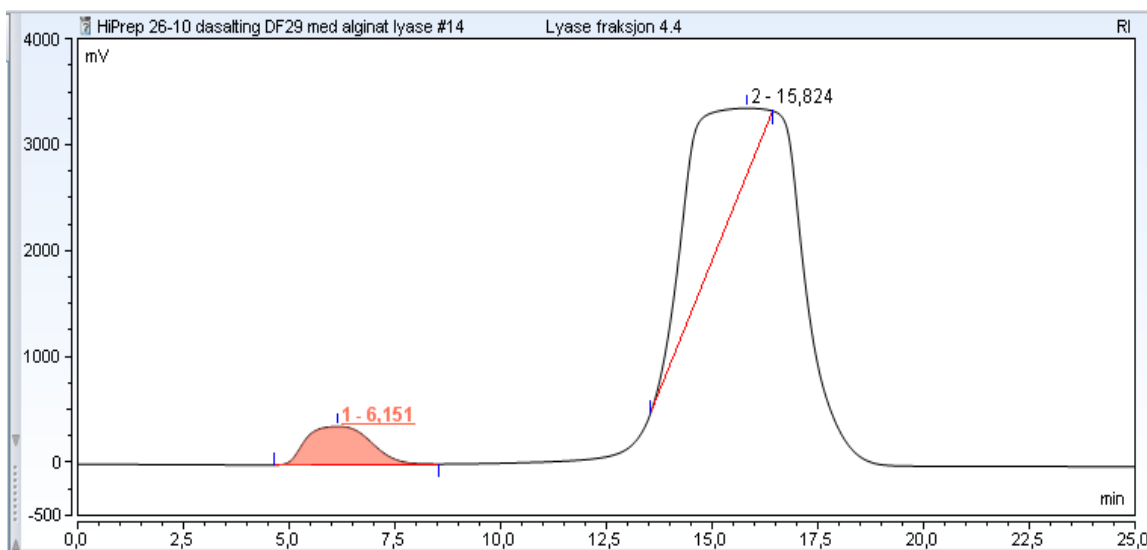
4.2.2.2 Preparativ ionebytterkolonne

Det er ønskelig å fremstille store mengder av alginatoligosakkarider, og den analytisk kolonnen er for liten til å fraksjonere større mengde, derfor ble det prøvd ut en større kolonne på 138 mL. Fraksjonering 150 mg stoffet på en gang var en for stor mengde at det gav videre et nytt problem. Prøvemengden er for mye slik at den gikk over deteksjons øvre grense til UV-detektor. Derfor ble det foretatt fenol-svovelsyretest etter ionebytterkolonnen. Eluatene ble testet med denne metoden og deretter ble det utført absorpsjonsmåling. De absorpsjons-verdiene ble brukt til å lage en karbohydratprofil. Elueringen ble delt opp i fire fraksjoner og blir kalt for fraksjon -B1, -B2,-B3, -B4, se Figur 4.11. Denne gangen viser ikke de toppene så tydelige som med den analytisk kolonnen.



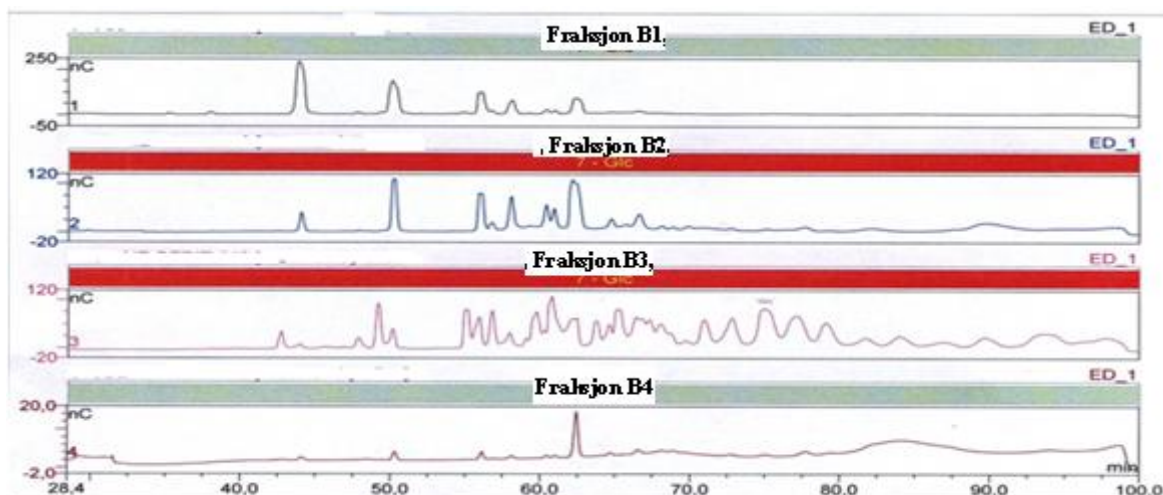
Figur 4.11. Karbohydratprofil av M-60 degradert med alginatlyase, fra fenolsyretest målt ved 490nm. Prøven blir delt opp i 4 fraksjoner og blir kalt for fraksjon B1,- B2,- B3, og- B 4, merket på figuren, utført ved fenol-svovelsyretest

For å kunne bruke prøven videre på autoaktivering og celleforsøk, ble fraksjonene desaltet med en gelfilteringskolonnen (se metode 3.4.5). Prøven vår ble eluert ut tidlig som en liten topp (5-7,5 min.), men salttoppen kommer senere som en stor topp (områder), se Figur 4.11. Figuren er et eksempel på kromatogram til desalting av fraksjon B4.



Figur 4.12: Et av de kromatogrammene til desalting av fraksjonene, fraksjon B4. Den lille toppen som eluert ut ved 5-7,5 min. er prøven, men den store toppen som kommer etter er salter. Y-aksen er refraktiv indeks (RI), x-aksen er tiden (minutter). Desalting ble utført med en HiPrep Desalting kolonnen.

Fraksjon B1,-B2,-B3,-B4 blir også analysert på en HPAEC-PAD før desalting for å finne ut om det er mange ulike oligosakkarider i fraksjonene av de lyasebehandlede prøvene.



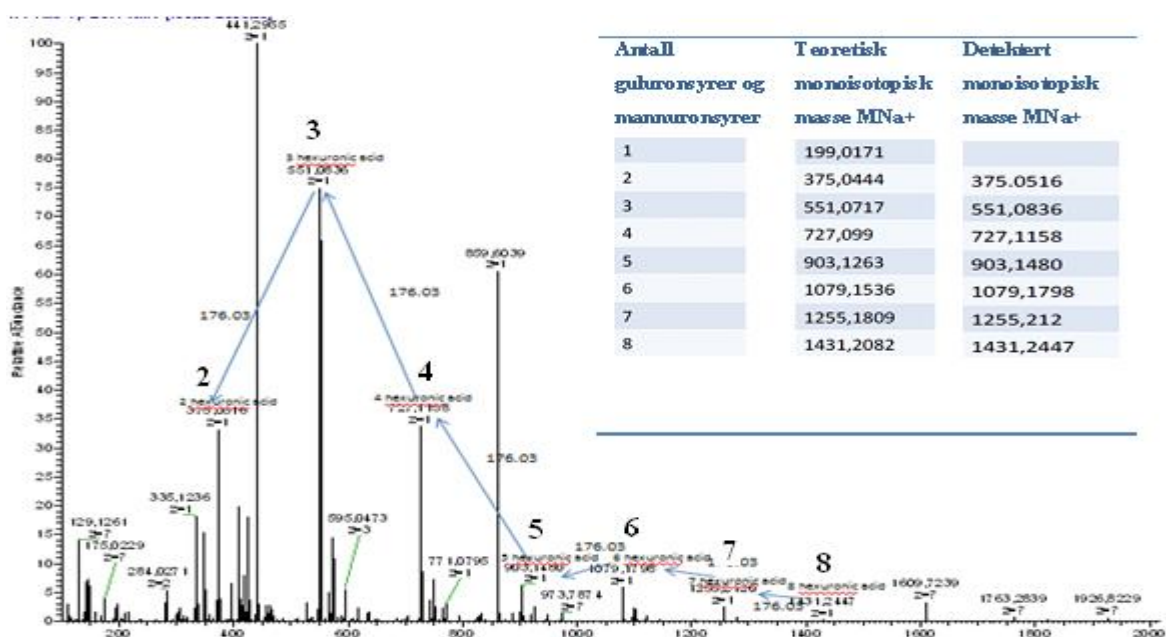
Figur 4.13: Kromatogram av lyasebehandlet M-60 fraksjon B1, -B2, -B3, -B4, utført av HPAEC-PAD.

HPAEC-PAD -kromatogram av lyasebehandlet M-60 fraksjon B1, -B2, -B3, -B4 er vist i figur 4.13. Fraksjon B1 har en stor topp som ble eluert ut tidlig i forhold til de andre fraksjonene, den ble eluert ut ved 43 minutter. Denne toppen finnes også i fraksjonene B2, B3 men i veldig liten mengde. Fraksjon B2 har en stor topp ved 50 minutter og noen flere i

området 55-70 minutter. På fraksjonen B3 er det flere overlappende topper som tyder på at her er det flere oligosakkarider.

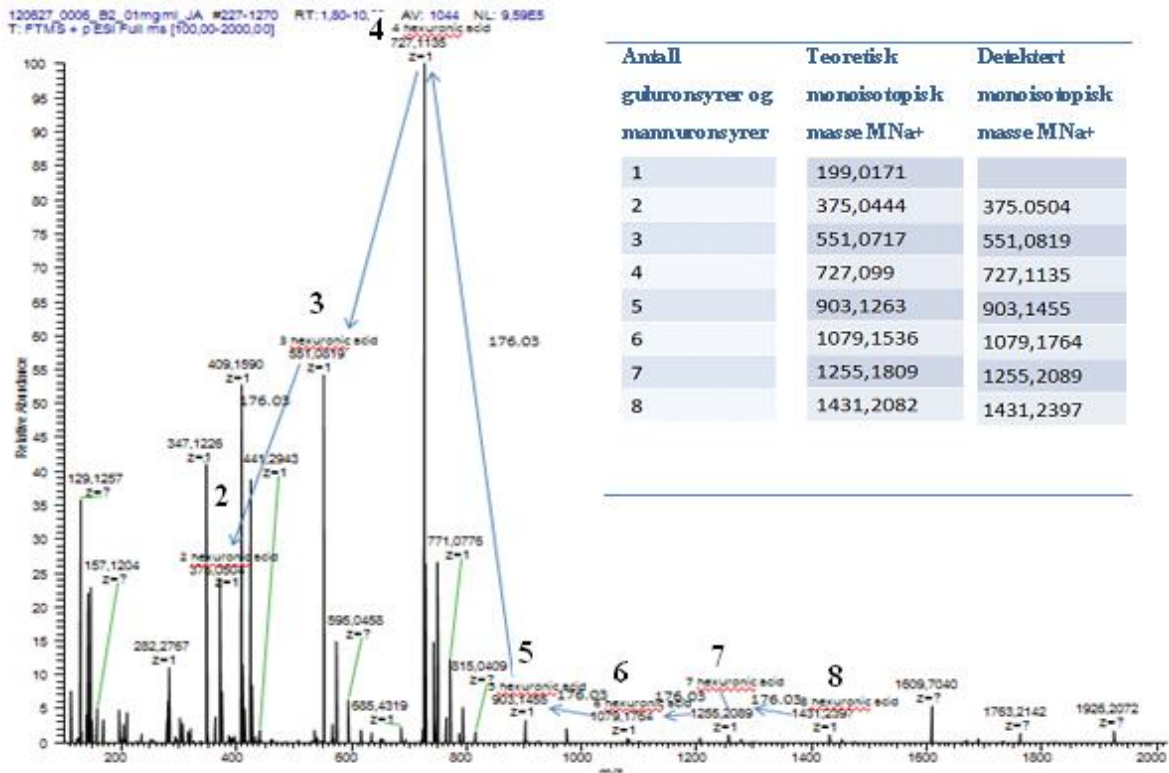
For å få kvalitativ- og kvantitativ analyse av fraksjonene ble prøvene sendt til Biomolekylær institutt for MS-analyse for å bestemme hvilke oligomere i fraksjonen ut i fra masse til molekyllioner på disse oligosakkaridene. De fleste av de detekterte fraksjonene ble fragmentert på en god måte i ionefella. Alle detekterte oligomere er detektert som Na addukter og med en ladning $[M+Na]^+$. Massene av oligosakkarider angis som m/z, som betyr masse/ladning. Den teoretiske massen for en uronsyre pluss Na^+ er 199,0171. I fraksjon B4 finnes det ingen oligosakkarider.

MS-spektrt til fraksjon B1, se Figur 4.14 ble følgende detektert: (m/z 375) som tilsvarer en dimer, (m/z 551) trimer, (m/z 727) tetramer, (m/z 903) pentamer, (m/z 1079) heksamer, (m/z 1255) heptamer og (m/z 1431) oktamer. Ifølge denne MS-analysen finner vi mest tetramere i fraksjonen og det største detekterte molekylet er oktamer i veldig liten mengde.



Figur 4.14: MS-spekter og tabell av detekterte oligosakkarider i lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon B1. Tabellen på viser de detekterte oligosakkariderene som finnes i fraksjonen B1. Der 1= monomer, 2= dimer, 3= trimer, 4= tetramer, 5= pentamer, 6= heksamer, 7= heptamer, 8= oktamer.

Det er litt avvik i tallene til den teoretisk- og detektert masse, men avviket er så lite at det er ubetydelig. Tallene fra 1 til 8 beskriver her størrelse på oligosakkarider fra monomer til oktamer oligosakkarider.

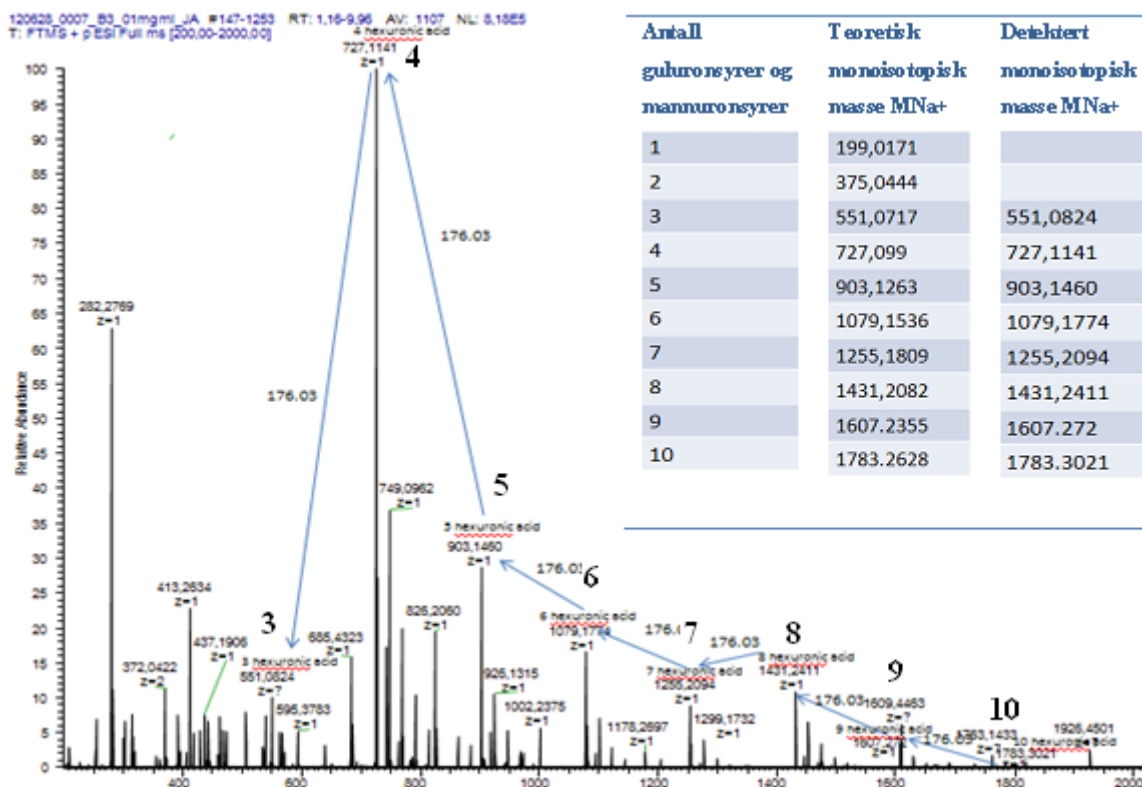


Figur 4.15: MS-spekter av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon B2.

I fraksjon B2 ble det detektert dimer, trimer, tetramer, pentamer, heksamer, heptamer og oktamer. MS-spekret viser mest innhold av tetramer, og så kommer trimer og dimer, men det er veldig lite av de andre oligosakkaridene, se Figur 4.15. Tabellen til høyre på figur viser de detekterte oligosakkaridene som finnes i fraksjonen B2.

- **Detektert oligomer i fraksjon B3**

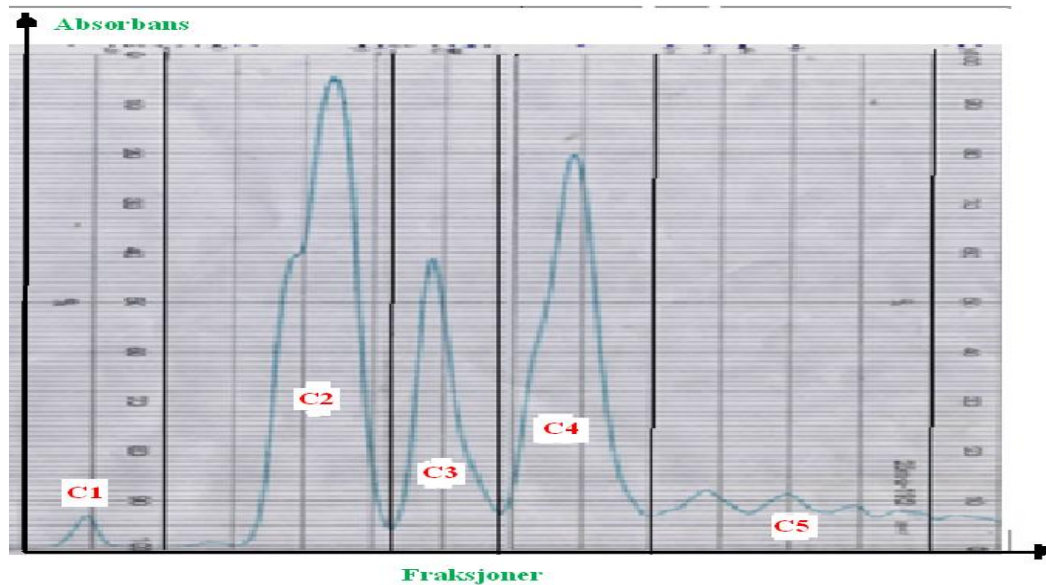
I sammenlign med de andre fraksjonene inneholder fraksjon B3 ikke dimer men trimer, tetramer, pentamer, heksamer, heptamer, oktamer, nonamer og dekamer. MS-spekret på Figur 4.16 viser at tetramer finnes mest her og så kommer pentamer, mens de andre oligosakkaridene er det veldig lite av. Tabellen til høyre på figur viser de detekterte oligosakkaridene som finnes i fraksjonen B2.



Figur 4.16: MS-spekter av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon B3.

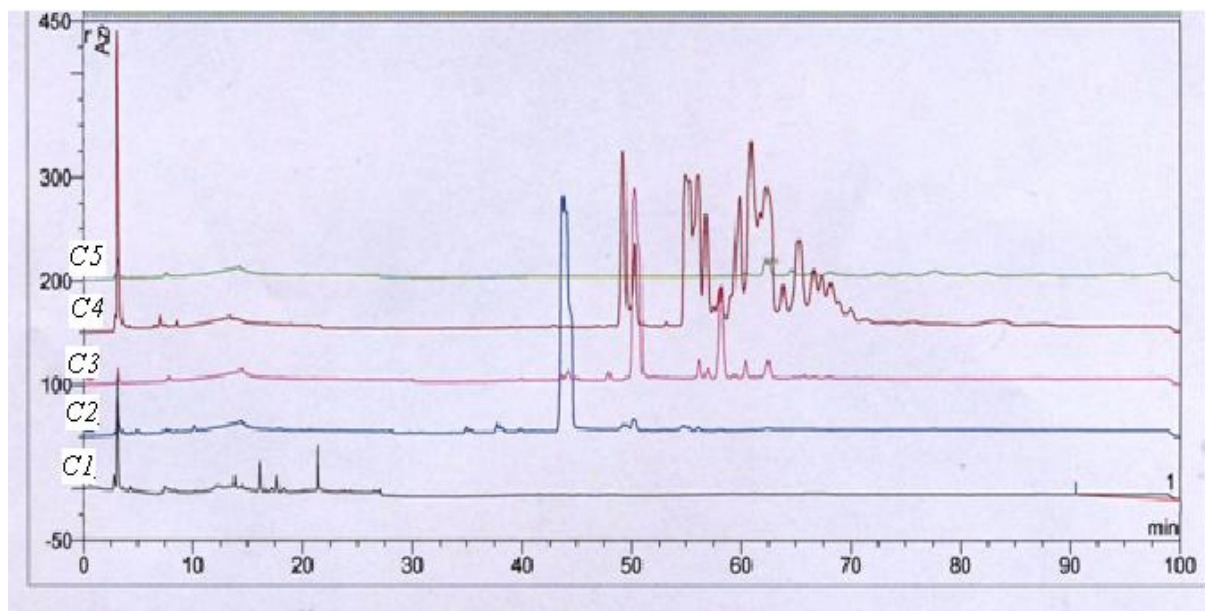
4.2.2.3 Semi-preparativ ionebytterkolonne

Etter utprøving med den preparativ ionebytterkolonnen, gav ikke den så klart separasjon av prøven som den analytiske kolonnen, derfor ble det prøvd ut en seriekopping av fem analytisk kolonner med kolonnevolum på 25 mL. Elueringen viser godt separert topp, og denne gangen blir elueringen delt opp i fem fraksjoner, kalt for fraksjon C1,- C2, -C3, -C4, og -C5, se Figur 4.17.



Figur 4.17: Elueringsprofil av lyasebehandlet M-60 og fraksjonering i en semi-preparativ ionebytterkolonnen (5x5 mL). Den er delt opp i 5 fraksjoner, fraksjon C1,-C2,-C3,-C4, og -C5 som er merket på figuren, utført ved UV-deteksjon.

Her ble også fraksjonene videre analysert på en HPAEC-PAD før desalting for å finne ut om det er mange ulike oligosakkarider i fraksjonene av den lyasebehandlede prøven.



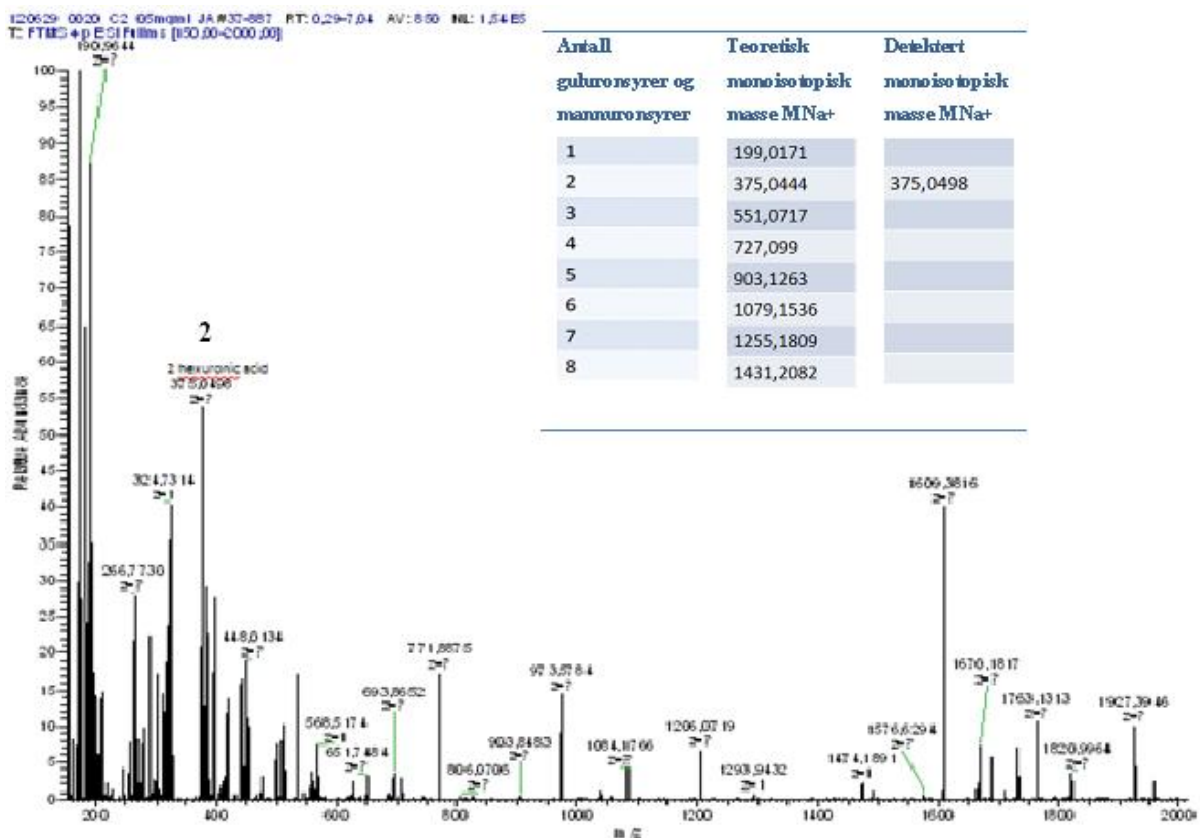
Figur 4.18: Kromatogram av lyasebehandlet M-60 fraksjon C1, -C2, -C3, -C4,og -C5 som er fraksjonert på semi-preparativ ionebytterkolonnen. Fraksjons nummer er merket på venstre side av figuren, utført med HPAEC-PAD.

HPAEC-PAD -kromatogram av lyasebehandlet M-60 fraksjon C1, -C2, -C3, -C4 og -C5 er vist i figuren 4.18. Elueringen viser at fraksjonene C1 og C5 har ikke noe særlig stoffer her siden de ikke har noe betydelige topper. Fraksjon C2 eluert ut en stor topp ved 44 minutter som ikke finnes i de andre fraksjonene. Ved tiden 50-60 minutter ble det eluert ut stoffer både fra fraksjon C3 og C4. Men det er flere stoffer som ble eluert ut overlappende med hverandre ved tiden 55-72 minutter i fraksjon C4.

Fraksjonene ble også analysert på MS. I fraksjon C1 finnes det ingen oligosakkarider. De andre fraksjonene ble det detektert oligosakkarider.

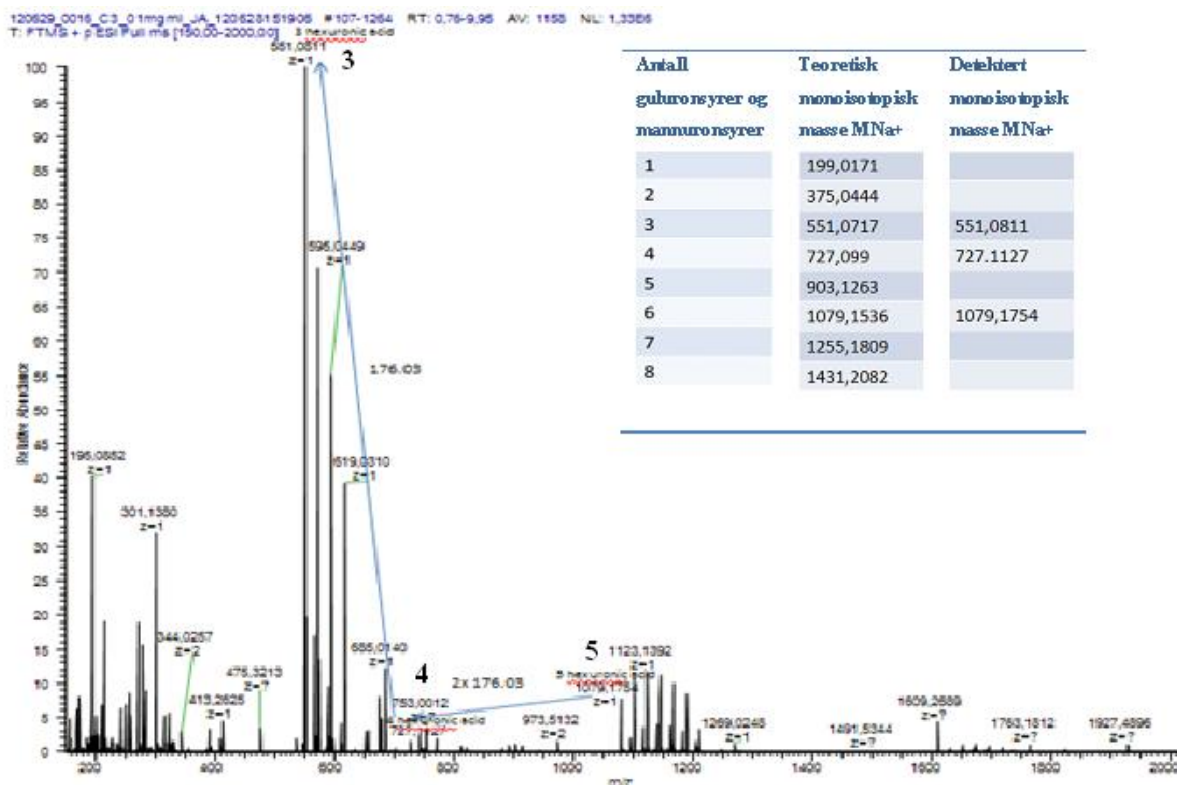
- **Detektert oligomer i fraksjon C2**

Det ble det detektert kun dimer i fraksjon C2, dette betyr at det er mulig å fremstille en ren dimer med den analytisk kolonnen. MS-spektret til fraksjonen C2 med tabellen til høyre på figur som vises kun dimer som ble detekterte i fraksjonen, se Figur 4.19.



Figur 4.19: MS-spekter av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon C2.

- **Detektert oligomer i fraksjon C3**

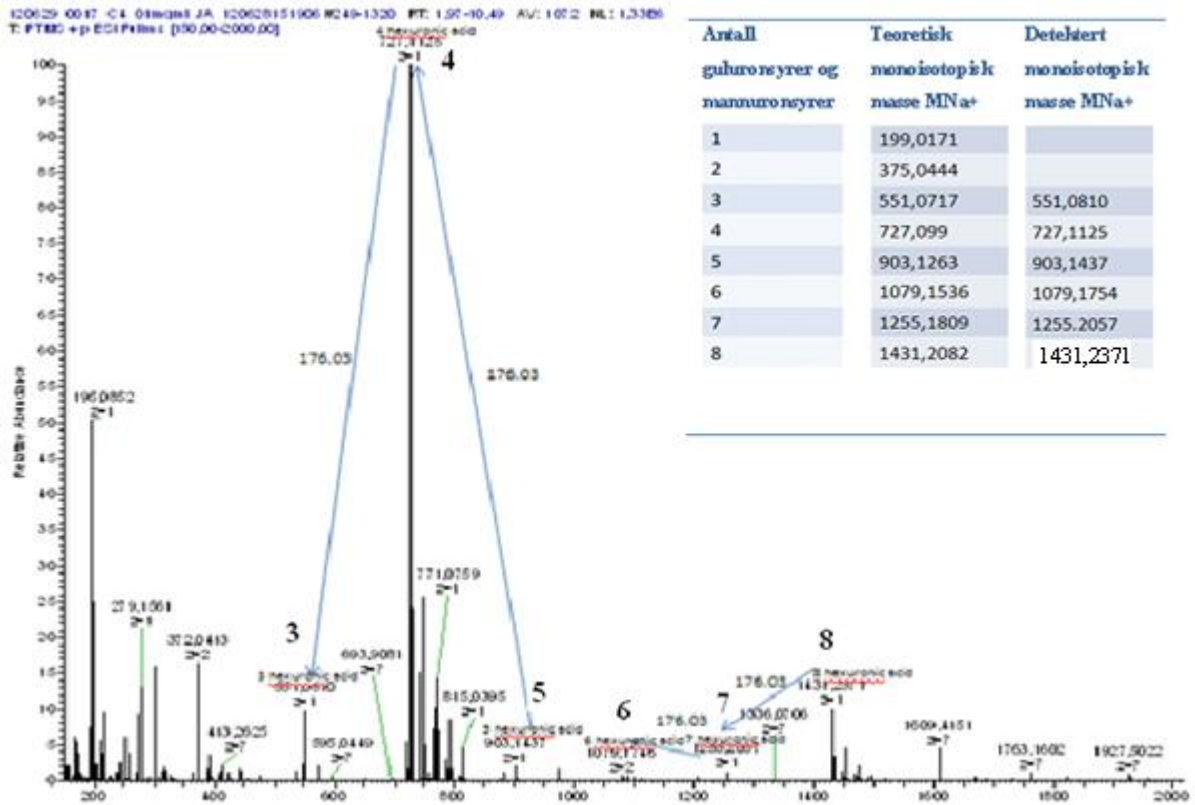


Figur 4.20: MS-spekter av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon C3.

Figur 4.20 viser MS-spekter av fraksjon C3 med tre detekterte oligosakkarider, trimer, tetramer og heksamer, som mest av alt er trimer. Tabellen til høyre på figur vises de detekterte oligosakkaridene i fraksjonen C3.

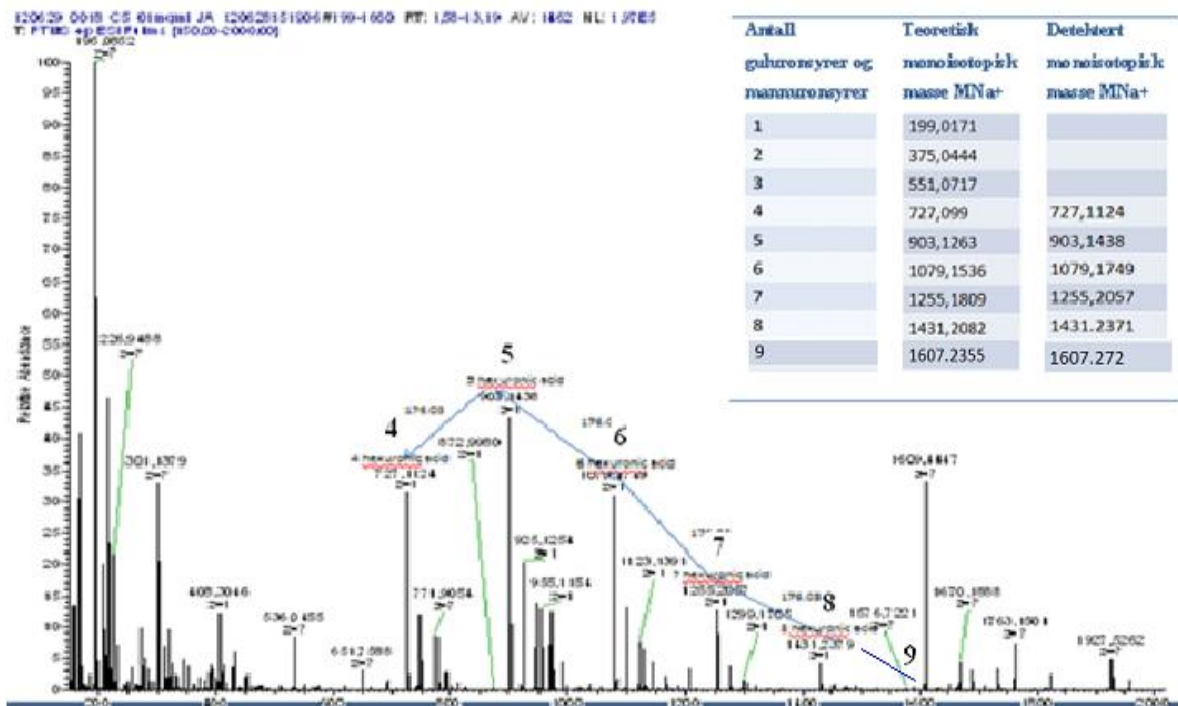
- **Detektert oligomer i fraksjon C4**

I fraksjon C4 ble det detektert trimer, tetramer, pentamer, heksamer og heptamer. Her finner vi mest av tetramer, men veldig lite av de andre oligosakkaridene, se Figur 4.21. Tabellen på figuren vises de detekterte oligosakkaridene i fraksjonen.



Figur 4.21: MS-spekter av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon C4.

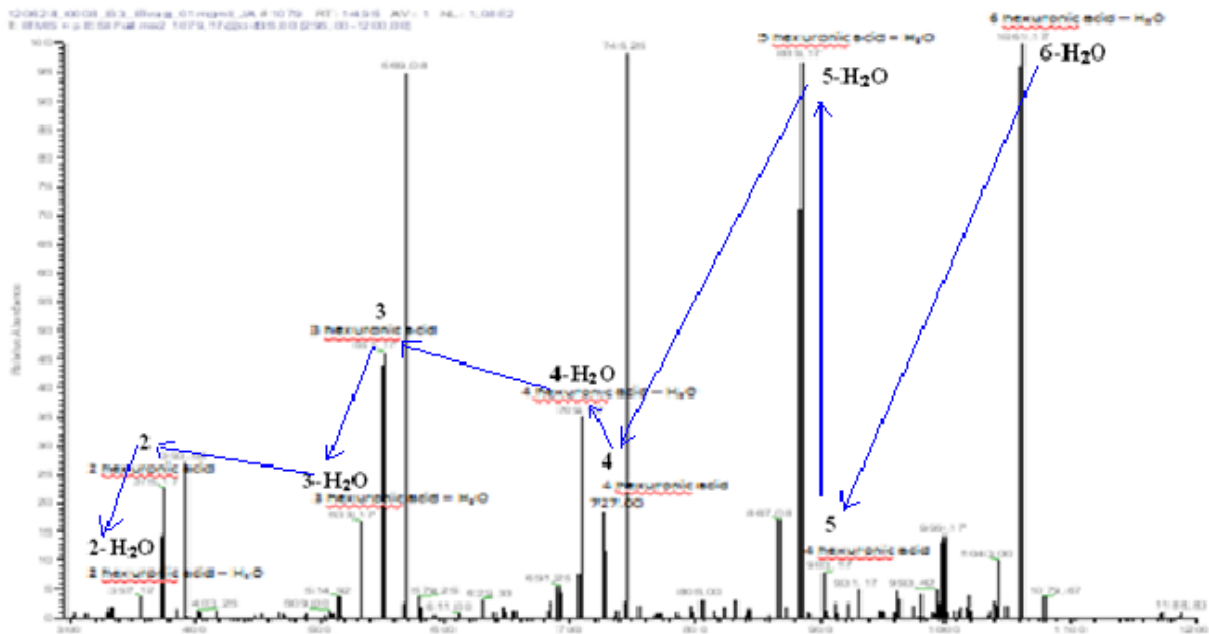
- Detektert oligomer i fraksjon C5



Figur 4.22: MS-spekter av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon C5.

I MS-spekteret av lyasebehandlet M-60 alginat fraksjon C5 ble følgende detektert: tetramer, pentamer, heksamer, pentamer, oktamer og nonamer. Det er pentamer det finnes mest av, deretter tetramer og heksamer, mens det er veldig små mengde av de andre, se Figur 4.22.

I tillegg ble det kjørt MS/MS av dimer, trimer, tetramer, pentamer og heksamer oligomer. Disse fragmenteringene viser at de identifiserte massene kommer fra alginat oligosakkarider og ikke noe annet tilfeldig stoff med samme masse. Figur 4.23 er et eksempel på MS/MS kromatogram til heksamer.



Figur 4.23: MS/MS av m/z 1079,17 (heksamer) som blir fragmentert til pentamer (m/z 903,14), tetramer (m/z 727,11), trimer (m/z 551,08), dimer (m/z 375,05).

Spektrt viser heksamer med toppen m/z 1097,17. Molekylet ble ionisert på nytt slik at den fragmenterer ved glykosidbindingene til heksamer uten vann (-18) (m/z 1061), videre til pentamer (m/z 903,14), pentamer uten vann (m/z 885), tetramer (m/z 727,11), tetramer uten vann (m/z 709), trimer (m/z 551,08), trimer uten vann (m/z 533), og dimer (m/z 375,05) og dimer uten vann (m/z 357).

Ut i fra spektrene blir det gjort beregning for den relativ mengdeforhold av oligomer i hver fraksjon. Oversikt over innholdet av de forskjellige fraksjonene, andel prosent av oligomer som finnes i fraksjonene er vist på tabell 3.

Tabell 3. Den relativ mengdeforhold av oligomer som finnes i hver fraksjon.

	Fraksjon	Mono	Dimer	Trimer	Tetramer	Pentamer	Heksamer	Heptamer	Oktamer	Nonamer	Dekamer
Preparativ ionebytter- kolonne	B1		21%	48%	21%	4%	4%	2%			
	B2		4%	32%	60%	2%	0,4%	0,8%	0,7%		
	B3			0,5%	59%	17%	10%	5%	6%	2%	0,5%
Semi- preparativ ionebytter- kolonne	C2		100%								
	C3			91%	1,5%	7,1%					
	C4			8%	89%	1,7	1%				
	C5				26%	36%	25%	10%	3%	0,3	

4.2.2.1 Fraksjonering med sterk anionebytter

Prøvene ble også kjørt på en sterk anionbytterkolonnen HiTrap Q Fast Flow med samme programmeringen som er gjort i den analytisk ionebytterkolonne for å se om separasjon blir noen annerledes.



Figur 4.24: Elueringsprofil av M-60 etter behandling med alginatlyase og fraksjonering med en HiTrap Q Fast Flow kolonnen (5mL). Deteksjon foregikk ved hjelp av UV-detektor.

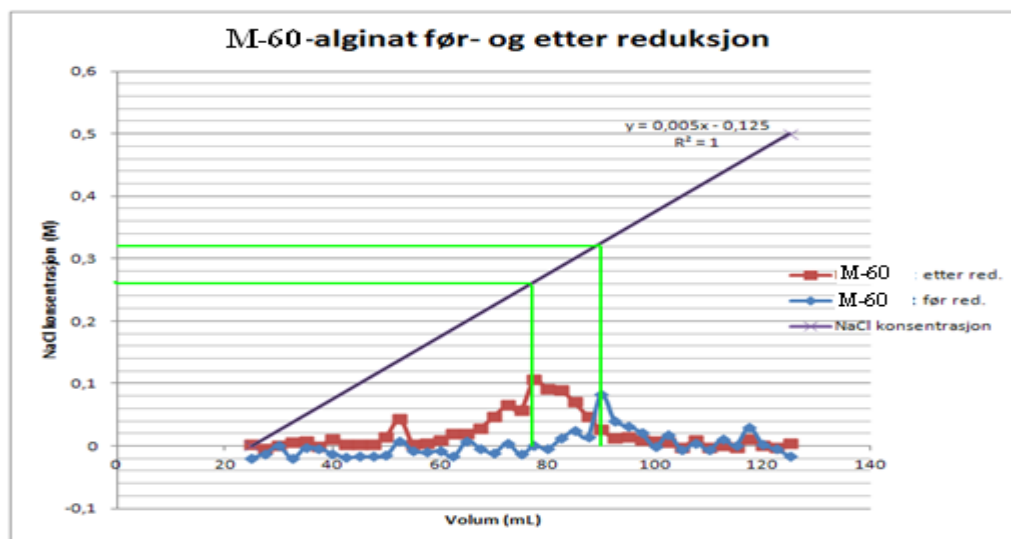
Figur 4.24 viser elueringen til alginat lyasebehandlet der gradient begynner fra 0 mL og går over 48 kolonnevolumer (240 mL) fra 0-0,5 M NaCl. Elueringsprofilen viser fire topper, der de tre første av dem er overlappet hverandre. På grunn av dårlig separasjon valgte vi ikke å gå videre med denne metoden.

4.3 KARBOKSYLSYREREDUKSJON

Det ble foretatt reduksjon av M-60 og M-100 med hensikt å fjerne ladninger fra uronsyrer i polymerene for å få mer nøytrale molekyler. Dette er for videre studere på betydning av alginats ladningen på legumainaktiviteten. For å finne ut hvor mye prøvene har blitt redusert, ble prøvene videre analysert med ionebytterkromatograf og NMR.

4.3.1 Ionebytterkarakterisering av redusert M-60 og - M-100

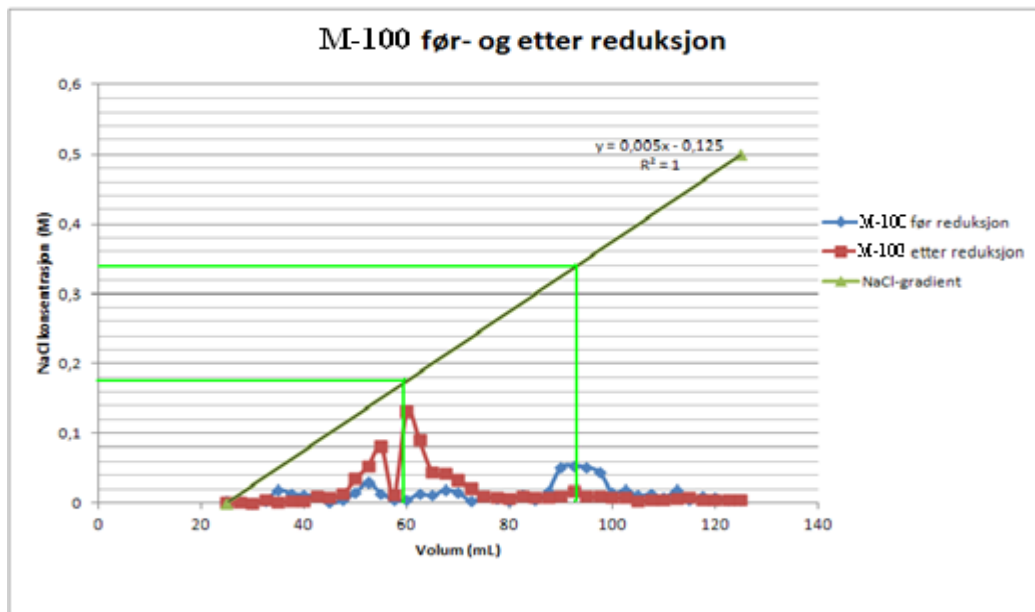
Etter at M-60 og M-100 ble redusert som beskrevet i metoden 3.7, ble det gjort en ionebyttekarakterisering av karbohydratprofil til M-60 og M-100 før og etter reduksjon for å undersøke om prøvene hadde fått færre ladninger etter reduksjon. Når prøvene har vært redusert vil karboksylsyregruppene evne til å binde seg til kolonnematerialet endres, og prøvene vil elueres ved en lavere NaCl konsentrasjon avhengig av hvor effektiv reduksjonen har vært. For å kunne beregnet NaCl konsentrasjon til eluering av hver av prøvene, ble det også plottet inn NaCl-gradient i diagrammet for å bestemme en ligning for gradienten. Verdiene for NaCl konsentrasjonen ved eluering av de høyeste punktene til karbohydrattoppene ble beregnet ved hjelp av ligningen og kan brukes som et mål for ladningstettheten av prøven. NaCl konsentrasjonen er gjengitt i tabell 4.



Figur 4.25: Karbohydratprofil av M-60 før og etter reduksjon med natriumborhydrid. Eluering fra en HiTrap DEAE-Sepharose fast flow ionebytterkolonne med NaCl gradient (0-0,5M). Karbohydratprofilen er målt med fenol-svovelsyretest og absorpsjonsmåling ved 490 nm.

Ubehandlet M-60 ble eluert ut ved 0,33 M NaCl mens redusert M-60 ble eluert ut ved 0,27 M NaCl, se Figur 4.25.

Ubehandlet M-100 ble eluert ut ved 0,33 M NaCl mens redusert M-100 ble eluert ut ved 0,175 M NaCl, se Figur 4.26.



Figur 4.26: Karbohydrofil av M-100 før og etter reduksjon med natriumborhydrid etter eluering fra en HiTrap DEAE-Sepharose fast flow ionebytterkolonnen med NaCl gradient (0-0,5M). Karbohydratprofilen er målt med fenol-svovelsyretest og absorbansmåling ved 490 nm.

Tabell 4. Oppsummering av beregnet NaCl-konsentrasjoner som M-100 og M-60 var eluert ut. Tallene er bestemt ut ifra karboprofilene på figur 4.25 og 4.26.

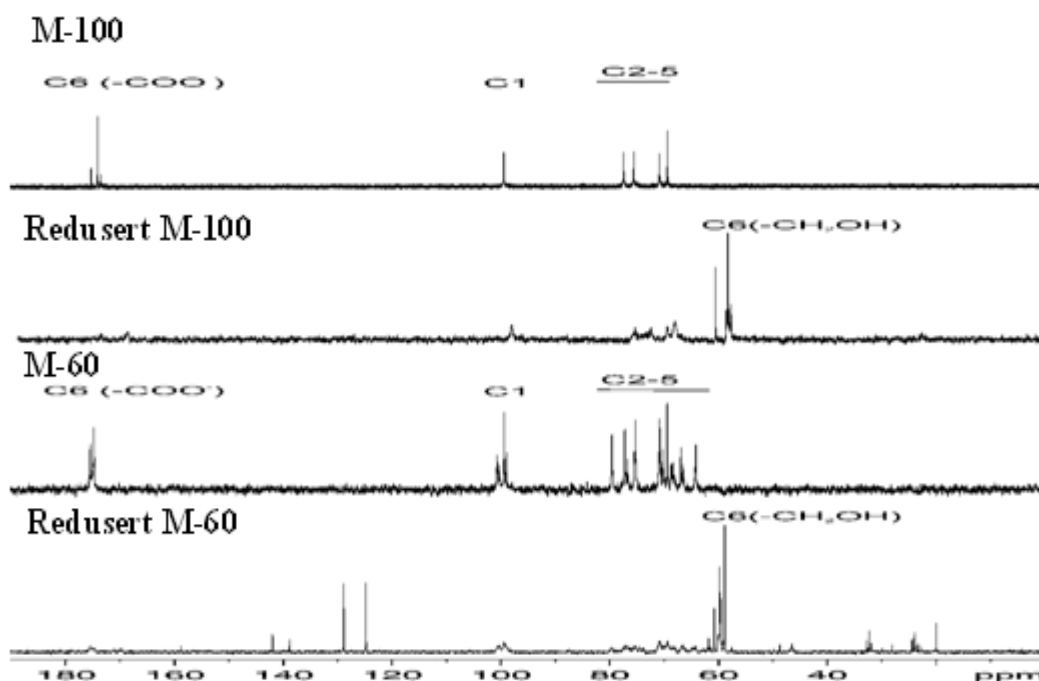
Prøve	M-100		M-60	
	Før reduksjon	Etter reduksjon	Før reduksjon	Etter reduksjon
NaCl konsentrasjon (M)	0,33	0,175	0,33	0,27

Tabell 4 viser også at M-60 og M-100 hadde like mye ladninger før reduksjon. Dette er ganske riktig siden M-100 og M-60 er forventet å ha likt ladninger uansett om

monnosakkridsammensetningen deres er ulike. Etter reduksjonen ble prøvene mindre ladet, men det er fortsatt ladninger tilstede. M-100 ser ut til å ha blitt redusert mer enn M-60.

4.3.2 ^{13}C -MNR-analyse av redusert M-60 og –M-10

Det ble også foretatt en NMR-analysering av M-60 og M-100 etter reduksjon. Arbeidet er utført av Dr. Finn Ackermann, NTNU. Etter reduksjon vil mannuronsyre bli omdannet til mannose, og guluronsyre omdannet til gulose. NMR-sprekter viser på figur 4.27.



Figur 4.27: ^{13}C -NMR-spektra til prøvene M-60 og M-100 før og etter reduksjon.

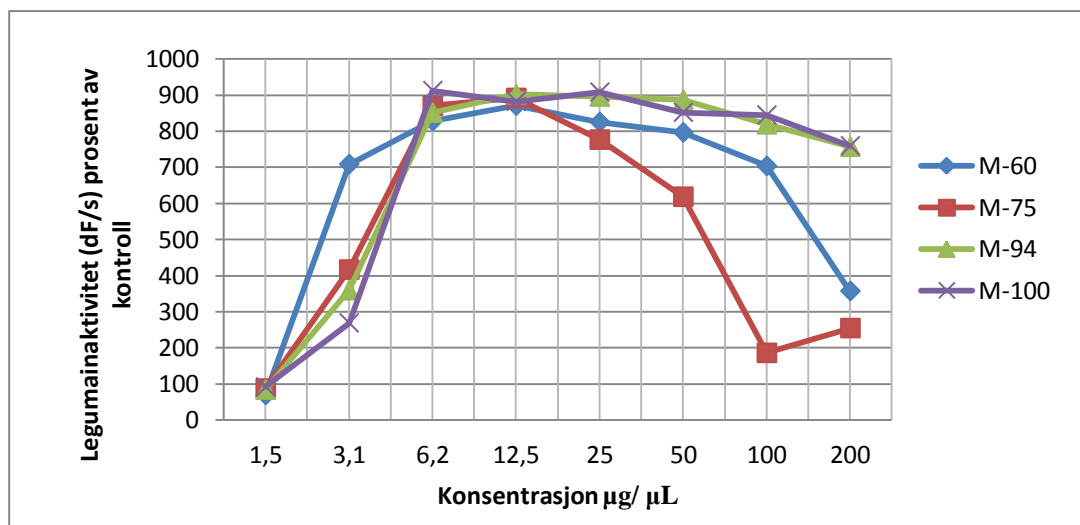
På begge spektrene av M-60 og M-100 vises signaler ved rundt 180 ppm, som viser at de inneholder karboksylsyrer i C-6 atomet. For M-60 rundt 100 ppm (C-1) er det to nærliggende topper som sannsynligvis fra mannuronsyre og guluronsyre. Tilsvarende har spektret fra M-100 bare ett signal ved 100 ppm. Signalene fra C2-C5 kommer i områder rundt 65-80 ppm [97]. Etter reduksjon sees signaler rundt 60 ppm, mens signalene ved 180 ppm er blitt kraftig redusert. Dette skyldes at karboksylsyrergruppen på C-6 (180 ppm) har blitt redusert til alkoholgruppe (60 ppm). En liten topp sees fortsatt ved 180 ppm for redusert M-60 (nederste spekter figur 4.27), noe som tyder på at reduksjonen ikke har vært fullstendig. Det ble estimert at prøvene var rundt 80-95 % redusert.

På spektret til M-60 etter reduksjon finnes det ukjente signaler ved 120-130 ppm. Signaler kommer sannsynligvis fra borat som ikke er fullstendig fjernes fra prøven etter reduksjon. Denne prøven ble derfor forsøkt å renses opp på nytt med samme vaskeprosedyre som tidlig.

4.4 EFFEKT AV ALGINAT PÅ AUTOAKTIVERING AV PROLEGUMAIN

4.4.1 Betydningen av alginats konsentrasjon og struktur ved autoaktivering av prolegumain

Alginatprøver med forskjellige konsentrasjoner ble laget for å stimulere autoaktiveringen av prolegumain. Prøvene ble inkubert ved 37°C og pH 4 i 4 timer. Aktivt legumain ble målt som prosent av kontroll (prolegumain tilsatt 0,9 % NaCl).



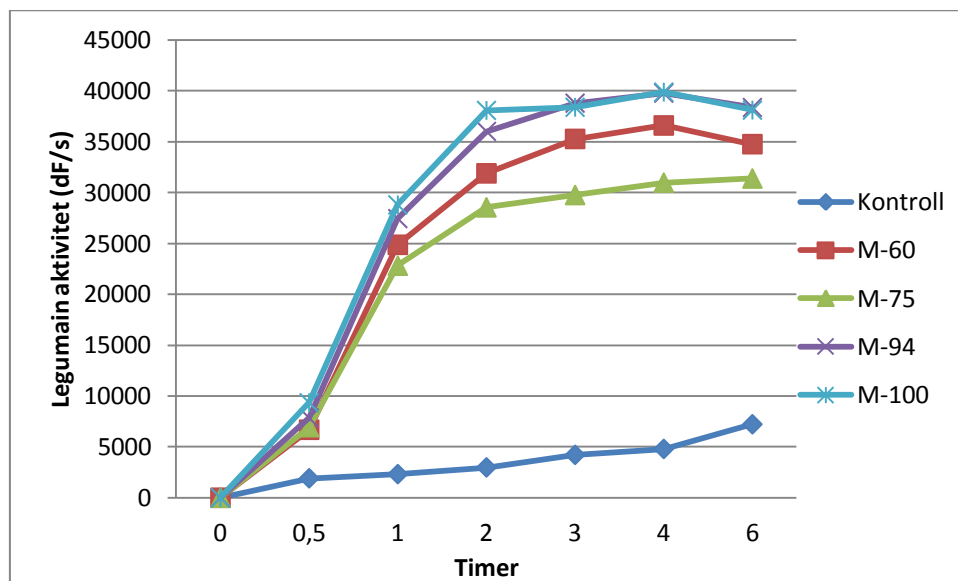
Figur 4.28: Autoaktivering av prolegumain akselerert av alginatprøvene i forskjellige konsentrasjoner. Det blir målt prosent aktivt legumain (dF/s) av kontroll etter 4 timers inkubering ved pH 4. ($n=1$).

Det viste seg at konsentrasjonen til alginatene har en betydning for autoaktiveringen, se Figur 4.28. Alginat M-94 og M-100 gir mye legumainaktivitet der konsentrasjonen er over 6,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, men utover den konsentrasjon stabiliserer aktiviteten seg. M-60 og M-75 viser høyest legumainaktivitet ved konsentrasjon 6,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ til 12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, men effekten reduseres ved

høyere konsentrasjon. Kurven til M-75 viste å synke mest av de andre alginatene ettersom konsentrasjon var over 12,5 µg/ µL. Forsøket ble gjort en gang.

4.4.2 Betydningen av inkuberingstiden med alginat ved autoaktivering av prolegumain

Resultatet av autoaktiveringen av prolegumain med alginatprøvene (2mg/mL) ved forskjellige inkuberingstider. Forsøket ble utført to ganger og begge gangene viste alginatprøvene å gi høyere aktivering av prolegumain sammenligne med kontroll. Figur 4.29 vises resultat til et representativt forsøk. Alginat M-100 og M-94 gav mest stimulering av autoaktivering med 7 ganger høyere legumain-aktiviteten enn kontroll, mens M-60 gav 6 ganger høyere og M-75 gav 5 ganger høyere legumainaktivitet. Effekten til alginatprøvene økte raskt fra 0 til 2 timer inkubering, men stabiliserte seg etter 2 timer.

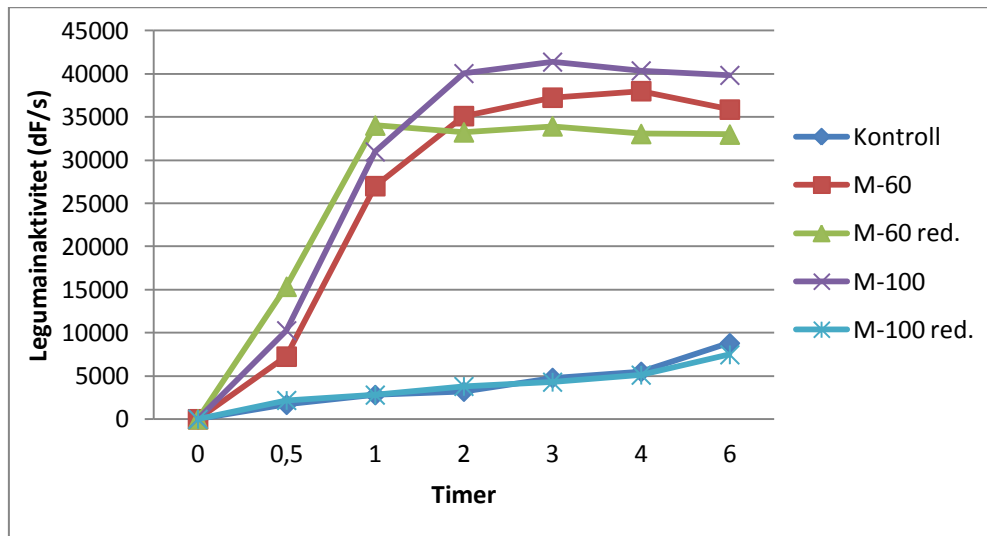


Figur 4.29: Aktivering av prolegumain akselerert av alginat prøvene ved forskjellige inkuberingstider ved pH 4. Kontroll er prolegumain tilsatt av 0,9 % NaCl. Et representativt forsøk er vist (n=2).

4.4.3 Betydning av alginats ladninger ved autoaktivering av prolegumain

Det er ønskelig å finne ut om alginats ladninger har betydning for legumainsaktivitet ved autoaktivering. Redusert M-60 og –M-100 ble stimulert direkte på prolegumain ved

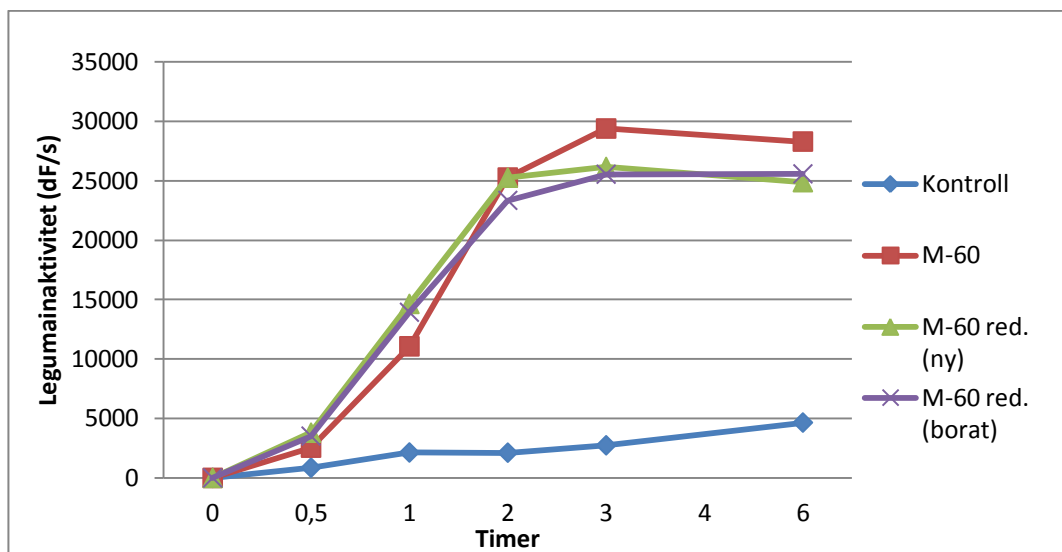
autoaktivering. Det ble gjort to autoaktiveringsforsøk av prolegumain ved stimulering av ubehandlet og reduserte alginatprøver ved forskjellige inkuberingstider.



Figur 4.30: Autoaktiveringsforsøk med ubehandlet og reduserte alginatprøver ved forskjellige inkuberingstid og pH 4. Kontroll er prolegumain tilsatt av 0,9 % NaCl. Et representativt forsøk er vist ($n=2$).

Figur 4.29 viser et representativt forsøk av de reduserte alginatprøvene, der det ble brukt den første lagede redusert M-60. Redusert M-60 gav omtrent likt effekt som ubehandlet M-60, med rundt 5 ganger høyere legumainaktivitet enn kontrollen, mens redusert M-100 gav ingen aktivitet i forhold til ubehandlet M-100 som gav 8 ganger høyere aktivitet.

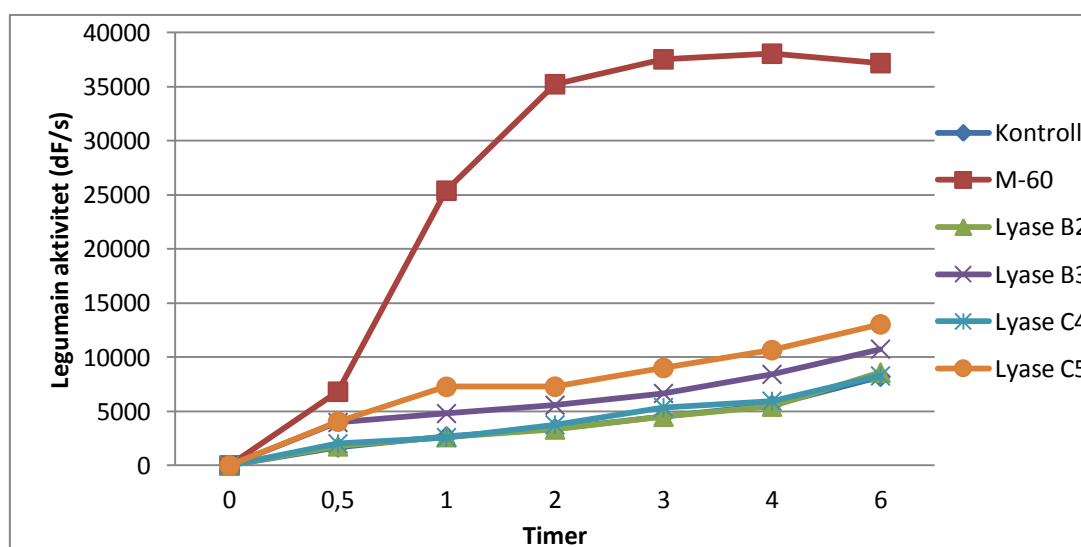
Det ble også gjort et autoaktiveringsforsøk med ubehandlet M-60, den nye redusert M-60 og redusert M-60 hvor borat ikke var blitt fjernes, som en borat-kontroll. Resultatet viser at den nye redusert M-60, og redusert M-60 med borat gav likt legumainaktivitet og nesten like mye aktivitet som ubehandlet M-60, med rundt 5 ganger høyere aktivitet.



Figur 4.32: Autoaktiveringsforsøk med nye redusert M-60 og redusert M-60 hvor borat ikke er fjernes, ved forskjellige inkuberingstid og pH 4. Kontroll er prolegumain tilsatt 0,9 % NaCl. (n=1).

4.4.4 Betydning av alginats størrelse for autoaktivering av prolegumain

De lyasebehandlede M-60-fraksjonene B2, og B3 fra den preparative kolonnen og C4, og C5 fra den semipreparative kolonnen, ble inkubert med prolegumain for å finne ut om størrelsen på alginats polymerkjede har betydning for autoaktivering av prolegumain.



Figur 4.33: Effekt av lyasebehandlede alginat prøver på autoaktivering av prolegumain ved forskjellige inkuberingstider, inkubering ved pH 4. Kontroll er prolegumain tilsatt 0,9 % NaCl. (n=1)

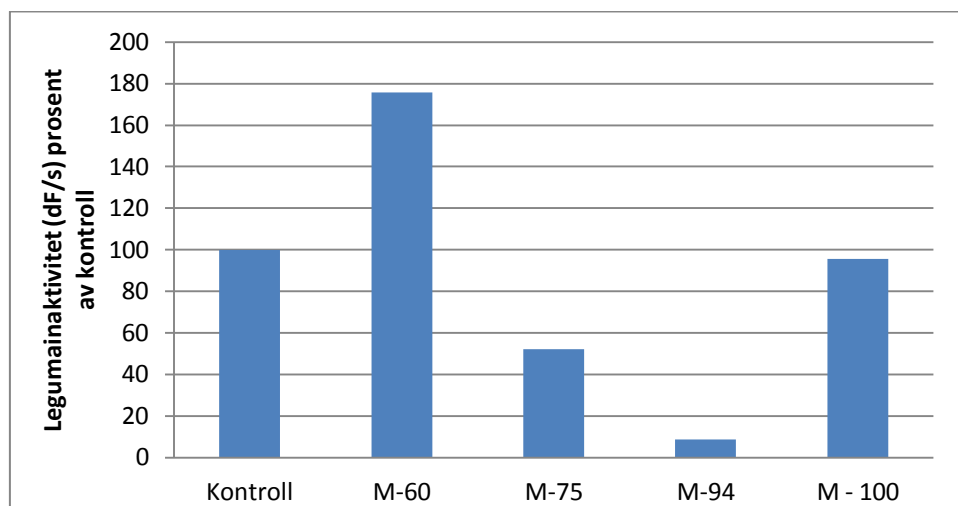
Figur 4.33 viser at ubehandlet M-60 gav 6 ganger høyere legumainaktivitet enn kontrollen. Mens lyasebehandlet M-60-fraksjoner B2 og C4 gav ingen effekt, kurvene av disse fraksjonene og kontrollen overlappet hverandre, de har likt legumainaktivitet. Sammenlignet med ubehandlet M-60 gav fraksjon B3 90% lavere og fraksjon C5 gav 80 % lavere legumainaktivitet.

4.5 EFFEKT AV ALGINAT PÅ LEGUMAINAKTIVITET I RAW 264.7- CELLER

For å undersøke i hvilken grad alginatprøvene har betydning for aktivitet av legumain i makrofager, ble RAW 267.4- celler inkubert med de forskjellige alginatprøvene, både før- og etter reduksjon, og de lyasebehandlede alginatfraksjonene.

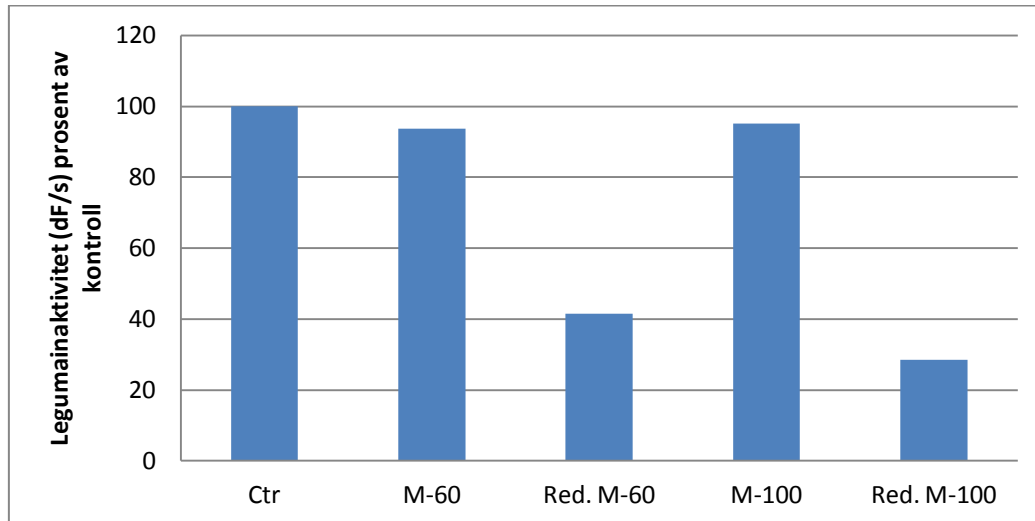
4.5.1 Betydning av alginats konformasjon og ladning ved stimulering av RAW 264.7 celler

RAW 264.7-celler ble stimulert med M-60, M-75, M-95 og M-100 (2mg/mL) og inkubert ved 37°C i 2 dager. Forsøket ble gjort en gang.



Figur 4.34: Legumainaktivitet (dF/s per μg totalprotein i prosent av kontroll) målt i cellelysat av RAW 264.7-celler etter stimulering av alginatprøvene (2mg/mL), i 2 dager. Kontroll var cellemediet stimulert med serumfritt. (n=1)

Resultatet på figur 4.25 viser at ved sammenligning med kontrollen, gav M-60 80% høyere legumainaktivitet, M-75 gav 50% lavere, M-94 gav 90% lavere, og M-100 gav likt legumainaktivitet som kontrollen.



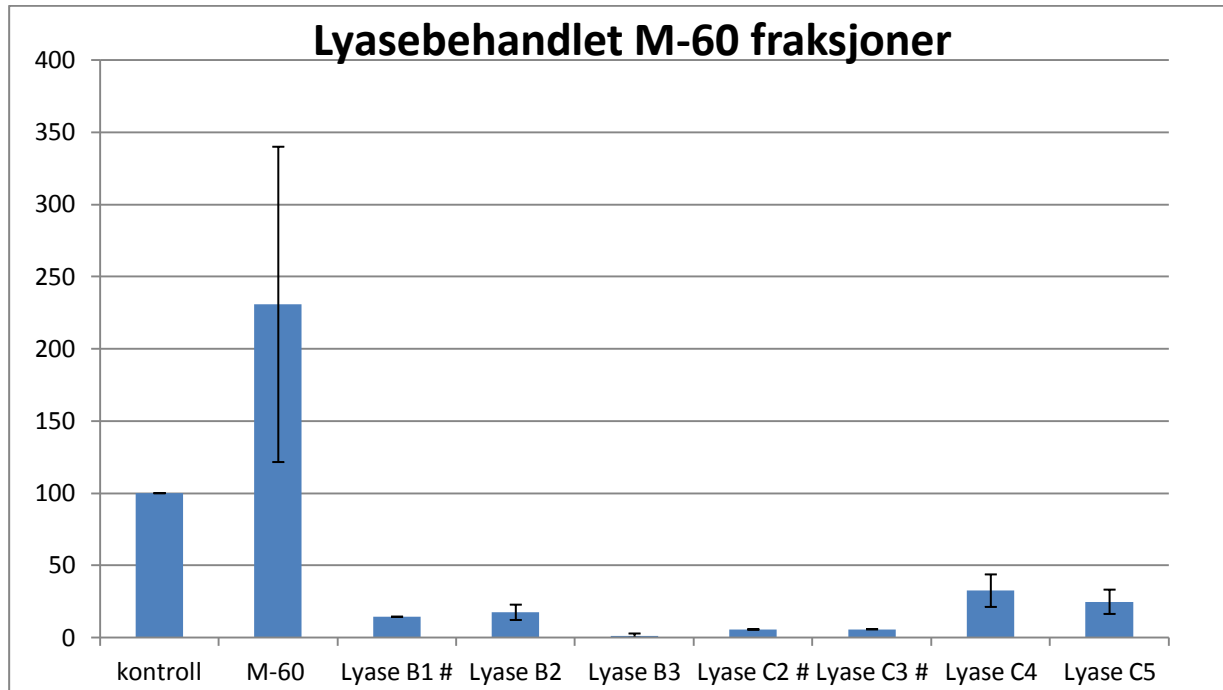
Figur 4.35: Legumainaktivitet (dF/s per μ g totalprotein I prosent av kontroll) målt på cellelysat fra RAW 264.7-celler i 2 dager med reduserte alginatprøver (2mg/mL). Kontroll var cellemediet stimulert med serumfritt. ($n=1$).

Figur 4.35 viser at ubehandlet alginat M-60 og M-100 gav ganske likt aktivitet som kontrollen. De reduserte alginatene gav lavere legumainaktivitet enn de ubehandlede alginatene. Her viser det at M-60 ikke har stimulerings effekt på legumainaktivitet som det gjorde på celleforsøk som er nevnt ovenfor. Sammenligning av ubehandlet og reduserte alginat, gav redusert M-60 60 % lavere enn M-60, og redusert M-100 gav 70 % lavere aktivitet enn redusert M-100.

4.5.2 Betydning av alginats størrelse ved stimulering av RAW 264.7 celler

RAW 264.7-celler ble stimulert med fraksjonene fra lyasebehandlet M-60. Dette var ønskelig for å finne ut om det er noen forskjell på effekten av lange- og korte polymerkjeder.

Celleforsøk med lyasebehandlet M-60 fraksjoner ble gjort to ganger, der ved det første forsøket ble celler stimulert med fraksjon B1, B2, B3, C2, C3, C4 og C5 når som disse fraksjonene har vist å inneholde oligosakkarider (MS-resultat). I det andre forsøket ble celler stimulert med samme lyasebehandlet fraksjonene men ikke frasjon B1, C2, C3 som var tomme. Resultat av forsøkene presenteres på figur 4.36.



Figur 4.36: Celleforsøk med lyasebehandlet alginat. Legumainaktivitet (dF/s per µg totalprotein i prosent av kontroll) målt i cellelysat av RAW 264.7-celler etter stimulering med lyasebehandlet alginat (2mg/mL). (n=1[#]-2) Fraksjonene som er merket # er ikke testet ut i 2. forsøk.

Resultat av celleforsøket på figuren viser at stimulering med de lyasebehandlede M-60-fraksjonene på RAW 264.7-celler gav mye lavere legumainaktivitet sammenlignet med ubehandlet M-60 og til og med hemming av legumainaktivitet. Lavest er aktivitet etter stimulering med fraksjon B3. Sammenlignet med kontrollen gav fraksjon B3 50 ganger lavere, fraksjon B2, -C2,- C3 gav 10 ganger lavere aktivitet enn kontrollen, og fraksjon B1,- C4 og -C5 gav rundt 5 ganger lavere aktivitet.

Celleforsøket med lyasebehandlet M-60 ble repetert med fraksjonene B2, -B3, -C4, og -C5, mens det var tomt for fraksjonene merket #. Som i første forsøk ble aktivitetene etter stimulering med lyasebehandlet M-60 mye lavere i forhold til ubehandlet M-60. Fraksjonene har dobbelt legumainaktivitet som det første forsøket, derfor ble standardavvik veldig stort. Dette er pga. kontrollen denne gangen gav halvparten lavere legumainaktivitet enn kontrollen i det første forsøket.

5 Diskusjon

5.1 KARAKTERISERING AV ALGINATPRØVENE

5.1.2 Monosakkaridesammensetning

Monosakkaridsammensetningen til M-60, M-100 urensset og M-100 renset ble utført ved hjelp av metanolyse, GC og NMR.

Ved å sammenligne kromatograms resultatene av M-100 renset og M-100 urensset, viser det at M-100 urensset har en veldig stor topp ved 15,4 minutter i forhold til M-100 renset. Urenset M-100 kan i utgangspunktet inneholder mye kontaminering av endotoksin (LPS) i forhold til M-100 renset. Derfor ut i fra resultatet ble M-100 renset valgt til å gå videre med i autoaktivering og celleforsøk ved tanken på fri for LPS.

Som forventet inneholder M-100 kun mannuronsyre, mens M-60 inneholder både mannuronsyre og guluronsyre. På grunn av manglende guluronsyrestandard ble det litt usikker å bekrefte at de toppene som finnes i M-60 og ikke i M-100 er guluronsyre. Ut ifra resultatene av metanolyse og GC-kromatogram, viser beregningen at M-100 inneholder ca. 100% mannuronsyre og spor av galaktose. M-60 inneholder ca. 80% og 20% guluronsyre, samt litt spor av mannose og galaktose. Ved sammenligning med NMR resultatet viser den en annen prosent av monosakkarid-sammensetning i M-60. Det ble funnet 60 % av mannuronsyre og 40 % av guluronsyre.

Uoverensstemmende resultatene til de to metodene kan forklares ved mangel av standarder til mannuronsyre og guluronsyre i metanolyse og GC metode. Sammenfall av toppene til mannuronsyre og guluronsyre kan være et problem her. Samtidig ble beregningen av mannuronsyre gjort ut ifra M-100 standardkurve likningen som gav veldig mye usikkerhet. Dette er fordi likningen fra M-100 standardkurven gav et veldig lite stigningstall, noe som kan skyldes ufullstendig metanolyse. Det vil si at ikke alle glykosidbindinger i M-100 ble hydrolysert, og derfor ble ikke de detektert på GC. Det er mer troverdig svar fra NMR-analyse enn metanolyse og GC, fordi det er også vist at markedet M-60 inneholder rundt 60 % mannuronsyre og 40 % guluronsyre [98].

5.2 TILLAGING AV ALGINAT- OLIGOSAKKARIDER

5.2.1 Degradering av M-60 med alginatlyase

Det ble brukt alginatlyase til degradering av alginat for å fremstille oligomer med mindre molekylvekt. Tidlig ble det kun gjort degradering der både alginat og alginatlyase løst i buffer, med tanken på at enzymaktivitet blir optimalt når pH er under kontroll og det er litt salt tilstede. Det ble brukt pH 6,3 fordi det er det optimum for enzymet ut ifra Sigma spesifikasjonen. Men denne gangen ble det funnet at alginatlyasen virker også i vann, og at det faktisk gav bedre enzymaktivitet enn med buffer. Forklaringen kan være at det er noe ioner tilstede i enzympreparatet fra Sigma og dessuten noe som følger med substrater. Degraderingen er mer optimalt i vann enn ved degraderingen der komponentene er løst i bufferløsning. Dette er et glimrende resultat for metodeutvikling, fordi man sparer masse tid på å ikke behøve å desalte prøven før ionebytterkolonnen som man var nødt til tidligere. I tillegg mister vi også mindre av stoffet enn det som er vanlig under desalting.

5.2.2 Ionebytterfraksjonering av lyasebehandlet M-60

Analytisk ionebytterkolonne ble anvendte først og det viste å gi en bra fraksjonering. Siden det var ønskelig å fremstille stor mengde av oligomere ble det forsøk oppskalering med en preparativ ionebytterkolonne. Men den preparativ ionebytterkolonne gav dårligere separasjon av lyasebehandlet M-60 prøven i forhold til den analytisk uansett om begge er pakket med samme kolonnematerialet. Forklaringen kan være pga. den analytisk ionebytterkolonnen er ferdig pakket mens den andre pakket vi selv. Andre forklaring kan være at den preparativ kolonnen har større diameter enn den andre kolonnen som kan gjør at stoffer binder seg mer til kolonnen. Semi-preparativ ionebytterkolonnen ble anvendte tilslutt, og resultatet viste at den ga god separasjon. MS-analyse hadde vist at semi-preparativ ionebytterkolonnen klarte å isolere 3 rene fraksjoner, C2 (dimer), C3(trimer) og C4 (tetramer). Uansett om C3 og C4 var ikke helt 100% rent isolert som C2, men beregningen viste at de inneholdt rundt 90% av disse oligomerene i prøvene, og dette er rene nok.

Sammenligning av retensjonstider for HPAEC-PAD analyse av A-fraksjonene med C-fraksjonene indikerer at A1 tilsvarer C2 (dimer), A2 tilsvarer C3 (trimer), A3 tilsvarer C4 (tetramer). Dette ble bekreftet ut i fra MS-resultatet. Grunnen til at de hadde likt HPAEC-PAD- resultat var fordi begge anvendte samme ionematerialet, den analytiske ionebytter-

kolonnen. Fraksjon A3 og C4 hadde mange overlappende topper som kan skyldes at analysebetingelser som anvendte denne gangen er ikke helt optimalt for separasjonen. De betingelsene kan være mengde til prøven, eluerings konsentrasjon, -hastighet osv.

Den semi-preparativ ionebytterkolonnen med svak anionbyttere hadde gitt en god separasjon av oligosakkarider, men det ble også ønske å teste på en sterk anionbyttere HiTrap Q Fast Flow. Resultatet viser at elueringen er dårligere separert i forhold til den svake anionbytterkolonnen. Dette forteller oss at den svakt anionbytterkolonnen, med vise ioniser pH-områder gav bedre separasjon av alginats oligosakkarider i forhold til den sterke anionbytterkolonnen som kan ioniseres i hele pH-området.

Det har også vært tidligere forsøkt av gelfiltrering ved separasjon av oligosakkarider. Men semi-preparativ ionebytterkolonnen viste å gi bedre separasjon enn gelfiltrering Superdex75 Hiloam som ble anvendt tidligere [55]. I en annen publisering hadde gelfiltrering viste å gi like god separasjon som semi-preparativ ionebytterkolonnen. Her ble det anvendt av gelfiltrering Biogel P-6-kolonnen [99].

5.3 KARBOKSYLSYREREDUKSJON

M-100 og M-60 er høyt ladete molekyler som blir redusert for å teste ut om dette har effekt på legumainaktivitet. Mengde ladninger av alginatene blir bestemt ved anvendelse av både ionebytterkromatografi og ^{13}C -NMR-analyse.

5.3.1 Ionebytterkarakterisering av redusert M-60 og - M-100

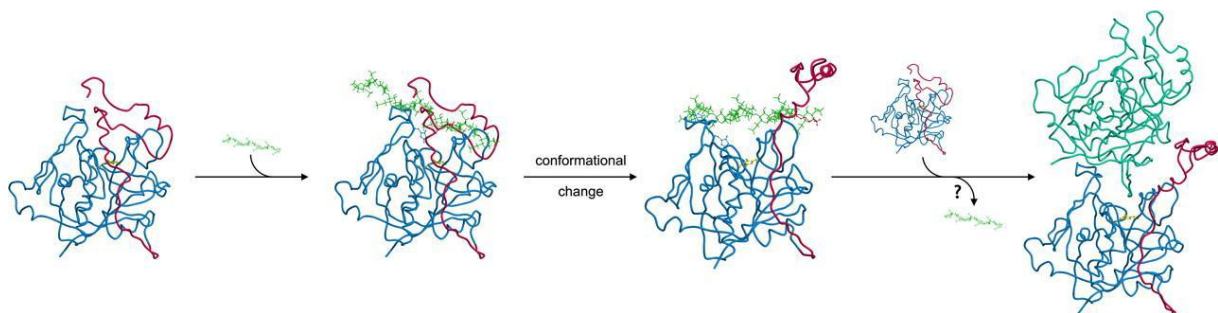
Ionekarakterisering ble gjort på prøvene før- og etter reduksjon for å sjekke om ladningen blir endret. Resultatet av ^{13}C -NMR viser at M-100 har vært mer redusert i forhold til M-60. Dette kan skyldes at det er vanskeligere å redusere guluronsyre enn mannuronsyre pga. ulik konfigurasjon av karboksylsyregruppen, dvs. at den karboksylsyre-gruppen til guluronsyre som vender motsatt vei i planet i forhold til mannuronsyre gjør at den er mindre tilgjengelig for reduksjon enn mannuronsyre.

Ut i fra ionebytterkromatogram viser det at ureduert M-60 og M-100 har likt mengde av ladning uansett om det er forskjell innhold av mengde mannuronsyre og guluronsyre. Dette vil si at begge uronsyrer kan binde seg like godt til kolonnematerialet.

^{13}C -NMR-resultat viser at begge prøvene har blitt redusert omtrent 80-95 %. Resultatet viser at deres reduksjonene var ikke fullstendig. Dette er bra for å unngå løselighets-problem før ionebytterkarakterisering og for de biologiske testene senere. Hvilken uronsyre som har vært redusert blir ikke beregnet. På NMR-spektret til redusert M-60 finnes det andre signaler ved 120-140 ppm. som ikke stammer fra alginat men mer sannsynlig fra borat. Innhold av borat vil kunne tenkes å påvirke autoaktiveringsforsøk senere, derfor ble det laget en ny redusert M-60. Denne gangen rekker vi ikke å karakterisere prøven med NMR-analyse eller ionebytterkolonnen derfor er det ikke lett å si hvor mye av prøven som har blitt redusert og om borat var fjernet. Men det er forventet at ladningen i prøven ble redusert som det vi hadde fått tidligere.

5.4 AUTOAKTIVERING

Som nevnt i innledningen er autoaktivering av prolegumain nødvendig for at legumain skal bli aktivt. Hvordan prosessen blir katalysert er ikke vist enda. Men det nærmeste vi kan sammenligne prolegumains autoaktivering med er autoaktivering av procathepsin B som er en annen cysteinprotease [100]. Mekanismen for autoaktivering av cathepsin B er vist på Figur 5.2. Glykosaminoglykanmolekyl (GAG) binder seg til procathepsin B, som fører til en konformasjonsendring av procathepsin B. Dette fører til at enzymets aktive sete ikke lenger blir blokkert, slik at et annet procathepsin B- molekyl kan binde seg til og aktivere molekylet. Alginat akselererer antagelig autoaktivering av prolegumain på lignende måte.



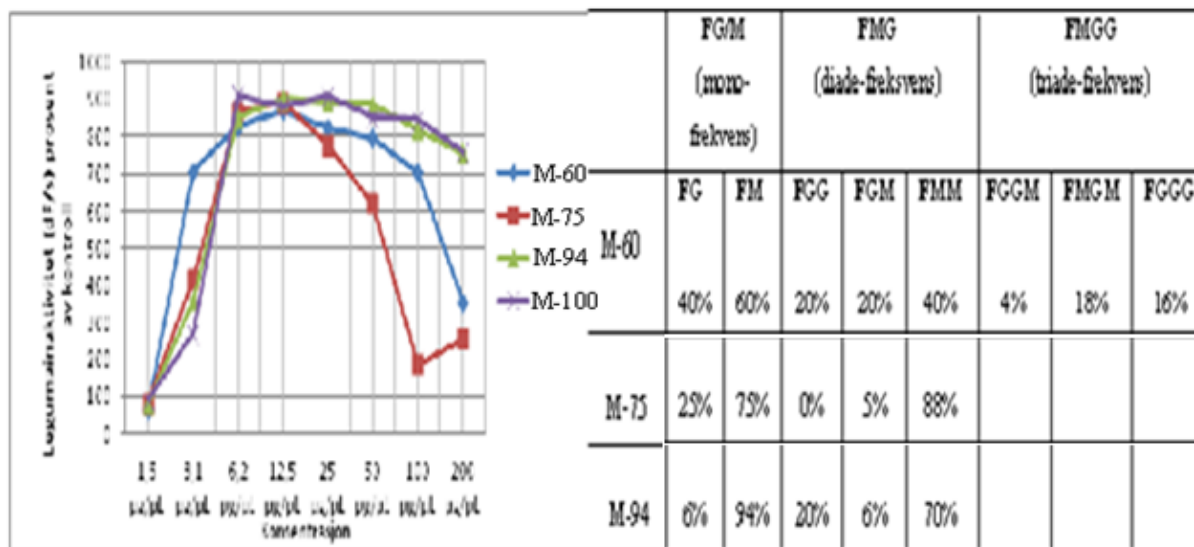
Figur 5.2: Mekanisme for hvordan glykosaminoglykaner (grønt) akselerer autoaktivering av cathepsin B. Det røde området er proformen til enzymet [100].

5.4.1 Betydning av alginats konsentrasjon, struktur og inkuberingstid av alginat for autoaktivering av prolegumain

Ved hjelp av tids-og doseresponsforsøk ble det bestemt optimal inkuberingstid og alginats konsentrasjon for autoaktivering av prolegumain. Doseresponsstudien ble utført med 2 timers inkubering og seks ulike konsentrasjoner. Det viste seg at autoaktiveringen av prolegumain også skjedde ved lave alginats konsentrasjoner. At så lav dose som 6,25 µg/mL, alginatene ble observert å føre til rask autoaktivering, noe som tyder på at alginat ikke trenger å være tilstedet i høy konsentrasjon for å kunne øke autoaktiveringen av prolegumain. Ved tidsresponsforsøk med 0-6 timers inkubering med alginat (2mg/mL) ble maksimal legumainaktivitet oppnådde etter 2 timers inkubasjon. Resultatet av tidresponsforsøk til autoaktivering av prolegumain ved pH 4 viste at inkuberingstid har en betydning for effekten av alginat. Det kan tenkes at etter 2 timer er all alginaten i prøver blir brukt opp, fordi alginat er sannsynligvis en kofaktor som må interagere seg inn i selve proenzymet for at autoaktiveringen skal akselerere.

Doseresponsforsøk fra autoaktivering av prolegumain ved pH 4, viste at M-94 og M-100 gav mer stabil legumainaktivitet ved økende konsentrasjon i forhold til M-60 og M-75. Kurven til M-90 og M-100 flatet ut ved konsentrasjon 6,2 µg/µL til 200 µg/µL. Men kurven til M-60 og M-75 sank ved økende konsentrasjon fra 12,5 µg/µL til 200 µg/µL. Alginatenes konformasjon kan forklare denne forskjellen. M-94 og M-100 inneholder mer mannuronsyre som gjør at deres polymerkjeder er mer utstrakte. M-60 og M-75 har mer guluronsyre slik at polymerkjedene deres har flere "kløfte". Det er derfor mulig at økende konsentrasjon av alginatene M-60 og M-75 vil føre til at polymerkjedene aggregerer (geldannelse), på grunn av G-enheter har evne til å kompleksbinde Ca²⁺ noe som ikke forekommer i rene M-blokker, og dermed ikke kan interagere med prolegumain og påvirke autoaktiveringen.

Det ble også observert at legumainaktiviteten etter tilsetning av M-75 viste seg å bli redusert tidligere enn M-60 ved økende konsentrasjon. Dette var ikke helt passende med vår tidligere forklaringen, og derfor gav dette oss en annen teori om effekt av alginat ved autoaktivering. Det ser ut som at autoaktivering av prolegumain blir påvirket av alginats konsentrasjon, konformasjon, og også muligens G-sekvenser. M-75 inneholder ingen G-blokker (FGG) mens M-60 inneholder den samme andel G-blokker som M-94. Se Figur 5.2 for en oversikt over struktur-aktivitets forhold av alginatene. Det kan også skyldes at forsøket bare har vært gjennomført en gang og at man dermed trenger repetisjon for å verifisere resultatet.



Figur 5.2: Resultat til alginats legumainaktivitetene ved forskjellige konsentrasjoner og tabellen til alginatenes innhold av mannuronsyre (M), guluronsyre (G). (F)=frekvens.

5.4.2 Betydning av ladningen på alginat for autoaktivering av prolegumain

Ved første autoaktiveringsforsøk gav redusert M-60 veldig høy aktivitet som ikke var veldig forskjellig fra den ubehandlede M-60. Dette er motsatt av tidligere resultater. Vi valgte derfor å lage en ny redusert M-60 fordi vi mente at grunnen til økningen i legumainaktivitet kunne skyldes borat, siden ¹HNMR-sprektet til denne redusert M-60-prøven viste å inneholde også andre stoffer som ikke finnes i redusert M-100. Sannsynligvis er det borat som ikke har blitt vasket bort under vasking av prøven ettersom prøven ble behandlet med store mengder reduksjonsreagenser.

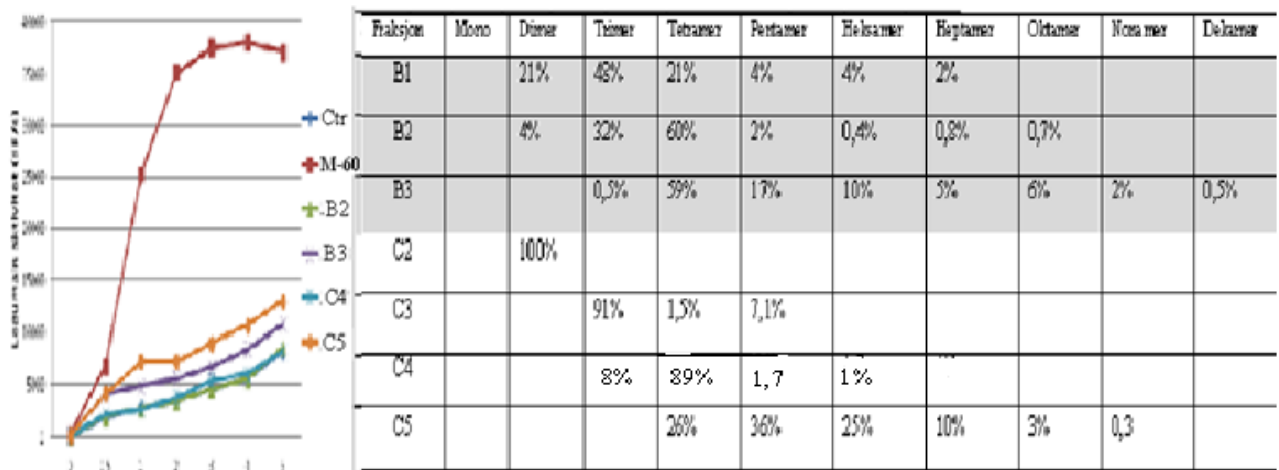
I det andre forsøket ble prolegumain inkubert med den nye reduserte M-60 og også med redusert M-60-prøven som ikke var ferdig vasket av borat, som en borat-kontroll. Det viste seg at begge prøvene hadde høy autoaktivitet av prolegumain, og aktiviteten var også lik som den gamle reduserte M-60-prøven. Det kan tenkes at borat som ikke ble vasket bort i både den gamle, og sannsynligvis i den nye reduserte M-60-prøven kompleksbinder med M-60, gav denne økningen av legumainaktiviteten.

Den nye redusert M-60 ble ikke analysert ved ¹³C HNMR, eller på ionebytterkolonne og vi vet derfor ikke hvor mye som har blitt redusert i denne prøven, men siden samme prosedyre ble fulgt forventer vi den samme grad reduksjon.

5.4.3 Betydning av alginats størrelse for autoaktivering prolegumain

De lyasebehandlede alginatene gav betydelig mindre autoaktivering av prolegumain i forhold til alginat M-60, som ikke er degradert av lyase. Fraksjon B2 og C4 gav ingen effekt, og begge fraksjonene viste seg å inneholde høyt andel av tetramer, der B2 har 60 % mens C4 hadde rundt 90 %. C5 og B3 har derimot litt høyere aktivitet enn kontrollen, innholdet av disse to fraksjonene er en blanding av større oligomere enn fraksjon C5 og B3. Det viser at forskjellen i aktiviteten av fraksjonene skyldes lengden på polymerkjedene. C5 og B3 inneholder flere lange polymerkjeder, med de største detekterte oligosakkrider, dekamere med molekylvekt på 1783 Da. I sammenligning med fraksjon B2 og C4 som inneholder kortere oligomer, tetramer molekylvekt 727 Da. For å forklare dette sammenlignet vi MS-resultatene og målte legumainsaktiviteten ved autoaktivering med de lyasebehandlede alginatene, se Figur 5.3.

Stimulering med fraksjon B2 og C4 gav mindre legumainaktivitet enn stimulering med fraksjon C3 og C5. Dette understreker ytterligere at molekylstørrelsen av alginat har betydning for autoaktivering av prolegumain, og at jo større alginatmolekylet er, jo større evne har det til å akselerere autoaktivering. Det ser ut som at molekylvekten til alginat må reduseres til 4 uronsyreenheter (tetramer) molekylvekt på 727 Da for ikke lenger å akselerere autoaktivering av prolegumain.



Figur 5.3 Monnosakkaridensammensetning og legumainaktivitet til de lyasebehandlede alginatene.

5.5 CELLEFORSØK

5.5.1 Betydning av alginatkonformasjon ved stimulering på RAW 264.7 celler

Resultatene av celleforsøk viste at M-60 gav dobbelt legumainaktivitet enn kontrollen, mens M-100 gav ingen effekt, M-75 og M-94 gav mindre aktivitet enn kontrollen og ble sett på som en hemmende effekt. Grunnen til at alginatene gav ulik effekt kan være på grunn av ulik konformasjon, som skyldes forskjellig innhold av mannuronsyre og guluronsyre i polymerkjeden. Alginat med MG-blokker og glykosidbindinger veksler mellom aksial-ekvatorial og ekvatorial-aksial konformasjon, og gir strukturen små ”kløfter” i kjeden. Alginat med høyt mannuronsyreinnhold gir kjeden en mer utstrakt konformasjon. Det kan tenkes at M-60 konformasjon har flere ”kløfter” enn de andre alginatene, dermed vil de binde seg bedre til reseptorene. I sammenligning av innholdet i disse alginatene, finnes det mye mer av GM-sekvensen i M-60 i forhold til de andre alginatene. Resultatet av M-75 og M-94 gav lavere legumainaktivitet i forhold til kontroll, en hemmende effekt. Dette kan skyldes forurensning av LPS som er årsaken til den hemmende effekten. Upublisert data fra vårt laboratorium viser at LPS kan ha en hemmende effekt på legumainaktiviteten (Berven L, upubliserte data). En annen mulig forklaring kan være at disse alginatene kan binde seg til andre reseptorer, som fører til hemming av autoaktivering av prolegumain. En annen mulig grunn er at disse fire alginater ikke er isolerte fra samme kilde, dermed kan renhetsgraden eller andre egenskaper være litt forskjellige.

I to celleforsøk ved stimulering av M-60 viste seg å gi dobbelt legumainaktivitet enn kontroll, men i et celleforsøk gav det ingen effekt. Resultatene var ikke helt reprodusebare. En tidligere masteroppgave [55] har vist at stimulering med M-60 og M-100 resulterte i mye høyere legumainaktivitet sammenlignet med resultatene i denne oppgaven. Forklaringen kan være at cellene ble stimulert i to dager i denne oppgaven, og fire dager i den tidligere oppgaven.

Variasjonen kan også sannsynligvis skyldes kontrollprøvene som har ganske høy legumainaktivitet denne gangen. Det som har vært lagt merke til under celleforsøk er at den ustimulerte kontrollen ikke gav like reproduserbare legumainaktiviteten hver gang. Dette førte til at alginateffekten sammenlignet med kontrollen ble varierende i hvert forsøk. I celleforsøket der M-60 ikke gav noe effekt på økning av legumainaktivitet kan være på grunn

av dette, eller tilstedeværelse av LPS som også har vist hemmende effekt av legumain-aktivitet (Berven L., upublisert data).

Det har vært vist at mannuronsyre-polymerer i alginat kan aktivere celler ved å binde seg til toll-like reseptor (TLR) 2 og 4 [53]. Alginats stimulering av autoaktivering av prolegumain i celleforsøket kan skyldes dette, men det er fortsatt usikkert om TLR finnes kun på overflaten til makrofager eller også inni celler. LPS har også vist bindingskapasitet til TLR-4 og stimulerer TNF-sekresjon men ikke legumainsekresjon. Det vil si at både alginat og LPS viste seg å kunne binde seg til TLR-4 men det er sannsynligvis alginat som stimulerer syntetisering av legumain. Det kan tenkes at alginat og LPS aktiverer ulike intracellulære signalveier, men i utgangspunkt kan de binde seg til samme reseptor. Det er uansett for tidlig å si noe om TLR 2 og 4 er molekylmål til alginats interagering for denne effekten på legumain-aktiviteten, så dette må undersøkes videre.

5.5.2 Betydning av alginatladning ved stimulering av RAW 264.7 celler

De redusert alginatprøvene gav tilnærmet ingen legumainaktivitet. Dette stemmer med det vi hadde observert tidligere [55]. Dette forteller oss at ladningen til alginaten har en betydning for stimuleringen av RAW-celler. Noe som tyder på at disse alginatsreseptorene på celleoverflaten er ladet, slik at jo mindre ladet et alginat er, jo mindre egnet er det til reseptorinteraksjon, og dermed vil den respondere mindre på legumainaktiviteten. Det kan tenkes at reseptorer som kan interagere med alginat har anionladninger, motsatt med alginatladning som er kation når den ionisert.

5.5.3 Betydning av alginatstørrelse ved stimulering på RAW 264.7 celler

Stimulering med lyasebehandlet M-60-fraksjon viste ingen legumainaktivitet. Størrelsen på alginatpolymerkjeden viste seg å ha en betydning for legumainaktiviteten. Etersom M-60 ble degradert med alginatlyase fikk vi en blanding av korte oligomere, fra dimer-oligosakkarider til dekamer-oligosakkarid med molekylvekt 375-1783 Da.

Det har tidligere blitt vist at alginat etter degradering av lyase (oligomer) induserer cytokinproduksjon (TNF- α) ved binding til TLR 2 og 4 (innledning 1.5). Vi kan tenke oss at alginatene kan binde seg til TLR-reseptorene og stimulere cytokinproduksjon, som videre kan gi en hemmende effekt på legumainaktiviteten. En annen mulighet er at lyasebehandlet alginat

kan binde seg til en annen reseptor enn TLR 2 og 4, som kan gi denne hemmende effekten. LPS-tilstedeværelse i alginatene kan også være årsaken, siden det ble vist at LPS har en hemmende effekt på legumainaktivitet (upublisert data). For å utelukke denne LPS-påvirkningen kan polymyxin B tilsettes i cellemediet ved stimulering, dette bør undersøkes.

Effekt av alginat på legumainaktiviteten i celleforsøk kan bygge på en alginatreseptor-interaksjons teori der både konformasjon, polymerlengde og alginats ladning har betydning for alginats binding til reseptorer på makrofag celleroverflaten. Makrofagreseptorers egenskaper for interaksjon med alginat har sannsynligvis store bindingssteder som egner seg bedre til lange polymerkjeder enn korte. Kan det være mulig for CR3-reseptor som har vært vist å være target til beta-glukan, Toll-reseptor 2 og 4, ellers Dectin-1-reseptorer (innledning 1.6). Ellers det kan være flere reseptorer som har sete som alginatskonformasjon ”passer inn i”, men ikke alle alginat-reseptor-interaksjon gir legumainaktivitet.

I celleforsøk er det fortsatt usikkert om alginat påvirker legumainaktivitet ved å binde seg til reseptorer på overflaten til makrofager, og derfra signaliserer den intracellulære prolegumain autoaktiveringen, eller om makrofager kan svulle alginat inn i celler ved endosome, der alginat interagerer med intracellulær reseptorer eller direkte akselererer proenzymet for autoaktivering.

6 Konklusjon

Det ble benyttet forskjellige metoder for å karakterisere alginat i denne oppgaven. Det viste at $^1\text{H-NMR}$ er best egnet til å bestemme monosakkaridsammensetning av alginat, og MS-analyse var en optimal metode for å identifisere oligomere.

Det ble vellykket å fremstille rene oligomere ved degradering av M-60 alginat med alginatlyase fra *Flavobacterium* sp., og som videre ble fraksjonert på svak anionbytterkolonnen. Det ble isolert tre rene fraksjoner med innhold av dimere, trimere og tetramere. Det var den semi-preparative ionebytterkolonnen som klarte å isolere disse rene oligomerene.

Alginats har evne til å stimulere autoaktivering av prolegumain, der stimuleringen er avhengig av alginats konsentrasjon, konformasjon, molekylstørrelse, og ladning samt inkuberingstid av prolegumain med alginat. Autoaktivering av prolegumain ble sterkt stimulert av alginat med lange polymerkjeder med betingelse at ladningen av polymeren er ikke redusert. Mens lyase-behandlet alginat som har kortere polymerkjeder med molekylvekt 375- 1783 Da, og redusert alginat med lite ladning viste å gi veldig lite eller ingen stimulering av autoaktiveringen. Alginat med økt innhold av mannuronsyre og som har "utstrakt" konformasjon akselererer autoaktivering av prolegumain i større grad enn alginat som inneholder mer guluronsyre og som har "kløfte" konformasjon. Akseleringen til "utstrakt" alginat er også mer stabil over lengre inkubasjon enn "kløfte" alginat.

Celleforsøk med RAW264.7 celler viste også at alginats molekylstørrelse, sammensetning og ladning har betydning for alginats evne til å påvirke cellelinjens aktivitet av legumain. Legumainaktivitet ble stimulert av alginat med lange polymerkjeder. Alginat med større mengde guluronsyre i polymeren, mer "kløfte" konformasjon gav mer stimulering enn "utstrakt" polymerkjeder der det er høyt innhold av mannuronsyre. Alginat med korte polymerkjeder og lav molekylvekt (375-1783 Da) og redusert alginat gav en hemmende effekt av cellulær legumainaktivitet.

Ved å sammenligne effekt av alginat på legumainaktiviteten ved autoaktiveringsforsøk og celleforsøk ser vi at resultatene er litt forskjell. Ved autoaktiveringsforsøket er det en direkte stimulering av alginat på prolegumain. Alginat kan sannsynligvis være en kofaktor som setter seg inn i selve proenzymet og akselererer autoaktivering. Mens ved celleforsøk kan man tenke

seg at alginat stimulerer den intracellulære legumainaktiviteten indirekte, ved å binde seg til reseptorer på overflaten av makrofager. Men dersom vi kan tenke oss at alginat kan tas opp i makrofagene (ved fagocytoses) så kan det godt være at det skjer den samme intracellulært autoaktivering av prolegumain som den *in vitro* autoaktivering som er omtalt, der alginat kan være en kofaktor som akselererer autoaktivering.

Selv om legumain er vist å være involvert i utvikling av kreft, ved blant annet i malign tykktarmskreft [61], så kan det ut ifra resultatene i denne oppgaven (alginatstimulert legumainaktivitet) ikke konkluderes med at inntak av alginat i kosten fører det til tarmkreft, siden forsøkene er gjort *in vitro* og ikke *in vivo*. Men observasjonene er interessant og må undersøkes nærmere.

7 Veien videre

MS-kromatograf identifiserer oligomer som finnes i fraksjonene, men den kvantifiserer ikke sekvens til disse oligomerene, om det er GG, GM, MGM, GGM osv. Dette kan man til neste gang undersøke nærmere ved å lage større mengde av fraksjonene og sende til NMR-analyse. Det kunne også være interessant å også isolere større oligomer som pentamer, -heksamer, -heptamer neste gang.

Både svake og sterke anionbytter kolonner ble prøvd ut i denne oppgaven, dermed kan det kanskje også være fint å prøve fraksjonering på en omvendt-fase kromatografi, som kan være godt egnet til å separere umettete alginatoligosakkarider som ble dannet etter lyasebehandling [101].

I fremtiden kan man se frem til en videre utvikling HPAEC-PAD metode for å bedre separasjonen av oligomer med prinsippet om innvirkning av oligosakkarid substituerte som acetater. Dette kan bli undersøkt mer for å studere separasjon av oligomerer med samme DP men forskjellige substitusjonsgrader [102].

Ved celleforsøk har det vist seg at de lyasebehandlede M-60 fraksjonene gav en hemmende effekt på legumainaktivitet. Det er interessant å studere videre om denne hemmende effekt kan skyldes LPS. Det er også viktigst å få avklart på molekylvekt til ubehandlet alginat, slik som det ble gjort på lyasebehandlet alginat med tanke på alginats store molekylvekt stimulerte økning av legumainaktivitet.

Et annet aspekt som er viktig å få på plass er effekt av alginat på stimulering av makrofager. Alginat binde seg til reseptorer på makrofagsoverflaten, og gir legumainaktiviteten, eller at makrofager kan svulle alginat inn i celle ved endome og der utøver alginat legumainaktiviteten ved interagerer med reseptorer i det intracellulært, eller at den direkte akselererer autoaktivering av prolegumain som en kofaktor. Dersom det er alginat-reseptor-interaksjon, er det interessant å vite hvilke reseptorer som alginat kan interagere med.

Celleforsøk av ubehandlet alginatene og autoaktiveringsforsøk av redusert M-60 må uansett repeteres for å se reproduserbarheten til resultatene som er oppnådd.

Litteraturlist

1. Nøkkelhullet, V.f.j.n.o.f.m.a.n.m., <http://www.nokkelhullsmarket.no/nokkelhull/incoming/article612.ece/BINARY/Veileder+til+N%C3%B8kkelhullsforskriften+%28PDF%29>. 2009.
2. Kendall, C.W.C., A. Esfahani, and D.J.A. Jenkins, *The link between dietary fibre and human health*. Food Hydrocolloids, 2010. **24**(1): p. 42-48.
3. Bray, F., et al., [*Epidemiology of colorectal cancer in Norway*]. Tidsskr Nor Laegeforen, 2007. **127**(20): p. 2682-7.
4. Lunn, J. and J.L. Buttriss, *Carbohydrates and dietary fibre*. Nutrition Bulletin, 2007. **32**(1): p. 21-64.
5. Anderson, J.W., B.M. Smith, and N.J. Gustafson, *Health benefits and practical aspects of high-fiber diets*. Am J Clin Nutr, 1994. **59**(5 Suppl): p. 1242S-1247S.
6. helsedirektoratet, *Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer. Metodologi og vitenskapelig kunnskapgrunnlag. Nasjonalt råd for ernæring 2011*. http://www.helsedirektoratet.no/publikasjoner/rapporter/kostr_d_for_fremme_folkehelsen_og_forebygge_kroniske_sykdommer_i_norge_metodologi_og_vitenskapelig_kunnskapgrunnlag_790144., 2011.
7. Burkitt, D., *Epidemiology of cancer of the colon and rectum*. Diseases of the Colon & Rectum, 1993. **36**(11): p. 1071-1082.
8. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1496-501.
9. Peters, U., et al., *Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme*. Lancet, 2003. **361**(9368): p. 1491-5.
10. Park, Y., et al., *Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies*. JAMA, 2005. **294**(22): p. 2849-57.
11. Burkitt, D.P., *Epidemiology of cancer of the colon and rectum*. Cancer, 1971. **28**(1): p. 3-13.
12. Topping, D.L. and P.M. Clifton, *Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides*. Physiol Rev, 2001. **81**(3): p. 1031-64.
13. McIntyre, A., P.R. Gibson, and G.P. Young, *Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model*. Gut, 1993. **34**(3): p. 386-91.
14. Donati, I. and S. Paoletti, *Material Properties of Alginates Alginates: Biology and Applications*, B.H.A. Rehm, Editor 2009, Springer Berlin / Heidelberg. p. 1-53.
15. Winn, S.R., et al., *Behavioral recovery following intrastriatal implantation of microencapsulated PC12 cells*. Exp Neurol, 1991. **113**(3): p. 322-9.
16. Rokstad, A.M., et al., *Microencapsulation of cells producing therapeutic proteins: optimizing cell growth and secretion*. Cell Transplant, 2002. **11**(4): p. 313-24.
17. Soon-Shiong, P., et al., *Long-term reversal of diabetes by the injection of immunoprotected islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5843-7.
18. Hasse, C., et al., *Parathyroid xenotransplantation without immunosuppression in experimental hypoparathyroidism: long-term in vivo function following microencapsulation with a clinically suitable alginate*. World J Surg, 2000. **24**(11): p. 1361-6.
19. Brownlee, I.A., et al., *Alginate as a source of dietary fiber*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2005. **45**(6): p. 497-510.

20. Draget, K.I. and C. Taylor, *Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications*. Food Hydrocolloids, 2011. **25**(2): p. 251-256.
21. Haug, A., *Composition and properties of alginates*, ed. N.i.f.t.-o.t.n. 301964, NTH trykk.
22. Mørch, Ý., *Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy*, in Department of Biotechnology. NTNU: Trondheim., 2008.
23. Larsen, B. and A. Haug, *Biosynthesis of alginate. 3. Tritium incorporation with polymannuronic acid 5-epimerase from Azotobacter vinelandii*. Carbohydr Res, 1971. **20**(2): p. 225-32.
24. Madgwick, J., A. Haug, and B. Larsen, *Polymannuronic acid 5-epimerase from the marine alga Pelvetia canaliculata (L.) Dcne. et Thur*. Acta Chem Scand, 1973. **27**(9): p. 3592-4.
25. Nyvall, P., et al., *Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga Laminaria digitata*. Plant Physiol, 2003. **133**(2): p. 726-35.
26. Haug, A. and B. Larsen, *Biosynthesis of alginate. Epimerisation of D-mannuronic to L-guluronic acid residues in the polymer chain*. Biochim Biophys Acta, 1969. **192**(3): p. 557-9.
27. Haug, A. and B. Larsen, *Biosynthesis of alginate. II. Polymannuronic acid C-5-epimerase from Azotobacter vinelandii (Lipman)*. Carbohydr Res, 1971. **17**(2): p. 297-308.
28. Hartmann, M., et al., *Mode of action of recombinant Azotobacter vinelandii mannuronan C-5 epimerases AlgE2 and AlgE4*. Biopolymers, 2002. **63**(2): p. 77-88.
29. Hartmann, M., et al., *Time-resolved 1H and 13C NMR spectroscopy for detailed analyses of the Azotobacter vinelandii mannuronan C-5 epimerase reaction*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2002. **1570**(2): p. 104-112.
30. Pawar, S.N. and K.J. Edgar, *Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications*. Biomaterials, 2012. **33**(11): p. 3279-305.
31. Donati, I., et al., *New hypothesis on the role of alternating sequences in calcium-alginate gels*. Biomacromolecules, 2005. **6**(2): p. 1031-40.
32. Larsen, B. and A. Haug, *Biosynthesis of alginate. 1. Composition and structure of alginate produced by Azotobacter vinelandii (Lipman)*. Carbohydr Res, 1971. **17**(2): p. 287-96.
33. Lin, T.Y. and W.Z. Hassid, *Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from a marine brown alga, Fucus gardneri Silva*. J Biol Chem, 1966. **241**(14): p. 3283-93.
34. Tondervik, A., et al., *Isolation of mutant alginate lyases with cleavage specificity for di-guluronic acid linkages*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 35284-92.
35. Kwiatek, M.A., et al., *An alginate-antacid formulation (Gaviscon Double Action Liquid) can eliminate or displace the postprandial 'acid pocket' in symptomatic GERD patients*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2011. **34**(1): p. 59-66.
36. Soon-Shiong, P., et al., *Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation*. The Lancet, 1994. **343**(8903): p. 950-951.
37. Michaud, P., et al., *Polysaccharide Lyases: Recent Developments as Biotechnological Tools*. Critical Reviews in Biotechnology, 2003. **23**(4): p. 233-266.
38. Preiss, J. and G. Ashwell, *Alginic acid metabolism in bacteria. I. Enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 309-16.
39. Haugen, F., F. Kortner, and B. Larsen, *Kinetics and specificity of alginate lyases: Part I, A case study*. Carbohydr Res, 1990. **198**(1): p. 101-9.

40. Nakada, H.I. and P.C. Sweeny, *Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas*. J Biol Chem, 1967. **242**(5): p. 845-51.
41. Wong, T.Y., L.A. Preston, and N.L. Schiller, *ALGINATE LYASE: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 289-340.
42. Michaud, P., et al., *Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools*. Crit Rev Biotechnol, 2003. **23**(4): p. 233-66.
43. Østgaard, K., *Determination of alginate composition by a simple enzymatic assay*. Hydrobiologia, 1993. **260-261**(1): p. 513-520.
44. Boyd, J. and J.R. Turvey, *Structural Studies of Alginic acid, using a bacterial poly- α -L-gulonate lyase*. Carbohydr Res, 1978. **66**(1): p. 187-194.
45. Tajima, S., et al., *Alginate oligosaccharides modulate cell morphology, cell proliferation and collagen expression in human skin fibroblasts in vitro*. Arch Dermatol Res, 1999. **291**(7-8): p. 432-6.
46. Kawada, A., et al., *Alginate oligosaccharides stimulate VEGF-mediated growth and migration of human endothelial cells*. Arch Dermatol Res, 1999. **291**(10): p. 542-7.
47. Kawada, A., et al., *Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture*. FEBS Lett, 1997. **408**(1): p. 43-6.
48. Yoshida, T., et al., *Alginic acid oligosaccharide suppresses Th2 development and IgE production by inducing IL-12 production*. Int Arch Allergy Immunol, 2004. **133**(3): p. 239-47.
49. Yang, D. and K.S. Jones, *Effect of alginate on innate immune activation of macrophages*. J Biomed Mater Res A, 2009. **90**(2): p. 411-8.
50. Otterlei, M., et al., *Similar mechanisms of action of defined polysaccharides and lipopolysaccharides: characterization of binding and tumor necrosis factor alpha induction*. Infect Immun, 1993. **61**(5): p. 1917-25.
51. Iizima-Mizui, N., et al., *Antitumor activity of polysaccharide fractions from the brown seaweed Sargassum kjellmanianum*. Kitasato Arch Exp Med, 1985. **58**(3): p. 59-71.
52. Iwamoto, M., et al., *Structure-activity relationship of alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW264.7 cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(20): p. 4423-9.
53. Flo, T.H., et al., *Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers*. J Biol Chem, 2002. **277**(38): p. 35489-95.
54. Taylor, P.R., et al., *Macrophage receptors and immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 901-44.
55. Nguyen, N., *Studier av alginats effekt på prolegumain og cellesekresjon av matriksmetalloproteaser*. 2011.
56. Volman, J.J., J.D. Ramakers, and J. Plat, *Dietary modulation of immune function by beta-glucans*. Physiol Behav, 2008. **94**(2): p. 276-84.
57. Kraehenbuhl, J.P. and M.R. Neutra, *Epithelial M cells: differentiation and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 301-32.
58. Brown, G.D. and S. Gordon, *Immune recognition: A new receptor for [beta]-glucans*. Nature, 2001. **413**(6851): p. 36-37.
59. Karin, M., T. Lawrence, and V. Nizet, *Innate Immunity Gone Awry: Linking Microbial Infections to Chronic Inflammation and Cancer*. Cell, 2006. **124**(4): p. 823-835.
60. Chen, J.M., M. Fortunato, and A.J. Barrett, *Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue*. Biochem J, 2000. **352 Pt 2**: p. 327-34.

61. Murthy, R.V., et al., *Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2293-9.
62. Chen, J.M., et al., *Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase*. J Biol Chem, 1997. **272**(12): p. 8090-8.
63. Li, D.N., et al., *Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo*. J Biol Chem, 2003. **278**(40): p. 38980-90.
64. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. J Biol Chem, 2003. **278**(35): p. 33194-9.
65. Maehr, R., et al., *Asparagine endopeptidase is not essential for class II MHC antigen presentation but is required for processing of cathepsin L in mice*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 7066-74.
66. Hsing, L.C. and A.Y. Rudensky, *The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation*. Immunological Reviews, 2005. **207**(1): p. 229-241.
67. Manoury, B., et al., *An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 695-9.
68. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27747-53.
69. Choi, S.J., et al., *Osteoclast Inhibitory Peptide 2 Inhibits Osteoclast Formation via Its C-Terminal Fragment*. Journal of Bone and Mineral Research, 2001. **16**(10): p. 1804-1811.
70. Chambers, R.E. and J.R. Clamp, *An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials*. Biochem J, 1971. **125**(4): p. 1009-18.
71. pedersen-bjerre, S.a.K.E.R., *Legemiddelanalyse*. Fagbokforlaget2004.
72. Cui, S.W., *Food carbohydrates: chemistry, physical properties, and applications* Taylor & Francis2005.
73. Grasdalen, H., B. Larsen, and O. Smidsrød, *A p.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates*. Carbohydr Res, 1979. **68**(1): p. 23-31.
74. Grasdalen, H., B. Larsen, and O. Smisrod, *¹³C-n.m.r. studies of monomeric composition and sequence in alginate*. Carbohydr Res, 1981. **89**(2): p. 179-191.
75. Grasdalen, H., *High-field, ¹H-n.m.r. spectroscopy of alginate: sequential structure and linkage conformations*. Carbohydr Res, 1983. **118**(0): p. 255-260.
76. Hisano, T., et al., *A simple method for determination of substrate specificity of alginate lyases*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994. **78**(2): p. 182-184.
77. Kaneko, Y., et al., *Bacterial alginate lyase: properties of the enzyme formed in a mixed culture of bacteria isolated from soil*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1990. **70**(3): p. 147-149.
78. Iwamoto, Y., et al., *Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from Alteromonas sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**(1): p. 133-42.
79. Svanem, B.I., et al., *The catalytic activities of the bifunctional Azotobacter vinelandii mannuronan C-5-epimerase and alginate lyase AlgE7 probably originate from the same active site in the enzyme*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31542-50.
80. DuBois, M., et al., *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical Chemistry, 1956. **28**(3): p. 350-356.
81. Sogn, C., *Polysakkarider fra Vernonia kotschyana rot. Etnobotanikk kjemi og biologisk aktivitet*. 1998.

82. Biotechnologi, P.L., *Gel Filtration, Principles and Methods*. 5th edition S-751 82 Uppsala, S.
83. Bricker, J. Available from: <http://bricker.tcnj.edu/tech/BIOL311chromatography.htm>.
84. Dionex, *Analysis of Carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD)*. [Technical Note 20], 2000: p. <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/5023-TN20.pdf>.
85. Gross, J.H., *Mass Spectrometry, A Textbook*. Springer, Germany 2004.
86. Fenn, J.B., et al., *ELECTROSPRAY IONIZATION FOR MASS-SPECTROMETRY OF LARGE BIOMOLECULES*. *Science*, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
87. Crotti, S., R. Seraglia, and P. Traldi, *Some thoughts on electrospray ionization mechanisms*. *European Journal of Mass Spectrometry*, 2011. **17**(2): p. 85-99.
88. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *ELECTROSPRAY: FROM IONS IN SOLUTION TO IONS IN THE GAS PHASE, WHAT WE KNOW NOW*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2009. **28**(6): p. 898-917.
89. Cech, N.B. and C.G. Enke, *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. *Mass Spectrometry Reviews*, 2001. **20**(6): p. 362-387.
90. Olsen, J.V., et al., *Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis*. *Nat Meth*, 2007. **4**(9): p. 709-712.
91. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis*. *Analytical Chemistry*, 2000. **72**(6): p. 1156-1162.
92. Hu, Q.Z., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2005. **40**(4): p. 430-443.
93. Kim, J.B. and N.C. Carpita, *Changes in Esterification of the Uronic Acid Groups of Cell Wall Polysaccharides during Elongation of Maize Coleoptiles*. *Plant Physiol*, 1992. **98**(2): p. 646-53.
94. Melton, L.D., *Structural characterization of oligosaccharides isolated from the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II*. *Carbohydr Res*, 1986. **146**(2): p. 279.
95. standards., L.,
: p. Available from <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=TIB-71&Template=cellBiology>
96. Johansen, H.T., C.G. Knight, and A.J. Barrett, *Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis*. *Anal Biochem*, 1999. **273**(2): p. 278-83.
97. Kawarada, H., et al., *Structure characterization of alginate and conformational behaviors of various alkali-metal alginates in solution*. *Polymer Bulletin*, 1990. **24**(5): p. 551-557.
98. Sodium, M.B.R.P.o., et al.: p. 90-924.
99. Heyraud, A., et al., *HPLC analysis of saturated or unsaturated oligogulonates and oligomannuronates. Application to the determination of the action pattern of *Haliotis tuberculata* alginate lyase*. *Carbohydr Res*, 1996. **291**(0): p. 115-126.
100. Caglič, D., et al., *Glycosaminoglycans Facilitate Procathepsin B Activation through Disruption of Propeptide-Mature Enzyme Interactions*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007. **282**(45): p. 33076-33085.

101. Tavernier, M.-L., et al., *Efficient purification of small unsaturated oligoglucuronides by reversed-phase chromatography*. Journal of Chromatography B, 2008. **863**(2): p. 266-272.
102. Cataldi, T.R., C. Campa, and G.E. De Benedetto, *Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing*. Fresenius J Anal Chem, 2000. **368**(8): p. 739-58.