

# Effekt av $\beta$ -glukan fra gjær på legumainaktivitet

Layla Mohammad Khader Zubaidi



Master oppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk kjemi.

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskaplige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai. 2013

Veiledere:

Anne Berit Samuelsen og Lise Berven



# Sammendrag

$\beta$ -glukaner er polysakkarider som går under gruppen biologisk respons modifierende stoffer BRM.  $\beta$ -glukan har mange interessante biologiske effekter som blir satt under fokus.  $\beta$ -glukan har en immunmodulerende effekt som muligens kan benyttes i kreftbehandling. Legumain er en lysosomal cysteinprotease som uttrykkes i nyrer, men den finnes også i lever, milt, prostata og makrofager. I nyrene bidrar legumain til normal proteinkatabolisme og renal homeostase. Legumain bryter ned fibronektin i proksimaletubuli-cellene, og det bidrar til remodulering av ekstracellulær matriks. Legumain er involvert i patogenesen for en rekke sykdommer som aterosklerotiske lesjoner, slag, og kreft. Siden legumain er involvert i kreftpatogenesen, så var det av interesse å forske om  $\beta$ -glukan fra gjær kunne hemme dette enzymet. For å utføre denne oppgaven ble  $\beta$ -glukan karakterisert ved forskjellige metoder. Først ble en løselig fraksjon fra  $\beta$ -glukan isolert, og kalt for WML. For å undersøke monosakkaridsammensetning i  $\beta$ -glukan, ble den isolerte fraksjonen metanolysert og analysert ved GC, monosakkaridene som ble funnet i prøven var hovedsakelig glukose og spor av mannose. Gjær  $\beta$ -glukan er (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6) glukosekjeder, for å bestemme bindingsmønster i WML ble den metylert og analysert ved GC-MS. WML var en langkjede  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) glukose, men det var lite spor av (1,3,6) glukose i prøven. Deretter ble WML analysert på HPLC sammen med  $\beta$ -glukan standarder fra korn for å bestemme molekylvekten. To molekylvekts populasjoner ble det funnet ved HPLC-analysen, den ene populasjon hadde Mw på ca 54 kDa, mens den andre populasjon var uten for standardkurven. For å fraksjonere de to molekylvekts populasjonene ble en SEC-HPLC foretatt, molekylvektene til fraksjonene ble bestemt ved HPLC. En høymolekylær fraksjon A hadde molekylvekt på ca 58 kDa, og en lav molekylær B lå utenfor standardkurven. Enzymdegraderte WML ble også fraksjonert ved SEC-HPLC, to fraksjoner ble samlet EA og EB. De to fraksjonene EA, og EB ble analysert ved HPAEC-PAD, resultatet viste at hele enzymdegraderte prøven var eluert i EB fraksjonen. Ufraksjonert enzymdegradert prøve ble analysert ved HPAEC-PAD, prøven hadde fire oligosakkaridtopper. For å analysere hvor store disse oligosakkaridene er, så ble prøvetoppene samlet, og analysert ved ESI-MS. Resultatet fra ESI-MS viste at enzymdegraderte WML inneholdt en blanding av mono-, di-, tri-, og tetrasakkarider. For å bestemme bindingsmønster i disse oligosakkaridene, ble de metylert og analysert ved GC-MS. Glukosetoppen, monosakkaridtoppen, ble ikke tatt med.

Resultatet viste at de forskjellige oligosakkaridene var (1→3) bundet glukose, og inneholdt spor av (1→6) bundet glukose.

RAW264.7-cellene ble stimulert med WML for å teste legumainaktivitet, og de ble også stimulert med de hydrolyserte prøvene og den enzymdegraderte prøven. For å undersøke om løselighet av  $\beta$ -glukan kunne påvirke legumainaktivitet, ble den partikulære  $\beta$ -glukan WMP, og den delvis løselige WMS testet på RAW264.7-cellen. Legumainaktivitet ble hemmet ved stimulering med WMP og WMS, mens WML og den enzymdegraderte prøven var på nivå med kontrollen. Resultatene viste at  $\beta$ -glukan med så liten molekylvekt som tetramer fører til ingen effekt på legumainaktivitet. De hydrolyserte prøvene, fraksjon A og fraksjon B, har ført til stimulering av legumainaktivitet, det viste at løselig  $\beta$ -glukan med molekylvekt større en tetramer gir stimulering av legumainaktivitet.

# Forord

Denne oppgaven ble utført ved farmasøytisk institutt, avdeling for farmasøytisk kjemi.

Oppgaven ble startet august 2012 og avsluttet mai 2013. Først og fremst vil jeg takket Gud for å ha gitt meg styrke og tålmodighet for å fullføre farmasistudiet.

Det mange som har bidratt i denne oppgaven og har hjulpet meg til å fullføre dette arbeidet.

En stor takk rettes til min veileder Anne Berit Samuelsen. Takk for all hjelp, veiledning og rådgivning som jeg fikk under oppgaven. En takk til Ph. D studenten, Lise Berven, min andre veileder, for all hjelp og veiledning jeg fikk i cellelaben.

Jeg vil også takke personale i tredje etasje:

Hoai Thi Nguyen: tusen takk for hjelpen med GC-analysen og GC-MS-analysen.

Ellen Hanne Cohen: tusen takk for hjelpen med HPAEC-PAD, og alle bestillinger du tok for oss.

Sutajini Yogarajah: Tusen takk for en kjempe hyggelig omvisning i lab, labsikkerhet, hjelp i metyleringsprosess, og ikke minst for alle hyggelige samtaler.

Jeg vil takk ingeniør Anders Moe ved institutt for biovitenskap for hans hjelp med ESI-MS analyse.

En stor takk rettes til mine foreldre Mohammad Alzubaidi og Insherah Alzubaidi som har støttet og oppmuntret meg gjennom alle disse årene.

Takk til alle mine søsken som har motivert meg gjennom helestudiet.

Takk til mine venner ved Universitet i Oslo for en hyggelig og minnerik studietid.

Mai, 2013

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Forkortelsesliste .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Introduksjon .....</b>	<b>3</b>
2.1	$\beta$ -glukan.....	3
2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
2.3	$\beta$ -glukan fra gjær.....	7
2.4	Legumain .....	9
2.5	Makrofager.....	11
2.5.1	RAW 264.7.....	12
<b>3</b>	<b>Mål med oppgave.....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>Metoder.....</b>	<b>14</b>
4.1	Kjemikalier .....	14
4.2	Generelle metoder.....	16
4.2.1	Innveing.....	16
4.2.2	Vann.....	16
4.2.3	pH-justering.....	16
4.2.4	Frysetørring.....	16
4.2.5	Sentrifugering.....	17
4.2.6	Dialyse.....	17
4.2.7	Fenol- svovelsyretest.....	18
4.3	$\beta$ -glukan.....	18
4.3.1	Isolering av løselig fraksjon.....	19
4.3.2	Metanolyse .....	20
4.3.3	Gasskromatografi (GC).....	21
4.3.4	Metylering.....	22
4.3.5	Gasskromatografi- massespektroskopi.....	25
4.3.6	HPAEC- PAD.....	25
4.3.7	Væskeskromatografi (HPLC).....	26
4.3.8	Preparativ gelfiltrering (SEC).....	28
4.3.9	Elektrospray ionisering massespektroskopi (ESI-MS).....	29
4.4	Degradering av $\beta$ -glukan.....	30
4.4.1	Bestemmelse av reduserende ende .....	30
4.4.2	Enzymdegradering.....	30
4.4.3	Partiell hydrolyse.....	31
4.5	Celleforsøk .....	32
4.5.1	Celledyrkning .....	32
4.5.2	Splitting av celler .....	32
4.5.3	Celletelling.....	33
4.5.4	Utsåing av celler .....	33
4.5.5	Stimulering med $\beta$ -glukanprøver.....	33
4.5.6	Lysering av celler.....	34
4.6	Måling av Legumain aktivitet .....	34
4.6.1	Måling av totalprotein .....	35
4.6.2	Celleproliferasjons test (MTT).....	36
<b>5</b>	<b>Resultater.....</b>	<b>37</b>

<b>5.1</b>	<b>Isolering av løselig fraksjon</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2</b>	<b>Karakterisering av <math>\beta</math>-glukan</b> .....	<b>37</b>
5.2.1	Monosakkaridsammensetning.....	37
5.2.2	Estimering av molekylvekten til WML.....	38
5.2.3	Preparativ gelfiltrering.....	39
5.2.4	Karakterisering av bindingsforhold i WML .....	41
<b>5.3</b>	<b>Degradering av WML</b> .....	<b>42</b>
5.3.1	Enzymdegradering.....	42
5.3.2	Partiell hydrolyse.....	51
<b>5.4</b>	<b>Stimulering av RAW 246.7-celler og måling av legumainaktivitet</b> .....	<b>54</b>
5.4.1	Celleviabilitetstest MTT .....	59
<b>6</b>	<b>Diskusjon</b> .....	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Isolering av løselig fraksjon</b> .....	<b>60</b>
<b>6.2</b>	<b>Karakterisering av <math>\beta</math>-glukan</b> .....	<b>60</b>
6.2.1	Monosakkarid sammensetning.....	60
6.2.2	Estimering av molekylvekt .....	61
6.2.3	Karakterisering av bindingsforhold.....	61
<b>6.3</b>	<b>Degradering av WML</b> .....	<b>62</b>
6.3.1	Partiell hydrolyse.....	62
6.3.2	Enzymdegradering.....	63
<b>6.4</b>	<b>Stimulering av RAW 264.7 celler og måling av legumainaktivitet</b> .....	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>Veien videre</b> .....	<b>69</b>
	<b>Litteratur liste</b> .....	<b>70</b>
	<b>Vedlegg / Appendiks</b> .....	<b>74</b>

# 1 Forkortelsesliste

AEG	Asparaginyll endopeptidase
CR-3	Komplementreseptor-3
DMSO	Dimetylsulfoksid
DTT	Ditritreitol
ESI	Elektrospray ionisering
FID	Flammeionisasjonsdetektor
GC	Gasskromatografi
HDL	Høy densitet lipoprotein
HPAEC	High Performance Anion Exchange Chromatography-
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kDa	Kilo-dalton
LDL	Lav densitet lipoprotein
mAb	Monoklonale antistoffer
MBP	Myelin basisk protein
MHC	Hovedvevsforlikelighetsantigenkomplekset
MS	Massespektrometri
Mw	Molekylvekt
PAD	Pulsed Amperometric Detection
PAMP	Patogen assosiert mønster molekyl
PBS	Fosfatbufret salin
PRR	Mønster gjenkjennelses reseptor
ROS	Reaktiv oksygen arter
SEC	Size Exclusion Chromatography
TFA	Trifluoroeddiksyre
TLR	Toll-like reseptor
TMS	Trimetylsilyl
TNF	Tumornekrosesfaktor
WML	Den isolerte $\beta$ -glukan



WMP

Den partikulære wellmune

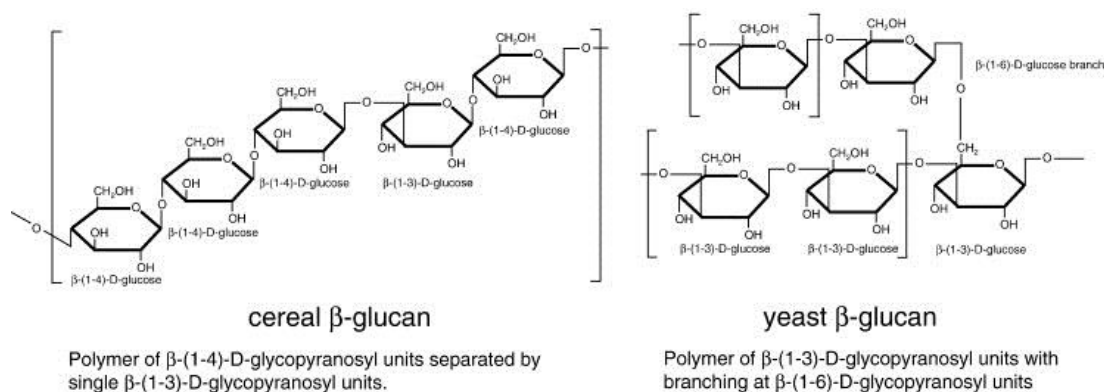
WMS

Den løselige wellmune

# 2 Introduksjon

## 2.1 $\beta$ -glukan

$\beta$ -glukaner er naturlige polysakkarider som består av  $\beta$ -D-glukoseenheter bundet sammen med glukosidbindinger (Auinger, Riede et al. 2013).  $\beta$ -glukan er en del av gjær-, sopp- og bakteriecellevegg. Korn som bygg og havre inneholder også  $\beta$ -glukan i sin endosperm cellevegg.  $\beta$ -glukan kan variere i struktur og forgreninger avhengig av  $\beta$ -glukankilden.  $\beta$ -glukan fra gjær og sopp inneholder  $1 \rightarrow 3$  bundet glukoseenheter, med  $1 \rightarrow 3/1 \rightarrow 6$  forgreninger.  $\beta$ -glukan fra korn er lineær og er bygget opp av korte sekvenser av  $1 \rightarrow 4$  D-glukose.  $1 \rightarrow 4$  sekvenser er bundet sammen med  $1 \rightarrow 3$  D-glukose, **figur (1)**. Fysikalske og kjemiske egenskaper til  $\beta$ -glukan som løselighet, tertiærstruktur, molekylvekt, og grad av forgrening kan variere avhengig av  $\beta$ -glukankilden (Volman, Ramakers et al. 2008).



$\beta$ -Glucan type	Structure	Description
Bacterial	—————	Linear $\beta$ 1,3 glucan (i.e. Curdlan)
Fungal	┆┆┆┆┆	Short $\beta$ 1,6 branched, $\beta$ 1,3 glucan (i.e. Schizophyllan)
Yeast	—┆—┆—	Long $\beta$ 1,6 branched, $\beta$ 1,3-glucan (i.e. WGP $\beta$ -glucan, Betafectin™)
Cereal	—■—■—	Linear $\beta$ 1,3/ $\beta$ 1,4-glucan (i.e oat, barley, rye)

Figur-1  $\beta$ -glukan kilde og struktur (Volman 2008)

$\beta$ -glukan har interessante fysiologiske effekter, og har derfor fått mye oppmerksomhet i forskning.  $\beta$ -glukan er en biologisk responsmodifikator (BRM) (Driscoll, Hansen et al. 2009). En BRM er et stoff som kan påvirke immunsystemet, og dette gjør  $\beta$ -glukan, den

modulerer immunsystemet positivt. Positiv immunmodulering eller som det kalles også immunpotensering, spiller veldig viktig rolle i behandling av en rekke sykdommer der immunsystemet er involvert, som kreft. Immunmodulerende stoffer er fordelt i tre grupper: den første gruppen er intakte mikrober, bakterielle komponenter eller sopp komponenter som zymosan og  $\beta$ -glukan, mens den andre gruppen er naturlige komponenter fra et normalt immunsystem, som hormoner, og den tredje gruppen er syntetiske komponenter. Forskning fokuserer mest på den første gruppen (Novak and Vetvicka 2008). En del av den første gruppen, intakte mikrober eller bakterielle komponenter, kalles for PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*, patogen-assosierte mønstermolekyler. PAMPs gjenkjennes av menneskets immunsystem via PRR, *Pattern recognition receptors*, mønster gjenkjennelsesreseptorer. PAMPs er molekyler som er en del av mikroorganismens cellevegg som  $\beta$ -glukan eller kan være en overflate molekyl som gjenkjennes av hovedsakelig makrofagene. Makrofagene detekterer  $\beta$ -glukan via sine PRR som TLR-2, dektin-1, CR3 og laktocylceramid reseptor (Novak and Vetvicka 2008).

$\beta$ -glukan har også positive effekter på hjertekarsystemet. Studier har vist at havre  $\beta$ -glukan reduserer total kolesterol i blodet, øker HDL, og senker LDL. Inntak av havre  $\beta$ -glukan har gunstige effekter på forebygging, behandling og kontroll av diabetes. Dessuten kan havre  $\beta$ -glukan aktivere monocytter, makrofager, NK-celler, og kan øke mengder av immunoglobuliner, noe som kan bedre immunresponsen ved kreft og infeksjoner (Daou and Zhang 2012).

Curdlan er en bakteriell, linær 1 $\rightarrow$ 3  $\beta$ -glukan som stammer fra *Alcaligenes faecalis* som er en jordbakterie som har vist i en musestudie å ha en effekt mot leishmania ved å øke produksjon av T-hjelpeceller Th1 og Th17 som produserer cytokiner som IL-6, IL-1 $\beta$  og IL-23. Th17 produserer IL-17 og IL-23 som ble funnet å være viktig i behandling av leishmania infeksjon. Curdlan aktiverer makrofager ved å binde seg til dektin-1 reseptor, dermed øker produksjonen av TNF- $\alpha$  og NO (Ghosh, Sharma et al. 2013).

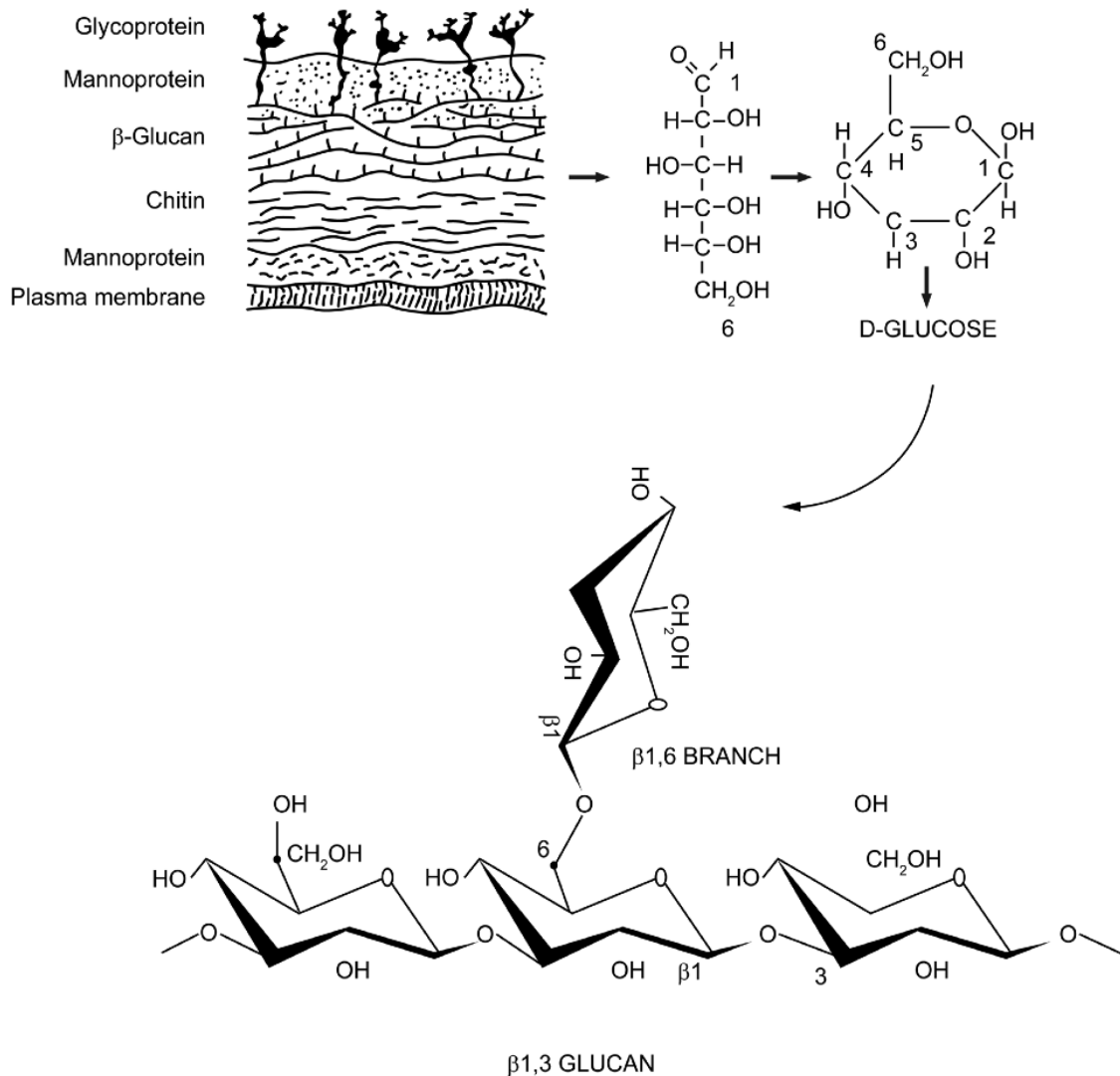
Mange andre studier ble gjort for å undersøke  $\beta$ -glukan fra forskjellige kilder, og studiene har kommet med veldig positive funn i forhold til modulerings av immunsystemet. Behovet for å finne ut mer, og forske på  $\beta$ -glukan er fortsatt stort før det kan tas i bruk medisinsk.

## 2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Gjær er encellet eukaryote mikroorganisme. Det er kjent fra lang tid tilbake, og mennesker har brukt det til brødbaking, øl- og vingjæring. I dag spiller gjær en stor rolle i brødindustri og ikke minst i forskning. Gjærstammen som brukes i fermenteringsindustri er stort sett *Saccharomyces cerevisiae*. Etter ølgjæring blir rester av gjær rensset og brukt som kosttilskudd. Ølgjær som kosttilskudd ble først brukt for hud, hår og ikke minst for å forsterke immunsystemet. Grunnen til det er at ølgjær er rik på B-vitaminer og inneholder en del mineraler. Allerede i 1919 ble det gjort forsøk for å bestemme innholdet av ølgjær. Det ble funnet at ølgjær inneholder en del vannløselige vitaminer og uorganiske salter som har betydning i kostholdet (Osborne and Wakeman 1919).

En dyrestudie ble gjort for å se effekten av ølgjærekstrakt i behandling av utmattelsessyndrom. Musene i studien ble injisert med *Brucella abortus* antigen hver andre uke for å indusere kronisk utmattelsessyndrom hos musene. Et ølgjærekstrakt ble oralt administrert 2 uker før injeksjon og 4 uker etter. Musenes løpeaktivitet, definert som antall hjulrunder i 24 timer, ble målt og sammenlignet mellom gruppen som fikk ølgjærekstrakt og gruppen som var ubehandlet. Miltvekten, prosent av miltens follikulær området og ekspresjonsnivå av interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) og interleukin-10 (IL-10) mRNA i milten ble bestemt for begge gruppene før studiestart. Den behandlede gruppen hadde høyere daglig aktivitet enn den ubehandlede allerede etter den andre injeksjon med *Brucella abortus* antigen. Produksjon av IFN- $\gamma$  og IL-10 var nedsatt i den behandlede gruppen. Resultatet fra denne studien var at en ekstrakt fra ølgjær kan være beskyttende etter gjentatt injeksjon med *Brucella abortus* antigen ved å normalisere vertens immunrespons (Takahashi, Yu et al. 2006).

*S.cerevisiae* er en godt studert organisme, celleveggen som utgjør 80-90 % av cellenes tørrvekt er også studert. Celleveggen inneholder like store mengder av  $\beta$ -glukan som  $\alpha$ -mannan, begge komponentene kan medføre fagocytose i en mus-cellelinje (Giannis, Lombard et al. 1993). Gjærcelleveggen inneholder (1 $\rightarrow$ 3)-D-glukose, (1 $\rightarrow$ 6)-D-glukose, chitin og mannoprotein bundet sammen, (figur-2). Mannoprotein virker som fyll i celleveggen og er veldig viktig for permeabilitet av celleveggen (Kollár, Reinhold et al. 1997).



**Figur-2** Gjærcelleveggen oppbygning (Chan, Chan et al. 2009)

Zymosan er et produkt som ble laget av celleveggen til *S.cerevisiae*, celleveggen ble laget ved koking av celler og trypsinering. Produktet inneholder definerte polysakkarider som  $\beta$ -glukan, mannan og chitin. Zymosan blir fagocytet av de medfødte immuncellene som makrofagene, monocyttene og leukocytene, dermed stimulerer den sekresjon av inflammatoriske mediatorer som TNF- $\alpha$ , IL-8, hydrogenperoksid, og arakidonsyre (Sato, Sano et al. 2003). Zymosan brukes som modell for å studere det medfødte immunsystemet og immuncellenes forskjellige aktiveringsmekanismer som fagocytose, og regulering av cytokinproduksjon. Zymosan blir fagocytet ved binding til forskjellige reseptorer som dektin-1, TLR-2 og integrin Mac-1 (Jiang, Sternweis et al. 2013). Ved binding til dektin-1 reseptor i dendrittiske celler induserer zymosan produksjon av interleukin-10 (IL-10) og nesten ingen IL-6 og IL-12 (Dillon, Agrawal et al. 2006).

## 2.3 $\beta$ -glukan fra gjær

$\beta$ -glukan er en av hovedkomponentene som danner gjærcellevegg.  $\beta$ -glukan utgjør 30-60% av gjærcelleveggen (Barsanti, Passarelli et al. 2011). Gjær  $\beta$ -glukan er kommersielt tilgjengelig i preparater som Zymosan fra Sigma-Aldrich, Yestimun® fra Leiber GmbH, Wellmune® fra Biothera, og nbg®24:7™ fra Immunocorp AS. Zymosan er et produkt fra gjærcelleveggen som inneholder proteinkarbohydratkomplekser. Yestimun® er et tysk produkt som produseres av ølgjær, og markedsføres som godt for immunsystemet. Wellmune® markedsføres også som immunmodulerende preparat, og at den aktiverer det medfødte immunsystemet. Produsenten Biothera hevder at  $\beta$ -glukan i Wellmune® er utvunnet fra en bestemt gjærstamme av *S.cerevisiae*. nbg®24:7™ inneholder norske  $\beta$ -glukaner som er utvunnet også fra *S.cerevisiae* og den markedsføres som norske  $\beta$ -glukaner som har en immunmodulerende effekt. Immunocorp som produserer nbg®24:7™ kapsler, har en hudpleieserie som inneholder norske  $\beta$ -glukaner.

### *Kolesterolsenkende effekt*

I en studie ble det funnet at gjær  $\beta$ -glukan betydelig senket den totale kolesterolkonsentrasjon i blodet, og hevet HDL-nivået. 15 overvektige menn deltok i studien. Deltakerne hadde forhøyet total kolesterol, men var ikke under medikamentell behandling. Studien startet med 3 uker innkjøringsperiode, fulgt av 8 uker behandling med 15 g  $\beta$ -glukan daglig og 4 uker uten behandling. Total kolesterol og HDL nivå ble målt ved innkjøringsperioden, uke 8 og uke 12.  $\beta$ -glukan fra gjær har redusert total kolesterol og forhøyet HDL-konsentrasjon ikke før 4 uker etter at inntaket av  $\beta$ -glukan ble stoppet (Nicolosi, Bell et al. 1999).

### *Effekt på forkjølelse og øvre luftveisinfeksjoner:*

For å bekrefte den immunmodulerende effekt av  $\beta$ -glukan ble den testet i kliniske studier. En studie ble utført for å teste effekten av  $\beta$ -glukan på sirkulerende cytokiner og kjemokiner med hensyn til øvre luftveisinfeksjoner. Studien var randomisert, dobbel-blindet, placebo-kontrollert og gikk over 90 dager. Preparatet som ble testet var WGP® den partikulære  $\beta$ -glukan, mot rismel i placebo. Deltakere i studien fikk 250 mg daglig. Studien konkluderte

med at WGP® gir redusert varighet og redusert alvorlighetsgrad av øvre luftveisinfeksjon og symptomer på luftveisinfeksjoner. Nivået av cytokiner var uendret mellom placebogruppen og gruppen som fikk WGP® ved studiestart og ved avslutning (Fuller, Butt et al. 2012).

I en annen studie ble det undersøkt om uløselig  $\beta$ -glukan Yestimun® bidrar til å opprettholde kroppens immunforsvar mot patogener i friske personer. Studien var randomisert, placebo-kontrollert og dobbel-blindet. Studien varte i 16 uker, 162 deltakere ble delt i to grupper. En gruppe fikk en døgndose på 900 mg  $\beta$ -glukan, som skulle fordeles to ganger daglig. Placebogruppen fikk kapsler med placebo som også skulle inntas to ganger daglig. Resultatet fra studien viste at partikulært  $\beta$ -glukan reduserte antall forkjølelsepisoder i  $\beta$ -glukangruppen. En svak forbedring i totale forkjølelssymptomer, og signifikant reduksjon i søvnforstyrrelser forårsaket av forkjølelse ble observert ved  $\beta$ -glukangruppen (Auinger, Riede et al. 2013).

En dobbel-blindet randomisert, placebo-kontrollert studie ble utført med samme produkt Yestimun® for å teste forbedring av immunforsvaret. To grupper med 50 deltakere i hver gruppe fikk enten placebo eller Yestimun®. En gruppe fikk 450 mg  $\beta$ -glukan to ganger daglig, og placebogruppen fikk mikrostallinsk cellulose. Studien konkluderte med at  $\beta$ -glukan har en signifikant infeksjons- og forkjølelssforebyggende effekt. En signifikant reduksjon på forkjølelssvarighet og mildere symptomer ble også observert (Graubaum, Busch et al. 2012).

#### *$\beta$ -glukan og kreft:*

Som tidligere nevnt og som studier har vist så har  $\beta$ -glukan en immunmodulerende effekt. Forskjeller i struktur og kilde til  $\beta$ -glukan, fører til forskjell også i biologisk aktivitet. Det ble rapportert at  $\beta$ -glukan er viktig i adjuvant kreftterapi.  $\beta$ -glukan virker ved å stimulere de medfødte og adaptive immunresponser. Studier har vist at den partikulære  $\beta$ -glukan aktiverer dendritiske celler, makrofager ved dectin-1 reseptor som fører til økning av antitumor immunresponser. Aktiverte dendritiske celler stimulerer differensiering av T-hjelpeceller (Th1), og cytotoksiske T-lymfocytter in vitro (Qi, Cai et al. 2011).

I en dyrestudie ble  $\beta$ -glukan fra forskjellige kilder testet sammen med monoklonale antistoffer i kreft behandling.  $\beta$ -glukan fra gjær og forskjellige type sopp ble testet på murin modell for å sammenligne effektivitet av mAb-behandling alene og sammen med  $\beta$ -glukan.

Resultatet fra studien viste at effektiviteten av mAb-behandling økte ved samtidig behandling med  $\beta$ -glukan, særlig  $\beta$ -glukan fra gjær. Oral administrert partikulær  $\beta$ -glukan fra gjær tas opp gjennom M-cellene i mage-tarmsystemet og så blir den fagocyttert av makrofagene i milten og beinmarg. Deretter blir små deler av degradert  $\beta$ -glukan frigitt. Disse små delene binder seg til CR-3 i nøytrofile celler, på samme måte som løselig  $\beta$ -glukan, dermed blir cellene aktivert til å drepe iC3b-opsonisert gjær eller tumorceller. Løselig  $\beta$ -glukan stimulerer også makrofagene til å skille ut IL-6 og TNF- $\alpha$ . En slik aktivering av det medfødte immunsystemet ga bedre antitumor effekt og økt langsiktig overlevelse enn behandling med monoklonale antistoff alene (Driscoll, Hansen et al. 2009).

## 2.4 Legumain

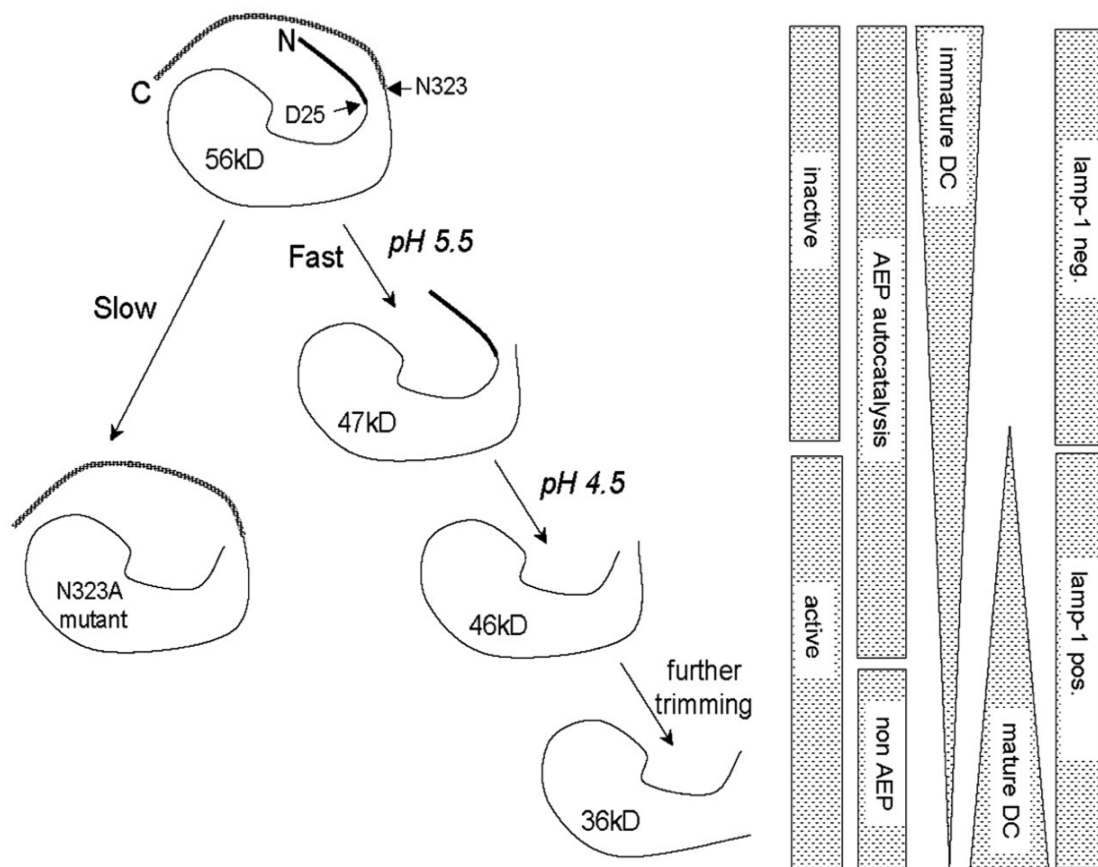
Legumain eller asparaginylindepeptidase (AEP) er en lysosomal cysteinproteaseenzym som bryter ned proteinsubstrater spesifikk ved C-terminal i asparagin i P1-posisjon. Den tilhører C-13 familie i humane cysteinendepeptidaser. Legumain ble først oppdaget i planter og i *schistosoma mansoni* (Chen, Dando et al. 1997).

Legumain er mest uttrykt i nyrer, men den finnes også i lever, milt, prostata og makrofager. I nyrene bidrar legumain til normal proteinkatabolisme og renal homeostase. Legumain bryter ned fibronektin i proksimaltubuli-cellene, og det bidrar til remodulering av ekstracellulære matriks. Legumain er involvert i patogenesen for en rekke sykdommer som aterosklerotiske lesjoner, slag, og kreft (Edgington, Verdoes et al. 2012, Yamane, Hachisu et al. 2012).

Legumain er overtrykt i prostata, kolon og brystkreft. Legumain blir trykt av tumorceller, endotelceller og tumor assosiert makrofager (TAM). Legumain er involvert i cellemigrasjon, metastase og vevinvasjon (Liu, Sun et al. 2003, Liu 2008).



Li og sine medarbeidere har kartlagt hvordan legumain aktiveres. Enzymet er syntetisert som et inaktiv preproprotein. Preproproteinet prosesseres til prolegumain med molekylvekt på 56 kDa. Prolegumain fraktes fra golgiapparatet til lysosomene, der skjer en spalting av C-terminal etter asparagin 323 (N323), og en ved N-terminal etter asparaginsyre 25 (D25). Legumain blir aktivt etter den siste spalting som skjer ved pH 3,5-4,5 og da har enzymet molekylvekt (46 kDa), (figur-3). Legumain blir prosessert *in vivo* til 36 kDa ved hjelp av andre proteaser, men dette fører ikke til økning av enzymaktivitet (Li, Matthews et al. 2003).



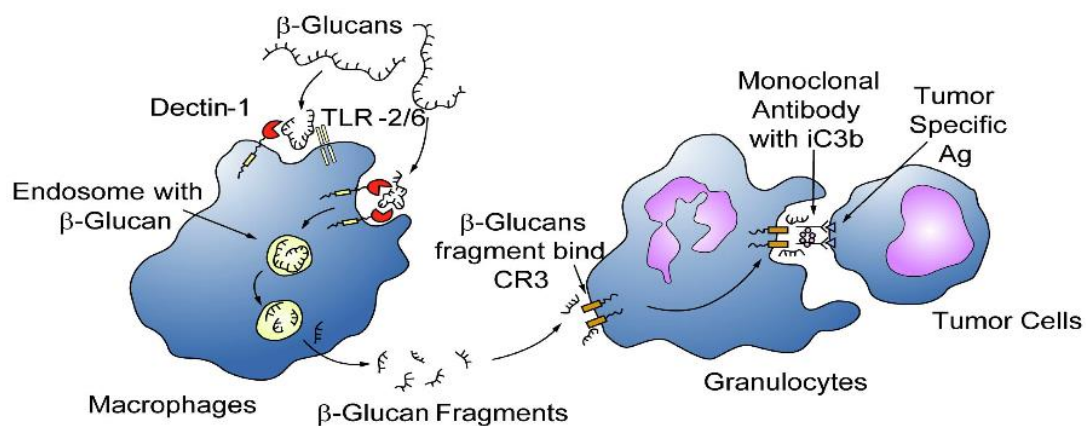
**Figur -3:** Aktivering av legumain. Den inaktive 56-kDa proenzymet befinner seg prelysosomalt omdannes gradvis til aktiv legumain ved autokatalytisk spalting ved Asn 323 etterfulgt av Asp 25. Den siste spalting som fører til endelig enzymet fører ikke til ytterligere økning i aktivitet (Li, Matthews et al. 2003).

Legumain er involvert i mange prosesser i kroppen, blant annet nedbrytning av bakterielle antigener i lysosomer/ endosomer. Degradert antigener danner komplekser med ”major histocompatibility complex” MHC klasse II som presenteres til T-celler. Eksempel på dette er tetanus toksinet som blir kløvyet og utfoldet av legumain. Utfoldet protein blir gjenkjent av MHC klasse II molekyler som danner et kompleks med det, og så presenterer det til T-celler (Manoury, Hewitt et al. 1998).

Legumain kan også hindre kompleksbinding av antigen og MHC klasse II molekyler. Eksempel på dette er myelin basic protein MBP. MBP er et protein som er involvert i patogenesen til multipel sklerose. Legumain prosesserer MBP noe som hindrer binding av MHC II molekyler, og videre en uønsket autoimmun reaksjon (Beck, Schwarz et al. 2001). Legumain er involvert i hemming av osteoklastdannelse i benmargen. Dette fører til hemming av benresorpsjon (Choi, Kurihara et al. 2001).

## 2.5 Makrofager

Makrofager er kroppens ”gatefeier” eller scavenger, de fagocytterer, fjerner døde celler, cellerester og ikke minst fjerner invaderende mikroorganismer. Makrofagene har forskjellige overflatereseptorer som CR1, CR3 og CR4 som binder komplemente proteiner. Aktiverte komplemente proteiner som har bundet seg til en bakterie, binder seg videre til komplemente reseptorer på makrofager, noe som fører til endocytose av bakterien. Makrofagene har PRR, som gjenkjenner deler av invaderende mikroorganismer som  $\beta$ -glukan partikler, eksempler på disse reseptorene er: lektin-reseptorer, dektin-1 og Toll-like reseptorer TLR-2 og TLR-6. Dektin-1 gjenkjenner partikulært  $\beta$ -glukan og CR-3 gjenkjenner den løselige  $\beta$ -glukan (Pharham 2009, Goodridge, Reyes et al. 2011). Makrofagene frigjør substanser som NO og tumornekrosefaktoralfa (TNF- $\alpha$ ) som er med på å uskadeliggjøre mikroorganismer og kreftceller. Makrofagene spiller også en indirekte rolle i bekjempelse av infeksjoner og tumordannelse i kroppen ved sekresjon av cytokiner og antigen prosessing og presentering (Klimp, De Vries et al. 2002). Fagocyttering av  $\beta$ -glukan ved binding til dektin-1 fører til aktivering av makrofagene, produksjon av ROS og utskillelse av forskjellige cytokiner, det medfører også til degradering av  $\beta$ -glukan til små løselige fragmenter.  $\beta$ -glukan binding til dektin-1 reseptor skjer ved samarbeid eller uten samarbeid med TLR-2/6. Fragmentert  $\beta$ -glukan som blir skilt ut, binder seg til CR-3 i nøytrofile celler og fører til en immunrespons(Chan, Chan et al. 2009)( figur-4).



**Figur-4** Forskjellige måter å aktivere immunsystemet med for å få antitumoreffekt. Makrofagene binder  $\beta$ -glukan via dectin-1 i samarbeid med eller uten TLR-2/6, degraderer den til løselige fragmenter. Fragmentert  $\beta$ -glukan binder seg til CR-3. (Chan, Chan et al. 2009).

### 2.5.1 RAW 264.7

RAW-264.7 er makrofagcellelinje fra mus som er injisert med Abelson leukemivirus. RAW-264.7 celler uttrykker dectin-1 reseptor (Brown and Gordon 2001) som er ansvarlig for fagocytose i makrofagene og som fagocytterer blant annet partikulær  $\beta$ -glukan. I produktdatabladet for cellelinje fra produsenten står det at disse cellene fagocytterer zymosan som er en partikulær  $\beta$ -glukan (ATCC 2012). Det er svært sannsynlig at RAW 264.7 uttrykker legumain siden den er en makrofagcellelinje. Det er ikke kjent per i dag om  $\beta$ -glukan fra gjær påvirker legumain produksjon i makrofager. Det er det som skal undersøkes ved denne oppgaven.

### 3 Mål med oppgave

I denne oppgaven var det overordnede målet å undersøke om  $\beta$ -glukan fra gjær kan påvirke legumainaktivitet.

Målet med oppgaven oppnås ved:

- Å karakterisere  $\beta$ -glukan fra gjær med hensyn på monosakkaridsammensetning, bindingsmønster og molekylvekt
- Å studere effekt av  $\beta$ -glukan på legumainaktivitet i RAW 264.7 cellelinje.
- Å studere hvordan legumainaktiviteten i RAW 264.7 forholder seg til  $\beta$ -glukans molekylvekt.

# 4 Metoder

## 4.1 Kjemikalier

Kjemikalie	Produsent
1-Metylimidazol	Fluka
Ammoniakk	Merck
Benzyloksykarbonyl-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, Waltham, MA
D-Mannitol	Sigma- Aldrish
Di-Natiumhydrogensulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	Merck
Diklormetan	Merck
Dinitrosalisylsyre (DNS)	Merck
DMSO (dimetylsulfoksid)	Sigma- Aldrish
Eddiksyre 100 %	Merck
Endo-1,3- $\beta$ glukanase	Megazyme
Etanol	Arcus
Glukose	Sigma
Heksan	Sigma
Kloroform	Prolabo
Metanol	Merck
Metanolisk HCl 3M	Supelco analytical, USA
Metyljodid	Fluka
Natriumacetat	Merck
Natriumborodeuterid	Aldrish
Natriumfosfat	Merck
Natriumklorid	AnalaR®Normapur
Natriumsulfat	Merck
Penicillin (100U/mL)	Sigma

<b>Saltsyre</b>	Prolabo
<b>Streptomycin (100 µg/mL)</b>	Sigma
<b>Sølvnitrat</b>	Merck
<b>Triflouroeddiksyre (TFA)</b>	Merck
<b>Vannfritt metanol</b>	Sigma
<b>Wellmune</b>	Biothera
<b>Wellmune soluble powder product</b>	Biothera
<b>β-glukan standarder</b>	Megazyme

## **4.2 Generelle metoder**

### **4.2.1 Innveing**

Vektene som ble brukt til innveining var Sartorius analysevekt og Mettler overskålevekt.

### **4.2.2 Vann**

Vannet som ble brukt i alle forsøkene er destillert vann.

### **4.2.3 pH-justering**

Justering av pH ble foretatt ved hjelp av et pH-meter (Mettler Toledo, Seven Easy). pH bufferne som ble brukt til kalibrering av pH-meteret ved pH-buffer 4 og 7 (Hamilton Duracal Buffer, Hamilton Bonandus AG Switzerland).

### **4.2.4 Frysetørring**

Frysetørring er en metode som brukes for å øke holdbarhet og øke løselighet av stoffer. Stoffene fryses ned, deretter frysetørket ved å fjerne is ved sublimasjon. Fjerning av is fører til muligens en ending i konformasjon som gjør stoffet lett mottakelig for vann igjen, og stoffet for økt løselighet.

- Metanolbad: Hetofring, Heto Birkerød Danmark
- Frysetørker: Christ Alpha 1-4
- Pumpe: Chemistry Hybrid RC5, Vacuumbrand Wertheim Germany.

Prøvene ble rundfryst i metanolbad eller frosset ned i fryser, og deretter frysetørket utenpå eller inni frysetørkeren.

### 4.2.5 Sentrifugering

To sentrifuger ble brukt for å sentrifugere prøvene i. En stor sentrifuge Multifuge 4 KR, Heraeus.

Den andre, Thermo Fresco 21 centrifuge, ble brukt til sentrifugering av cellelysaten som var i ependorfrør.

### 4.2.6 Dialyse

Dialyseslanger, Spectra / por Mw cut off 12-14000 Da ble kokt i destillert vann i 10 minutter tilsatt 100µl 0,1 M NaOH per liter vann. Kokte slanger ble skylt med destillert vann, deretter ble de kokt på nytt med bare destillert vann i 10 minutter. Tilslutt ble dialyseslangene skylt med destillert vann og var klar til bruk.

Dialyseslanger, Spectra/ por Mw 3500 Da ble kokt i destillert vann i 10 minutt tilsatt en pellet NaOH (som tilsvarer 0,21g) per liter vann. Kokte slanger ble skylt med destillert vann, deretter ble de kokt på nytt med bare destillert vann i 10 minutter. Tilslutt ble dialyseslangene skylt med destillert vann og var klar til bruk.

Slangene ble lukket i den ene enden ved hjelp av en plastklemme og skylt med vann. Slangen ble fylt til  $\frac{3}{4}$  med prøveløsning også ble det tilsatt 2-3 dråper toluen for å hindre bakterievekst. Luften ble presset ut av slangene, deretter ble de lukket med en plastklemme. Slangene ble lagt i et stor begerglass med destillert vann, ble satt i kjølerom 4°C med magnetrør.

Vannet ble byttet flere ganger i løpet av dagen. Dialysevannet ble testet for innhold av NaCl; da den skulle fjernes fra prøveløsning; ved å dryppe noen dråper AgNO<sub>3</sub>. Ble vannet blakket var det fortsatt kloridioner i prøven, og dialysen var ikke ferdig enda.



## 4.2.7 Fenol- svovelsyretest

### Prinsipp:

Fenol- svovelsyretest er en metode som brukes for å bestemme karbohydratinhold i en prøve. Karbohydrater og deres derivater danner sammen med fenol og konsentrert svovelsyre guldfarget forbindelse som indikerer innhold av karbohydrater i en prøve. Guldfargen absorberer UV-lys ved 390 nm (Dubois, Gilles et al. 1956).

### Reagenser:

Konsentrert svovelsyre

4 % fenol

### Utførelse:

Prøveløsning 200 µl ble tilsatt i et glassrør, deretter tilsatt 200 µl 4 % fenol og 1 ml konsentrert svovelsyre. Innholdet ble blandet ved hjelp av votex. Løsning ble satt på benk ca 30 min minutter for å kjøle ned. Deretter ble absorbans målt ved 390 nm.

## 4.3 β-glukan

β-glukan som ble brukt i denne oppgaven er fra gjær, isolert fra en bestemt gjærstamme av produsenten Biothera *the immune health company*. Biothera har utviklet fire typer β-glukan. Tabell-1 presenterer de fire typene.

**Tabell-1** Presentasjon av Biothera produkter, deres innhold av β-glukan, og løselighet ) (European Food Safety Authority (EFSA) 2011).

Navn	Løselighet	Innhold av β-glukan
BetaRight BWGP	Uløselig β-glukan	70 % β-glukan (1,3/1,6)
Wellmune WGPS	Løselig β-glukan	75 % β-glukan(1,3/1,6)
Dispersible WGPD	Uløselig β-glukan	75 % β glukan (1,3/1,6)
Wellmune WGP	Uløselig β-glukan	70 % β- glukan (1,3/1,6)

Alle de fire produktene inneholder også andre stoffer fra prosessering av *S.cerevisiae* som celleveggskomponenter, proteiner, fett, aske og fuktighet. WGPS ble brukt i oppgaven, og fra den ble det isolert en løselig fraksjon. Den løselige  $\beta$ -glukan ble kalt WMS som betyr Wellmune- solubale, mens den løselige fraksjonen som ble isolert ble kalt for WML Wellmune- løselig. Partikulært wellmune ble kalt for WMP.

### 4.3.1 Isolering av løselig fraksjon

#### Prinsipp:

WMS blir kalt av produsenten den løselige  $\beta$ -glukan, men er ikke helt løselig i vann. I tillegg inneholdte produktet celleveggskomponenter som vi ikke ville ha med i eksperimentene. Derfor ble det valgt å isolere en løselig fraksjon fra produktet.

#### Material:

Wellmune soluble powder product

Code F 3020, LOT 09297\_ 0,07 g

Destillert vann

Etanol 96 %

#### Utførelse:

WMS 2g ble veid inn, fuktet med 96 % etanol, deretter ble det løst i destillert vann under oppvarming 80 °C i 30 minutter. Løsningen ble sentrifugert ved 1500 rpm i 30 minutter. Det oppløste WMS ble dialysert, metode 2.2.6 for å fjerne uønskede stoffer. Dialyseslangene, Spectra / por Mw cut off 12-14000 Da, ble brukt. Etter ferdig opprensing, ble løsning av WMS ble frysetørket. Den rensede fraksjonen som fikk navnet WML ble veid inn i en egnet beholder med lokk og satt i fryseren til videre analyse.

### 4.3.2 Metanolyse

#### Prinsipp:

Metanolyse er en metode som utføres for å identifisere monosakkaridsammensetning i karbohydratpolymere. Hvis polysakkaridene blir utsatt for et surt, vannfritt, metanolholdigmiljø blir de spaltet til monosakkarider. Monosakkaridene vil danne metylglykosider ved C1-posisjon. Det er viktig at metanolyse skjer i vannfritt miljø for å hindre hydrolyse (Chambers and Clamp 1971).

#### Reagenser:

- 1 mg/ml mannitol i 1 M HCl i metanol Internstandard
- Vannfri metanol
- 3 M HCl i vannfri metanol
- TMS reagens (Vannfri pyridin, heksametyldisilazan, trimetylklorisilan)

#### Internstandard:

Mannitol 1 mg/mg ble lagd ved å løse 25 mg mannitol i 1 M HCl i metanol (25ml).

Videre ble prøven behandlet slik:

#### Utførelse:

Frysetørket WML (1 mg) ble veid inn i en supelcorør. Røret ble dekket med parafilm og en kanyle ble brukt til å lage hull i parafilmen. Prøven ble satt til tørking over forsfo pentoksid i 24-48 timer. Eksikatoren ble satt varmeskap ved 40°C. Det ble tilsatt 1 ml 3 M HCl i metanol til prøven, deretter ble 100 µl internstandard tilsatt. Prøven ble inkubert i varmeskap ved 80 °C i 24 timer. Etter inkubering ble prøven dampet inn med nitrogen gass til tørrhet. For å fjerne HCl fra prøven ble (200 µl) vannfritt metanol tilsatt til prøven. Deretter ble prøven tørket med nitrogen gass. Prøven ble satt til tørking i vakuum over forsfo pentoksid i minst en time før TMS-derivatisering. TMS (100 µl) ble tilsatt til prøven, prøven ble mikset godt på vortex mikser. Prøven ble satt til henstand i ca ½ time. Supernatanten (80 µl) ble overført til GC-prøverør med en glasspipette.

### 4.3.3 Gasskromatografi (GC)

#### Prinsipp:

Gasskromatografi er en metode som brukes for separasjon av stoffer som er flyktige eller kan omdannes til flyktige termisk stabile derivater. Mobilfasen er en gassform som kalles bæregass og stasjonærfasen er fylt i tynne kolonner. Stoffene injiseres i en oppvarmet injektor, og de fordampes ved inngangen til kolonnen. Bæregassen frakter med seg stoffene som fordeler seg mellom bæregassen og stasjonærfasen. Separasjonen av stoffene er avhengig av komponentenes affinitet til stasjonærfasen (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen 2010).

#### Reagenser:

Heksan til vask av injektor.

#### Utførelse:

Gasskromatograf : Thermo Scientific Focus  
Detektor: Flamme- ionisasjonsdetektor (FID)  
Injektor: Splitt/ splitless- injektor  
Kolonne: Restek kapillærkolonne (30 cm, 0,32 indre diameter) med 0.25  $\mu\text{m}$  filmtykkelse  
Bæregass: Helium  
Flow: Konstant trykk 0,70 bar  
Injeksjonsvolum: 1  $\mu\text{L}$   
Injeksjonstemperatur: 250  $^{\circ}\text{C}$   
Detektortemperatur: 300  $^{\circ}\text{C}$   
Temperaturprogram: initielt 140  $^{\circ}\text{C}$ , deretter økning med 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  til 170  $^{\circ}\text{C}$ , videre økning med 6  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  til 250  $^{\circ}\text{C}$   
Programvare: Chromeleon versjon 6,8  
Supernatant (1  $\mu\text{L}$ ) fra metanalyse prøven som er TMS derivatisert ble injisert i gasskromatografens injektor, og programmet ble startet.

## 4.3.4 Metylering

### 2.3.4.1 Metylering

Metylering er en derivatiseringsmetode som utføres for å karakterisere bindingsmønster til polysakkarider. Metoden består av følgende trinn: Metylering, hydrolyse, reduksjon, og acetylering, samt GC-MS

#### Prinsipp:

Polysakkarider inneholder fri OH-grupper som inngår i glykosidbindinger, for å kunne skille dem kan man utføre metylering. Frie hydroksylgrupper deprotoneres først med en sterkbases (NaOH i DMSO), deretter metyleres de med et metyleringsreagens som (CH<sub>3</sub>I), og frie metoksygrupper blir dermed til O-metyl-grupper (Ciucanu and Kerek 1984).

#### Reagenser:

- DMSO (Dimetylsulfoksid løsning)
- NaOH pellets, tørr
- Metyljodid CH<sub>3</sub>I
- Natriumtiosulfat-pentahydrat
- Kloroform

#### Utførelse:

WML (1 mg) ble veid in i metyleringsrør, DMSO (500 µL) ble tilsatt prøven. Prøven ble ristet i 20 minutter på en vortex ved 200 rpm for å løse opp stoffet. En nylaget suspensjon av NaOH løst i DMSO (50 µL) ble tilstt prøven ved hjelp av en SMI glasspipette. For å fjerne O<sub>2</sub> som kan gi sidereaksjoner ble prøven gasset med nitrogen. Deretter ble prøven ristet igjen på en vortex ved 200 rpm i 40 minutter. Metyljodid (400 µL) ble tilsatt prøven i avtrekk i tre omganger, deretter ble prøven satt til risting i 10 minutter etter hver tilsetning. Nylaget 100 mg/mL (10 mL) ble tilsatt prøver, etterfulgt med (2 mL) kloroform. Prøven ble mikset godt på en whirlmikser ( minst 40 sekunder), deretter ble prøven sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter for å separere fasene. Det ble tatt vare på kloroformfasen som ble vasker med destillert vann. Vasking av kloroform ble gjentatt 4-5 ganger, og prøven ble sentrifugert mellom hver gang. Kloroformfasen ble tilslutt overført til en nytt metyleringsrør, også tørket under nitrogengass.

#### 2.3.4.2 Hydrolyse

##### Prinsipp:

For å spalte glykosidbinding i de delvis metylerte polysakkarider utføres det en hydrolyse prosess. Polysakkaridene hydrolyseres med Triflouroeddiksyre (TFA). Da får man delvis metylerte monosakkarider

##### Materiale:

Prøven fra metylerings metode.

##### Reagens:

2,5 M TFA Triflouroeddiksyre

##### Utførelse:

TFA 2,5 M (500 µL) ble tilsatt til den metylerteprøven. Prøven ble blåst med nitrogen, deretter ble prøven satt i varmeskap ved 100 °C i 2 timer. Den hydrolyserte prøven ble avkjølt på benken, og så dampet til tørrhet med nitrogen gass.

#### 2.3.4.3 Reduksjon

##### Prinsipp:

For å åpne de delvis metylerte sykliske monosakkarider reduseres hemiacetal gruppen som er på C1 til alditoler . Et deuterium atom innføres fra NaBH<sub>4</sub> i det anomerisk karbonet. Deuteriumatomet gjør det lettere å skille mellom C1 og C6 ved GC- MS analyse.

##### Materiale:

Prøven som ble hydrolysert.

##### Reagenser:

2 M NH<sub>3</sub>- løsning

NaBH<sub>4</sub> i 2 M NH<sub>3</sub> ( nylaget)

5 % eddiksyre i metanol

Vannfritt metanol

Iseddikk

Utførelse:

En løsning av  $\text{NaBH}_4$  i 2 M  $\text{NH}_3$  ble nylaget. 2 M  $\text{NH}_3$  (500  $\mu\text{L}$ ) ble tilsatt den hydrolyserte prøven, etterfulgt med (500  $\mu\text{L}$ ) 1 M  $\text{NaBH}_4$  (nylaget). Prøven ble blandet på vortex, deretter ble prøven inkubert i 60 minutter ved 60 °C. Iseddikk (50  $\mu\text{L}$ ) ble tilsatt prøven i tre omganger for å ødelegge overskuddet av reduktant. Prøven ble tørket i speedVac i ca to timer. Deretter ble 2,5 mL 5 % eddiksyre i metanol, så ble prøven tørket i speedVac i ca en time. Det trinnet ble gjentatt en gang til. Vannfritt metanol 2,5 mL ble tilsatt i prøven, da ble den også tørket i speedVac i ca halv time. Det siste trinnet ble gjentatt en gang til.

#### 2.3.4.4 Acetylering

Prinsipp:

For å få mer flyktige produkter acetyleres de delvis metylerte alditoler ved hjelp av eddiksyreanhydrid.

Materiale:

Alle prøver fra redusering.

Reagenser:

1-metylimidazol

Eddiksyreanhydrid

Destillert vann

Diklormetan

Vannfri metanol

Utførelse:

Prøven ble tilsatt 200  $\mu\text{l}$  1-metylimidazole, etterfulgt med 2 ml eddiksyreanhydrid. For å oppnå god løselighet av prøven, ble prøven sonikert på ultralysbad, deretter ble prøven satt til henstand i 10 minutter ved romtemperatur. Prøven ble ekstrahert med 2x1ml diklormetan. Løsningen ble mikset godt i (minst 30 sekunder), deretter ble prøven sentrifugert ved 1000 rpm i 3 minutter. Diklormetanfasen (nederste fasen) fra begge ganger ble tatt ut med en

pasteturpipetter og overførte til et nytt metyleringsrør. Diklormetan fasen ble vasket med 2x5ml destillert vann. Den øverste fasen og mellomsjiktet ble fjernet. En ny pasteturpipetter ble brukt til å overføre den nederste fasen (diklormetan) til et supelcorør. Prøven ble dampet til tørrhet under nitrogengass. Diklormetan (800 µL) ble tilsatt prøven for analyse på GC-MS.

### **4.3.5 Gasskromatografi- massespektroskopi**

#### Prinsipp:

Detektor som kobles til GC maskinen kan være et massespektrometer. En kombinasjon av GC-MS gjør at stoffene kan separeres først i GC-kolonnen, deretter eluerer stoffene i massespekteret og bombarderes med elektroner under vakuum. Stoffene ioniseres og spaltes til mindre fragmenter. Molekylionene/ fragmentene akselereres inn i en masseanalysator hvor de blir separert etter forholdet mellom masse og ladning ( $m/z$ ). Hvert fragment har et unikt og karakteristisk massespekter. Informasjon som kan fås av tolkning av massespekter er molekylvekt, atomer som finnes i forbindelse, bruttoformel, hvilke grupper stoffet består av, og bindingsmønster(Pedersen-Bjergaard and Rasmussen 2010).

### **4.3.6 HPAEC- PAD**

#### Prinsipp:

*High Performance Anion Exchange Chromatography- Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD) er en effektiv metode for å separere oligosakkarider i følge molekylstørrelse under basiske forhold. Karbohydratene ioniseres i sterk basisk miljø og da blir de mer egnet for separering i en ionebytterkolonna (Hardy and Townsend 1988).

En HPAED-PAD består av reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og datamaskin med programvare. Prøven injiseres i kolonnen ved hjelp av trykket som føres fra pumpen. Prøven passerer først gjennom en forkolonne som plasseres foran hoved kolonnen for å filtrere bort partikler som kan skade kolonnen. Separerte molekyler vil detekteres av detektoren, og deteksjonen vil oversettes av programvare i form av kromatogram.

HPAED-PAD kan kobles til en CMD karbohydrat membran desalter for å samle fraksjonerte oligosakkarider. CMD er utviklet for å fjerne natriumionene fra natriumacetat løsning etter HPAED-PAD analyse.



### Utførelse:

Detektor	PAD (Pulsed Amperometric Detection)
Kolonne	CarboPak® PA100 (4 x 150 mm), BioLC® Dionex Comporation
Forkolonne	CarboPak® PA 100 ( 4 x 150 mm), BioLC® Dionex Comporation
Pumpe	Dualpump ICS-3000, Dionex
Autoinjektor	AutoSample, Dionex
Elueringsmiddel	100 mM NaOH og 500 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	20 µL
Programvare	Chromleon versjon 6,8
Desaltingsenhet:	CMD-I karbohydrat membrane desalter
Regenerant	150 mM TFA

Enzymdegraderte prøven ble veid inn og løst i destillert vann, filtrert 0,45 µm før analysen. De hydrolyserte prøvene ble også analysert ved denne metoden. Metoden ble brukt for fraksjonering av den enzymdegraderte prøven, da ble en karbohydrat membran desalter koblet til systemet. Fraksjonene ble oppsamlet etter toppenes retensjonstid i forskjellige dramglass. Prøvene ble samlet, fryst ned, og frysetørket.

### **4.3.7 Væskekromatografi (HPLC)**

HPLC *High Performance Liquid Chromatography* er en form for væskekromatografi som foregår under høyt trykk, den ble brukt som metode for å estimere molekylvekt til WML, enzymdegraderte prøven, og de hydrolyserte prøvene. En HPLC- instrument består av en reservoar for mobilfase, pumpe, injektor, kolonne, detektor og en datamaskin med programvare. Stoffene blir separert i kolonnen som er innpakket med stasjonærfasen. Mobilfasen pumpes gjennom kolonnen med konstant hastighet for å separere stoffene som er løst i en løsning som er blandbar med mobilfasen. Separerte stoffer ble detektert av detektoren, som gir en elektronisk respons for stoffene. Datamaskinen med egnet programvare oversetter responsen til et kromatogram.

Reagenser:

Destiller vann

50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Etanol 20 % til oppbevaring av kolonna.

Løsninger ble 0,45 µm filtrert og gasset med Helium.

β-glukan standarder molekyl vekt fra 30 – 650 kDa.

Utførelse:

Apparatur: Hitachi LaChrom Elite

Detektor: RI Detector L-2490 EZ

Programvare: Chrom Elite

Kolonne: TSK-Gel® G5000PWXL HPLC Column (7,8 mm x 30 cm), Supleco

TSK-Gel® G3000PWXL HPLC Column (7,8 mm x 30 cm), Supleco

Forkolonne: TSK-Gel® PWXL Guard Colum (6,0 mm x 4,0 cm), Supelco

Mobilfase: 50 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> filtrert med 0,45µm, degasset med helium

Flow: 0,5 mL/min

Injeksjonsvolum: 95 µL

Prøvene og standarder ble løst 1 mg/mL enten i destillert vann eller i Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, deretter filtrert med 0,45 µm. Kolonnen ble vasket med vann, deretter ble den vasket med mobilfasen (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Etter at analyse ble ferdig ble kolonnen vasket med vann, deretter med 20 % etanol. Seperasjonsområdet i TSK-3000 kolonnen er mindre enn 60 kDa for dextraner, og for TSK-5000 kolonnen mellom 50 og 7000 kDa (SUPELCO 1996).

### 4.3.8 Preparativ gelfiltrering (SEC)

#### Prinsipp:

Gelfiltrering eller eksklusjonskromatografi (size- exclusion chromatography, SEC) er en metode for separasjon av stoffer etter molekylstørrelse. Stoffene må være løselig i mobilfasen. Stoffene som separeres må ikke ha interaksjoner med stasjonærfasen for å oppnå en optimal separasjon. Stoffene bringes gjennom kolonne etter at mobilfasen fyller kolonnen. Passasje gjennom kolonnen skjer gjennom porene i stasjonærfasen. De minste molekylene fraktes gjennom de minste porene, og da bruker de lengere tid å komme seg gjennom porene enn større molekyler som ikke går gjennom porene (Pedersen-Bjergaard and Rasmussen 2010).

#### Reagenser:

Destillert vann 0,45 µm filtrert

Etanol 20 % for oppbevaring av kolonne

#### Utførelse:

Apparatur: SuperFrac<sup>TM</sup> Fraction collector, Pharmacia

Detektor: RID- A6, SHIMADZU

Fraksjonsamler: Pharmacia LKB, Superfrac

Pumpe: P-50, Pharmacia Biotch

Programvare: Chromeleon versjon 7.0

Kolonne: Superdex 200 pg dextrans, eller Superdex 30 pg

Injeksjonsvolum: 5 mL

Flow: 2 mL/ min

Fraksjonsstørrelse 2 mL

Mobilfase: Destillert vann 0,45 µm filtrert, gasset med Helium.

Prøve 5 mg ble løst i 5 ml destillert vann, deretter ble prøven filtrert med 0,45 µm filter før injisering i kolonnen. Kolonnen ble koblet til fraksjonsamleren med en slange, slik at prøven blir samlet opp. Ut fra kromatogrammet og toppenes retensjonstid kunne man beregne hvilke fraksjoner som skal samles. Fraksjonen ble samlet, renses ved dialyse, metode 2.2.6. Deretter ble fraksjonen fryst på metanolbad, også frysetørket. Etter fraksjonering ble kolonnen vasket først med vann, deretter med 20 % etanol.

### 4.3.9 Elektrospray ionisering massespektroskopi (ESI-MS)

#### Prinsipp:

Elektrospray ionisering massespektrometri (ESI-MS) er en viktig metode i klinisk laboratorier. Det er en følsomt, robust og pålitelig verktøy for å studere små mengder på mikroliters prøvevolumer. Det er egnet for analyse av ikke flyktige og termisk labile biomolekyler. ESI anvender elektrisk energi for å overføre ioner fra oppløsning til gassfase, før de utsettes til MS-analyse. Nøytrale forbindelser kan også omdannes til ionisk form ved protonering, og dermed kan de blir studert ved ESI-MS (Ho, Lam et al. 2003).

#### Reagenser:

Destiller vann

Acetonitril

Maursyre

#### Utførelse:

Massespekter	LTQ Orbitrap XL fra Thermo fisher, Bremen, Tyskland
Elektronsprayer	Thermo Fisher Scientific, Bremen, Tyskland
Programvare	Qual Browser, versjon 2.0.7

Prøvene ble løst opp i 50:50 destillert vann og acetonitril. Deretter 0,1 % maursyre tilsatt prøvene slik at slutt karbohydrat konsentrasjon ble 0,5 mg/mL.

## 4.4 Degradering av $\beta$ -glukan

### 4.4.1 Bestemmelse av reduserende ende

#### Prinsipp:

3,5 Dinitrosalisylsyre er en reagens som brukes ofte til bestemmelse av reduserende ender. 3,5 Dinitrosalisylsyre har en gul farge som endres til rød- orange farge ved nærvær av reduserende sukker og i en basisk miljø. Molekylet 3 amino-dinitrosalisylsyre absorberer UV- lys bølglengde 540 nm. Intensiteten av den røde- orange fargen gir indikasjon på reduserende sukker konsentrasjon i en løsning.

#### Reagenser:

Glukose

Destillert vann

3,5 Dinitrosalisylsyre DNS

#### Utførelse:

Glukose stamløsning ble laget til konsentrasjonen 1 mg/mL. Deretter ble det laget en fortynningsrekke med konsentrasjoner 0, 137.5, 275, 412.5, 450, 825, 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Fra disse løsningene ble det tatt 100  $\mu\text{L}$  som ble overført til en liten plastbeholder med kork på. DNS 100  $\mu\text{L}$  ble tilsatt til prøven. Blandingen ble kokt i 5 minutter i vannbad, deretter ble 500  $\mu\text{L}$  destillert vann tilsatt prøven. 200  $\mu\text{L}$  ble pipettert ut i mikroplate. UV- absorbans ble målt ved 540 nm.

### 4.4.2 Enzymdegradering

#### Prinsipp:

WML ble enzymdegradert av endo- 1,3-  $\beta$ -glukanase til mindre oligosakkarider. Dette ble gjort for å sammenligne bioaktivitet til enzymdegradert prøve med de WML, og med de hydrolyserte prøvene.

#### Reagenser:

Endo- 1,3-  $\beta$ -glukonase fra Trichoderma, EC 3.2.2.39

Natriumacetat 0,05 M buffer, pH 4,5

HCl 2 M

Destillert vann.

Dinitrosalysilisyre DNS

#### Utførelse:

En bufferløsning av natriumacetat 0,05 M ble laget ved å løse opp Na-acetat i destillert vann, justerte pH ved å tilsette forsiktig 2 M HCl til pH var 4,5. WML 5 mg ble løst i 5 ml destillert vann eller 0,05 M Na-acetat buffer. Enzymløsning 10  $\mu$ L som tilsvarer 500 enheter ble tilsatt til WML løsningen. Prøven ble inkubert ved 40 °C i en varmeskap. Det ble tatt prøver underveis ved forskjellige tidspunkter 10 min, 30min , 1t, 2t, 4t, 6t og 24t for å måle enzymaktivitet. For å måle enzymaktiviteten ble det tatt 100  $\mu$ l enzymbehandlet WML i et lite rør, tilsatt 100  $\mu$ l DNS som reagerer med reduserende glukose. Prøven ble kokt opp i 5 minutter på vannbad. Destillert vann 500  $\mu$ l ble tilsatt til løsningen, deretter ble 200  $\mu$ l prøve pipettert i en mikroplate for UV måling ved 540 nm.

### **4.4.3 Partiell hydrolyse**

#### Prinsipp:

Polysakkarider hydrolyseres til monosakkarider i nærvær av sur miljø. WML ble hydrolysert med triflouroeddiksyre (TFA) under varme for å oppnå mindre karbohydrat enheter. Ved hydrolyse blir polysakkaridene degradert systematisk. WML ble hydrolysert for å undersøke nedgangen i molekylvekten.

#### Reagenser:

Destillert vann

Triflouroeddiksyre TFA (0,1, 0,25 M)

Metanol

### Utførelse:

WML ble løst i destillert vann 2mg/mL, deretter ble den fortynnet med TFA.

Prøvensluttkonsentrasjon var 1 mg/mL i 0,25 M TFA. Prøven ble inkubert i varmeskap ved 70 °C i 1, 2, 4, 6, og 24 timer. Ved hvert tidsuttak ble prøveløsning avkjølt på is. WML ble også hydrolysert i 0,1 M TFA ved 100 °C i 1 time. Det ble tatt 100µL for å måle konsentrasjon av reduserende sukker med 3,5 dinitrosalisylsyre DNS, metode 2.4.1.

Prøveløsning ble dampet på rotavapor ved 40 °C til tørrhet. Deretter ble prøven vasket flere ganger med metanol for å fjerne TFA rester. Tørrstoffet ble reløst med destillert vann, fryst ned på metanolbad også frysetørket for videre bruk.

## **4.5 Celleforsøk**

### **4.5.1 Celledyrkning**

RAW 264.7 er makrofaglignende leukemiske cellelinje fra mus. Cellelinja ble dyrket i celleflasker med vekstmediet som er blandet med serum, (10 %) penicillin/ streptomycin (1 %) og natriumbikarbonat (2%). Cellene ble satt i varmeskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> (Cellculture CO<sub>2</sub> Incubator ESCO).

Vekstmediet: Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)

4,5 g/L- Glukose

L\_Glutamin

25 mM HEPES

Pyruvate

### **4.5.2 Splitting av celler**

RAW264.7 cellene ble splittet to ganger i uken. Splitting foregikk i en LAF-benk med vertikal laminær luftstrøm. Arbeid i LAF-benk var etter aseptisk arbeidsteknikk for å hindre kontaminasjon av celler. Vekstmediet ble fjernet fra celleflaska og (10 mL) nytt medie ble tilsatt til celleflaska. Cellene ble løsnet fra flaskebunnen med en celskraper. Mediet ble pipettert opp og ned ca 10 ganger for å løse opp celleklumper. Deretter ble (1,5 mL)

cellesuspensjon g (13 mL) nytt medie overført til ei ny celleflaske. Flaska ble merket med navn, pasasjenummer og dato. Flaska ble satt inn i varmeskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>.

### **4.5.3 Celletelling**

For å ha kontroll på cellekonsentrasjon i celleforsøk så er det nødvendig med celletelling. Cellene ble telt i en automatisk celleteller (Countness invitrogen™). Cellesuspensjon (15 µL) ble blandet med tryptanblått (15µL). Blanding ble overført til en glassplate som kan innføres i celletelleren. Resultatet vises på tellerens display som totale antall celler, antall døde, antall levende og % av celledød.

### **4.5.4 Utsåing av celler**

Etter celletelling ble cellesuspensjon fortynnet med mediet i LAF-benken for å oppnå en viss cellekonsentrasjon. I en 6-brønners cellekulturplate ble cellene sådd ut. Antall celler per brønn skulle være 500 000 celler. Cellene ble inkubert i varmeskap ved 37°C og 5 % CO<sub>2</sub> over natt.

### **4.5.5 Stimulering med β-glukanprøver**

WML-prøver ble løst i serumfritt medie til konsentrasjon 2 mg/mL. De inkuberte cellene ble vasket med 1 mL serumfritt medie en gang før 1 mL oppløst prøve ble tilsatt. To brønner fikk tilsatt kun serumfritt mediet, uten prøve for å brukes som kontroll. Cellene ble inkubert i 48 timer i varmeskap ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub>



### 4.5.6 Lysering av celler

Etter 48 timer inkubasjon i varmeskap ble cellene lysert med lysisbuffer. Først ble mediet fjernet fra cellene, deretter ble cellene vasket med 1 mL PBS. Deretter ble cellene lysert med 300  $\mu$ L lysisbuffer. En celleskraper ble brukt for å løsne cellene fra brønnene. Lyserte celler ble overført til en eppendorfrør. Cellene ble fryst ned til  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  i ca 20 minutter, deretter ble cellene tint opp ved  $37^{\circ}\text{C}$ . Frysing og tining av celler ble gjentatt to ganger for å oppnå best lyseringsgrad. Tinte celler ble sentrifugert ved  $10000 \times g$  i 10 minutter ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatanten ble overført til nye eppendorfrør. Cellelysaten ble oppbevart i fryseren før legumainaktivitet ble målt.

#### Reagenser:

Lysis-buffer 500 mL:

100 mM Na-citrat (Mw 294,1)- 14,71 g

1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Mw372,24) – 0,19 g

pH justeres til 5,8

Tilsatt 1 % ( 5 g) N-octyl- $\beta$ -D-glukan (detergent)

PBS: fosfat buffret salin.

## 4.6 Måling av Legumain aktivitet

#### Prinsipp:

Legumain spalter spesifikt peptidsubstratet Z-Ala-Ala-Asn-NHMec karboksylterminal for Asn. NHMec er flouoserende så for å måle legumainaktivitet bruker man en metode som måler graden av flouosence som gjenspeiler mengden aktivt legumain. Cellelysaten blandes med assaybuffer som inneholder reduksjonsmiddelet ditiotretiol (DTT) som fører til aktivering av cysteinproteaser. Flouosence måles ved hjelp av en mikroplateleser Victor Wallac (Johansen, Knight et al. 1999).

### Reagenser:

Assaybuffer: 200  $\mu$ L DTT (200mM) + 40 mL assaybuffer

Substratopløsning: 200  $\mu$ L (2,5 mM) Ala-Ala-Asn + 14,5 mL assaybuffer.

### Utførelse:

Mikroplateleser: Wallac Victor 1420 Multilabel counter,  
Perkin Elmer Life and Analytical Sciences

Programvare: Workout

For å måle legumainaktivitet ble en 96-brønners mikroplate brukt. Cellelysate (20  $\mu$ L) ble pipettert i brønnene. Lysisbuffer ble brukt som kontroll. Mikroplaten ble satt i mikroplateleseren, Victor, der ble det autoinjisert (100  $\mu$ L) assaybuffer. Prøven og assaybuffer ble blandet godt og inkubert i 10 minutter før injisering av (50  $\mu$ L) substratløsning.

## **4.6.1 Måling av totalprotein**

For å ha en indikasjon på antall celler i prøvene ble totalprotein målt i cellelysatenes. Det ble gjort ved å blande 10  $\mu$ L cellelysate med 200  $\mu$ L Bio-Rad Protein Assay som ble (fortynnet 1:5 i destillert vann). Prøvene ble satt til henstand i 5 minutter. Fargestoffet som er i Bio-Rad-reagenset (Coomassie Brilliant Blue G-250) binder seg til proteinet og forårsaker fargeendring og dermed absorpsjons endring fra 465 nm til 595 nm (Bradford 1976). Fargeendringen ble målt med en mikroplateleser (Wallac Victor 1420 counter). Proteinstandard som ble brukt var bovint albumin, og standardkurve 50-400  $\mu$ g/mL.

## 4.6.2 Celleproliferasjons test (MTT)

### Prinsipp:

MTT-analysen er en kolorimetrisk analyse som baserer seg på at aktive celler kløyver den gule tetrazolium saltet (MTT) til en lilla farge. Den cellulære reduksjon involverer pyridin nukleotid faktorer NADH og NADPH. Formazan kvantifiseres via en ELISA leser.

### Reagenser:

MTT reagens: 5mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) oppløst i PBS.

Oppløsnings løsning: 10 % SDS i 0,01M HCl.

### Utførelse:

Cellene plates i 96-brønners mikroplate, celle konsentrasjon 250 000 celler/mL. (100 µL) cellesuspensjon pipetteres per brønn og inkuberes 24 timer ved 37°C og 5 % CO<sub>2</sub>. De inkuberte cellene ble stimulert med oppløste WMS, WML og WMP i konsentrasjon 2mg/mL og 1 mg/mL. Stimulerte cellene blir inkubert i 48 timer, før mediet skiftes til serumfritt mediet + (10 µL) MTT-reagens. Cellene inkuberes i 4 timer ved 37 °C før tilsetning av oppløsningsreagens. Cellene inkuberes overnatt før måling av absorpsjon ved 595 nm.

# 5 Resultater

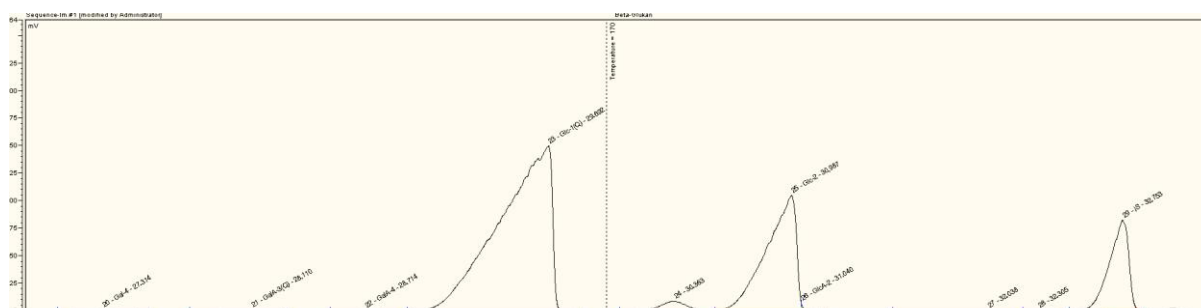
## 5.1 Isolering av løselig fraksjon

Isolering av en løselig fraksjon fra WMS ved hjelp av metode 2.3.1 ga en veldig ren, løselig fraksjon, den fikk navnet WML. Total vekt på den rensede løselige fraksjonen var 1,245 g, og utbyttet var 62 %.

## 5.2 Karakterisering av $\beta$ -glukan

### 5.2.1 Monosakkaridsammensetning

Monosakkaridinnholdet i WML ble bestemt ved metanalysemetoden og GC- metoden. Gaskromatogrammet (figur-5) viser tre store topper. De to første toppene er fra glukose ( Rt 29,6 og 30,9 min). Den siste toppen ved Rt 32,7 er fra mannitol som er internstandard. To små topper ved (Rt 22,34, og 24,19) er fra mannose som prøven inneholdt spor av.



**Figur-5** . Gaskromatogram av WML etter metanalyse og TMS derivatisering. To store topper den ene ved 29,6 minutter for glukose1 og den andre ved 30,9 for glukose 2, og den siste ved 32,7 er for internstandard.

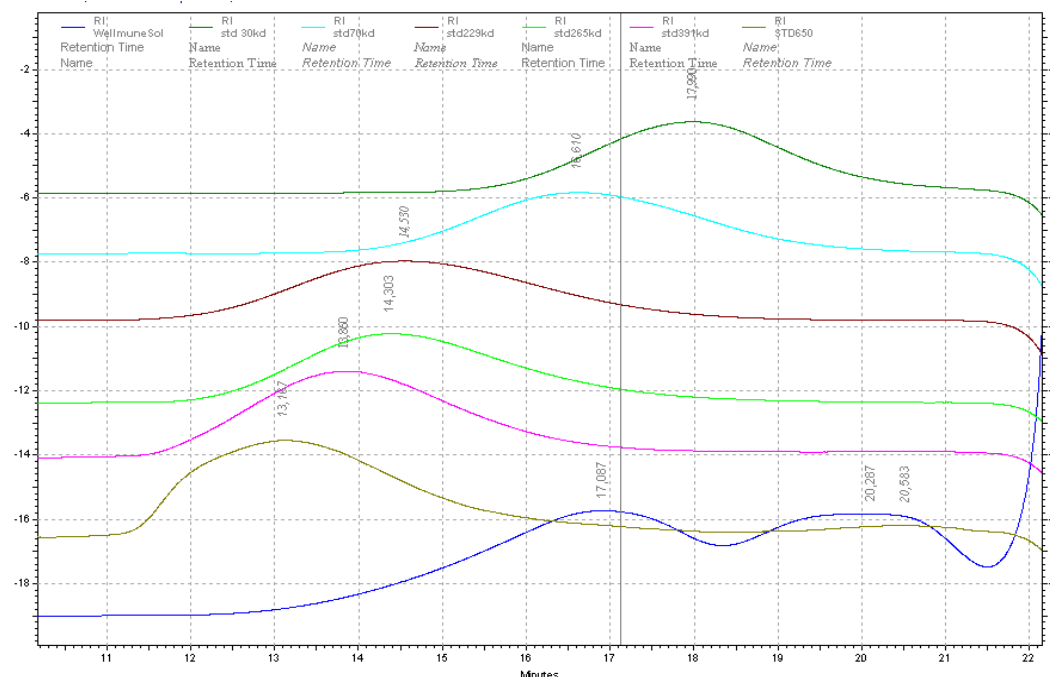
Tabell-2 viser prosentinnhold av monosakkaridene i  $\beta$ -glukan.  $\beta$ -glukan inneholder 99,75 % glukose og spor av mannose.

**Tabell 2.** Prosentinnhold av enkelte monosakkaridene i  $\beta$ -glukan prøven.

Monosakkarid	% av total karbohydrat innhold
Glukose	99,75
Mannose	0,25

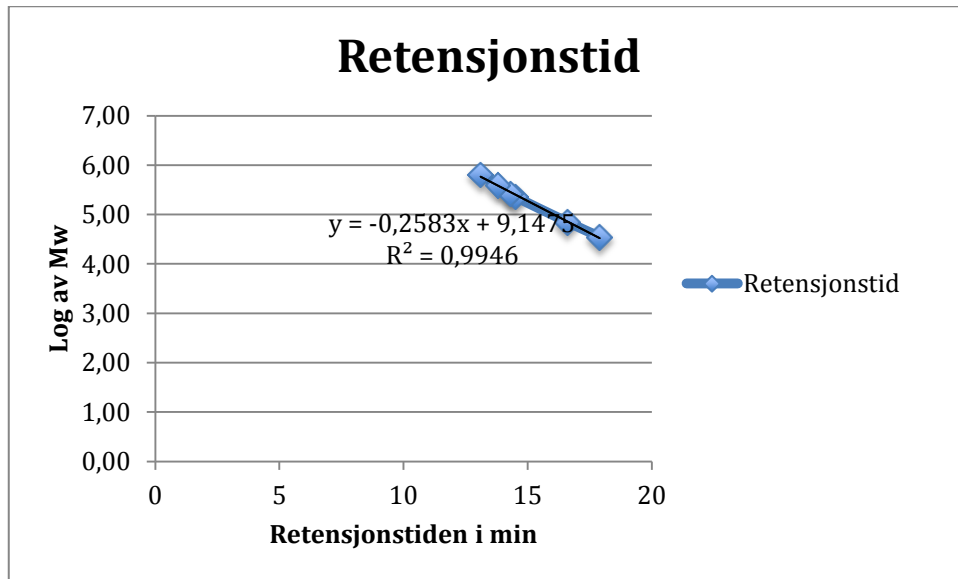
## 5.2.2 Estimering av molekylvekten til WML

WMLs gjennomsnittlige molekylvekt ble bestemt ved HPLC og ut fra en standardkurve som ble laget av en serie  $\beta$ -glukan standarder som har kjente molekylvekter (650, 391, 265, 229, 70,6 og 35,6 kDa), figur-6. I kromatogrammet til WML ble det sett to molekylvekt populasjoner.



**Figur- 6** Kromatogram fra HPLC analyse av polysakkaridstandarder og WML.

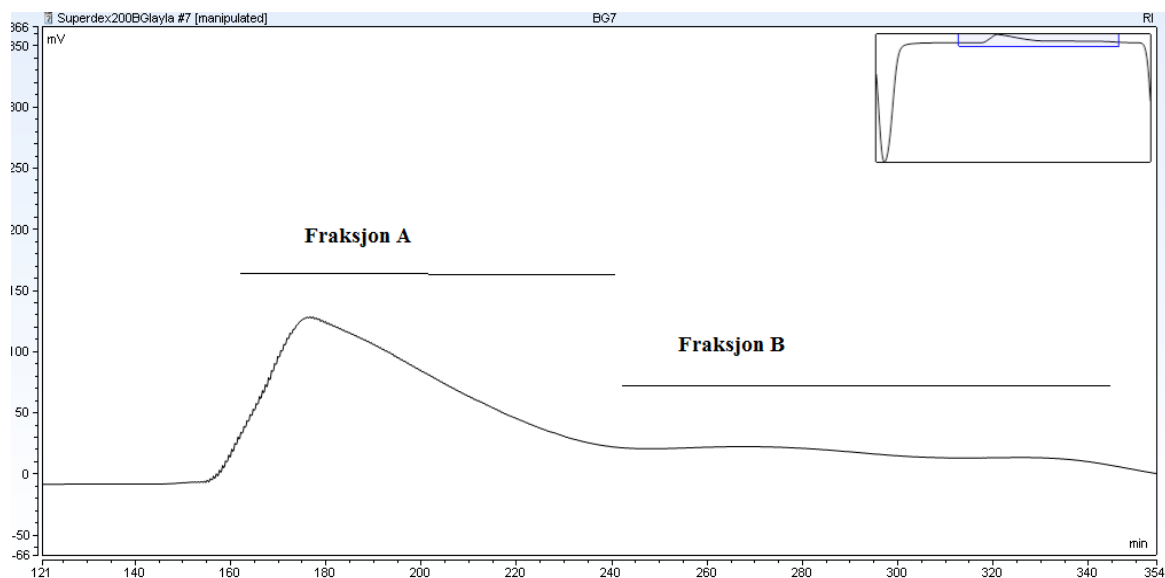
Logaritmen av gjennomsnittlige molekylvekter ble plottet mot retensjonstid for å få en lineær standardkurve. For å bestemme molekylvekten til WML ble ligningen i figur-7 brukt til beregning. Den gjennomsnittlige molekylvekten til første populasjon som har (Rt 17,087 min) var 54 200 Da. Toppen til den andre populasjonen var ujevn, og hadde to retensjonstider, da ble gjennomsnittet av retensjonstiden beregnet, og den gjennomsnittlige molekylvekten var 6 500 Da. Molekylvekten for den andre populasjonen er utenfor standardkurven og er beregnet med stor usikkerhet.



*Figur- 7. Beregnet standardkurve for standarder med molekylvekt i området 30-650 kDa.*

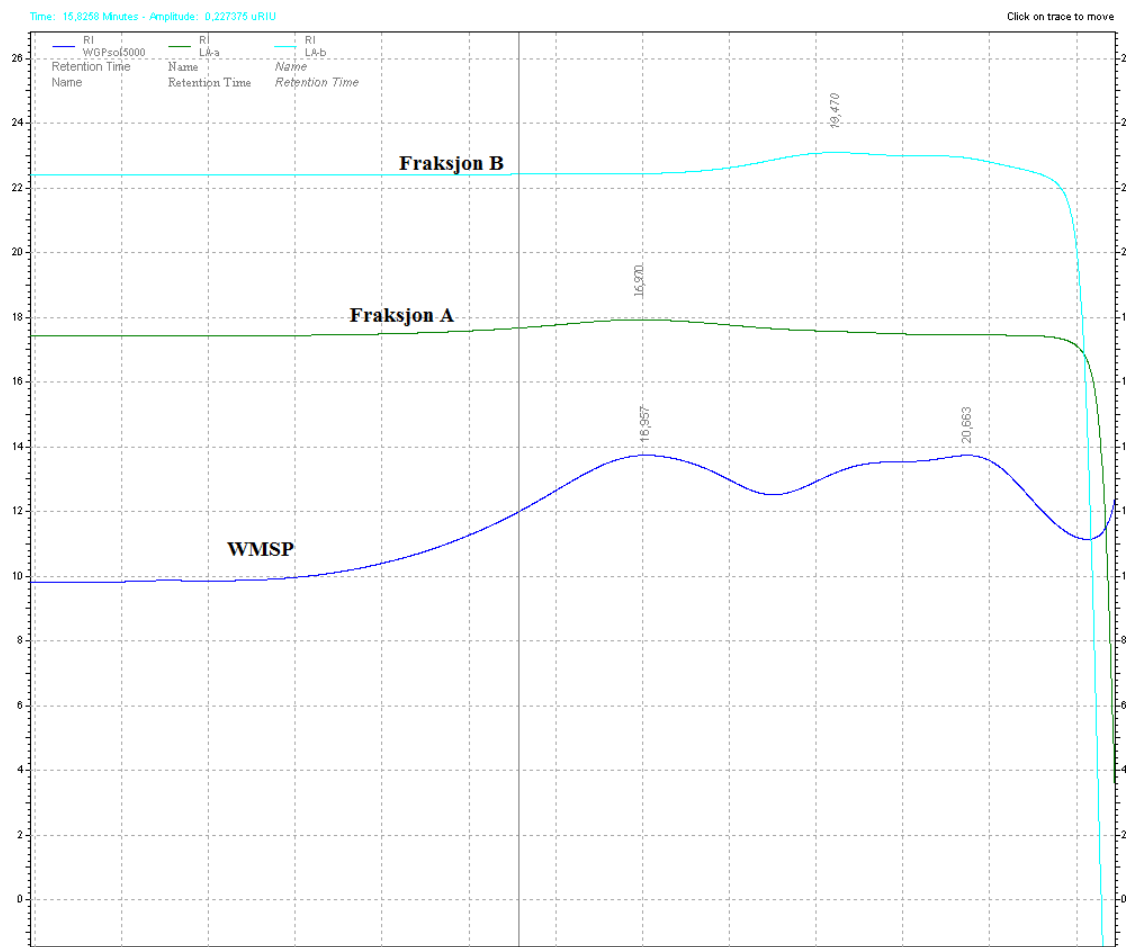
### 5.2.3 Preparativ gelfiltrering

HPLC analysen viste at WML består av to molekylvekt populasjoner, figur- 6. Disse to populasjoner ble fraksjonert med gelfiltrering. Figur-8 viser kromatogrammet fra SEC, to topper ble detektert, fraksjonene ble kalt A og B.



*Figur-8 Elueringsprofil av WML etter gelfiltrering med sudex 200.*

Fraksjon A og B, som er vist i figur-8 ble analysert ved HPLC for å se om de elueres ved omtrent samme retensjonstid som de to populasjonene som var i WML. Figur-9 viser de tre stoffene som ble analysert ved HPLC der retensjonstiden til første populasjon i WML var 16,997 min. Retensjonstiden for den andre populasjon var 20,663. Man kan se at toppen for den andre populasjonen er bred og at den består av to ikke-separerte toppe. Fraksjon B ligner mye på denne selv om retensjonstiden ikke stemmer helt fordi det ble funnet Rt for første topp på fraksjon B, 19,470 min, og for den andre populasjonen i WML ble Rt funnet til den andre toppen, 20,663 min. Retensjonstid for fraksjon A var 16,970 som tilsvarende den høymolekylære delen av WML. Fraksjon B har en profil for den lavmolekylære delen av WML. UT fra profilene ser det ut til at den preparative gelfiltreringskolonnen var godt egnet til å fraksjonere WML i en høymolekylær del A, og en fraksjon med lavere molekylvekt B som ser ut til å inneholde to ulike molekylvekts populasjoner.



**Figur-9** Kromatogram av fraksjon, A (i midten), B(øverst) og WML(nederst) etter analyse på en TSK-Gel® G5000PWXL ved HPLC.

Molekylvekten til fraksjon A og B ble også bestemt ved hjelp av standardkurven som ble brukt for molekylvekt bestemmelse av WML. Tabellen nedenfor presenterer molekylvekten til de forskjellige stoffene.

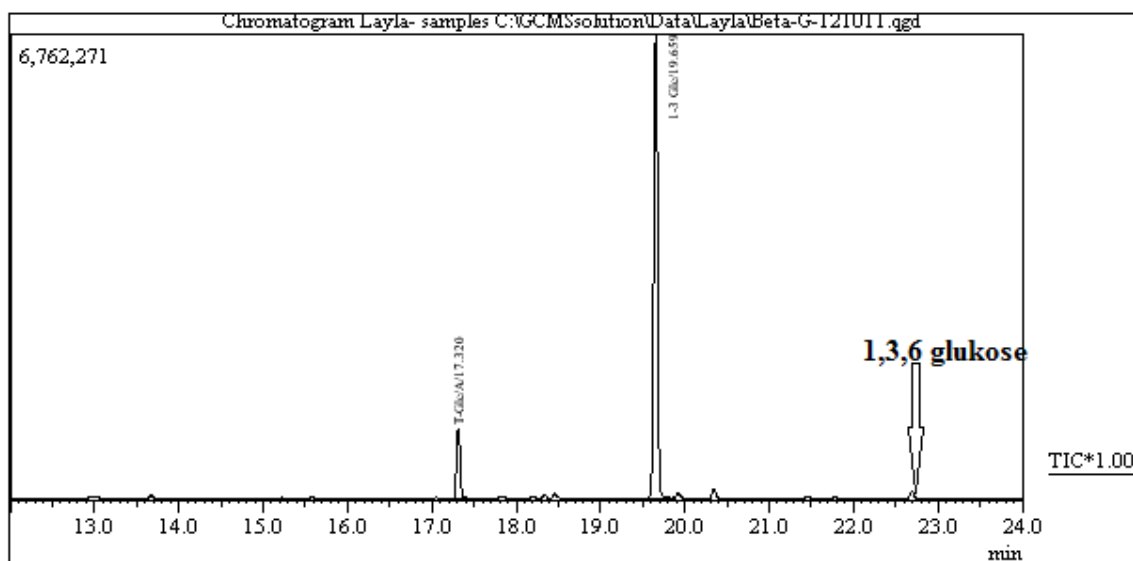
**Tabell- 3:** Beregnet molekylvekt for WML, fraksjon A, og fraksjon B

	WML	Fraksjon A	Fraksjon B
Molekylvekt	54 200Da 6500 Da*	58 100Da	13100Da*

\* Verdien er utenfor standardkurven og det er beregnet med stor usikkerhet.

### 5.2.4 Karakterisering av bindingsforhold i WML

Bindingsmønster i WML ble bestemt etter metyleringsmetoden som ble fulgt med hydrolyse, reduksjon, acetylering. Prøven ble analysert ved GC-MS. Figur-10 viser GC-kromatogrammet etter GC-MS analyse som viser to hovedtopper som elueres ved henholdsvis 17,3 og 19,6 minutter og en mindre topp har kommet ved 22,6 minutter. Analyse av fragmenteringsmønsteret i MS-spektret viste at toppen ved 17,3 var fra terminalglukose, og toppen ved 19,6 minutter var for 1,3 bundet glukose. Den siste toppen som kom ved 22,6 minutter indikerte at prøven inneholdt spor av 1,3,6 bundet glukose.



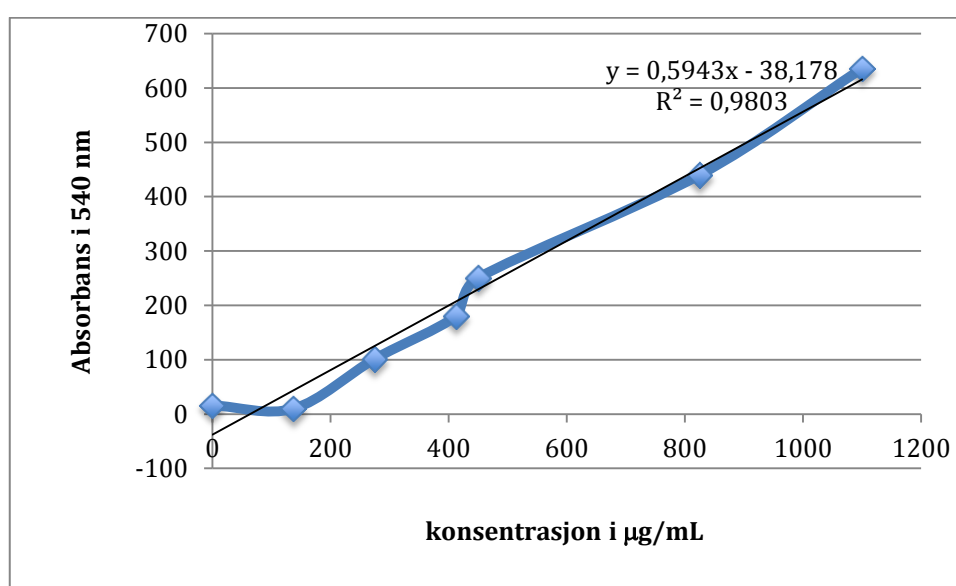
**Figur- 10** GC-MS spekter av WML etter metylering, to topper som befinner seg i kromatogrammet den første ved 17,3 er fra terminalglukose og den ved 19,6 er 1,3 glukose



## 5.3 Degradering av WML

### 5.3.1 Enzymdegradering

WML ble enzymdegradert som beskrevet i metode 2.4.1. Standardkurven ble laget ut fra resultatene fra metode 2.4.1 bestemmelse av reduserendeender. Likning i standardkurven i figur-11 ble brukt for å måle konsentrasjon av reduserendeender i enzymdegraderte og hydrolyserte prøver.

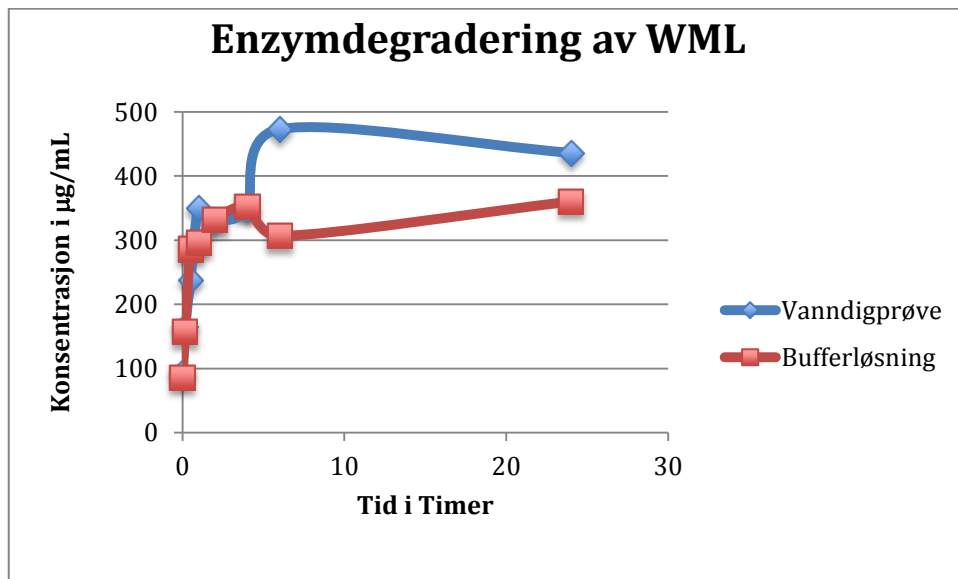


*Figur- 11 Standardkurve for glukosereduserende endebestemmelse*

Enzymet endo- 1,3-  $\beta$ -glukanase ble brukt for degradering av WML.

Enzymdegraderingshastigheten ble målt i både bufferløsning og vannløsning for å se om pH og tilsvarende salter påvirker enzymaktivitet. Degradering av WML i bufferløsning går i samme hastighet som i vannløsning i de første 4 timer. I bufferløsning gikk degraderingshastigheten noe ned etter fire timer, men økte deretter sakte, figur-12.

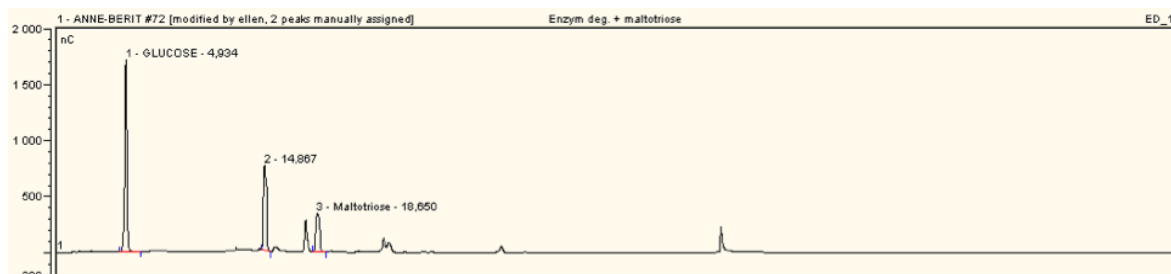
Degraderingshastigheten jevnet seg etter det. I vannløsning økte degraderingshastigheten fra 4 til 6 timer, deretter senket degraderingshastigheten seg litt.



**Figur-12** Konsentrasjon av reduserendeender i buffer, og vandigløsning ved enzymdegradering av WML

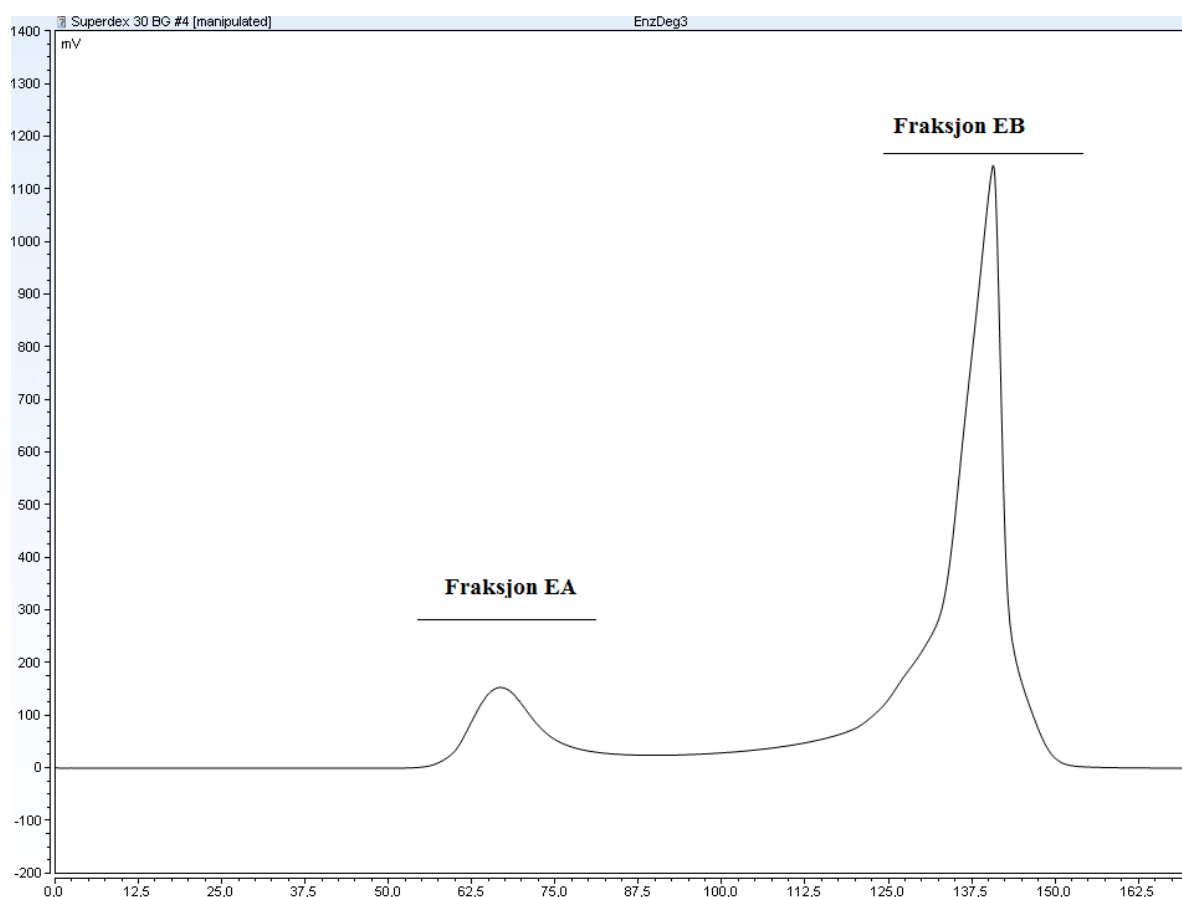
Siden enzymaktivitet var høyere i vandig miljø så forsøket ble gjentatt med større mengde prøve. Prøven ble kokt opp etter 24 timer for å ødelegge enzymet. Deretter ble prøven frysetørket.

Det ble foretatt HPAEC-PAD analyse for å studere hvilke oligomere som ble dannet under enzymdegradering. Figur- 13 viser kromatogrammet fra HPAEC-PAD analysen der prøven inneholder fire separerte topper med fire forskjellige oligosakkarider.



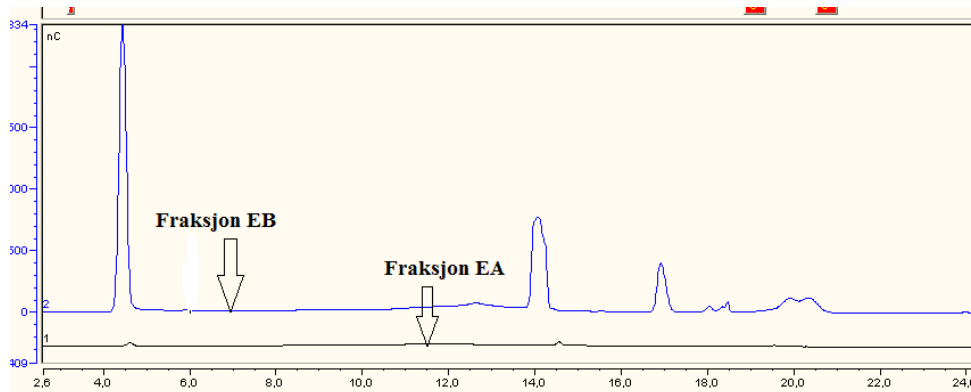
**Figur-13** HPAEC-PAD analyse, metode 2.3.5, av den enzymdegraderte prøven. Første topp er fra glukose, deretter er det en topp for en dimer, og en trimer oligosakkarider.

En preparativ gelfiltreringsmetode ble brukt for å fraksjonere den enzymdegraderte prøven. Figur-14 viser hvor toppene har kommet. Første topp som ble kalt fraksjon EA var veldig liten i forhold til toppen for fraksjon EB.



**Figur- 14** Elueringsprofil av enzymdegraderte WML etter gelfiltrering med Superdex30.

Fraksjonene tilsvarende EA ble slått sammen, og det ble også fraksjonene tilsvarende EB, deretter ble de dialysert metode 2.2.6. Dialyserte fraksjoner ble frysetørket, deretter løst opp og analysert på HPAED-PAD. Gelfiltreringskolonnen var ikke effektiv nok for å separere de forskjellige oligosakkaridene som ble dannet etter enzymdegradering. Figur-15 viser fraksjon EA og fraksjon EB som ble samlet ved gelfiltreringsmetode etter å ha blitt analysert i HPAED-PAD. I fraksjon EA (nederst i figur-15) ble det ikke detektert noen oligosakkarider, mens flere toppar ble detektert i fraksjon EB. Det viser at oligosakkaridene ble eluert i fraksjon EB.

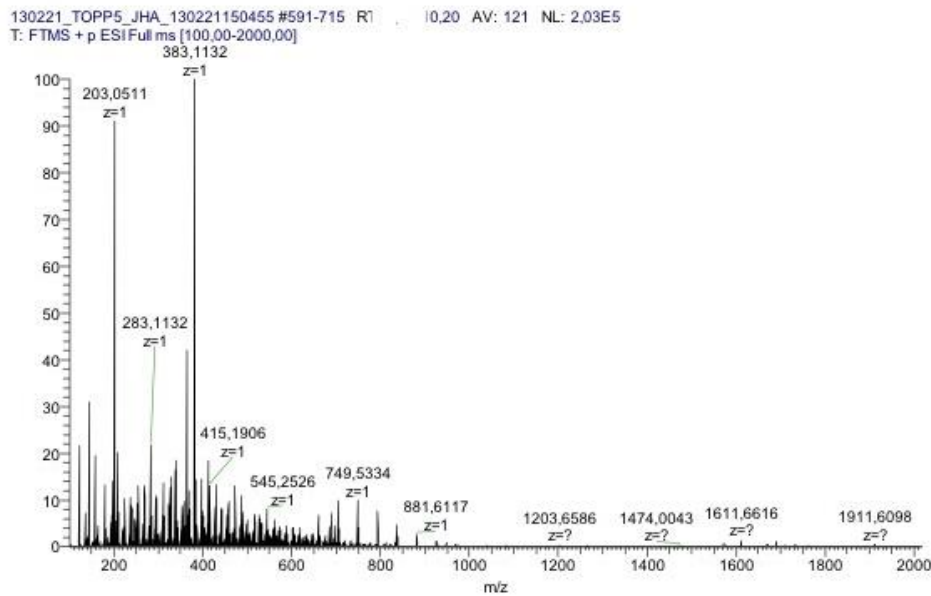


**Figur- 15** Kromatogram fra HPAEC-PAD analyse av den enzymdegraderte prøven. Fraksjon EA nederst, og EB øverst i kromatogrammet.

Siden gelfiltreringsmetode ikke var effektiv til å fraksjonere oligosakkaridene i den enzymdegraderte prøven, ble HPAED-PAD brukt til manuell oppsamling av isolerte oligosakkarider. Figur-14 viste 4 toppen som kom etter henholdsvis 5, 15, 20 og 24 minutter, og disse ble samlet opp og gitt navnene T5, T15, T20, T24. Instrumentet ble koblet til en desaltingsenhet. Enzymdegradert prøve ble injisert og toppene ble samlet, frysetørket. Prøvene T5, T15, T20, og T24 ble analysert for molekylvekt med ESI- MS for å analysere hva slags oligosakkarider prøvene inneholdt. Prøvene T15, T20, og T24 ble også metylert og analysert på GC-MS- analyse for bestemmelse av bindingsmønster i oligosakkaridene.

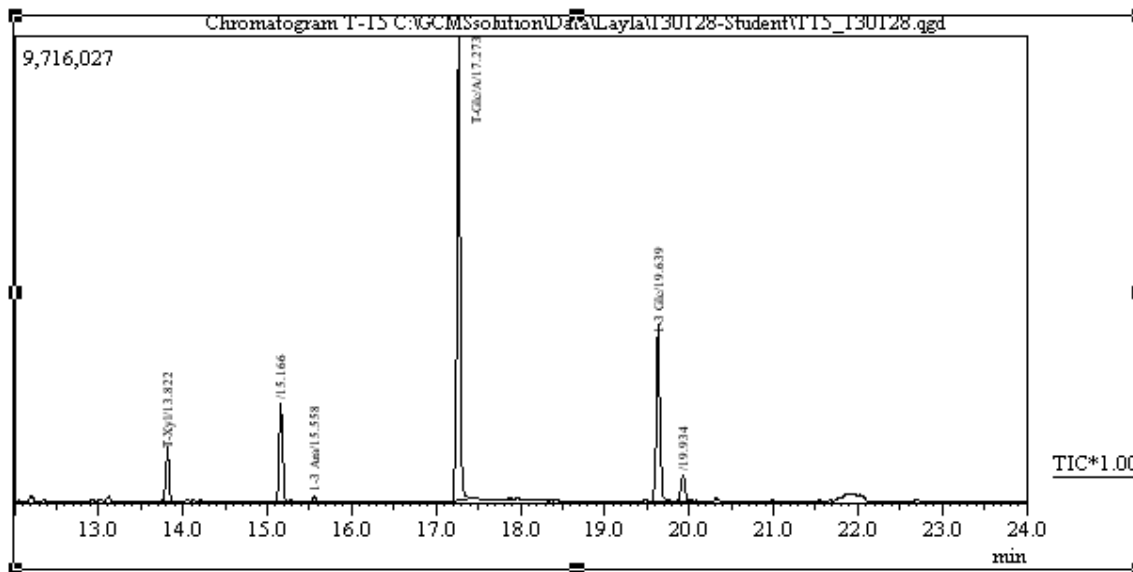
T5 ble analysert ved MS-laben. Figur -16 viser T5 av den enzymdegraderte prøven der massen angis som masse/ladning ( $m/z$ ). Massen som ble detektert i spektret var  $m/z= 203$ , som tilsvarer Na-glukose addukt. Prøven inneholdt 61,9 % glukose.

# T5



*Figur-16 MS-spektret av T5 ( $m/z=203$ ) som er fragment Na-glukose addukt.*

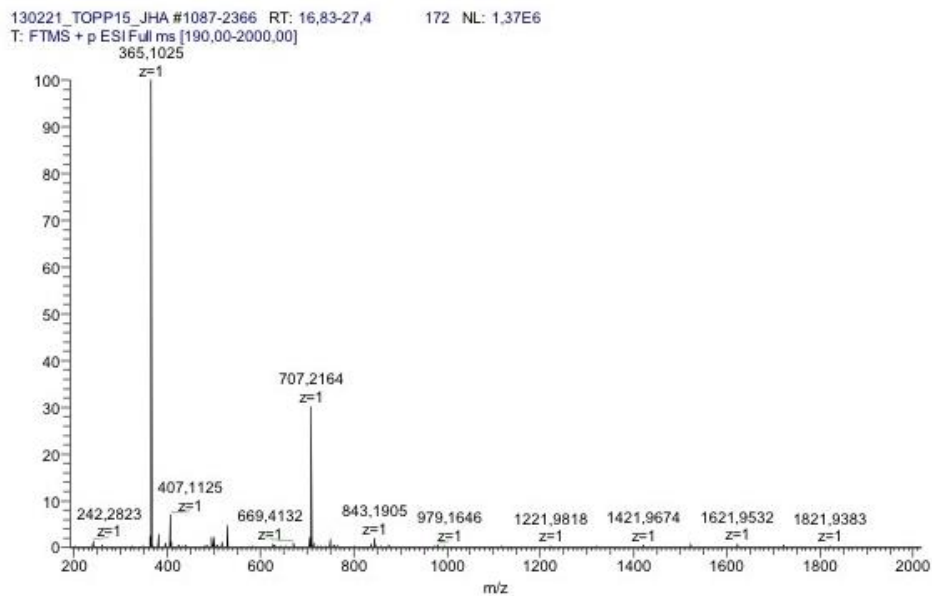
T15 ble metylert og analysert ved GC-MS for å bestemme bindingsmønster i oligomeren. Figur-17 viser at prøven inneholdt en topp for terminalglukose. Den kom etter 17 minutter, og toppen som kom ved 19,7 minutter var for 1,3 bundet glukose. Det ble detektert også xylose, som var en forurensning i prøven.



**Figur-17** Kromatogram av T15 fra enzymdegradert prøven, fra GC-MS analyse. Toppen ved 17,3 minutter er terminalglukose topp, og den ved 19,7 minutter er 1,3 bundet glukose.

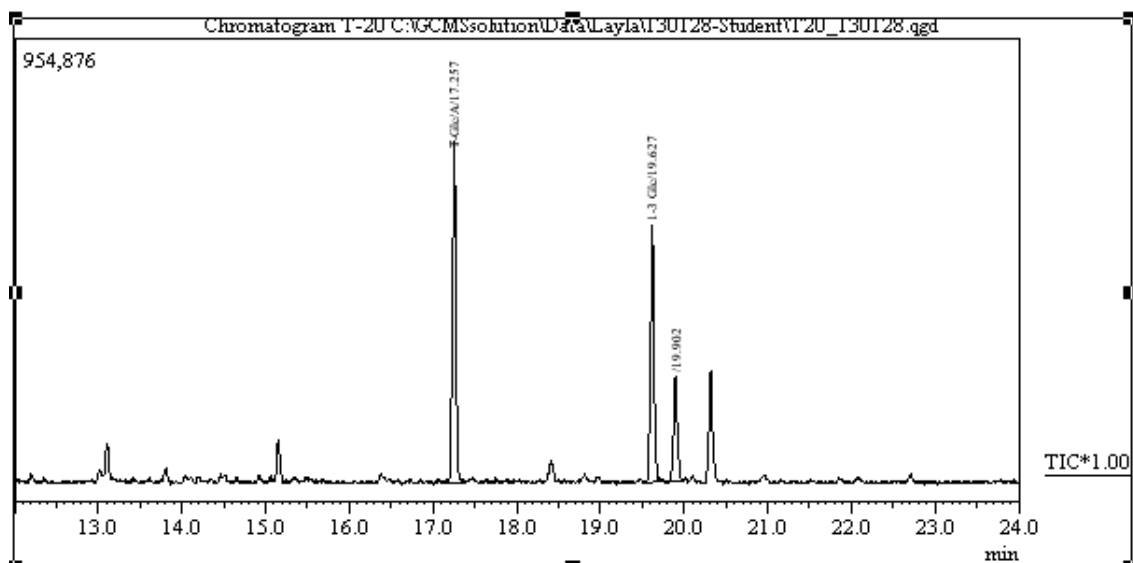
Massen som ble detektert i MS-spektret figur-18 var  $m/z = 365$ , og det tilsvarer massen på en dimer ( $342 + 23 = 365$ ). Dimerinnholdet i topp 15 var 96 %, den resterende 4 % er glukosetrimer som ble eluert for tidlig eller som har forekommet på grunn av ufullstendig vask av kolonne mellom hver samlingsrunde.

# T15



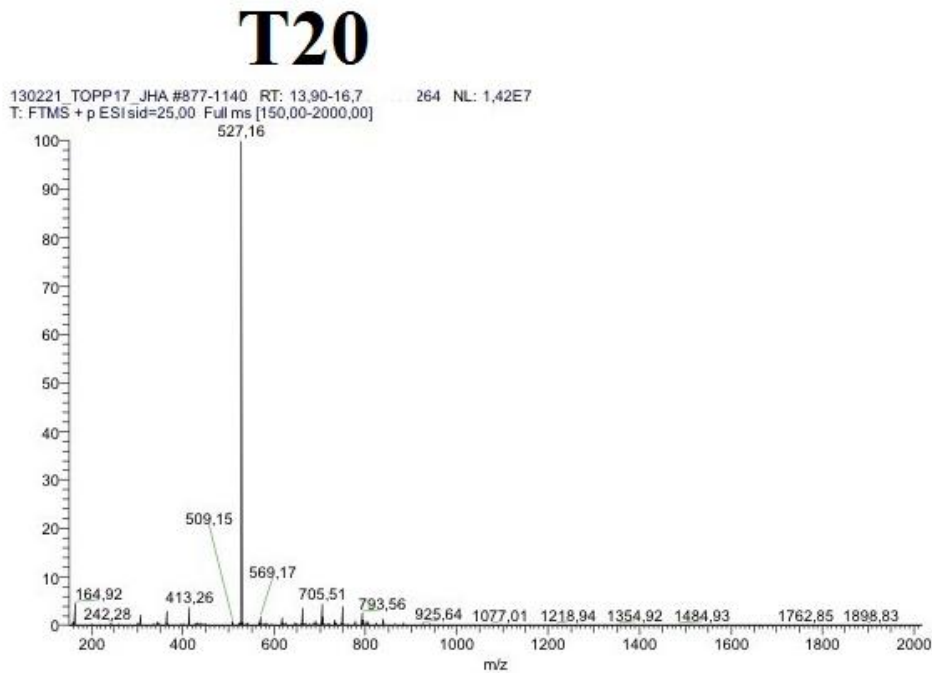
*Figur-18 MS-spekret av T15 som inneholdt Na- addukt av glukosedimer.*

GC-MS kromatogram av topp 20 hadde en topp som kom ved 17,3 minutter, og det var terminalglukosetoppen, og en topp ved 19,7 minutter for 1,3 bundetglukose, se figur -19. To små topper kom etter 1,3 glukosetoppen, de er ikke karbohydrat og anses som forurensninger.



*Figur-19 Kromatogram av T 20 fra GC-MS analyse.*

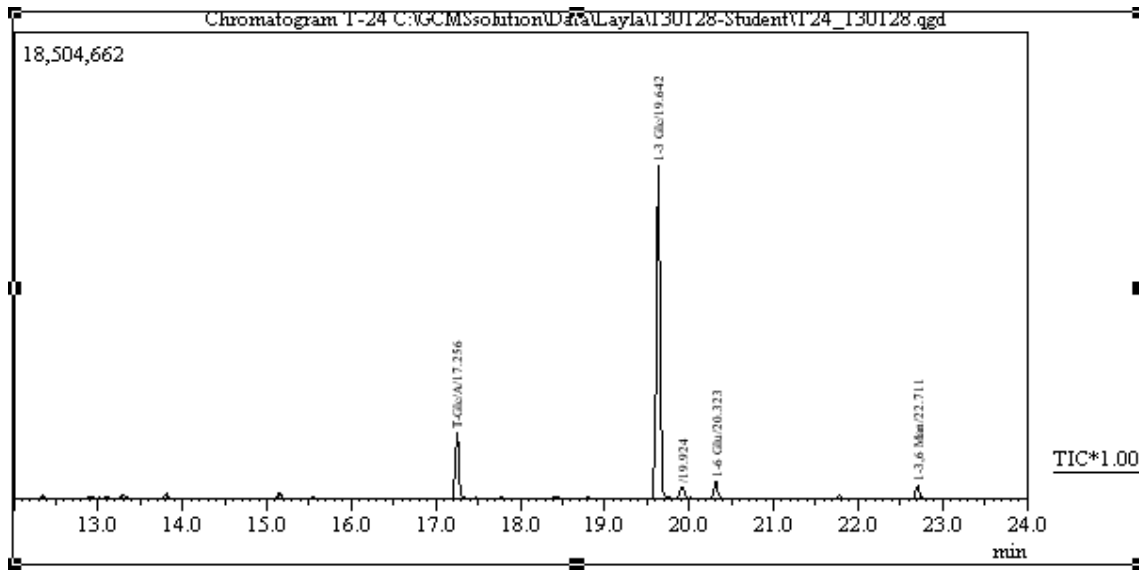
Resultatet fra MS analyse indikerte at topp 20 inneholdt 97 % trimer oligosakkarider. Figur - 20 viser MS-spektret av topp 20 hvor massen som ble detektert var  $m/z = 527$  som tilsvarer massen til en Na- addukt av en glukosetrimer ( $504 + 23 = 527$ ).



*Figur-20: MS-spektret av T20 som inneholdt Na-addukt av glukosetrimer.*

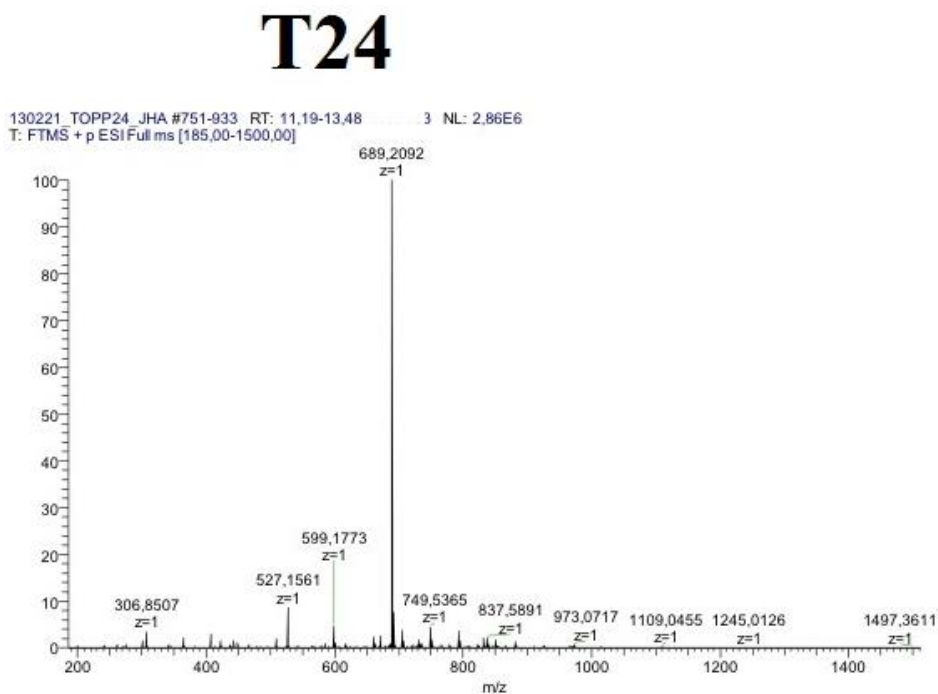
Figur-21 fra GC-MS analyse viser at prøven inneholdt en topp for terminal glukose ved 17,2 minutter og en topp for 1,3- glukose ved 19,6 minutter. Det er også detektert en liten topp for mannose. Dessuten er det en liten topp for 1,6-glukose ved RT: 20,4 min. Den andre lille toppen som kom ved 22,8 minutter er for 1,3,6- glukose, det tyder på at prøven har spor av forgreinet oligosakkarid. Hovedmengden av oligosakkarid er uforgreinet 1,3- glukose. Forholdet mellom terminalglukose og 1,3- glukose er ca 1:3, og det stemmer i figuren også.





Figur-21 Kromatogram av T24 fra GC-MS analyse.

Figur-22 viser resultatet fra MS- analyse for T24. Massen som ble detektert er  $m/z = 689$  som tilsvarer massen ( $666+23= 689$ ) Na- addukt av en glukose tetramer.

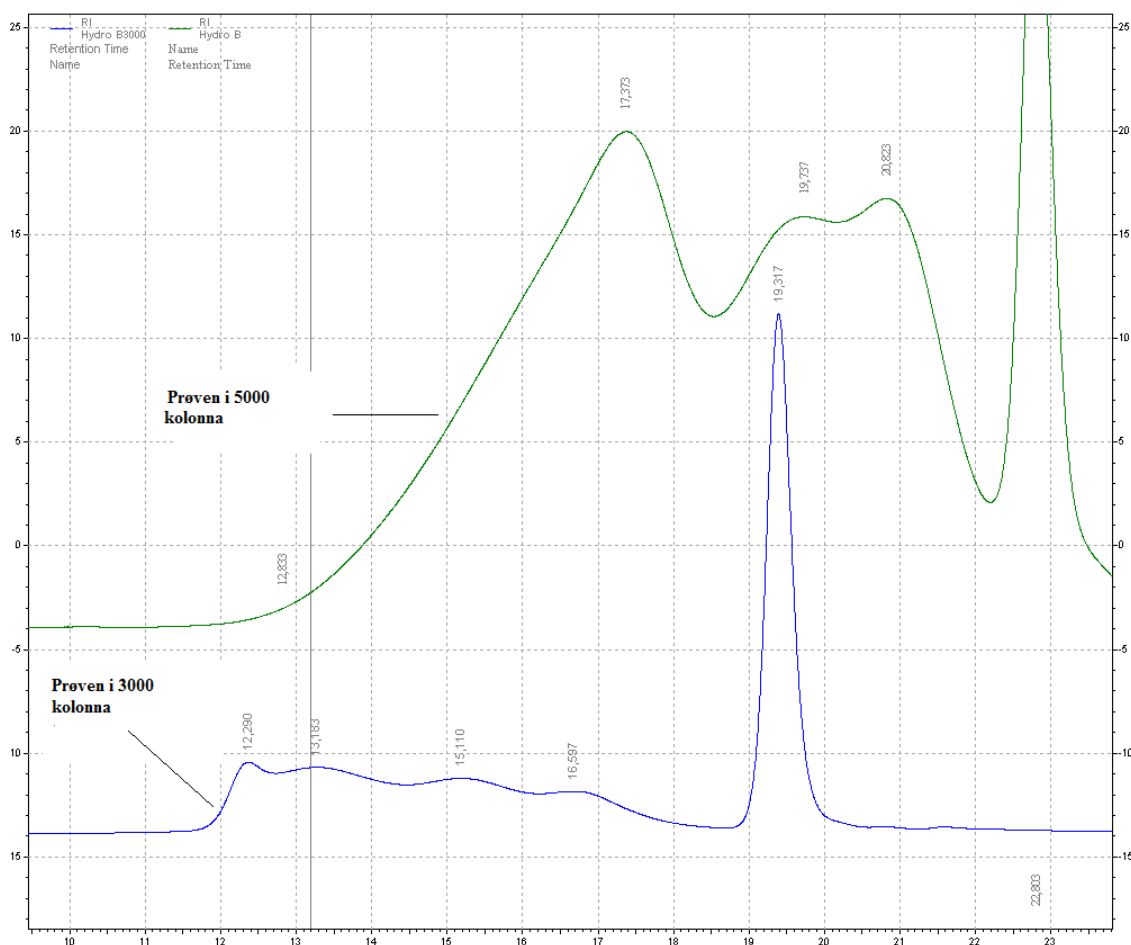


Figur-22 MS-spekret av topp 24 som inneholdt Na- addukt an ev glukose.

### 5.3.2 Partiell hydrolyse

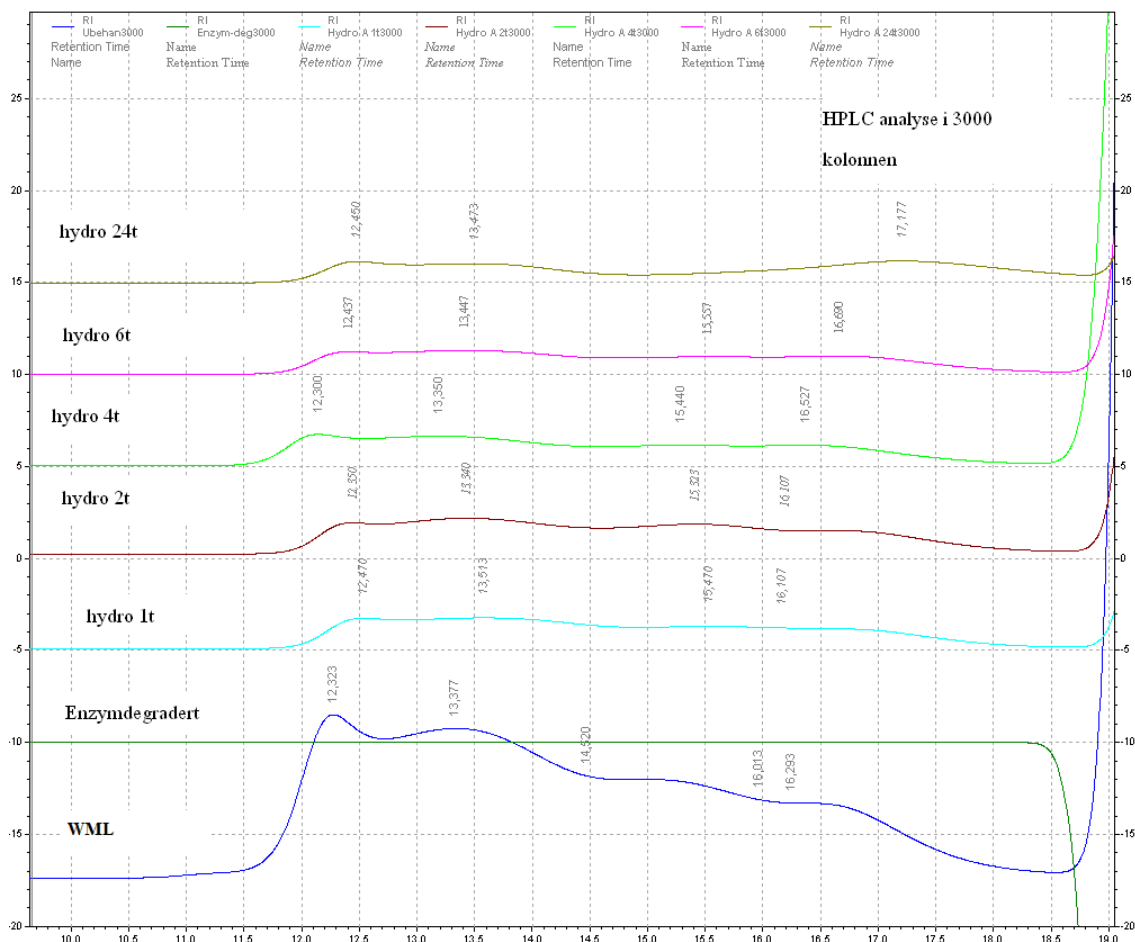
WML ble hydrolysert ved forskjellige betingelser og med forskjellige syrekonsentrasjoner. WML ble hydrolysert på den måten for å undersøke effektiviteten av de forskjellige hydrolysebetingelser i hydrolysering av WML.

WML ble hydrolysert i 0,1 M TFA, ved 100 °C i en time. Prøven ble analysert ved HPLC med TSK- Gel® G3000 og TSK- Gel® G5000 kolonnen. Figur-23 viser to elueringsprofiler, de to profilene viser at kolonnene har ulike separasjonsområder og kan ikke sammenlignes direkte. Retensjonstid i TSK5000 kan ikke sammenlignes direkte med retensjonstid i TSK3000. Den store høye toppen til slutt i begge profilene var salt-toppen, og den kom ved helt ulik retensjonstid. De molekylene som var større enn kolonnens separasjonsområde kom som voidvolumet som var ved 12,29 i TSK3000. Tilsvarende molekyler ble fraksjonert i TSK5000 som kan separere større molekyler enn TSK3000. TSK3000 ga fire ikke godt separerte topper mens de i TSK5000 ble separert i tre topper.



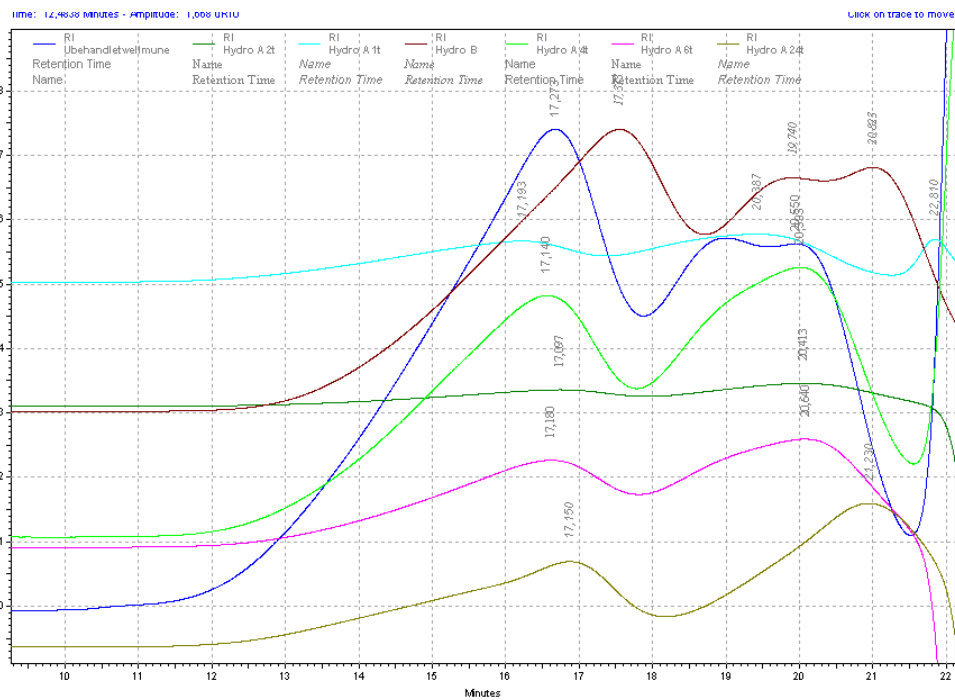
**Figur-23** HPLC analyse av den hydrolyserte WML ved 100 °C i 1 time. De to profilene viser ulike separasjonsområder som ikke kan sammenlignes direkte. TSK3000 ga fire godt separerte topper, mens TSK5000 ga tre separerte topper.

De hydrolyserte prøvene sammen med den enzymdegraderte prøven og WML ble analysert ved hjelp av HPLC, der TSK-Gel® G3000 kolonnen ble brukt. Figur- 24 viser elueringsprofil for prøvene.



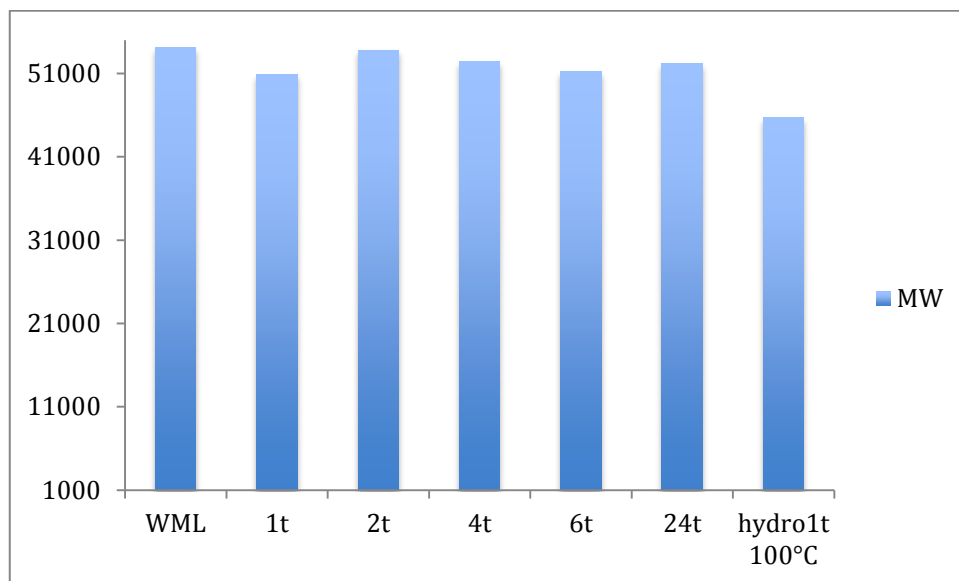
**Figur -24.** De hydrolyserte prøvene, enzymdegradert og WML analysert i 3000 kolonnen ved hjelp av HPLC.

STK3000-kolonnen ga ikke godt separerte topper av de hydrolyserte prøvene, derfor ble det valgt å bruke STK5000-kolonnen. Den enzymdegraderte prøven kom rett gjennom STK3000-kolonnen fordi molekylene i denne prøven var mindre enn kolonnens nedre separasjonsområde. Figur- 25 viser de hydrolyserte prøvene etter at de ble analysert i STK5000-kolonnen. Der ble de hydrolyserte prøvene analysert sammen med WML. Retensjonstiden fra toppene ble brukt for å estimere molekylvekten av karbohydratene.



**Figur-25.** HPLC-kromatogram for de hydrolyserte prøvene sammen med den WML analysert på TSK-Gel® G5000 kolonnen.

Likningen fra figur-4, som ble vist tidligere, ble brukt for å beregne molekylvekten til de hydrolyserte prøvene. Figur- 26 viser nedgangen av molekylvekt av den høymolekylære delen av prøven ved økt hydrolysetid. Prøvene ble hydrolysert i svake betingelser, og det førte til at den høymolekylære delen ikke ble brutt ned, kanskje en liten del av den. I figur-25 ser man at hydrolyse skjer mer i de mer lavmolekylære toppene. Molekylvekten til den lavmolekylæredelen var utenfor standardkurven.



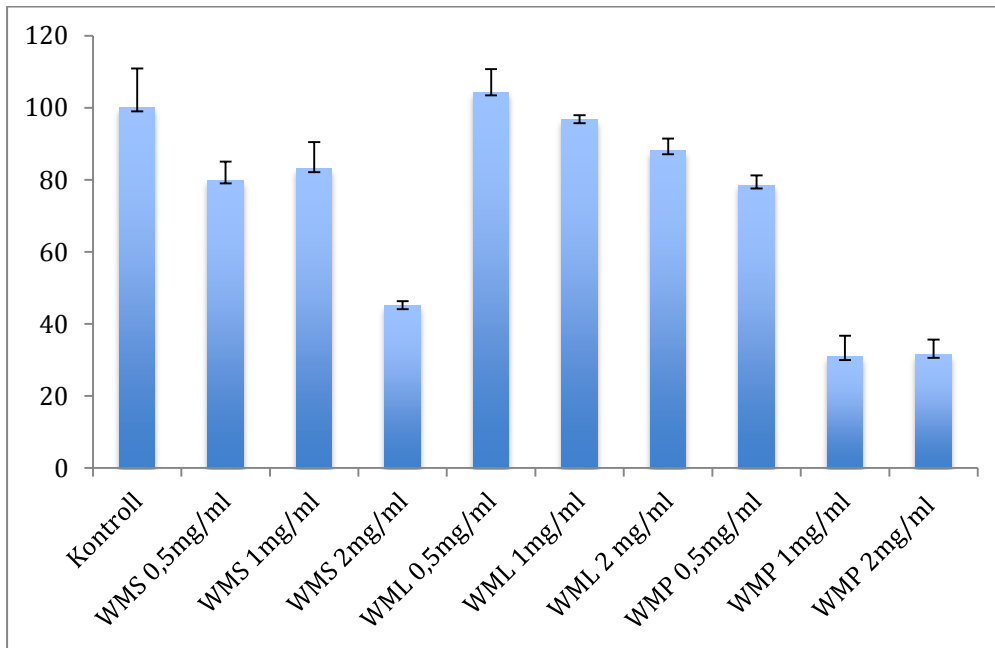
*Figur-26 Molekylvektene til WML og de hydrolyserte prøven etter analyse ved HPLC.*

## **5.4 Stimulering av RAW 246.7-celler og måling av legumainaktivitet**

Forskjellige prøver av WML ble opparbeidet og brukt til stimulering av RAW 264.7 -celler for å undersøke i hvilken grad  $\beta$ -glukan kan påvirke legumainaktivitet i denne cellelinja. Cellene ble inkubert med prøvene i 48 timer etter stimulering før de ble lysert. Cellelysaten ble brukt for både legumainaktivitets- og proteinmåling.

For å bestemme hvilken konsentrasjon man skulle velge å stimulere med så ble cellene først stimulert med WMP (partikulær wellmune ®), WMS (løselig wellmune ®) eller WML

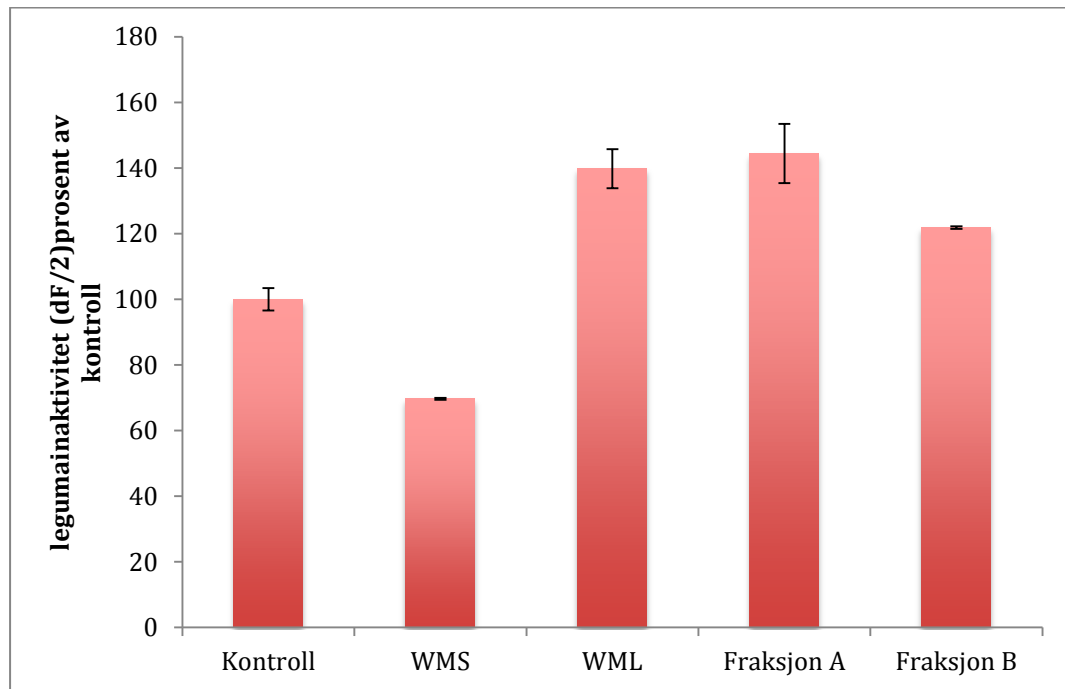
(løseligfraksjon fra wellmune®). Cellene ble stimulert med følgende konsentrasjoner: 2 mg/mL, 1mg/mL, og 0,5 mg/mL. WMP i 2 mg/mL og 1 mg/mL ga hemming av legumainaktivitet. Aktiviteten var ca 1/3 av kontrollen. WMS 2 mg/mL ga legumainaktivitet tilsvarende ca 50 % av kontrollen. Ved 0,5 mg/mL konsentrasjon ble enzymaktiviteten på kontrollnivå, figur- 27. På bakgrunn av disse resultatene ble konsentrasjon 2 mg/mL valgt for videre stimuleringsforsøk.



**Figur- 27** Måling av legumainaktivitet i cellelysater etter stimulering med WMS, WML og WMP i 0,5,1,2 mg/mL. Forsøket ble utført 3 ganger, og figuren viser resultater fra ett representativ forsøk.

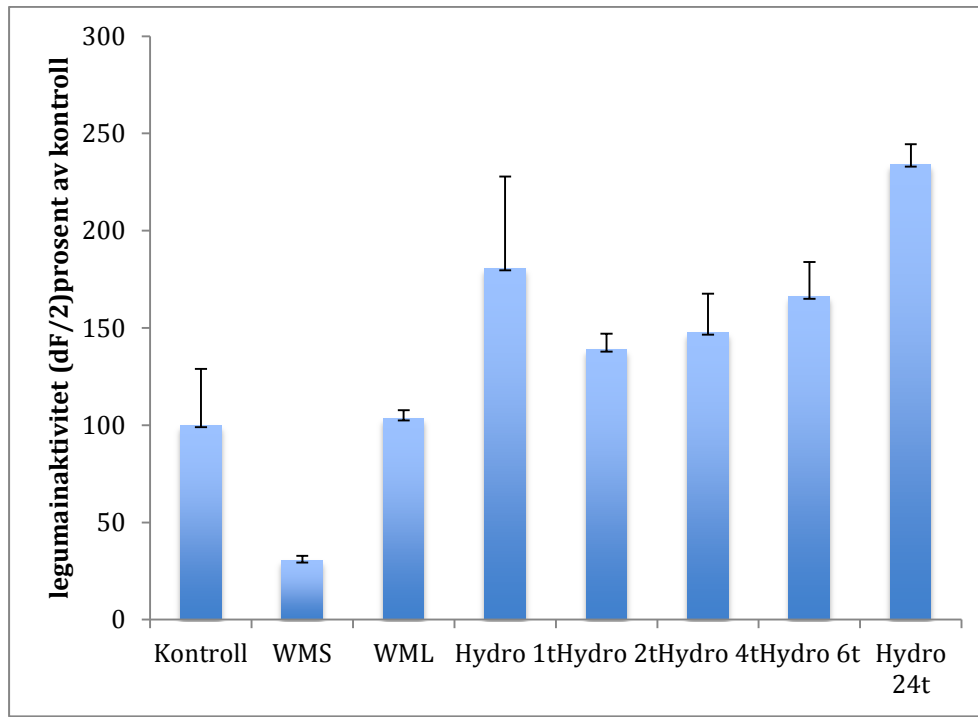
For å undersøke om molekylstørrelsen påvirket legumainaktivitet så ble cellene stimulert med fraksjon A, og fraksjon B, de hydrolyserte prøvene, og den enzymdegraderte prøven.

Figur-28 viser legumainaktivitet etter stimulering med WMS, WML, fraksjon A og fraksjon B. Stimulering av RAW 246.7 cellene med WMS hemmet legumainaktivitet, mens stimulering med WML og fraksjon A ga økt legumainaktivitet. Fraksjon B ga også aktivering av legumainaktivitet, men i mindre grad.



**Figur-28** Måling av legumainaktivitet i cellelysater etter stimulering med WMS, WML, fraksjon A, og fraksjon B, konsentrasjon 2 mg/mL. Forsøket ble utført 3 ganger, og figuren viser resultater fra ett representativt forsøk.

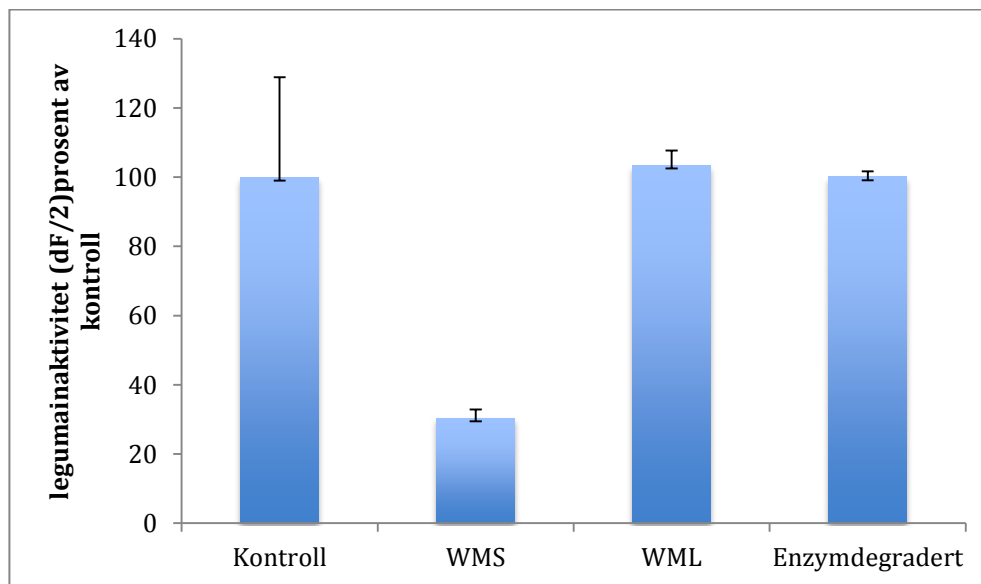
Legumainaktivitet ble også målt i RAW 264.7 cellene etter stimulering med de hydrolyserte prøvene for å se om degradering ved hydrolyse kunne påvirke legumainaktivitet. De hydrolyserte prøvene ga økt legumainaktivitet i forhold til kontrollen, se figur- 29.



**Figur- 29** Legumainaktivitet målt i cellelysater etter stimulering med WMS, WML, og hydrolyserte prøver etter 1t, 2t, 4t, 6t og 24t timer. Forsøket ble utført 3 ganger, og figuren viser resultater fra ett representativt forsøk.



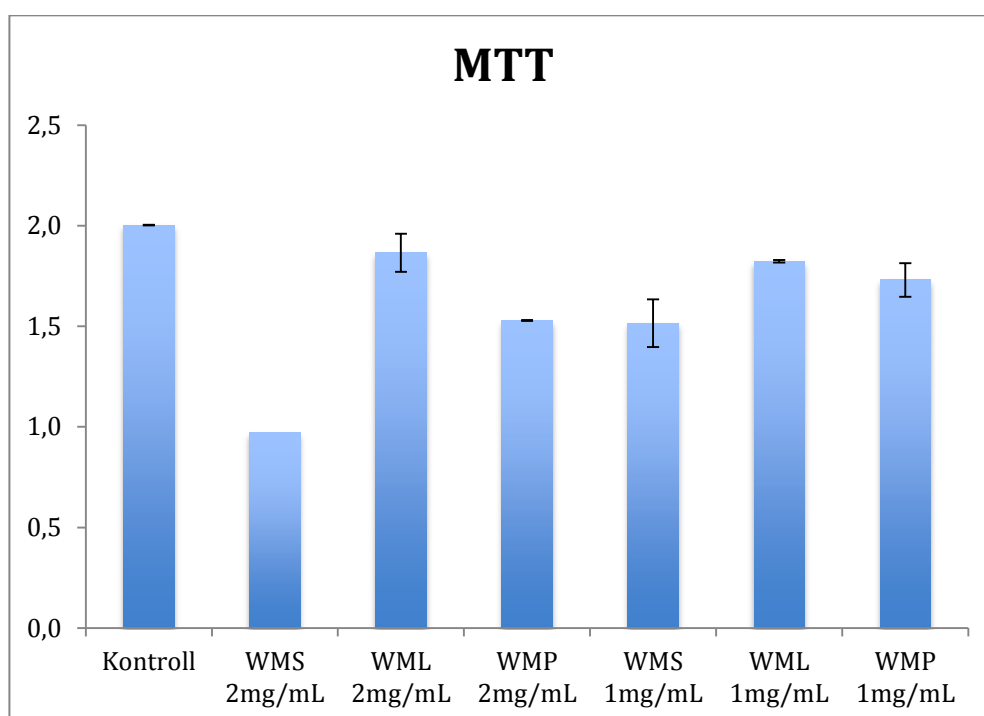
Det ble også testet om enzymdegradert prøver, som er en blanding av forskjellige oligosakkarider og har molekylvekt mye mindre enn de hydrolyserte prøvene, kunne påvirke legumainaktiviteten. Figur -30 viser at enzymdegradert prøve har ikke påvirket legumainaktiviteten. Resultat fra enzymdegradert prøve var på nivå med kontrollen.



**Figur- 30** Legumainaktivitet målt i cellelysater etter stimulering med WMS, WML, og enzymdegradert prøve. Forsøket ble utført 3 ganger, og figuren viser resultater fra ett representativ forsøk.

### 5.4.1 Celleviabilitetstest MTT

Cellene ble inkubert med WMP, WMS, og WML konsentrasjonene på 2mg/mL og 1 mg/mL. Cellene tålte stort sett prøvene godt i begge konsentrasjoner, figur-31. Det løselige  $\beta$ -glukan WMS i konsentrasjon 2 mg/mL hadde ca 50 % celledød, den er halvparten av kontrollen. Den partikulære  $\beta$ -glukan WMP ga litt celledød ved konsentrasjon 2 mg/ mL. Den løselige  $\beta$ -glukan fraksjonen WML ga ingen celledød.



**Figur-31** Cellene ble inkubert med prøvene WMS, WML og WML for å undersøke om prøvene påvirket cellenes viabilitet. Forsøket ble utført 3 ganger, og figuren viser resultater fra ett representativt forsøk.

# 6 Diskusjon

## 6.1 Isolering av løselig fraksjon

WMS som ble kalt av produsenten for den løselige  $\beta$ -glukan var egentlig ikke helt vannløselig. Ved isolering av den løselige fraksjonen kunne man se at oppløsningen var uklar, og etter sentrifugering så var det en god mengde bunnfall i sentrifugeringsrørene. Gjærcelleveggen inneholder som nevnt tidligere chitin, mannoprotein, og  $\beta$ -glukan bundet sammen (Kollár, Reinhold et al. 1997). WMS inneholder andre stoffer (proteiner, fett og aske) og ikke bare ren  $\beta(1\rightarrow3)/(1\rightarrow6)$ -glukan (European Food Safety Authority (EFSA) 2011). I tillegg  $\beta$ -glukan er ganske stort molekyl, og det i seg selv kan være et hinder til vannløselighet, ikke minst celleveggs komponenter som chitin og mannoprotein som finnes i prøven kan være årsak til den uklare løsningen. WML-utbytte fra isoleringsmetoden var 62 %. Den isolerte vannløselige fraksjonen, WML, var fullstendig løselig i vann. Videre ble kun WML analysert og karakterisert, mens WMP og WMS ble inkludert i bioaktivitetsstudier for å se på effekt av preparatenes løselighet.

## 6.2 Karakterisering av $\beta$ -glukan

### 6.2.1 Monosakkarid sammensetning

Monosakkaridsammensetning ble bestemt ved metanolyse, TMS-derivatisering og gasskromatografi. Siden WML var et isolert fra WMS som består av  $(1\rightarrow3)/(1\rightarrow6)$ -bundet- $\beta$ -D-glukose, se figur- 1, så var det forventet å finne at WML hovedsakelig inneholdt glukose. WML inneholdt spor av mannose. Mannose finnes i gjærcelleveggen som mannoprotein, og er ikke så lett å fjerne det fra  $\beta$ -glukan, figur- 2 (Kollár, Reinhold et al. 1997, European Food Safety Authority (EFSA) 2011).

## 6.2.2 Estimering av molekylvekt

Molekylvekten til  $\beta$ -glukan ble estimert på grunnlag av  $\beta$ -glukan standarder fra korn som har kjente molekylvekt mellom 30 og 360 kDa. Ved analyse på HPLC var WML fordelt på to populasjoner. Molekylvekten til den første populasjon var rundt 54 kDa, mens molekylvekten til den andre populasjon var 6 kDa, og det ligger utenfor standardkurven. Grunnen til at WML ble fordelt mellom to populasjoner er at isoleringsprosessen foregikk under oppvarming, 80 °C, og produsenten har tilsatt eddiksyre til WMS for å gjøre den løselig. Da ble WML partiellhydrolysert. Molekylvekten til fraksjon A var  $M_w$ : 58 kDa, mens fraksjon B var lav molekylær  $M_w$ : 13 kDa. Molekylvekten til B fraksjonen var utenfor standardkurven, og dermed ble det beregnet med stor usikkerhet.

## 6.2.3 Karakterisering av bindingsforhold

WMS har en relativt enkel struktur, (1 $\rightarrow$ 3)/(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukose. For å bestemme bindingsmønster i WML, ble den metylert og analysert ved GC-MS. I GC-MS-kromatogrammet ble terminalt bundet, (1 $\rightarrow$ 3)-bundet, spor av (1 $\rightarrow$ 6)-bundet og (1 $\rightarrow$ 3 $\rightarrow$ 6) bundet glukose detektert. Produsenten Biothera lagde WMS ved å hydrolysere WGPD (den dispersibel wellmune) med syre (European Food Safety Authority (EFSA) 2011). Denne behandlingen har mest sannsynlig ført til hydrolysering av (1 $\rightarrow$ 6)-glykosidbindinger, og dette kan forklare hvorfor det ble funnet spor av (1 $\rightarrow$ 6)-glukose og spor av forgreiningspunkter (1 $\rightarrow$ 3 $\rightarrow$ 6) glukose. En annen mulighet kan tenkes at dette produktet inneholder lite (1 $\rightarrow$ 6)-glukose forgreininger. Det vet man ikke, siden verken WMP eller WMS ble analysert.

## 6.3 Degradering av WML

Forskjellige fysikalske og kjemiske egenskaper til et stoff kan føre til forskjeller i biologisk aktivitet. Studier har vist at partikulær og løselig  $\beta$ -glukan aktiverer immunsystemet via to forskjellige mekanismer (Qi, Cai et al. 2011). Det kan også tenkes at forskjellige molekylstørrelser kan føre til variasjon i den biologiske aktiviteten. For å undersøke dette ble WML degradert i forskjellige metoder for å undersøke om molekylstørrelse kunne affektere  $\beta$ -glukanens bioaktivitet.

### 6.3.1 Partiell hydrolyse

WML ble hydrolysert i forskjellige betingelser, og det ble tatt prøver ved forskjellige tidspunkter. De hydrolyserte prøvene ble analysert ved HPLC for å se på molekylvektreduksjon i forhold til hydrolysebetingelsene. Prøvene ble analysert først med TSK- Gel® G3000 kolonnen, men da ble de ikke separert godt. Grunnen til det er at TSK- Gel® G 3000 kolonnen separerer karbohydrater med molekylvekt mindre enn 50 kDa (SUPELCO 1996). Deretter ble de analysert ved TSK- Gel® G5000 kolonnen. Toppene ble separert bedre ved STK5000 kolonnen. Molekylvekten til de hydrolyserte prøvene ble estimert på grunnlag av standardkurven. HPLC-kromatogrammet viste prøvene med to forskjellige topper. Molekylvekts størrelse ble beregnet på den høymolekylære toppen, siden den andre toppens molekylvekt var utenfor standardkurven. En reduksjon i molekylvektstørrelse i forhold til molekylvekten til WML kunne man se, men problemet er at nedgangen i molekylvektstørrelsen ikke er systematisk etter hydrolysetid. Grunnen til dette er at man regner molekylvekten etter retensjonstiden til toppunktet, dette gir en gjennomsnittlig molekylvekt. En ting til er at det kan tenkes at hydrolysen skjedde i den lavmolekylæredelen av prøven, mens den høymolekylæredelen ble lite hydrolysert. Det hadde vært enklere å fraksjonere WML til A og B først, og så utføre en partiellhydrolyse på hver en av dem og se undersøke nedgangen i molekylvekt.

### 6.3.2 Enzymdegradering

WML ble enzymdegradert av endo- 1,3-  $\beta$ -glukanase, for å oppnå mindre molekylvekt.

Endo-1,3- $\beta$ -glukanase er et endo enzym, det vil si at den vil starte degradering av  $\beta$ -glukan fra midten og ikke fra enden. Det ble prøvd enzymdegradering i vandigmiljø og i en bufferløsning. Prøven ble 50 % degradert etter 6 timer ved vandigmiljø, i tillegg var det ikke så stor forskjell i degraderingshastighet mellom prøven som var degradert ved vandigmiljø og i bufferløsning. Enzymet er levert som ammoniumsulfat suspensjon, pH 4,5. Dette kan være en årsak til at enzymet virket godt i vandigmiljø og ikke i natriumacetat bufferløsning.

Enzymdegradering i vandigmiljø hadde mange fordeler i forhold til celleforsøkene. Hvis prøven ble enzymdegradert i bufferløsning så måtte buffersaltene blitt fjernet fra prøven før celleforsøk. For å fjerne buffersaltene måtte prøven ha blitt dialysert, og det kunne man ikke gjøre, siden den enzymdegraderte prøven har veldig småmolekyler som også ville blitt dialysert vekk. Derfor var det bedre å enzymdegradere prøven i vandigmiljø.

Den enzymdegraderte prøven ble fraksjonert med Superdex 30 på kolonnen som fraksjonerer stoff med molekylvekt mindre enn 10 kDa. Man vet at ved enzymdegradering vil molekylvekten bli mye mindre, og derfor ble denne kolonnen brukt. Den enzymdegraderte prøven kom i to fraksjoner via kolonnen og man kunne se to topper i gelfiltrerings kromatogrammet (EA og EB), men ved HPAEC-PAD analyse var hele prøven eluert ved EB fraksjonen. Den enzymdegraderte prøven ble eluert ved SEC-HPLC med destillert vann og ikke med en saltløsning, fordi det var uønskelig å tilføre salter til prøven. Hadde prøven blitt eluert med et annet elueringmiddel, så kunne elueringsprofilen ved HPAEC-PAD vært kanskje annerledes. Det viste seg at fraksjonering av den enzymdegraderte prøven ved gelfiltrering ikke var effektiv, derfor ble EA og EB ikke brukt til andre analyser, eller til stimulering av RAW-cellene.

Den enzymdegraderte prøven ble analysert ved HPAEC-PAD med maltotriose standard. Analysen viste at den enzymdegraderte prøven inneholdt oligosakkarider, og de ble reisolert ved denne å koble en desaltingsenhet til HPAEC-PAD. Enzymet endo- 1,3- $\beta$ -glukanase er et spesifikt glukanothidrolase enzym (Megazyme 2013). Enzymet hydrolyserer linær  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukose, den degraderer prøven fra midten. Resultatet fra ESI-MS-analysen viste at prøven inneholdt glukose, dimer-, trimer- og tetramerglukoseenheter. Metyleringsanalyse viste at oligosakkaridene var lineære.

## 6.4 Stimulering av RAW 264.7 celler og måling av legumainaktivitet

RAW 264.7 cellene ble stimulert med WMS, WMP, og WML i en dose-respons forsøk, der cellene ble stimulert med følgende konsentrasjoner: 2, 1 og 0,5 mg/mL. Den partikulære  $\beta$ -glukan WMP hemmet legumainaktivitet ved 2 mg/mL og 1 mg/mL mens ved 0,5 mg/mL hemmet WMP legumainaktiviteten i mindre grad. WMS hemmet også legumainaktiviteten ved 2 mg/mL, men i mindre grad enn WMP.

En celleviabilitetstest (MTT) ble gjort for å undersøke om den observerte hemmingen av legumain ved stimulering med WMP ikke var falskt positivt resultat. Den partikulære  $\beta$ -glukan WMP og den løselige fraksjonen WML ga ikke celledød. Mens den løselige  $\beta$ -glukan WMS ga 50 % celledød ved prøvekonsentrasjon 2 mg/mL. Ved cellestimulering for bestemmelse av legumainaktivitet ble det observert litt fargeendring av mediet. WMS inneholder noe eddiksyre som kan være årsaken til fargeendringen av mediet, noe som fører til at cellene ikke trives i mediet. Selv om ca 50 % av cellene døde på grunn av pH- endring, men legumainaktivitet hemmes fortsatt litt ved stimulering med WMS 1 mg/mL.

Resultatene fra celleforsøkene viste at WMP hemmet legumainaktivitet, men WML som er en fullstendig løselig fraksjon, ikke hemmet legumainaktiviteten. Studier har vist at RAW 264.7 cellene uttrykker dektin-1 reseptor som er  $\beta$ -glukan reseptor. Dektin-1 reseptor er ansvarlig for fagocytose i makrofagene og dendritiske celler (Brown and Gordon 2001). Mekanismen for hvordan legumainaktivitet blir hemmet av WMP er ikke kartlagt. Det som er kartlagt nå er at partikulært  $\beta$ -glukan binder seg til dektin-1 reseptor i makrofagen og blir fagocyttert (Goodridge, Reyes et al. 2011).  $\beta$ -glukan som blir fagocytter av makrofagene blir degradert til løselige  $\beta$ -glukan fragmenter som blir skilt ut av makrofagene (Hong, Yan et al. 2004). Det kan tenkes at fagocyttert  $\beta$ -glukan blir degradert i lysosomene, og at de små løselige fragmenter kunne føre til hemming av prolegumain autoaktivering ved lav pH.

Forsøkene har vist at WMS hemmet legumainaktiviteten kun ved 2 mg/mL og ved 1 mg/mL, men i mindre grad. Det er rapportert at løselig  $\beta$ -glukan binder seg til makrofagene og dendritiske celler uavhengig av verken dektin-1 reseptor eller CD11b, den krever CR-3

binding (Qi, Cai et al. 2011). Det er ukjent hvordan WMS hemmer legumainaktivitet. Det kan tenkes at andre  $\beta$ -glukan reseptorer kan være involvert i signalmediering inni cellene og dermed føre til at legumainaktiviteten hemmes. Et poeng til er at WMS ikke er fullstendig løselig, og de uløselige partiklene i WMS kunne bli fagocytter på samme måte som WMP, ved dektin-1 binding, og føre til hemming på samme måte som tenkes.

WML hemmet ikke legumainaktivitet. Det som kunne tenkes her er at siden isoleringsprosessen har ført til fjerning av forgreiningene, førte WML verken til stimulering eller at legumainaktiviteten ble hemmet. Studier har vist at løselig  $\beta$ -glukan med molekylvekt på 150 kDa har interagert med rensset dektin-1 reseptor ved veldig lave konsentrasjoner, men klarte ikke å aktivere den (Goodridge, Reyes et al. 2011). Molekylvekten til WML er rundt 54 kDa, og da kan molekylvekts reduksjon forklare legumainaktivitet som var på kontrollnivå. WML klarte kanskje ikke å binde seg til noen reseptorer eller komme inn i makrofagene for å hemme eller føre til stimulering av legumainaktivitet.

WML ble fraksjonert og fraksjonene A og B ble testet i celleforsøkene for å undersøke om molekylvektstørrelse påvirket legumainaktivitet. Resultatene fra forsøkene viste at fraksjon A, B og WML ga litt stimulering av legumainaktivitet, mens WMS hemmet legumainaktivitet som vanlig. Det var litt uvanlig å få stimulering med WML, siden i alle andre forsøk var WML verken hemmende eller stimulerende, og legumainaktivitet var på nivå med kontroll. Det kan tenkes at siden molekylvekten ble redusert, så ble andre  $\beta$ -glukan reseptorer involvert, noe som førte til enzymaktivering.

I et annet forsøk ble cellene stimulert med WMS, WML, og den enzymdegraderte prøven. WMS hemmet legumainaktivitet som forventet mens den enzymdegraderte prøven og WML hadde legumainaktivitet på nivå med kontroll. Her ser man også at så små molekyler som oligosakkrider ikke fører til verken stimulering eller at legumainaktiviteten blir hemmet, noe som kan foreklares med manglende fagocytose, eller manglende reseptorbinding. Cellene ble stimulert med de hydrolyserte prøvene for å undersøke om molekylvekten kunne påvirke legumainaktivitet. Alle de hydrolyserte prøvene ga litt stimulering i forhold til kontroll. Det kan tenkes at reduksjon i molekylvekten gir stimulering av legumainaktivitet. Grunnen til det kan forklares med at prøvene kunne binde seg til TLR-2 eller TLR-6, dermed stimulere utskilling av cytokiner som TN- $\alpha$ , IL-6, IL-12 og IL-10. Noen av disse cytokinene



kan ha en stimulerende effekt på legumain, dette må nok undersøkes litt nærmere for å kunne konkludere med det.

## 7 Konklusjon

I denne oppgaven ble  $\beta$ -glukan isolert fra et  $\beta$ -glukan preparat fra *S.cerevisiae* til en løselig fraksjon som ble kalt WML. WML ble karakterisert med hensyn til molekylvektstørrelse og bindingsmønster. WML ble fraksjonert ved SEC-HPLC, enzymdegradert og hydrolysert. RAW 264.7 cellene ble stimulert med WML, enzymdegradert prøve, hydrolyserte prøver, og fraksjonerte prøver for å undersøke sammenhengen mellom legumainaktivitet og molekylstørrelse. Den partikulære  $\beta$ -glukan WMP, og den løselige  $\beta$ -glukan WMS ble også testet på RAW-cellene for å undersøke om løseligheten av  $\beta$ -glukan kunne påvirke legumainaktivitet.

Ved karakterisering av  $\beta$ -glukan ble det funnet at den isolerte fraksjon bestod av glukose, og spor av mannose.  $\beta$ -glukan bestod av  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) bundet glukose, og hadde spor av forgreiningspunkter, (1,3,6) bundet glukose. Hydrolyse av  $\beta$ -glukan førte til molekylvektreduksjon av den høymolekulære delen av  $\beta$ -glukan, mens behandling av WML med endo 1,3- $\beta$ glukanase førte til dannelse av oligosakkarider. Det ble dannet mono-, di-, tri- og tetramere. Alle oligosakkaridene bestod av  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glukose.

RAW-264.7 celler ble stimulert med WMP, WMS og WML og resultatene viste at partikulær  $\beta$ -glukan hemmer legumainaktiviteten best, mens WMS som er ”delvis løselig” hemmer legumainaktivitet i mindre grad. Legumainaktiviteten hemmes ikke av fullstendig løselig  $\beta$ -glukan så lenge molekylvekten ikke blir for liten. Det viste også resultatene fra forsøket der RAW-cellene ble stimulert med fraksjon A, B og enzymdegraderte prøven. Enzymaktiviteten økte ved stimulering med A og B fraksjonene, mens legumainaktiviteten var på nivå med kontrollen ved stimulering med enzymdegraderte prøve. Resultatene ble forsterket med de hydrolyserte prøvene som førte til stimulering av legumainaktiviteten.

Det er påvist at partikulært  $\beta$ -glukan binder seg til dektin-1 reseptor på makrofagene. En slik binding fører til fagocyttering av  $\beta$ -glukan. Det er ukjent hvordan hemming av legumainaktivitet skjer, men det kan tenkes at fagocyttert partikulært  $\beta$ -glukan transporteres til lysosomene og blir delvis degradert, dermed kunne tenkes å hemme autoaktivering av

prolegumain. Den stimulerende effekten som er observert ved den løselige  $\beta$ -glukan kunne tenkes å være på grunn av binding til CR-3 eller en annen type  $\beta$ -glukan reseptor.

## 8 Veien videre

Man kunne undersøke ved å merke  $\beta$ -glukan, både den løselige og den partikulære med et fluoriserende stoff, og så stimulere cellene med dem for å se hvordan stoffet blir tatt opp i cellene, hvordan og hvor legumain blir hemmet. En autoaktivering forsøk med den partikulære og den løselige  $\beta$ -glukan kan bidra til mer forståelse om hvordan legumain blir hemmet. Dette kan gi et fremskritt i forskning av  $\beta$ -glukan og dens antitumor virkning. En autoaktiveringforsøk av prolegumain med de hydrolyserte og den enzymdegraderte prøvene kunne også gi en bedre forståelse for effekt av molekylstørrelsesreduksjon og økt enzymaktivitet.

# Litteratur liste

ATCC (2012, 2012). "RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)." Retrieved 07.05, 2013, from [https://http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-71.aspx?geo\\_country=no&slp=1 - 357C3571006A4259B64650D34DF19048](https://http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/TIB-71.aspx?geo_country=no&slp=1 - 357C3571006A4259B64650D34DF19048).

Auinger, A., et al. (2013). "Yeast (1, 3)-(1, 6)-beta-glucan helps to maintain the body's defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects." European journal of nutrition: 1-6.

Barsanti, L., et al. (2011). "Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of  $\beta$ -glucans." Natural Product Reports **28**(3): 457-466.

Beck, H., et al. (2001). "Cathepsin S and an asparagine - specific endoprotease dominate the proteolytic processing of human myelin basic protein in vitro." European journal of immunology **31**(12): 3726-3736.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**(1): 248-254.

Brown, G. D. and S. Gordon (2001). "Immune recognition: a new receptor for  $\beta$ -glucans." Nature **413**(6851): 36-37.

Chambers, R. and J. Clamp (1971). "An assessment of methanolysis and other factors used in the analysis of carbohydrate-containing materials." Biochemical Journal **125**(4): 1009.

Chan, G., et al. (2009). "The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells." J Hematol Oncol **2**: 25.

Chen, J.-M., et al. (1997). "Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase." Journal of Biological Chemistry **272**(12): 8090-8098.

Choi, S. J., et al. (2001). "Osteoclast Inhibitory Peptide 2 Inhibits Osteoclast Formation via Its C - Terminal Fragment." Journal of Bone and Mineral Research **16**(10): 1804-1811.

Ciucanu, I. and F. Kerek (1984). "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates." Carbohydrate Research **131**(2): 209-217.

Daou, C. and H. Zhang (2012). "Oat Beta - Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **11**(4): 355-365.

- Dillon, S., et al. (2006). "Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance." Journal of Clinical Investigation **116**(4): 916-928.
- Driscoll, M., et al. (2009). "Therapeutic potential of various  $\beta$ -glucan sources in conjunction with anti-tumor monoclonal antibody in cancer therapy." Cancer Biology & Therapy **8**(3): 218-225.
- Dubois, M., et al. (1956). "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." Analytical chemistry **28**(3): 350-356.
- Edgington, L. E., et al. (2012). "Functional imaging of legumain in cancer using a new quenched activity-based probe." Journal of the American Chemical Society **135**(1): 174-182.
- European Food Safety Authority (EFSA), P., Italy (2011). "Scientific Opinion on the safety of 'yeast beta-glucans' as a Novel Food ingredient1." Retrieved 08.April, 2013, from <http://www.efsa.europa.eu/en/search/doc/2137.pdf>.
- Fuller, R., et al. (2012). "Influence of yeast-derived 1, 3/1, 6 glucopolysaccharide on circulating cytokines and chemokines with respect to upper respiratory tract infections." Nutrition.
- Ghosh, K., et al. (2013). "Successful Therapy of Visceral Leishmaniasis With Curdlan Involves T-Helper 17 Cytokines." Journal of Infectious Diseases **207**(6): 1016-1025.
- Gaiomis, J., et al. (1993). "Both mannose and beta-glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages." Journal of leukocyte biology **54**(6): 564-571.
- Goodridge, H. S., et al. (2011). "Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a phagocytic synapse/." Nature **472**(7344): 471-475.
- Graubaum, H.-J., et al. (2012). "A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Study Using an Insoluble Yeast Beta-Glucan to Improve the Immune Defense System." Food and Nutrition **3**: 738-746.
- Hardy, M. R. and R. R. Townsend (1988). "Separation of positional isomers of oligosaccharides and glycopeptides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(10): 3289-3293.
- Ho, C., et al. (2003). "Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications." The Clinical Biochemist Reviews **24**(1): 3.
- Hong, F., et al. (2004). "Mechanism by which orally administered  $\beta$ -1, 3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models." The Journal of immunology **173**(2): 797-806.

Jiang, L. I., et al. (2013). "Zymosan activates protein kinase A via adenylyl cyclase VII to modulate innate immune responses during inflammation." Molecular immunology **54**(1): 14-22.

Johansen, H. T., et al. (1999). "Colorimetric and fluorimetric microplate assays for legumain and a staining reaction for detection of the enzyme after electrophoresis." Analytical biochemistry **273**(2): 278-283.

Klimp, A., et al. (2002). "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer." Critical reviews in oncology/hematology **44**(2): 143-161.

Kollár, R., et al. (1997). "Architecture of the yeast cell wall  $\beta$  (1 $\rightarrow$  6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$  (1 $\rightarrow$  3)-glucan, and chitin." Journal of Biological Chemistry **272**(28): 17762-17775.

Li, D. N., et al. (2003). "Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo." Journal of Biological Chemistry **278**(40): 38980-38990.

Li, D. N., et al. (2003). Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo. F. 2. Molecular Pharmaceutics.

Liu, C. (2008). Legubicin a Tumor-activated Prodrug for Breast Cancer Therapy, DTIC Document.

Liu, C., et al. (2003). "Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy." Cancer research **63**(11): 2957-2964.

Manoury, B., et al. (1998). "An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation." Nature **396**(6712): 695-699.

Megazyme (2013). "E-LAMSE Datasheet." endo, 1,3- $\beta$ -GLUCANASE from Trichoderma sp. (LOT 91102a). Retrieved 06.05, 2013, from [http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/E-LAMSE\\_91102a\\_DATA.pdf](http://secure.megazyme.com/files/BOOKLET/E-LAMSE_91102a_DATA.pdf).

Nicolosi, R., et al. (1999). "Plasma lipid changes after supplementation with  $\beta$  -glucan fiber from yeast." The American journal of clinical nutrition **70**(2): 208-212.

Novak, M. and V. Vetvicka (2008). " $\beta$  -glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action." Journal of Immunotoxicology **5**(1): 47-57.

Osborne, T. B. and A. J. Wakeman (1919). "EXTRACTION AND CONCENTRATION OF THE WATER-SOLUBLE VITAMINE FROM BREWERS'YEAST." Journal of Biological Chemistry **40**(2): 383-394.

Pedersen-Bjergaard, S.-. and K. E.-. Rasmussen (2010). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokfori.

Pharham, P.-J., Charles A (2009). The immune system/ Peter Parham. London, Garland Science, Taylor & Francis Group.

Qi, C., et al. (2011). "Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived  $\beta$ -glucans." Blood **117**(25): 6825-6836.

Sato, M., et al. (2003). "Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- $\kappa$ B activation and TNF- $\alpha$  secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A." The Journal of immunology **171**(1): 417-425.

SUPELCO (1996). "TSK-GEL® Gel Filtration Columns." Retrieved 13.05, 2013, from [http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product Information Sheet /8524.Par.0001.File.tmp/8524.pdf](http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Product%20Information%20Sheet/8524.Par.0001.File.tmp/8524.pdf).

Takahashi, T., et al. (2006). "Beneficial effect of brewers' yeast extract on daily activity in a murine model of chronic fatigue syndrome." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine **3**(1): 109-115.

Volman, J. J., et al. (2008). "Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans." Physiology & behavior **94**(2): 276-284.

Volman, J. J. R., J.D. Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans: Struktur av korn og gjær  $\beta$ -glukan.

Yamane, T., et al. (2012). "Knockdown of legumain inhibits cleavage of annexin A2 in the mouse kidney." Biochemical and biophysical research communications.



# **Vedlegg / Appendiks**