

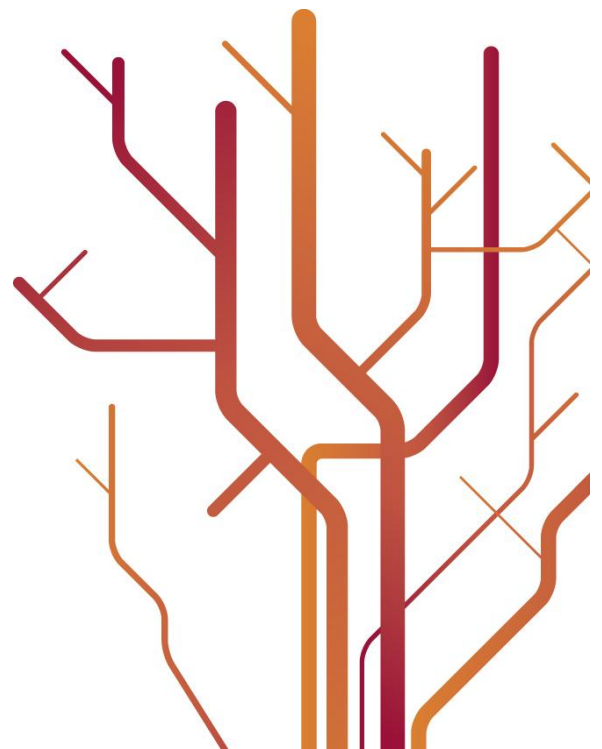
Antimikrobielle forbindelser fra de to subarktiske sjøpungene: *Synoicum turgens* og *Synoicum incrustatum*



Ida Kristine Hansen

Mastergradsoppgave i marin bioteknologi (60 stp)

Mai 2011



Forord

Denne masteroppgaven i marin bioteknologi ble utført på Norges fiskerihøgskole (NFH) ved fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi (BFE), Universitet i Tromsø, høsten 2010 og våren 2011. Veiledere har vært førsteamanuensis Tor Haug og professor Klara Stensvåg.

Først og fremst ønsker jeg å takke Tor for god veiledning både på lab og under oppgaveskrivingen. Jeg ønsker også å takke Klara for gode råd under skriveprosessen, og for mange interessante problemstillinger til en masteroppgave, hvor denne falt best i smak. Videre ønsker jeg å takke bioprospekteringsgruppa og da spesielt Margey Tadesse og Hans-Matti Blencke for hjelp med diverse maskiner og gode råd. En takk rettes også til Robert Andre Johansen fra Marbio for det taksonomiske arbeidet, Bjørn Gulliksen for bilder, Janette Hammer Anderesen og Trine Stiberg fra Marbio for hjelp til anticancer testing og til Johan Svenson fra Smallstruct for kjøring av høyopløselig MS.

Jeg må også takke mine to studieveinner gjennom 5 år, Runar og Charlotte, som har alltid har vært der for meg, og delt mange hyggelige stunder både på og utenfor universitet. Til sist vil jeg takke min familie som har vist stor interesse for hva jeg holder på med, samt vært en god støtte i tunge tider.

Tromsø, mai 2011

Ida Kristine Hansen

Sammendrag

To arter sjøpung fra subarktiske strøk, *Synoicum turgens* og *Synoicum incrustatum*, ble testet for antibakteriell aktivitet. Prøvene ble ekstrahert med 60% acetonitril + 0.1% trifluoreddiksyre, og videre rensset med fast fase ekstraksjon (SPE). Disse ble testet for antibakteriell aktivitet, og videre fraksjonert ved høytrykks-væskekromatografi (HPLC). HPLC fraksjonene ble testet for aktivitet, hvor aktive fraksjoner ble rensset opp med ny HPLC. Disse fraksjonene ble undersøkt med LC-MS for å beregne renhet i fraksjonene. Det ble funnet antibakteriell aktivitet i både *S. turgens* og *S. incrustatum*. Flere av de antibakterielle forbindelsene viste også aktivitet mot cancerceller og vanlige celler. To forholdsvis rene fraksjoner ble isolert fra 40% SPE eluat fra *S. turgens*, hvor den ene av disse kan se ut til å inneholde antibakterielle peptider.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Forkortelser	V
1. Innledning.....	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Naturstoffer	2
1.3 Sjøpunger (Ascidacea)	6
1.4 Metodikk	13
1.5 Mål for oppgaven	15
2. Materiale og metode.....	16
2.1 Kjemikalier og reagenser	16
2.2 Metodeforløpet i denne oppgaven.....	16
2.3 Forsøksdyr, innsamling og lagring.....	18
2.4 Ekstraksjon.....	18
2.5 Fast fase ekstraksjon ("Solid phase extraction"; SPE).....	19
2.6 Bakteriedyrking.....	19
2.7 Antibakteriell testing.....	19
2.8 Anticancertesting.....	20
2.9 Separasjon ved bruk av Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC).....	20
2.10 Massespektrometri (MS).....	22
3. Resultater.....	23
3.1 Utbytte av ekstraksjon.....	23
3.2 Antibakteriell aktivitet i ekstrakter.....	25
3.3 Isolering og innledende karakterisering av aktive komponenter	28
3.4 Anticanceraktivitet i ekstrakter	35

4. Diskusjon.....	37
5. Konklusjoner	42
6. Referanser.....	43

Forkortelser

ACN	Acetonitril
ESI	Elektrospray ionisering (Electrospray Ionization)
HPLC	Høytrykks-væskekromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
LC-MS	Væskekromatografi-massespektrometri (Liquid chromatography mass spectrometry)
<i>m/z</i>	Masse/ladning
MHB	Muller Hinton Broth
MQ	MilliQ-vann
MS	Massespektrometri
OD	Optisk tetthet (optical density)
PDA	Photodiode array detector (UV-detektor)
RP-HPLC	Omvendt fase høytrykks-væskekromatografi (Reversed phase High Performance Liquid Chromatography)
SPE	Fast fase ekstraksjon (Solid Phase Extraction)
TFA	Trifluoreddiksyre
UV-vis	Ultrafiolett-synlig (Ultraviolet-visible)
WHO	Verdens helseorganisasjon (World Health Organization)

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Nest etter hjerte- og karsykdommer er det infeksjonssykdommer som tar flest menneskeliv i verden. Infeksjonssykdommer er sykdommer fremkalt av mikroorganismer, som bakterier, virus, sopp og parasitter. Omtrent 15 millioner mennesker dør hvert år som følge av infeksjonssykdommer¹. Spesielt barn under 5 år er utsatt, og i 2008 utgjorde infeksjonssykdommer 68 % av alle registrerte dødsfall for denne aldersgruppen². Stadig nye infeksjonssykdommer som foreløpig ikke kan behandles, og en økende grad av multiresistente mikroorganismer, skaper store bekymringer rundt om i verden^{3,4}. Trusselen er ansett å være så stor at Verdens helseorganisasjon (WHO) har valgt ”bekjemp antimikrobiell resistens” som tema for World Health Day 2011. På denne dagen vil WHO starte en internasjonal kampanje for å stoppe spredningen av antimikrobiell resistens⁵.

Antibiotika er naturlige eller semi-syntetiske forbindelser med opprinnelse fra mikrober med antimikrobiell aktivitet, og blir benyttet til forebygging og behandling av kliniske infeksjoner i både mennesker og dyr. Antimikrobiell resistens er motstandsdyktighet som utvikles i bakterier overfor slike forbindelser, og er en uunngåelig evolusjonær respons som utvikler seg raskt ved overbruk og misbruk av antibiotika⁶. Helt fra Darwin’s evolusjonslære har det vært viden kjent at alle levende organismer strever for å tilpasse seg omgivelsene, dette være seg mat, vann eller oksygentilgang, men også tilstedeværelse av potensielt farlige og i noen tilfeller dødelige forbindelser. Mikroorganismer er ingen unntak og har vist seg å være svært dyktige til å utstå og tilpasse seg omgivelsene, inkludert utvikle forskjellige mekanismer som gir resistens mot antimikrobielle forbindelser⁷.

Noen bakterier er motstandsdyktige mot mer enn et antibiotikum, og slike bakterier kalles for multiresistente bakterier⁶. Listen blant multiresistente bakterier er lang, inkludert Gram-positive bakterier som meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), koagulase-negative *Staphylococcus* sp, vankomycinresistente enterokokker (VRE), pencillin-resistent pneumokokker^{6, 8, 9}, og multiresistente Gram-negative bakterier som *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp., og *Pseudomonas aeruginosa*^{6, 10, 11}. Spredningen av multiresistente bakterier er ikke kun et resultat av misbruk av antibiotika til humant bruk. Bruk av antibiotika blir i økende grad anvendt innenfor veterinærmedisin ved behandling av infeksjonssykdommer hos husdyr⁶. Andre bekymringer er langtidseffekten etter

spraying av frukttrær med antibiotika i noen deler av verdenen, samt overforbruket av antibiotika for behandling av sykdommer innenfor akvakultur¹².

Årets tiltak, besluttet av WHO⁵, om strengere regulering for bruk av antibiotika for å minke spredning av resistente bakterier er en nødvendighet. Den største trusselen er kanskje ikke blitt et faktum enda, men det kan tenkes at større problemer er i vente når rester av storforbrukt antibiotika brukt i medisin til mennesker, i veterinærmedisiner og i akvakultur, etc. siver ut og spres i miljøet. Antimikrobiell resistent kan kanskje etter hvert overføres til bakterier i havet, jorden og i drikkevannet, og på denne måten også nå patogene bakterier¹³. Det er stort behov for strenge reguleringer av antibiotikaforbruk, og det er stort behov for nye antimikrobielle forbindelser som kan bekjempe resistente bakterier^{14, 15}. Dette gir motivasjon for å lete etter nye forbindelser som kan brukes i medisiner mot resistente bakterier, der hvor andre medisiner feiler.

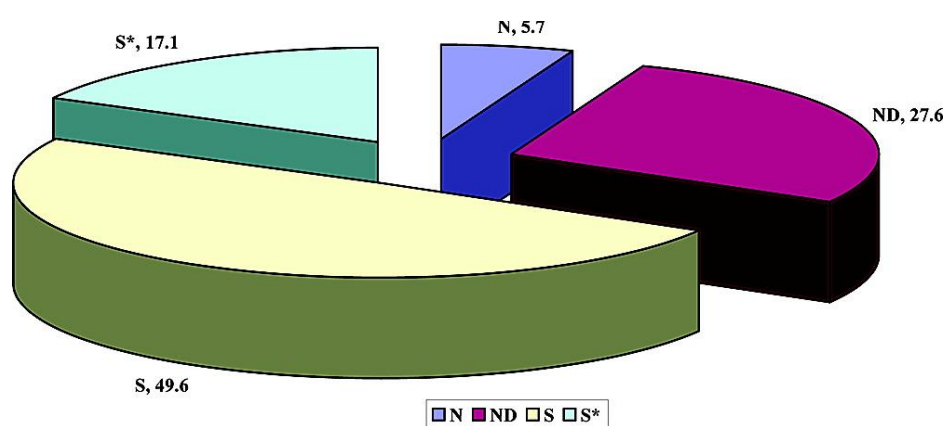
1.2 Naturstoffer

Menneskene har gjennom årtusener brukt naturen og dens ressurser for å overleve. Ressursene innebærer blant annet tilgang til mat, ly, klær, fargestoffer, og ikke minst medisiner. Spesielt har planter vært viktige for sine legende egenskaper opp gjennom tidene. Det er funnet skrifter fra Mesopotamia helt fra år 2600 f.Kr. som beskriver bruk av olje fra seder og sypress (bartrær), lakris fra roten av lakrisplanten, myrra og valmueolje, til behandling av alt fra forkjølelse til infeksjoner og inflammasjoner. Dette er produkter som blir benyttet selv i dag¹⁶.

Stoffer som utnyttes fra planter, mikroorganismer og dyr, kalles naturstoffer. Disse produseres av levende celler, og tar del i biosyntesen av både primære og sekundære metabolitter. Primære metabolitter blir brukt til egen funksjon i grunnleggende biokjemiske prosesser i cellene, mens sekundære metabolitter produseres av ulike grunner, hvor de fleste enda ikke er helt kjent for oss¹⁷. Det antas at sekundære metabolitter spiller en rolle i hvordan organismer tilpasser seg omgivelsene sine for å overleve. Eksempler på naturstoffer er steroider, fettsyrer, aminosyrer, proteiner, terpenoider, peptider, etc¹⁸.

Naturstoffer, eller derivater fra naturstoffer, i medisin har vært brukt lenge. Storhetstiden for antibiotika derimot kom først ved Flemings oppdagelse av penicillin fra soppen *Penicillium notatum* i 1928, og når vi fikk større kunnskap om dens brede spekter til terapeutisk bruk i 1940 årene. Etter dette startet for alvor søket etter nye bioaktive forbindelser fra naturen¹⁹.

I ”gamle dager”, før screening etter antimikrobielle forbindelser ble kraftig intensivert og før den post-genomiske æra startet, var mer enn 80% av medisinene utviklet fra naturstoffer eller inspirert fra forbindelser fra naturstoffer²⁰. Selv om det i senere tid har vært stor økning av syntetisk produserte medisiner, spiller naturstoffer fortsatt en viktig rolle. Slik diagrammet i Figur 1 viser, var over 50% av alle klinisk brukte medisiner mellom 1981-2006 enten fra naturstoffer, utledet fra naturstoffer eller en etterligning av naturstoffer²¹. Mellom 2005 og 2007 ble 13 naturstoff-relaterte medisiner godkjent, hvorav 5 av disse presenterer nye klasser medisiner: peptidene exenatid og ziconotide, og de lavmolekylære medisinene ixabepilone, retapamulin og trabectin (Figur 2)²⁰.



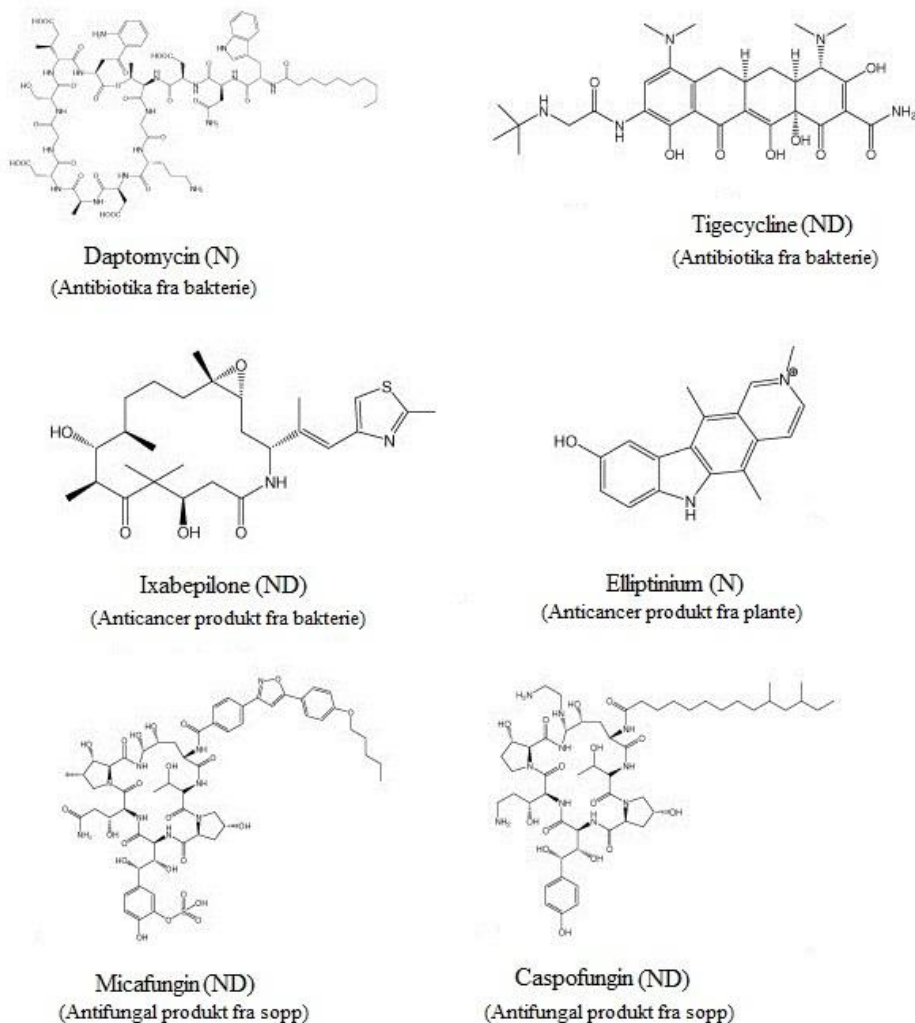
Figur 1. Kilder for lavmolekylære medisiner fra 1981-2006, regnet ut i prosent. Kategoriene er: "N", naturstoffer; "ND", utledet fra naturstoffer og vanligvis en syntetisk modifikasjon; "S", helt syntetisk medisin ofte funnet ved tilfeldig screening /modifikasjon av et eksisterende produkt; "S*", laget ved ren syntese, men utgangspunktet for struktur er/var fra et naturstoff. Diagrammet er hentet fra Newman (2008)²¹.

Mange naturstoffer er et gode utgangspunkt for å produsere nye stoffer kjemisk, men ofte er de også en utfordrende å produsere for den farmasøytiske industrien. Typiske problemer forbundet med naturstoffer er at de har begrenset kjemisk stabilitet og er dårlig oppløselige. Som Figur 2 viser, har mange naturstoffer komplekse strukturer med stor eller liten molekylvekt. Slike komplekse strukturer vil ofte være dyre å framstille. I tillegg vil store molekyler mest sannsynlig ikke kunne absorberes fra tarmen og overføres videre til blodet, noe som gjør det problematisk å bruke dem i orale medisiner⁴. Andre utfordringer som naturstoffer byr på er begrensinger i forhold tilgang på materialer. Innsamling kan være mer tidkrevende, og juridiske forhold som regulerer opphavsrett er fortsatt diffust²⁰.

Til tross for komplikasjoner er det et sterkt fokus på behov for å lete etter nye naturstoffer som har antimikrobielle egenskaper. Naturstoffer dekker en mye større kjemisk bredde, som

syntetiske og semisyntetiske forbindelser ikke dekker¹⁷. I tillegg inneholder naturstoffer mange flere chirale sentre, ringstrukturer og høyere tetthet mellom de funksjonelle gruppene, noe som gir høyere ligand affinitet og bedre spesifisitet til det biologiske målet (f.eks. til cellevegg eller spesifikke proteiner)¹⁷. Til tross for størrelsen er mange naturstoffer som absorberes lettere enn syntetiske medisiner²⁰.

Det oppdages stadig nye naturstoffer og lages enda flere derivater fra naturstoffer. De antibakterielle forbindelsene daptomycin og tigecycline, anticancerforbindelsene ixabepilone og elliptinium, og de antifungale forbindelsene micafungin og caspofungin (Figur 2), er bare noen av mange forbindelser som er blitt utredet de siste årene²⁰. Uten oppdagelse av slike naturstoffer, er det mange livreddende medisiner som ikke hadde vært tilgjengelig på markedet i dag. Fortsatt gjenstår utallige levende organismer og lite utforskede miljø, som for eksempel det marine miljø, som kan benyttes for å finne nye potensielle naturstoffer.



Figur 2. Eksepler på strukturer fra naturstoffer (N) og derivater fra naturstoffer (ND). Strukturene er hentet fra Harvey (2008)²⁰.

1.2.1 Potensial for nye antimikrobielle forbindelser fra det marine miljø

Havet dekker over 70% av jordens overflate og har et gjennomsnittsdyp på 3800 m. Det er registrert mer enn 500 000 marine arter og stadig flere oppdages etter hvert som ny teknologi gjør dypt-levende organismer mer tilgjengelig¹⁸. Det marine miljø kan variere veldig i forhold til fysiske og kjemiske faktorer som temperatur, saltinnhold, trykk og lystilgang. Mange marine organismer har lært å tilpasse seg vanskelige forhold for kunne overleve²².

Antimikrobielle forbindelser fra det marine miljø er langt mindre undersøkt enn dem fra terrestriske miljø, mye på grunn av utfordringene forbundet med innsamling og identifisering av marine organismer¹⁸. Dette henger også litt sammen med at det i tillegg har det vært liten tradisjon for å spise marine organismer (annet enn fisk) og på den måten erfare legende effekter, slik det i årtusener er blitt gjort med terrestriske organismer (spesielt planter). Det har heller ikke vært tradisjon for å føre farmakoper (bøker om legemidler) fra det marine miljø²².

Marine dyr, planter og mikroorganismer har vist seg å produsere sekundære metabolitter som skiller seg fra tilsvarende forbindelser fra terrestriske organismer, og har et stort og variert spekter med unike kjemiske strukturer¹⁸. Det påstås også at det er i det marine miljø kjemikere vil finne høyest ”kjemodiversitet”, og har størst mulighet for å finne nye typer antimikrobielle forbindelser. Potensialet vil være størst i organismer uten terrestriske ekvivalenter, som røde og brune alger, svamper, nesledyr, mosdyr (bryozoa) og sjøpung.²² Mange av disse organismene er primitive, fastsittende dyr som ikke har spesielle fysiske egenskaper eller ytre bestanddeler som f.eks. skjell eller kamuflasje, for å beskytte seg mot predatorer, annet enn å bruke kjemiske våpen for å frastøte eller forgifte fiender. For at disse kjemiske forbindelsene skal ha en effekt når de skilles ut i vannet, og dermed fortynnes, må de være mer potente enn de måtte ha vært på landejorden²².

1.2.2 Marine antimikrobielle forbindelser på markedet og under klinisk testing

Da marine antimikrobielle forbindelser er langt mindre undersøkt enn terrestriske, er det også langt færre medisiner utviklet fra marint miljø på markedet i dag. Nesten 300 patenter ble tatt ut mellom 1969 og 1999 på molekyler isolert fra marine organismer, men færre enn 1 av 10 av disse har resultert i medisiner på markedet²². For tiden er 13 marine naturforbindelser eller derivativer fra naturforbindelser i forskjellige faser av klinisk testing (Tabell 1). På det

medisinske markedet har 3 marine naturstoffer, henholdsvis cytarabine (Ara-C), vidarabine (Ara-A), ziconotide, blitt godkjent av de strenge kriteriene til FDA (Food and Drug Administration) i USA. Trabectedin er godkjent for sitt formål i EU, og er til klinisk testing i fase II og III for å bli godkjent som medisin for flere krefttyper²³.

Tabell 1. Eksempler på marine naturforbindelser som er i klinisk utprøving og der deres kliniske status er angitt. Modifisert fra Mayer et al. (2010)²³

Klinisk status	Forbindelsens navn	Marin organisme*	Kjemisk klasse	Sykdomsområde
Godkjent	Cytarabine, Ara-C (<i>Cytostar-U</i> [®])	Svamp	Nukleosid	Kreft
	Vidarabine, Ara-A (<i>Vira-A</i> [®])	Svamp	Nukleosid	Virus
	Ziconotide (<i>Prialt</i> [®])	Kjeglesnegl	Peptide	Smerte
	Trabectedin (ET-743, <i>Yondelis</i> [®]) (kun EU registrert)	Sjøpung	Alkaloid	Kreft
Fase III	Eribulin Mesylate (E7389)	Svamp	Makrolid	Kreft
	Soblidotin (TZT 1027)	Bakterie	Peptid	Kreft
Fase II	DMXBA (GTS-21)	Mark/orm	Alkaloid	Kognisjons schizofreni
	Plinabulin (NPI-2358)	Sopp	Diketopiperazine	Kreft
	Plitidepsin, Deyhydrodidemnin B (<i>Aplidin</i> [®])	Sjøpung	Syklisk depsipeptid	Kreft
	Elisidepsin (<i>Irvalac</i> [®])	Bløtdyr (Mollusc)	Syklisk depsipeptid	Kreft
	PM1004 (<i>Zalypsis</i> [®])	Nakengjellet snegl	Alkaloid	Kreft
	Tasidotin, Synthadotin (ILX-651)	Bakterie	Peptid	Kreft
	Pseudopterosin	Bløtkorall	Diterpen glykosid	Sårheling
Fase I	Bryostatin 1	Mosdyr (Bryozoa)	Polyketid	Kreft
	Hemiasterlin (E7974)	Svamp	Tipeptid	Kreft
	Marizomib (Salinosporamide A; NPI-0052)	Bakterie	Beta-lakton-gamma laktam	Kreft

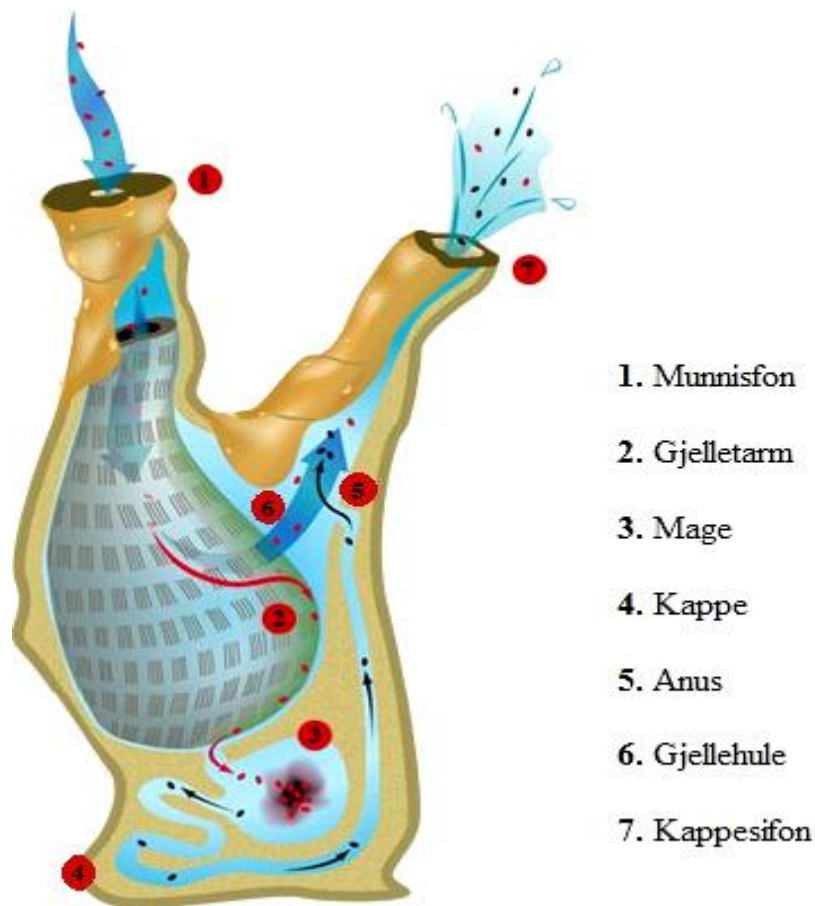
* Enten naturstoff, analog eller derivat av forbindelse produsert av denne organismen.

1.3 Sjøpunger (Ascidiacea)

Sjøpunger er fastsittende, bunnlevende kappedyr og tilegner seg næring ved å filtrere sjøvann. De tilhører underrekken kappedyr (Tunicata), og selv om de har et primitivt utseende er de høyere utviklet enn alle virvelløse dyr. I likhet med mennesker tilhører sjøpungene rekken

ryggstrengdyr, noe som vil si at de har en ryggstreng internt plassert på ryggiden. Ryggstrengen forsvinner ved omdanningen fra et frittsvømmende larvestadium til et fastsittende og enkeltstående (solitær) eller kolonidannende voksenstadium. Sjøpunger er den største gruppa av underrekken kappedyr, og karakteriseres ved den celluloseholdige kappen ("tunica") som omslutter de indre organene. Nesten samtlige arter i denne gruppa er hermafroditter (tvekjønnet). Flere arter danner kolonier ved knoppsskyting, og mange lever i symbiose med encellede alger²⁴.

Sjøpunger er registrert i samtlige verdenshav, og den store utbredelsen kan muligens komme av at larver forflyttes med ballastvann fra båter eller fra skalldyroppdrett. Det er funnet sjøpunger på de fleste havdybder, men størsteparten av artene finnes i de øvre 500 meterne. Rundt om 50 arter er funnet på dyp mellom 2000 og 5000 meter²⁵.



Figur 3. Generell anatomi til sjøpung der ulike bestanddeler er avmerket. Modifisert fra Nevala (2005)²⁶.

Anatomien som er en forutsetning for de generelle fysiologiske prosessene, blir illustrert i Figur 3, hvor vann med små plankton, detritus, bakterier og andre næringspartikler går inn

gjennom munnisfongen (innstrømningsrøret) øverst, og gjennom svelget til gjelletarmen (=gjellesekk). Gjelletarmen utgjør hovedmassen av de indre organene. Her fanges næringspartiklene opp av cilier (små, hurtigbevegende hår) og føres til magen gjennom ciliekledte renner. Vannet føres ut i gjellehulen og videre ut gjennom kappesifongen (utstrømningsrøret). I magen fordøyes næringspartiklene, og avfallsstoffer føres fra tarmen til anus og ut i gjellehulen. Derfra blir avfallsstoffene pumpet ut sammen med det filtrerte vannet ved at sjøpungen kontraherer kroppen^{24, 27}.

På grunn av dette filtersystemet, utsettes sjøpunger for store mengder mikroorganismer, hvor noen kan være patogene, og må derfor ha et effektivt immunforsvar. Da sjøpunger, i likhet med invertebrater, mangler et adaptivt (spesifikk) immunforsvar, har de et desto sterkere medfødt (uspesifikk) immunforsvar. Hovedcellene i dette immunforsvaret antas å være hemocytter, som er fagocytiske. Hemocytter er motile celler som fagocytterer mikrober og skiller ut antimikrobielle og cytotoxiske substanser til hemolymfen. Noen slike substanser er blitt isolert fra ulike arter sjøpung²⁸.

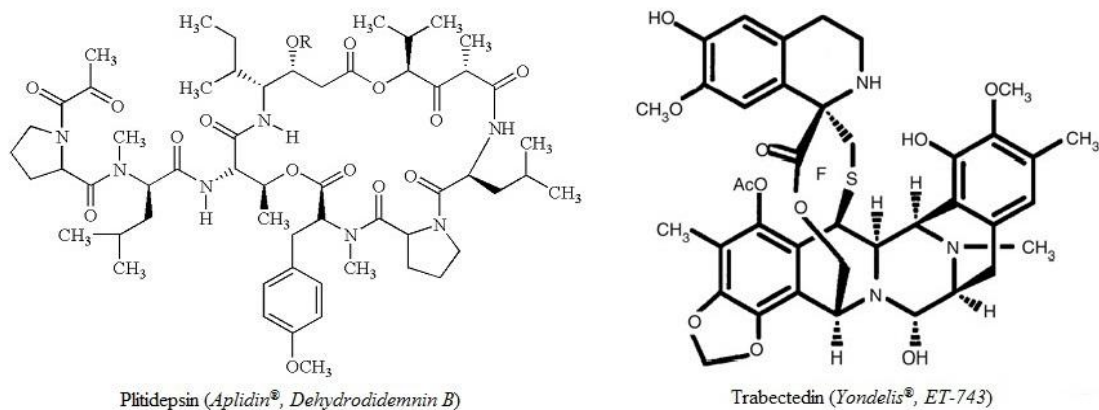
1.3.1 Sjøpung og antimikrobielle forbindelser

Sjøpung har en rekke fysiologiske og biologiske egenskaper som gjør dem interessante som kilde for studie av antimikrobielle forbindelser. I likhet med hai ser sjøpung ut til å mangle evnen til å danne kreftsvulster. Mange arter har også totalt fravær av biofouling (begroing av alger, bakterier og lignende), noe som kan indikere at de inneholder cytotoxiske og/eller antibakterielle forbindelser. På noen av artene som har biofouling er det funnet antivirale forbindelser²⁵.

Det er gjort mange studier på sekundære metabolitter fra sjøpung og en rekke nitrogenholdige forbindelser er isolert fra ulike arter. Disse forbindelsene kan stort sett deles i 2 store grupper; sykliske antimikrobielle peptider og alkaloider, hvorpå disse igjen kan deles inn i mange undergrupper. Mange av forbindelsene har vist god antimikrobiell aktivitet, og da særlig antibakteriell, anticancer, immunosuppressiv og antiviral aktivitet²⁵.[®]

Trabectedin (*Yondelis*[®]) og plitidepsin (*Aplidin*[®]) (Figur 4) er blant de mest kjente antimikrobielle forbindelser isolert fra sjøpung. Trabectedin (også kjent som ecteinascidin-743 eller ET-745) er isolert fra den karibiske sjøpungen *Ecteinascidia turbinata*. Trabectedin er et alkaloid, og er den første marine anticancer forbindelsen som er godkjent i EU til bruk

for pasienter med bløtvevsarkom og pasienter med tilbakefall av ovariecancer (eggstokkreft). Plitidepsin (også kjent som dehydrodidemnin B) er et depsipeptide isolert fra middelhavssjøpungen *Aplidium albicans*. Plitidepsin har vist lovende anticancer aktivitet og er for tiden under fase II kliniske studier (Tabell 1)^{23, 22}.



Figur 4. Strukturen på plitidepsin og trabectedin, opprinnelig isolert fra sjøpunger, henholdsvis *A. albicans* og *E. turbinata*. Strukturene er hentet fra Kornprobst *et al.* (2010)²².

1.3.2 Sjøpung av slekten *Synoicum*

Langs norskekysten er det registrert 75 forskjellige arter sjøpung²⁴. To av disse er artene *Synoicum turgens* og *Synoicum incrustatum*, og taksonomien til disse kommer frem i Tabell 2.

Tabell 2. Taksonomien til *S. turgens* og *S. incrustatum* angitt med vitenskapelige og norske navn.

Klassifisering	Vitenskapelige navn	Norske navn
Rike	Animalia	Dyreriket
Rekke	Chordata	Ryggstrengdyr
Underrekke	Tunicata	Kappedyr
Klasse	Asciacea	Sjøpunger
Order	Aplousobranchia	-----
Family	Polyclinidae	-----
Slekt	<i>Synoicum</i>	-----
Art	<i>Synoicum turgens</i>	-----
	<i>Synoicum incrustatum</i>	-----

1.3.2.1 *S. turgens* (Phipps, 1774)

Utbredelse: Arten har en utpreget arktisk utbredelse. I Norge finnes den kun ved kysten av Finnmark²⁴.

Beskrivelse: *S. turgens* er avbildet i Figur 5. Arten danner halvkuleformete kolonier med felles utstrømningsåpning og perifere innstrømningsrør. Koloniene er ikke dekket av sand, men har mange små tagglignende utskudd. Individene i kolonien kan bli opp til 4 cm lange²⁹.

Levested: Forekommer på grunt vann og ned til ca 250 m.



Figur 5. *S. turgens* samlet inn utenfor Bjørnøya (bildet er tatt av Bjørn Gulliksen).

Antimikrobiell aktivitet: *S. turgens* har blitt svært lite undersøkt for antimikrobiell aktivitet. Lippert og medarbeidere (2003)³⁰ har undersøkt flere subarktiske marine invertebrater, deriblant *S. turgens*, for antimikrobiell aktivitet. Invertebratene ble testet mot 5 bakteriestammer isolert fra marint miljø, og ingen av bakteriene lot seg hemme av råekstrakter fra *S. turgens*.

1.3.2.2 *S. incrustatum* (Sars, 1851)

Utbredelse: Vestkysten av de britiske øyer, helt opp til Nord-Irland³¹, og langs Nord-Norges kyst²⁹.

Beskrivelse: *S. incrustatum* er avbildet i Figur 6. Den danner halvkuleformete kolonier med felles utstrømningsåpning og perifere innstrømningsrør. Koloniene er som regel tett klynget sammen og dekker ca 6-10 cm av området de er festet til. Hvert hode fra zooidene (enkeltindividene) er 6-10 mm i diameter og tett dekket av sand både på siden og på overflaten. Zooidene i seg selv er fargeløse, men på grunn av sanden ser den generelle fargen ut til å være grå eller grå-brun³¹. Det er ikke lett skille zooidene fra hverandre, og hvert individ kan bli maks 5 cm høy²⁹.

Levested: *S. incrustatum* er vanlig å finne på vertikale fjellsider i utsatte områder, og opptrer ofte sammen med andre koloniale sjøpunger. Det kan se ut til at den foretrekker områder med sterke tidevannsstrømmer og med en viss mengde sand til stede³¹.



Figur 6. *S. incrustatum* samlet inn utenfor Bjørnøya (bildet er tatt av Bjørn Gulliksen).

Antimikrobiell aktivitet: Litteratursøk antyder at *S. incrustatum* ikke tidligere er blitt undersøkt for antimikrobiell aktivitet, eller at resultater ikke er publisert

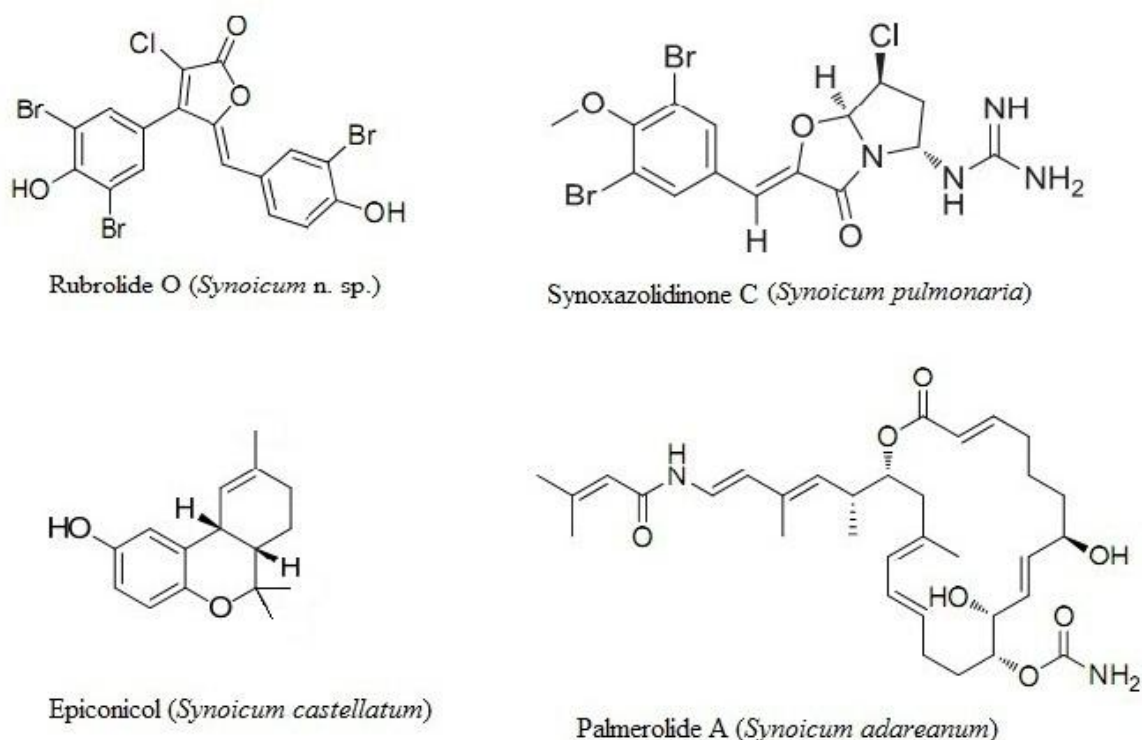
1.3.2.3 Bioaktive forbindelser fra andre *Syonicum*-arter

Sjøpunger av slekten *Syonicum* består utelukkende av kolonidannende dyr. Kappen hos *Syonicum*-arter inneholder ingen mineralspikler (nålliknende struktur), og i tillegg har kappen hos mange av artene overhodet ingen biofouling. Det har så langt blitt isolert 20 strukturer fra sjøpunger av slekten *Syonicum*, hvorav størsteparten av metabolittene er meroterpener, makrolider og halogenerte aromatiske derivater. Få alkaloider er isolert fra *Syonicum* sp., men det er derimot isolert veldig mange aromatiske derivater, hvorav flere av disse har vist antimikrobiell aktivitet (Figur 7)²⁵.

Mange *Syonicum*-arter har vist anticanceraktive forbindelser, noe som ofte er et resultat av at det er nettopp her fokuset på letingen har vært³²⁻³⁶. Eksempler på dette er epiconicol (Figur 7) isolert fra *Syonicum castellatum* og prunolidene A, B og C fra *Syonicum prunum*, hvor alle forbindelsene fra disse australske artene har vist noe cytotoxisk aktivitet^{32, 33}. Mer potent anticanceraktive forbindelser ble funnet i rubrolidene I, K, L og M fra den spanske sjøpungen *Syonicum blochmanni*, der alle forbindelsene viste høy aktivitet mot flere cancerceller³⁴. Fra den antarktiske sjøpungen *Syonicum adareanum*, 2 ecdysteroider (hyousterone A og C), abeohyousterone og palmerolide A (Figur 7) blitt isolert^{35, 36}. Abeohyousterone og hyousterone A og C har vist litt bioaktivitet mot ulike cancerceller, og det er blitt foreslått at hyousteronene i *S. adareanum* blir produsert av sjøpungen som et kjemisk forsvar mot krepsdyr³⁶. Palmoride A skiller seg fra andre anticancerforbindelser fra *Syonicum*-arter med at den er veldig cytotoxisk mot melanomceller og lite cytotoxisk mot andre celler³⁵. Selv om hovedfokuset har vært på anticanceraktive forbindelser i *Syonicum* arter, betyr det ikke at slekten er en dårlig kilde for andre bioaktive forbindelser.

Fra den indiske sjøpungen, *Syonicum macroglossum*, er tiruchanduramine blitt isolert. Denne forbindelsen har vist lovende α -glucosidase hemmende aktivitet, noe som utnyttes i anti-diabetes medisiner³⁷. Fra *Syonicum* n. sp., samlet ved New Zealand, har en anti-inflammatorisk forbindelse, E/Z-rubrolide O (Figur 7), blitt isolert³⁸. Få *Syonicum* arter fra kaldere strøk har blitt undersøkt for bioaktive forbindelser, men en subarktisk art, *Syonicum pulmonaria*, har vist både antibakteriell, antifungal og anticancer aktivitet. Av denne ble 3 alkaloider isolert, synoxazolidinones A, B og C, hvor synoxazolidinones A og B viste

antibakteriell og antifungal aktivitet, og synoxazolidone C (Figur 7) viste antibakteriell og anticancer aktivitet^{39, 40}.



Figur 7. Strukturer på antimikrobielle forbindelser funnet i ulike *Synoicum* slekter. Strukturene er hentet fra Perarce *et al.* (2007)³⁸, Tadesse *et al.* (2011)⁴⁰, Carroll *et al.* (1993)³² og Diyabalanage *et al.* (2006)³⁵.

1.4 Metodikk

1.4.1 Ekstraksjon av naturstoffene

I forkant av isolering og rensing av naturstoffer, må stoffene først ekstraheres fra det biologiske materialet. En metode for er å knuse materialet og ekstrahere med passende løsemiddel. Ved å sette ekstraktet til omrøring kan hastigheten på ekstraksjonsprosessen økes. Etter ekstraksjon separeres den biologiske massen som ikke lar seg løse opp, fra løsemiddelet. Det gjøres en grov rensing ved å helle løsningen over i ny beholder, som vanligvis blir fulgt opp av et filtreringssteg⁴¹.

1.4.2 Fast fase ekstraksjon

Fast fase ekstraksjon (SPE) er en kromatografisk metode som opprinnelig ble utviklet for anriking av biologiske og miljøbestemte prøver før videre analyse på mer konvensjonelle metoder som for eksempel høytrykks-væskekromatografi eller gasskromatografi⁴². Ved bruk

av denne metoden kan man få grovseparert forbindelser fra andre forbindelser i en løsning. Dette gjøres ved å bruke en stasjonær fase som de ønskede forbindelsene ”fester seg” til. Ved å endre polaritet i løsningsmiddelet, vil disse forbindelsene ”slippe taktet” og elueres ut. Fast fase ekstraksjon kan også benyttes for å fjerne urenheter eller uoppløselige forbindelser i prøver. Ekstraksjonsprinsippene brukt for å separere ved bruk av SPE benytter polar, ikke-polar, ionebytte- og kovalent interaksjon⁴³. Ved grovseparering av fraksjoner fra marine arter blir ofte SPE brukt for å separere forbindelser fra vannfasen basert på polaritet, samt vaske ut salter og andre hydrofile ”urenheter” som ikke blir ansett å være interessante⁴⁴⁻⁴⁸.

1.4.3 Antimikrobiell- og anticancertesting

Antimikrobiell- og anticancertesting gjør det mulig å lete etter forbindelser med aktivitet rettet mot de mikrobene/cancercellene som brukes i testene. Slike tester gir en god indikasjon på om et ekstrakt eller en forbindelse er verdt å gå videre med til ytterligere separasjon⁴⁹. Aktive fraksjoner renses ytterligere og testes på nytt for aktivitet. På denne måten kan en til slutt få en forbindelse, hvor et eller flere bioaktive molekyler kan identifiseres. Det er viktig å ha tilgjengelig materiale av alle fraksjoner fra hvert rensessteg fordi de kan testes for ny aktivitet, og sammenlignes med andre fraksjoner og stoffer renses i senere steg i prosessen⁵⁰.

1.4.4 Høytrykks-væskekromatografi (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

HPLC er en robust og rask teknikk som gjør det mulig å separere, identifisere og kvantifisere forbindelser. Ulike kromatografiske teknikker kan benyttes ved HPLC, alt etter hvilke kolonner, stasjonære faser og løsemidler som brukes til mobil fase, og derved bestemme separering av forbindelser i ekstrakter etter f.eks. polaritet, størrelse eller ladning⁵¹.

Omvendt fase høytrykks-væskekromatografi (RP-HPLC) blir ofte benyttet for å separere forbindelser fra marine organismer, med en stasjonær fase med C₁₈ karbonkjeder koblet til silika-partikler i kolonner kalt C₁₈-kolonner⁴⁴⁻⁴⁸. Betydningen av ”omvendt fase” er at den stasjonære fasen er mer upolar enn den mobile fasen, som er av polar karakter (inneholder vann). Dette fører til at polare stoffer elueres ut før mer upolare stoffer⁵¹.

1.4.5 Ultrafiolett-synlig (UV-vis) spektroskopi

UV-vis spektrofotometrisk detektor er ansett å være en universal detektor for et hvert LC system da den er lett anvendelig og meget sensitiv⁵⁰. Detektoren måler til enhver tid absorpsjon av ultrafiolett eller synlig lys. Photodiode array (PDA) detektor er en avansert form for UV-vis detektor og kan kobles til en HPLC teknikk kalt HPLC-PDA eller LC-PDA. Denne detektoren kan måle absorpsjonen på alle bølgelengder fra 200-600 nm, og stoffer som absorberes i dette området vil kunne detekteres selv i nanogram mengder. HPLC retensjonstiden og UV-vis spekteret kan være karakteristisk for enkelte komponenter⁵².

1.4.6 Massespektrometri (MS)

MS er en veldig sensitiv teknikk som gjør det mulig å identifisere molekylvekten på ukjente komponenter i en prøve. Den kan detektere selv mikrogram (μg) av komponentene. Dette gjøres ved at komponentene blir ionisert (spaltet) og masse-til-ladning (m/z) blir detektert på de gjenværende ioniserte delene. Komponenter som ikke kan ioniseres kan heller ikke detekteres⁵⁰. LC-MS eller HPLC-MS, som blir brukt i denne oppgaven, kombinerer to teknikker som gjør at komponenter først blir separert gjennom et HPLC system før et massespektrometer selektivt detekterer molekylenes identitet⁵².

1.5 Mål for oppgaven

Hovedmålet for denne oppgaven var å lete etter og påvise tilstedeværelsen av antibakterielle forbindelser først og fremst, men også anticancerforbindelser, i to subarktiske arter sjøpung: *S. turgens* og *S. incrustatum*.

Hypotesen var at det finnes slike aktive forbindelser i disse to artene, men at disse sannsynligvis er ulike da artene lever i ulike biotoper og har ulik grad av biofouling. For å teste hypotesen, ble følgende undermål definert;

- 1) Lage ekstrakter og isolere antibakterielle forbindelser fra aktive fraksjoner.
- 2) Se om antibakterielle forbindelser også viser aktivitet mot cancerceller.
- 3) Utføre innledende karakterisering av de aktive komponentene.

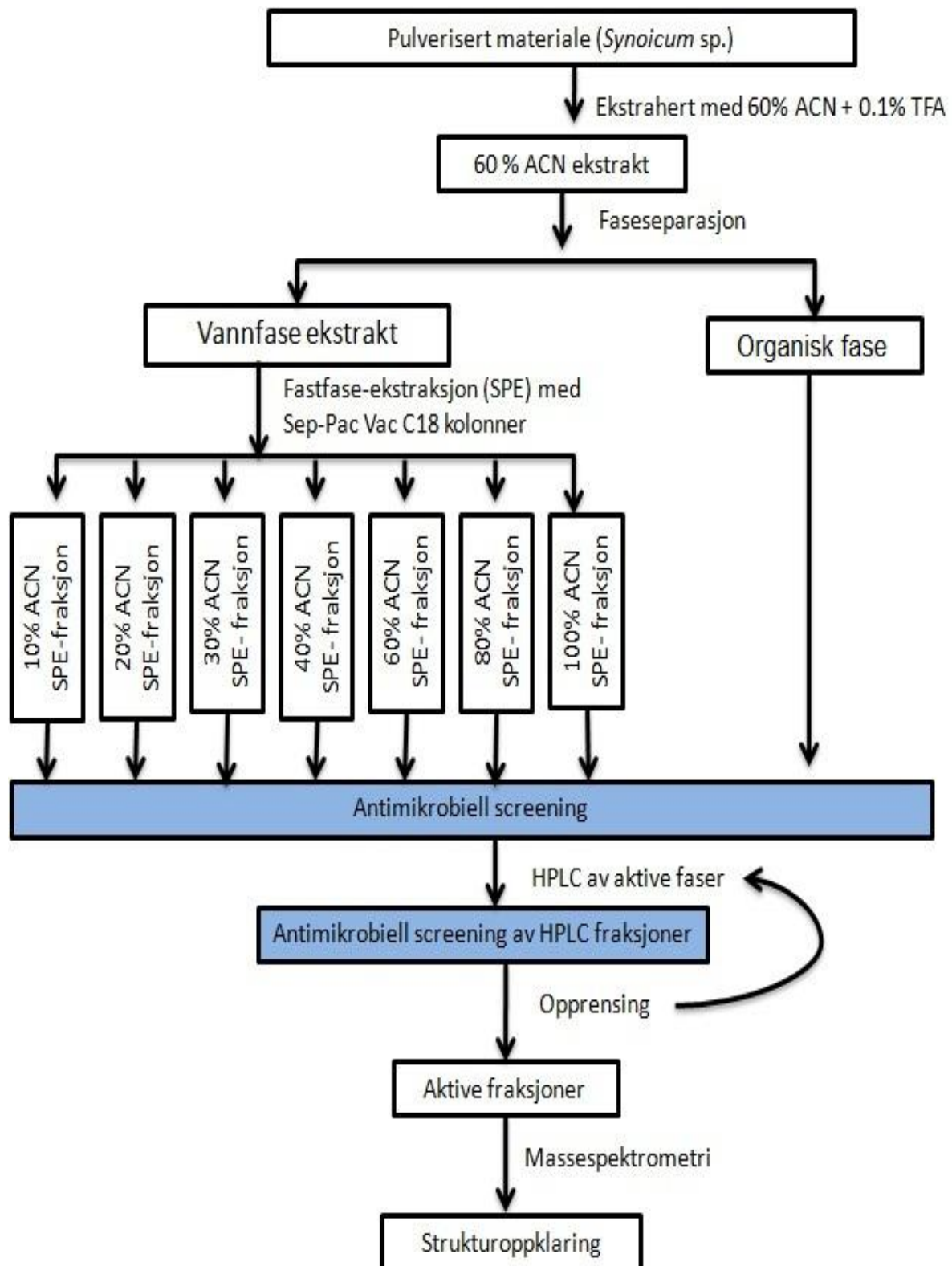
2. Materiale og metode

2.1 Kjemikalier og reagenser

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Trifluoreddiksyre	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
MilliQ-vann	Millipore Corp., MA, USA
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Mueller Hinton (MH) agar	Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA
Mueller Hinton (MH) Broth plater	2.1% MH-Broth og 2% Agar i MQ-H ₂ O

2.2 Metodeforløpet i denne oppgaven

Antimikrobielle forbindelser ble forsøkt ekstrahert fra *S. turgens* og *S. incrustatum* ved å bruke ekstraksjonsmetodene vist i Figur 8. De ulike fasene ble testet for antibakteriell aktivitet og separert ved bruk av RP-HPLC. HPLC fraksjonene ble så testet for aktivitet mot bakterier og cancerceller, hvorpå fraksjoner med aktivitet ble undersøkt med MS for å få en indikasjon på molekylmasse og renhet av fraksjonene.



Figur 8. Oversikt over alle metodestegene brukt i oppgaven.

2.3 Forsøksdyr, innsamling og lagring

Levende sjøpunger av arten *S. turgens* og *S. incrustatum* ble samlet inn fra Barentshavet, like utenfor Bjørnøya 18. mai, 2009 av Marbank. En batch med *S. turgens* (I) ble samlet av dykkere på 20 m dybde (74°28.872' N 01°844.404' E), og en annen batch av *S. turgens* (II) ble hentet på 47.18 m dybde (74°20.109' N 01°920.925' E) ved bruk av en Agassiz trål og en batch med *S. incrustatum* ble hentet på 34 m dybde (74°19.453' N 01°909.341' E) med Agassiz trål. Det taksonomiske arbeidet ble gjort av Robert Andre Johansen ved Marbank. Organismene ble mottatt frosne. Væske ble fjernet fra prøvematerialet ved bruk av en VirTis Genesis (SP Scientific, NY, USA) frysetørker. Etter frysetørking ble materialet lagret ved -20 °C fram til ekstraksjon ble foretatt.

2.4 Ekstraksjon

Det frysetørkede prøvematerialet (ca. 100 g av hver art) ble knust til pulver og ekstrahert med 5 volum (v/w tørrvekt) 60% (v/v) acetonitrile med 0.1% trifluoreddiksyre (TFA). Da det etter de to første ekstraheringene av *S. incrustatum* ble klart at en stor andel fra denne arten var sand, ble det tilsatt om lag 200 g til 5 volum (v/w tørrvekt) 60% (v/v) acetonitrile med 0.1% trifluoreddiksyre (TFA) ved de to neste ekstraksjonene. Blandingen ble satt til omrøring i over 24 timer ved 4 °C. Supernatanten ble overført til en ny kolbe og ekstraksjonen utført på ny på den gjenværende pelleten. Etter nye 24 timer ble all supernatant samlet i samme kolbe. Det resterende materialet ble samlet i falconrør, sentrifugert i en Multifuge 1S-R Heraeus (Thermo Electron Corporation, Tyskland) ved 3000 rpm i 6 min, supernatant samlet opp og pelleten kastet. Supernatanten fra begge ekstraksjonsrundene ble satt i fryser (-20 °C) i ca. 2 timer for å få faseskillelse. Væsken ble separert i en organisk fase (ACN-rik fase) og en vannfase (salt-rik fase), og overført til forhåndveide 50 ml falconrør. Organisk fase legger seg øverst og vannfasen legger seg nederst. Begge fasene ble vakuuminndampet i en Scanspeed 40 vakuumsentrifuge med en Cooling Trap kjølefelle (Scanvac AS, Danmark) og en Membran-Vakuumpumpe MD 4 (Vacuumbrand, Tyskland).

De inndampede prøvene ble veid og tørrstoffmengde beregnet. Vannfasen ble løst opp i 0.05% (v/v) TFA til en konsentrasjon på 100 mg/ml og videre fraksjonert ved fast fase ekstraksjon. Organisk fase ble frosset ned fram til antibakteriell testing.

2.5 Fast fase ekstraksjon ("Solid phase extraction"; SPE)

Vannfasen ble fjernet for salt ved bruk av SPE. Til dette ble det brukt Sep-Pac Vac 35cc (10g) C18 SPE-kolonner (Waters, Irland) koblet til vakuu. Før vannfasen ble tilsatt ble kolonnene kondisjonert med 30 ml ren ACN og ekvilibrert med 30 ml 0.05% TFA. Etter at vannfasen var tilsatt ble materialet som ikke holdes igjen i kolonnene vasket ut med 50 ml 0.05% TFA. Materialet som ble holdt igjen i kolonnene ble stegvis eluert med (30 ml av hver): 10, 20, 30, 40, 60, 80 og 100% ACN med 0.05% TFA. De ulike SPE eluatene ble vakuuminndampet, tørrstoffmengde beregnet og løst opp i MQ-vann (100 mg/ml). Eluatene ble lagret ved 4 °C fram til antibakteriell testing.

2.6 Bakteriedyrking

Bakteriene som ble brukt til antibakteriell testing var 3 Gram-negative stammer; *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) og *Listonella anguillarum* (AL 104), og 2 Gram-positive stammer; *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) og *Staphylococcus aureus* (ACC 9144). Alle isolatene ble dyrket på Mueller Hinton agar plater ved romtemperatur.

Dagen før antibakteriell testing ble 2 bakteriekolonier fra hvert isolat tilført reagensrør med 5 ml MH-Broth medium (2.1% i dH₂O) og satt til risting over natten i romtemperatur. Dagen etter ble 20 µl av bakterieløsningene tilført nye rør med 5 ml MH-Broth medium og satt til risting ved romtemperatur i ca. 2 timer. For å finne bakterietettheten på bakterieløsningene ble absorbansverdiene (ved 600 nm) lest av på en BioMate 3 Spectrophotometer (Thermo, USA). Bakterieløsningen ble ut fra absorbansverdiene fortynnet til en konsentrasjon på 2.5-3 x 10⁴ ml⁻¹ celler i rør med 10 ml MH-Broth medium.

2.7 Antibakteriell testing

Antibakteriell testing ble foretatt på 10, 20, 30, 40 og 60% SPE eluat og på organisk fase fra både *S. turgens* og *S. incrustatum*. På grunn av mangel på tørrstoff fra 80 og 100% SPE, ble disse ikke testet. Ekstraktene som skulle testes ble fortynnet i MQ-vann til en konsentrasjon på 20 mg/ml. På 96 well Nunc-plater ble det gjort tofolds fortynningsrekker på hvert ekstrakt og hver fortynning inneholdt 50 µl væske. Fraksjonene ble inkubert sammen med 50 µl bakteriesuspensjon fra bakteriedyrkingen, noe som gjorde at konsentrasjonen på ekstraktene ble 10, 5, 2.5, 1.25 og 0.63 mg/ml. MQ-vann ble brukt som negativ vekstkontroll og

oxytetracycline 160 μM som positiv kontroll på vekstinnhibering. Fra kontrollene ble 50 μl inkubert sammen med 50 μl bakteriesuspensjon. Før avlesing ble platene dekket med Nunc forseglingsstape og det ble stukket hull over hver brønn for å unngå kondens. Antibakteriell aktivitet ble registrert ved bruk av en Perkin Elmer Envision 2103 Multilable Reader (Turku, Finland) over 24 timer ved 35 °C. Maskinen ristet prøvene før hver avlesning og absorbansen ble registrert ved 595 nm hver time. Programmet som ble brukt het Wallac Envision Manager, v 1.12. Ekstraktene ble sammenlignet med kontrollene for å avgjøre hemmingsgrad.

Antibakteriell testing av HPLC fraksjoner ble utført på stort sett samme måte som SPE eluatene, bare at det ikke ble gjort noen fortyninger. En alikvot på 50 μl av hver HPLC fraksjon ble blandet med 50 μl bakteriesuspensjon fra bakteriedyrkingen. Aktive fraksjoner ble ytterlig separert med bruk av RP-HPLC, retestet for antibakteriell aktivitet og undersøkt med bruk av LC-MS.

2.8 Anticancertesting

Anticancertesting ble foretatt på 10, 20, 30 og 40% SPE eluater og organisk fase fra *S. turgens* (I) og *S. incrustatum*, samt på utvalgte HPLC fraksjoner fra 10, 20 og 30% SPE *S. incrustatum* og fra 40% SPE fra *S. turgens* (I). HPLC fraksjoner som ble valgt til anticancertesting var de med størst topper, samt topper som viste aktivitet under antibakteriell testing. Til APGene 96 dypbrønnsplater med U-bunn ble 600 μl av prøvene tilsatt. Det ble gjort tofolds fortyningsrekker på SPE eluatene og organisk fase. Når cellene ble tilsatt utgjorde fortyningsserien 100, 50, 25, 10 $\mu\text{g/ml}$. Ingen fortykning ble gjort på HPLC fraksjonene.

Prøvene ble sendt til Marbio for testing av anticanceraktivitet. Cancercellene som ble brukt til anticancertesting var A2058 melanomceller og vanlige celler brukt som kontroll, var MRC5 lungefibroblaster.

2.9 Separasjon ved bruk av Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Aktive SPE eluater, 10, 20, 30, 40 og 60% fra *S. turgens* (I), *S. incrustatum*, og 40% SPE eluat fra *S. turgens* (II), ble separert med RP-HPLC. HPLC-systemet som ble brukt er produsert av Waters (Waters Associates, Millipore Corp., MA, USA). Det består av en

Sunfire Prep C18 kolonne (5 µm; 10 x 250 mm), 717 autosampler, 600 E pumpe, 2996 PDA detektor og databehandlingsprogrammet Millennium v 4.00. Detektoren ble programmert til å registrere absorbansen mellom 200-600 nm. Injeksjonsvolumet varierte mellom 200 og 600 µl, alt etter hvor mye stoff som var tilgjengelig fra de ulike eluatene. Mobilfasen besto av A) 0.05% TFA og B) ACN + 0.05% TFA, og ble pumpet igjennom kolonnen med en flow på 4 ml/min. Ulike gradienter ble kjørt over 50-60 min og varierte mellom SPE eluatene (se Tabell 3).

Tabell 3. Gradientene som ble brukt under RP-HPLC til de ulike SPE eluatene.

Organisme	SPE eluat	Gradient
<i>S. turgens</i> (I)	10%	Lineær gradient 0-20% ACN over 50 min
	20%	Lineær gradient 0-40% ACN over 60 min
	30%	Lineær gradient 0-40% ACN over 60 min
	40%	Lineær gradient 0-60% ACN over 60 min
	60%	Lineær gradient 0-60% ACN over 60 min
<i>S. incrustatum</i>	10%	Lineær gradient 0-20% ACN over 50 min
	20%	Lineær gradient 0-20% ACN over 50 min
	30%	Lineær gradient 0-40% ACN over 60 min
	40%	Lineær gradient 0-40% ACN over 60 min
	60%	Lineær gradient 0-60% ACN over 60 min
<i>S. turgens</i> (I)	Re-kromatografi av aktive fraksjoner fra 40%	20% ACN isokratisk i 20 min og lineær gradient 20-40% ACN over 40 min

Fraksjoner (4 ml) ble samlet i rør per minutt med en Gilson FC 204 fraksjonssamler (Gilson, WI, USA). Ut fra kromatogrammet ble det vurdert hvilke fraksjoner som var aktuelle for videre analyser. De aktuelle fraksjonene ble inndampet i vakuumsentrifuge og etterpå tilsatt MQ-vann før antibakteriell testing.

2.9.1 Rensing av aktive fraksjoner

Fraksjoner som viste aktivitet ble forsøkt opprenset. Dette ble gjort ved å kjøre ny RP-HPLC gjentatte ganger på SPE eluatene og samle opp de aktuelle toppene for hand. Disse ble kjørt på samme måte som under separasjonsprosessen, men med en modifisert gradient (se Tabell 3). De opprensede fraksjonene ble inndampet, tilsatt MQ-vann og testet på nytt for antibakteriell aktivitet. Aktive fraksjoner ble underøkt med LC-MS og ytterligere separert ved

å kjøre ny RP-HPLC. De oppsamlede toppene ble inndampet, tilsatt MQ-vann, undersøkt med LC-MS og re-testet for antibakteriell aktivitet.

2.10 Massespektrometri (MS)

2.10.1 Væskekromatografi-massespektrometri (LC-MS)

LC-MS ble innledningsvis kjørt på 10, 20, 30, 40 og 60% SPE eluatene fra *S. turgens* og *S. incrustatum* for å få et overblikk over hvilke stoffer som befant seg i de ulike eluatene, og for å bestemme egnede HPLC-gradienter. LC-MS av HPLC fraksjoner ble videre utført for å vurdere molekylmasse og renhet i prøvene.

SPE eluatene og HPLC fraksjonene ble analysert ved bruk av LC-MS i positiv mode (deteksjon av positive ioner). MS-systemet som ble brukt er produsert av Waters (Waters Associates, Millipore Corp., MA, USA). Det består av en Waters 2990 separation module med en C18 kolonne (Sunfire 2.1 x 100 mm) og Waters Micromass ZQ analysator med Masslynx v 4.1 programvare. Betingelsene brukt under LC-MS er oppsummert i Tabell 4.

Tabell 4. Betingelsene brukt under analyse av prøvene ved bruk av Quattro LC quadropole mass spectrometry

Betingelser	LC-MS-ESI-Q
ESI mode	ESI +
Solvent	5% ACN i MilliQ-vann med 0.1% TFA
Flow	0.1 ml/min
Desolvation gas	Nitrogen
Capillary (k/V)	3.5
Cone (V)	30
Temperature source (°C)	110
Temperature desolvation (°C)	350
Cone gas flow (L/hr)	60
Desolvation gas flow (L/hr)	120

2.10.2 Høyoppløselig MS

Fraksjonene som så ut til å være renest etter analyse med LC-MS, ble sendt til Smallstruct for videre analyse med høyoppløselig MS.

3. Resultater

3.1 Utbytte av ekstraksjon

Tabell 5 viser mengde tørrstoff som ble gjenvunnet fra vannfase og organisk fase etter løsemiddelekstraksjonen (60% ACN med 0.1% TFA) og mengde tørrstoff gjenvunnet i de ulike SPE eluatene etter fast fase ekstraksjon av *S. turgens* (I og II) og *S. incrustatum*. Utbyttet etter ekstraksjon var generelt større for *S. turgens* (I og II) enn for *S. incrustatum*. Det var små forskjeller i utbytte mellom de 2 *S. turgens*-prøvene.

Tabell 5. Oversikt over gjennomsnittlig tørrstoffmengde gjenvunnet i vannfase, SPE eluat og organisk fase fra startmaterialet fra *S. turgens* (I og II) og *S. incrustatum*.

Art	Materiale	Tørrstoff (gram)	Gjenvunnet Materiale (%)
<i>S. turgens</i> (I)	Materiale før ekstraksjon	100.000	100.00
	Vannfase før SPE	24.499	24.50
	10% SPE	0.480	0.48
	20% SPE	0.137	0.14
	30% SPE	0.167	0.17
	40% SPE	0.102	0.10
	60% SPE	0.043	0.04
	80% SPE	0.023	0.02
	100% SPE	0.003	0.00
	Organisk fase	1.363	1.36
<i>S. turgens</i> (II)	Materiale før ekstraksjon	100.000	100.00
	Vannfase før SPE	33.385	33.39
	10% SPE	0.346	0.35
	20% SPE	0.114	0.11
	30% SPE	0.189	0.19
	40% SPE	0.148	0.15
	60% SPE	0.072	0.07
	80% SPE	0.043	0.04
	100% SPE	0.000	0.00
	Organisk fase	1.049	1.05
<i>S. incrustatum</i>	Materiale før ekstraksjon	150.000	100.00
	Vannfase før SPE	6.711	4.47
	10% SPE	0.071	0.05
	20% SPE	0.020	0.01
	30% SPE	0.014	0.01
	40% SPE	0.017	0.01
	60% SPE	0.015	0.01
	80% SPE	0.006	0.00
	100% SPE	0.005	0.00
	Organisk fase	0.439	0.29

3.2 Antibakteriell aktivitet i ekstrakter

3.2.1 Antibakteriell aktivitet i SPE eluater og organiske faser

SPE eluater og organiske faser ble testet mot *L. anguillarum*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. glutamicum* og *S. aureus*, hvorav de 3 første er Gram-negative bakterier og de 2 siste er Gram-positive bakterier. Det ble registrert aktivitet mot alle bakteriene i nesten samtlige SPE eluat og organiske faser fra begge *S. turgens*-prøvene og *S. incrustatum* (Tabell 6). På grunn av tekniske feil med Perkin Elmer Envision 2103 Multilable Reader under avlesningen, måtte samtlige tester for antibakteriell aktivitet avleses manuelt etter 72 timer. Hemmingsgrad ble vurdert ut fra kontrollene.

Alle SPE eluatene fra *S. turgens* (I og II) og 4 av SPE eluatene fra *S. incrustatum* viste aktivitet mot samtlige Gram-negative bakterier de ble testet mot. De organiske fasene fra *S. turgens* (I) og *S. incrustatum* viste kun aktivitet mot *L. anguillarum*. Det samme gjorde 60% SPE eluat fra *S. incrustatum*. *L. anguillarum* var mye mer følsom enn de to andre Gram-negative bakteriene, og mange fraksjoner viste aktivitet helt ned til 0.63 mg/ml, som var den laveste konsentrasjonen som ble testet. Alle SPE eluat ekstraktert fra både *S. turgens* (I og II) og *S. incrustatum* viste aktivitet mot samtlige Gram-positive bakterier. Generelt var *C. glutamicum* en del mer følsom enn *S. aureus* overfor de ulike prøvene. De organiske fasene fra *S. turgens* (I) og *S. incrustatum* viste også aktivitet mot de Gram-positive bakteriene (Tabell 6).

Tabell 6. Antibakteriell aktivitet i SPE eluater og organiske faser (alle oppløst i MQ-vann til 100 mg/ml) fra *S. turgens* (I og II) og *S. incrustatum*.

Art	Fraksjon	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)				
		<i>L. a.</i>	<i>E. c.</i>	<i>P. a.</i>	<i>C. g.</i>	<i>S. a.</i>
<i>S. turgens</i> (I)	10% SPE	1.25	10	5	1.25	10
	20% SPE	0.63	5	2.5	0.63	2.5
	30% SPE	2.5	5	2.5	1.25	5
	40% SPE	0.63	5	2.5	0.63	2.5
	60% SPE	0.63	10	2.5	0.63	10
	Organisk fase	2.5	-	-	1.25	10
<i>S. turgens</i> (II)	10% SPE	it	10	5	2.5	5
	20% SPE	it	10	5	0.63	2.5
	30% SPE	it	10	0.63	0.63	2.5
	40% SPE	it	5	0.63	0.63	2.5
	60% SPE	it	10	5	1.25	10
	Organisk fase	it	it	it	it	it
<i>S. incrustatum</i>	10% SPE	1.25	10	10	2.5	10
	20% SPE	0.63	10	5	2.5	2.5
	30% SPE	0.63	5	10	2.5	2.5
	40% SPE	0.63	10	10	5	10
	60% SPE	0.63	-	-	2.5	10
	Organisk fase	0.63	-	-	10	10

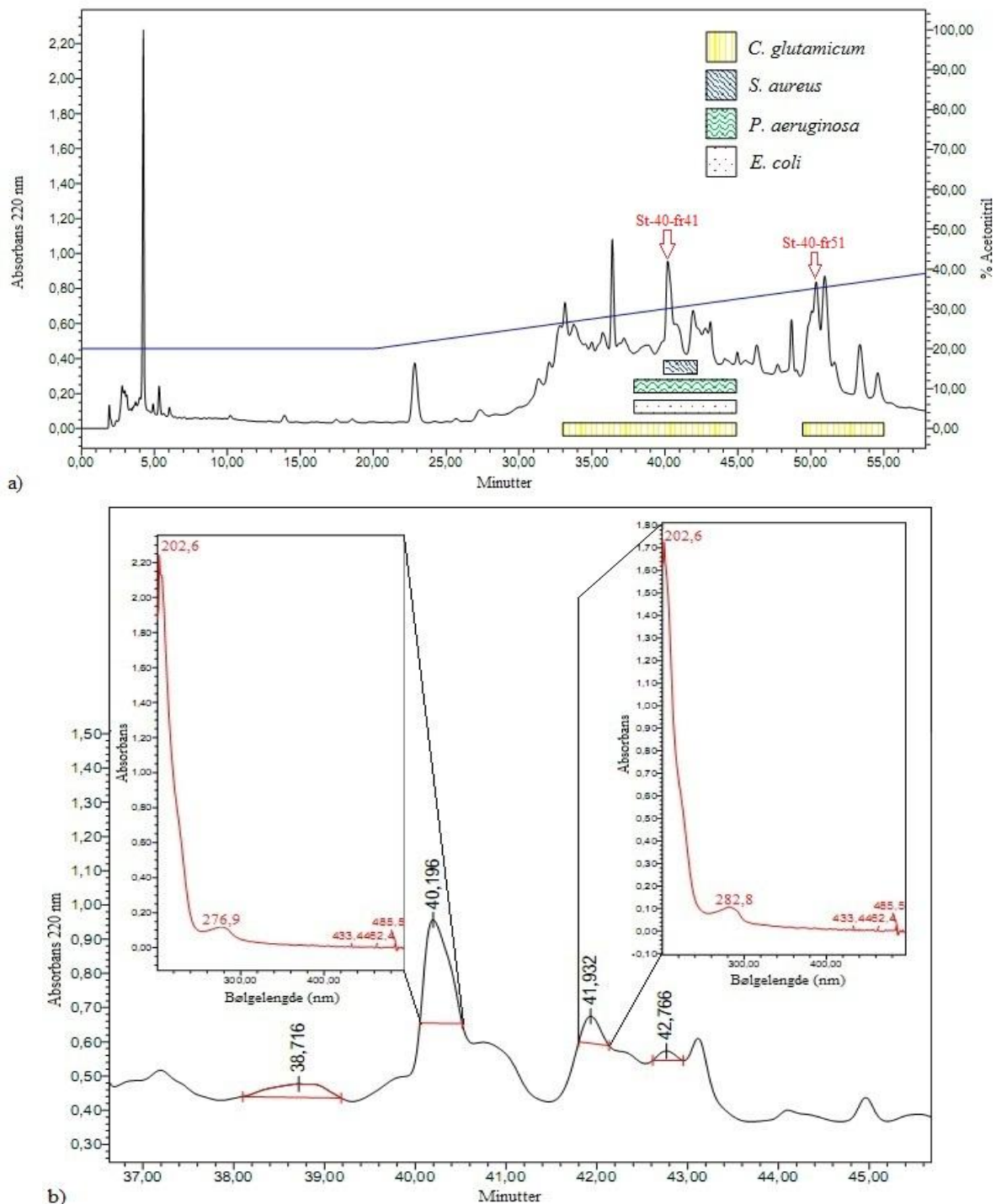
Forkortelser: -, Ingen aktivitet. it, ikke testet.

3.2.2 Antibakteriell aktivitet i HPLC fraksjoner

Alle 10, 20, 30, 40 og 60% SPE eluatene fra *S. turgens* (I) og *S. incrustatum* ble fraksjonert ved hjelp av RP-HPLC. Fraksjonene ble samlet hvert minutt med en fraksjonssamler og testet for aktivitet mot de samme bakteriene som SPE eluatene og organiske faser ble testet mot. På grunn av problemer i forbindelse med oppdyrkingen av *L. anguillarum*, ble denne bakterien utelatt videre i testing av HPLC fraksjoner.

Ingen av HPLC fraksjonene fra *S. incrustatum* viste aktivitet mot noen av bakteriene. Fra *S. turgens* (I) viste ingen av HPLC fraksjonene fra 10, 20, 30 og 60% SPE aktivitet mot noen av bakteriestammene. I HPLC fraksjonene fra 40% SPE derimot, var det noen fraksjoner som viste aktivitet mot samtlige bakterier. Siden HPLC fraksjoner fra 40% SPE av *S. turgens* var de eneste som viste aktivitet, valgte jeg å gå videre med dette SPE eluatet for å prøve å isolere de aktive komponentene. Fra *S. turgens* (II) ble det kun kjørt HPLC på 40% SPE for se om

den viste like mye aktivitet som *S. turgens* (I). Disse HPLC fraksjonene ble bare testet mot *P. aeruginosa* og *E. coli*. Mange av fraksjonene fra *S. turgens* (II) viste aktivitet mot bakteriene, men flere fraksjoner fra *S. turgens* (I) var aktive.



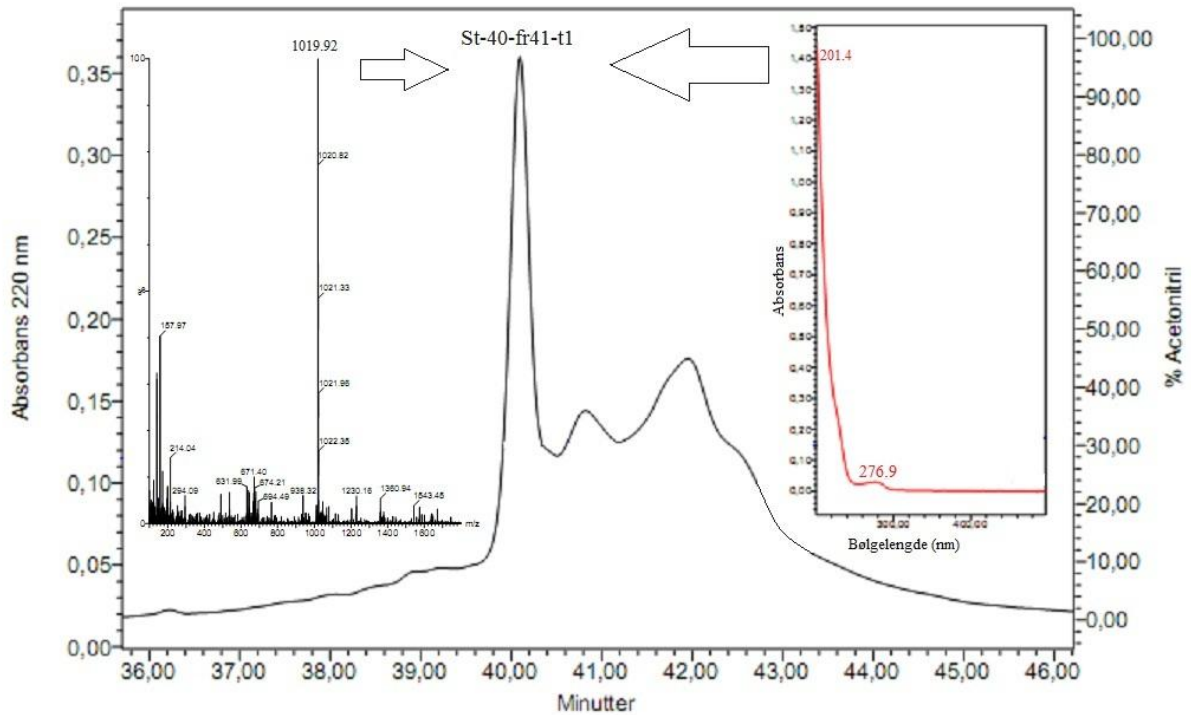
Figur 9. a) Kromatogrammet (ved 220 nm) viser hvilke RP-HPLC fraksjoner fra *S. turgens* (I) 40% SPE eluat som er aktiv mot de ulike bakteriene. Den blå linjen viser ACN konsentrasjonen i mobilfasen i forhold til tiden. Det ble under analysen kjørt 20% ACN isokratisert i 20 min, etterfulgt av en lineær gradient på 20-40% over 40 min. St-40-fr41 står for *S. turgens*-40% eluat-fraksjon 41. Det samme gjelder for St-40-fr51, bare at det er fraksjon 51. b) Utsnitt av kromatogrammet med UV-spekteret til de to toppene som hemmet bakterievekst av samtlige bakterier de ble testet for.

Fra 40% SPE av *S. turgens* (I) ble det kjørt ny RP-HPLC og alle toppene fra kromatogrammet (Figur 9a) ble samlet opp for hand og på nytt testet for antibakteriell aktivitet. Figur 9a viser hvilke HPLC fraksjoner som er aktive mot de ulike bakteriene og ved hvilken ACN gradient de ble eluert ut ved. *C. glutamicum* var mest sensitiv mot de oppsamlede HPLC fraksjonene (toppene), mens den andre Gram-positive bakterien, *S. aureus*, bare var aktiv mot to av fraksjonene. Begge Gram-negative bakterier (*P. aeruginosa* og *E. coli*) var sensitive overfor de samme HPLC fraksjonene. Alle HPLC fraksjonene ble undersøkt med MS, hvor de fleste fraksjonene så ut til å være noe uren, og et nytt rensesteg var nødvendig.

Figur 9b viser et utsnitt av det området fra kromatogrammet i Figur 9a med mest aktivitet, og et utsnitt av UV-spekteret til de to fraksjonene (toppene) som hemmet alle de testede bakteriestammene. Begge toppene i kromatogrammet viser et noenlunde likt UV-spekter, med en peak på 202.6 nm og en mindre peak rundt 280 nm.

3.3 Isolering og innledende karakterisering av aktive komponenter

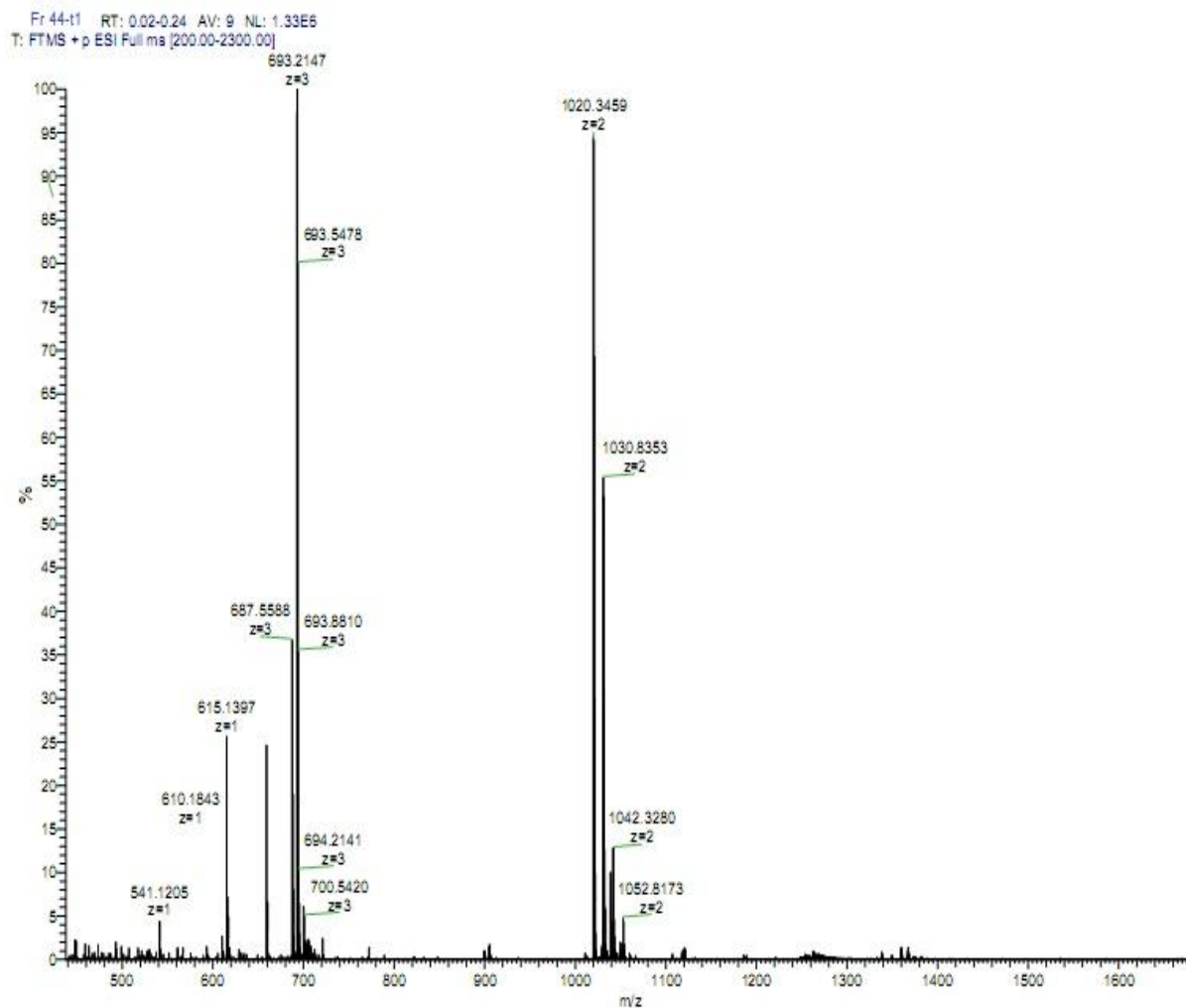
For å få separert de aktive fraksjonene fra *S. turgens* (I) 40% SPE ytterligere, ble ny RP-HPLC kjørt på SPE eluatet og fraksjonene samlet opp med fraksjonssamler. Fra fraksjonene samlet opp i området som har vist aktivitet tidligere (Figur 9a), ble det kjørt ytterligere en runde RP-HPLC på hver HPLC fraksjon. Toppene (fraksjonene) ble samlet opp for hand og testet for aktivitet mot *C. glutamicum*. De mest aktive fraksjonene ble undersøkt med LC-MS, hvor fraksjon St-40-fr41-t1 og fraksjon St-40-fr51-t2 så ut til være de reneste forbindelsene. Disse ble undersøkt med høyoppløselig MS for mer nøyaktige verdier.



Figur 10. Kromatogrammet viser de opprensede toppene (fraksjonene) fra RP-HPLC av fraksjon 44 fra *S. turgens* 40% SPE, samt UV-spekteret og LC-MS spekteret til topp St-40-fr41-t1. Alle de 3 toppene i kromatogrammet var aktive mot *C. glutamicum*. Den største toppen, St-40-fr41-t1, ble analysert med MS.

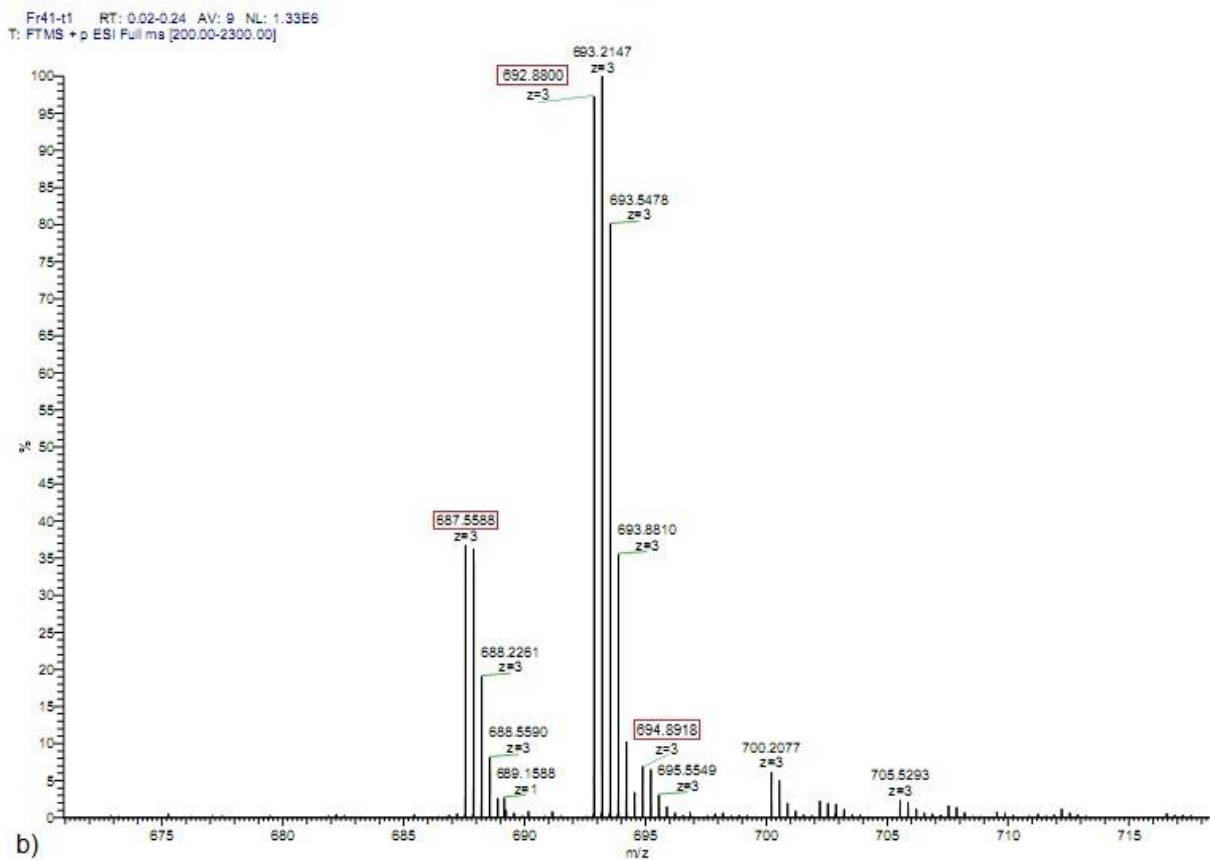
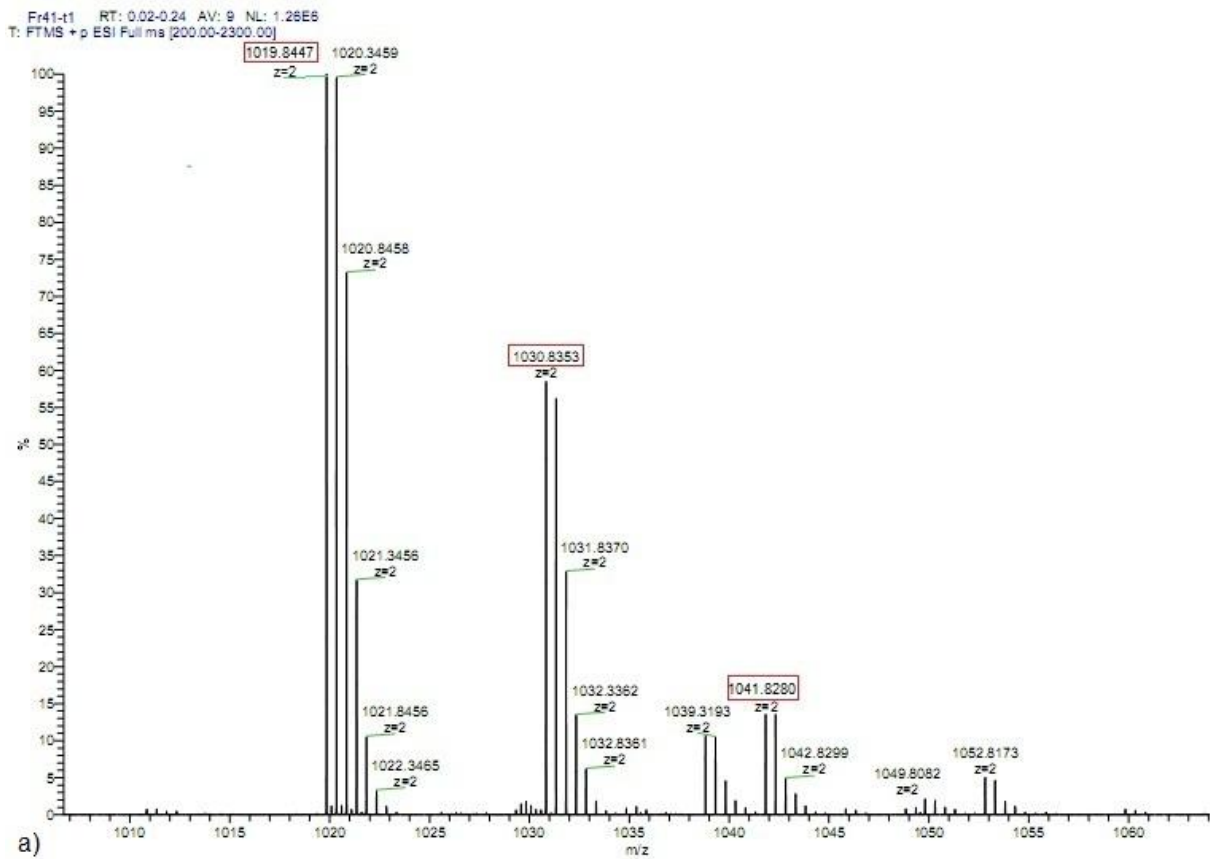
Figur 10 viser et utsnitt av kromatogrammet og toppene samlet opp fra RP-HPLC av fraksjon 44 (samlet opp mellom 43 og 44 min) fra forrige kjøring. Utsnittet av UV-spekteret med en peak på 201.4 nm og en liten peak på 276.9 nm, sammen med MS spekteret og den karakteristiske m/z -verdien på 1019.92, indikerer at fraksjon St-40-fr41-t1 er en opprenset forbindelse fra St-40-fr41 (Figur 9a), derav navnet (t1 står for topp 1). Av alle opprensede HPLC fraksjoner, analysert med LC-MS, var det kun St-40-fr41-t1 som hadde en m/z -verdi på 1019.92. Den samme m/z -verdi funnet ved LC-MS av rent 40% SPE eluat fra *S. turgens* (I) og ved LC-MS av St-40-fr41.

St-40-fr41-t1 ble undersøkt med høyopløselig MS, hvor mer nøyaktige verdier ble presentert enn under LC-MS. Her var det to m/z verdier som skilte seg ut, med m/z på 1120.3459 og 693.2147 (Figur 11). Den ene m/z verdien på 1120.3459 er den samme som under LS-MS ble registrert til å være 1019.92. Den andre m/z verdien på 693.2147 vises bare som støy ved LC-MS (Figur 10).



Figur 11. Høyopløselig MS spekter (ESI+) av St-40-fr41-t1.

De to store m/z verdiene på 1120.3459 og 693.2147 ble zoomet inn på for å se på m/z verdiene rundt disse. Figur 12a viser et utsnitt av m/z verdien på 1120.3459 og Figur 12b viser et utsnitt av m/z verdien på 693.2147. Ut fra disse spektrene kan man beregne størrelsen på molekylene, og hvilke sammensetning de ulike ionene har. m/z verdiene som var enklest å indikere noe ut fra er markert i spektrene i Figur 12 a og b.



Figur 12. a) Utsnitt av av m/z verdien på 1120.3459 fra Figur 11. b) Utsnitt av m/z verdien på 693.2147 fra Figur 11. Fra de markerte verdiene ble molekylmassen og sammensetningen av de ulike ionene beregnet.

Tabell 7 viser massene som er blitt kalkulert ut fra m/z verdien og ladningene på de markerte ionene fra Figur 12. Ved å trekke fra protonene og adduktene som er bundet til molekylene under sammensetning, kan masse på molekylene beregnes. Et gjennomsnitt av de 3 molekylmassen med $z=2$ og $z=4$, indikerer at massene på molekylene er ca. 2036 Da og 2035 Da.

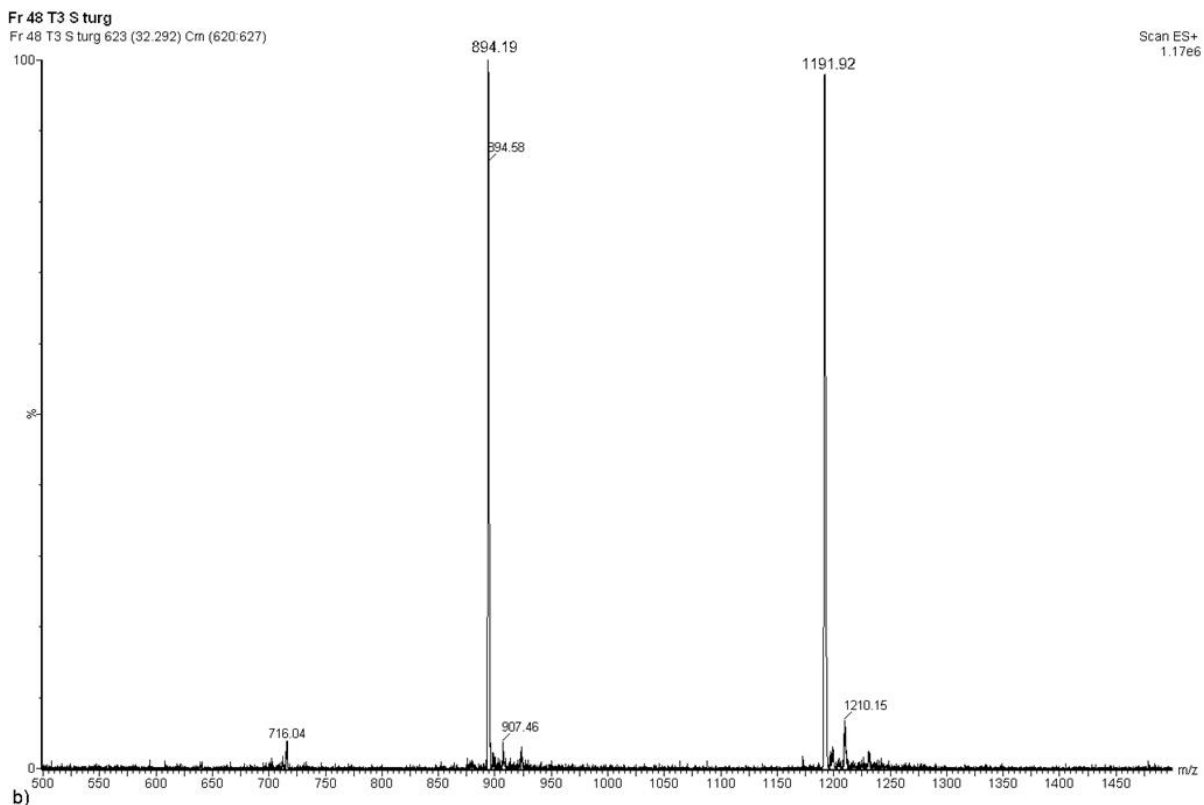
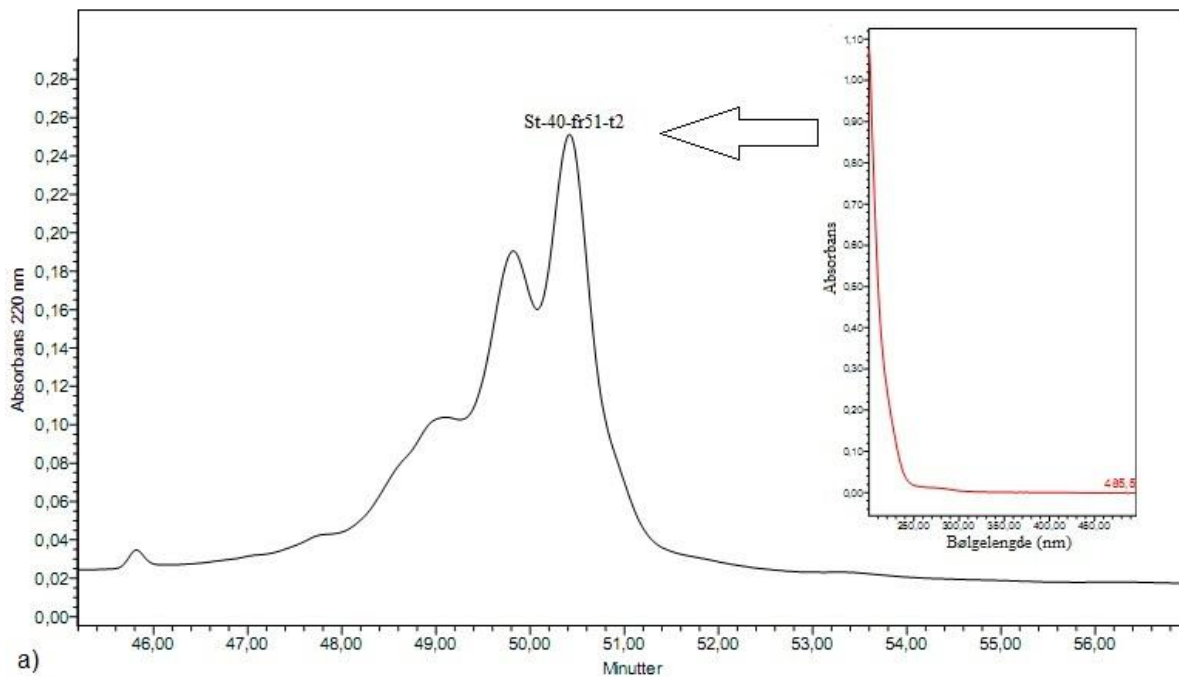
Tabell 7. Kalkulert masse og foreslått sammensetning på de markerte ionene i Figur 12 a og b, beregnet ut fra m/z verdi og ladning.

Ladning (#z)	Masse/ladning(m/z)	Kalkulert masse	Sammensetning
2	1019.8447	2037.67	M+2H
2	1030.8353	2059.65	M+H+Na
2	1041.828	2081.64	M+2Na
3	687.5588	2059.65	M+2H+Na
3	692.8800	2075.62	M+2H+K
3	694.8918	2081.64	M+H+2Na

M = molekylet, H = hydrogen, Na = natrium, K = kalium

Figur 13a viser et utsnitt av kromatogrammet og toppene samlet opp fra RP-HPLC av fraksjon 48 (samlet opp mellom 47 og 48 min) fra forrige kjøring, samt et utsnitt av UV-spekteret til fraksjon St-40-fr51-t2. UV-spekteret viser ingen synlige topper. Figur 13b viser LC-MS spekteret til fraksjon St-40-fr51-t2, hvor 2 m/z -verdier på henholdsvis 894.19 og 1191.92 skilte seg ut. Ut fra sammenligning av LC-MS spekter og UV-spekter tyder det på at St-40-fr51-t2 er en opprenset forbindelse fra St-40-fr51 (Figur 9a), derav navnet (t2 står for topp 2).

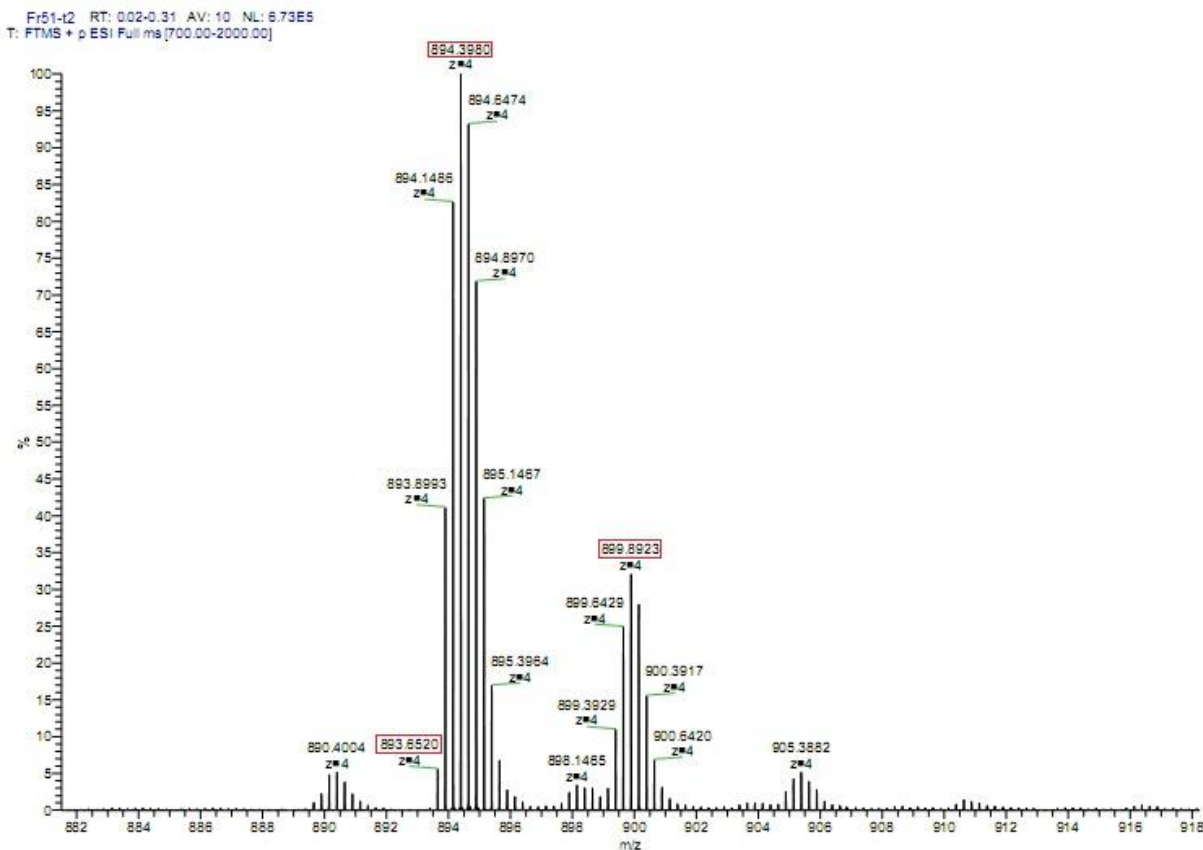
De 2 m/z -verdiene på 894.19 og 1191.92, var også å finne i 2 andre fraksjoner fra RP-HPLC av HPLC. Disse ble eluert ut like etter fraksjon 48 (fraksjon 49 og fraksjon 50), men St-40-fr51-t2 så ut til å være renere ved LC-MS, og derfor brukt i videre analyser.



Figur 13. a) Kromatogrammet viser de 2 opprensede toppene (fraksjonene) fra RP-HPLC av fraksjon 48 fra *S. turgens* 40% SPE, samt UV-spekteret til topp St-40-fr51-t2. Begge toppene i kromatogrammet var aktive mot *C. glutamicum*. Den største toppen, St-40-fr51-t2, ble analysert med MS. b) LC-MS spekter (ES+) av topp 3 fra RP-HPLC fraksjon ved 48 min. To topper med m/z på 894.19 og 1191.92 skilte seg ut på LC-MS spekteret.

Det ble kjørt høyopløselig MS på fraksjon St-40-fr51-t2 og mer nøyaktige verdier ble beregnet, en m/z verdi på 1189.1989 som tilsvarer $[M+3H]^{3+}$ og en m/z verdi på 894.3980 som

tilsvarende $[M+4H]^{4+}$. Dette er de samme verdiene som i Figur 13b ble registrert med en m/z på 894.19 og 1191.92. Få av spektrene fra høyoppløselig MS ga ikke klare indikasjoner på størrelsen på molekylene, og hvilke sammensetning de ulike ionene har. Ved å zoome inn m/z verdi 894.3980, var det noen av m/z verdiene som kunne gi indikasjoner på dette (Figur 14).



Figur 14. Utsnitt av m/z verdien på 894.3459 fra høyoppløselig MS. Fra de markerte verdiene ble molekylmassen og sammensetningen av de ulike ionene beregnet.

Tabell 8 viser massene som er blitt kalkulert ut fra m/z verdien og ladningene på de markerte ionene fra Figur 14. Et gjennomsnitt av de 3 molekylmassene beregnet ut fra kalkulert masse og sammensetning, kan indikere at massen på molekylet er ca. 3569.59 Da.

Tabell 8. Kalkulert masse og foreslått sammensetning på de markerte ionene i Figur 14, beregnet ut fra m/z verdi og ladning.

Ladning (#z)	Masse/ladning(m/z)	Kalkulert masse	Sammensetning
4	893.6520	3570.61	M + H
4	894.3980	3573.59	M+4H
4	899.8923	3595.57	M+3H+Na

3.4 Anticanceraktivitet i ekstrakter

3.4.1 Anticanceraktivitet i SPE eluater og organiske faser

Fra aktivitetstesting av SPE eluater og ACN ekstrakter mot melanomceller (cancer celler) og lungfibroblaster (vanlige celler), var det noen få av prøvene som viste litt aktivitet mot melanomceller (Tabell 9), men ikke nok til å regnes som aktive. Prøvene regnes som aktive ved > 50% celledød, mistenkelige mellom 40-50% celledød og inaktive ved < 40% celledød. Det var mer aktivitet mot lungfibroblaster enn mot melanomceller, men bare 2 av prøvene ble regnet som mistenkelig og kun 1 ble regnet som aktiv mot lungfibroblaster.

Tabell 9. Anticancer aktivitet i SPE eluater (100 µg/ml) og organisk fase fra *S. turgens* (I) og *S. incrustatum*. Lungfibroblaster er normale celler og melanomceller er cancer celler.

Art	Material (100 µg/ml)	Celledød (%)	
		Lungfibroblaster (MRC5)	Melanomceller (A2058)
<i>S. turgens</i> (I)	10% SPE	8	1
	20% SPE	38	0
	30% SPE	43	0
	40% SPE	43	20
	ACN ekstr.	12	0
<i>S. incrustatum</i>	10% SPE	36	0
	20% SPE	96	1
	30% SPE	17	0
	40% SPE	11	0
	ACN ekstr.	13	30

Fra Tabell 9 går det fram at 100 µg/ml fra 30% SPE og 40% SPE *S. turgens* viste mistenkelig aktivitet (mellom 40-50% celledød) mot lungfibroblaster, mens fra *S. incrustatum* var 100 µg/ml fra 20% SPE aktiv (> 50% celledød) mot lungfibroblaster. Ingen av SPE eluatene eller de organiske fasene var aktiv eller viste mistenkelig aktivitet mot melanomceller.

3.4.2 Anticanceraktivitet i HPLC fraksjoner

Fra antibakteriell testing var det flest HPLC fraksjoner fra 40% SPE som viste aktivitet. Av denne grunn ble også flest HPLC fraksjoner fra 40% SPE testet mot anticancer aktivitet. Disse fraksjonene er de samme som ble samlet opp med fraksjonssamler under del 3.3.

Tabell 10. Anticancer aktivitet i HPLC fraksjoner fra *S. turgens* (I) og *S. incrustatum*. Lungfibroblaster er normale celler og melanomceller er cancerceller.

Art	HPLC fraksjon	Celledød (%) Lungfibroblaster (MRC5)	Celledød (%) Melanomceller (A2058)
<i>S. turgens</i> (I)	32 min fra 40% SPE	76	0
	41 min fra 40% SPE	100	45
	43 min fra 40% SPE	100	99
	44 min fra 40% SPE ¹	100	100
	46 min fra 40% SPE	61	19
	47 min fra 40% SPE	96	5
	48 min fra 40% SPE ²	87	97
	50 min fra 40% SPE	100	100
<i>S. incrustatum</i>	30 min fra 10% SPE	76	0
	46 min fra 20% SPE	71	0

1 = St-40-fr41 og 2 = St-40-fr51

Samtlige HPLC fraksjoner var aktive mot lungfibroblaster og 5 av fraksjonene fra *S. turgens* 40% SPE var aktive mot melanomceller (> 50% celledød). En fraksjon fra *S. turgens* 40% SPE viste mistenkelig aktivitet (mellom 40-50% celledød). Fraksjon 44 min og 48 min fra 40% SPE fra *S. turgens* er samme fraksjoner som blir utpekt i Figur 9 (St-40-fr41 og St-40-fr51).

4. Diskusjon

De to subarktiske sjøpungene *S. turgens* og *S. incrustatum* ble screenet for antibakterielle - og anticancerforbindelser, hvor aktive komponenter ble forsøkt isolert og innledningsvis karakterisert. Bioaktive forbindelser med god aktivitet mot både bakterier og cancerceller, ble funnet i flere SPE eluater fra begge sjøpungene. Ved opprensing av disse var fraksjoner fra 40% SPE fra *S. turgens* mest aktive, hvor noen var aktive mot samtlige bakterier de ble testet mot, og mot cancerceller. Av de opprensede forbindelsene var det 2 som så ut til å være delvis rene. Begge disse inneholdt forholdsvis store molekyler.

I første ekstraksjonsprosess ble materialet ekstrahert med 60% ACN + 0.1% TFA og satt til omrøring, en metode som har vist seg å være godt egnet for ekstraksjon av både peptider og mindre forbindelser med antibakteriell aktivitet fra marine organismer fra arktiske og subarktiske strøk⁴⁴⁻⁴⁸. Blandingen med løsemiddel og materiale ble delt i en organisk fase (ACN-rik fase) og en vannfase (salt-rik fase), hvor vannfasen ble ytterligere separert med en SPE-ekstraksjon. Ut fra vekten på startmaterialet fra sjøpungene, ble bare en liten del tørrstoff gjenvunnet av vannfase og organisk fase. Dette skyldes at en stor del av materialet ikke lar seg oppløse i løsemiddelet, og blir liggende som en pellet på bunnen av blandingen. Pelleten filtreres bort, da stoffer som ikke lar seg løse opp er uinteressante for videre analyser. En større mengde tørrstoff ble gjenvunnet fra vannfasen enn fra organisk fase i sjøpungene. Dette kommer av at en stor del av vekten fra vannfasen kommer fra salter. Marine organismer inneholder veldig mye natriumklorid (salt)⁵³, som igjen løser seg til vann. Acetonitril og natriumklorid er derimot ikke blandbare⁵⁴, noe som medfører en faseskillete (to faser) ved ekstraksjon av marint materiale med 60% ACN løsnings. Salter, som er ikke av interesse ved leting etter antimikrobielle forbindelser, blir sammen med andre polare stoffer renses bort fra vannfasen med bruk av SPE-ekstraksjon.

Mest gjenvunnet materiale fra SPE eluatene var å finne i eluatene ekstrahert med lavest % ACN gradient. Mindre tørrstoff ble gjenvunnet fra vannfasen etter hvert som ACN gradienten ble større. SPE kolonnen brukt under ekstraksjon separerer stoffene basert på polaritet, hvor de mest polare stoffene kommer ut først og de minst polare til slutt. Vannfasen inneholder naturlig nok mest polare stoffer, og disse binder seg best til polare løsemidler som vann med lav ACN gradient. De mest upolare stoffene fra sjøpungene vil ligge i den organiske fasen.

Det ble gjenvunnet atskillig mer tørrstoff fra *S. turgens* enn fra *S. incrustatum* både i organisk fase og vannfase. Som nevnt i introduksjonen, foretrekker *S. incrustatum* områder med en viss mengde sand til stede, og zooidene er som regel tett dekket av sand³¹. Dette var også tilfellet for arten brukt i denne oppgaven, hvor mye sand og småstein lå sammen med sjøpungene. Sanden løser seg ikke opp med løsemidler, og vil filtreres bort sammen med resten av pelleten. Dette vil si at en mindre andel av organismen fra *S. incrustatum* vil blandes med løsemiddelet, enn hva som er tilfellet med *S. turgens*. Det kan tenkes at utbyttet av gjenvunnet materiale fra *S. incrustatum* hadde vært bedre om sand og småstein hadde blitt fjernet før ekstraksjon, men det hadde vært en umulig oppgave da sanden var inkorporert i sjøpungen og ikke bare rundt i omgivelsene.

Av utvunnet materiale fra *S. turgens* (I) og *S. turgens* (II) er forskjellene ikke nevneverdig blant de organiske fasene, men for vannfasene ble det utvunnet en del mer tørrstoff fra *S. turgens* (II) enn fra *S. turgens* (I). Dette er mest sannsynlig tilfeldig, og kan komme av forskjeller under deling av fasene eller filtrering av pellet.

Det ble funnet mye antibakteriell aktivitet i nesten samtlige SPE eluater fra både *S. turgens* og *S. incrustatum* mot alle bakteriene de ble testet mot. Flere av eluatene viste aktivitet helt ned til 0.63 mg/ml, som var den laveste konsentrasjonen som ble testet. Organisk fase fra begge artene viste aktivitet mot alle bakteriene utenom *E. coli* og *P. aeruginosa*. Både SPE eluatene og de organiske fasene ble løst opp i vann (100 mg/ml) før antibakteriell testing, men organisk fase lot seg dårlig oppløse i vann. Det kan hende at utfallet hadde blitt annerledes om organisk fase hadde blitt løst opp i annet løsemiddel enn vann, men da hadde det vært en fare for at løsemidlet selv var antibakterielt.

Av de Gram-positive stammene var *C. glutamicum* mest sensitiv mot ekstraktene, noe som også har vært registrert i andre studier hvor samme bakterier har blitt testet mot marine ekstrakter^{44, 45}. *L. anguillarum* var mest sensitiv av de Gram-negative bakteriestammene, men en ekstremt høy dødelighet, av og til også i negativ kontroll (vann), tydet på at noe kunne være galt med denne stammen. Det kan tenkes at vekstforholdene ikke var optimale for *L. anguillarum*, som er en marin bakterie og vant med lave temperaturer og et annet saltinnhold, når aktiviteten ble målt ved 35 °C. Enda større fortyninger bør ha blitt utført på ekstraktene, da det kan hende at noen hemmer bakterievekst ved enda lavere konsentrasjon enn 0.63 mg/ml.

Ut fra resultatene kan det tyde på at *S. turgens* generelt er mer aktiv mot de testede bakteriestammene enn *S. incrustatum*. Det kan ikke utelukkes at forskjellene skyldes vanskelighetene ved ekstraksjonsprosessen av *S. incrustatum*, men det kan også komme av at *S. turgens* inneholder mer potente antimikrobielle forbindelser. Kornprobst (2010)²² hevder at in god indikator på tilstedeværelse av antibakterielle eller antifungale substanser på fastsittende marine organismer, er at organismene ikke er dekket av noen form for biofilm (fra bakterier, alger, sopp, o.l.). En organisme som er delvis eller nesten fullstendig dekket, vil mest sannsynlig ikke ha indre ressurser som forhindrer dette. Om *S. turgens* blir utsatt for antimikrobiell biofilmdannelse er uvisst, men ut fra bilder av de to artene, ser *S. turgens* ut til å være renere enn *S. incrustatum*.

Da Lippert og medarbeidere (2003)³⁰ screenet ekstrakter fra *S. turgens* for antibakteriell aktivitet, ble det ikke registrert aktivitet. Dette strider mot mine resultater fra *S. turgens* (I og II). Forskjellen kan komme av at Lippert *et al.* brukte andre ekstraksjonsmetoder (1:1 MeOH/DCM) som ikke var like effektive som dem brukt i denne oppgaven. I tillegg renses de ikke opp ekstraktene, men testet kun råekstraktet mot bakteriene. Bakteriene som Lippert *et al.* testet ekstraktet mot var også forskjellige fra dem i denne oppgaven, der de brukte bakterier fra marint miljø, isolert fra steiner, sediment og vannkolonner. Disse bakteriene er mest sannsynlig en del føden til *S. turgens*, og derfor produserer de kanskje ikke antibakterielle forbindelser mot disse, slik de gjør mot fremmede bakterier.

De to artene *S. turgens* (I og II) viste ganske lik aktivitet, men noen få unntak. *S. turgens* (I) ble samlet av dykkere på 20 m dybde, og *S. turgens* (II) ble samlet på 47.18 m dybde med Agassiz trål. Det har blitt registrert før at ekstrakter fra samme organisme har vist forskjell i bioaktivitet ut hvilken sesong på året de er blitt hentet opp, eller hvilke andre organismer som vokser i samme område⁵⁵. Man kan ikke utelukke helt at dette ikke er tilfellet mellom de to *S. turgens* artene, men aller helst er nok forskjellene tilfeldige, da begge artene ble hentet opp på samme tid og omtrent ved samme lokalitet.

Noen av de antibakterielle aktivitetene som er registrert fra SPE eluatene, kan være fra forbindelser som er en del av immunforsvaret til sjøpungene⁴⁴. Sjøpunger mangler, som nevnt innledningsvis, et spesifikt immunforsvar, men har til gjengjeld et godt utviklet uspesifikt immunforsvar. Forbindelsene som forårsaker antibakteriell aktivitet kan kanskje komme fra substanser produsert av sjøpungens egne hemocytter²⁸. Den antibakterielle aktiviteten ble målt

i ikke-stimulerte sjøpunger, og det er ukjent om dyrene ville vist en økende antibakteriell aktivitet ved stimulering med mikrober i forkant av innsamling⁴⁴. Det kan ikke utelukkes at noen av de antibakterielle aktivitetene fra SPE eluatene kommer fra symbiotiske mikroorganismer, eller fra mikroorganismer som er en del av næringen til sjøpungene⁵⁶, noe som har blitt registrert før i sjøpung av samme slekt⁵⁷.

SPE eluatene ble fraksjonert ved bruk av RP-HPLC, og alle fraksjonene ble testet for antibakteriell aktivitet. Ingen av HPLC fraksjonene fra *S. incrustatum* viste aktivitet mot noen av de testede bakteriene, selv om flere av SPE eluatene gjorde det. Dette kan komme av at eluatene inneholder mange små, aktive forbindelser, som sammen hemmer aktivitet, men når disse blir separert ved HPLC er de ikke sterke nok til å hemme aktivitet. Samme resonnementet gjelder for alle HPLC fraksjonene fra *S. turgens*, utenom fraksjonene fra 40% SPE eluat. Det kan hende at flere fraksjoner hadde vært aktive om de ble oppkonsentrert før testing.

Fra antibakteriell testing av 40% SPE eluatene fra *S. turgens* (I) og (II), så det ut til å være forholdsvis lik aktivitet i begge eluatene. Ved testing av HPLC fraksjoner fra disse, var det derimot flere aktive fraksjoner fra *S. turgens* (I) enn fra (II). Årsaken til dette kan være at konsentrasjonen var høyere i (I) enn i (II), eller det kan komme av at fraksjonene ble bedre separert i *S. turgens* (I).

Flere av HPLC fraksjonene fra *S. turgens* (I) 40% SPE viste lovende aktivitet mot flere av bakteriene de ble testet mot. To av fraksjonene hemmet samtlige bakterier de ble testet mot. Toppene på ca 280 nm som vises i UV spekteret til disse, tyder det på at det er aromatiske forbindelser til stede i fraksjonene⁵⁸. Ved ytterligere separering av alle de antibakterielle HPLC fraksjonene fra *S. turgens* (I) 40% SPE, samt analyse med LC-MS på de nye separerte fraksjonene, var det to fraksjoner som så ut til å være renere enn de andre; St-40-fr41-t1 og St-40-fr51-t2. Disse opprensede fraksjonene var aktiv mot *C. glutamicum*, som var den eneste bakterien de ble testet mot.

St-40-fr41-t1 ble, ut fra UV-spekteret og LC-MS spekteret, mistenkt å inneholde peptider. Mistanken ble forsterket etter analyse ved høyoppløselig MS, hvor fraksjonene viste bjelleformete spekter som er karakteristisk for peptider⁵⁹. Ut fra de beregnede molekylmassene, ser peptidene ut til å være henholdsvis 2036 Da og 2035 Da. Ved ytterligere

zooming på spekteret med #z 2, kan det hende at man hadde funnet et ion med en m/z -verdi på 1038.819. Dette ionet ville da hatt en kalkulert masse på 2075.62 Da, som utgjør molekylets masse, et proton og et kalium-addukt (Tabell 11). Ved ytterligere zooming på spekteret med #z 3, kan det hende at man hadde funnet et ion med en m/z -verdi på 680.23. Dette ionet ville da hatt en kalkulert masse på 2037.67 Da, som utgjør molekylets masse og 3 proton (Tabell 11). Om disse antakelsene hadde vært tilfelle, ville de to først antatte peptidene være samme peptid, og fraksjon St-40-fr41-t1 ville vært mye renere enn først antatt.

Tabell 11. Ny kalkulert masse og foreslått sammensetning på de markerte ionene i Figur 12 a og b, beregnet ut fra m/z verdi og ladning.

Ladning (#z)	Masse/ladning(m/z)	Kalkulert masse	Sammensetning
2	1019.8447	2037.67	M+2H
2	1030.8353	2059.65	M+H+Na
2	1038.819	2075.62	M+H+K
2	1041.828	2081.64	M+2Na
3	680.230	2037.67	M+3H
3	687.5588	2059.65	M+2H+Na
3	692.8800	2075.62	M+2H+K
3	694.8918	2081.64	M+H+2Na

M = molekylet, H = hydrogen, Na = natrium, K = kalium

Antimikrobielle peptider er blitt funnet mange ganger før i marine organismer^{46, 28, 60}. I tillegg ser det ut til at aktive peptider oftest blir isolert fra 40% ACN ekstrakter⁶⁰. Det spekuleres i at de har en viktig funksjon i det uspesifikke immunforsvaret, hvor de blir utskilt av de sirkulerende hemolymfene²⁸. Antimikrobielle peptider kan være aktuelle til bruk i nye typer antibiotika mot multiresistente bakterier²⁸.

Fraksjon St-40-fr51-t2 så ikke ut til å være like ren som St-40-fr41-t1, og det merkelige UV-spekteret tyder på at det inneholder molekyler som ikke detekteres på UV-vis spektrometeret. Molekylmassen på den ene av forbindelsene ble, ut fra analyse med høyoppløselig MS, vurdert til å være ca 3569.59 Da. Det er vanskelig å forklare hvordan et såpass stort molekyl ikke detekteres på UV-spekteret, men ut fra dette kan det virke som om St-40-fr51-t2 ikke inneholder peptider.

Anticancertesting ble først og fremst utført på SPE eluater og HPLC fraksjoner som hadde vist antibakteriell aktivitet. Ingen av SPE eluatene så ut til å være aktive mot melanomceller, men noen var aktive mot lungefibroblaster. Fra HPLC fraksjonene var samtlige fraksjoner

aktive mot lungefibroblaster, og flere var aktive mot melanomceller. To av disse fraksjonene var de samme som St-40-fr41-t1 b og St-40-fr51-t2 ble isolert fra. Det er vanskelig å vurdere potensialet til HPLC fraksjonene i forhold til anticanceraktivitet, da tørrstoffmengden til disse er ukjente. For å finne ut av dette måtte tørrstoffmengde først blitt beregnet, for så teste dem ved lavere konsentrasjoner. Det at fraksjonene dreper vanlige lungefibroblaster tyder på at de er dårlig egnet til bruk i kreftmedisin, men kan være et godt utgangspunkt som ”drug lead”.

5. Konklusjoner

Hypotesen om at antibakterielle og anticancerforbindelser finnes både *S. turgens* og *S. incrustatum* ble forsterket da flere SPE eluater fra begge organismene viste god aktivitet mot samtlige bakteriestammer de ble testet mot. *S. turgens* ser ut til å ha være mer aktiv enn *S. incrustatum*. Spesielt 40% SPE fra *S. turgens* virker å være lovende da flere antibakterielle forbindelser ble påvist. Analysene indikerer at en av fraksjonene fra 40% SPE fra *S. turgens* inneholder ett antibakterielt peptid, men videre analyser må utføres for å bekrefte dette.

6. Referanser

1. WHO (2008). The global burden of disease: 2004 update Geneva: World Health Organization.
2. Black, R.E., Cousens, S., Johnson, H.L., Lawn, J.E., Rudan, I., Bassani, D.G., Jha, P., Campbell, H., Walker, C.F., Cibulskis, R., Eisele, T., Liu, L. & Mathers, C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *The Lancet* **375**, 1969-1987.
3. Cragg, G.M., Newman, D.J. & Snader, K.M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* **60**, 52-60.
4. von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S. & Häbich, D. (2006). Antibacterial natural products in medicinal chemistry - Exodus or revival? *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 5072-5129.
5. WHO (2011) Combat antimicrobial resistance - No action today, no cure tomorrow, <http://www.who.int/world-health-day/2011> [25 april, 2011]
6. Brown, P.D. (2010). Multiple drug resistance. I: Meszaros, A. & Balogh, G. (red.), Multiple drug resistance, 65-98, New York: Nova Science Publishers.
7. Alanis, A.J. (2005). Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* **36**, 697-705.
8. Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B. & Bartlett, J. (2009). Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of america. *Clinical Infectious Diseases* **48**, 1-12.
9. Lentino, J.R., Narita, M. & Yu, V.L. (2008). New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **27**, 3-15.
10. Giske, C.G., Monnet, D.L., Cars, O. & Carmeli, Y. (2008). Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**, 813-821.
11. Slama, T.G. (2008). Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Critical Care* **12** (Suppl 4), S4.
12. Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P. & Sprenger, M. (1998). Antimicrobial resistance. *Bmj* **317**, 609-610.
13. Kümmerer, K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**, 311-320.
14. Rice, L.B. (2003). Do we really need new anti-infective drugs? *Current Opinion in Pharmacology* **3**, 459-463.
15. French, G.L. (2010). The continuing crisis in antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36**, S3-S7.
16. Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* **17**, 215-234.
17. Singh, S.B. & J.C., C. (2010). Chemical space and the difference between natural products and synthetics. I: Buss, A.D. & Butler, M.S. (red.), Natural product chemistry for drug discovery 28-43, Cambridge: Royal Society of Chemistry.
18. Bhat, S.V., Nagasampagi, B.A. & Meenakshi, S. (2009). Natural products. Chemistry and applications. Oxford: Alpha Science International LTD.
19. Cragg, G.M. & Newman, D.J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry* **77**, 7-24.

20. Harvey, A.L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today* **13**, 894-901.
21. Newman, D.J. (2008). Natural products as leads to potential drugs: an old process or the new hope for drug discovery? *Journal of medicinal chemistry* **51**, 2589-2599.
22. Kornprobst, J.M. (2010a). Encyclopedia of marine natural products, Vol. 1. General aspects, microorganisms, algae, and fungi Weinheim,: Wiley-Blackwell.
23. Mayer, A.M.S., Glaser, K.B., Cuevas, C., Jacobs, R.S., Kem, W., Little, R.D., McIntosh, J.M., Newman, D.J., Potts, B.C. & Shuster, D.E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* **31**, 255-265.
24. Moen, F.E. & Svensen, E. (2008). Dyreliv i havet, Utg. 5. Kristiansund: Kom forlag.
25. Kornprobst, J.M. (2010b). Encyclopedia of marine natural products, Vol. 3. Protostomes and deuterostomes Weinheim: Wiley-Blackwell.
26. Nevala, A.E. (2005) Big trouble from little squirts: WHOI scientist investigates a troublesome invasive species, Oceanus:
<http://www.whoi.edu/oceanus/viewArticle.do?id=3940> [20 april, 2011]
27. Hayward, P.J. & Ryland, J.S. (1990). The marine fauna of the British Isles and North-West Europe, Vol. 2 Oxford: Clarendon Press.
28. Tincu, J.A. & Taylor, S.W. (2004). Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3645-3654.
29. Hagerman, L. (1969). Marina djur Stochholm: Natur och Kultur.
30. Lippert, H., Brinkmeyer, R., Mulhaupt, T. & Iken, K. (2003). Antimicrobial activity in sub-Arctic marine invertebrates. *Polar Biology* **26**, 591-600.
31. Picton, B.E. & Morrow, C.C. (2010) *Synoicum incrustatum* (M Sars, 1851), Encyclopedia of Marine Life of Britain and Ireland:
<http://www.habitas.org.uk/marinelife/species.asp?item=ZD400> [21 april, 2011]
32. Carroll, A.R., Bowden, B.F. & Coll, J.C. (1993). Studies of Australian ascidians. III. A new tetrahydrocannabinol derivative from the ascidian *Synoicum castellatum*. *Australian Journal of Chemistry* **46**, 1079-1083.
33. Carroll, A.R., Healy, P.C., Quinn, R.J. & Tranter, C.J. (1999). Prunolides A, B, and C: novel tetraphenolic bis-spiroketal from the Australian ascidian *Synoicum prunum*. *The Journal of Organic Chemistry* **64**, 2680-2682.
34. Ortega, M.J., Zubia, E., Ocana, J.M., Naranjo, S. & Salva, J. (2000). New rubrolides from the ascidian *Synoicum blochmanni*. *Tetrahedron* **56**, 3963-3967.
35. Diyabalanage, T., Amsler, C.D., McClintock, J.B. & Baker, B.J. (2006). Palmerolide A, a cytotoxic macrolide from the antarctic tunicate *Synoicum adareanum*. *Journal of the American Chemical Society* **128**, 5630-5631.
36. Miyata, Y., Diyabalanage, T., Amsler, C.D., McClintock, J.B., Valeriote, F.A. & Baker, B.J. (2007). Ecdysteroids from the Antarctic tunicate *Synoicum adareanum*. *Journal of Natural Products* **70**, 1859-1864.
37. Ravinder, K., Vijender Reddy, A., Krishnaiah, P., Ramesh, P., Ramakrishna, S., Laatsch, H. & Venkateswarlu, Y. (2005). Isolation and synthesis of a novel β -carboline guanidine derivative tiruchanduramine from the Indian ascidian *Synoicum macroglossum*. *Tetrahedron letters* **46**, 5475-5478.
38. Pearce, A.N., Chia, E.W., Berridge, M.V., Maas, E.W., Page, M.J., Webb, V.L., Harper, J.L. & Copp, B.R. (2007). E/Z-rubrolide O, an anti-inflammatory halogenated furanone from the New Zealand ascidian *Synoicum* n. sp. *Journal of Natural Products* **70**, 111-113.
39. Tadesse, M., Strom, M.B., Svenson, J., Jaspars, M., Milne, B.F., Torfoss, V., Andersen, J.H., Hansen, E., Stensvag, K. & Haug, T. (2010). Synoxazolidinones A

- and B: novel bioactive alkaloids from the ascidian *Synoicum pulmonaria*. *Organic Letters* **12**, 4752-4755.
40. Tadesse, M., Svenson, J., Jaspars, M., Strom, M.B., Abdelrahman, M.H., Andersen, J.H., Hansen, E., Kristiansen, P.E., Stensvag, K. & Haug, T. (2011). Synoxazolidinone C; a bicyclic member of the synoxazolidinone family with antibacterial and anticancer activities. *Tetrahedron letters* **52**, 1804-1806.
 41. Seidel, V. (2005). Initial and bulk extraction. I: Sarker, S.D., Latif, Z. & Gray, A.I. (red.), Natural Products Isolation, 2. utg. 27-46, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
 42. Weller, H.N. (1999). Purification of combinatorial libraries. *Molecular diversity* **4**, 47-52.
 43. Kamysz, W., Okrój, M., Lempicka, E., Ossowski, T. & Lukasiak, J. (2004). Fast and efficient purification of synthetic peptides by solid-phase extraction. *Acta Chromatographica* **14**, 180-186.
 44. Haug, T., Stensvag, K., Olsen, Ø.M., Sandsdalen, E. & Styrvold, O.B. (2004). Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology* **85**, 112-119.
 45. Tadesse, M., Gulliksen, B., Strom, M.B., Styrvold, O.B. & Haug, T. (2008). Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology* **99**, 286-293.
 46. Stensvåg, K., Haug, T., Sperstad, S.V., Rekdal, Ø., Indrevoll, B. & Styrvold, O.B. (2008). Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Developmental & Comparative Immunology* **32**, 275-285.
 47. Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvag, K., Sandsdalen, E. & Styrvold, O.B. (2002). Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish and Shellfish Immunology* **12**, 371-385.
 48. Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M. & Stensvag, K. (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* **81**, 94-102.
 49. Bhakuni, D.S. & Rawat, D.S. (2005). Bioactive marine natural products New York: Springer.
 50. Houssen, W.E. & Jaspars, M. (2005). Isolation of marine natural products. I: Sarker, S.D., Latif, Z. & Gray, A.I. (red.), Natural Products Isolation, 2. utg. 353-390, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
 51. Latif, Z. (2005). Isolation by preparative high-performance liquid chromatography. I: Sarker, S.D., Latif, Z. & Gray, A.I. (red.), Natural Products Isolation, 2. utg. 213-232, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
 52. Sarker, S.D. & Nahar, L. (2005). Hyphenated techniques. I: Sarker, S.D., Latif, Z. & Gray, A.I. (red.), Natural products isolation, 2. utg. 233-267, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
 53. Vernberg, W.B. & Vernberg, J.F. (1972). Environmental physiology of marine animals New York: Springer-Verlag.
 54. Brady, J.E. (2004). Generell kjemi: grunnlag og prinsipper, Utg. 2. Trondheim: Tapir akademisk forlag.
 55. Li, J.W. & Vederas, J.C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* **325**, 161-165.
 56. Proksch, P., Edrada, R.A. & Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**, 125-134.

57. Riesenfeld, C.S., Murray, A.E. & Baker, B.J. (2008). Characterization of the microbial community and polyketide biosynthetic potential in the palmerolide-producing tunicate *Synoicum adareanum*. *Journal of Natural Products* **71**, 1812-1818.
58. ThermoSpectronic (2010). Basic UV-vis theory, concepts and applications.
59. Crews, P., Rodríguez, J. & Jaspars, M. (2010). Organic structure analysis, Utg. 2. New York: Oxford university press.
60. Mercado, L., Schmitt, P., Marshall, S.H. & Arenas, G. (2005). Gill tissues of the mussel *Mytilus edulis chilensis*: a new source for antimicrobial peptides. *Electronic Journal of Biotechnology* **8**, -.