

Immunmodulerande polysakkarid frå *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.)

Magnhild Ravnskog Nilsen



Masteroppgåve ved Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitskaplege fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Immunmodulerande polysakkarid frå *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.)

Magnhild Ravnskog Nilsen

Masteroppgåve for graden master i farmasi ved
Seksjon for farmasøytisk kjemi
Fagområde farmakognosi

Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitskaplege fakultet

Universitetet i Oslo

Mai 2015

Rettleiarar:
Kari T Inngjerdingen,
Ingvild Austarheim
og Berit Smestad Paulsen

© Magnhild Ravnskog Nilsen

2015

Immunmodulerande polysakkarid frå *Zanthoxylum zanthoxyloides*

Magnhild Ravnskog Nilsen

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Samandrag

Zanthoxylum zanthoxyloides veks i tropiske område i Vest-Afrika og blir akta som antiseptisk, analgetisk og sveittedrivande. Den har tradisjonelt blitt nytta mot mellom anna malaria, tuberkulose og dysenteri. Denne oppgåva tar for seg vidare struktur-aktivitetsstudiar av fraksjonane BA50%1 og BAW1 frå stammebarken, og RB50%2 og RBW2 frå rotbarken, opparbeida av Hoås (2014). Det skulle utførast strukturoppklaring og bestemming av biologisk aktivitet i fraksjonane og degraderingsprodukta deira for å bestemme struktur-aktivitetsforhold til polysakkarid frå *Z. zanthoxyloides*.

Det vart nytta gelfiltering for vidare oppreinsing av fraksjonane. Desse fraksjonane vart vidare enzymatisk degradert med pektinase, *endo*-PG eller arafase/galaktanase og monosakkarid-samansetning i degraderingsprodukta og native fraksjonar vart bestemt. Det vart også bestemt bindingstype i utvalde fraksjonar. Biologisk aktivitet vart bestemt ved å undersøkte polysakkarida si evne til å fikserer komplement og stimulere makrofagar.

Med unntak av fraksjon BA50%1.1P1 hadde rotbark-fraksjonane meir potent komplementfikserande aktivitet enn stammebark-fraksjonane, og etanolekstrakt-fraksjonane var meir aktive enn vassekstrakt-fraksjonane. Dette er i samsvar med resultatata til Hoås. Fraksjonar degradert med pektinase (uspesifikk aktivitet) eller *endo*-PG (spesifikk aktivitet) hadde ikkje HG-område og hadde høgare komplementfikserande aktivitet enn nativ fraksjon.

Fraksjonar degradert med kombinasjonen arafase/galaktanase fekk ei reduksjon i innhaldet av Ara, mens det var mindre endring i innhald av Gal. Desse hadde lågare komplementfikserande aktivitet enn nativ fraksjon. BA50%1.1P1 er pektinase-degradert etanol-fraksjon frå stammebark og hadde høgast makrofagstimulerande aktivitet, BA50%1.1E1 stammer frå den same native fraksjonen, men var degradert med kombinasjonen arafase/galaktanase, og hadde lågast makrofagstimulerande aktivitet. Det er ikkje lett å sjå ein tendens på kva strukturelement som er viktig for makrofagstimulering ut frå desse resultatata, men det er mogleg at romleg form er viktig for binding til TLR4-reseptoren.

Alle fraksjonane som vart studert med omsyn til bindingstype, hadde RG-I område med AG-I og AG-II-strukturar. AG-II er viktig for komplementfikserande aktivitet og med unntak av BA50%1.2 hadde alle undersøkte fraksjonar lik eller meir potent komplementfikserande aktivitet enn positiv kontroll BP-II.

Forord

Denne masteroppgåva vart utført ved seksjon for farmasøytisk kjemi, fagområde farmakognosi, i perioden august 2014 til mai 2015. Det har vore eit veldig utfordrande og spennande år!

Eg ønsker å takke heile avdelinga for farmakognosi for å ta godt i mot meg, og gjere det siste året til det beste året på farmasistudiet! Eg vil savne dykk! Eg vil spesielt takke rettleiarane mine; Berit Smestad Paulsen for at du har vore der gjennom heile året og gitt god fagleg rettleiing, Ingvild Austarheim for at du gav meg sjølvtilitt på laben og ikkje minst Kari Tvette Inngjerdingen for tålmodighet, opplæring og hjelp på laben og for at eg kom i mål.

Takk Suthajini Yogarajah og Hoai Thi Nguyen Aas for hjelp og rettleiing på laben. Takk Anna Armika Tussilago Nyman og Giang Thanh Thi Ho for at de har delt kunnskap og for å hjelpe når eg har trengt det. Takk Thuy Lan Nguyen og Philippe Nguyen Phung for gode delte samtaler på masterkontoret.

Tusen takk til mamma og pappa, utan oppmuntring og støtte frå dykk ville eg ikkje ha starta eller kome meg gjennom studiet! Tusen takk for all korrekturlesing av masteroppgåva!

Til slutt, og mest av alt, takk kjære Hans Petter de Fine, for at du godtok og støtta at eg starta eit nytt studieløp, og har vore der for meg dei siste fem åra. Tusen takk for at all tålmodighet og inspirasjon!

Røyken, 15. mai 2015

Magnhild Ravnskog Nilsen

Innhald

Samandrag	IV
Forord	V
Innhald	VI
Figurar	IX
Tabellar	X
1 Forkortingar	1
2 Innleiing	3
2.1 Polysakkarid	3
2.1.1 Polysakkarid	3
2.1.2 Celleveggen	3
2.1.3 Pektin	3
2.1.4 Homogalakturonan	6
2.1.5 Rhamnogalakturonan-I	6
2.1.6 Rhamnogalakturonan-II	7
2.2 Immunologi	9
2.2.1 Komplementsystemet	9
2.2.2 Makrofagar	10
2.2.3 Pektin med immunmodulerande aktivitet	10
2.3 <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i> (Lam.)	12
2.3.1 Systematikk (namn og taksonomi)	12
2.3.2 Habitat og botanikk	13
2.3.3 Tradisjonell bruk	13
2.3.4 Vitskaplege studiar	13
3 Målet med oppgåva	14
4 Metode	15
4.1 Generell metode	15
4.1.1 Absorbansmåling	15
4.1.2 Degassing/evakuering av luft/fukt	15
4.1.3 Blanding av løysingar	15
4.1.4 Dialyse	16
4.1.4.1. Førbeuing av dialyseslangar	16

4.1.4.2. Dialyse.....	17
4.1.5 Filtrering	17
4.1.6 Frysetøking (lyofilisering)	18
4.1.7 Innveging.....	19
4.1.8 pH-målingar	19
4.1.9 Jod-jod-kalium-test.....	19
4.1.10 Sentrifugering.....	20
4.1.11 Vasskvalitet.....	20
4.1.12 Volumreduksjon	20
4.2 Isolering av polysakkarid	21
4.2.1 Eksklusjonskromatografi/gelfiltrering	21
4.2.1.1. Superdex 200 prep grade.....	21
4.2.1.2. BioGel P30.....	23
4.2.1.3. PD-10 desaltingskolonne	25
4.2.2 Affinitetskromatografi	26
4.2.2.1 Con A Sepharose.....	26
4.2.3 Enzymatisk degradering	27
4.2.3.1. Pektinase.....	28
4.2.3.2. <i>Endo</i> -polygalakturonase.....	29
4.2.3.3. Alfa-L-arabinofuranosidase og <i>exo</i> -beta-1,3-galaktanase.....	30
4.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemming av karbohydratinnhald	31
4.3.1 Fenol-svovelsyretesten.....	31
4.3.2 Metanolyse, silylering, gasskromatografi.....	32
4.3.2.1. Metanolyse.....	32
4.3.2.2. Silylering.....	34
4.3.2.3. Gasskromatografi.....	35
4.4 Strukturoppklaring.....	37
4.4.1 Bestemming av molekylvekt	37
4.4.2 Atomkraftmikroskop	38
4.4.3 Karboksylyrereduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering, GC-MS ...	39
4.4.3.1 Karboksylyrereduksjon før metylering.....	39
4.4.3.2. Metylering.....	41
4.4.3.3. Hydrolyse.....	43
4.4.3.4. Reduksjon.....	44

4.4.3.5. Acetylering.....	46
4.4.3.6. GC-MS.....	47
4.5 Biologisk aktivitet	49
4.5.1 Komplementfiksering	49
4.5.2 Stimulering av makrofagar	54
5 Resultat og diskusjon	58
5.1 Strukturoppklaring.....	64
5.1.1 Isolering av polysakkarid.....	64
5.1.2 Gelfiltrering	64
5.1.3 Affinitetskromatografi	65
5.1.4 Enzymatisk degradering	65
5.1.5 Molekylvekt	67
5.1.6 Kvalitativ bestemming av mengde monosakkarid.....	69
5.1.7 Bestemming av bindingsforhold	73
5.1.8 Atomkraftmikroskopi	76
5.2 Biologisk aktivitet	77
5.2.1 Komplementfiksering.....	77
5.2.2 Makrofagstimulering.....	80
5.3 Struktur og aktivitet.....	82
5.3.1 Molekylvekt	82
5.3.2 Enzymatisk degradering	82
5.3.3 Strukturelement	83
6 Konklusjon.....	84
7 Reagensar.....	86
Litteraturliste	88

Figurar

Figur 2.1. Modell av plantecelleveggen.	4
Figur 2.2. Skisse av den tradisjonelle modellen av eit pektin.	5
Figur 2.3. Skisse av dei to vanlegaste modellane av pektin.	5
Figur 2.4. «Levande ting-liknande» («Living thing-like»)-modellen.	6
Figur 2.5. Ulike sidekjeder til RG-I.	8
Figur 2.6. Oversikt over komplementsystemet.	9
Figur 2.7. Grein av <i>Zanthoxylum zanthoxyloides</i>	12
Figur 4.1. Metanolyse av surt polysakkarid.	32
Figur 4.2. TMS-derivatisering av metylglykosider og metylesterar.	34
Figur 4.3. Temperaturprogram GC.	36
Figur 4.4. Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe.	40
Figur 4.5. Metylering av hydroksylgrupper.	42
Figur 4.6. Sur hydrolyse av glykosidbindingane.	43
Figur 4.7. Reduksjon med NaBD ₄	44
Figur 4.8. Acetylering av karboksylsyrereduserte av delvis metylerte polysakkarid.	46
Figur 4.9. Temperaturprogram for GC-MS.	48
Figur 4.10. Mikrotiterplate, oppsett for titeringskurve.	53
Figur 4.11. Mikrotiterplate, oppsett for prøvemateriale.	53
Figur 4.12. Griess-reaksjon.	54
Figur 4.13. Mikrotiterplate, oppsett ved stimulering av makrofagar.	57
Figur 5.1. Oversikt over utført arbeid på fraksjon BA50%1.	59
Figur 5.2. Oversikt over utført arbeid på fraksjon BAW1.	60
Figur 5.3. Oversikt over utført arbeid på fraksjon RB50%2.	61
Figur 5.4. Oversikt over utført arbeid på fraksjon RBW2.	62
Figur 5.5. Karbohydratprofil av BAW1.	64
Figur 5.6. Karbohydratprofil av BAW1.1P(2).	66
Figur 5.7. Elueringsprofil av fraksjonane på Diol-300.	68
Figur 5.8. Gasskromatogram av BAW1.1P(2)1.	69
Figur 5.9. AFM-bilde av BAW1.1.	76
Figur 5.10. ICH ₅₀ BP-II/ICH ₅₀ fraksjonene.	78
Figur 5.11. Komplementfikserande aktivitet frå stammebark-fraksjonane.	79
Figur 5.12. Komplementfikserande aktivitet frå rotbark-fraksjonane.	79

Figur 5.13. Komplementfikserande aktivitet frå enzym-degraderte fraksjonar.....	80
Figur 5.14. Måling av frigjeving av nitritt frå fraksjonane samanlikna med medium..	81

Tabellar

Tabell 4.1. Fortynningsoppsett for kvart prøve.....	51
Tabell 4.2. Fortynningsoppsett for komplement.....	52
Tabell 5.1. Startfraksjonar i denne oppgåva.	58
Tabell 5.2. Inndeling i fraksjonar og utbytte.	63
Tabell 5.3. Tidspunkt for topper av dekstran med kjend molekylvekt ved 0,8 ml/min.	68
Tabell 5.4. Prosentdel monosakkarid relatert til totalt innhald av sukker i BA50%-fraksjonane...71	71
Tabell 5.5. Prosentdel monosakkarid relatert til totalt innhald av sukker i BAW-fraksjonane.....71	71
Tabell 5.6. Prosentdel monosakkarid relatert til totalt innhald av sukker i RB50% og RBW-fraksjonane.	72
Tabell 5.7. Bindingsforhold i dei seks fraksjonane.....	75
Tabell 5.8. Ein oversikt over strukturelementa i fraksjonane.	76

1 Forkortingar

α eller β	Konfigurasjon av anomerisk karbon i monosakkarid
4-O-Me-GlcA	4-oksygenmetyl-glukuronsyre
<i>f</i>	Furanose-form (5-ring)
<i>p</i>	Pyranose-form (6-ring)
AG-I og -II	Arabinogalaktan-I og -II
Ara	Arabinose
Arafase	α -L-arabinofuranosidase
BA50%1	Bark, ekstrahert med 50 % etanol i reinsa vatn, 70 °C, fraksjon 1 etter separasjon på ionebytter
BAW1	Bark, ekstrahert med reinsa vatn, 100 °C, fraksjon 1 etter separasjon på ionebytter
BP-II	Pektin frå <i>Biophytum petersianum</i>
<i>endo</i> -PG	<i>Endo</i> -polygalakturonase
FPLC	Fast protein væskechromatografi
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
GalA	Galakturonsyre
Galaktanase	<i>Exo</i> - β -1,3-galaktanase
Glc	Glukose
GlcA	Glukuronsyre
HG	Homogalakturonan
ICH ₅₀	Verdien som gir 50 % hemming av hemolyse
LPS	Lipopolysakkarid
Man	Mannose
PMAA	Delvis metylerte aldol-acetat (Partially Methylated Alditol Acetate)
RB50%2	Rotbark, ekstrahert med 50 % etanol i reinsa vatn, 70 °C, fraksjon 2 etter separasjon på ionebytter
RBW2	Rotbark, ekstrahert med reinsa vatn, 100 °C, fraksjon 2 etter separasjon på ionebytter
RG-I og -II	Rhamnogalakturonan-I og -II
Rha	Rhamnose
RI	Refraktiv indeks
rpm	Rundar per minutt

SEC	Ekklusjonskromatografi (size exclusion chromatography)
V_0	Ekklusjonsvolum, void volume
V_t	Total permeasjonsvolum
Xyl	Xylose

2 Innleiing

2.1 Polysakkarid

2.1.1 Polysakkarid

Polysakkarid er ei heterogen kjemisk gruppe, med mange ulike eigenskaper. Den består av monosakkarid som er bunde med glykosidbindingar. Lengda på kjedene kan variere frå nokre få til fleire tusen. Kjedene kan bestå av ei eller fleire typar monosakkarid, dei kan vera lineære eller forgreina. Polysakkarid gir både næring (stivelse) og styrke (fiber) i plantar (Paulsen og Barsett, 2005).

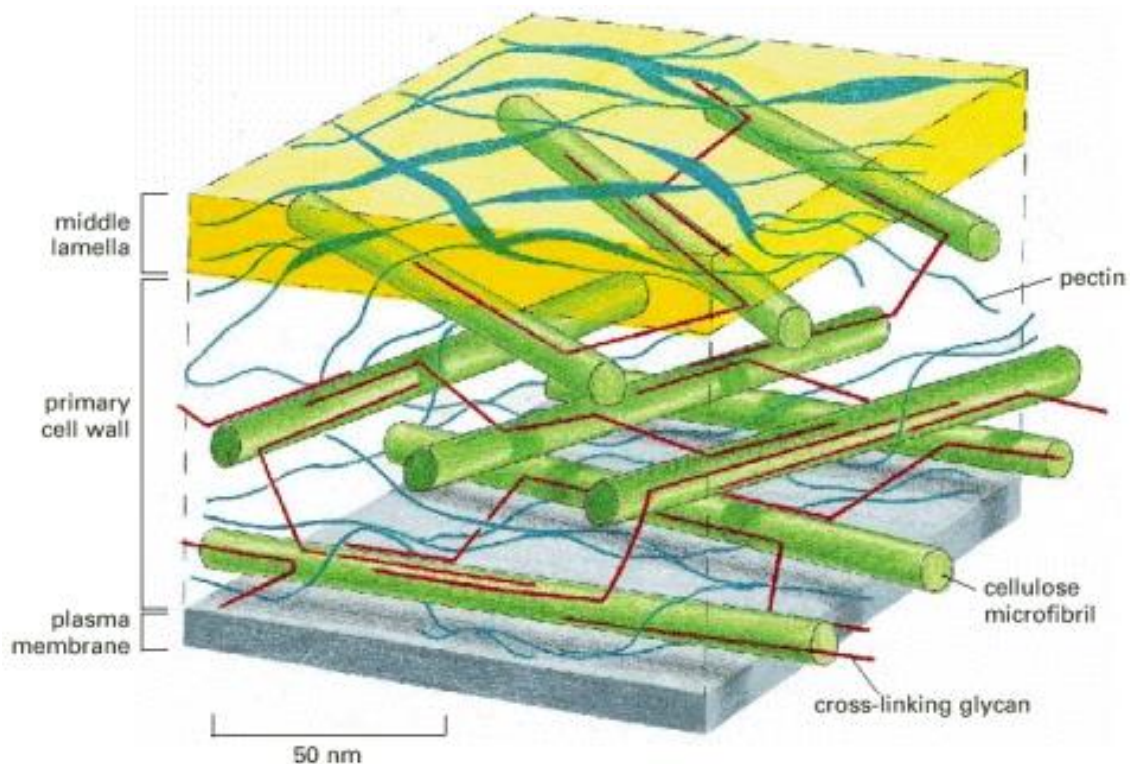
2.1.2 Celleveggen

Planteceller har ein cellevegg på utsida av cellemembranen. Den består av sekundær cellevegg, primær cellevegg og midt-lamellen ytst, sjå figur 2.1. Planteceller kan vekse til å bli tusen gonger større enn original storleik, dette krev at celleveggen har styrke og moglegheit til å ekspandere. Polysakkarid bidrar til å danne eit nettverk i celleveggen, binde saman celler gjennom midt-lamellen, bestemme porøsitet i celleveggen, gi eit vandig miljø, signaloverføring og i forsvaret mot patogen (Pérez *et al.*, 2003; Somerville *et al.*, 2004; Yapo, 2011a).

Cellulose og krysslinka heteroglykan (hemicellulose) fins i sekundær og primær cellevegg, mens pektin fins i primær cellevegg og i midt-lamellen. Cellulose består av lineære, uløselege fibrillar som er kjeder av 1,4- β -glukose. Heteroglykan er forgreina polysakkarid som dannar hydrogenbindingar til fibrillar (Somerville *et al.*, 2004; Yapo, 2011b).

2.1.3 Pektin

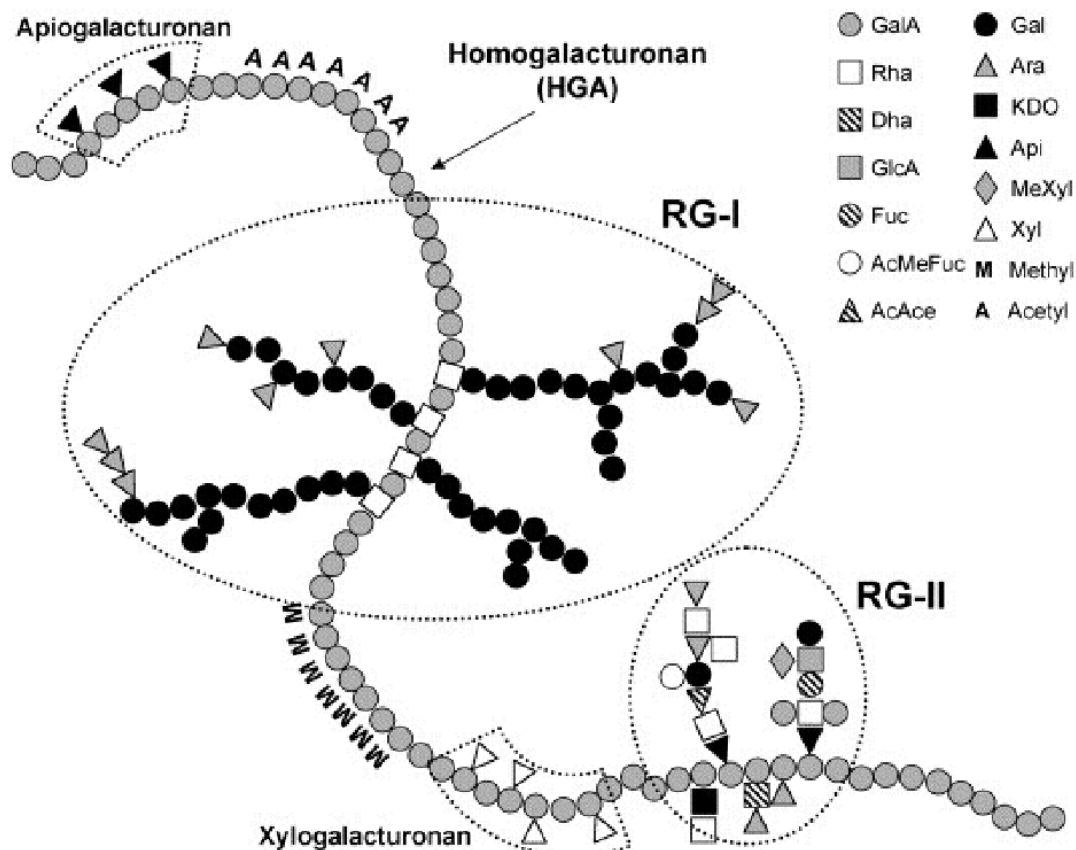
Pektin er ei gruppe polysakkarid som inneheld galakturonsyre (GalA). Pektin blir nytta i matindustrien som geldannar, fortjukkings- og stabiliseringsmiddel. Pektin har biologisk effekt hos menneske, mellom anna reduksjon av glukose- og kolesterol-nivå, anti-cancer-effekt og immunmodulering (Mohnen, 2008; Somerville *et al.*, 2004; Yapo, 2011a).



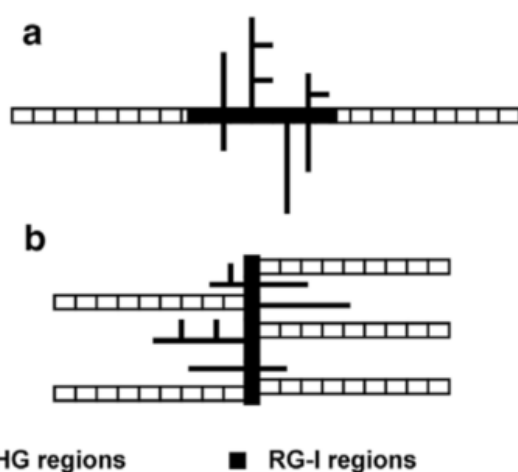
Figur 2.1. Modell av plantecelleveggen med midtlamellen, primær cellevegg og plasmamembran. Laga av cellulose (grøn) er bunde saman med kryssbunde hemiglykan (raud) med hydrogenbindingar. Pektin (blå) dannar eit nettverk rundt (Alberts *et al.*, 2002).

Pektin består av lineære «glatte» homogalakturonan-område (HG) og forgreina «hårete» rhamnogalakturonan-I-område (RG-I). Dei er bunde kovalent med xyloglukan i celleveggen (Caffall og Mohnen, 2009; Paulsen og Barsett, 2005; Yamada og Kiyohara, 2007).

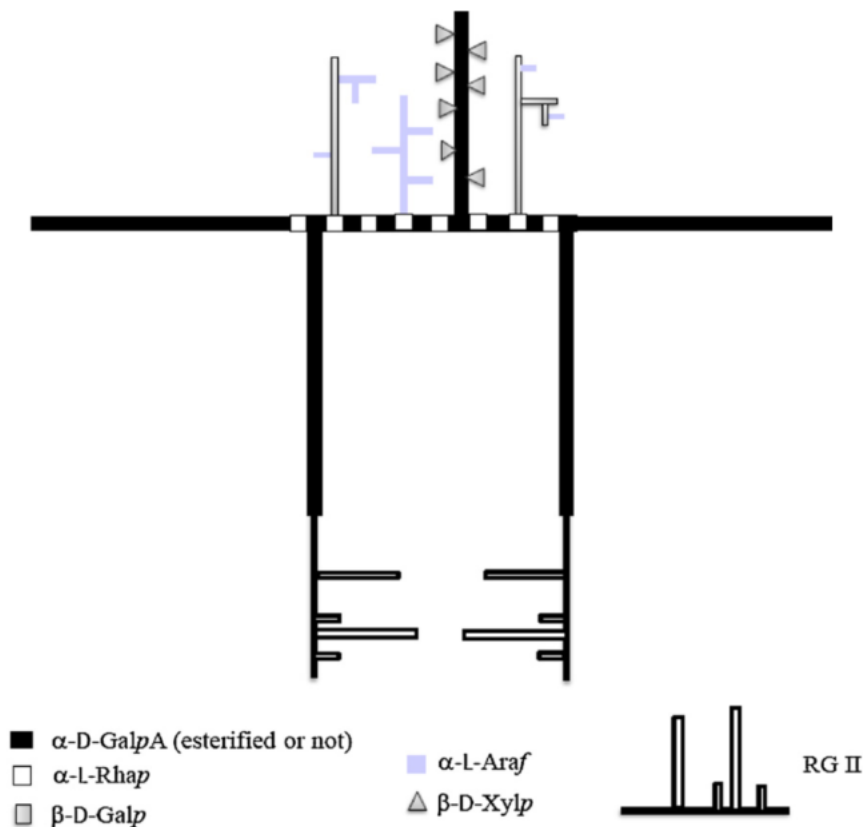
Det er føreslått ulike modeller for korleis områda i pektinet er sett saman. Ein går ut frå at HG og RG-I er kovalent kryssbunde fordi behandling med enzymet *endo*-polygalakturonase spaltar av RG-I. I Den tradisjonelle modellen (figur 2.2 og 2.3a) er at pektin består av repeterande einingar av lineære og forgreina område (Mohnen, 2008). Ein alternativ modell (figur 2.3b) er at pektinet har ei ryggrad av RG-I, med HG i sidekjedene (Round *et al.*, 2010). Det er også føreslått av Yapo (2011a) at pektinstrukturen både består av repeterande einingar av lineære og forgreina område, og at dei forgreina områda har lineære sidekjeder av HG, altså ein kombinasjon av dei to andre modellane (figur 2.4).



Figur 2.2. Skisse av den tradisjonelle modellen av eit pektin, med HG, RG-I og RG-II-område (Pérez *et al.*, 2003).



Figur 2.3. Skisse av dei to vanlegaste modellane av pektin. (a) er den tradisjonelle modellen, med repeterande område av HG og RG-I. (b) er RG-I-modellen, der ryggraden består av RG-I som har sidekjeder av HG (Round *et al.*, 2010).



Figur 2.4. «Levande ting-liknande» («Living thing-like»)-modellen, foreslått av Yapo (2011a), er ein kombinasjon av den tradisjonelle modellen og RG-I-modellen. Ryggraden består av alternerande kjeder av HG og RG-I. RG-I har sidekjeder av nøytrale sukre som arabinan, galaktan og AG-I og -II på den eine sida og sidekjeder av HG på den andre sida.

2.1.4 Homogalakturonan

Homogalakturonan (HG) består av 10–100 einingar av 1,4- α -D-GalA, med ulik grad av metyl- og acetyler- grupper (i høvesvis 6 og 2/3-posisjon). Det er mellom 55 og 70 % HG i pektin. HG dannar gel ved ione-kryssbinding med kalsium. Dette bidrar til porøsitet og styrke i celleveggen (Mohnen, 2008; Paulsen og Barsett, 2005; Yapo, 2011a).

2.1.5 Rhamnogalakturonan-I

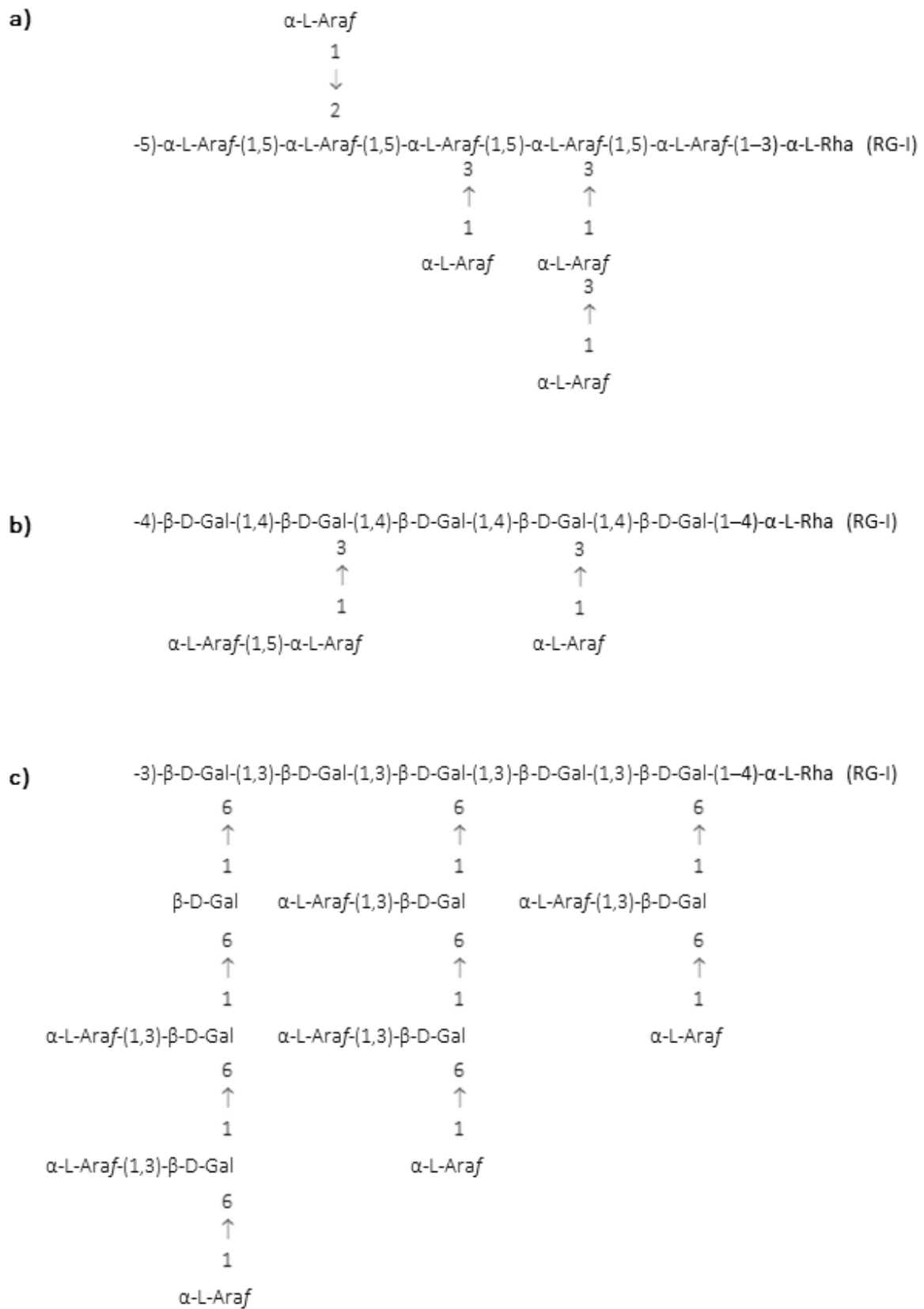
Rhamnogalakturonan-I (RG-I) har ei ryggrad av 15–200 alternerande α -1,4-D-GalA-einingar og α -1,2-L-rhamnose-einingar (Rha) med ulike sidekjeder i 3 og 4-posisjon i Rha. Det er ei heterogen gruppe med stor skilnad i strukturar. Mellom 20 og 80 % av Rha-einingane har sidekjeder av nøytrale sukre, i hovudsak arabinan, galaktan, arabinogalaktan-I (AG-I) og arabinogalaktan-II

(AG-II). Pektin består av mellom 5 og 48 % RG-I. RG-I fins i hovudsak i celleveggen, og ein går ut frå at dei spelar ei viktig rolle ved celledeling og i forsvar mot patogen. RG-I gir også styrke og fleksibilitet av celleveggen saman med HG og RG-II (Mohnen, 2008; Paulsen og Barsett, 2005; Yapo, 2011a, b).

Figur 2.5 viser ulike sidekjeder i RG-I. Arabinan er har ei rygggrad av 1,5- α -L-arabinose (Ara) med eventuelle kjeder av Ara i 2- og 3-posisjon. AG-I har ei rygggrad av 1,4- β -D-galaktose (Gal), med sidekjeder av Ara i 3-posisjon. AG-II har ei rygggrad av 1,3- β -D-Gal, med sidekjeder av 1,6- β -D-Gal med forgreiningar eller terminale α -L-Ara-einingar (Paulsen og Barsett, 2005; Yamada og Kiyohara, 2007).

2.1.6 Rhamnogalakturonan-II

Rhamnogalakturonan-II (RG-II) består av ei rygggrad av 9–10 1,4- α -D-GalA og har fire sidekjeder med 12 forskjellige sukre, inkludert sjeldne sukre som 2-keto-3-deoksy-D-lykso-heptulosarsyre (KDO), 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulosonsyre (DHA), 2-Me-fukose, 2-Me-xylose, apiose og etansyre. Pektin består av om lag 10 % RG-II. RG-II er ein dimer og består av to einingar som er krysslinka gjennom apiose gjennom eit bor-atom. Ein meiner at ein av funksjonane til RG-II er å forsyne planten med bor, som er viktig for cellevekst (Mohnen, 2008; Paulsen og Barsett, 2005; Pérez *et al.*, 2003).

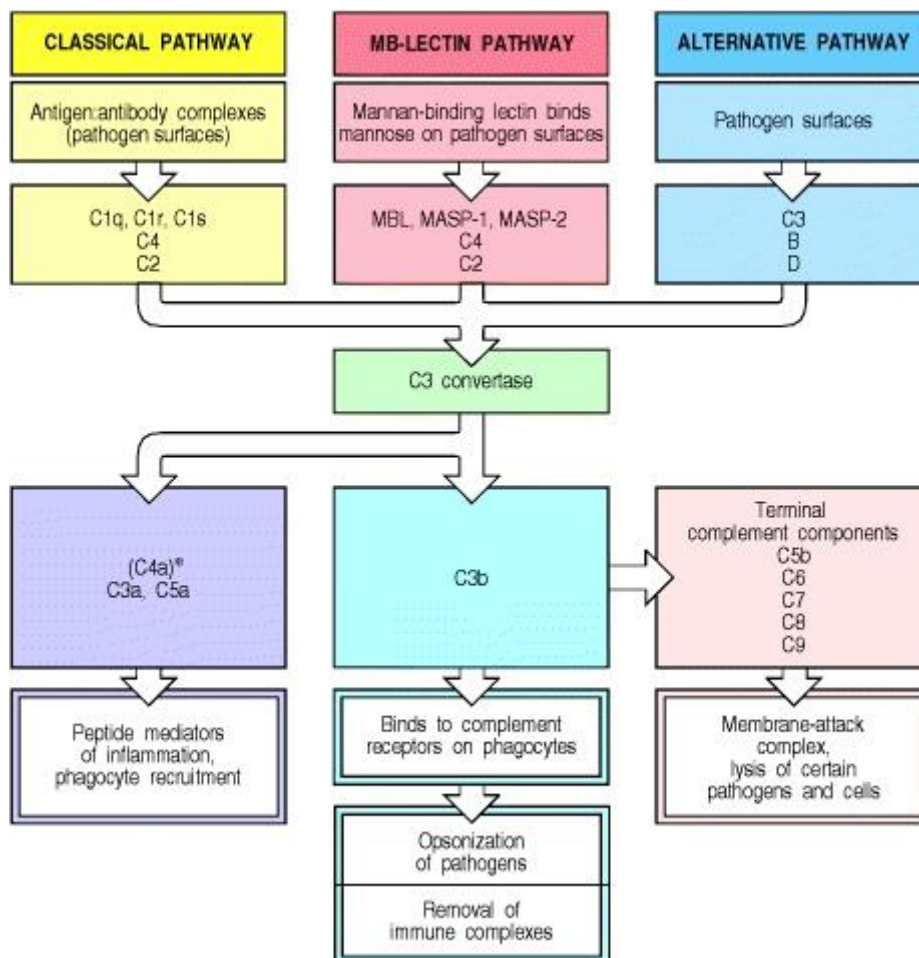


Figur 2.5. Ulike sidekjeder til RG-I. (a) Arabinan-kjede. (b) AG-I-kjede. (c) AG-II-kjede.

2.2 Immunologi

2.2.1 Komplementsystemet

Komplementsystemet er ein del av det medfødde immunsystemet, men er linka til det erverva immunsystemet. Det består av ei rekke inaktive plasma-proteasar som kan bli aktivert ved proteolytisk kløyving gjennom tre forskjellige kaskade-reaksjonar; klassisk, mannan-bindande lektin (MB-lektin) eller alternativ veg, sjå figur 2.6. (Janeway *et al.*, 2001a).



Figur 2.6. Oversikt over komplementsystemet. Dei tre vegane har ulik aktivering, men gir lik respons; gjennom ein kaskadereaksjon blir det danna mellom anna C3a som er ein mediator for inflammasjon, C3b som blir bunde til cellemembranen til bakterien og opsoniserer bakterien slik at dei kan bli fagocytterte og C5b som gir membran-angrep og lyse av cellemembranen (Janeway *et al.*, 2001a).

I den klassiske vegen blir komplementsystemet aktivert ved binding av immunkompleks til C1q. MB-lektin og alternativ veg er immunkompleks-uavhengige og er ein del av førstelinje-immunforsvaret. I MB-lektin-vegen blir komplementsystemet aktivert via mannose på overflata

av patogen. I den alternative vegen blir komplementsystemet aktivert via komplement-komponent 3 (C3) av hydroksylgrupper frå karbohydrat på overflata av mikroorganismar (Janeway *et al.*, 2001a; Yamada og Kiyohara, 2007).

Aktivering av komplementsystemet gir biologisk aktive komponentar som gir inflammasjon og tilkallar fagocytter (C3a, C5a), opsoniserer bakterien for fagocytose (C3b) og gir membran-angrep og lyse av cellemembranen hos bestemte patogenar og celler (C5b–9) (Janeway *et al.*, 2001a).

2.2.2 Makrofagar

Makrofagar har mange funksjonar i immunsystemet; dei fagocytterar uønskt materiale, skil ut mediatorar som cytokinar og kjemokinar og interagerer med lymfocytter. Toll-like reseptor-4 (TLR4) binder PAMP (patogen-assosiert molekylære mønster) som både peptidoglykan og lipopolysakkarid (LPS) (Janeway *et al.*, 2001b; Rang *et al.*, 2007).

Studiar har vist at polysakkarid interagerer med og stimulerer makrofagar via mellom anna TLR4, CD14, komplement reseptor 3 (CR3), scavenger-reseptor og dektin-1-reseptor. Binding til desse reseptorene aukar produksjon av mellom anna frie radikalar (ROS), nitrogenoksid (NO), tumor-nekrose-faktor (TNF- α) og interleukiner (IL). Binding av TLR4 er vist å gi ei oppregulering i produksjon av TNF- α og NO (Schepetkin og Quinn, 2006).

2.2.3 Pektin med immunmodulerande aktivitet

Fleire studiar har vist farmakologisk aktivitet av pektin, men ikkje alle pektin har farmakologisk aktivitet. Pektin-fraksjonar frå medisinsplanter som tradisjonelt har vore nytta i behandling av infeksjonar, sår og tumorar har i studiar vist effekt på komplementsystemet, makrofagar, lymfocytter og NK-celler. Studiar har vist at den farmakologiske aktiviteten er knytt til dei forgreina områda. Det er spesielt AG-II som ofte er identifisert som viktig for komplementfikserande aktivitet, men også plantefraksjonar med RG-I-, AG-I-, RG-II- og heteroglykan-struktur har farmakologisk aktivitet. Pektin aktiverer komplementsystemet via den klassiske og alternative vegen (Michaelsen *et al.*, 2000; Paulsen og Barsett, 2005; Yamada og Kiyohara, 2007).

Yamada og Kiyohara (2007) har ved bruk av enzymet *endo*- α -1,4-poly-D-galakuronase vist at ein vil få RG-I-område med meir potent komplementfikserande aktivitet enn korresponderande original-pektin, samt 1,4- α -D-oligo-GalA med liten eller ingen komplementfikserande aktivitet. Yamada og Kiyohara viser også til at dersom ein nyttar enzymet *exo*- α -L-arabinofuranosidase som

fjerner Ara frå sidekjedene, vil det degraderte pektinet ha ein lik eller meir potent komplementfikserande aktivitet, og foreslår at 1,3,6- β -D-Gal koplå til RG-I er den minste essensielle struktureininga som har komplement-fikserande aktivitet.

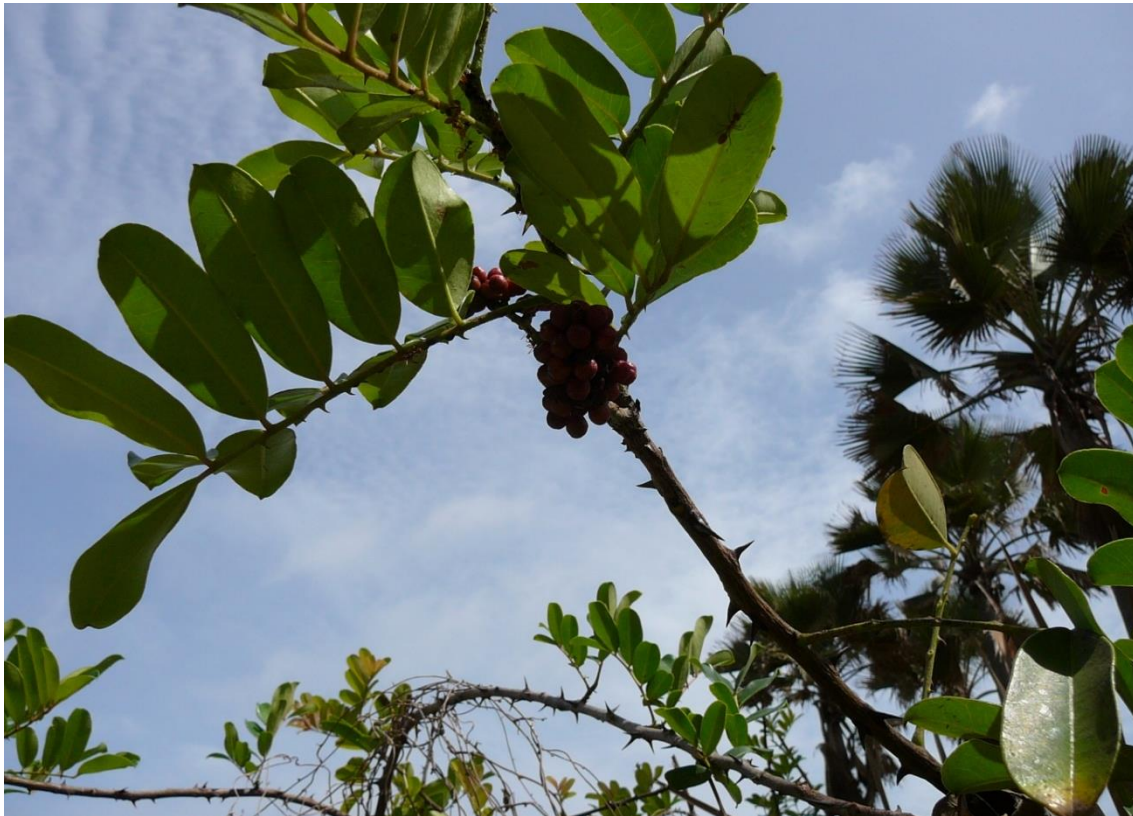
Stimulering av makrofagar er ei av dei viktige farmakologiske effektane pektin har vist å ha på immunsystemet. Studiar har vist at pektin-fraksjonar som inneheld arabinogalaktan gir auka produksjon av interleukiner, TNF- α , ROS og NO (Schepetkin og Quinn, 2006).

Farmakokinetikk av farmakologiske aktive pektin er ikkje grundig studert. Ein meiner at pektin blir tatt opp gjennom lymfeknutar i tynntarmen (Peyers plakk og isolerte lymfe-follikler (ILF)), via lymfesystemet og til systemisk sirkulasjon. Sjølve mekanismen for transport over epitelet er ikkje kjend, det er mogleg den er IgA-reseptor-mediert, at mikrofloraen i tarmen lagar oligosakkarid eller at det fins ein ukjend transporter for oligosakkarid. Det har blitt observert at pektin har blitt akkumulert i lymfeknutar, Peyers plakk og i lever, milt og nyrer og det er påvist antistoff mot farmakologiske aktive pektin i systemisk sirkulasjon og i tarmen (Yamada og Kiyohara, 2007).

2.3 *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.)

2.3.1 Systematikk (namn og taksonomi)

Rike:	Plantae
Divisjon:	Angiosperm
Klasse:	Equisetopsida
Subklasse:	Magnoliidae
Orden:	Rosanae
Familie:	Rutaceae
Slekt:	<i>Zanthoxylum</i>
Art:	<i>zanthoxyloides</i> (Lam.) Zepern. & Timler



Figur 2.7. Grein av *Zanthoxylum zanthoxyloides*, med runde blad, rød-brune bær og tornar (Atamari, 2007).

Synonym: *Fagara senegalensis* (DC.) A.Chev., *Fagara zanthoxyloides* Lam., *Zanthoxylum senegalense* (DC). Andre namn: Senegal prickly-ash, candlewood, toothache bark (eng)., Fagara jaune (fr.) (Matu, 2011; ThePlantList, 2013; Tropicos, 2015).

2.3.2 Habitat og botanikk

Zanthoxylum zanthoxyloides er eit busktré som blir opp mot 18 meter høgt og opp mot 0,5 meter brei. Eldre greiner har tornar, sjå figur 2.7. Den blomstrar to gonger i året, i den første delen av den tørre sesongen og i den regnfulle sesongen. Frukta er rød-brun og 5–6 mm i diameter i diameter og frøa er blå-svarte. Den veks i tropiske område i Vest-Afrika, både på savannane, i skog og langs kysten. *Z. zanthoxyloides* har ei utstrakt bruk som tradisjonell medisin, og på grunn av ukontrollert og øydeleggande hausting ved å dra opp røtene har den blitt ei trua art (AfricanPlantDatabase, 2012; Etsè *et al.*, 2011; Matu, 2011).

2.3.3 Tradisjonell bruk

Z. zanthoxyloides er akta som antiseptisk, analgetisk og sveittedrivande. Tradisjonelt har maserasjon, dekoksjon og infusjon av rotbark og stammebark vore nytta mot mellom anna malaria, sigdcelleanemi, tuberkulose, dysenteri og smerte. Røtene og nye skot har vore nytta som tyggepinne. Stammen blir nytta som treverk, og blada og frøa blir brukt som krydder (Adesina, 1986; AfricanPlantDatabase, 2012; Matu, 2011).

2.3.4 Vitskaplege studiar

Det er gjort fleire studiar av rotbark, stammebark, blader, blommar, frukt og frø frå *Z. zanthoxyloides*. Den inneheld mellom anna lågmolekylære substansar som alkaloid, flavonoid, lignan, amid og eteriske oljer (Etsè *et al.*, 2011). Det er påvist at planten har mellom anna antioksidant effekt, antimikrobiell effekt, antifungal effekt og antihelmetisk effekt. Den har effekt mot sigdcelleanemi, er gastrobeskyttande og har anti-cancer eigenskaper. Men alle desse effektane tilskrive dei lågmolekylære substansane (Boye *et al.*, 2012; Misra *et al.*, 2013; Olounladé *et al.*, 2012; Wouatsa *et al.*, 2013).

Denne oppgåva bygger på masteroppgåva til Hoås (2014), ut over dette er det ikkje funne vitskaplege studiar av polysakkarid frå *Z. zanthoxyloides*.

3 Målet med oppgåva

Denne oppgåva tar for seg struktur- og aktivitetsstudiar av fire fraksjonar av *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.), opparbeida av Hoås (2014); BA50%1, BAW1, RB50%2 og RBW2. Plantematerialet er hausta og tørka i Mali.

Målet med oppgåva var følgande:

- Å gjere ei detaljert strukturoppklaring av polysakkarid frå *Z. zanthoxyloides*.

Dette skulle gjerast for å:

1. Finne informasjon om strukturelle trekk i dei isolerte pektinfraksjonane.
2. Bestemme biologisk aktivitet av fraksjonane og degraderingsprodukta deira
3. Basert på strukturstudiar og biologisk aktivitetsstudiar, bestemme struktur-aktivitetsforhold til polysakkarid frå *Z. zanthoxyloides*.

4 Metode

4.1 Generell metode

4.1.1 Absorbansmåling

Måling av UV-absorbans vart utført i samanheng med fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.1.), komplementfiksering (metode 4.5.1.) og makrofagstimulering (metode 4.5.2.).

Utstyr

- Mikrotiterplater, 96 flate brønner (nunc/ VWR)
- Mikroplate-absorbans-lesar: iMark modell 3550 (Bio-Rad)

4.1.2 Degassing/evakuering av luft/fukt

Uønska luft/oksygen vart fjerna ved enten vakuum frå pumpe eller fortrenging ved hjelp av helium i mellom 5 til 15 minutt.

Eksikator vart nytta for å fjerne fukt frå tørre prøver og for å hindre at fukt frå lufta kom til tørre prøver. Luft vart evakuert frå eksikatoren ved hjelp av pumpe.

Utstyr

- Helium, komprimert (AGA)
- Pumpe (ILMVAC)
- Eksikator med blågel

4.1.3 Blanding av løysingar

Løysingar vart blanda ved bruk av enten magnet og magnetrørar eller virvlar (vortex).

Utstyr

- Magnet
- Magnetrørar: Color squid (IKA), RCT basic (IKA)
- Virvlar: MS2 basic (IKA), MS2 minishaker (IKA), Reax top (Heidolph)

4.1.4 Dialyse

Dialyse vart nytta for å fjerne salt frå løysingar. Ved dialyse blir molekyl i ei løysing separert etter storleik. Molekyl med ei lågare molekylvekt enn cut-off-verdien (MWCO) til ein semipermeabel membran (dialyseslangen) vil diffundere over membranen til lågare konsentrasjon i dialysevatnet, mens molekyl med høgare molekylvekt blir verande igjen i slangen. Diffusjonen skjer med osmotisk gradient og vil pågå til likevekt er nådd. Når det er mykje lågmolekylære stoff i løysinga må dialysevatnet skiftast oftare. Nye dialyseslangar kan innehalde restar av m.a. cellulose og må vaskast grundig før bruk for å unngå forureining i prøvene (Spectrum-Laboratories, 2012).

4.1.4.1. Førebuing av dialyseslangar

Reagensar

- Reinsa vatn
- 2 % Natriumhydroksid (NaOH)
- 0,05 % Natriumazid (NaN₃)

Utstyr

- Dialyseslangar: Spectra/Por Dialysis Membrane, Standard RC Tubing, MWCO: 3,5 kD (Spectrum Laboratories).
- Kjele
- Kokeplate
- Stort begerglas
- Boks for oppbevaring

Prosedyre

1. 2 % NaOH og 0,05 % NaN₃ vart laga til.
2. Dialyseslangane vart kuttet i ønska lengde, 30–100 cm
3. Slangane vart deretter skylt godt med springvatn og overført til kokande NaOH og kokt i minutt.
4. Slangane vart avkjølt deretter skylt godt to gonger inn- og utvendig med reinsa vatn.
5. Slangane vart kokt i 10 minutt i reinsa vatn og skylt godt innvendig med reinsa vatn.
6. Fram til bruk vart dialyseslangane oppbevart i 0,05 % NaN₃ ved 4 °C for å unngå bakteriell vekst.

4.1.4.2. Dialyse

Reagensar

- Reinsa vatn

Utstyr

- Dialyseslangar
- Dialyseklemmer
- Stort begerglas
- Glasstavar
- Magnet
- Magnetrorar: Color squid (IKA), RCT basic (IKA)
- Aluminiumsfolie
- Saltmeter SSX210 (ebro)

Prosedyre

1. NaN_3 vart fjerna ved å skylje slangane godt i reinsa vatn.
2. Slangane vart lukka først med knute og deretter dialyseklemme. Litt reinsa vatn vart helt oppi for å sjekke at slangen var tett.
3. Dialyseløysinga vart helt oppi slangen til den var $\frac{1}{2}$ – $\frac{3}{4}$ full, avhengig av saltkonsentrasjon.
4. Luft vart fjerna frå slangen og den andre enden lukka med klemme og knute.
5. Eit begerglas med magnet vart fylt med reinsa vatn og sett på magnetrorar på benken. 3 glasstavar vart lagt i kryss over magneten, slik at slangen ikkje vart øydelagd av magneten. Slangane vart lagt over/rundt glasstavane.
6. Vatn vart skifta jamleg, i starten kvar time, deretter 2 gonger i døgnet.
7. Over natta vart begerglaset sett på magnetrorar på kjølerommet, med aluminiumsfolie dekkja over.

4.1.5 Filtrering

Filtrering vart nytta for å fjerne forureiningar frå ei løysing. For mindre volum vart det nytta sprøyte med påsett filter. For større volum vart det nytta nutsj og pumpe.

Utstyr:

- Filter:
 - Acrodisc m/ 0,45 / 0,22 μm membran (Pall) for sprøyte
 - Durapore membranfilter 22 μm (Millipore)
- Sprøyte (Soft Ject)
- Filtreringsutstyr (Phenomenex)
- Pumpe (IMVAC)

4.1.6 Frysetørking (lyofilisering)

Frysetørking (lyofilisering) vart nytta for å tørke prøver. Frysetørking skjer ved sublimasjon, det vil sei at vatnet frå frosen prøve går rett over i gassform. Dette skjer når væsketrykket over isen er lavt (lav temperatur og trykk). Frysetørking er ei skånsam og godt eigna metode fordi frysetørka prøver bevarer struktur og form. Den frysetørka prøven er porøs og lett å jobbe med, og kan i tillegg lett løysast i vatn igjen (Martin-Christ, 2013).

Utstyr

- Pærekolbe, overgangar med glasull
- Metanolbad: Hetofrig (Heto Birkerød)
- Roteringsseining (Heto)
- Drammeglas, parafilm og kanyle
- Frysar
- Frysetørkar: Alpha 1-4 (Christ), Alpha 1-4 LD Plus (Christ)

Prosedyre

1. Ved store volum av prøven, vart prøven dampa inn på rotavapor før frysing.
2. Når pærekolbar vart nytta vart prøvematerialet frose ned under rotering i metanolbadet ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Når drammeglas vart nytta (0,5–5 ml), vart prøvematerialet frose ned i frysar.
3. Prøver i pærekolbe vart festa på utsida av frysetørkaren. Ein overgang med glasull var mellom kolben og frysetørkaren. Prøver på drammeglas vart dekkja av perforert parafilm og sett inni frysetørkaren.
4. Etter 18–48 timer (avhengig av total-volum) var alt vatnet sublimert, prøven tatt av frysetørkaren og innhaldet vege.

4.1.7 Innveging

Til innveging vart det nytta finvekt for innvegingar under 1 gram og grovvekt for innvegingar over 1 gram.

Ustyr

- Finvekt: Sartorius Extend ED224S, Sartorius Practum 213-1S
- Grovvekt: Mettler BB2400, Sartorius Analytic A200S

4.1.8 pH-målingar

pH vart målt med bruk av papir til grovmålingar eller pH-meter ved tillaging av buffer. pH-meteret vart først kalibrert med buffer pH 4, 7 eller 9, etter ønska pH i buffer.

Utstyr

- pH-papir (Whatman)
- pH-meter (Mettler Toledo Seven Compact pH/ion-meter S220) med kalibreringsutstyr

4.1.9 Jod-jod-kalium-test

Jod-jod-kalium-testen vart nytta for å undersøke om det var stivelse i prøvene. Jod reagerer med amylose og gir ein blå farge, slik kan stivelse påvisast. Dersom det ikkje er stivelse i løysinga blir den farga oransje (Rundle *et al.*, 1944).

Reagensar

- 3 % Jod løyst i 6,7 % kaliumjodid-løysing Reinsa vatn

Utstyr

- Kvit porselensplate med 12 flate brønnar
- Rørespatel
- Pipette

Prosedyre

1. Eit lite flak av kvar prøve vart lagt i kvar si brønn og løyst i litt reinsa vatn.
2. Eit par dråper jod-jod-kalium vart dryppa over.
3. Eventuell fargeendring vart notert.

4.1.10 Sentrifugering

Sentrifugering vart nytta for å separere væsker med ulik tettheit eller evakuere luft ut av væske. Tid og rundar per minutt (rpm) varierer.

Utstyr

- Sentrifuge: Sentrifuge mini (Labnet), Centrifuge 5810 (eppendorf), Sentrifuge (MSE)

4.1.11 Vasskvalitet

Alt vatn som vart nytta var ionebytta, og er omtalt som reinsa vatn eller ionebytta vatn.

Utstyr

- Elix 10 med Progard 2 (Millipore)

4.1.12 Volumreduksjon

Reduksjon av volum / avdamping av løysemiddel vart gjort med forskjellige metodar, etter kva som var formålet; ønske om oppkonsentrering, fjerning av lett flyktige stoff eller tørking. Det vart brukt rotavapor med vassbad, vakuu-evaporator, evaporator med varme og nitrogen eller frysetørking (metode 4.1.6.), gjerne i kombinasjon med kvarandre.

Utstyr:

- Rotavapor med vassbad; IKA RV10 basic (VWR)
- Pærekolbe
- Vakuu-evaporator: SpeedVac Savant SPD121P med Vapornet Savant VN100, Refrigerated vaportrap RVT4101 og Vacuume pump OFP 400 (Thermo Scientific)
- Reagensrøyr

- Evaporator med varmemodul og nitrogen (Pierce Reacti-vap III og Reacti-therm III, komprimert nitrogen AGA)
- Frysetørkar

4.2 Isolering av polysakkarid

4.2.1 Eksklusjonskromatografi/gelfiltrering

Eksklusjonskromatografi (SEC) vart nytta for å separere molekyl etter storleik. Polysakkarid er vassløselege, difor vart gelfiltrering nytta. Kolonnematerialet er ein porøs matriks av sfæriske partiklar som er kjemisk og fysikalsk stabil og inert. Stasjonærfasen er matriksen med buffer som fyller porene og rommet mellom partiklane. Det er viktig at det ikkje oppstår interaksjonar mellom prøvematerialet som skal separerast og stasjonærfasen (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010).

Separasjonen skjer fordi små molekyl har tilgang til porene i kolonnematerialet, og difor brukar lengre tid gjennom kolonnen, medan store molekyl passerer gjennom kolonnen med same hastigheita (flowen) som mobilfasen (elueringsmiddelet). Volumet som krevst for å transportere store molekyl, er eksklusjonsvolumet (void volume, V_0), og tilsvarer 30 prosent av totalt kolonnevolum i ein godt pakka kolonne. Små molekyl vert eluert rett før det totale permeasjonsvolumet (V_t), altså når mobilfasen har eluert gjennom kolonnen. Ein kan berre separere stoff med molekylstørrelsar som vert eluert mellom eksklusjonsvolum og total permeasjonsvolum, og ein må velje matriks ut etter molekylstorleik og selektivitet (GE-Healthcare, 2007c, 2010; Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010).

Luftboblar i kolonnen kan påverke elueringa, difor vart elueringsmiddelet degassa før bruk. Prøvematerialet vart filtrert 0,45 μm før den vart sett på kolonnen.

4.2.1.1. Superdex 200 prep grade

Superdex er ein matriks som består av kryssbunde agarose-partiklar som er kovalent bunde med dekstran. Agarose-matriksen gir fysikalsk og kjemisk stabilitet, mens dekstran gir god gelfiltrasjon. Superdex 200 prep grade separerer dekstraner mellom 10 000 og 100 000 Da (GE-Healthcare, 2007c, 2011). Injeksjonsloop vart brukt for å sette prøvemateriale på kolonnen (GE-Healthcare, 2007d).

Reagensar

- Reinsa vatn
- 1 M Natriumhydroksid (NaOH)
- 20 % Etanol

Utstyr

- Kolonne:
 - HiLoad 26/600-kolonne med Superdex 200 prep grade kolonnemateriale (GE Healthcare Life Sciences)
 - Volum: 320 ml.
 - Kolonnetrykk max: 0,5 MPa
- ÄKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) med
 - Injeksjonsloop: Superloop, 10 ml (GE Healthcare Life Sciences)
 - Fraksjonssamlar: Frac-900 med 10 ml fraksjonsrøyr
 - Programvare: Unicorn 4.0
- Mikrofilter, 0,45 µm membran
- Sprøyte, 10 ml
- pH-papir

Føresetnader

- Metode for eluering:
 - Hastighet: 1 ml/min
 - Injeksjonsstorleik (prøve): 8–9 ml (10 mg/ml)
 - Elueringslengde: 1,8 kolonnevolum (CV)
 - Fraksjonssamlar starta opp etter 0,3 CV og samla 1,5 CV
 - Fraksjonsstorleik: 10 ml (48 fraksjonar)

Prosedyre

1. Det vart brukt ei tidlegare pakka kolonne. Den vart sett til temperering i 24 timer.
2. Kolonnen vart vaska med 3,5 CV reinsa vatn.
3. Superloopen vart vaska og klargjort (fylt med vatn).
4. Det vart laga ein metode for køyring av prøve (sjå føresetnader) og for vasking av kolonnen.

5. Superloopen og kolonnen vart vaska mellom kvar prøve. Superloopen vart vaska med ca. 15 ml reinsa vatn. Kolonnen vart vaska med 1,5 CV reinsa vatn.

Påføring og eluering av prøver

6. Prøvematerialet vart vege opp og løyst med reinsa vatn til 10 mg/ml. Deretter vart den filtrert gjennom filter, 0,45 µm, og påført kolonnen gjennom superloop.
7. Prøven vart eluert og samla i fraksjonar etter tillaga metode.
8. Fenol-svovelsyretesten vart brukt til å bestemme karbohydratinnhaldet og slå saman fraksjonsrøyr til fraksjonar (metode 4.3.1.)

Vask og konservering av kolonne

9. Kolonnen vart vaska med 1 CV 1 M NaOH for å få ut salt og stoff som sit fast i kolonnen.
10. Deretter vart kolonnen vaska med reinsa vatn til pH var nøytral, totalt 6 CV.
11. Til slutt vart kolonnen konserverert med 2 CV 20 % etanol og sett på kjølerom.

4.2.1.2. BioGel P30

BioGel P30 er ein matriks som består av polyakrylamid-perler. Den gir separasjon i molekylvektsområde 2 500 til 40 000 Da. Injeksjonsloop vart brukt for å sette prøvemateriale på kolonnen (Bio-Rad, 2000).

Reagensar

- Reinsa vatn
- 0,05 % Natriumazid (NaN_3)

Utstyr

- Kolonne:
 - C26/100-kolonne (GE Healthcare Life Sciences) med Bio-Gel P30 kolonnemateriale (Bio-Rad)
 - Volum: 318 ml
 - Kolonnetrykk max: 0,1 MPa
- ÄKTA FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) med
 - Injeksjonsloop: Superloop, 10 ml (GE Healthcare Life Sciences)
 - Fraksjonssamlar: Frac-900 med 10 ml fraksjonsrøyr
 - Programvare (Unicorn 4.0)

- Mikrofilter, 0,45 µm membran
- Sprøyte, 10 ml

Føresetnader

- Metode for eluering:
 - Hastighet: 0,5 ml/min
 - Injeksjonsstorleik (prøve): 9 ml
 - Elueringslengde: 1,4 kolonnevolum (CV)
 - Fraksjonssamlar starta opp etter 0 CV
 - Fraksjonsstorleik: 5 ml (95 fraksjonar)

Prosedyre

1. Det vart brukt ei tidlegare pakka kolonne. Den vart sett til temperering i 24 timer.
2. Kolonnen vart vaska med 2 CV reinsa vatn.
3. Superloopen vart vaska og klargjort (fylt med vatn).
4. Det vart laga ein metode for køyring av prøve (sjå føresetnader) og for vasking av kolonnen.
5. Superloopen og kolonnen vart vaska mellom kvar prøve. Superloopen vart vaska med ca. 15 ml reinsa vatn. Kolonnen vart vaska med 1,6 CV reinsa vatn.

Påføring og eluering av prøver

6. Prøvematerialet, 9 ml, vart filtrert gjennom filter, 0,45 µm og påført kolonnen gjennom superloop.
7. Prøven vart eluert og samla i fraksjonar etter tillaga metode.
8. Fenol-svovelsyretesten vart brukt til å bestemme karbohydratinnhaldet og slå saman fraksjonsrøyr til fraksjonar (metode 4.3.1.)

Vask og konservering av kolonne

9. Kolonnen vart vaska med 2 CV reinsa vatn.
10. Til slutt vart kolonnen konservert med 2 CV NaN₃ og sett på kjølerom.

4.2.1.3. PD-10 desaltingskolonne

PD-10 desaltingskolonne er ferdigpakka med Sephadex G-25 medium og gir rask separasjon av høgmolekylære stoff frå lågmolekylære stoff i små volum. Den vart nytta som alternativ til dialyse for å reinse vekk salt og andre lågmolekylære stoff frå prøver med molekylvekt over 5000 Da (GE-Healthcare, 2007b).

Reagensar

- Reinsa vatn
- 20 % Etanol

Utstyr

- Kolonne:
 - PD-10 desaltingskolonne (GE Healthcare)
 - Volum: 8,3 ml
- Reservoar: Fraksjonsrøyr med hol
- Oppsamlingsrøyr: Eppendorf-røyr
- Mikrofilter, 0,45 µm membran
- Sprøyte, 10 ml

Føresetnader

- Påført volum: 2,5 ml
- Elueringsvolum: 3,5–6 ml
- Fraksjonsstorleik: 1 ml

Prosedyre

- Hetta på toppen av kolonnen vart fjerna og væska fekk renne gjennom kolonnen.
- Kolonnen vart vaska med 25 ml reinsa vatn.

Påføring og eluering av prøver

- Det vart sett på prøve og den rant gjennom matriksen.
- Det vart eluert med reinsa vatn og dette vart samla i eppendorf-røyr.
- Kolonnen vart vaska med 10 ml reinsa vatn mellom kvar prøve.

- Dersom det var meir enn 2,5 ml prøve, vart trinn 3–5 gjentatt.
- Karbohydratprofil vart evt. bestemt ved fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.1)

Vask og konservering av kolonne

- Kolonnen vart vaska med 25 ml reinsa vatn.
- Til slutt vart kolonnen konservert med 10 ml 20 % etanol og sett i kjøleskap.

4.2.2 Affinitetskromatografi

Affinitetskromatografi separerer stoff basert på interaksjon mellom stoffet og ein spesifikk ligand som sit i matriksen. Stoffet vert eluert ut ved å reversere interaksjonen; det kan gjerast ved ein kompetitiv ligand eller ved å endre pH, ionestyrke eller polaritet (GE-Healthcare, 2007a).

4.2.2.1 Con A Sepharose

Concanavalin A (Con A) er eit lektin som bind molekyl som inneheld kjeder med mannose eller terminal mannose eller glukose. Con A Sepharose er bunde til Sepharose 4B, krysslinka agarose (GE-Healthcare, 2007a).

Reagensar

- Con A Sepharose
- Bindingsbuffer (pH 7,4):
 - 20 mM Tris-HCl ((Hydroksymetyl) Aminometan Hydroklorid)
 - 0,5 M Natriumklorid (NaCl)
 - Reinsa vatn
- Elueringsbuffer (pH 7,4):
 - 0,2 M α -metyl-D-Mannose
 - 20 mM Tris-HCl ((Hydroksymetyl) Aminometan Hydroklorid)
 - 0,5 M Natriumklorid (NaCl)
 - Reinsa vatn

Utstyr

- Kolonne med Con A Sepharose, Volum: 6 ml
- Oppsamlingsrøyr

- Mikrofilter, 0,45 μm membran
- Sprøyte, 10 ml

Prosedyre

- Con A Sepharose vart romtemperert før pakking.
- Con A Sepharose vart blanda med reinsa vatn for å lage ei resin-slurry til å pakke kolonnen. Det vart evakuert luft frå slurryen ved bruk av pumpe.
- Slurryen vart overført til kolonnen, forsiktig for å unngå luftbobler. Væska rant gjennom. Deretter vart det helt over 3–5 CV bindingsbuffer til kolonnehøgda var konstant.

Påføring og eluering av prøver

- Prøven vart vege opp og løyst til 1 mg/ml og filtrert 0,45 μm .
- Prøveløysinga vart helt oppi kolonnen.
- Det vart først eluert med bindingsbuffer, 10 CV, fraksjon 1.
- Deretter vart det eluert med 10 CV elueringsbuffer, fraksjon 2.
- Fraksjonane vart dialysert (metode 4.1.4.) før inndamping og frysetørking.
- Kolonnematerialet vart kasta etter bruk.

4.2.3 Enzymatisk degradering

Degradering med enzym vart nytta for å isolere forgreina områder på pektinet (RG-I) og spalte av arabinanar og AG-II frå RG-I (Paulsen og Barsett, 2005; Yamada og Kiyohara, 2007).

Endo-poly-polygalakturonase (*endo*-PG, EC 3.2.1.15) kløyver α -1,4-D-galakturonan-bindingar i HG-område og gir oligo-galakturonatar. Slik vert RG-I spalta av pektinet. *Endo*-PG spalter midt i molekylet og føretrekk de-estrisert galakturonan. Pektinase frå Novozyme inneheld pektintranseliminase (PGL) og pektinesterase (PE, EC 3.1.1.11) i tillegg til *endo*-PG. PE hydrolyserer metylester frå HG-område. PGL gir ikkje-hydrolytisk, transeliminativ spalting av pektin (BRENDA, 2015a, b; Jayani *et al.*, 2005; Voragen *et al.*, 2009).

α -L-arabinofuranosidase (arafase, EC 3.2.1.55) spalter arabinan og arabinogalaktan-kjeder og *exo*- β -1,3-galaktanase (galaktanase, EC3.2.1.145) spalter β -1,3-gaalaktan-rygggrad i AG-II-kjeder frå ikkje-reduserande ende og frigir kjeder av arabinogalaktan (BRENDA, 2015c, d).

4.2.3.1. Pektinase

Reagensar

- Pektinase (*Aspergillus aculeatus*), 3 800 U/ml
- Reinsa vatn
- 50 mM natriumacetatbuffer, pH 4

Utstyr

- Vekt
- Drammeglas med perforert lokk
- Pipette
- Vassbad med flytevest og klype
- Mikrofilter, 0,45 µm membran
- Inkubatorskap

Føresetnader

- pH 4
- Inkubering ved risting, 37 °C.

Prosedyre

- Acetatbuffer, 50 mM, vart laga.
- Prøvene vart vege opp og løyst med 50 mM acetatbuffer til konsentrasjonen 5 mg/ml.
- Pektinase, 2 µl, vart tilsett og prøven vart inkubert (sjå føresetnader) i 24 timer.
- Degraderinga vart stoppa ved å varme blandinga til 100 °C i 2–5 minutt. Blandinga vart deretter avkjølt, filtrert og vidare fraksjonert med BioGel P30.

4.2.3.2. *Endo*-polygalakturonase

Reagensar

- *Endo*-polygalakturonase (*Aspergillus aculeatus*), 280 U/mg
- Reinsa vatn
- 50 mM ammoniumacetatbuffer, pH 5

Utstyr

- Vekt
- Drammeglas med perforert lokk
- Pipette
- Vassbad med flytevest og klype
- Mikrofilter, 0,45 µm membran
- Inkubatorskap

Føresetnader

- pH 5
- Inkubering ved risting, 40 °C, 20 timer.

Prosedyre

- Acetatbuffer, 50 mM, vart laga.
- Prøvene vart vege opp og løyst med 50 mM acetatbuffer til konsentrasjonen 5 mg/ml.
- Enzymet, 10 µl, vart tilsett og prøven vart inkubert (sjå føresetnader).
- Degraderinga vart stoppa ved å varme blandinga til 100 °C i 2–5 minutt. Blandinga vart deretter avkjølt, filtrert og vidare fraksjonert med BioGel P30.

4.2.3.3. Alfa-L-arabinofuranosidase og *exo*-beta-1,3-galaktanase

Reagensar

- Alfa-L-arabinofuranosidase (*Aspergillus niger*), 250 U/ml
- *Exo*-β-1,3-galaktanase (*Clostridium thermocellum*), 40 U/ml
- Reinsa vatn
- 50 mM ammoniumacetatbuffer, pH 5

Utstyr

- Vekt
- Drammeglas med perforert lokk
- Pipette
- Vassbad med flytevest og klype
- Mikrofilter, 0,45 μm membran
- Inkubatorskap

Føresetnader

- pH 5
- Inkubering ved risting, 40 °C, 2 × 24 timar.

Prosedyre

- Acetatbuffer, 50 mM, vart laga.
- Prøvene vart vege opp og løyst med 50 mM acetatbuffer til konsentrasjonen 5 mg/ml.
- Det vart tilsett 50 μl per 1ml prøve arafase og 10 μl neste dag og 30 μl galaktanase og 5 μl neste dag og prøven vart inkubert (sjå føresetnader).
- Degraderinga vart stoppa ved å varme blandinga til 100 °C i 2–5 minutt. Blandinga vart deretter avkjølt, filtrert og vidare fraksjonert med PD-10-kolonne.

4.3 Kvalitativ og kvantitativ bestemming av karbohydratinnhald

4.3.1 Fenol-svovelsyretesten

Fenol-svovelsyretesten er ein kolometrisk metode som vart nytta for å bestemme karbohydratinnhald. Når karbohydrat reagerer med svovelsyre, vert det danna furfuraldehyd. Når furfuraldehyd reagerer med fenol, vert det danna eit gulfarga kondensasjonskompleks. Når fenolkonsentrasjonen er konstant, er intensiteten proporsjonal med mengde karbohydrat (Dubois *et al.*, 1956).

Reagensar

- 95 % Svovelsyre (H_2SO_4)
- 4 % Fenol

Utstyr

- Reagensrøyr av glas, 5 ml
- Pipette, *air displacement* og *positiv displacement*
- Virvlar i avtrekksskap
- Mikrotiterplater, 96 flate brønner
- Mikroplate-absorbans-lesar: iMark modell 3550 (Bio-Rad)
- Verneutstyr: Lange hanskar og vernebriller

Føresetnader

- Absorbans målt ved 490 nm.

Prosedyre

1. Det vart overført 100 μ l av kvart fraksjonsrøyr til kvar sine reagensrøyr. Det vart tilsett 200 μ l fenol og 1 ml svovelsyre til reagensglaset og virvla godt på virvlar, deretter stod dei i ro i 30 minutt. Dersom det var lite prøveløysing, vart det nytta 25 μ l prøve, 50 μ l fenol og 200 μ l svovelsyre.
2. Det vart overført 100 μ l av kvar reagensrøyr til brønn i mikrotiterplata.

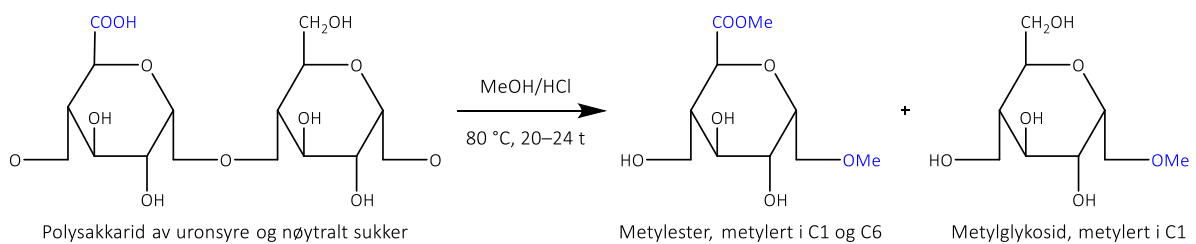
3. Absorbans vart målt og basert på absorbans-spreiingsplot vart fraksjonsrøyr slått saman til fraksjonar.

4.3.2 Metanolyse, silylering, gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) er ei kromatografisk separasjonsmetode for stoff som kan derivatiserast til termisk stabile og flyktige stoff, og kan dermed nyttast til å bestemme innhald av monosakkarid i ein prøve som inneheld polysakkarid. Glykosidbindingane mellom monosakkarida vert først spalta med metanolyse. Metanolysert prøve vert deretter silylert for å gjera monosakkarida flyktige før påføring på GC-kolonne (Chambers og Clamp, 1971; Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010; Sweeley *et al.*, 1963).

4.3.2.1. Metanolyse

For å analysere innhaldet av monosakkarid med GC, må glykosidbindingane mellom monosakkarida først spaltast, enten ved hydrolyse eller metanolyse. Ved metanolyse vart saltsyre i vassfri metanol nytta, og ein får metylglykosid av nøytrale sukker og metylester av uronsyrer, sjå figur 4.1. Det vart nytta vassfri metanol for å unngå dekomponering av monosakkarida. For å korrigere for eventuelle tap under metanolysen, vart mannitol i kjend konsentrasjon nytta som intern standard (Chambers og Clamp, 1971).



Figur 4.1. Metanolyse av surt polysakkarid. Nøytrale sukre blir metylglykosid og uronsyrer blir metylestre.

Reagensar

- Intern standard: Mannitol i vassfri metanol, 1 mg/ml
- 3 M HCl i vassfri metanol
- Metanol, vassfri

Utstyr

- Supelcorøyr med lokk
- Pipette 100 µl / 250 µl
- Pasteurpipette i glas med gummismokk, 1 ml
- Parafilm og kanyle
- Eksikator med blågel
- Vekt
- Evaporator med varmemodul og nitrogen (Pierce Reacti-vap III og Reacti-therm III, komprimert nitrogen AGA)
- Varmeskap (Heraus Function Line)

Prosedyre

Førebuing

Dag 1

1. Tørr prøve, 1 mg, vart vege inn i metanolyserøyr. Nøyaktig vekt notert.
2. Intern standard, 100 µl, (mannitol i metanol) vart tilsett ved bruk av pipette.
3. Prøven vart dampa inn til tørreik under nitrogengass.

Metanolyse

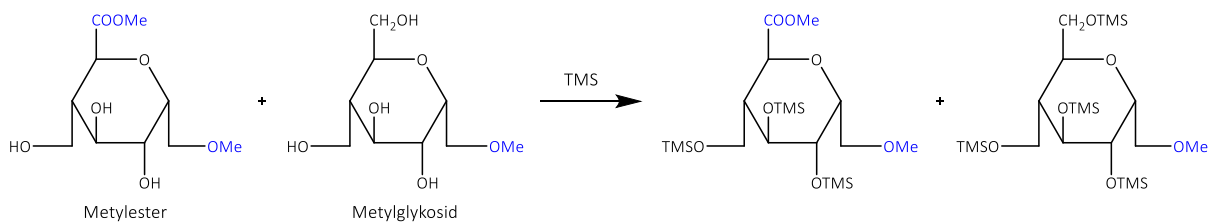
4. 3M HCl i vassfri metanol, 1 ml, vart tilsett til prøven med pasteurpipette med gummismokk.
5. Lokket på metanolyserøyrret vart skrudd fast og metanolyserøyrret vart sett i varmeskap ved 80 °C i 20–24 timer. Etter 10 minutt vart overtrykk fjerna ved å skru opp lokket og deretter skru lokket godt på for å unngå fordamping.

Dag 2

6. Prøven vart tatt ut av omnen og dampa inn til tørreik under nitrogengass.
7. HCl i vassfri metanol vart vaska vekk ved å tilsette 250 µl vassfri metanol til metanolyserøyrret, og deretter dampa inn til tørreik under nitrogengass. Dette vart gjort 3 gonger. Siste gongen var prøven heilt tørr.
8. Tørr prøve vart dekket med perforert parafilm og oppbevart i eksikator i minst 1 time før TMS-derivatisering.

4.3.2.2. Silylering

Monosakkarid er lite flyktige på grunn av polare hydroksylgrupper, og er derfor ikke godt eigna til analyse ved gasskromatografi. Ved silylering (TMS-derivatisering) vert monosakkarida flyktige og kan analyserast med GC. Trimetylsilan, TMS, reagerer med hydroksylgruppene i monosakkarida og danner flyktige og termisk stabile monosakkaridderivat, sjå figur 4.2. (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010; Sweeley *et al.*, 1963).



Figur 4.2. TMS-derivatisering av metylglykosider og metylesterar. TMS-reagerer med hydroksylgruppene i monosakkarida og danner flyktige og termisk stabile monosakkaridderivat.

Reagensar

- TMS, vassfri

Utstyr

- Transferpettor, 100 µl (BRAND)
- Eppendorf-røyr
- Virvlar: MS2 Minishaker (IKA)
- Sentrifuge mini (LABNET)

Prosedyre

1. Vassfri TMS, 100 µl, vart tilsett metanolysert prøve.
2. Lokket vart sett på og metanalyserøyrret virvla i 30–40 sekund.
3. Metanalyserøyrret med prøve og TMS stod i romtemperatur i minst 15 minutt, og vart deretter overført til eppendorf-røyr og sentrifugert til klar supernatant.

4.3.2.3. Gasskromatografi

Silylert prøve vart injisert i oppvarma injektor ved starten av GC-kolonnen, og fordampar straks. Prøven vert frakta med mobil fase (bæregass) gjennom kolonnen. Prøven vil fordele seg ulikt mellom mobil fase og stasjonær fase. Dei molekyla med minst affinitet til stasjonærfasen vil gå raskast gjennom kolonnen. Ved utgangen av kolonnen er det ein detektor som detekterer molekyla etter kvar som dei kjem ut. Slik vert monosakkarida separert og detektert (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, 2010).

Reagensar

- Heksan
- Metanol

Utstyr

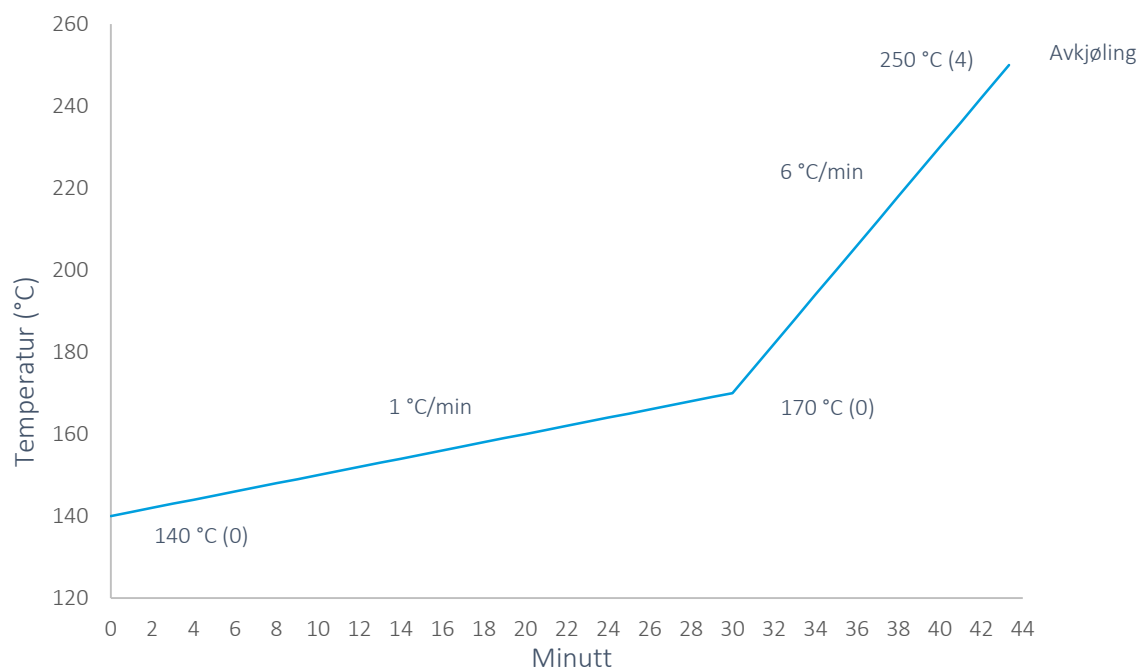
- Gasskromatograf: Thermo Scientific Focus GC
- Programvare: Chromeleon, versjon 6.80 (Dionex)
- Sprøyte

Analysevilkår

- Detektor: Flammeionisasjon (FID)
- Bæregass: Helium
- Kolonne: Restek-Rxi 5MS (fused silika kapillærkolonne)
Lengde: 30 m, indre diameter: 0,32 mm, filmtjukkuleik: 0,25 µm
- Injektor temperatur: 250 °C
- Detektor temperatur: 300 °C
- Injeksjonssystem: Splitt (ratio: 1/10)
- Injeksjonsvolum: 1 µl (manuell)
- Flow-modus: konstant trykk (0,7 bar)
- Temperaturprogram: Sjå figur 4.3

Prosedyre

1. Programvare og GC vart starta etter lokal prosedyre.
2. Prøveløysing, 1 μ l, vart injisert på GC-kolonnen.
3. Sprøyta vart vaska grundig med heksan og metanol før og etter bruk.



Figur 4.3. Temperaturprogram GC.

4.4 Strukturoppklaring

4.4.1 Bestemming av molekylvekt

Molekylvekt vart bestemt ved bruk av Diol-300-kolonne. Dette er ei SEC-kolonne (metode 4.2.1) for HPLC. Matriksen er ein silikagel og den er eigna til å separere molekyl mellom 10 000 og 1 000 000 Da. Det vart laga standardkurver ved hjelp av dekstran med kjend molekylvekt, og desse vart nytta til å finne distribusjon av molekylvekt i fraksjonane (YMC, 2015).

Reagensar

- 50 mM Natriumsulfat (Na_2SO_4)-buffer, pH 6
- Reinsa vatn
- Metanol

Utstyr

- Kolonne:
 - YMC-Pack Diol-SEC-300
 - Volum: 14 ml
 - Kolonnetrykk max: 100 bar
- HPLC: VWR Hitachi EliteLaChrom med pumpe, autosampler og programvare
- Detektor: RI
- Programvare: EZChrome Elite
- Vialer 1,5 ml (VWR)
- Filter: 0,45 μm

Føresetnader

- Metode for eluering:
 - Hastighet: 0,8 ml/min
 - Injeksjonsstorleik: 0,1 ml
 - Temperatur: 25–40 °C
 - Elueringstid: 40 minutt

Prosedyre

1. Pumpa vart vaska med reinsa vatn 0,5 ml/min i 1 minutt.
2. Kolonnen vart kondisjonert med reinsa vatn 0,5 ml/min i 1 time, deretter 0,8 ml/min i 30 minutt.
3. Cella i detektor vart skylt i 30 sekund 3 gonger.
4. Kolonnen vart kondisjonert med buffer 1 ml/min i 1 time
5. Cella i detektor vart skylt i 30 sekund eit 4 gonger.
6. Metode og sekvens vart laga.

Eluering av prøve

7. Prøvematerialet vart løyst i buffer 2 mg/ml og filtrert 0,45 µm over i vialer
8. Vialene vart sett i maskina og sekvens køyrt. Siste vial er reinsa vatn.

Vask og konservering

9. Kolonnen vart vaska med reinsa vatn, 10 CV, 0,8 ml/min i ca. 3 timer
10. Kolonnen vart deretter konservert med 50 % metanol, 3 CV, 0,7 ml/min i 1 time
11. Pumpa vart skylt med reinsa vatn og deretter 20 % metanol.

4.4.2 Atomkraftmikroskop

Atomkraftmikroskopi (AFM) vart nytta til å visualisere pektin og studere aggregering.

Reagensar

- Reinsa vatn

Utstyr

- Objektglas
- Dekkglas
- Mica
- Neglelakk
- Tape
- Nitrogengass

- Atomkraftmikroskop: JPK NanoWizard II (JPK Instruments AG, Tyskland)
- Silikon cantilever: Ultrasharp silicon probes, NSC35/AIBS (MicroMasch)
- Programvare: JPK Image processing program (JPK instruments AG, Tyskland)

Prosedyre

Tillaging av preparat

1. Mica vart festa på objektglas med neglelakk og tørka. Brukte mica-plater vart strippa med teip.
2. Prøven vart løyst i reinsa vatn til konsentrasjon 1 mg/ml og vidare fortynna til 10 µg/ml.
3. 10 µl prøve vart påført mica-plata og tørka med nitrogengass, kjemma med reine dekkglas.

Visualisering av prøven

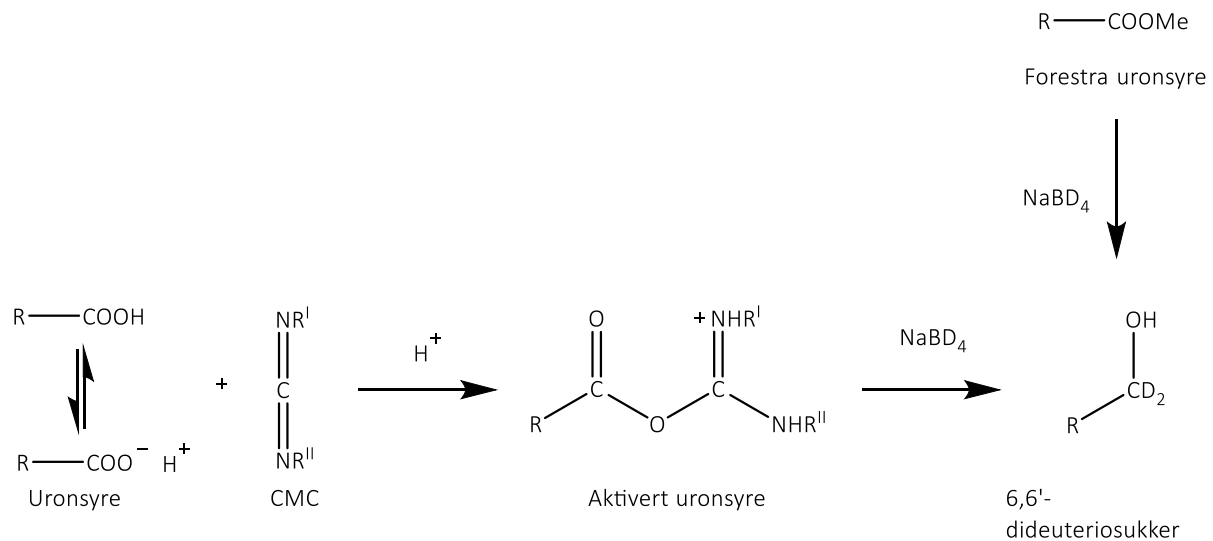
4. Prøven vart visualisert med atomkraftmikroskop ved intermittent mode i luft og med silikon cantilever, i samarbeid med Kari Tvette Inngjerdingen og Ingvild Austarheim ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo.

4.4.3 Karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon, acetylering, GC-MS

Gasskromatografi med massespektrometri (GC-MS) vart nytta for å bestemme bindingsform og ringform til monosakkarida. Før prøvene vart analysert med GC-MS vart det gjort karboksylsyre-reduksjon av uronsyrer og frie hydroksylgrupper vart deretter metylert. Hydroksylgrupper som inngår i glykosidbindingar vart hydrolysert, redusert og acetylert til delvis metylerte aldol-acetat (PMAA) som kan analyserast på GC-MS (Pettolino *et al.*, 2012).

4.4.3.1 Karboksylsyre-reduksjon før metylering

For å kunne detektere uronsyrer på GC-MS må dei først reduserast til nøytrale 6,6'-deuteriosukker, sjå figur 4.4. Dette vart gjort ved å først aktivere med carboimid (CMC) før reduksjon med natrium-bordeuterid (NaBD₄). Ved analyse på GC-MS kan desse skiljast frå nøytrale sukke fordi dei har ei større masse ($M^+ + 2$), men kan ikkje skiljast frå metylforestra uronsyrer (Kim og Carpita, 1992; Pettolino *et al.*, 2012).



Figur 4.4. Aktivering og reduksjon av karboksylsyregruppe, og reduksjon av forestra urnsyre.

Reagensar

- 0,5 M Imidazol-HCl
- Natriumbordeuterid (NaBD₄)Iseddik
- 0,2 M MES (2-(N-Morpholino)etan-svovelsyre)
- Carboiimid (CMC)
- 2 M Tris(hydroksymetyl) aminometan (TRIZMA)
- 0,05 M Natriumhydroksid (NaOH)
- Reinsa vatn

Utstyr

- Glasrøyr med skrukork (medium og store)
- Vekt (Sartorius Praxium 213-1S)
- Pipette
- Virvlar: MS2 Minishaker (IKA)
- Dialyseslangar: Spectra/Por Dialysis Membrane, Standard RC Tubing, MWCO: 3,5 kD (Spectrum Laboratories) eller PD-10-kolonne, Sephadex G-25 M (GE Healthcare)
- Vakuu-evaporator: SpeedVac Savant SPD121P med Vapornet Savant VN100, Refrigerated vaportrap RVT4101 og Vacuume pump OFP 400 (Thermo Scientific)

- Is
- pH-papir (Whatman)
- Frysetørkar (Alpha 1-4 LD Plus)

Prosedyre

(Dag 1)

1. 1 mg prøve vart vege opp i glasrøyr (medium) med skrukork og løyst i 5 ml 0,5 M iskald imidazol-HCl
2. Prøven vart redusert ved å tilsette 1 ml (300 µl + 300 µl + 400 µl) nylaga 100 mg/ml NaBD₄ i imidazol-HCl. Løysinga vart miksa godt etter kvar tilsetjing, og sett på is i 5 minutt etter dei to første tilsetjingane og i 30 minutt etter den tredje tilsetjinga.
3. Overskot reduktant vart øydelagt ved langsam tilsetjing av iseddik (5 × 100 µl) og det vart kontrollert at pH var under 7 med pH-papir.
4. Prøven vart sett på PD-10-kolonne (metode 4.2.1.3.).
5. Prøven vart vakuum-tørka på SpeedVac til 1 ml og frysetørka over natta (metode 4.1.6.)

Dag 2

6. Prøven vart løyst i 1 ml reinsa vatn og tilsett 200 µl 0,2 M MES og 400 µl nylaga 500 mg/ml carboimid i reinsa vatn. Løysinga vart miksa godt og inkubert i 3 timar ved 25–30 °C.
7. 1 ml 2 M TRIZMA vart tilsett og prøven avkjølt på is i 5–6 minutt.
8. 1 ml nylaga 70 mg/ml NaBD₄ i 0,05 M NaOH vart tilsett og inkubert natta over ved 4 °C.

Dag 3

9. Overskot reduktant vart øydelagt ved langsam tilsetjing av iseddik (5 × 100 µl).
10. Prøven vart dialysert i 24 timar mot reinsa vatn (metode 4.1.4.).

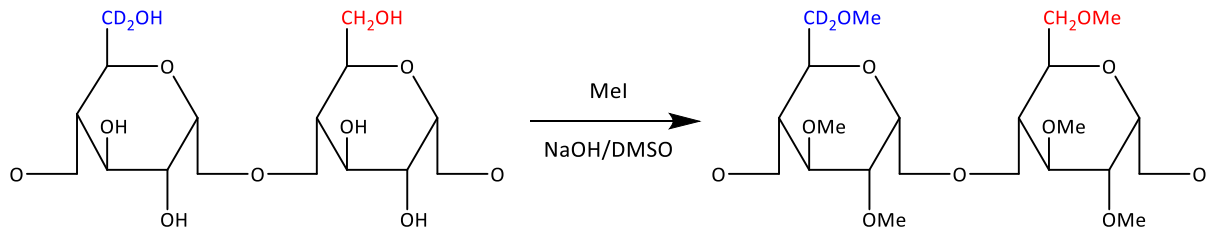
Dag 4

11. Prøven vart vakuum-tørka på SpeedVac til 1 ml og frysetørka i store glasrøyr.

4.4.3.2. Metylering

I metyleringa vart frie hydroksylgrupper i polysakkarida metylert. Hydroksylgruppene som inngår i glykosidbindingane vert ikkje metylert, og difor kan dei differensierast i analysen. Det vert danna karbanion av dimetylsulfoksid (DMSO) ved sterkt basisk miljø. OH-ion og DMSO-karbanionet ioniserer frie hydroksylgrupper. Dermed vert det danna polyalkosyon som reagerer med

metyljodid og gir metylerte karbohydratpolymere, sjå figur 4.5. (Ciucanu og Kerek, 1984; Pettolino *et al.*, 2012).



Figur 4.5. Metylering av hydroksylgrupper i polysakkaridet.

Reagensar

- Metanol, vassfri
- Dimetylsulfoksid (DMSO)
- Natriumhydroksid pellets (NaOH)
- Metyljodid (MeI)
- Natriumtiosulfat
- Reinsa vatn
- Diklormetan (DKM)

Utstyr

- Glasrøyr med skrukork (små)
- Risteapparat: Vibrax-vxr (IKA)
- Agatmorter og pistill
- Pipette
- Transferpettor, 500 μ l (BRAND)
- Pasteurpipette i glas med gummismokk
- Evaporator med varmemodul og nitrogen (Pierce Reacti-vap III og Reacti-therm III, komprimert nitrogen AGA)
- Virvlar: MS2 Minishaker (IKA)
- Sentrifuge (MSE)

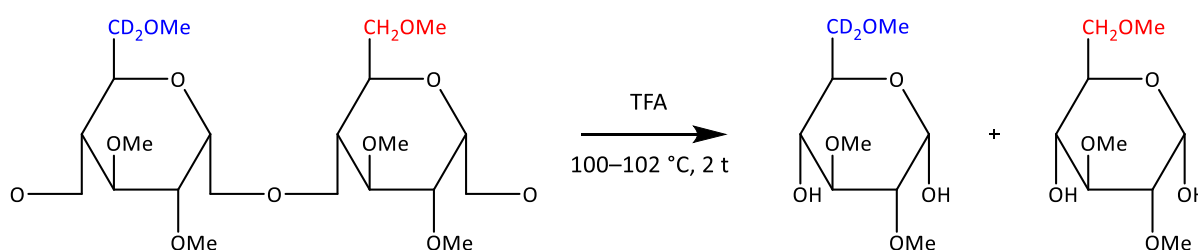
Prosedyre

Dag 5

1. Frysetørka prøve frå karboksylsyre-reduksjonen (metode 4.4.3.1) vart dehydrert ved tilsetjing av 200 μ l vassfritt metanol som vart blåst av med nitrogengass.
2. DMSO, 500 μ l, vart tilsett, kork sett på og prøven rista ved 200 rpm i 20 minutt for å løyse glykan.
3. Det vart laga ein suspensjon (slurry) av NaOH-pellets i DMSO (2 pellets/ml gir ca. 120 mg/ml) ved hjelp av agatmorter og pistill.
4. 500 μ l DMSO/NaOH vart tilsett prøveløysinga med transferpettor
5. Prøven vart blåst med nitrogengass og sett på risteapparat i 30 minutt.
6. 100 μ l MeI vart tilsett i avtrekk og prøven vart rista ved 200 rpm i 10 minutt.
7. Punkt 6 vart gjentatt.
8. 200 μ l MeI vart tilsett i avtrekk og prøven vart rista ved 200 rpm i 20 minutt.
9. 10 ml nylaga 100 mg/ml natriumtiosulfat i reinsa vatn og 2 ml DKM vart tilsett og kork sett på.
10. Prøven vart virvla i 40 sekund og deretter sentrifugert i 5 minutt for å separere fasane.
11. Vassfasen (den øvste fasen) vart dekantert av ved hjelp av pasteurpipette i glas og kasta.
12. DKM-fasen (den nedste fasen) vart vaska av med 4×5 ml reinsa vatn, virvla og sentrifugert.
13. DKM-fasen vart overført til små glasrøyr og dampa inn under nitrogengass.

4.4.3.3. Hydrolyse

Ved sur hydrolyse vart glykosidbindingane mellom monosakkarida spalta, sjå figur 4.6. (Pettolino *et al.*, 2012).



Figur 4.6. Sur hydrolyse av glykosidbindingane gir monosakkarid.

Reagensar

- 2,5 M Trifluoreddiksyre (TFA)

Utstyr

- Pipette
- Varmeskap (Heraeus Instruments / Function Line)
- Evaporator med varmemodul og nitrogen (Pierce Reacti-vap III og Reacti-therm III, komprimert nitrogen AGA)
- Vakuu-evaporator: SpeedVac Savant SPD121P med Vapornet Savant VN100, Refrigerated vaportrap RVT4101 og Vacuum pump OFP 400 (Thermo Scientific)

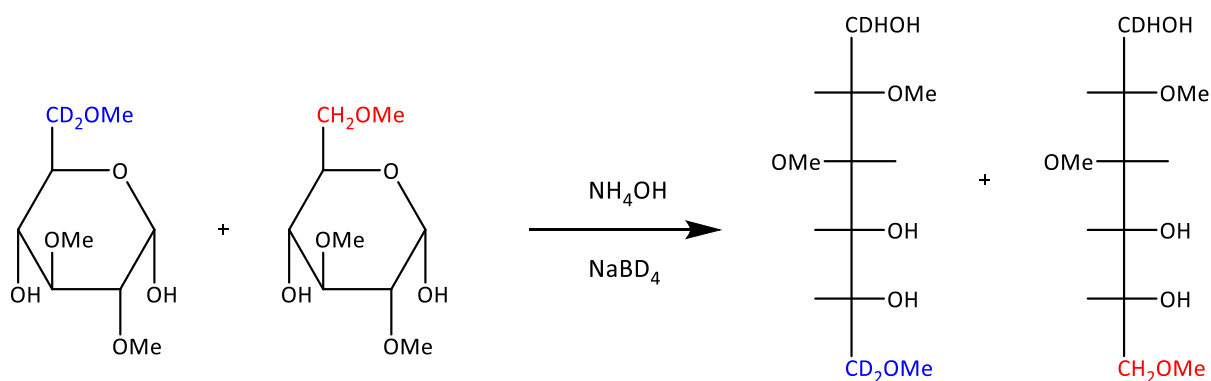
Prosedyre

Dag 6

1. 2,5 M TFA, 500 μ l, vart tilsett metylert prøve (metode 4.4.3.2.), og bobla gjennom med nitrogengass i 5–10 sekund.
2. Prøven vart hydrolysert i 2 timer ved 100–102 $^{\circ}$ C. Etter 10 minutt vart det sjekka at korken sat fast.
3. Prøven vart avkjølt og vakuu-tørka med SpeedVac til den var heilt tørr (0,5 timer med overheat).

4.4.3.4. Reduksjon

Dei delvis metylerte monosakkarida vart redusert i basisk miljø med natrium-bordeuterid, dermed vart ringen opna og C1 merka med deuterium. Informasjon om anomerisk konfigurasjon går tapt i dette trinnet, sjå figur 4.7. (Pettolino *et al.*, 2012).



Figur 4.7. Reduksjon med $NaBD_4$ opnar ringen og merker C1 med deuterium.

Reagensar

- 2 M Ammoniakk (NH_3)
- 1 M Natriumbordeuterid (NaBD_4)
- Iseddik
- 5 % Eddiksyre i metanol
- Metanol

Utstyr

- Vekt, Sartorius Practum 213-1S
- Pipette
- Ultralydbad: Ultrasonic cleaner (VWR)
- Varmeskap (Heraeus Instruments / Function Line)
- Vakuum-evaporator: SpeedVac Savant SPD121P med Vapornet Savant VN100, Refrigerated vaportrap RVT4101 og Vacuum pump OFP 400 (Thermo Scientific) eller Evaporator med varmemodul og nitrogen (Pierce Reacti-vap III og Reacti-therm III, komprimert nitrogen AGA)

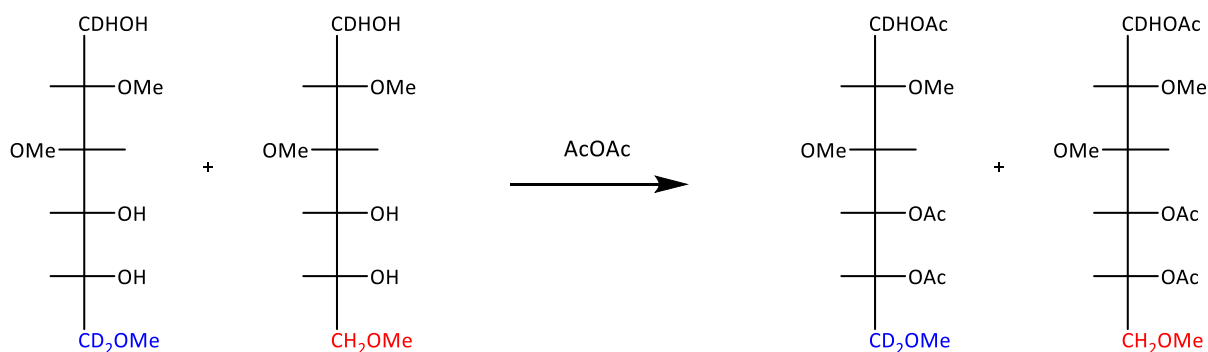
Prosedyre

Dag 7

1. Residuet frå hydrolysen (metode 4.4.3.3.) vart løyst i 500 μl 2M NH_4OH .
2. 1 M NaBD_4 i 2 M NH_4OH vart laga til.
3. 1 M NaBD_4 i 2 M NH_4OH , 500 μl , vart tilsett prøven.
4. Løysinga vart sett på ultralydbad i 1 minutt og deretter inkubert ved 60 °C i 1 time.
5. Overskot reduktant vart øydelagt med $3 \times 50 \mu\text{l}$ iseddik.
6. Prøven vart tørka med SpeedVac (1,5 t m/ overheat).
7. 5 % eddiksyre i metanol, 2,5 ml, vart tilsett og tørka på SpeedVac (30 minutt m/overheat).
8. Punkt 7 vart gjentatt (20 minutt m/ overheat)
9. Metanol, 2,5 ml, vart tilsett for å fjerne borsyre og tørka på SpeedVac (20 minutt u/overheat).
10. Punkt 9 vart gjentatt. Det er viktig å fjerne all borsyra, den skal vera kvitt pulver når den er tørr.

4.4.3.5. Acetylering

Acetylering av nydanna hydroksylgrupper (involvert i glykosidbindingane) vart gjort for å auke flyktigheita til dei delvis metylerte alditolene før injeksjon i GC-MS, sjå figur 4.8. (Pettolino *et al.*, 2012).



Figur 4.8. Acetylering av karboksylsyre-reduerte av delvis metylerte polysakkarid aukar flyktigheiten før GC-MS.

Reagensar

- 1-metylimidazol
- Eddiksyreanhydrid
- Diklormetan (DKM)
- Reinsa vatn

Utstyr

- Pipette
- Store metyleringsrøyr
- Supelco-røyr (Supelco)
- Vialer til GC-MS
- Virvlar: MS2 Minishaker (IKA)
- Sentrifuge (MSE)
- Evaporator med varmemodul og nitrogen (Pierce Reacti-vap III og Reacti-therm III, komprimert nitrogen AGA)

Prosedyre

Dag 8

1. Residuet frå reduksjonen vart tilsett 200 μ l 1-metylimidazol. Deretter vart det tilsett 2 ml eddiksyreanhydrid.
2. Prøven vart miksa godt på virvlar, og sett til henstand i 10 minutt. Viss nødvendig vart den sett på ultralydbad for å bryte opp krystallane før henstand.
3. Overskot eddiksyreanhydrid vart øydelagt ved tilsetjing av 10 ml reinsa vatn (prøven blir varm), blanda godt og sett til henstand i 10 minutt.
4. Dei delvis metylerte og delvis acetylerede sukrene vart ekstrahert i 2×1 ml DKM, virvla i 30 sekund og sentrifugert i 5 minutt. Den nedste fasen (= DKM) vart samla kvar gong.
5. DKM-fasane vart samla og tilbakevaska med 2×5 ml reinsa vatn.
6. Diklormetan-fasen vart overført til supelcorøyr og tørka forsiktig med nitrogengass.
7. Residuet vart løyst i passe mengde DKM og analysert på GC-MS.
8. Prøven blir lagra i -20 °C.

4.4.3.6. GC-MS

Ut frå retensjonstida (GC) og massen av fragmenta (MS) kan bindingsform og ringform bestemast.

Bindingsforholdet vart rekna ut ved å sjå på forholdet av arealet av kvar binding i forhold til totalt areal av monosakkaridet multiplisert med prosentdel av monosakkaridet i prøven. Det vart tatt omsyn til at molekylstorleiken påverkar arealet i toppen.

Utstyr

- Gasskromatograf-massepektrometer: Shimadzu GC-2010 med GCMS-QP2010
- Programvare: GCMS Analysis

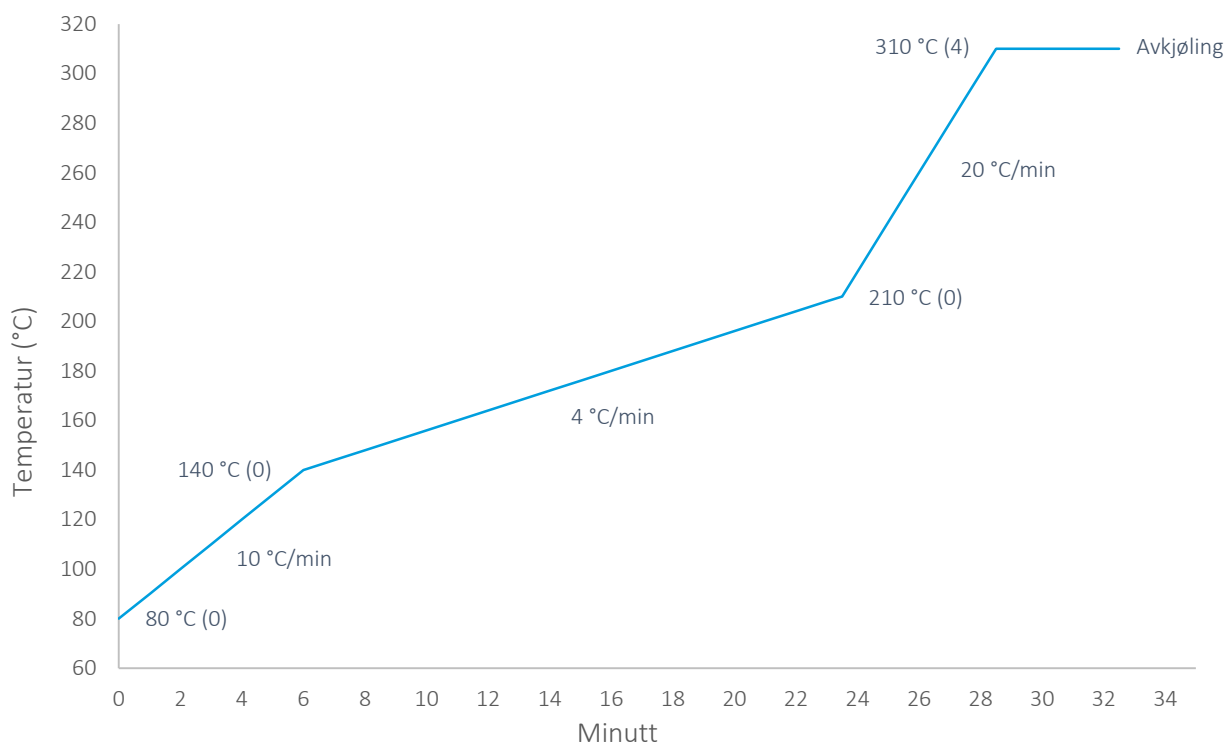
Analysevilkår

- Beregass: Helium
- Kolonne: Restek Rtx-5
Lengde: 30 m, indre diameter: 0,25 mm, filmtjukkleik: 0,25 μ m
- Injektor temperatur: 280 °C
- *Interface* detektor temperatur: 280 °C

- Ionekilde temperatur: 200 °C
- Injeksjonssystem: Splitt (1:10)
- Injeksjonsvolum: 1 µl (automatisk)
- Flow-modus: Konstant trykk (77 kPa)
- Temperaturprogram: Sjå figur 4.9.

Prosedyre

Prosedyren vart utført av Hoai Thi Nguyen Aas ved Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo.



Figur 4.9. Temperaturprogram for GC-MS.

4.5 Biologisk aktivitet

4.5.1 Komplementfiksering

Komplementfikseringstesten er ein *in vitro* hemolytisk analysemetode som gir ein indikasjon på om biologiske aktive substansar kan modulere immunsystemet via komplementsystemet. På same måte som komplementaktivering kan gi membran-angrep på bakteriar, blir erythrocyttar lysert (hemolyse). I testsystemet vart det nytta erythrocyttar frå sau (SRBC), antistoff mot erythrocyttane frå kanin og komplement frå human serum. Erythrocyttane vart gjort følsame med antistoff slik at dei kan binde seg til komplement og det kan skje hemolyse. I testen vart det nytta den konsentrasjonen av komplement som gir 50 % hemolyse av dei sensibiliserte erythrocyttane. Sjølve testen vart gjort ved å la prøvemateriale reagere med komplement og deretter la komplementet reagere med sensitiviserte blodceller og til slutt måle grad av hemming av hemolyse.

Dersom prøvematerialet aktiverer komplement, vil det forbrukast komplement. Dersom prøvematerialet hemmar komplement, vil hemming av komplementfaktorar stoppe kaskadereaksjonen. Testen skil derfor ikkje mellom aktivering eller hemming av komplementsystemet. Dersom prøvematerialet påverkar komplement vil resultatet bli hemming av hemolyse. Dersom prøvematerialet ikkje påverkar komplement, vil resultatet bli ingen hemming av hemolyse. Aktiviteten (ICH_{50}) er den lågaste konsentrasjonen som gir 50 % hemming av hemolyse (Michaelsen *et al.*, 2000; Yamada og Kiyohara, 2007).

Reagensar

- Fosfatbuffer (PBS), pH 7,2 Veronalbuffer, pH 7,2, med 2 mg/ml BSA og 0,02 % NaN_3
 - 2000 ml Veronalbuffer for CFT, pH 7,2
 - 13,36 ml Bovint serum albumin (BSA), antigen
 - 4 ml 10 % Natriumazid (NaN_3)
- Reinsa vatn
- Erythrocyttar (SRBC), Sau 10010; 5/11/14 og 22/1/15
- Antistoff: Amboceptor Virion 9020
- Humant komplement ECG; 29/11/05
- Standard: *Biophytum petersianum* (BP-II) 1 mg/ml.

Utstyr

- Pipette og multipipette i forskjellige storleikar (10 μ l–1 ml)
- Pasteurpipette, 3 ml (plast/ glas)
- Reagensrøyr, 10 ml
- Reagentreservoar
- Mikrotiterplater med dekkande teip (rund og flat botn)
- Parafilm
- Eppendorf-røyr
- Virvlar (Heidolph Reax top)
- Sentrifuge: Centrifuge 5810 (Eppendorf)
- Varmeskap med ristepate: 211DS Shaking Incubator (Labnet International)
- Mikroplate-absorbans-lesar: iMark modell 3550 (Bio-Rad)

Føresetnader

- Sentrifugering av reagensrøyr: 5 minutt, 3000 rpm.
- Sentrifugering av mikrotiterplater: 5 minutt, 1500 rpm.
- Inkubering: Varmeskap med ristepate, 30 minutt, 37 °C.
- Absorbans målt ved 415 nm.

Prosedyre

Fortynning av prøvemateriale:

1. Prøvemateriale vart vege inn (ca. 1 mg) og løyst i veronal/BSA-buffer til ei stamløysning med konsentrasjon 1 mg/ml eller 0,5 μ g/ml og deretter fortynna til 250 μ g/ml.
2. Det vart deretter laga ei firefolds fortynningsrekke for både standard og prøvemateriale (sjå tabell 4.1). Prøvene vart lagt i frysen fram til bruk.

Vasking av blodceller:

1. Med pipette vart det tatt ut 100 μ l blod per plate, utan å slemme opp blodet, og overført til eit reagensglas.
2. Blodet vart først vaska to gonger med fosfatbuffer og deretter ein gong med veronal/BSA-buffer. Glaset vart fylt halvfullt med vaskevæske. Mellom kvar vask vart blandinga sentrifugert. Vaskevæsket vart pipettert av med plastpipettar.

Tabell 4.1. Fortynningsoppsett for kvart prøve ved fire-folds-fortynning

Røyr nr.	Konsentrasjon (µg/ml)	
0	1000 ^A /500 ^B	Stamløysing
1	250	250 µl frå stamløysing + 750 µl Veronal/BSA-buffer ^A / 250 µl frå stamløysing + 250 µl Veronal/BSA-buffer ^B
2	62,5	250 µl frå røyr 1 + 750 µl Veronal/BSA-buffer
3	15,6	250 µl frå røyr 2 + 750 µl Veronal/BSA-buffer
4	3,9	250 µl frå røyr 3 + 750 µl Veronal/BSA-buffer
5	0,98	250 µl frå røyr 4 + 750 µl Veronal/BSA-buffer
6	0,24	250 µl frå røyr 5 + 750 µl Veronal/BSA-buffer
7	0,06	250 µl frå røyr 6 + 750 µl Veronal/BSA-buffer

Sensibilisering av blodceller:

1. Til kvar av platene vart det, til like mange reagensglas, tatt ut 5,925 ml veronal/BSA-buffer, 15 µl Virion 920 Amboceptor og 60 µl blodceller. Blodcellene vart tatt frå botn for å unngå buffer. Dette vart dekket med parafilm, og deretter inkubert (sjå føresetnader).
2. Blodet vart vaska to gonger med fosfatbuffer og ein gong med veronal/BSA-buffer. Mellom kvar vask vart blandinga sentrifugert og vaskevatten vart pipettert av med pipettar.
3. Etter siste sentrifugering vart vaskevatten fjerna og det vart tilsett 5,940 ml veronal/BSA-buffer for å få ei 1 % suspensjon av blodcellene.

Titreringskurve for komplementkjelda:

Cellemembranen blir svakare med alderen, difor er gamalt blod lettare å hemolysere enn nytt blod, og det trengst mindre komplement for å lysere gamalt blod samanlikna med nytt blod.

1. Til ei mikrotiterplate med runde brønnar vart det tilsett 100 µl reinsa vatn til 8 av brønnane (100 % lysekontroll) og 50 µl veronal/BSA-buffer til 4 × 7 av brønnane (sjå figur 4.10).
2. Komplementet vart fortynna med veronal/BSA-buffer (som vist i tabell 4.2) og 50 µl av kvar fortynning vart tilsett kvar av brønnane som allereie var tilsett 50 µl veronal/BSA-buffer. Dette gav 4 parallellar av kvar fortynning.
3. Mikrotiterplata vart dekket med teip, for å hindre fordamping, og inkubert (sjå føresetnader).
4. Det vart tilsett 50 µl 1 % SRBC i alle brønnane og plata vart inkubert (sjå føresetnader).
5. Plata vart sentrifugert (sjå føresetnader) og supernatanten, 100 µl frå kvar brønn, vart overført til ei mikrotiterplate med flate brønnar. Luftbobler vart fjerna ved sentrifugering (sjå føresetnader).

6. Absorbansen vart målt, og det vart korrelert til grad av hemolyse.

$$\text{Lyseringsgrad: } \frac{Abs_{buffer}}{Abs_{vatn}} \times 100 \%$$

Tabell 4.2. Fortynningsoppsett for komplement

Komplement/buffer	Komplement (μ l)	Veronal/BSA-buffer (μ l)
1/40	10	390
1/50	10	490
1/60	10	590
1/70	10	690
1/80	10	790
1/90	10	890
1/100	10	990

Testing av prøvematerialet

1. Det vart nytta mikrotiterplate med runde brønner. Til kvar brønn vart det tilsett 50 μ l prøvemateriale, med 2 parallellar for kvar fortynning. Det vart nytta 4 parallellar med 100 μ l reinsa vatn som 100 % lysekontroll og 4 parallellar med 50 μ l veronal/BSA-buffer som kontroll (sjå figur 4.11).
2. Komplement vart tatt opp frå frysaren rett før bruk og det vart nytta den fortynninga som gav 50 % hemolyse i titreringskurven. Til kvar av brønnane (unntatt 100 % lysekontroll og blank) vart det tilsett 50 μ l fortynna komplement.
3. Plata vart dekkja av teip for å hindre fordamping, og inkubert (sjå føresetnader).
4. Det vart tilsett 50 μ l sensibiliserte erytrocyttar til alle brønnane, og plata vart inkubert (sjå føresetnader).
5. Plata vart sentrifugert (sjå føresetnader) og supernatanten, 100 μ l frå kvar brønn, vart overført til ei mikrotiterplate med flate brønner. Luftbobler vart fjerna ved sentrifugering (sjå føresetnader).
6. Absorbansen vart målt, og det vart korrelert til grad av hemolyse.

$$\text{Lyseringsgrad: } \frac{Abs_{kontroll}}{Abs_{vatn}} \times 100 \%$$

$$\text{Hemmingsgrad: } \frac{Abs_{kontroll} - Abs_{prøve}}{Abs_{kontroll}} \times 100 \%$$

1/40	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
1/50	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B10	B12
1/60	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
1/70	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
1/80	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
1/90	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
1/100	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
rensa vatn	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Figur 4.10. Mikrotiterplate, oppsett for titeringskurve.

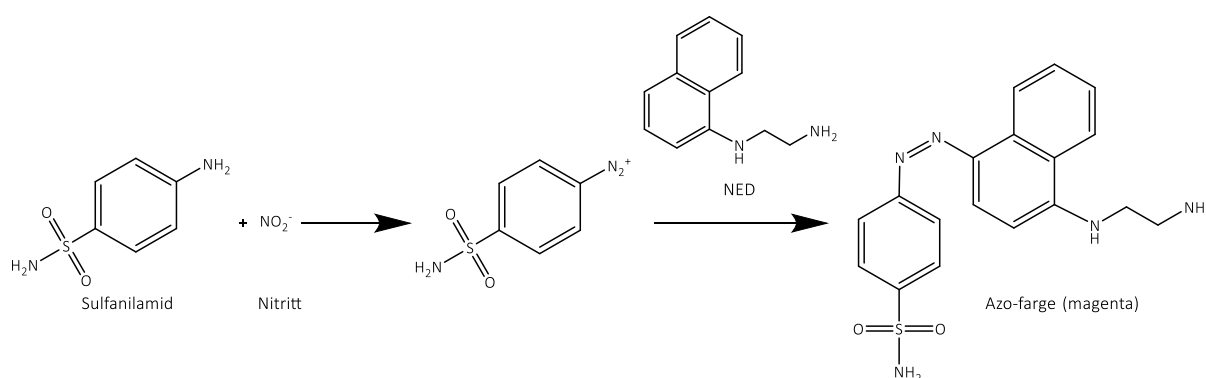
RØR ▶ PRØVE ▼		1 (250 µg/ml)	2 (62,5 µg/ml)	3 (15,6 µg/ml)	4 (3,91 µg/ml)	5 (0,98 µg/ml)	6 (0,24 µg/ml)						
I	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	
II	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B10	B12	
III	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	
IV	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	
V	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	
VI	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	
BPII	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	
kontroll	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	
		100 % lyse				50 % lyse				Blank			

Figur 4.11. Mikrotiterplate, oppsett for prøvemateriale.

4.5.2 Stimulering av makrofagar

RAW musemikrofagar vart stimulert i eit *in vitro* testsystem for å undersøke om fraksjonane har biologisk aktivitet via stimulering av makrofagar. Ved makrofagstimulering gir oppregulering av TLR4 auka NO-produksjon og -frigjering. NO blir brote ned til anna nitritt (NO_2^-). Det vart nytta Griess-reagensar for å kolometrisk bestemme i kor stor grad fraksjonane i ulike konsentrasjonar gir nitrittfrigjeving frå makrofagane (Inngjerdingen *et al.*, 2012). Sulfanilamid reagerer med nitritt og dannar eit salt som blir magenta ved tilsetjing av NED, sjå figur 4.12.

Mengde frigjort nitritt vart bestemt av ein standardkurve av nitritt. Medium vart nytta som negativ kontroll og LPS vart nytta som positiv kontroll. For å undersøke om makrofagstimulering skuldast forureining av LPS, vart det tilsett LPS-antagonisten AM-12 til to parallellar av den høgaste konsentrasjonen i det siste forsøket. AM-12 er ein lipid-A-analog som ikkje aktiverer inflammasjonskaskaden.



Figur 4.12. Griess-reaksjon. Sulfanilamid og nitritt dannar eit salt. Ved tilsetjing av NED blir det danna ein magenta Azo-farge.

Reagensar

- Cellelinje: RAW 264,7 cellelinje frå musemakrofagar
- Dyrkingsmedium: DMEM tilsett 10 % kalveserum (FBS), 1 % penicillin/streptomycin, 5 ml natriumpyruvat og 500 μl 2-mercaptoetanol.
- Positiv kontroll: Lipopolysakkarid frå *E. coli* 055:B5 (LPS), 10 ng/ μl
- LPS-antagonist: LPS-antagonist; AM-12
- 100 mM Natriumnitrat (NaNO_3)

- Griess-reagens A: 1 % Sulfanilamid i 5 % fosforsyre.
- Griess-reagens B: 0,1 % N-(1-naptyl)etylendiamin (NED) i reinsa vatn.

Utstyr

Splitting av RAW 264,7-celler

- Steril stripette, 5–25 ml
- Steril sentrifugerøyr, 50 ml
- Steril celleskrapar
- Steril dyrkingsflaske
- Celleinkubatorskap med CO₂-kontroll (Esco)

Stimulering av makrofagar

- Pipette med sterile tipper
- Eppendorf-røyr
- Tryptanblå (Life technologies)
- Sterile sentrifugerøyr, 15–50 ml
- Steril reagentreservoar
- Steril stripette, 25 ml
- Aluminiumsfolie
- Vekt
- Mikrotiterplater, runde og flate brønner
- Celleteljar: Countess Automated Cell Counter, med tellekammer (Invitrogen)
- Sentrifuge: 4200 (Kubota)
- Celleinkubatorskap med CO₂-kontroll (Esco)
- Mikroplate-absorbans-lesar: iMark modell 3550 (Bio-Rad)

Føresetnader

- Sentrifugering av sentrifugerøyr: 5 minutt, 1300 rpm (hurtigval 1).
- Sentrifugering av mikrotiterplater: 2 minutt, 1400 rpm (hurtigval 2).
- Inkubering: Varmeskap med 5 % CO₂, 37 °C.
- Absorbans målt ved 540 nm.

Prosedyre

Fortynning av prøvemateriale

1. Det vart vege opp ca. 1 mg av prøvemateriale og løyst i reinsa vatn til 5 mg/ml. Desse vart vidare fortynna til 500 µg/ml og 50 µg/ml. Prøvene vart oppbevart i frysen mellom forsøka.

Splitting av RAW 264,7-celler

RAW 264,7-celler blir splitta 2 gonger i veka (enten måndag/torsdag eller tysdag/fredag).

1. Medium vart fjerna med stripette.
2. Det vart tilsett 10 ml nytt medium, og celleskrape vart nytta til å losne cellene.
3. Det vart tilsett 12/20 ml nytt medim til ny dyrkingsflaske.
4. Det vart pipettert forsiktig opp og ned 10–15 gonger med stripetten for å løyse opp eventuelle celleklumpar.
5. Det vart overført 1 ml av cellesuspensjonen til den nye dyrkingsflaska og flaska vart lagt i inkubator.
6. Resten (9 ml) vart overført til sentrifugerøyr og brukt vidare.

Makrofagstimulering

Dag 1

1. For å telle cellene vart 10 µl cellesuspensjon blanda med 10 µl tryptanblå i eit eppendorf-røyr. 10 µl vart overført til teljekammer og sett inn i celleteljaren. Talet på levande celler vart notert.
2. Cellene vart spunne ned på sentrifugen.
3. Cellene vart resuspendert i dyrkingsmedium til konsentrasjon på 500 000 celler/ml. Det vart først tilsett 1 ml, pipettert forsiktig for å løyse opp celleklumpen.
4. Det vart nytta ei mikrotiterplate med flate brønner. 2 µl prøve vart tilsett kvar brønn, i 2 parallellar. Til den øvste konsentrasjonen av prøven vart det tilsett LPS-antagonist i ytterligare 2 parallellar. Som positiv kontroll vart det nytta 5 µl LPS (10 ng/µl), i 2 parallellar. Som negativ kontroll vart det nytta 100 µl medium. Sjå figur 4.13.
5. Det vart tilsett 100 µl cellesuspensjon (= 50 000 celler) til kvar brønn. Dette gir sluttkonsentrasjonen av prøvene: 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml (og LPS 0,5 µg/ml).
6. Cellene vart inkubert i ca. 22–24 timar (sjå føresetnader).

Dag 2

Nitritt-standardkurve må lagast for kvart forsøk grunna endringar i farge.

7. Det vart vege opp 50 mg Griess-reagens A og løyst i 5 ml 5 % fosforsyre. Det vart vege opp 5 mg Griess-reagens B og løyst i 5 ml reinsa vatn. Griess-reagens B er lyssensitiv.
8. Det vart laga fortynningar av 100 mM NaNO₂ ved å sette til medium (50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78 og 0,39 µM) for standardkurven.
9. Supernatanten, 100 µl, vart overført til mikrotiterplate med runde brønner og sentrifugert (sjå føresetnader).
10. Supernatanten, 50 µl, vart overført til mikrotiterplate med flate brønner. 50 µl av kvar av fortynningane av NaNO₂ vart tilsett mikrotiterplata i 2 parallellar, sjå figur 4.13.
11. Griess-reagens A, 50 µl, vart tilsett kvar brønn og plata vart sett mørkt i 10 minutt.
12. Griess-reagens B, 50 µl, vart tilsett kvar brønn.
13. Luftbobler vart fjerna ved sentrifugering (sjå føresetnader) og absorbansen vart målt (sjå føresetnader).

	(100 µg/ml)	(10 µg/ml)	(1 µg/ml)	(100 µg/ml) m/antagonist	standardkurve	LPS (0,5 µg/ml)						
medium	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
PRØVE ▼												
I	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
II	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
III	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
IV	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
V	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
VI	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Figur 4.13. Mikrotiterplate, oppsett ved stimulering av makrofagar.

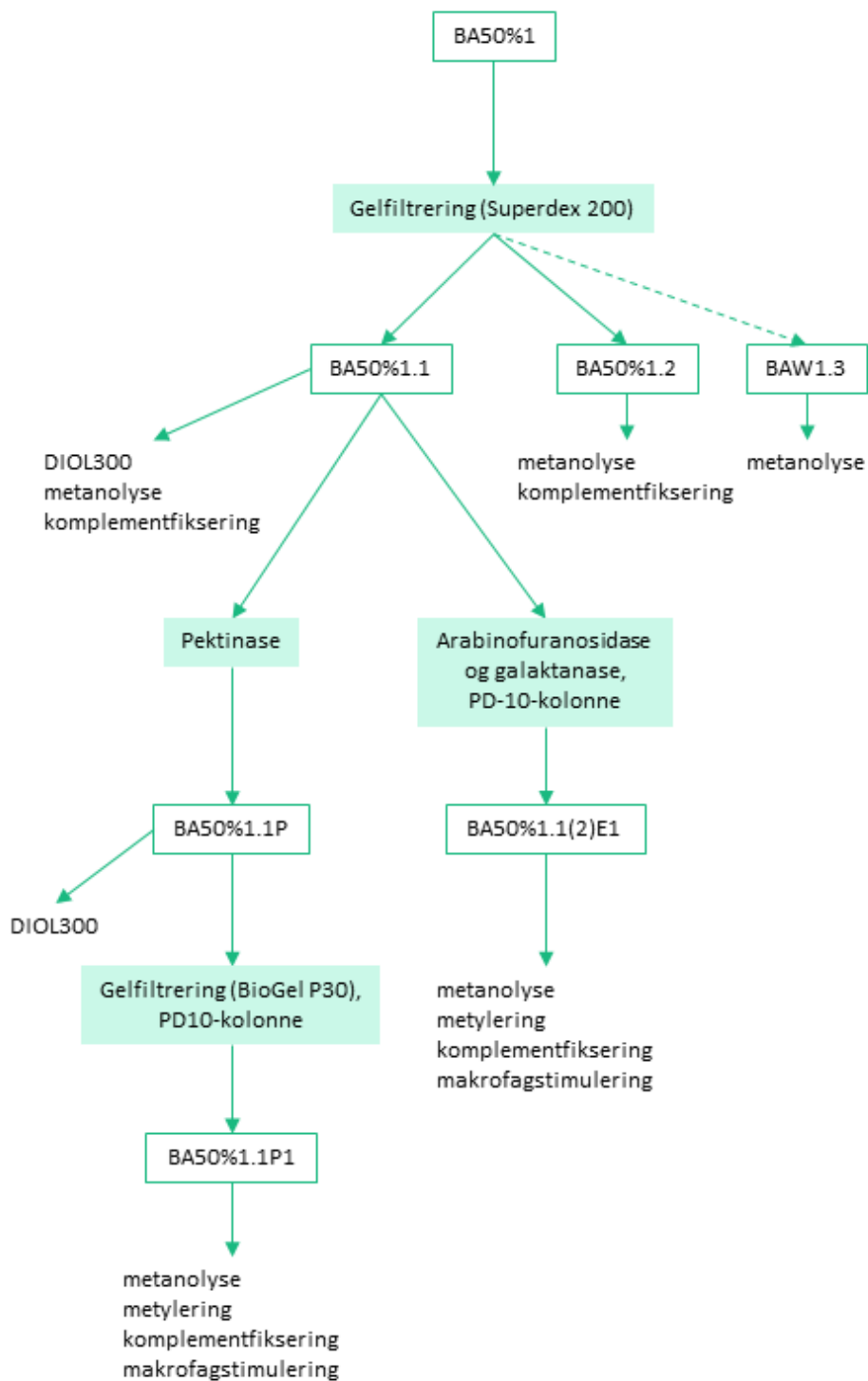
5 Resultat og diskusjon

Denne oppgåva er basert på plantemateriale og resultat frå Gunhild Hoås si masteroppgåve, levert våren 2014. Plantematerialet er stammebark og rotbark frå planten *Zanthoxylum zanthoxyloides*, hausta i Blendio, Mali, i juli 2012 og tørka.

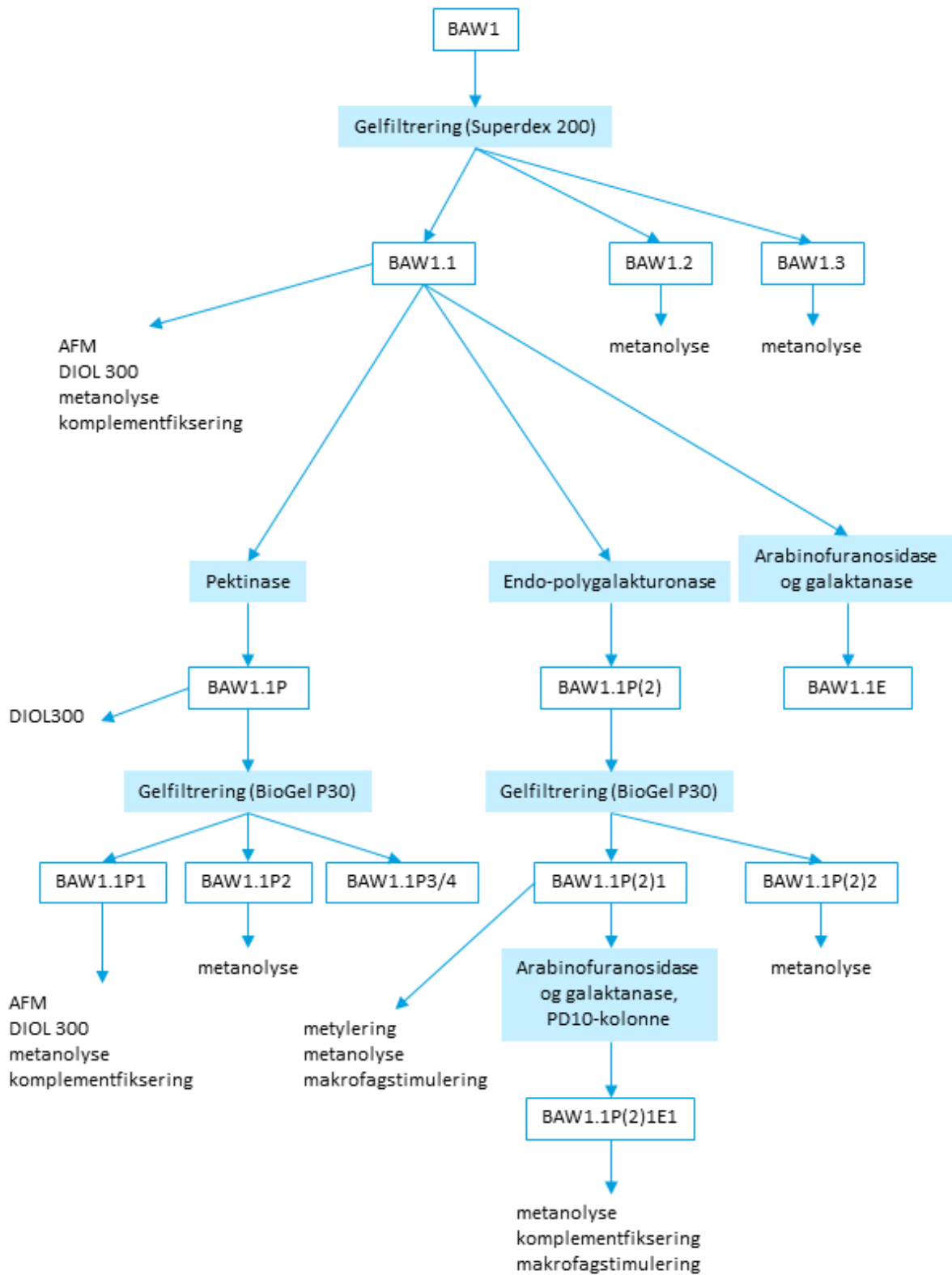
Figur 5.1–5.4 gir oversikt over utført arbeid i denne oppgåva, som tar for seg vidare struktur- og aktivitetsstudiar av fire fraksjonar opparbeida av Hoås (2014); BA50%1, BAW1, RB50%2 og RBW2. Fraksjonane vart vald ut basert på høg komplementfikserande aktivitet og tilgjengeleg mengde plantemateriale. Fraksjonane BA50%1 og BAW1 kjem frå stammebarken, mens fraksjonane RB50%2 og RBW2 kjem frå rotbarken. Utgangsmaterialet til alle fraksjonane var først ekstrahert på Dionex Model ASE 350 med organiske løysingsmiddel med aukande polaritet for å fjerne lågmolekylære og upolare stoff. Råekstrakta BA50% og RB50% framkom etter ekstraksjon med 50 % etanol i reinsa vatn ved 70 °C. Råekstrakta BAW og RBW framkom etter vidare ekstraksjon med reinsa vatn, 100 °C, og vart deretter degradert med α -amylase for å fjerne stivelse. Deretter vart alle ekstraktane fraksjonert på en ANX Sepharose Fast Flow ionebyttarkolonne.

Tabell 5.1. Startfraksjonar i denne oppgåva. Fraksjonane er opparbeida av Hoås (2014).

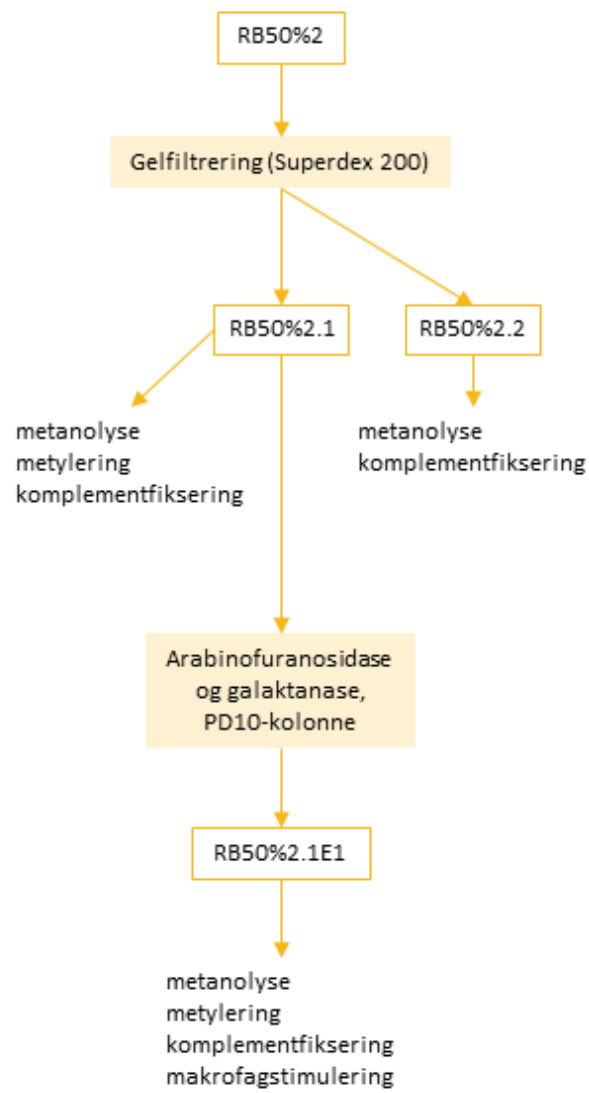
Namn	Vekt, mg	Forklaring
BA50%1	185	Stammebark, ekstrahert med 50 % etanol i reinsa vatn, 70 °C, fraksjon 1 etter separasjon på ionebyttar
BAW1	187	Stammebark, ekstrahert med reinsa vatn, 100 °C, fraksjon 1 etter separasjon på ionebyttar
RB50%2	170	Rotbark, ekstrahert med 50 % etanol i reinsa vatn, 70 °C, fraksjon 2 etter separasjon på ionebyttar
RBW2	155	Rotbark, ekstrahert med reinsa vatn, 100 °C, fraksjon 2 etter separasjon på ionebyttar



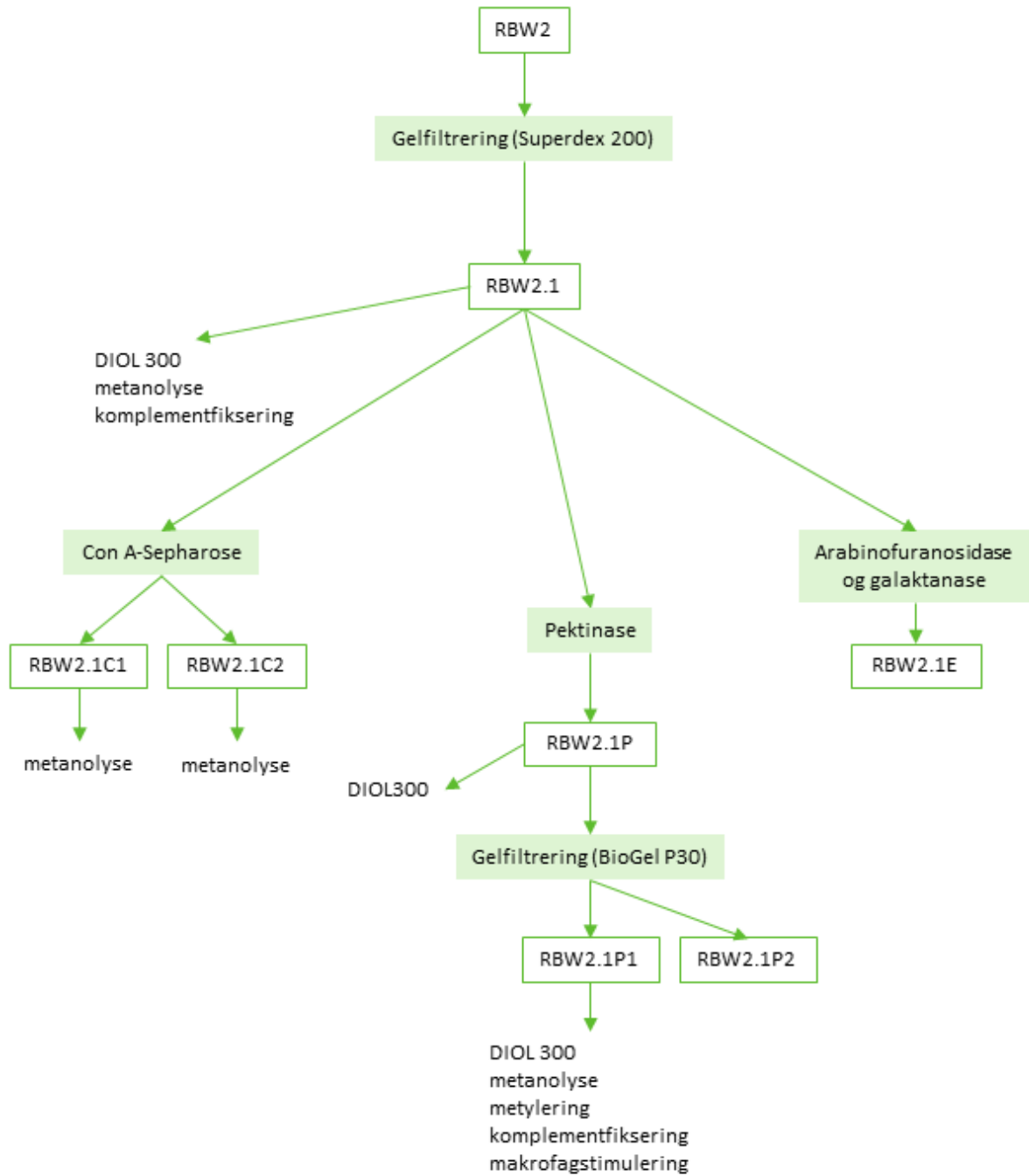
Figur 5.1. Oversikt over utført arbeid på fraksjon BA50%1. Oppreinsinga av BA50%1.1 vart gjort i to omgangar. I den første oppreinsinga vart fraksjonsrør 41–48 slått saman med fraksjonsrør 41–48 frå BAW1 til BAW1.3, sjå tabell 5.2.



Figur 5.2. Oversikt over utført arbeid på fraksjon BAW1.



Figur 5.3. Oversikt over utført arbeid på fraksjon RB50%2.



Figur 5.4. Oversikt over utført arbeid på fraksjon RBW2.

Tabell 5.2. Inndeling i fraksjonar og utbytte.

Fraksjon		Startmengde, mg	Fraksjon	Fraksjonsør	Utbytte, mg
BA50%1	Gelfiltrering nr. 1	80,1	BA50%1.1	3–11	23,7
			BA50%1.2	12–20	29,5
BA50%1	Gelfiltrering nr. 2	91,6	BA50%1.1	2–11	23,7
			BA50%1.2	12–20	29,5
BA50%1.1	Pektinase/ Gelfiltrering	12	BA50%1.1P1	3–10	1,4
BA50%1.1	Arafase/galaktanase/ Gelfiltrering	10	BA50%1.1E1	3–8	5,8
BAW1	Gelfiltrering	80,1	BAW1.1	3–14	54,5
			BAW1.2	15–21	<1
			BAW1.3	41–48 + 41–48 frå BA50%1	<1
BAW1.1	Pektinase/ Gelfiltrering	27	BAW1.1P1	23–29	4
			BAW1.1P2	63–67	1
			BAW1.1P3	71–77	<1
			BAW1.1P4	81–89	<1
BAW1.1	<i>Endo</i> -PG/ Gelfiltrering	19,6	BAW1.1P(2)1	15–22	10
			BAW1.1P(2)2	57–60	5,4
BAW1.1	Arafase/galaktanase	3	BAW1.1E	–	<1
BAW1.1P(2)1	Arafase/galaktanase/ Gelfiltrering	5	BAW1.1P(2)1E1	3–9	2,3
RB50%2	Gelfiltrering	80,1	RB50%2.1	3–16	47,7
			RB50%2.2	17–27	3,9
RB50%2.1	Arafase/galaktanase/ Gelfiltrering	10	RB50%2.1E1	1–5	7,4
RBW2	Gelfiltrering	80	RBW2.1	2–18	52,4
RBW2.1	Con A Sepharose	4,8	RBW2.1C1	1	<1
			RBW2.1C2	2	<1
RBW2.1	Pektinase/ Gelfiltrering	25,9	RBW2.1P1	26–36	12
			RBW2.1P2	76–87	1
RBW2.1	Arafase/galaktanase	3	RBW2.1E	–	<1

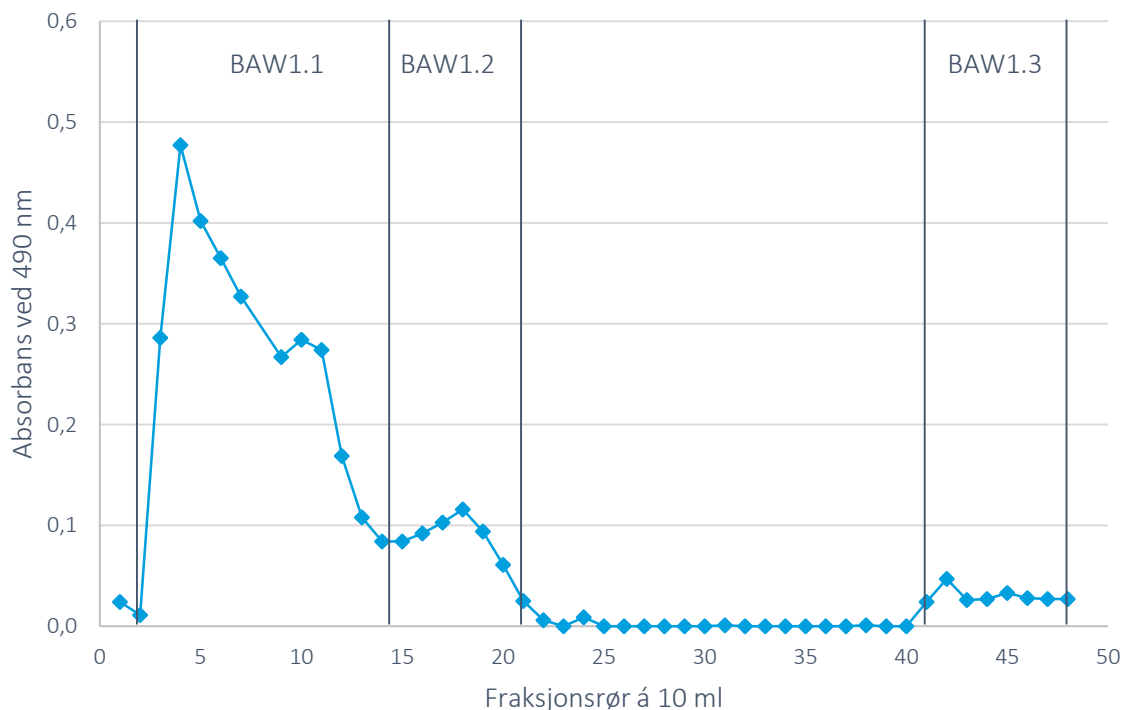
5.1 Strukturoppklaring

5.1.1 Isolering av polysakkarid

5.1.2 Gelfiltrering

Gelfiltrering (metode 4.2.1) separerer stoff etter molekylstorleik og vart nytta for å separere eller reinse stoff. Det vart nytta Superdex 200 prep grade-kolonne for å opparbeide prøver tilsvarende dei som vart undersøkt av Hoås (2014). Etter enzymatisk degradering med pektinase eller *endo*-polygalakturonase (*endo*-PG), vart det nytta BioGel P30 for å separere av salt og avspalta oligosakkarid.

Etter enzymatisk degradering med α -L-arabinofuranosidase (arafase) og *exo*- β -1,3-galaktanase vart det nytta PD-10-kolonne for å separere av salt og avspalta oligosakkarid. PD-10-kolonne vart også nytta for å separere av salt, som alternativ til dialyse. Diol-300 vart nytta til å bestemme molekylvekt (metode 4.4.1).



Figur 5.5. Karbohydratprofil av BAW1 med inndeling i tre fraksjonar ved gelfiltrering på Superdex 200 prep grade. Absorbans målt ved 490 nm etter fenol-svovelsyretest.

Etter kvar gelfiltrering vart fraksjonsrøra analysert med fenol-svovelsyretesten (metode 4.3.1) for å undersøke nærvær av karbohydrat. Det vart laga spreingsplott av absorbansmålingane og toppar vart samla i fraksjonar. Fraksjonane vart dampa inn og frysetørka for vidare prøveopparbeiding, strukturanalyser eller biologiske undersøkingar. Figur 5.5 viser karbohydratprofil av BAW1. BAW1 vart fraksjonert på Superdex 200 prep grade og har ein hovudtopp (BAW1.1), tett følgd av ein litt mindre topp (BAW1.2). Når det nærmar seg det totale permeasjonsvolumet, kjem ein liten topp. Det var ein tilsvarende topp i karbohydratprofilen til BA50%1, og desse to vart slått saman til BAW1.3. Det var for lite mengde BAW1.3 til å undersøke meir enn monosakkaridinnhald.

5.1.3 Affinitetskromatografi

RBW2.1 hadde relativt mykje glukose, sjølv om RBW2 har vore ionebytta og behandla med α -amylase av Hoås (2014). Det vart undersøkt om dette var stivelse med jod-jod-kalium-testen (metode 4.1.9), men den gav negativt resultat. For å undersøke om glukosen sit på overflata av pektinet eller er gøymt inni pektinet, vart det nytta ConA-Sepharose-kolonne (metode 4.2.2).

Det vart samla to fraksjonar frå kolonnen; RBW2.1C1 og RBW2.1C2. RBW2.1C1 utgjer molekyla ikkje blir bunde til kolonnen, mens RBW2.1C2 utgjer dei som har blitt festa til kolonnen. Av monosakkaridsamansetninga i fraksjon RBW2.1C1 og RBW2.1C2 såg ein at det er mest glukose i RBW2.1C1, og veldig lite glukose i RBW2.1C2. Det kan vera ulike grunner til dette. Det kan henda at Glc er gøymt i pektinstrukturen og ikkje er på overflata av pektinet, eller er glykosid-bunde til pektinet og er ein del av total-polymeren. Det kan også hende at kolonnen ikkje fungerte.

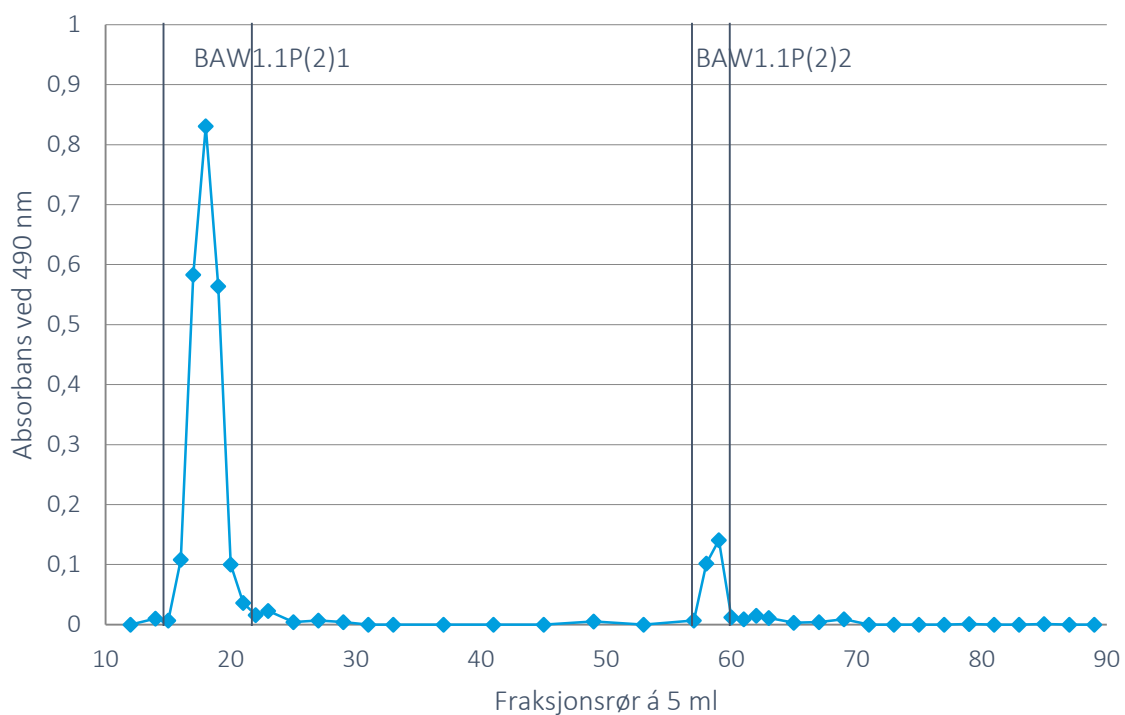
5.1.4 Enzymatisk degradering

Pektin er store strukturer med ulike strukturuområde, sjå figur 2.2–2.4. Det vart nytta enzymatisk degradering (metode 4.2.3) for å undersøke nærare kva strukturuområde som var i fraksjonane. Det vart nytta pektinase, *endo*-polygalakturonase (*endo*-PG) samt α -L-arabinofuranosidase (arafase) og *exo*- β -1,3-galaktanase (galaktanase). Etter degradering vart avspalta oligosakkarid separert frå pektinet ved bruk av gelfiltreringskolonne (BioGel P30 eller PD-10-kolonne), og karbohydratprofilen bestemt ved fenol-svovelsyretest.

Basert på mengde GalA og Rha i monosakkaridsamansetninga og mengde tilgjengeleg stoff, vart fraksjonane BAW1.1, BA50%1.1 og RBW2.1 vald for degradering med pektinase. Det var ei

kjend forureining av mannose i enzym-blandinga, dette ser ein i monosakkaridsamansetninga, der desse fraksjonane har ein større del mannose enn den korresponderande ikkje-degraderte fraksjonen. Monosakkaridsamansetninga i dei degraderte fraksjonane viste at pektinasen har ein uspesifikk aktivitet; det er noko mindre GalA, og tydleg mindre Ara.

For å få isolert forgreina område av BAW1.1 vart det forsøkt å degradere fraksjonen med *endo*-PG, fordi *endo*-PG har betre spesifisitet enn pektinase. Figur 5.6 viser karbohydratprofil av BAW1.1P(2), fraksjonen oppnådd etter enzymatisk degradering. Her er det ein tydleg hovudtopp (BAW1.1P(2)1). *Endo*-PG spalter midt i molekylet og frigir oligosakkarid. Desse kjem i ein liten topp (BAW1.1P(2)2) når det nærmar seg det totale permeasjonsvolumet. Det vart undersøkt monosakkaridsamansetning av BAW1.1P(2)2 som viste at den inneheld stort sett berre GalA. Enzymet har hatt spesifikk aktivitet.



Figur 5.6. Karbohydratprofil av BAW1.1P(2) med inndeling i to fraksjonar ved gelfiltrering på BioGel P30. Absorbans målt ved 490 nm etter fenol-svovelsyretest.

Basert på høgt innhald av Ara og Gal vart arafase og galaktanase vart nytta saman for å undersøke strukturen i sidekjedene i dei forgreina områda i fraksjonane BAW1.1P(2)1, BA50%1.1 og RB50%2.1. Figur 2.5 viser sidekjedene i RG-I. Arafasen spalter Ara, mens galaktanasen spalter 1,3-Gal (AG-II) frå den ikkje-reduserande enden og frigir monosakkarid.

Dei enzymdegraderte fraksjonane BAW1.1P(2)1E, BA50%1.1E og RB50%2.1E vart reinsa på PD-10-kolonne. Deretter vart dei undersøkt vidare for monosakkaridsamansetning (og bindingsforhold), komplementfikserande aktivitet og makrofagstimulerande aktivitet, sjå figur 5.1–5.4.

5.1.5 Molekylvekt

Det er fleire ulike måtar å nemne molekylvekt for polymere substansar; dei vanlegaste er M_n er antallsgjennomsnittet og gir eit mål på kjedelengda, M_w er vektsgjennomsnittet og gir eit mål på storleiken av polymerkjeda. M_n kan bestemast ved membran osmometri eller SEC, mens M_w kan bestemast ved statisk lysspreiing (SLS) eller sedimentasjon. Polydispersitetsindeksen (PDI), M_w/M_n er eit mål på heterogeniteten i molekylvekta.

I denne oppgåva vart molekylvekt (M_n) bestemt ved bruk av SEC med RI-detektor (metode 4.4.1.). Det vart nytta ei Diol-300-kolonne som separerer molekylvekt mellom 10 og 1 000 kDa, der dei største molekyla kjem først. Det vart nytta standardar av dekstran med molekylvekt mellom 11,7 og 475 kDa for å bestemme molekylvekta på prøvene. Dekstraner har eit anna romleg volum enn pektin på grunn av ein annan forgreiningsgrad. Molekylvekta til pektinfraksjonane blir dermed bestemt i forhold til dekstraner. Det vart ikkje laga eit spreingsplott, fordi R^2 (*coefficient of determination*) var for lav, i staden vart tidspunktet for toppane i standardane (tabell 5.3) samanlikna med toppane i prøvene. Dette gir berre ein grov indikasjon på molekylvekta.

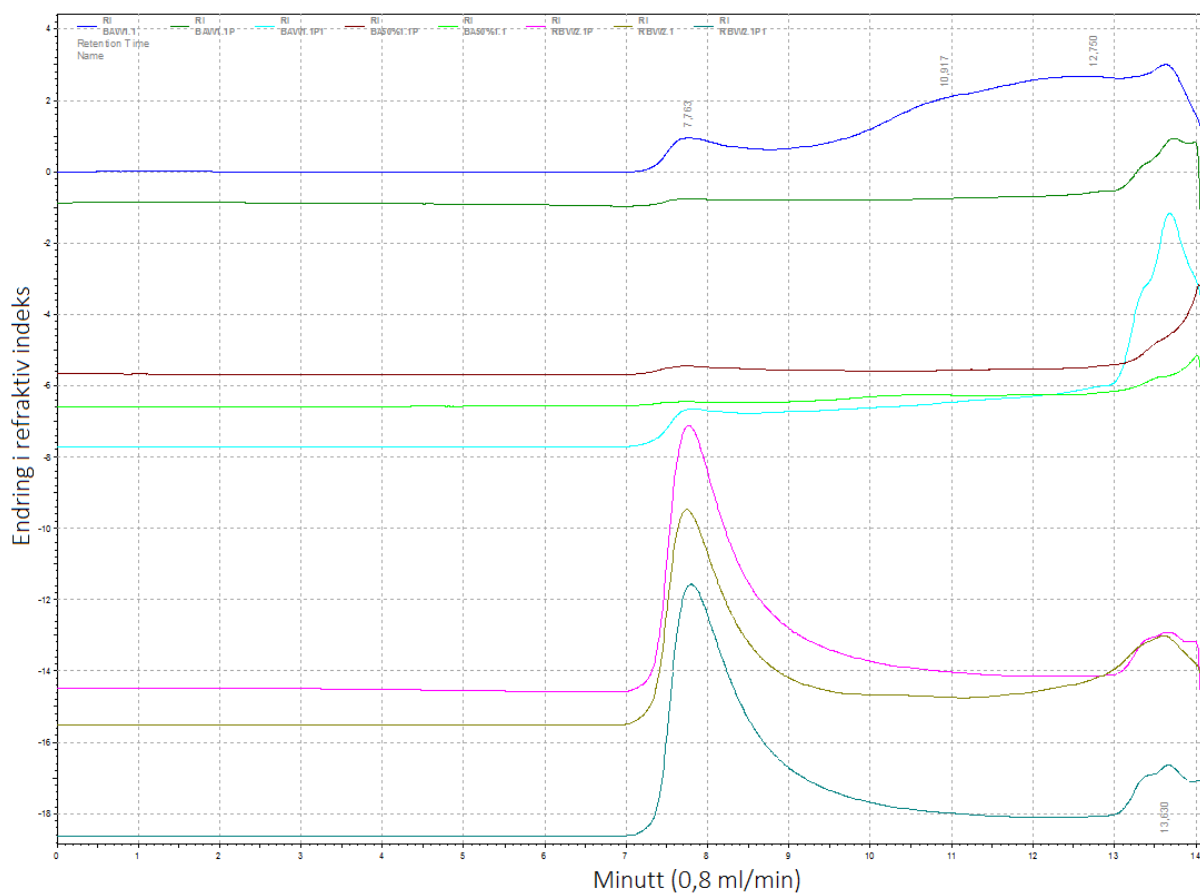
Det er stor polydispersitet i prøvene og molekylvekta er difor nemnd som spreieing og ikkje gjennomsnitt. Følgande fraksjonar vart undersøkt: BAW1.1, BAW1.1P, BAW1.1P1, BA50%1.1, BA50%1.1P, RBW2.1, RBW2.1P og RBW2.1P1. Figur 5.7 viser elueringsprofilen av fraksjonane. Alle prøvene har ei heterogen samansetnad av molekyl med molekylvekt mellom ca. 10 og 500 kDa, og alle har ein topp ved ca. 475 kDa. Dette er hovudtoppen i RBW2.1-fraksjonane. Dei har dessutan ein sekundærtopp ved ca. 5 kDa. RBW2.1 har noko fleire molekyl mellom ca. 10 og ca. 80 kDa enn dei pektinase-behandla og oppreinsa fraksjonane RBW2.1P og RBW2.1P1.

BA50%1.1 og BA50%1.1P har flest molekyl med molekylvekt mellom ca. 5 og 10 kDa.

Fraksjonane av BAW1.1P og BAW1.1P1 har hovudtoppen ved ca. 5 kDa. BAW1.1 har langt fleire molekyl mellom ca. 10 og ca. 150 kDa enn dei pektinasebehandla og oppreinsa fraksjonane BAW1.1P og BAW1.1P1.

Tabell 5.3. Tidspunkt for topper av dekstran med kjend molekylvekt ved 0,8 ml/min. Refraksiv indeks viser talet på kjeder som passerer detektoren, hovudtoppen viser molekylvekta (M_n) til dekstranet.

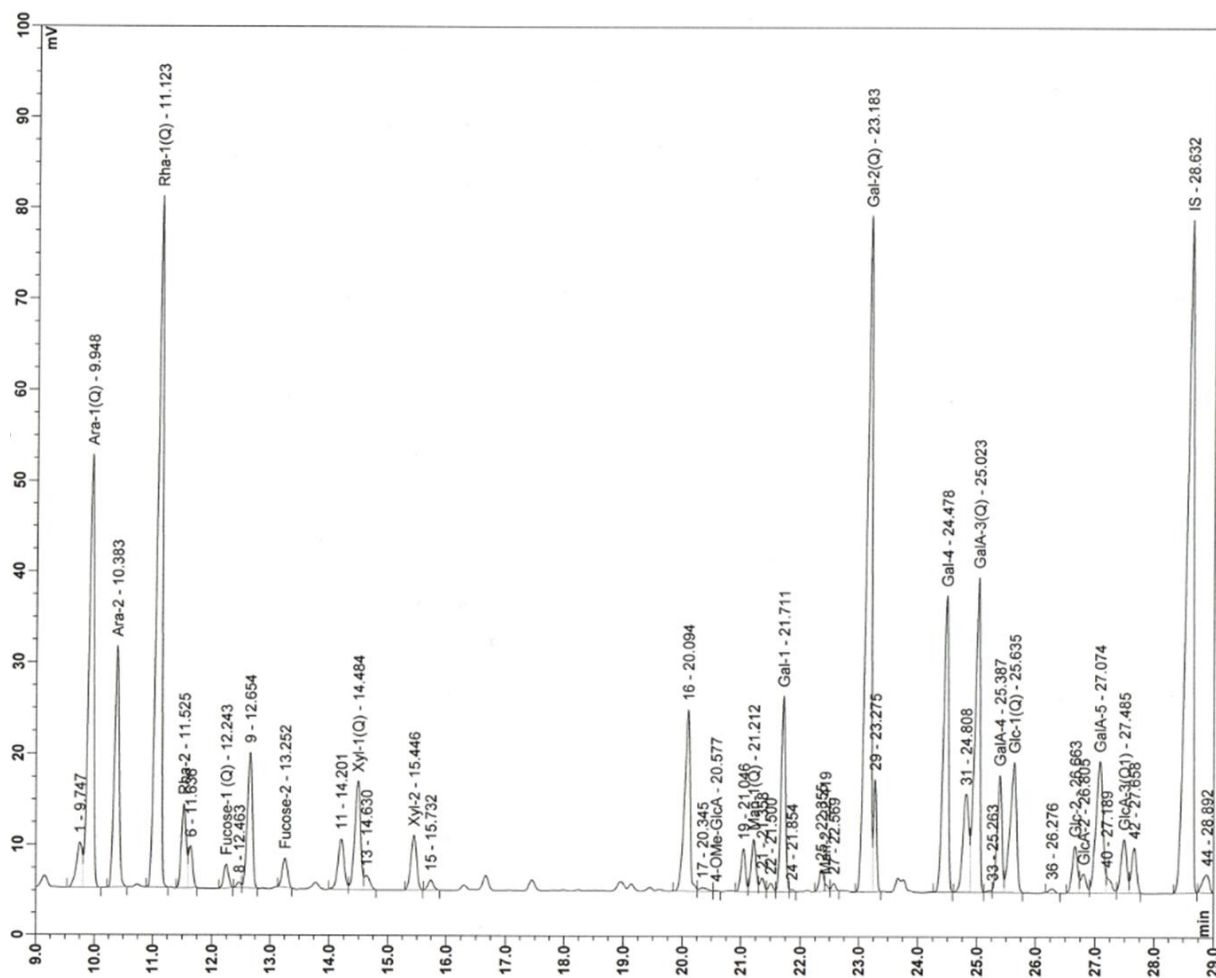
Topp ved 0,8 ml/min	
Dekstran 11 700	12,48
Dekstran 19 000	11,99
Dekstran 30 000	10,57
Dekstran 80 000	9,68
Dekstran 150 000	8,75
Dekstran 233 000	8,21
Dekstran 475 000	7,61



Figur 5.7. Elueringsprofil av fraksjonane på Diol-300. Endring i refraktiv indeks viser talet på kjeder som passerer detektoren.

5.1.6 Kvalitativ bestemming av mengde monosakkarid

For å bestemme samansetnad av monosakkarid vart 19 av fraksjonane undersøkt med GC etter metanolyse og silylering (metode 4.3.2). BAW1.1, BA50%1.1, RBW2.1 og RB50%2.1 inneheld alle Ara, Rha, Gal og GalA som er typiske monosakkarid i pektin, som også Hoås (2014) fann. Figur 5.8 viser eit døme på kromatogram.



Figur 5.8. Gasskromatogram av BAW1.1P(2)1.

Fleire av resultata er enten over eller under kvantifiseringsgrensa. Desse er merka med høvesvis * eller ** i tabellane (5.4–5.6). Desse resultata er litt usikre, men det er vanskeleg å vurdere kva usikkerheitsmarginen er.

Stammebark-fraksjonane

Både BA50%1.1 og BAW1.1 inneheld monosakkarid som fins i rhamnogalakturonan (RG-I) og homogalakturonan (HG) (Tabell 5.4 og 5.5).

BAW1.1 vart først degradert med pektinase. Deretter vart den reinsa opp på BioGel P30-kolonne, og samla i to fraksjonar; BAW1.1P1 og BAW1.1P2.

Pektinase-enzymet var forureina med mannose, som gir høgare verdiar av mannose i både BAW1.1P1 og BAW1.1P2. BAW1.1P1 har mindre GalA enn BAW1.1 og litt mindre Ara. BAW1.1P2 inneheld svært lite karbohydrat, under 5 prosent av prøven. Den består i hovudsak av monosakkarida Ara, GlcA og GalA. Det var forventa at denne i hovudsak ville innehalde GalA, men den inneheld ei mindre prosentdel GalA enn BAW1.1P1. Den har dobbelt så mykje Ara som BAW1.1. Pektinasen har altså spalta av Ara og GlcA, men tilsynelatande ikkje så mykje GalA. Pektinasen har hatt ein uspesifikk effekt.

BAW1.1 vart deretter degradert med *endo*-PG, reinsa på BioGel-kolonne og samla i to fraksjonar, BAW1.1P(2)1 og BAW1.1P(2)2. BAW1.1P(2)1 inneheld litt mindre GalA enn BAW1.1. BAW1.1P(2)2 inneheld nesten berre GalA og det ser ut som at enzymet har spalta av HG frå pektinet. Innhaldet av Ara er bevart.

BAW1.1P(2)1 vart vidare degradert med arafase og galaktanase, og reinsa opp på PD-10-kolonne. Det vart samla ein fraksjon, BAW1.1P(2)1E1. Denne fraksjonen inneheld halve mengda Ara, og noko større prosentvis del GalA, elles er samansetninga relativ lik som den native fraksjonen. Det tyder på at arafasen har spalta av Ara, men ut frå monosakkaridsamansetninga ser det ikkje ut som det har blitt spalta av særleg mykje Gal. Det kan vera at det burde vore nytta eit anna enzym, eller at galaktanasen ikkje kom skikkelig til på grunn av tette forgreiningar.

Fraksjon BAW1.2 og BAW1.3 inneheld sannsynlegvis monosakkarid og oligosakkarid, utan typisk pektin-struktur. BAW1.2 består i hovudsak av Ara og består difor truleg berre av arabinanar. BAW1.3 inneheld svært lite karbohydrat, i underkant av 5 prosent av prøven, men består i hovudsak av monosakkarida Ara og Glc. Dei inneheld svært lite eller ingen GalA.

Fraksjon BA50%1.1 vart først degradert med pektinase og reinsa på BioGel P30-kolonne. Her vart det berre tatt vare på BA50%1.1P1. Som BAW1.1P1, har denne fraksjonen mindre Ara, men ingen forskjell i prosentdel GalA samanlikna med den native fraksjonen. Fraksjon BA50%1.1 vart deretter degradert med arafase og galaktanase og reinsa opp på PD-10-kolonne til BA50%1.1E1. Dette gav, som BAW1.1P(2)1E1 halvering i andel Ara, men liten endring i mengde Gal.

Fraksjon BA50%1.2 inneheld sannsynlegvis mest oligosakkarid, og inneheld i hovudsak Glc og Ara.

Tabell 5.4. Prosentdel monosakkarid relatert til totalt innhald av sukker i BA50%-fraksjonane.

i.d.: ikkje detektert. *: under kvantifiseringsgrensa. **: over kvantifiseringsgrensa.

	BA50% 1.1	BA50% 1.1P1	BA50% 1.1E1	BA50% 1.2
Ara	25	10	12	17
Rha	8	12	9	12
Fuc	1 *	2	2 *	2 *
Xyl	7	6	8	4 *
Man	2	4	3 *	4 *
Gal	29	30	31	9
Glc	8	13	8	50
GlcA	6	9	6 *	i.d.
GalA	14	14	21	3 *
4-O-Me-GlcA	spor	spor	spor	i.d.

Tabell 5.5. Prosentdel monosakkarid relatert til totalt innhald av sukker i BAW-fraksjonane.

i.d.: ikkje detektert. *: under kvantifiseringsgrensa. **: over kvantifiseringsgrensa.

	BAW 1.1	BAW 1.1P1	BAW 1.1P2	BAW 1.1P(2)1	BAW 1.1P(2)2	BAW1.1 P(2)1E1	BAW 1.2	BAW 1.3
Ara	14	9	27 *	15	<1 *	8	79 **	28 *
Rha	12	12	9 *	15	spor *	15	2	8 *
Fuc	<1 *	2	i.d.	1 *	i.d.	1 *	<1 *	i.d.
Xyl	3	2	9 *	4	spor *	4	4	12 *
Man	1	3	4 *	1 *	i.d.	2 *	1	5 *
Gal	27 **	28	5 *	25	2 *	23	6	5 *
Glc	5	9	spor *	5	3	5	5	41 *
GlcA	2	8	22	6	i.d.	6	i.d.	i.d.
GalA	36 **	28	25 *	29 **	94 **	36	2	i.d.
4-O-Me-GlcA	spor	spor	spor *	spor	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.

Rotbark-fraksjonane

RB50%2.1 og RBW2.1 inneheld også sannsynlegvis HG og RG-I (Tabell 5.6). RBW2.1 inneheld mest Gal, medan RB50%2.1 også inneheld ei stor del Ara. Dette tyder på store område av sidekjedene arabinan, AG-I og/eller AG-II i RG-I.

RB50%2.1 vart degradert med arafase og galaktanase og reinsa opp på PD-10-kolonne, og det vart samla ein fraksjon; RB50%2.1E1. Den inneheld halve delen Ara samanlikna med den native fraksjonen. Det tyder på at arafasen har spalta av Ara, men ut frå monosakkardisamansetninga ser det ikkje ut som det har blitt spalta av særleg mykje Gal. Som med dei andre fraksjonane som var behandla med kombinasjonen arafase og galaktanase, kan det henda at galaktanasen ikkje fekk spalta av særleg mykje Gal fordi den ikkje kom til, eller at det burde vore nytta eit anna enzym.

RB50%2.2 har relativ lik monosakkaridsamansetning som RB50%2.1. Det kan tyde på at separasjonen av desse ikkje har vore så god, samtidig tilsvarer dette resultatata frå Hoås (2014).

RBW2.1 vart degradert med pektinase og reinsa på BioGel P30-kolonne. Det vart samla to fraksjonar, RBW2.1P1 og RBW2.1P2, men berre RBW2.1P1 vart undersøkt med omsyn til monosakkaridsamansetning. Pektinasen har uspesifikt spalta av Ara og noko GalA.

Tabell 5.6. Prosentdel monosakkarid relatert til totalt innhald av sukker i RB50% og RBW-fraksjonane. i.d.: ikkje detektert. *: under kvantifiseringsgrensa. **: over kvantifiseringsgrensa.

	RB50% 2.1	RB50% 2.1E1	RB50% 2.2	RBW 2.1	RBW 2.1P1
Ara	16	7	15	7	3
Rha	6	6	6	8	6
Fuc	6	7	6	2	3
Xyl	2	<1 *	3	2	1 *
Man	1	3	2	1	2
Gal	31 **	33	30	29 **	30 **
Glc	17	17	19	20	27
GlcA	12	14	13	14	17
GalA	9	11	7	16	11
4-O-Me-GlcA	spor	spor	spor	spor	spor

5.1.7 Bestemming av bindingsforhold

Bindingsforhold vart bestemt for å finne ut kva strukturer som er i dei ulike fraksjonane. Den vart bestemt ved gasskromatografi-massespektroskopi (GC-MS) etter karboksylsyre-reduksjon, metylering, hydrolyse, reduksjon og acetylering (metode 4.4.3). Det vart vald ut fraksjonar frå alle fire utgangsstoffa.

Hoås (2014) undersøkte bindingsforholda i BAW1.1, BA50%1.1 og RBW2.1. Det vart vald ut korresponderande enzym-degraderte fraksjonar, BA50%1.1P1, BA50%1.1E1, BAW1.1P(2)1 og RBW2.1P1, for å kunne undersøke om enzym-degradering endra bindingsforholda, og dermed kva strukturar som var forsvunne og blitt igjen. RB50%2.1 var ikkje undersøkt tidlegare, difor vart denne og den enzym-degraderte fraksjonen RB50%2.1E1 undersøkt. Resultata kan ikkje direkte samanliknast med Hoås (2014) sine, sidan prøveopparbeidninga er gjort av forskjellige personar og forskjellige feilkjelder kan ha påverka resultatet, men det kan gjerast ei grov samanlikning.

Det er utfordringar knytt til å bestemme bindingsforhold og bestemme strukturar basert på bindingsforholda. Undermetylering, spesielt i tett forgreina område, kan skje fordi reagensane ikkje kjem til. Fullstendig metylering vil gi terminal/ forgreiningratio på 1:1. I dette forsøket varierte det frå 1:0,3 til 1:0,6. I tillegg mister ein informasjon om anomerisk konfigurasjon (α/β) når ringen blir opna. I tillegg er det ei usikkerheit knytt til tolkinga av GC-MS-spekteret (Pettolino *et al.*, 2012).

Bindingsforholda er presentert i tabell 5.7. Oversikt over stukturelementa i fraksjonane er presentert i tabell 5.8. Alle fraksjonane inneheld både 1,4-GalA og 1,2-Rha, og inneheld såleis rhamnogalakturonan-I (RG-I). Rhamnogalakturonan I (RG-I) bruker å vera forgreina i posisjon 3 eller 4 i Rha. Alle prøvene har forgreiningpunktet 1,2,4-Rha, det betyr at det er RG-I med forgreiningar i alle prøvene. Alle fraksjonane har relativt forgreina galaktosyl-regionar, mellom 25 og 50 % av Gal er forgreina. Prøvene som er behandla med pektinase eller *endo*-PG har ikkje overskot av 1,4-GalA, og inneheld såleis ikkje homogalakturonan (HG). Det er lite 1,2- og 1,3-Ara i alle fraksjonane, dette er vanlege sidekjeder av arabinanar.

Alle fraksjonane inneheld 1,3-, 1,6- og 1,3,6-Gal, strukturelement frå arabinogalaktan-II (AG-II), som er eit viktig strukturelement for komplementfiksierende aktivitet. Hoås (2014) viste at det er AG-II tilstade i BAW1.1, BA50%1.1 og RBW2.1. AG-II er ofte bunde med protein, og det er fortsatt uklart om det er ein del av pektinstrukturen, men pektin og AG-II blir ofte co-eluerte og

er vanskelege å separere frå kvarandre. Dette tyder det på at dei kan vera kovalent bunde (Vincken *et al.*, 2003). Alle fraksjonane har også noko 1,4- samt 1,3,4- og/eller 1,4,6-Gal som strukturelement frå arabinogalaktan-I (AG-I).

Stammebark-fraksjonane

BA50%1.1P1 inneheld ikkje HG, alle 1,4-GalA inngår i RG-I-strukturen, og det har blitt relativt sett meir T-GalA. Dette betyr at pektinasen har spalta av det som var av HG i BA50%1.1. Det er også spalta av Ara. I den native fraksjonen var størstedelen av Ara i 1,3,5-binding, men i BA50%1.1P1 er det ikkje detektert 1,3,5-Ara. Det er relativt blitt meir 1,3-Ara og T-Ara, som forventta når 1,3,5-Ara er spalta av. 1,3,5-Ara fins både i som forgreiningspunkt i arabinan og i sidekjedene i AG-I. Det tyder på at pektinasen har spalta av ein del arabinan-struktur. BA50%1.1P1 inneheld noko AG-I og litt arabinan. Vidare er det AG-II i fraksjonen.

I BA50%1.1E1 er det observert mindre Ara og Gal, samanlikna med den native fraksjonen BA50%1.1. All 1,3,5-Ara er spalta av og det er blitt mindre 1,5-Ara. Samtidig er det observert relativt sett meir 1,3-Ara og T-Ara, som forventta. Mengde observert 1,3,6-Gal er redusert, men også 1,3- og 1,6-Gal. Samtidig er det observert ein auke i T-Gal. Dette viser at det er spalta av både AG-II og arabinan, men ikkje all AG-II og arabinan. Det er noko 1,4-bindingar, som viser at det også er AG-I i fraksjonen.

BAW1.1P(2)1 er den fraksjonen som inneheld mest RG-I. Hoås (2014) undersøkte bindingsforholda i BAW1.1, og viste at fraksjonen inneheldt 1,4-GalA og 1,2/1,2,4-Rha i forhold 3:1, og da altså en del HG. Samanlikna med desse resultatane inneheld den enzymdegraderte fraksjonen ingen HG. Det betyr at *endo*-PG har spalta av HG. Det er ei lita mengde 1,5- og 1,3,5-Ara i fraksjonen, som betyr at det er noko arabinan tilstade, samanlikna med den native fraksjonen er det mindre 1,5-Ara og meir T-Ara. Frå tabell 5.7 ser me at det er litt AG-I og ein del AG-II tilstade i fraksjonen.

Rotbark-fraksjonane

RB50%2.1 inneheld ikkje HG og lite RG-I. Fraksjonen inneheld noko arabinan og AG-I. Dette er den fraksjonen som inneheld mest AG-II. RB50%2.1E1 inneheld mindre 1,3- og 1,3,6-Gal i forhold til RB50%2.1, det kan tyde på at noko av AG-II har blitt spalta av galaktanasen. Det har også blitt en reduksjon i 1,5- og 1,3,5-Ara, noko som tyder på at arafase har spalta av deler av arabinan-strukturen. Fraksjonen inneheld også noko AG-I.

Tabell 5.7. Bindingsforhold i dei seks fraksjonane. Spor: >0,5. i.d.: ikkje detektert

		BA50%1.1P1	BA50%1.1E1	BAW1.1P(2)1	RB50%2.1	RB50%2.1E1	RBW2.1P1
<i>Araf</i>	T	7	6	9	8	4	2
	1,2	1	2	<1	<1	1	spor
	1,3	1	2	<1	<1	1	spor
	1,5	1	2	3	5	2	spor
	1,3,5	i.d.	i.d.	2	2	i.d.	i.d.
	Sum	10	12	15	16	7	3
<i>Rhap</i>	T	3	2	2	<1	<1	1
	1,2	3	3	8	3	1	1
	1,3	2	1	<1	spor	spor	spor
	1,4	i.d.	i.d.	i.d.	<1	1	<1
	1,2,4	3	3	4	1	1	2
	1,3,4	<1	spor	spor	<1	1	<1
	Sum	12	9	15	6	6	6
<i>Xyl</i>	T	2	1	<1	1	spor	spor
	1,4	4	7	4	<1	<1	<1
	Sum	6	8	4	2	1	1
<i>GlcP</i>	T	4	3	2	5	5	9
	1,3	<1	<1	spor	4	3	2
	1,4	5	2	2	1	5	4
	1,6	3	2	<1	4	4	10
	1,3,6	i.d.	spor	i.d.	1	i.d.	i.d.
	1,4,6	<1	i.d.	spor	2	1	3
	Sum	13	8	5	17	17	27
<i>GlcAp</i>	T	4	3	3	8	7	12
	1,4	5	3	3	4	7	5
	Sum	9	6	6	12	14	17
<i>GalP</i>	T	6	5	4	2	5	4
	1,3	4	3	4	8	6	12
	1,4	2	3	2	<1	3	1
	1,6	4	9	4	5	11	2
	1,2,4	i.d.	i.d.	spor	i.d.	i.d.	2
	1,3,4	2	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.	i.d.
	1,3,6	8	7	9	13	4	2
	1,4,6	4	2	<1	2	4	6
	1,3,4,6	1	<1	spor	i.d.	i.d.	2
	Sum	30	31	25	31	33	30
<i>GalAp</i>	T	10	13	18	7	7	8
	1,4	4	8	11	2	4	3
	Sum	14	21	29	9	11	11

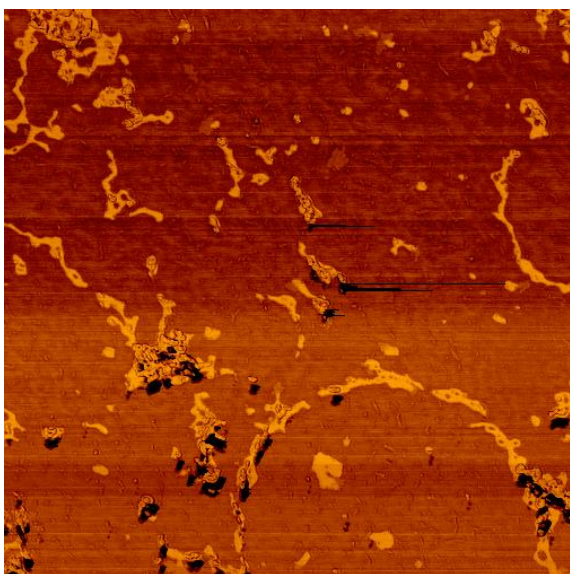
RBW2.1P1 inneheld lite RG-I og ikkje noko HG. Resultata frå Hoås (2014) viste at det var ein del HG i RBW2.1. Det betyr at pektinasen har spalta vekk HG. Det er også spalta av Ara, spesielt T-Ara, samanlikna med den native fraksjonen. Det er ein del AG-II og litt mindre AG-I i fraksjonen.

Tabell 5.8. Ein oversikt over strukturelementa i fraksjonane.

	BA50%1.1P1	BA50%1.1E1	BAW1.1P(2)1	RB50%2.1	RB50%2.1E1	RBW2.1P1
HG	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei	Nei
RG-I	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Arabinan	Sannsynlegvis	Sannsynlegvis	Ja	Ja	Sannsynlegvis	Nei
AG-I	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
AG-II	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

5.1.8 Atomkraftmikroskopi

Atomkraftmikroskopi (AFM) gir ei moglegheit til å studere og direkte visualisere individuelle molekyl (metode 4.4.2). Fraksjonane BAW1.1 og BAW1.1P1 vart undersøkt med AFM. Eit AFM-bilete av BAW1.1 er vist i figur 5.9. Her ser me det tydeleg at fraksjonen BAW1.1 inneheld eit hierarki av separate molekyl og aggregerte molekyl. Det kan vidare sjå ut til at nokon av molekyla er forgreina. Dette har også blitt vist i AFM-bilete av pektin i tidlegare studiar (Ovodova *et al.*, 2006; Round *et al.*, 2001).



Figur 5.9. AFM-bilde av BAW1.1 (2,5 µm x 2,5 µm).

5.2 Biologisk aktivitet

5.2.1 Komplementfiksering

Det vart gjort *in vitro* undersøking av komplementfikserande aktivitet for å undersøke immunmodulerande effekt av fraksjonane (metode 4.5.1). 12 av fraksjonane i som vart undersøkt for komplementfikserande aktivitet vart undersøkt totalt to gongar over ein periode på tre månader. Fordi fraksjonane berre vart undersøkt to gongar, er det usikkerheit knytt til resultatane. Resultat frå det eine forsøket er presentert. Komplementfiksering er eit biologisk assay og resultatane vil variere frå gang til gang. Resultatane er difor nemnd som ICH₅₀-verdien til BP-II i forhold til ICH₅₀-verdien fraksjon for å kunne samanlikne på tvers, sjå figur 5.10.

Fraksjonane vart undersøkt i utgangskonsentrasjonane 0,06 til 1000 µg/ml, pga. fortytning med komplement er konsentrasjonen i brønnen halvparten. Alle fraksjonane viste ein dose-respons-aktivitet, sjå figur 5.11–5.13. Alle fraksjonane, bortsett frå BA50%1.2, er har høgare aktivitet enn BP-II. Hoås (2014) viste at rotbark-fraksjonane var mest aktive. Med unntak av BA50%1.1P1, stadfestar dette forsøket dette funnet.

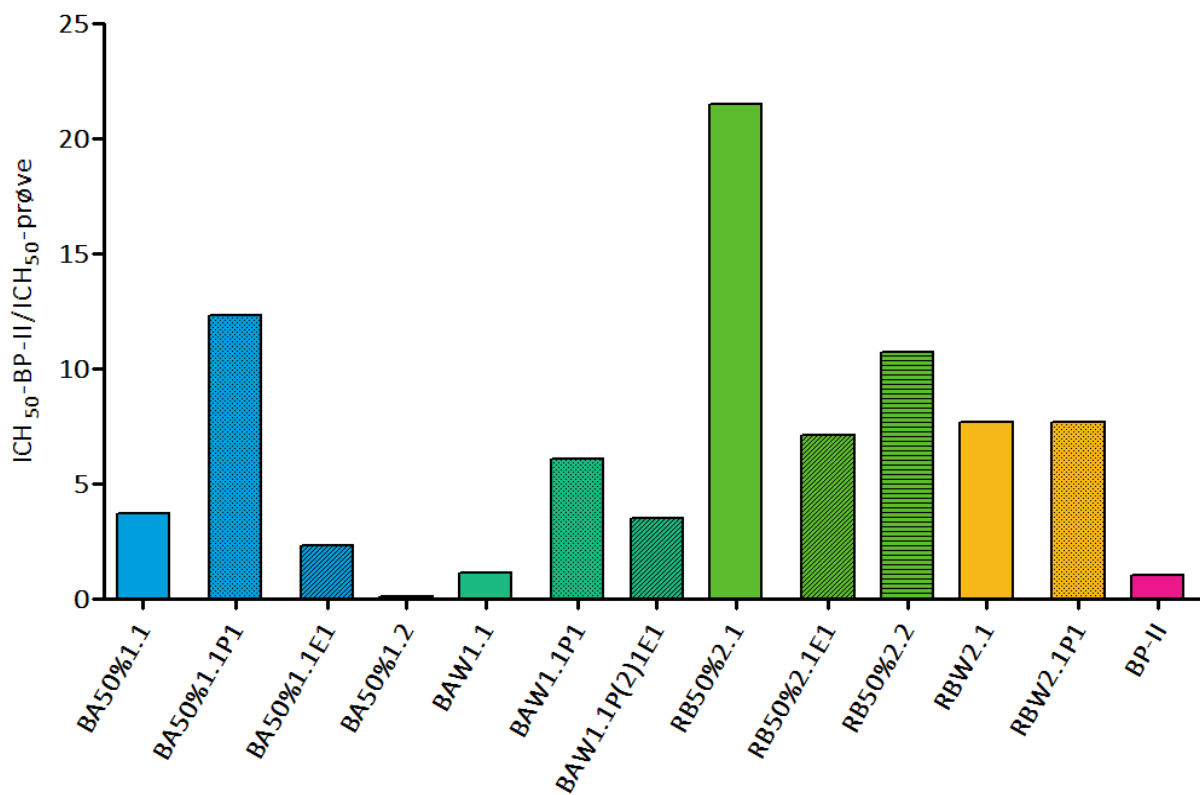
Tre fraksjonar vart degradert med pektinase. I tillegg vart ein fraksjon degradert med *endo*-PG samt arafase og galaktanase undersøkt for komplementfikserande effekt. Yamada og Kiyohara (2007), har vist at behandling med *endo*-PG fjerna område med HG, og at dei forgreina områda som vart igjen hadde høgare komplementfikserande aktivitet enn dei korresponderande originale områda. Dette er også vist av mellom anna Inngjerdingen *et al.* (2007) og Togola *et al.* (2008). Monosakkaridsamansetnaden i dei tre fraksjonane som vart behandla med pektinase, viste at det ikkje var blitt særleg mindre GalA, men mindre Ara samanlikna med korresponderande originale fraksjonar. Samtidig viste dataa frå GC-MS at dei pektinase-behandla fraksjonane ikkje hadde HG-område. Dei pektinase-degraderte fraksjonane viste enten lik eller høgare effekt enn sine korresponderande originale fraksjonar. Det er mogleg den endra aktiviteten kan forklarast med at Ara er fjerna. Yamada og Kiyohara (2007) viste at fraksjonar behandla med arafase gir aktivisering av komplementsystemet via både alternativ veg i tillegg til klassisk veg, samt at behandlinga enten auka eller ikkje endra antikomplement-aktivitet samanlikna med korresponderande original fraksjon.

Tre fraksjonar vart degradert med ein kombinasjon av arafase og galaktanase; BA50%1.1E1, BAW1.1P(2)1E1 og RB50%2.1E1. Monosakkaridsamansetninga og bindingsforholda stadfestar at Ara er fjerna etter tilsetjing av arafase. Alle desse har lågare aktivitet enn dei native fraksjonane,

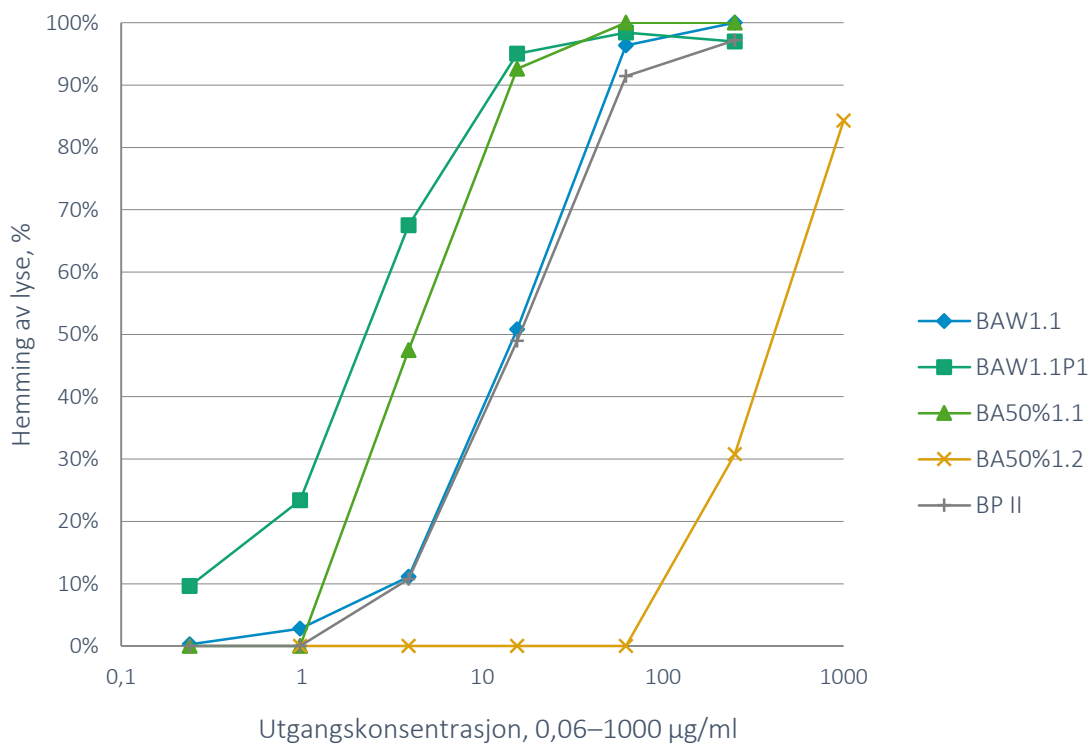
både BA50%1.1E1, BAW1.1P(2)1E1 har omtrent halvparten så lav aktivitet som høvesvis BA50%1.1 og BAW1.1P1, mens RB50%2.1E1 har nesten ein tredjedel lågare aktivitet enn RB50%2.1. BAW1.1P(2)1E1 har rett nok nesten tre gongar høgare aktivitet enn BAW1.1, men dette kan sannsynlegvis tilskrivast behandlinga med *endo*-PG. Dette er ikkje i tråd med funna frå Yamada og Kiyohara (2007).

I samanlikninga av RB50%2.1E1 med RB50%2.1 spelar sannsynlegvis også mengde AG-II ei rolle. RB50%2.1 var den fraksjonen som hadde høgast del AG-II i dei fraksjonane som vart undersøkt for bindingsforhold. RB50%2.1 er også den fraksjonen som har høgast komplementfikserande aktivitet.

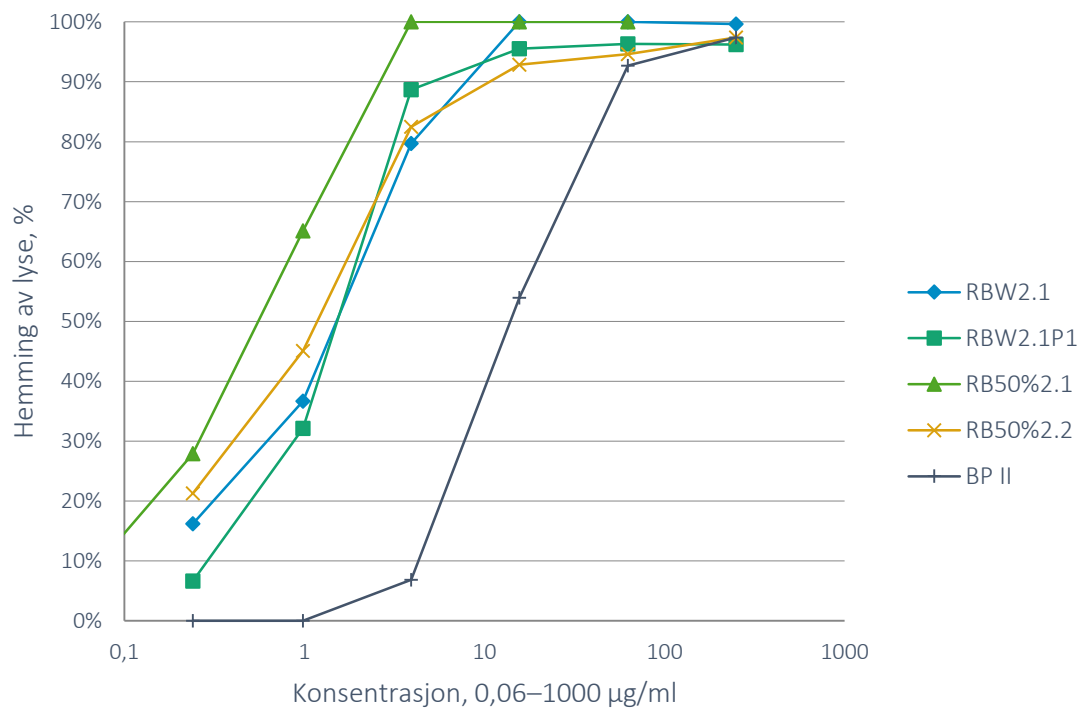
Det er mogleg at molekylvekt påverkar komplementfikserande aktivitet, dette har blitt vist i fleire studiar tidlegare, m.a. Nergard *et al.* (2005), (Togola *et al.*, 2008) og (Grønhaug *et al.*, 2010). Fraksjonane BA50%1.2 og RB50%2.2 er fraksjon to frå gelfiltreringa med lågare molekylvekt enn korresponderande fraksjon ein, og begge har lågare komplementfikserande aktivitet enn korresponderande fraksjon ein.



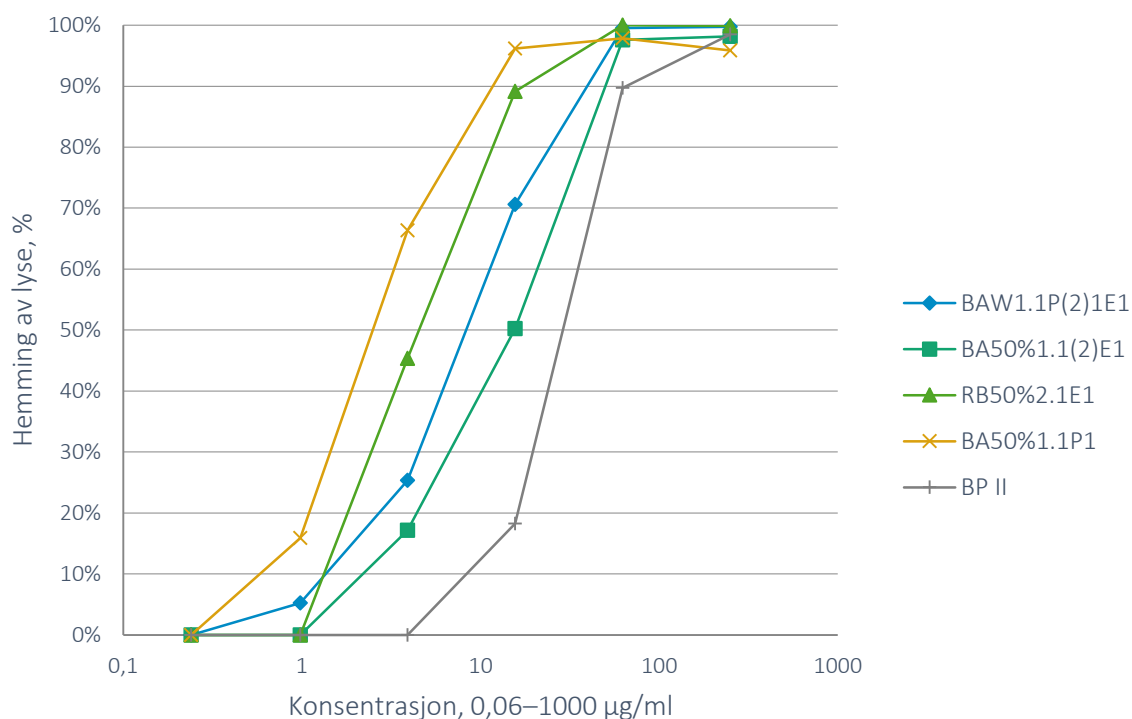
Figur 5.10. ICH₅₀ BP-II/ICH₅₀ fraksjonene. Alle, bortsett frå BA50%1.2, har høgare aktivitet enn BP-II. BP-II har ein gjennomsnittleg aktivitet på 22 µg/ml.



Figur 5.11. Komplementfikserende aktivitet frå stammebark-fraksjonane. Den gitte konsentrasjonen er utgangskonsentrasjonen, konsentrasjonen i brønnen er halvparten.



Figur 5.12. Komplementfikserende aktivitet frå rotbark-fraksjonane. Den gitte konsentrasjonen er utgangskonsentrasjonen, konsentrasjonen i brønnen er halvparten.



Figur 5.13. Komplementfikserende aktivitet frå enzym-degraderte fraksjonar. Den gitte konsentrasjonen er utgangskonsentrasjonen, konsentrasjonen i brønnen er halvparten.

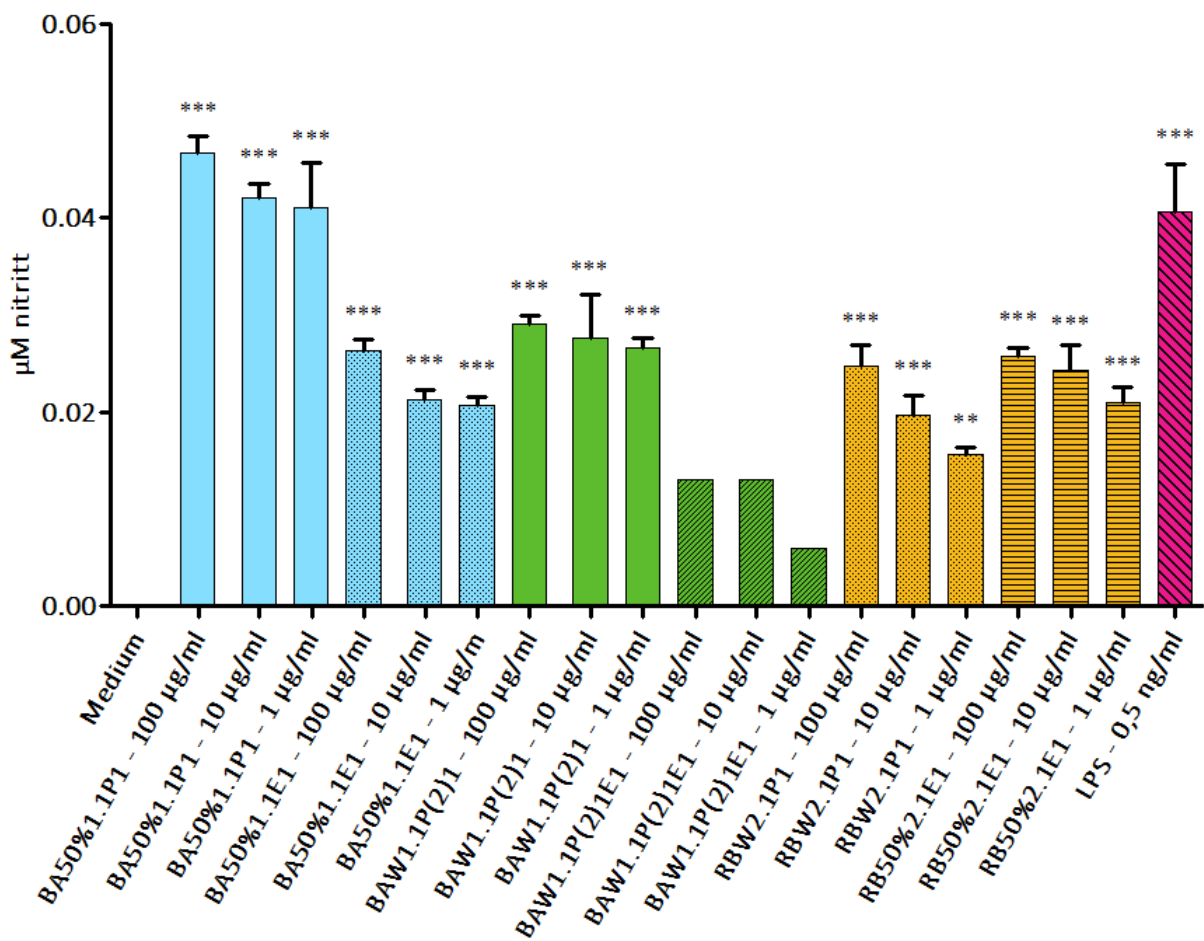
5.2.2 Makrofagstimulering

Det vart gjort tre forsøk med makrofagstimulering (metode 4.5.2). Dei undersøkte fraksjonane var stammebarkfraksjonane BAW1.1P(2)1, BAW1.1P(2)1E1, BA50%1.1P1 og BA50%1.1E1 samt rotbarkfraksjonane RBW2.1P1 og RB50%2.1E1. Det vart undersøkt bearbeida fraksjonar frå dei fire start-fraksjonane. BAW1.1P(2)1, BAW1.1P(2)1E1 vart vald ut for å undersøke om det var forskjell før og etter behandling av arafase og galaktanase. BA50%1.1P1 og BA50%1.1E1 samt RBW2.1P1 og RB50%2.1E1 vart vald ut for å undersøke fraksjonar behandla med enten pektinase eller arafase og galaktanase. Kvar av fraksjonane vart undersøkt i 3 konsentrasjonar; 100 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml.

Medium vart brukt som negativ kontroll og LPS, 0,5 µg/ml, vart brukt som positiv kontroll. I det siste forsøket vart det tilsett ein LPS-antagonist til to parallellar av den høgaste konsentrasjonen, for å undersøke om aktiviteten kunne vera på grunn av forureining av LPS i prøvene. LPS-antagonisten AM-12 er ein lipid-A-analog og difor ein antagonist til LPS-signalisering, utan å aktivere inflammasjonskaskaden. Antagonisten ble nytta i konsentrasjon på 30 µg/ml, som er vist

å ikkje vera toksisk mot RAW musemakrofagar. Det var berre ein liten forskjell mellom parallellane med og utan LPS-antagonist. Det tyder på at det kan vera eit lite innhald av LPS i prøven som gir ein viss synergieffekt.

Figur 5.14 viser grafen over nitrittfrigjeving frå makrofagar etter stimulering med fraksjonane, samanlikna med medium. Det er ein viss dose-respons-samanheng, der den høgaste konsentrasjonen gir høgast frigjeving av nitritt. BA50%1.1E1 har relativ lik aktivitet som RBW2.1P1 og RB50%2.1E1, samt BAW1.1P(2)1. Alle har høgare aktivitet enn medium.



Figur 5.14. Måling av frigjeving av nitritt frå fraksjonane samanlikna med medium. Det er berre tatt med ein parallell av BAW1.1P(2)1E1. ** betyr $p < 0,05$. *** betyr $p < 0,001$.

BA50%1.1P1 er den fraksjonen som har mest potent aktivitet på makrofagane, på linje med LPS. Den har høgare aktivitet enn den andre etanol-fraksjonen av stammebark, BA50%1.1E1, som ikkje er behandla med pektinase, men arafase og galaktanase. BA50%1.1P1 inneheld noko meir Rha og noko mindre GalA enn BA50%1.1E1, men begge inneheld RG-I med AG-I og AG-II sidekjeder.

BAW1.1P(2)1E1 har lågast aktivitet av alle fraksjonane. Dette er fraksjonen etter degradering av BAW1.1P(2) med arafase og galaktanase og monosakkaridsamansetninga viste at Ara var spalta av. Det er berre tatt med resultatata frå det eine forsøket av denne fraksjonen, fordi to av forsøka hadde negativ frigjeving. Tala her er difor ikkje statistisk signifikant.

Både BA50%1.1E1 og BAW1.1P(2)1E1 har lågare aktivitet enn høvesvis BA50%1.1P1 og BAW1.1P(2)1. Det kan tyde på at behandlinga med arafase gir dårlegare makrofagstimulerande effekt.

5.3 Struktur og aktivitet

5.3.1 Molekylvekt

Fraksjonar frå BA50%, BAW og RBW vart undersøkt med omsyn til molekylvekt. Dei viste stor heterogenitet i molekylvekt. Alle stammebark-fraksjonane inneheldt mest molekyl med molekylvekt på mellom 5 og 10 kDa, men hadde ei spreing opp til 150 kDa. Vass-ekstrakta av stammebark (BAW1.1)-fraksjonane hadde ein liten topp ved om lag 475 kDa. RBW2.1-fraksjonane inneheldt også molekyl med molekylvekt mellom 5 og 10 kDa, men inneheldt mest molekyl med molekylvekt rundt 475 kDa.

Rotbark-fraksjonane med høg molekylvekt hadde større komplementfikserande aktivitet enn stammebark-fraksjonane, som hadde lågare molekylvekt. Dette er i samsvar med funn i tidlegare studiar av m.a. Nergard *et al.* (2005), (Togola *et al.*, 2008) og (Grønhaug *et al.*, 2010).

BAW50%1.1P1 er den fraksjonen som har høgast makrofagstimulering. Den har relativt låg molekylvekt. Både BAW1.1-fraksjonane og RBW2.1-fraksjonane har lange kjeder i molekylet og har lågare makrofagstimulerande aktivitet enn BA50%1.1-fraksjonane. Det kan tenkast at storleiken på molekylet og den romlege formen kan påverke bindinga til TLR4-reseptoren.

5.3.2 Enzymatisk degradering

Det vart gjort enzymatisk degradering med pektinase, *endo*-PG, arabinase og galaktanase. 19 av fraksjonane, før og etter enzymatisk degradering, vart undersøkt med omsyn til monosakkarid-samansetning. Pektinasen spalta uselektivt både Ara, Glc, Gal og GalA. *Endo*-PG spalta nesten berre GalA. Blandinga av arafase og galaktanase spalta av Ara. Monosakkaridsamansetninga ymta

om at det ikkje var spalta av Gal, men resultatane frå GC-MS viste at det var blitt ein reduksjon i 1,3- og 1,3,6-Gal.

Etter degradering med pektinase eller *endo*-PG hadde stammebark-fraksjonane høgare komplementfikserande aktivitet enn dei native fraksjonane, mens RBW2.1P1 hadde lik komplementfikserande aktivitet som RBW2.1. Det stemmer med tidlegare forskning av m.a. Yamada og Kiyohara (2007), Inngjerdingen *et al.* (2007) og Togola *et al.* (2008), som har vist at isolerte forgreina område har høgare aktivitet enn det native pektinet som også har område med HG. Fraksjonane som var degradert med arafase og galaktanase hadde lågare komplementfikserande aktivitet enn dei native fraksjonane.

BA50%1.1P1 har høgare makrofagstimulerande aktivitet enn BA50%1.1E1. Dessutan har BAW1.1P(2)1 høgare aktivitet enn BAW1.1P(2)1E1. Dei to er ikkje direkte samanliknbare, det er same native fraksjon som er enzymatisk degradert med forskjellige enzym. Men BAW1.1P(2)1 er den native fraksjonen til BAW1.1P(2)1E1. Det kan tyde på at arafase/galaktanase spalter vekk strukturer som påverkar binding til makrofag.

5.3.3 Strukturelement

Stammebarkfraksjonane BA50%1.1P1, BA50%1.1E1 og BAW1.1P(2)1 samt rotbarkfraksjonane RBW2.1P1, RB50%2.1 og RB50%2.1E1 vart undersøkt med omsyn til bindingsforhold. Alle fraksjonane hadde RG-I-struktur med sidekjeder av både AG-I og AG-II-struktur. RBW2.1P1 hadde ikkje arabinan-struktur. Tidlegare har fraksjonane BAW1.1, BA50%1.1 og RBW2.1 vore undersøkt med omsyn til bindingsforhold, og dataa viser at desse har HG-område (Hoås, 2014), men ingen av dei enzymbehandla fraksjonane hadde HG-område. AG-II-område er viktig for komplementfikserande aktivitet, og alle fraksjonane, med unntak av BA50%1.2 hadde høgare komplementfikserande aktivitet enn positiv kontroll BP-II, BAW1.1 hadde omtrent lik aktivitet som BP-II. RB50%2.1 var den fraksjonen med mest AG-II (med forgreiningspunktet 1,3,6-Gal) og den fraksjonen med høgast komplementfikserande aktivitet.

BA50%1.1P1 var den fraksjonen som hadde høgast makrofagstimulerande aktivitet, på linje med positiv kontroll LPS. BA50%1.1E1, BAW1.1P(2)1 RBW2.1P1, og RB50%2.1E1 har relativ lik makrofagstimulerande aktivitet. Det er ikkje lett å sjå ein tendens på kva strukturelement som den mest potente fraksjonen har, som dei andre ikkje har. Det er mogleg at AG-II-strukturen er viktig, sidan BA50%1.1E1 har mindre AG-II samanlikna med BA50%1.1P1. Det kan også henda at den tredimensjonale strukturen til molekylet har betydning for bindinga til TLR4-reseptoren.

6 Konklusjon

Målet med oppgåva var å gjere ei detaljert strukturoppklaring av polysakkarid frå *Z. xanthoxyloides*, bestemme biologisk aktivitet av fraksjonane og degraderingsprodukta deira og bestemme struktur-aktivitetsforhold til polysakkarid frå *Z. xanthoxyloides* basert på strukturstudiar og biologiske aktivitetsstudiar, sjå kapittel 2.

Strukturoppklaring

Polysakkarida frå *Z. xanthoxyloides* har stor polydispersitet. RBW2.1-fraksjonane inneheld mange store molekyl, og har meir potent komplementfikserande aktivitet enn BA50%1.1-fraksjonane med mange mindre molekyl og BAW1.1-fraksjonane med stor spreining i molekylvekta til molekyla. Behandling med pektinase av BAW1.1 gav mindre spreining i molekylvekta og ein større del mindre molekyl. Denne effekten var ikkje like tydelig i fraksjonane frå BA50%1.1 og RBW2.1

Enzymatisk degradering med pektinase gav uspesifikk spalting av Ara, Glc, Gal og GalA, mens *endo*-PG spalta spesifikt GalA. Behandling med arafase og galaktanase spalta i hovudsak Ara.

Alle fraksjonane som vart studert med omsyn til bindingstypar hadde RG-I-struktur med AG-I og AG-II-sidekjeder.

Biologisk aktivitet / Struktur-aktivitetsforhold

Fraksjonen RB50%2.1 er den fraksjonen som har høgast komplementfikserande aktivitet. Rotbark-ekstrakta har generelt ein høgare aktivitet enn stamme-ekstrakta. Og etanol-ekstrakta har generelt ein høgare aktivitet enn vass-ekstrakta.

Enzymatisk degradering med pektinase og *endo*-PG gav forgreina molekyl utan HG-område, med høgare komplementfikserande aktivitet enn native fraksjonar. Behandling med arafase og galaktanase gav lågare komplementfikserande aktivitet enn dei native fraksjonane. Ved stimulering av makrofagar gav den arafase- og galaktanase-spalta fraksjonane mindre stimulering av makrofagar enn dei pektinase/*endo*-PG-fraksjonane.

Fraksjonen BA50%1.1P1 er den fraksjonen som har høgast makrofagstimulerande aktivitet, på linje med LPS. Med unntak av BAW1.1P(2)1E1 har dei andre fraksjonane relativ lik aktivitet, omtrent litt under halve aktiviteten til LPS. Det er ikkje lett å sjå ein tendens på kva

strukturelement BA50%1.1P1 har, som dei andre ikkje har, men det kan henda at den romlege strukturen til polysakkaridet er viktig for bindinga til TLR4-reseptoren.

Framtidige studiar

Denne masteroppgåva romma ikkje alle metodane som kunne brukast for å få til ei god struktur-opplaring av polysakkarida frå *Z. xanthoxyloides* og det trengst vidare studiar. Kombinasjonen av arafase og galaktanase spalta ikkje av så mykje Gal som forventa. Det kan forsøkast med ein anna enzymkombinasjon for å få spalta av meir sidekjedene for å studere desse nærare. Det kan også vera lurt å gjere metylering/GC-MS på fleire av dei avspalta fraksjonane frå enzymdegraderinga for å få kjennskap til kva som er spalta av. Bruk av lysspreiing saman med eksklusjons-kromatografi kan gi betre innsikt i molekylstorleiken. Det kan undersøkast om KDO er tilstade for å finne ut om det er RG-II i fraksjonane.

Ved bruk av ^1H og ^{13}C -NMR ville ein saman med resultatata frå GC-MS kunne lage eit betre forslag til korleis strukturen ser ut. Det var planlagt å gjere reduktiv aminering for å kunne analysere prøvande med MS-MS eller maldi-tof for detaljert strukturundersøking, men dette vart ikkje gjort.

Vidare kan andre biologiske assays, som til dømes kjemotakse-test, cytokinfrigjerung frå makrofagar og påverknad av dendrittiske celler gi betre forståing i korleis dei ulike fraksjonane påverkar immunsystemet.

7 Reagensar

1-metylimidazol, Fluka

2-(N-Morpholino)etan-svovelsyre (MES), Sigma Aldrich

2-mercaptoetanol, Gibco

Alfa-L-arabinofuranosidase (*Aspergillus niger*), 250 U/ml, Megazyme

Amboceptor Virion 9020, Institut Virion\Serion GmbH; Antistoff

Ammoniakk (NH₃), VWR

Ammoniumacetat (CH₃CO₂NH₄), Merck

Biophytum petersianum (BP-II)

Bovint serum albumin (BSA, 30 % i DPBS), Sigma; Antigen

Carboiimid* (CMC), Sigma Aldrich

Con A Sepharose, Pharmacia

Diklormetan (DKM), Sigma Aldrich

Dimetylsulfoksid (DMSO), Merck

DMEM, Gibco; medium

Eddiksyre, VWR Chemicals

5 % Eddiksyre i metanol

Eddiksyreanhydrid, Merck

Endo-polygalakturonase (*Aspergillus aculeatus*), 280 U/mg, Megazyme

Erytrocyttar (SRBC), Sau 10010; 5/11/14 og 22/1/15

96 % Etanol, UiO

Exo-β-1,3-galaktanase (*Clostridium thermocellum*), 40 U/ml, Nzytech;

4 % Fenol

Fosfatbuffer (PBS), Gibco; pH 7,2

5 % Fosforsyre

Heksan, Fisher

Humant komplement ECG; 29/11/05

Imidazol-HCl

Iseddik (CH₃COOH), VWR

3 % Jod løyst i 6,7 % kaliumjodid-løysing

Kalveserum (FBS)

Lipopolysakkarid frå *E. coli* 055:B5 (LPS), Sigma-Aldrich; 10 ng/ μ l

LPS-antagonist; AM-12, Kerafast, Inc.

Mannitol i vassfri metanol, 1 mg/ml

Mannose (α -metyl-D-Mannose), Sigma

Metanol, vassfri

Metanol, VWR

Metyljodid (MeI), Sigma

N-(1-naptyl)etylendiamin (NED), Griess-reagens B

Natriumazid (NaN_3), Merck

Natriumbordeuterid (NaBD_4), Sigma-Aldrich

Natriumhydroksid pellets (NaOH), Merck

Natriumklorid (NaCl), Merck

Natriumpyruvat, Gibco

Natriumsulfat (Na_2SO_4), NMD

Natriumtiosulfat, Merck

Natriumnitrat (NaNO_3)

Pektinase (*Aspergillus aculeatus*), 3 800 U/ml, Novozyme

Penicillin/streptomycin

RAW 264,7 cellelinje frå musemakrofagar, Sigma-Aldrich

3 M HCl i vassfri metanol

Saltsyre (HCl), VWR

Sulfanilamid, Sigma Aldrich; Griess-reagens A

95 % Svovelsyre (H_2SO_4), VWR

TMS, vassfri

Trifluoreddiksyre (TFA), Sigma Aldrich

Tris(hydroksymetyl) aminometan (TRIZMA), Sigma-Aldrich

Tris-HCl ((Hydroksymetyl) Aminometan Hydroklorid), Shelton Scientific

Veronalbuffer for CFT, Institut Virion\Serion GmbH; pH 7,2

* (N-Cykloheksyl-N'-(2-morfolinoetyl)carbodiimid metyl-p-toluenesulfonat)

Litteraturliste

- Adesina, S.K., **1986**. Further novel constituents of *Zanthoxylum Zanthoxyloides* root and pericarp. *Journal of Natural Products* **49**(4)715–716, Doi:10.1021/Np50046a035.
- AfricanPlantDatabase, **2012**. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. Conservatoire et Jardin botaniques & South African National Biodiversity Institute, <http://www.ville-ge.ch/musinfo/bd/cjb/africa/details.php?langue=en&id=89787>, sett: 21.02.2015.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., **2002**. The plant cell wall, *Molecular biology of the cell*, 4. utg. Garland Science, New York, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26928/>, sett: 05.05.2015.
- Bio-Rad, **2000**. Bio-Gel® P polyacrylamide gel. Instruction manual. Bio-Rad Laboratories, Hercules.
- Boye, A., Koffuor, G.A., Boampong, J.N., Amoateng, P., Ameyaw, E.O., Ansah, E.O., Addai, G.M., Adjei, C.K., Addo, J., Penu, D.K.A., **2012**. Gastroprotective effect and safety assessment of *Zanthoxylum Zanthoxyloides* (Lam) waterm root bark extract. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* **7**(2)73–80.
- BRENDA, **2015a**. Information on EC 3.1.1.11 – pectinesterase. Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany, <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.1.1.11>, sett: 05.05.2015.
- BRENDA, **2015b**. Information on EC 3.2.1.15 – polygalacturonase. Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany, <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.2.1.15>, sett: 05.05.2015.
- BRENDA, **2015c**. Information on EC 3.2.1.55 – non-reducing end alpha-L-arabinofuranosidase. Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany, <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.2.1.55>, sett: 05.05.2015.
- BRENDA, **2015d**. Information on EC 3.2.1.145 – galactan 1,3-beta-galactosidase. Institut fuer Biochemie und Bioinformatik, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany, <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.2.1.145>, sett: 05.05.2015.
- Caffall, K.H., Mohnen, D., **2009**. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research* **344**(14)1879–1900, Doi:10.1016/j.carres.2009.05.021.
- Chambers, R.E., Clamp, J.R., **1971**. An assessment of methanolysis and other factors used in analysis of carbohydrate-containing materials. *Biochemical Journal* **125**(4)1009–1018.
- Ciucanu, I., Kerek, F., **1984**. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* **131**(2)209–217, Doi:10.1016/0008-6215(84)85242-8.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., **1956**. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **28**(3)350–356.

Etsè, K.D., Aidam, A.V., de Souza, C., Crèche, J., Lanoue, A., **2011**. In vitro propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant. *Acta Botanica Gallica* **158**(1)47–55, Doi:10.1080/12538078.2011.10516253.

GE-Healthcare, **2007a**. Affinity chromatography. Principles and methods, Handbooks.

GE-Healthcare, **2007b**. PD-10 Desalting Columns. Instructions 52-1308-00 BB.

GE-Healthcare, **2007c**. Superdex 200 prep grade – unmatched resolution and speed. Application Note 18-1118-55 AB. Gel filtration.

GE-Healthcare, **2007d**. Superloop 10 ml, 50 ml, 150 ml. Data file 18-1134-31-AC. Liquid chromatography.

GE-Healthcare, **2010**. Gel filtration. Principles and methods, Handbooks.

GE-Healthcare, **2011**. HiLoad™ 16/600 and 26/600 Superdex™ 30 prep grade. HiLoad 16/600 and 26/600 Superdex 75 prep grade. HiLoad 16/600 and 26/600 Superdex 200 prep grade. Instruction 28-9920-17 AC.

Grønhaug, T.E., Ghildyal, P., Barsett, H., Michaelsen, T.E., Morris, G., Diallo, D., Inngjerdingen, M., Paulsen, B.S., **2010**. Bioactive arabinogalactans from the leaves of *Opilia celtidifolia* Endl. ex Walp. (Opiliaceae). *Glycobiology* **20**(12)1654–1664, Doi:10.1093/glycob/cwq120.

Hoås, G., **2014**. Polysakkarider med biologisk aktivitet isolert fra en tradisjonell medisinsplante fra Mali. *Fagara zanthoxyloides* Lam. Mastergradsoppgåve, Farmasøytisk institutt, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet. Universitetet i Oslo, Oslo.

Inngjerdingen, K.T., Meskini, S., Austarheim, I., Ballo, N., Inngjerdingen, M., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Paulsen, B.S., **2012**. Chemical and biological characterization of polysaccharides from wild and cultivated roots of *Vernonia kotschyana*. *Journal of Ethnopharmacology* **139**(2)350–358, Doi:10.1016/j.jep.2011.10.044.

Inngjerdingen, K.T., Patel, T.R., Chen, X., Kenne, L., Allen, S., Morris, G.A., Harding, S.E., Matsumoto, T., Diallo, D., Yamada, H., Michaelsen, T.E., Inngjerdingen, M., Paulsen, B.S., **2007**. Immunological and structural properties of a pectic polymer from *Glinus oppositifolius*. *Glycobiology* **17**(12)1299–1310, Doi:10.1093/glycob/cwm088.

Janeway, C.A.J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., **2001a**. The complement system and innate immunity, *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 5. utg. Garland Science, New York, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27100/>, sett: 05.05.2015.

Janeway, C.A.J., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J., **2001b**. Receptors of the innate immune system, *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 5. utg. Garland Science, New York, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27129/>, sett: 05.05.2015.

Jayani, R.S., Saxena, S., Gupta, R., **2005**. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry* **40**(9)2931–2944, Doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026.

Kim, J.-K., Carpita, N.C., **1992**. Changes in esterification of the uronic acid groups of cell wall polysaccharides during elongation of maize coleoptiles. *Plant Physiology* **98**(2)646–653, Doi:10.1104/pp.98.2.646.

Martin-Christ, **2013**. Operating manual freeze-dryer. Alpha 1-4 LDplus. Alpha 2-4 LDplus Osterode am Harz.

Matu, E.N., **2011**. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. PROTA (Plant Resources of Tropical Africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Nederland, <http://www.prota4u.org/protav8.asp?p=Zanthoxylum+zanthoxyloides>, sett: 21.02.2015.

Michaelsen, T.E., Gilje, A., Samuelsen, A.B., Hogasen, K., Paulsen, B.S., **2000**. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. *Scandinavian Journal of Immunology* **52**(5)483–490, Doi:10.1046/j.1365-3083.2000.00801.x.

Misra, L.N., Wouatsa, N.A.V., Kumar, S., Kumar, R.V., Tchoumboungang, F., **2013**. Antibacterial, cytotoxic activities and chemical composition of fruits of two Cameroonian *Zanthoxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology* **148**(1)74–80, Doi:10.1016/j.jep.2013.03.069.

Mohnen, D., **2008**. Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **11**(3)266–277, Doi:10.1016/j.pbi.2008.03.006.

Nergard, C.S., Matsumoto, T., Inngjerdningen, M., Inngjerdningen, K., Hokputsa, S., Harding, S.E., Michaelsen, T.E., Diallo, D., Kiyohara, H., Paulsen, B.S., Yamada, H., **2005**. Structural and immunological studies of a pectin and a pectic arabinogalactan from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp. (Asteraceae). *Carbohydrate Research* **340**(1)115–130, Doi:10.1016/j.carres.2004.10.023.

Olounladé, P.A., Azando, E.V.B., Hounzangbé-Adoté, M.S., Tam Ha, T.B., Leroy, E., Moulis, C., Fabre, N., Magnaval, J.F., Hoste, H., Valentin, A., **2012**. In vitro anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. *Parasitology Research* **110**(4)1427–1433, Doi:10.1007/s00436-011-2645-4.

Ovodova, R.G., Popov, S.V., Bushneva, O.A., Golovchenko, V.V., Chizhov, A.O., Klinov, D.V., Ovodov, Y.S., **2006**. Branching of the galacturonan backbone of comaruman, a pectin from the marsh cinquefoil *Comarum palustre* L. *Biochemistry (Moscow)* **71**(5)538–542.

Paulsen, B.S., Barsett, H., **2005**. Bioactive pectic polysaccharides, i: Heinze, T. (red.), *Polysaccharides I. Structure, characterization and use* – Advances in polymer science (nr. 186). Springer-Verlag, Berlin, s. 69–101, Doi:10.1007/b136817, <http://link.springer.com/book/10.1007/b136812>, sett: 21.02.2015.

Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., **2010**. Legemiddelanalyse, 2. utg. Fagbokforlaget, Bergen.

Pérez, S., Rodriguez-Carvajal, M.A., Doco, T., **2003**. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **85**(1–2)109–121, Doi:10.1016/S0300-9084(03)00053-1.

Pettolino, F.A., Walsh, C., Fincher, G.B., Bacic, A., **2012**. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. *Nature Protocols* **7**(9)1590–1607, Doi:10.1038/nprot.2012.081.

Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., **2007**. Rang and Dale's Pharmacology, 6. utg. Churchill Livingstone Elsevier Philadelphia.

- Round, A.N., Rigby, N.M., MacDougall, A.J., Morris, V.J., **2010**. A new view of pectin structure revealed by acid hydrolysis and atomic force microscopy. *Carbohydrate Research* **345**(4)487–497, Doi:10.1016/j.carres.2009.12.019.
- Round, A.N., Rigby, N.M., MacDougall, A.J., Ring, S.G., Morris, V.J., **2001**. Investigating the nature of branching in pectin by atomic force microscopy and carbohydrate analysis. *Carbohydrate Research* **331**(3)337–342.
- Rundle, R.E., Foster, J.F., Baldwin, R.R., **1944**. On the nature of the starch-iodine complex. *Journal of the American Chemical Society* **66**(12)2116–2120.
- Schepetkin, I.A., Quinn, M.T., **2006**. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* **6**(3)317–333, Doi:10.1016/j.intimp.2005.10.005.
- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredez, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., Youngs, H., **2004**. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**(5705)2206–2211, Doi:10.1126/science.1102765.
- Spectrum-Laboratories, **2012**. The ABCs of filtration and bioprocessing for the third millennium, i: Ballew, H.W., Martinez, F.J., Markee, C., Eddleman, R.T. (red.), Rancho Dominguez, CA.
- Sweeley, C.C., Bentley, R., Makita, M., Wells, W.W., **1963**. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. *Journal of the American Chemical Society* **85**(16)2497–2507, Doi:10.1021/ja00899a032.
- ThePlantList, **2013**. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. The Plant List, <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2469127>, sett: 21.02.2015.
- Togola, A., Inngjerdingen, M., Diallo, D., Barsett, H., Rolstad, B., Michaelsen, T.E., Paulsen, B.S., **2008**. Polysaccharides with complement fixing and macrophage stimulation activity from *Opilia celtidifolia*, isolation and partial characterisation. *Journal of Ethnopharmacology* **115**(3)423–431, Doi:10.1016/j.jep.2007.10.017.
- Tropicos, **2015**. *Zanthoxylum zanthoxyloides* (Lam.) Zepern & Timler. Missouri Botanical Garden, <http://www.tropicos.org/Name/100386516>, sett: 21.02.2015.
- Vincken, J.P., Schols, H.A., Oomen, R.J., McCann, M.C., Ulvskov, P., Voragen, A.G.J., Visser, R.G.F., **2003**. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiology* **132**(4)1781–1789.
- Voragen, A.G.J., Coenen, G.-J., Verhoef, R.P., Schols, H.A., **2009**. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Structural Chemistry* **20**(2)263–275, Doi:10.1007/s11224-009-9442-z.
- Wouatsa, V.N.A., Misra, L., Kumar, S., Prakash, O., Khan, F., Tchoumboungang, F., Venkatesh, R.K., **2013**. Aromatase and glycosyl transferase inhibiting acridone alkaloids from fruits of Cameroonian *Zanthoxylum* species. *Chemistry Central Journal* **7**(1)125, Doi:10.1186/1752-153X-7-125.
- Yamada, H., Kiyohara, H., **2007**. Immunomodulating activity of plant polysaccharide structures, i: Kamerling, J.P., Boons, G.-J., Lee, Y.C., Suzuki, A., Taniguchi, N., Voragen, A.G.J. (red.),

Comprehensive glycoscience. From chemistry to systems biology. Volum 4: Cell glycobiology and development; health and disease in glycomedicine. Elsevier, Amsterdam, s. 663–694, Doi:10.1016/B978-044451967-2/00125-2, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444519672001252>, sett: 21.02.2015.

Yapo, B.M., **2011a**. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins – A new hypothetical model. *Carbohydrate Polymers* **86**(2)373–385, Doi:10.1016/j.carbpol.2011.05.065.

Yapo, B.M., **2011b**. Rhamnogalacturonan-I: A structurally puzzling and functionally versatile polysaccharide from plant cell walls and mucilages. *Polymer Reviews* **51**(4)391–413, Doi:10.1080/15583724.2011.615962.

YMC, **2015**. YMC-Pack Diol-SEC. YMC Co., Ltd, Kyoto, Japan, http://www.ymc.co.jp/en/columns/ymc_pack_diol/index.html, sett: 05.05.2015.