

Rapport Å0613

Bioprospektering av organismer fra dyphavet

Marianne Synnes & Knut Sjøstad

Ålesund, 2006



(uk.wikipedia.org)

	MØREFORSKING Ålesund	Møreforskning Ålesund Postboks 5075 6021 ÅLESUND Telefon: 70 11 16 00 Telefaks: 70 11 16 01 www.mfaa.no NO 971 371 153
---	---------------------------------------	---

RAPPORT

Tittel:	ISSN 0804-5380
Bioprospektering av organismer fra dyphavet	Rapport nr.: Å0613
	Prosjekt nr.: 54399/54423/54461
Oppdragsgiver (navn og adr.):	Dato: 29.11.06
Møre og Romsdal fylke	Antall sider: 18
	Referanse oppdragsgiver:
Tlf./Fax.:	
Forfatter: Marianne Synnes	Signatur:
Rapport godkjent av: Iren S. Stoknes	Signatur:

Sammendrag:

I 2004 mottok Møreforskning Ålesund i samarbeid med Høgskolen i Ålesund støtte fra Møre og Romsdal Fylke til å starte opp prosjektet "Bioprospektering av dyphavsarter". I prosjektet har vi studert dyphavsarter som ble samlet inn til bl.a. dette prosjektet under MAR-ECO toktet sommeren 2004. Prosjektet er delfinansiert av Møre og Romsdal Fylke t.o.m. 2006.

Emneord:

Bioprospektering, dyphavsarter, mikroorganismer

Distribusjon/Tilgang: Åpen

INNHOOLD

1. Introduksjon.....	4
2. Material og metode.....	5
2.1 Innhenting av prøvemateriale.....	5
2.2 PCR/ DGGE analyse.....	7
2.3 Isolering av bakterier fra overflaten av marine organismer.....	7
2.4 Krysstesting av bakterier.....	8
2.5 Isolering av cystein protease inhibitorer.....	8
2.6 SDS-PAGE.....	9
2.7 Sekvensering av inhibitorer.....	9
3. Resultater.....	10
3.1 Karakterisering av mikroflora.....	10
3.2 Identifisering av mikroflora.....	10
3.3 Krysstesting av bakterier.....	12
3.4 Isolering av cystein proteasehemmere fra fiskens overflate.....	13
3.5 SDS-PAGE.....	14
3.6 Sekvensering av inhibitorer.....	15
4. Formidling.....	17
5. Konklusjon.....	17
6. Referanser.....	18

1. Introduksjon

I 2004 mottok Møreforskning Ålesund i samarbeid med Høgskolen i Ålesund støtte fra Møre og Romsdal Fylke til å starte opp prosjektet "Bioprospektering av dyphavsarter". I prosjektet har vi studert dyphavsarter som ble samlet inn til bl.a. dette prosjektet under MAR-ECO toktet sommeren 2004. Prosjektet er delfinansiert av Møre og Romsdal Fylke t.o.m. 2006.

Dyphavet inneholder en variert forekomst av bein- og bruskfiskarter, krepsdyr, blekksprut og geléplankton (småmaneter o.a.). Fiskearter er funnet helt ned til 11 000 meter. Dyphavsarter lever i ekstreme omgivelser med mørke, høyt trykk og lav temperatur. Med dyphavet menes dyp under ca. 400 meter. Jordens havområder har en gjennomsnittlig dybde på 3800 m, og derfor et trykk på 38 MPa. Temperaturen i dyphavet ligger på 1-3 °C, så det er innlysende at arter som lever under slike forhold må ha utviklet spesielle egenskaper. I havet finnes det også hydrotermale sprekker hvor det er både høyt trykk og høy temperatur. Marine organismer kan altså bli utsatt for temperaturer mellom 1-300 °C og trykk på 0,1 til 110 MPa.

Å leve på store havdyp stiller store krav til immunsystemet og metabolismen for øvrig. På grunn av de ekstreme levevilkårene er det grunn til å tro at disse organismene inneholder mikroorganismer og enzymer som er tilpasset til å fungere under slike forhold, og dermed er annerledes enn de som finnes under mer "normale" miljøbetingelser. Studier av enzymer isolert fra dyphavs-mikroorganismer viser at dette stemmer.

Det fins mange eksempler på at legemidler er hentet fra bakterier. Bakterier tilhørende ulike Streptomyces arter er i dag ansvarlige for 75 % av all antibiotika på markedet (Weber et al., 2003). Med en økende utvikling av resistente bakterier, er det viktig å finne nye antibakterielle stoffer som kan erstatte antibiotika som bakteriene er blitt resistente mot.

Prosjektets hovedmålsetning:

Gjennom studier av organismer fra dyphavet kunne kartlegge nye organismer og finne komponenter som kan være kommersielt interessante.

Delmål for prosjektet:

- I. Isolere og karakterisere mikrofloraen på overflaten av flere arter av dyphavsfisk
- II. Undersøke bioaktivitet i ekstrakter i forhold til antimikrobiell aktivitet
- III. Isolere og karakterisere enzymer / inhibitorer fra overflaten til utvalgte dyphavsarter

2. Material og metode

2.1 Innhenting av prøvemateriale

Sommeren 2004 deltok Møreforskning i tokt på den Midt-Atlantiske Ryggen (MAR) i regi av det internasjonale prosjektet Mar-Eco. Mar-Eco prosjektet hadde som mål å kartlegge biodiversiteten på MAR fra Azorene i sør til Island i nord. Havforskningsinstituttet var prosjektleder og bidro med det nye forskningsskipet G. O. Sars samt forskningspersonell. For å støtte G.O. Sars og prøvetakingen med fangst fra flere typer redskap, ble det gjennom iherdig innsats skaffet midler fra private og offentlige sponsorer og bidragsytere til å leie inn et kommersielt linefartøy, MS Loran. Fartøyet støttet G.O. Sars under andre delen av toktet fra begynnelsen til slutten av juli. Møreforskning hadde ansvaret for gjennomføringen av toktet med linebåten, og fikk dermed anledning til å samle inn en rekke dyphavsarter til forskningsformål. MAR-ECO toktet ble gjennomført med godt resultat, og prosjektet "Bioprospektering av dyphavsarter" mottok flere ulike arter av dyphavs fisk fra MS Loran, samt andre dyphavsarter fra G.O.Sars.

Tabell 1: Prøvemateriale fra MS Loran

<u>Materiale</u>	<u>Redskap</u>
Macrourus berglax/ Isgalt:	Line
Sebastes marinus/ Uer:	Line
Smooth head /Glatthodefisk:	Line
Hydrolagus affinis /Brun Havmus:	Line
Coryphaenoides sp.	Line
Spectrunculus grandis/ Loranfisk:	Line
Brosme Brosme/ Brosme:	Line
Etmopterus princeps/ Stor svarthå:	Line
Centroscymnus crepidater / Bunnhå 1:	Line
Centroscymnus crepidater / Bunnhå 2:	Line
Coryphaenoides armatus/	Line
Synaphobranchus kaupii/ Dyphavsål	Line
Bathyraja richardsoni/ Skate	Line
Antimora rostrata	Line

Tabell 2 Prøver fra G.O. Sars

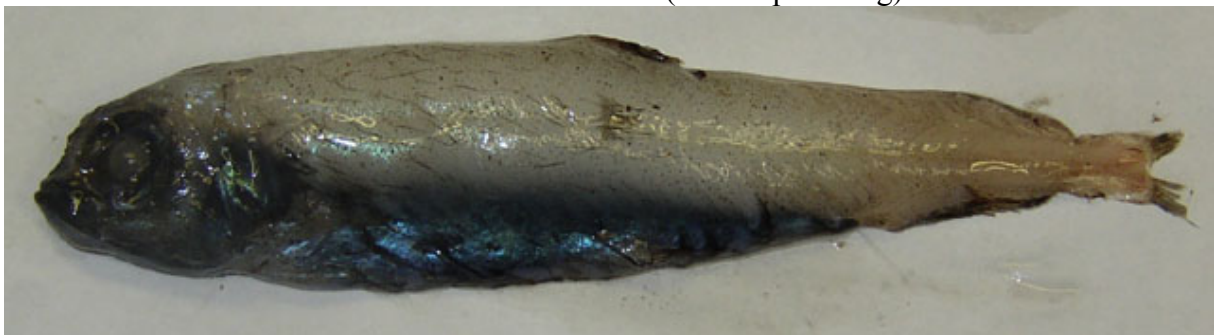
DATO	STASJON	REDSKAP	DYP m	ART
11062004	4	CTD	900	Vannprøve
16062004	12	CTD	4360	Vannprøve
13062004	8	334/1033	0-300	Bentosemia sp
14062004	8	334/1033	0-300	Crustacea
14062004	8	334/1034	800-300	Periphylla
13062004	8	Judayhov	1500-0	Div plankton
23062004	22 og 24	Judayhov	2300-0	Egg: kjempereke
28062004	30	359/1124		Crustacea
29062004	32	359		Plankton
13062004	6			Bathylagus euryops
13062004	6			Lampanyctue macdonaldi
13062004	8	334/1033	0-300	Crustacea Krill
24062004	24			Egg fra kjempereke
28062004	30			Crustacea



Brun havmus



Periphylla
(uk.wikipedia.org)



Bathylagus euryops (Fish Base)

2.2 PCR/ DGGE analyse

PCR/ DGGE analyse ble utført som tidligere beskrevet av Muyzer et al. (1993) og senere modifisert av Øvreås et al. (1997). PCR-blandingen inneholdt: 5 µl celle suspensjon (template), 25 µl 2xPCR-mix (Red'y Gold Mix, PK-0064-02R eller Gold-Mix PK-0064-02 (MedProbe), 2.5 µl BSA (20 mg/ml), 0.5 µM av hver primer (MWG) (0.25µl, 100 pmol/µl), 17µ dH₂O ble tilsatt til en finalt volum på 50 µl. Disse primerene ble brukt: PRBA338f med GC-clamp og PRUN518r. Følgende PCR-program ble brukt: 95 °C i 10 min (enzym aktivering) 92 °C i 2 min; 30 sykluser: 92 °C i 1 min (denaturering), 55 °C i 30 s, 72 °C i 1 min og til slutt 72 °C i 6 min.

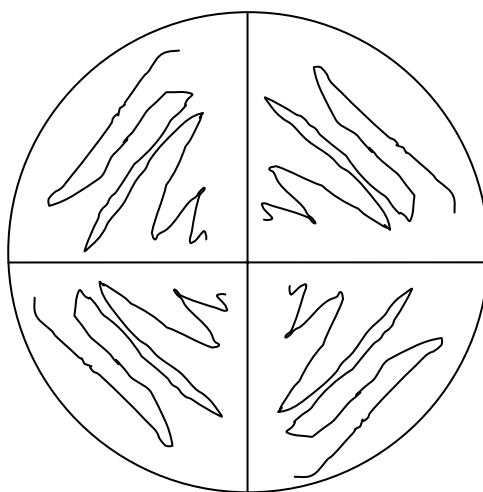
PCR-produktet (5 µl) ble analysert på en 1 % agarose-TAE gel (140 mm*110mm * 4 mm og kjørt i 5 min ved 50 V og 45 min ved 100 V). Agarosegelen ble farget med ethidium bromide (0.5 µg/ ml i dH₂O i 30 min fulgt av 5 min avfarging i dH₂O), og fotografert med et Kodak EDAS 290 system med et 495 nm EtBr-filter .

DGGE ble gjennomført med en Scie-Plas V20 CDC Dual Vertical Unit. Gelen (8 % (wt/vol) polyacrylamide gel (Bio Rad)) i 0.5xTAE-buffer var 1 mm tykk og hadde en gradient fra 20 % to 60 % denaturant, hvor 100 % denaturant inneholdt 7 M urea og 40 % formamide. 20 µl prøver ble applisert og gelen ble kjørt ved 20 V i 10 min og 60 V i 16 timer. Temperaturen var 60°C og bufferen var 0.5xTAE (20mM Tris, 10 mM acetate, 0.5 mM Na₂EDTA, pH 7.4). Gelen ble farget med SYBR-green I (1:10,000 dilution in 1xTAE) før den ble fortografert i et KODAK EDAS 290 system med SYBR green filter (535 nm)

2.3 Isolering av bakterier fra overflaten av marine organismer

Ca. 10 g/ 40-50 cm² av skinnen ble skjært ut med en steril skalpell og overført til en steril Stomacker pose med filter. 50 ml NSS-løsning ble tilsatt og prøven homogenisert i 30 sekunder i en Stomacker blender. Flere fortyndinger av homogenatet ble sådd ut på VNSS skåler og dyrket ved 15 °C i 5-6 dager. Typiske fortyndinger var: ufortynnet, 1:10, 1:100 og 1:1000, fortyntet i NSS for hver art som ble analysert.

Bakteriene som vokste opp var en blanding av ulike bakteriearter, ofte med ulikt utseende, så vi søkte å plukke kolonier fra flest mulig bakteriearter. De plukkede koloniene ble strøket ut på nye VNSS-skåler som vist under.



Bakteriene ble dyrket i 3 dager ved 15 °C, og en stor loop av bakterier ble resuspendert i 1.5 ml VNSS-medium tilsatt 15% glycerol og frosset. Bakterieklyngen ble mikset godt før frysing i egnede cryo-rør.

2.4 Krysstesting av bakterier

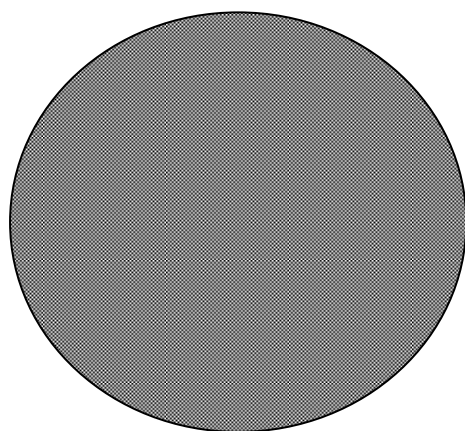
Hensikt: Teste om en bakterieart skiller ut stoffer som hindrer den andre i å vokse helt inntil. Bakterieart A, B, C og D (**Testbakterier**) ble testet mot bakterieart E (**Målbakterie**):

Dag 1: Testbakteriene ble dyrket opp i ristekultur (VNSS) i 2-3 dager. En stor øse av hver art ble slemmet opp i 50 ml VNSS medium og dyrket ved 15 °C.

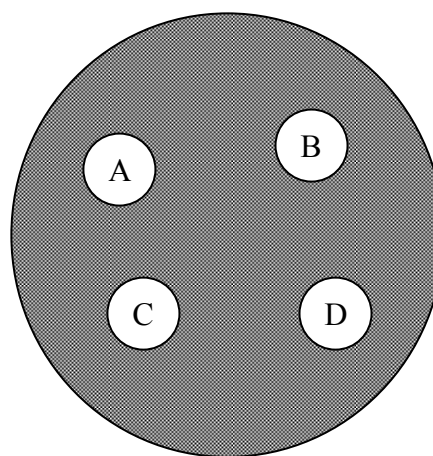
Dag 3: 100 µl av hver **testbakterie** ble strøket jevnt utover en VNSS-agar som en plen, og inkuberet i 3 dager.

Målbakteriene ble dyrket i VNSS ristekultur i tre dager. En stor øse av hver art ble slemmet opp i 50 ml VNSS medium og dyrket ved 15 °C.

Dag 6:



1) **Målbakterien** (100 µl) ble strøket utover skålen før **testbakteriene** ble lagt på



2) Fra **testbakteriene** stanset vi ut små runde pluggene som ble lagt med bakteriesiden ned mot **målbakterien**. Bakteriene ble deretter dyrket i 3 nye dager før inspeksjon av hemmingssoner rundt pluggene.

2.5 Isolering av cystein protease inhibitorer

Inhibitorer ble isolert fra huden til fire dyphavsarter, *Antimora rostrata*, *Hydrolagus affinis*, *Spectrunculus grandis* and *Coryphaenoides* sp. etter samme metode som tidligere publisert (Synnes, 1998). Skinnene ble homogenisert i 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, inneholdende 0.25 M sucrose, ved bruk av en Kenwood foodprocessor. Supernatanten ble filtrert og applisert på

papain-Sepharose chromatography som tidligere beskrevet (Synnes, 1998). Etter isolering fra papain-Sepharose kolonnen ble inhibitorer dialysert overnatt mot 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. Den dialyserte supernatanten ble applisert på en DEAE-Sepharose ionebyttekolonne og eluering av inhibitorer ble utført med en lineær NaCl gradient i 10 mM Tris-HCl, pH 7.0.

Inhibitor-aktiviteten ble målt mot papain som tidligere beskrevet (Synnes, 1998).

2.6 SDS-PAGE

Inhibitorerne ble kjørt på en 7.5 % SDS-PAGE (Bio Rad), og farget med Coomassie Brilliant Blue R-250 før de ble fotografert.

2.7 Sekvensering av inhibitorer

Båndene inneholdende inhibitorerne ble skjært ut av gelen og sendt til PROBE, Universitetet i Bergen for sekvensering. Prøvene ble sekvensert ved hjelp av CAF-metoden:

1) Reduksjon og alkylering

DTT (DiThioTritol, #171318-02 (Amersham Biosciences)) og Iodoacetamid (#I-6125, (SigmaAldrich)) ble benyttet til reduksjon og alkylering av proteinene.

2) Trypsinering av proteiner

Trypsin Porsine (#V511A, Promega) ble benyttet som protease.

3) Ekstrahering av peptider

Peptidene ble ekstrahert med 0,1% og 1% TFA (trifluoroacetic acid) og 60 % acetonitril.

4) Derivatisering

Chemically associated fragmentation (CAF) reagens (Ettan CAF MALDI Sequencing Kit, Amersham Bioscience AB, Uppsala, Sverige) gjør sekvensering lettere ved at fragmenteringsmønsteret blir mindre komplisert med nøytrale b-ioner (blir ikke detektert) og positive y-ioner. Derivatiseringen skjer i to steg, først blir lysin omdannet til homoarginin (masseøkning på 42 Da) deretter skjer det en sulfonering av N-terminal ende av peptidene (masseøkning på 136 Da).

5) Massespektrometisk analyse

Prøvene ble analysert ved hjelp av MALDI-ToF (Ultraflex ToF/ToF, BRUKER Daltonics GmbH). Peptid kalibreringsstandard (#222570, BRUKER Daltonics GmbH) ble brukt til kalibrering av masseskalaen. Prøvene ble applisert på en 600 µm AnchorTarget(# 209513) samt ground steel target (#209519) som drier droplet med matrix (dihydroxybenzoic acid (DHB)).

3. Resultater

3.1 Karakterisering av mikroflora

Isolering av mikroorganismer som lever på overflaten av ulike dyphavsarter.

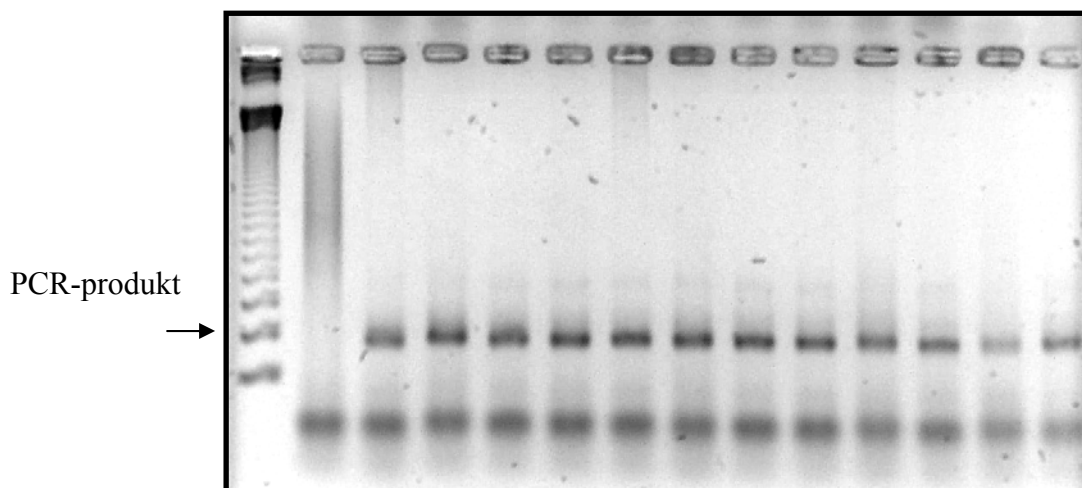
Av alt materialet som ble samlet inn fra MS Loran, ble det isolert bakteriearter fra overflaten til 14 ulike dyphavsfisk fanget med line. Alle de isolerte bakteriene ble testet for å avgjøre om de skiller ut antibakterielle stoffer/ stoffer som hindrer vekst av andre mikroorganismer. De isolerte bakteriene ble identifisert vha. sekvensering av 16S rDNA. Bakteriearter som ikke var i stand til å vokse under våre laboriebetingelser ble også identifisert ved hjelp av sekvensering.

I tillegg ble det samlet inn ulike mindre arter fra forskningsfartøyet G.O. Sars. Det ble også isolert bakteriearter assosiert med disse artene, de ble sekvensert og forsøkt identifisert.

3.2 Identifisering av mikroflora

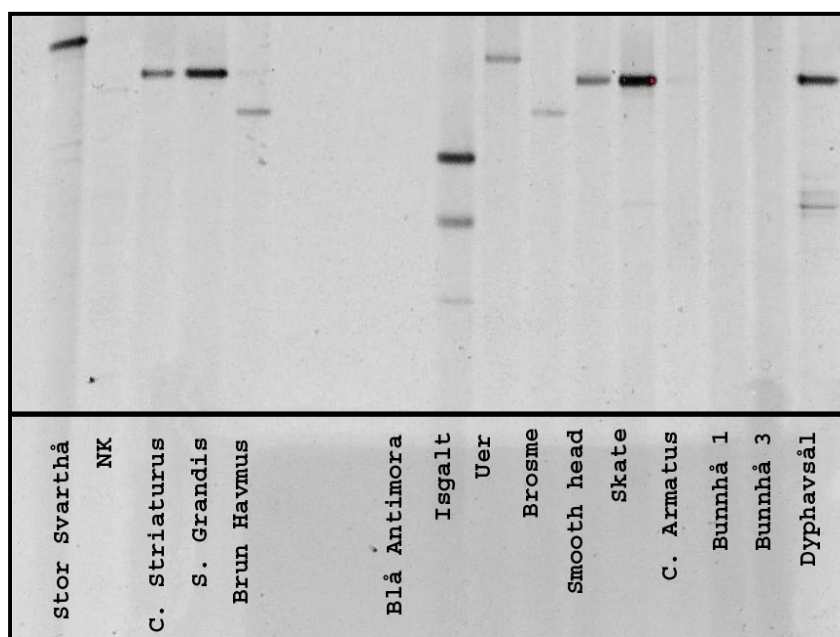
Mikroorganismer ble identifisert ved hjelp av 16 S rDNA (ribosomal DNA) analyser. Bakterieribosomene inneholder områder som er like for alle eubakterier (konservative områder) og områder som er spesifikke for den enkelte art. Tilsvarende gjelder for archaeobakterier.

16S rDNA området på hver bakterie ble oppkonsentrert ved hjelp av PCR analyse, og produktet ble kjørt på agarosegel for å sjekke at 16S rDNA området er blitt mangfoldiggjort. Produktet vises som et DNA bånd på 236 bp



Figur 1. 16S rDNA etter PCR-analyse, separert på 1% agarosegel

PCR-produktene ble separert ved hjelp av DGGE-analyse, og hvert bånd på DGGE-gelen representerer en bakterieart.



Figur 2: DGGE-gel av 16SrDNA oppkonsentrert ved PCR-analyse fra mikroflora isolert fra overflaten av ulike dyphavsarter (NK = Negativ kontroll)

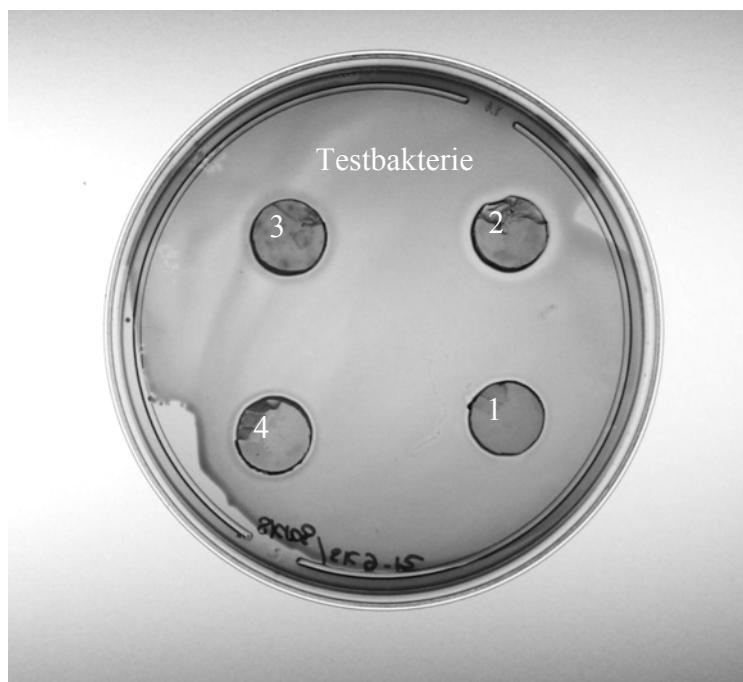
Resultatene av DGGE-gelen indikerte at den dominerende bakteriearten som levde på overflaten av de ulike dyphavsfiskene varierte mellom artene. For å identifisere hvilke arter som koloniserte overflaten av de ulike fiskeartene ble hovedbåndene skåret ut av gelen og DNA'et ble sekvensert. De ulike sekvensene ble sammenholdt med genomiske databaser for om mulig å identifisere de ulike bakteriene. Flere av de sekvenserte bakteriene så ut til å være nye arter, og kunne derfor ikke identifiseres ved hjelp av databasesøk (Tabell 3)

Tabell 3. Resultat av sekvensering

Coryphaenoides sp.	Uncultured cyanobacterium (DQ881163)
Spectrunculus grandis	Halomonas sp. (34525825)
Brun havmus	Psychrobacter sp. (DQ270705)
Brun havmus	Psychrobacter sp. (EF061909)
Blå antimora	Ingen påvisbar bakterievekst
Isgalt	Pseudoalteromonas sp.(DQ659044)
Isgalt	Psychrobacter sp. (EF061909)
Isgalt	Bacillus pumilus (EF032679)
Uer	Ingen treff i database, ny art?
Brosme	Ingen treff i database, ny art?
Smooth head	Ingen treff i database, ny art?
Skate	Ingen treff i database, ny art?
Coryphaenoides armatus	Ingen påvisbare bakterier
Bunnhå 1	Ingen påvisbare bakterier
Bunnhå 3	Ingen påvisbare bakterier
Dyphavsål	Uncultured cyanobacterium (DQ881163)
Stor svarthå	Ingen treff i database, ny art?

3.3 Krysstesting av bakterier

Isolerte bakterier som var i stand til å vokse under laboratorieforhold ble testet mot hverandre for å undersøke om noen av artene var i stand til å hemme veksten av de bakterieartene de ble testet mot.



Figur 3. Bakteriestamme 2 viser her antibakteriell aktivitet mot testbakterien. Denne aktiviteten ses som en ring rundt stamme 2, hvor testbakterien ikke er i stand til å vokse.

Resultatet av en slik krysstesting viste at følgende bakteriestammer var i stand til å hemme veksten av bakteriene de var testet mot:

Isgalt nr 1, 2, 3, 4
Smooth head nr 3
Smooth head nr 5
Brun havmus nr 5 og 7
Spectrunculus grandis nr 2

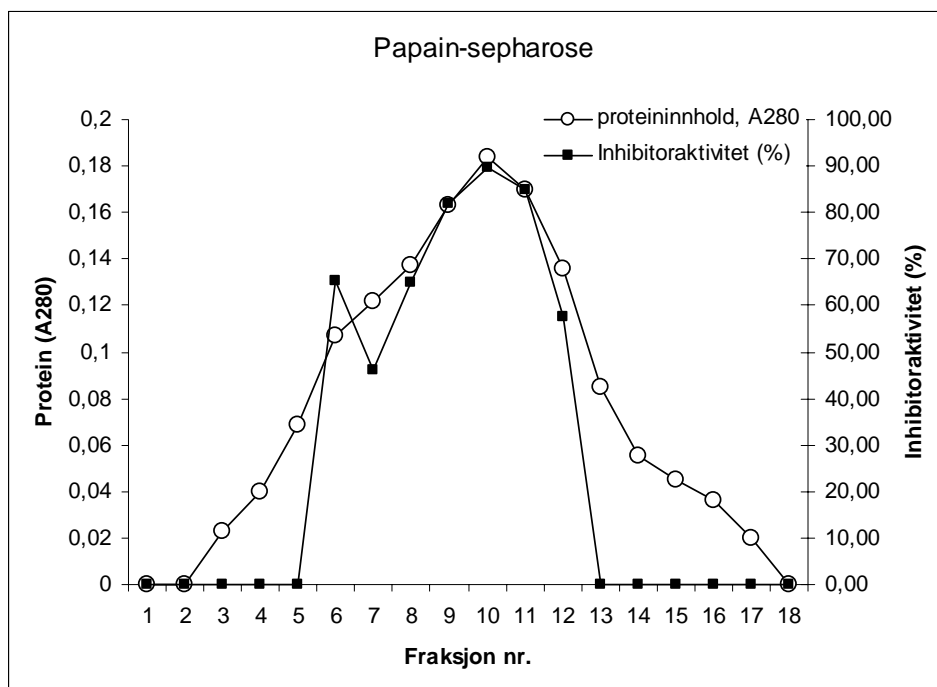
Disse bakterieartene ble testet videre mot *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Yersinia ruckeri* og *Carneobacterium piscicola*. Bakteriene ble testet mot hverandre ved krysstesting, og det ble laget ekstrakt av dyphavsbakteriene for å teste de mot de ovenfor nevnte bakteriene. Resultatene viste at bakteriene isolert fra Isgalt, Smooth head, Brun havmus og *Spectrunculus grandis* ikke viste noen antibakteriell aktivitet mot testbakteriene *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Yersinia ruckeri* og *Carneobacterium piscicola*. Bakteriene har derimot evnen til å hemme veksten av ulike marine bakterier, men viste ingen evne til å hemme veksten av de terresteriale (landlevende) bakteriene som ble testet.

3.4 Isolering av cystein proteasehemmere fra fiskens overflate.

Det er blitt en økt fokusering på rollen til proteasehemmere innenfor human medisin. Det ser ut til at proteaser spiller en viktig rolle i både vekst og spredning av kreftsvulster. Man ser bl.a økt aktivitet av cystein proteaser i tumorer, og dette er i noen tilfeller vist å korrespondere med redusert aktivitet av cystein inhibitorer. Familien av cystein proteaser er nøkkelfaktorer i patogenesen av kreftutvikling, leddgikt, osteoporose og mikrobielle infeksjoner.

En måte å kontrollere aktiviteten til cystein proteaser og andre kreftrelaterte proteaser som metalloproteaser, er derfor å øke tilgjengeligheten av inhibitorer. Cystein proteaser spiller også en avgjørende rolle for mange parasitters invasjon og spredning, bl.a. for malaria-parasitten *Plasmodium falciparum*. Her har cystein inhibitorer med hell vært brukt i behandlingen av malaria. Proteaser og deres inhibitorer er derfor svært viktige i både dyr og menneskers immunforsvar, og det er derfor viktig å få kjennskap til funksjon og virkningsmekanisme for eventuelt å kunne bruke inhibitorer aktivt som behandling mot virus og parasittangrep (McKerrow et al., 1999), eller for å hindre spredning av kreftsvulster (Keppler, 2005). Ved isolering av proteasehemmere fra bakterier og fiskehud kan man komme over hemmere som har effekt mot både bakterier og virus (Magnadottir, 2006). Disse kan igjen gi opphav til syntetiske preparater med potensiale som legemidler.

I dette prosjektet ble det isolert proteiner med inhibitor-aktivitet mot cystein proteaser fra skinnen til 4 ulike dyphavsarter, *Antimora rostrata*, *Hydrolagus affinis*, *Spectrunculus grandis* og *Coryphaenoides* sp. Inhibitorene ble først isolert fra skinnestrakt ved affinitetskromatografi, med papain koblet til Sepharose, metode som tidligere publisert (Synnes, 1998). Papain vil dermed binde cystein proteasehemmere fra ekstraktet, og kan elueres ut av kolonnen (Figur 4). Aktiviteten til cystein protease inhibitoren måles i dens evne til å hemme aktiviteten til enzymet papain.



Figur 4: Isolering av cysteine proteinase inhibitor fra *Spectrunculus grandis* ved papain-sepharose kromatografi.

Inhibitorene isolert ved affinitetskromatografi ble deretter videre rensert opp og konsentrert ved å applisere de på en anionbytter-kolonne (DEAE-sepharose, Figur 5).

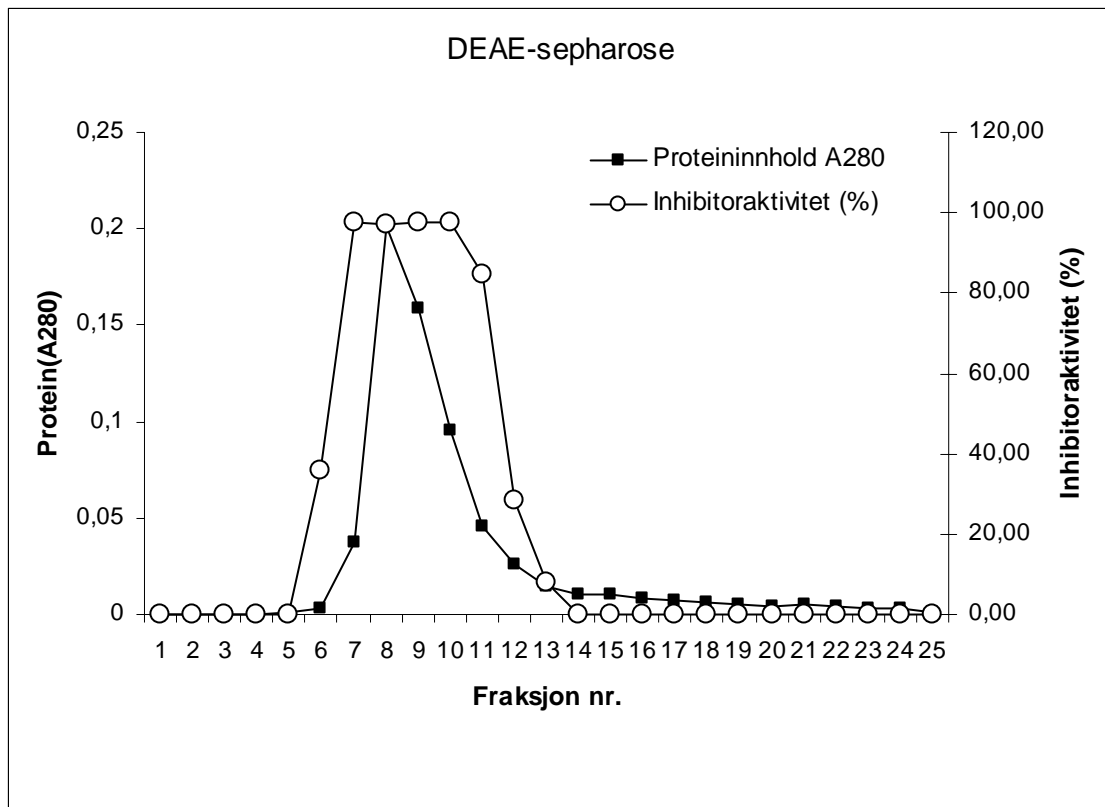
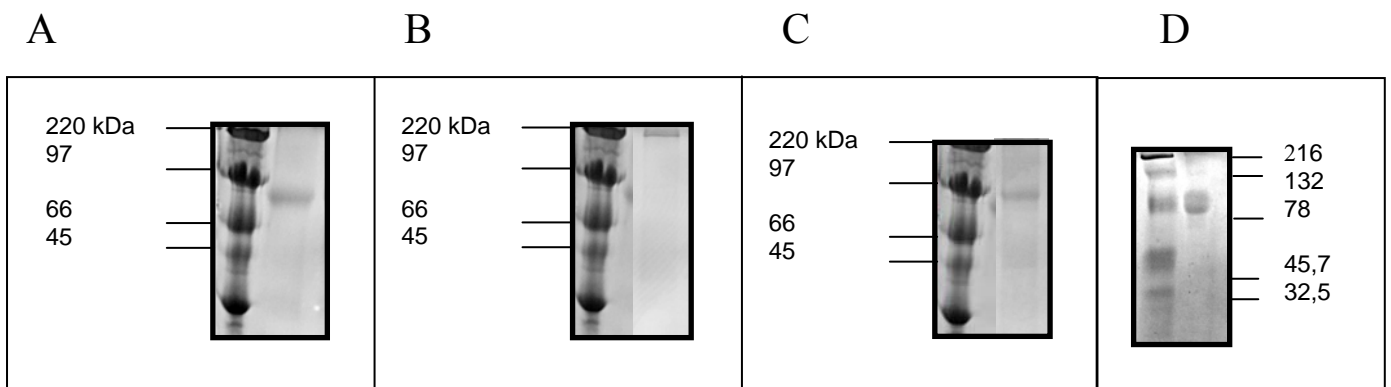


Fig. 5: Videre rensing av cystein proteinase inhibitor fra *Spectrunculus grandis* ved DEAE-sepharose kromatografi.

3.5 SDS-PAGE

De isolerte cysteinprotease-inhibitorene ble deretter kjørt på SDS-PAGE for å bestemme molekylvekten på inhibitorene (Figur 6).



Figur 6. Størrelsen av cystein protease inhibitorene ble bestemt ved analyse på SDS-PAGE. (A) Blå antimora, (B) Brun havmus, (C) *Coryphaenoides* sp. (D) *Spectrunculus grandis*

Etter SDS-PAGE ble inhibitorerne anslått å ha følgende størrelser:

Antimora rostrata	80-90 kDa
Coryphaenoides sp.	80-90 kDa
Spectrunculus grandis	80-90 kDa
Hydrolagus affinis	220 kDa

3.6 Sekvensering av inhibitorer

De isolerte cysteine protease inhibitorerne ble sekvensert hos PROBE, Universitetet i Bergen. Sekvensene ble sammenlignet med sekvenser fra cystein protease inhibitorer isolert tidligere, ved hjelp av databasesøk (Blast search).

Tabell 1. Peptider sekvensert ved hjelp av Caf. Resultat av sekvensering 1

Prøve nr.	Caf fragment	Sekvens
1	1430,0	MAI/LYQI/LI/LSANK
	2555,9	FDFESDSTHI/LFMI/LNSVGF..
2	1402,8	MAI/LYQI/LI/LSASK
3	2458,0	..STHI/LFTI/LNSVG..
4	1946,2	I/LI/LNVVGAPY(283,2)AI/LQI/LR
	2338,5	SPNFFVTFPSEI/LQFADEAR
	2730,8	...AVEDR

Aminosyrer merket med grønt er usikre I/L: kan ikke skille mellom I og L F/MOKS: ofte vanskelig å skille mellom F og oksidert M Tallene i parentes representerer massen til 2 aminosyrer som ikke kan bestemmes ut fra spekter.

Første sekvensering ga få, og korte sekvenser, nye prøver ble derfor sendt inn til ny sekvensering (Tabell 2)

Tabell 2. Peptider sekvensert ved hjelp av Caf.Resultat av sekvensering 2.

Sample name	Caf fragment	Sequence
1	936,0 1429,7 1733,7	I/LHFDIR/LR NSWGTGWGEDGYI/LR MAI/LYQI/LI/LSANK
2	1009,6 1191,6 1304,7 1402,7 1611,8 1793,9	I/LGAFGP(253)RR WFI/LAH(226)R GI/LFDPVI/LHDR I/LCI/LI/LFP?...R AI/LTVAFDMHMAI/LR TFI/LVWVNEEDHI/LR
3	1402,6 1651,8 1926,8 2301,9	MAI/LYQI/LI/LSATR I/LADHHTFYNEI/LR SYEI/LPD(185)VI/LTI/LGGGER AEYPI/LI/LH(212)CVHDTEDVR AEYPI/LI/LH(212)(61)VVHDTEDVR
4	1239,5 1296,6 1401,6 1894,9	..F(153)MSN(148)MR I/LAAFQVI/LAASK AAMNAI/LDEFNK I/LNFI/LEF....

I/L: can not differentiate between I and L. It is difficult to differentiate between oks M and F.

Databasesøk ga ingen treff på kjente cysteine protease inhibitorer, og sammenlignet med kjent sekvenser fra andre cysteine proteasehemmere fra fisk, så vi at identiteten mellom aminosyresekvensene var lav (Tabell 3)

Tabell 3 – eksempel på alignment mellom sekvenser fra prøve 1 og kjente cystein proteasehemmere fra chum salmon og chinese sturgeon

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment - sample1: LHFDIR MAIQIISANK
NSWGTGWGEDGYLR FDFESDSTHIFMINSVGF

chum          MIMEWKIVVPLLAVAFTVANAGLIGGPM DANMNDQGRDALQFAVVEHNKKTNDMFVRQV 60
Acipenser    -----GLVGGPMDADIGEEGVDALKFAVAEFPNKASNDMYIHRV 39
sample1      -----LHFDIRMA-----IY----- 10
                                     *: * :           ::

chum          AKVVNAQKQVVSGMKYIFTVQMGRTPCRKGGVEKI--CSVHKDPQMAVPYKCTFEVWSRP 118
Acipenser    SKVVVKVQKQVVAGIKYIVTVQMGRTSCRKGGAEKIELCAFHDVPELAKTSTCTFEVVSRL 99
sample1      -----QIISANKNSWGTGWG-----EDGYLRF-----DFESDSTHIFMINSVGF 48
                                     *::: . * . * : : * : *

chum          WMSDIQMVKNQCES 132
Acipenser    WIPETKLVKNTCT- 112
sample1      F----- 49
    
```


4. Formidling

Resultater fra prosjektet er formidlet ved :

- Prosjektet ble presentert gjennom to foredrag (Marianne Synnes og Knut Sjøstad) på konferansen "NATO/CCMS Pilot Study on Clean Products and Processes, 2005 Annual Meeting Aalesund, Norway, 19th - 24th of June 2005. Environmental Challenges in Marine Biotechnology, Product Design and Innovation", og Fylket ble kreditert for prosjektstøtten.
- Fylket ble også nevnt som bidragsyter da "Biofilm-prosjektet" vårt ble presentert av Knut Sjøstad på "The International Marine Biotechnology Conference" 7.-12. juni 2005, i St. John's, Labrador & Newfoundland, Canada.
- Presentasjonen av prosjektet under NATO-konferansen førte til en invitasjon om å skrive en review-artikkel om bioprospektering av dyphavsarter. Artikkelen "Bioprospecting of deep sea organisms: scientific and environmental aspects" blir nå trykket i journalen "CLEAN TECHNOLOGIES AND ENVIRONMENTAL POLICY".

Resultatene oppnådd i dette prosjektet vil bli publisert:

- Isolering og identifisering av bakteriearter på overflaten av ulike dyphavsarter vil bli publisert i en egen publikasjon (Knut Sjøstad & Marianne Synnes)

5. Oppsummering og konklusjon i henhold til målsetning

I henhold til prosjektets hovedmålsetning kan det konkluderes med at det gjennom kartlegging av nye organismer i dyphavet er gjort funn av mikroorganismer og komponenter som kan være kommersielt interessante.

- Det er isolert bakterier fra de fleste artene som ble samlet inn til dette prosjektet (ref. oversikt over innsamlede arter)
- De isolerte bakteriene er testet for antibakterielle egenskaper, og flere av disse var i stand til å hemme veksten av andre marine bakterier
- Det ble isolert og karakterisert cystein proteasehemmere fra skinnen til 4 arter av dyphavsfisk (*Antimora rostrata*, *Hydrolagus affinis*, *Spectrunculus grandis* og *Coryphaenoides* sp.)

Dette prosjektet har gitt mange interessante resultater hittil, og mange prosjekter å arbeide videre med. Vi har nå en stor samling av marine bakterier som må undersøkes nøyere. Foruten de potensielle antibakterielle stoffene fra marine bakterier, er det satt i gang et prosjekt hvor fettsyreprofilen til de marine bakteriene undersøkes, i håp om å finne spesielle fettsyrer. Ved en eventuell videreføring av prosjektet med isolering av cystein

proteasehemmere, bør inhibitorene karakteriseres videre med hensyn på spesifikk enzymaktivitet, og det bør arbeides videre med å identifisere sekvensene av disse proteinene.

6. Referanser

Muyzer, G. De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G.,1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, 59, 3, 695-700.

Magnadottir, b. (2006). Innate immunity of fish (overview). Fish and shellfish Immunology 20: 137-151.

McKerrow, J.H., Engel, J.C. and Caffrey, C.R. (1999). Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. Bioorganic and Medicinal chemistry 7: 639-644.

Keppler, D. (2005). Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. Cancer Letters, 235, 2:159-176.

Synnes, M (1998). Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from the skin of Atlantic salmon (*Salmo Salar L.*). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 121, 257–264

Weber, T., Welzel, K., Pelzer, S., Vente, A. and Wohlleben, W. (2003). Exploiting the genetic potential of polyketide producing streptomycetes, J Biotechnol 106: 221–232

Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.D. and Torsvik, V., 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Sælenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63, pp. 3367–3373.