

Alginat - protein interaksjoner

Lill June Kristoffersen

Bioteknologi

Oppgaven levert: Mai 2011

Hovedveileder: Gudmund Skjåk-Bræk, IBT

Biveileder(e): Berit Løkensgard Strand, IBT
Finn Lillelund Aachmann, IBT

FORORD

Denne oppgaven er utført ved Institutt for Bioteknologi, NTNU, Trondheim, under veiledning av Dr. Finn Lillelund Aachmann og Dr. Berit Løkensgard Strand. Jeg vil benytte anledningen til å takke for all hjelp jeg har fått gjennom mitt år som masterstudent. Deres glødende interesse for forskning har vært svært engasjerende, og reisen gjennom en verden med alginat, proteiner og elektrostatikk har vært fascinerende. Gjennom spennende diskusjoner har jeg fått stor inspirasjon i arbeidet med oppgaven. Jeg ønsker samtidig å takke Wenche Iren Strand og Ann-Sissel Ulset for teknisk hjelp på laben, samt hyggelige samtaler.

En stor takk går også til mine medstudenter. Takk for kaffepauser (selv om at jeg enda ikke drikker kaffe), gode samtaler, latter og motivasjon til å bli ferdig med oppgaven. Livet som student i Trondheim har vært en fantastisk opplevelse.

En takk går òg til familie og venner hjemme i nord. Dere har alltid tro på meg, noe som gir meg motivasjon til å gjøre det bra. Samtidig har dere lært meg at tiden som student skal nytes. En takk rettes også til Svein Hansen (tidligere naturfaglærer), som vekket min interesse for naturvitenskap.

SAMMENDRAG

Lite er kjent i forhold til proteiners interaksjon med alginat, noe som er viktig å ha kjennskap til ved bruk av biopolymeren som immobiliseringsmateriale for celler og proteiner. Denne oppgaven er derfor en studie av alginat – protein interaksjoner. En interaksjon med albumin, fibrinogen og insulin ble undersøkt, da proteinene har relevans i forhold til release systemer av proteiner, og en immunrespons mot alginatkuler ved celletransplantasjon. Lysozym ble brukt som positiv kontroll, ettersom proteinet er kjent å interagere med alginat.

Ettersom alginat er negativt ladet er det naturlig å tro at elektrostatiske krefter har betydning for polymerens vekselvirkning med andre molekyler. For å undersøke elektrostatiske krefters innflytelse på alginat – protein interaksjoner, ble proteinenes elektrostatiske overflatepotensial modellert ved hjelp av Adopter Poisson-Boltzmann Solver (APBS). Isoterm titreringskalorimetri (ITC) ble videre brukt for å måle vekselvirkningsvarmen ved interaksjon mellom proteiner og alginat i løsning. Proteinbinding til alginatkuler ble kvantifisert ved konsentrasjonsmålinger på nanodrop og mikroplateleser, og visualisert i mikroskop. Det ble tatt utgangspunkt i fysiologiske betingelser ($\text{pH} = 7$ og ionestyrke = 160mM), slik at forholdene samsvarer med det alginatkuler opplever ved transplantasjon.

Ved ITC interagerte proteinene med alginat etter synkende styrke: lysozym (positivt ladet) \gg albumin (negativt ladet) $>$ fibrinogen (negativt ladet). Albumin og fibrinogen viste å interagere svakt med alginat, til tross for deres negative ladning. Dette kan forklares ved at proteinene har en stor overflate, med enkelte positive regioner selv ved $\text{pH} > \text{pI}$. Den høye ionestyrken brukt i studiet bidrar til å redusere de tiltrekkende kreftene mellom molekylene. Ingen målbar interaksjon ble observert mellom alginat og insulin (negativt ladet), noe som kan forklares ved at proteinet har en liten overflate med få positive regioner. Proteinbinding til alginatkuler viste samme trend som ITC, noe som indikerer at alginatets elektrostatiske egenskaper i gel og løsning er den samme. Binding av lysozym ga kulekollaps ved høye proteinkonsentrasjoner på grunn av kondensering til gelnettverket i alginat. Den svake bindingen av albumin og fibrinogen påvirket ikke kulenes stabilitet.

Studiet indikerer at elektrostatiske tiltrekkende krefter har betydning ved alginat – protein interaksjoner, og at proteinenes overflateladning har betydning for deres interaksjon med alginat. APBS viste å gi et bra bilde på proteinenes mulige interaksjon med alginat, ettersom det var bra korrelasjon mellom antatt og observert interaksjon. Dette kan forklares ved at APBS implementerer eksperimentelle forhold (pH , ionestyrke etc.) som har betydning

for proteinenes elektrostatiske overflatepotensial. De eksperimentelle metodene brukt i studiet ga i flere tilfeller bare et kvalitativt mål på proteinenes interaksjon med alginat. Dette skyldes mest sannsynlig den svake (nanodrop og plateleser) og uspesifikke (ITC) interaksjonen som ble observert.

I videre arbeid vil det være interessant å se nærmere på adsorpsjon og absorpsjon av proteiner til alginatkuler eksponert for helblod, et modellsystem som samsvarer mer med det alginatkuler opplever ved transplantasjon. Hvordan proteinsammensetningen på kuleoverflaten endres over tid er også av interesse, ettersom proteinbinding ikke er en statisk prosess.

INNHALDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	ii
SYMBOLER OG FORKORTELSER	vi
DEL 1 INTRODUKSJON	1
1.1 Bakgrunn	1
1.2 Alginat.....	2
1.3 Proteiner	5
1.3.1 Lysozym	5
1.3.2 Albumin og fibrinogen	5
1.3.3 Insulin	6
1.4 Proteinelektrostatikk	6
1.4.1 Faktorer som påvirker proteinelektrostatikk	7
1.4.2 Modellering av proteiners elektrostatiske overflatepotensial.....	8
1.4.3 Termodynamikk ved proteininteraksjon	9
1.5 Produksjon av alginatkuler.....	10
1.6 Isoterm titreringskalorimetri	12
1.6.1 Prinsipp og termodynamiske størrelser	12
1.6.2 Instrumentering	12
1.6.3 Eksperimentelle forhold	13
1.6.4 Dataprosessering	15
1.7 Fluorescens	16
1.7.1 Prinsipp.....	16
1.7.2 Fluorescensmerking av proteiner	16
1.7.3 Deteksjon	16
DEL 2 STUDIEDESIGN	18
DEL 3 MATERIALER OG METODER	19
3.1 Materialer	19
3.2 Metoder	21
3.2.1 Proteinmodellering	21
3.2.2 Interaksjon mellom proteiner og natriumalginat (ITC).....	23
3.2.3 Interaksjon mellom proteiner og alginatkuler	25

DEL 4 RESULTATER	29
4.1 Proteinmodellering.....	29
4.1.1 Alginat	29
4.1.2 Lysozym	30
4.1.3 Insulin	32
4.1.4 Albumin	34
4.1.5 Fibrinogen.....	36
4.2 Interaksjon mellom proteiner og natriumalginat (ITC)	38
4.2.1 Lysozym	38
4.2.2 Insulin	40
4.2.3 Albumin	41
4.2.4 Fibrinogen.....	42
4.3 Interaksjon mellom proteiner og alginatkuler	43
4.3.1 Lysozym	44
4.3.2 Albumin	50
4.3.3 Fibrinogen.....	51
DEL 5 DISKUSJON	54
5.1 Karakterisering av alginat – protein interaksjoner	54
5.1.1 Lysozym	54
5.1.2 Insulin	59
5.1.3 Albumin	60
5.1.4 Fibrinogen.....	63
5.2 Evaluering av metoder brukt i studiet.....	65
5.3 Videre perspektiv.....	67
KONKLUSJON	69
REFERANSER	70
VEDLEGGSLISTE	79

SYMBOLER OG FORKORTELSER

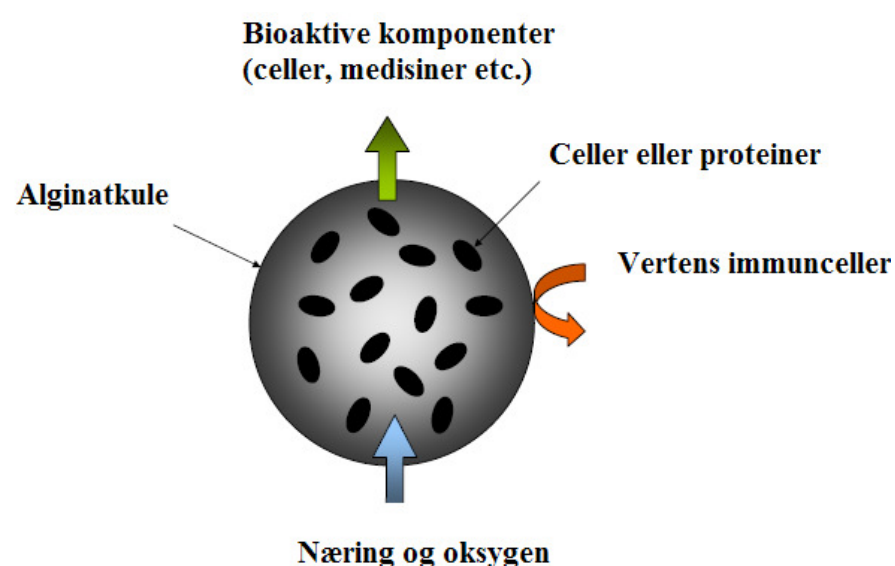
ΔG	Endring i Gibbs frie energi
ΔH	Endring i entalpi
ΔS	Endring i entropi
A_λ	Absorbans ved λ nm
APBS	Adopter poisson-boltzmann solver
BINS	Insulin fra okse
BSA	Serum albumin fra okse
\overline{DP}_n	Gjennomsnittlig antall monomerer per polymerkjede
e	Elementærladning
ϵ	Dielektrisk konstant
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	α -L-guluronsyre
H^1 -NMR	Hydrogen-1 nukleær magnetisk resonans
HEL	Lysozym fra eggehvite fra høns
HFiB	Humant fibrinogen
HINS	Humant insulin
HML	Humant lysozym fra melk
HSA	Humant serum albumin
Ig	Immunoglobulin
ITC	Isoterm titreringskalorimetri
k	Boltzmann konstanten

K_a	Bindingskonstant
KLSM	Konfokal laser skanning mikroskop
M	β -D-mannuronsyre
MG	Alternerende mannuron- og guluronsyrer
MOPS	3-(N-morfolino)propansulfonsyre
MQ	Milli-Q vann
PBS	Phosphate buffered saline
PDB	Protein data bank
PLL	Poly-L-lysin
pI	Isoelektrisk punkt
R_G	Treghetsradius
RMSD	Root mean square deviation
Rpm	Runder per minutt
SINS	Insulin fra svin
Å	Ångstrøm

DEL 1 INTRODUKSJON

1.1 Bakgrunn

Innkapsling av celler og bioaktive komponenter i alginat er en veletablert metode, brukt ved transplantasjon og ”drug delivery”. Lavmolekylære komponenter (proteiner, medisiner etc.) kan diffundere fritt ut av kulene, samtidig som det immobiliserte materialet blir beskyttet mot celler og høymolekylære forbindelser fra kroppens immunforsvar (Figur 1.1). Selve immobiliseringen kan utføres ved hjelp av ett steg, under fysiologiske betingelser [1].



Figur 1.1: Prinsipp for immobilisering av proteiner og celler i alginat. Lavmolekylære forbindelser som næringsstoffer, O₂ og bioaktive komponenter kan diffundere fritt ut fra kulene. Det immobiliserte materialet blir samtidig beskyttet mot høymolekylære forbindelser fra kroppens immunforsvar, da de er for store i forhold til kulenes porestørrelse. Hentet og modifisert fra [2].

Lite er kjent i forhold til proteiners interaksjon med alginat, noe som er viktig å ha kjennskap til ved bruk av biopolymeren som immobiliseringsmateriale [3]. En studie av alginat – protein interaksjoner er derfor av interesse, og har relevans i forhold til blant annet:

- Slow release systemer av proteiner, hvor proteiner må kunne frigis fra kulene på en kontrollert måte [4, 5].
- Celleadhesjon ved tissue engineering [6], hvor proteinbinding er ønskelig ettersom celler adherer dårlig til alginat [7].
- Immunreaksjoner mot alginatkuler ved celletransplantasjon, hvor proteinbinding til overflaten er vist både å kunne initiere og redusere en immunrespons [8, 9].

Introduksjon av biomaterialer i kroppen gir opphav til en ny overflate mellom materialet og cellulære komponenter, og proteinadsorpsjon til overflaten skjer direkte etter implantering. Ulike faktorer har betydning for proteinadsorpsjon til biomaterialer, noe som først og fremst inkluderer overflatens hydrofilisitet og hydrofobisitet, samt type og tetthet av overflateladninger [10, 11]. Hydrofile overflater viser mindre grad av proteinbinding i forhold til hydrofobe. Dette kan forklares ved deres hydrerte overflate, som gjør at en fysisk og energetisk barriere mot proteinadsorpsjon dannes, da energi kreves for å fjerne løsningsmidlet fra overflaten. Hydrofobe overflater er derimot lite hydrerte, noe som gjør proteinadsorpsjon mer termodynamisk favorisert [12]. Overflater av hydrerte polymerer (som alginat) er derfor vist å være mer kompatible i blod sammenlignet med hydrofobe [13]. I forhold til overflateladning, gir nøytrale og negativt ladde biomaterialer mindre immunrespons enn positive, da de fleste celler og serumproteiner er negativt ladet ved fysiologisk pH [10].

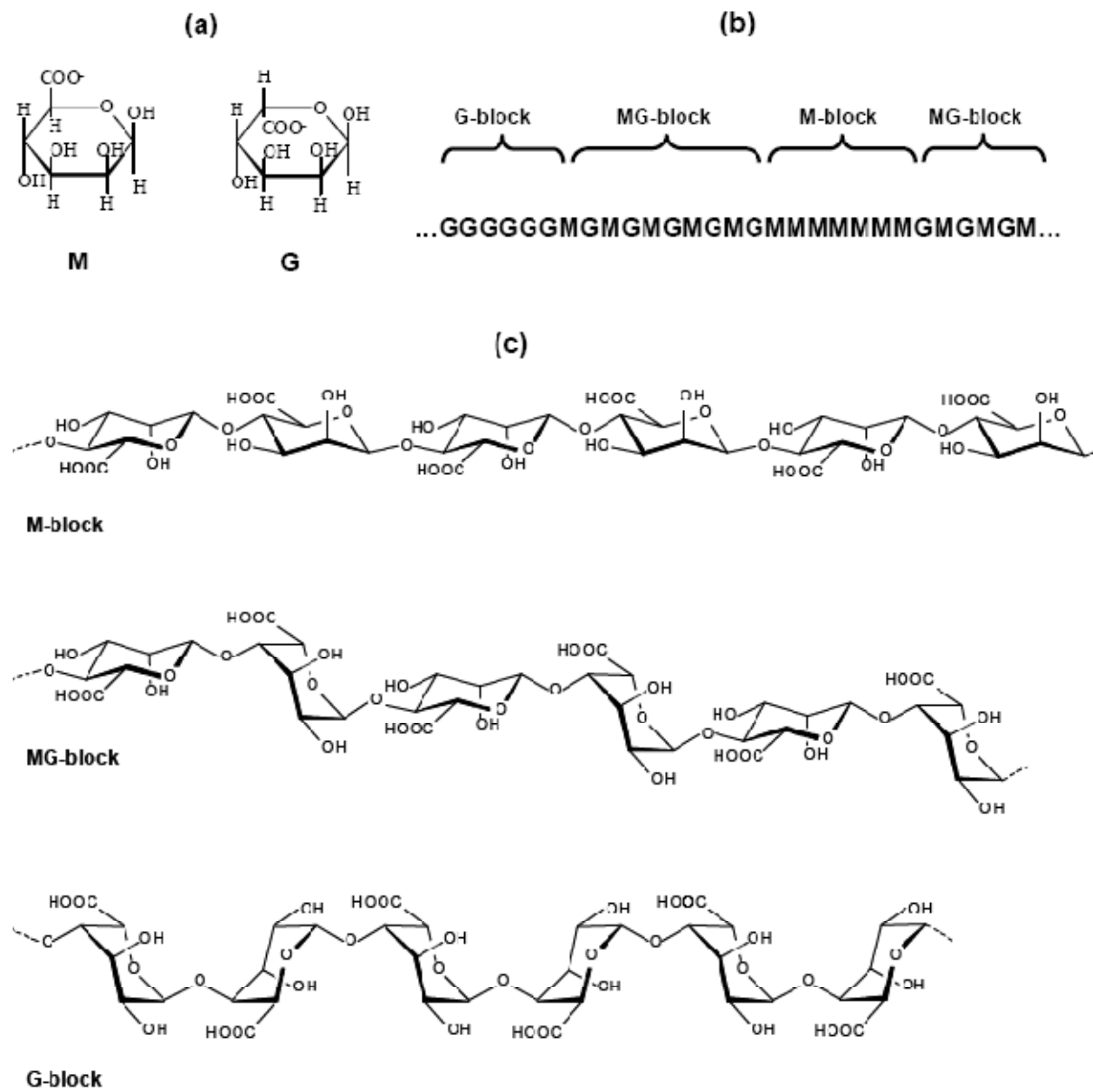
På grunn av alginats negative ladning forventes proteiner å interagere med polymeren i liten grad. Lite er allikevel kjent i forhold til proteiners interaksjon med alginat, noe som er viktig å ha kjennskap til ved bruk av biopolymeren som immobiliseringsmateriale. Denne oppgaven er derfor en studie av alginat – protein interaksjoner. En interaksjon med insulin, fibrinogen og albumin er blitt studert, da proteinene har relevans i forhold til bruk av alginat som immobiliseringsmateriale. Lysozym ble brukt som positiv kontroll ettersom proteinet er kjent å vekselvirke med alginat. Alginatets negative ladning gjør det naturlig å tro at elektrostatiske krefter har betydning for en mulig interaksjon. Innflytelsen elektrostatiske krefter har på alginat – protein interaksjoner vil derfor bli undersøkt.

1.2 Alginat

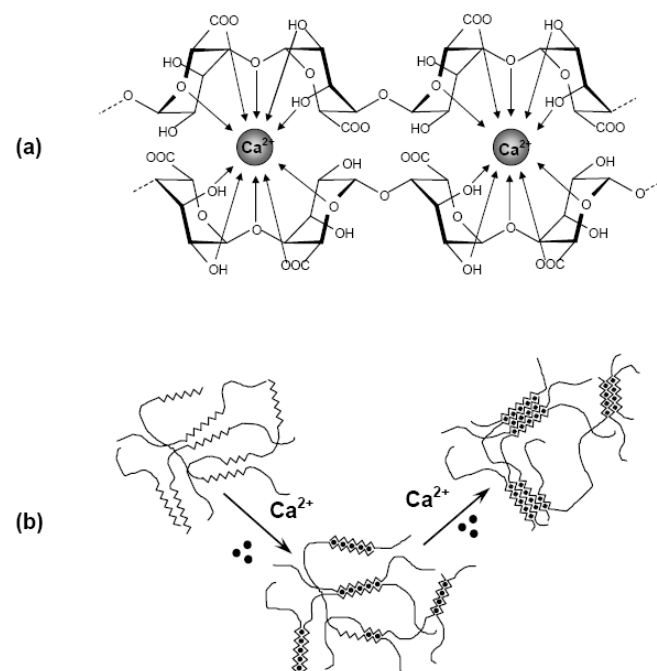
Alginat er en lineær binær kopolymer av (1→4) glykosidbundet β -D-mannuronsyre (M) og C-5 epimeren α -L-guluronsyre (G) (Figur 1.2), som produseres av brunalger og enkelte bakterier. pK_a -verdien til M og G er henholdsvis 3,38 og 3,65, noe som gjør polymeren negativt ladet ved fysiologisk pH [14]. Uronsyrene er distribuert i M-, G- og MG-blokker [14-17], der komposisjon og sekvens av blokkene avhenger av organisme og vev det er isolert fra [18]. Egenskapene til alginat som immobiliseringsmateriale avhenger sterkt av blokkstruktur [19, 20], da divalente kationer (med økende selektivitet: $Mg^{2+} \ll Ca^{2+} < Sr^{2+} < Ba^{2+}$) kryssbinder blokkene i ulik grad, noe som resulterer i geling (Figur 1.3).

Alginatmolekyler i en løsning kan beskrives som tilfeldige kjeder, der de ulike blokkstrukturene påvirker konformasjonen til polymeren [17]. For at karboksylgruppa til M

skal kunne være i en favorisert ekvatorial posisjon, har sukkerringene 4C_1 -konformasjon. M-blokker er derfor bundet sammen via diekvatoriale bindinger, noe som gir en fleksibel men flat struktur, med liten affinitet for divalente ioner. G er C-5 epimeren av M, og for at karboksylgruppa skal være i ekvatorial posisjon har sukkerringen 1C_4 -konformasjon. G-blokker er derfor bundet sammen via diaksiale bindinger, noe som gir en stivere og mindre fleksibel struktur [21]. Bindingen mellom guluronsyrene gjør at sukkerringene orienteres nesten loddrett på hverandre. Det dannes slik sett bindings seter mellom monomerene, hvor divalente kationer kan koordineres og binde OH- og COO- grupper [22]. Binding av ioner til G-blokker er kooperativ, og affiniteten for et ion øker med økende G-blokk lengde [19]. Alternerende sekvenser er bundet sammen via aksial-ekvatoriale bindinger, noe som gir en fleksibel struktur [21]. Nyere forskning viser at også disse kan kryssbinde divalente ioner [23].



Figur 1.2: Alginatstruktur. (a) Haworth formel til M = β -D-mannuronsyre og G = α -L-guronsyre. (b) Komposisjon av G-, M- og MG-blokker. (c) M-, G- og MG-blokker. M-blokker har en flat struktur på grunn av diekvatoriale bindinger mellom monomerene. G-blokker er bundet sammen via diaksiale bindinger, noe som gir en "eggebøks-struktur" hvor divalente kationer kan binde og danne gel. Alternierende sekvenser er også vist å binde divalente ioner. Hentet fra [2].



Figur 1.3: Binding av divalente ioner (Ca^{2+}) til alginat – eggeboksmodellen. **(a)** Koordinering av Ca^{2+} til bindingssteder hos G-blokker. **(b)** Dannelse av gelnettverk ved assosiasjon av alginatkjeder. Hentet fra [2].

1.3 Proteiner

1.3.1 LYSOZYM

Hos mennesker finnes lysozym i blant annet tårer, melk og spytt. Proteinets katalytiske oppgave er å bryte ned glykosidbindinger mellom sukkerringe, som forsvar mot bakterielle infeksjoner [24, 25]. Det er et lite protein ($M_w \approx 14,5\text{Kd}$, $R_G \approx 15,2\text{\AA}$) [26], med teoretisk isoelektrisk punkt (pI) ≈ 11 . Proteinet er derfor positivt ladet ved fysiologisk pH. Lysozym er svært velkarakterisert med tanke på aminosyresekvens, 3D-struktur, og fysiologiske egenskaper.

1.3.2 ALBUMIN OG FIBRINOGEN

Albumin er det primære proteinet i humant plasma (utgjør $\sim 60\%$) [27]. Det er et stort protein ($M_w \approx 66,5\text{kDa}$, $R_G \approx 29,8\text{\AA}$) [26], med teoretisk $pI \approx 5,5$, noe som gjør at det er negativt ladet ved fysiologisk pH. Proteinet har høy affinitet for ulike molekyler som fettsyrer, aminosyrer, etc., og dets viktigste fysiologiske oppgave er å frakte disse komponentene i blodet, til spesifikke målorgan [28, 29].

Fibrinogen er det tredje primære plasmaprotein (utgjør $\sim 4\%$) [27]. Det er et stort protein ($M_w \approx 330\text{kDa}$, $R_G \approx 142\text{\AA}$) [26], med teoretisk $pI \approx 6,8$. Fibrinogen er derfor negativt

ladet ved fysiologisk pH. Proteinet er nødvendig for blodkoagulering, i tillegg til at det er involvert i andre immunreaksjoner [30].

Albumin og fibrinogen er vist å kunne ha betydning for en immunrespons ved transplantasjon av biomaterialer *in vivo*. Proteinene er tilstede i høye serumkonsentrasjoner, og vil derfor være de første som interagerer med overflaten av biomaterialer [31]. Studier viser at mengde denaturert fibrinogen som spontant akkumulerer til overflaten korrelerer med størrelsen på den observerte immunresponsen. En denaturering gjør at epitoper på overflaten av proteinet synliggjøres, som kan gjenkjennes av enkelte immunceller slik at de binder. Biomaterialer dekket med albumin er på den andre siden vist å kunne redusere en immunrespons [32-35].

1.3.3 INSULIN

Insulin er et hormon som produseres av β -celler i bukspyttkjertlen, og dets katalytiske rolle er å kontrollere karbohydratmetabolisme og -lagring [36]. Det er et lite protein ($M_w \approx 5,7\text{kDa}$, $R_G \approx 10,3\text{\AA}$) [26], med teoretisk $pI \approx 5,2$, noe som gjør det negativt ladet ved fysiologisk pH. I kroppen er proteinet lagret som en heksamer.

Ved diabetes type 1 angriper immunforsvaret kroppens egne β -celler [36]. For behandling av sykdommen er det forsket mye på innkapsling av insulinproduserende celler i alginat for transplantasjon, en metode som først ble beskrevet av Lim og Sun i 1980 [37].

1.4 Proteinelektrostatikk

Proteiner foldes ved at hydrofobe aminosyrer begraves i proteinenes indre, slik at de unngår kontakt med løsningsmidlet. Hydrofile og ladde aminosyrer kommer derimot på overflaten, hvor de er viktige med tanke på molekylære interaksjoner [38]. I gjennomsnitt består et proteins overflate av 70 % hydrofile og ladde aminosyrer [39].

Interaksjoner som omhandler ladde aminosyrers titrerbare grupper (Arg, Lys, His, Cys, Tyr, Glu, Asp, C- og N-terminal) er de som har mest å si for et proteins elektrostatikk, selv om interaksjoner mellom dipoler også bidrar til dette [39]. Et molekyls totale elektrostatiske energi avhenger av interaksjoner mellom par av fullt eller partielt ladde atomer på makromolekylet, samt interaksjoner med løsningsmidlet og oppløste ioner. Dette skaper et elektrisk potensial rundt proteinet som kan strekke seg opptil 10 – 15 \AA ut i løsningen. Dette gir opphav til elektrostatiske langtrekkende interaksjoner [40]. Høy affinitet og spesifikk binding mellom molekyler involverer også deres egenskaper i å danne saltbroer og

hydrogenbindinger med hverandre, noe som gir opphav til elektrostatiske korttrekkende interaksjoner [41].

1.4.1 FAKTORER SOM PÅVIRKER PROTEINELEKTROSTATIKK

pH har stor betydning for et proteins lokale elektrostatikk, ettersom den er avgjørende for aminosyrenes grad av protonering. Aminosyrer med titrerbare grupper har ulike pK_a -verdier (Tabell 1.1), og deres ladning er derfor pH-avhengig. Resultatet av en pH-endring er at aminosyrene blir mer protonerte ($pH < pK_a$) eller deprotonerte ($pH > pK_a$), slik at de titrerbare gruppenees gjennomsnittsladning endres. En pH som favoriserer flere ladninger danner et sterkere elektrostatiske felt rundt proteinet [40, 42]. Ut fra Likning 1.1 er det teoretisk enkelt å forklare og forutse de pH-avhengige elektrostatiske endringene for proteiner, ettersom deres pK_a -verdier er kjent [43]. Situasjonen er allikevel mer komplisert, da proteiners lokale miljø kan endre aminosyrenes pK_a -verdi. Generelt sett er ladninger mindre stabile i proteiners upolare indre, dersom de ikke er stabilisert av nære dipolare grupper. Tilstedeværelsen av flere titrerbare grupper i et protein vil også endre aminosyrenes pK_a -verdi [40, 42].

$$pH = pK_a - \log \left(\frac{\text{syre}}{\text{base}} \right)$$

Likning 1.1

Tabell 1.1: Typiske pK_a -verdier til proteiners titrerbare aminosyrer. Hentet fra [43].

Aminosyre	pK_a
Asp (D)	4,1
Glu (E)	4,1
Arg (R)	12,5
Lys (K)	10,8
His (H)	6,0
Cys (C) (red.)	8,3
Tyr (Y)	10,9
C-term	3,1
N-term	8,0

Styrken til proteiners elektrostatiske felt avhenger også av løsningsmidlet og dets ionestyrke. Når et protein løses i et polart løsningsmiddel, vil løsningsmidlet og oppløste ioner prøve å senke systemets frie energi. Ved høy ionestyrke dannes et elektrisk dobbeltlag rundt molekylene, bestående av de ladde proteinene og et nøytraliserende overskudd av motioner dekket av medioner. Dette reduserer proteinenes elektrostatiske overflatepotensial,

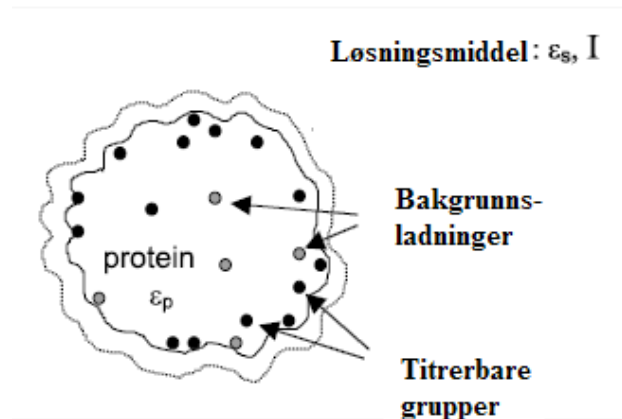
slik at elektrostatiske krefter (tiltrekkende eller frastøtende) mellom molekyler avtar. Konsentrasjonen av motioner vil være høyere rundt molekylene sammenlignet med i løsningsmidlet. For å utligne denne konsentrasjonsforskjellen trenger løsningsmidlet inn mellom molekylene, noe som gjør at de tiltrekkende kreftene mellom molekylene reduseres i enda større grad. Jo høyere dielektrisk konstant løsningsmidlet har, desto mer vil en elektrostatiske interaksjon skjermes ettersom mer energi trengs for å fjerne løsningsmidlet [44].

Dielektriske konstanter bestemmes ut fra løsningsmidlets grad av polarisering. Permanente dipoler oppstår når fordelingen av ladninger over naboatomer ikke er symmetrisk, som for vann, mens induerte dipoler oppstår fra elektrisk polarisering. I vann vil den relative friheten til molekylene gi en høy dielektrisk konstant ($\epsilon = 80$) på grunn av høy dipolar rotasjon. Permanente dipoler i proteiners indre er derimot i ro ettersom dipolare grupper er frosset i hydrogenbindinger, noe som gjør at de ikke kan reorienteres i et eksternt elektrisk felt. Orienteringen av induerte dipoler gir derfor proteinene en lav dielektrisk konstant ($\epsilon = 2 - 4$) [40, 45]. Et proteins og et løsningsmidlets dielektriske konstant vil ikke være homogen i alle regioner. Den vil for proteiner være større ved polare grupper (på utsiden kan den være 10) og mindre ved upolare grupper (på innsiden kan den være 2). For løsningsmidlet vil den dielektriske konstanten være mindre for hydrert vann ($\epsilon = 10$) i forhold til fritt vann ($\epsilon = 80$) [45].

1.4.2 MODELLERING AV PROTEINERS ELEKTROSTATISKE OVERFLATEPOTENSIAL

Ved modellering av proteiners elektrostatiske overflatepotensial er det viktig å reprodusere eksperimentelle miljø så bra som mulig. Proteinets overflatepotensial påvirkes av deres 3D-struktur og titrerbare grupper, løsningsmidlets pH og ionestyrke, samt proteinets og løsningsmidlets dielektriske konstant [40, 46].

Adopter Poisson-Boltzmann Solver (APBS) er et software-program som modellerer biomolekylers elektrostatiske overflatepotensial ved å løse Poisson-Boltzmann likninger. Modelleringen tar utgangspunkt i at proteinet er en kule med ladninger plassert nærme overflaten, omgitt av et kontinuerlig medium (løsningsmidlet) med oppløste ioner (Figur 1.4). Proteinstrukturen representeres ved en lav dielektrisk konstant ($\epsilon_p = 10$), og som et sett med punktladninger. Proteinets ladning beregnes ut fra dets titrerbare grupper og 3D-struktur. Proteinets elektrostatiske felt beregnes deretter ut fra dets ladning og dielektriske konstant, samt interaksjon med løsningsmidlet ($\epsilon_s = 80$) og oppløste ioner [40, 46].



Figur 1.4: Utgangspunkt for modellering av proteiners elektrostatiske overflatepotensial. Et protein med en lav dielektrisk konstant (ϵ_p), i et løsningsmiddel med høy dielektrisk konstant (ϵ_s) og ionestyrke = I. Hentet og modifisert fra [40].

1.4.3 TERMODYNAMIKK VED PROTEININTERAKSJON

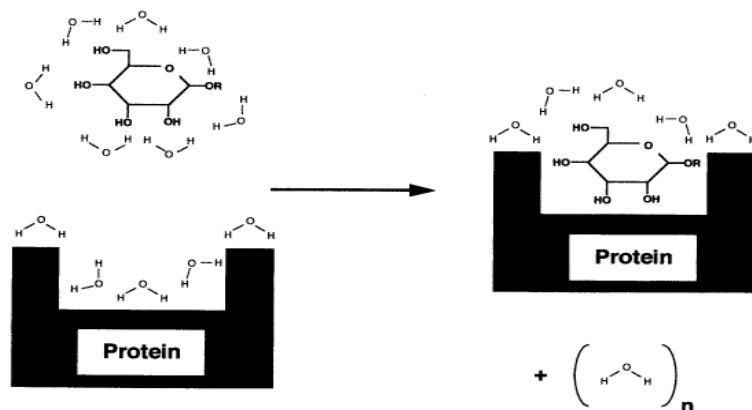
Molekylære interaksjoner (mellom proteiner, overflater etc.) er komplekse prosesser, og drives av intermolekylære krefter (hydrogenbindinger, Van der Waals interaksjoner, elektrostatiske interaksjoner og hydrofobe interaksjoner) [39]. Viktige parametre ved interaksjon er pH, ionestyrke, samt molekylenes og løsningsmidlets overflatefunksjonalitet, som er avgjørende for hvilke typer interaksjoner som er favoriserte [47].

Ved interaksjon skjer det en termodynamisk endring i systemet, forklart ved en endring i Gibb's frie energi ($\Delta G = \Delta H - \Delta S$). For at en interaksjon skal være favorabel må systemets frie energi reduseres, noe som bestemmes ut fra en endring i systemets totale entalpi og entropi. Ved molekylære interaksjoner vil molekylenes entropi nedsettes, ettersom deres grad av frihet reduseres ved binding til hverandre. Størrelsen på entropitapet vil være størst for fleksible molekyler. Entropitapet oppveies med en nedgang i entalpi på grunn av bindinger mellom dannes mellom segmenter. Ved interaksjon vil løsningsmiddel frigjøres fra molekylene, noe som gir en økning i entalpi. Dette gjør at systemets totale endring i entalpi ofte er neglisjerbar ($\Delta H_{\text{system}} \approx 0$). Det som derfor ofte avgjør om en interaksjon er termodynamisk favoriserbar er entropigevinsten ved frigjøring av løsningsmiddel. Løsningsmidlets entropi er nedsatt ved binding til store og mindre bevegelig molekyl. Ved interaksjon vil løsningsmidlet frigjøres slik at entropien øker (Figur 1.5). I hvor stor grad løsningsmidlets entropi øker avhenger av entropien til fritt løsningsmiddel [38].

Hydrofobe interaksjoner kan også forklares ut fra en nedgang i entropi ved frigjøring av løsningsmiddel, som ellers ville vært bundet og strukturert rundt de hydrofobe molekylene.

Ved en molekylær interaksjon nedsettes kontaktarealet med løsningsmidlet, slik at mengden ordnet løsningsmiddel avtar [47].

Interaksjoner som skjer via hydrogenbindinger og Van der Waals interaksjoner vil generelt sett ha en negativ ΔH og ΔS . For typiske hydrofobe interaksjoner er både ΔH og ΔS positive, mens elektrostatiske interaksjoner (ionebindinger) er assosiert ved små endringer i ΔH , og en positiv ΔS [48].

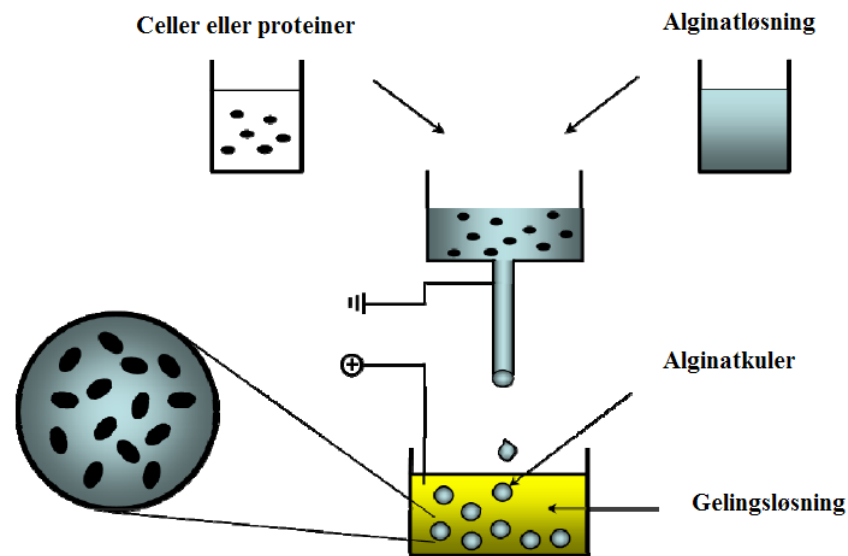


Figur 1.5: Binding av et glukose til et protein i vann, der frigjøring av vann gir en favoriserbar entropigevinst. Hentet fra [49].

1.5 Produksjon av alginatkuler

Den mest brukte metoden for produksjon av alginatkuler går ut på å dryppe en natriumalginatløsning (1 – 4 %) i en kalsiumløsning [20]. Ionene vil diffundere inn i alginatløsningen, hvor de interagerer med G- og MG-blokker og danner et gelnettverk. Dette er en rask metode, som i fravær av ikke-gelende ioner gir en høy alginatkonsentrasjon på kuleoverflaten [50]. Denne distribusjonen er ønskelig ettersom det gir mer stabile kuler, med lavere porestørrelse [51]. Tilsats av små mengder barium (som er et sterkere gelende ion enn kalsium) gir enda sterkere kuler [52].

Små og uniforme kuler kan produseres ved å danne et elektrisk potensial mellom gelingsløsningen (CaCl_2) og nål med alginatløsning, ved hjelp av en elektrostatisk kulegenerator (Figur 1.6). Det elektriske potensialet drar alginatdråpen fra nålspissen og ned i gelingsløsningen, der størrelse på nålspiss, elektrisk potensial, alginatkonsentrasjon, alginatflow, og avstand mellom alginat- og gelingsløsning, er med på å bestemme kulestørrelsen. Det kan slik sett lages kuler på 100 – 1000 μm , med liten størrelsesfordeling. Celler og proteiner kan innkapsles ved tilsats til alginatløsningen [53].



Figur 1.6: Innkapsling av celler og proteiner i alginat ved bruk av en elektrostatiske kulegenerator. De biologiske komponentene blandes i alginatløsningen, og tilføres gelingsløsning ved hjelp av en sprøytepumpe. Strøm koples på gelingsløsning og nål med alginatløsning, slik at små og uniforme kuler med liten størrelsesfordeling produseres. Hentet og modifisert fra [2].

Kulenes porestørrelse, stabilitet og styrke bestemmes først og fremst ut fra alginatkomposisjon og blokkstruktur. Høy-G alginat ($G > 70\%$ og G-blokk lengde > 15 monomerer) produserer sterkere, mer stabile og porøse kuler i forhold til høy-M alginat [54]. Kulene er dog sensitive for ioner som kan binde kalsium (for eksempel fosfat, citrat og laktat), samt ikke-gelende ioner (Na^+), noe som gir opphav til svelling og oppløsning [1]. Syv ulike epimeraser (AlgE1 – AlgE7) er funnet i bakterien *Azotobacter vinelandii*, som danner ulike produkt (G- eller MG-blokker) fra ulike substrat [55, 56]. Introduksjon av MG-blokker til høy-G alginat ved hjelp av C-5 epimerasen AlgE4 er vist å gi sterkere og mer fleksible kuler, der osmotisk svelling skjer i mindre grad [23, 57, 58]. Det er slik sett mulig å styre alginatets sammensetning *in vitro*, slik at dets egenskaper kan skreddersys.

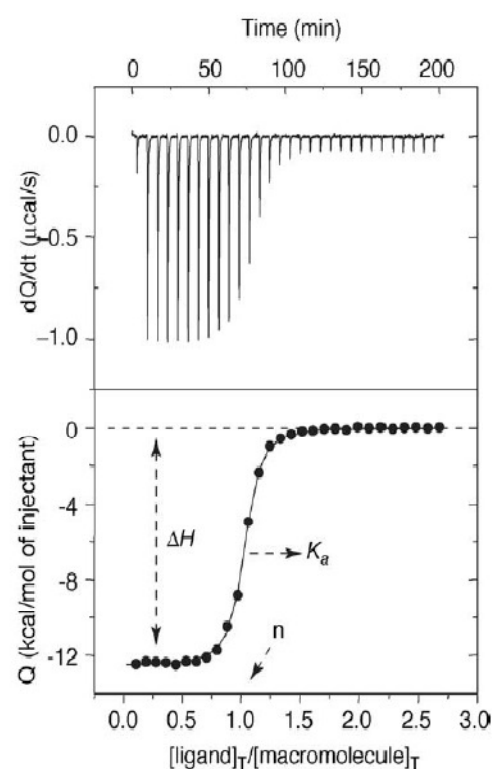
Ulike typer alginatkuler er under evaluering for bruk ved transplantasjon og "drug delivery" [8]. Mange faktorer spiller inn på kulenes biokompatibilitet, som type alginat brukt (høy-G, høy-M, renhetsgrad etc.), type og mengde gelingsion, og innkapslingsmetode [59]. Alginatkuler av høy-G alginat er vist å være kompatible ved implantering i mus [60], og nyere studier i en human helblodmodell viser at kulene ikke gir komplementaktivering (som har betydning ved en immunrespons) [8]. Dette kan mest sannsynlig forklares ut fra alginatets negative overflateladning [13].

1.6 Isoterm titreringskalorimetri

1.6.1 PRINSIPP OG TERMODYNAMISKE STØRRELSER

Isoterm titreringskalorimetri (ITC) er en analysemetode som brukes for å bestemme kreftene som stabiliserer interaksjonen mellom to molekyler, noe som gjøres ved å måle vekselvirkningsvarmen ved interaksjon. En serie injeksjoner av en reaktant (titranten) i en løsning av en annen reaktant (cellekomponenten), i et konsentrasjonsregime hvor bindingssetene hos cellekomponenten blir gradvis mettet, produserer en titerkurve av varme absorbert (eksoterm prosess) eller frigitt (endoterm prosess) per mol titrant injisert [61, 62].

Figur 1.7 viser et eksempel på en titrering, der entalpi, bindingskonstant (K_a) og støkiometri (n) ved interaksjon kan bestemmes direkte ut fra titerkurven. Fra K_a og ΔH kan systemets entropi og frie energi deretter beregnes. Dette kan, i kombinasjon med molekylens strukturelle informasjon, være med på å identifisere de viktigste overflateregionene ved interaksjon [61, 62].



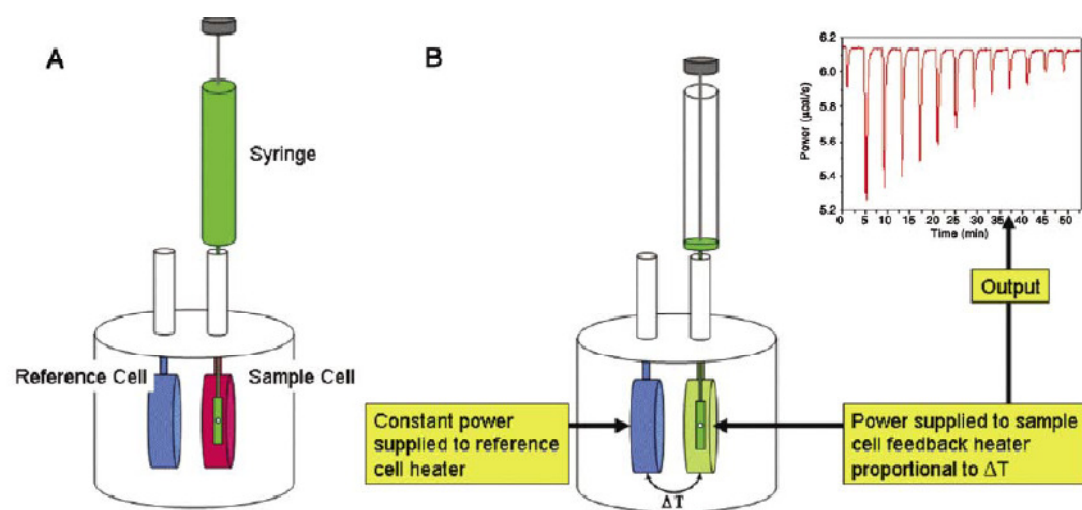
Figur 1.7: Eksempel på titerkurve med ligand titrert i makromolekyl, der ΔH , K_a og støkiometri (n) ved interaksjon kan bestemmes direkte ut fra titerkurven. Hentet fra [48].

1.6.2 INSTRUMENTERING

Et ITC-instrument består av to identiske celler (referanse- og prøvecelle) som holdes ved konstant, identisk temperatur. Cellene er omgitt av en adiabatisk kappe, som har en temperatur som er 5 – 10 °C lavere enn cellene. [63]. Figur 1.8 viser en skjematisk

fremstilling av et ITC-instrument. Før titranten injiseres i prøvecellen blir en konstant strøm tilført referansecellen. Dette representerer baselinjesignalet. Når titranten injiseres vil sensitive, termofile strømmer detektere temperaturforskjeller mellom de to cellene, og mellom cellene og kappen. Varme blir så absorbert (ved eksoterme prosesser) eller frigjort (ved endoterme prosesser) ved interaksjon, slik at en identisk temperatur mellom cellene opprettholdes. Instrumentresponsen er mengden energi ($\mu\text{cal}\cdot\text{sekunder}^{-1}$) nødvendig for å returnere cellene til identisk temperatur [63, 64].

En serie injeksjoner av titrant i den kalorimetriske cellen, i et konsentrasjonsregime hvor bindingssetene til cellekomponenten blir gradvis mettet, gir en titerkurve av varme per mol titrant injisert. Ved første injeksjon vil alt eller mesteparten av liganden binde cellekomponenten, noe som gir et stort varmesignal. Ettersom konsentrasjonen av ligand øker vil makromolekylet tilslutt bli mettet, slik at signalet blir mindre. Ved fullstendig titrering tilsvarer dette titrantens fortynningsvarme [63, 64].



Figur 1.8: Skjematiske representeringer av et ITC-instrument. **A)** ITC-instrument før titrering. Prøve- og referansecelle holdes ved konstant, identisk temperatur. Titranten plasseres i sprøyta og injiseres i cellekomponenten. **B)** ITC-instrument ved titrering. Når titranten injiseres i prøvecellen vil varme enten absorberes (eksoterm prosess) eller frigis (endoterm prosess) ved interaksjon. Dette fører til at varme henholdsvis fjernes eller tilføres prøvecellen, slik at temperaturen mellom cellene holdes konstant. Instrumentresponsen er mengden energi ($\mu\text{cal}\cdot\text{sek}^{-1}$) som er nødvendig for å returnere cellene til identisk temperatur. En serie injeksjoner av titrant i den kalorimetriske cellen gir en titerkurve av varme per mol titrant injisert. Hentet fra [64].

1.6.3 EKSPERIMENTELLE FORHOLD

Hver injeksjon av titrant i cellen fører som sagt til en bindingsreaksjon slik at, avhengig av bindingskonstanten og konsentrasjonen av cellekomponenten, en viss mengde

interagerende kompleks dannes. For å oppnå en komplett bindingsisoterm (som er nødvendig for nøyaktig bestemmelse av ΔH) må titranten være mer konsentrert enn cellekomponenten, og det molare forholdet mellom dem etter siste injeksjon burde være 2 – 3. Ettersom volumet i prøvecellen er 1,4 ml, og et typisk injeksjonsvolum av titrant er 10 μl med rundt 30 injeksjoner, er det best å bruke en titrantkonsentrasjon som er 10 – 20 ganger høyere enn cellekomponenten. Dette gjør at reaksjonen vil kunne nå det nøytraliserende punktet etter 7 – 13 injeksjoner [62, 63].

Det er viktig at de første injeksjonene definerer en baselinje hvor all ligand er bundet til makromolekylet. I tillegg må ekvivalensregionen (hvor mengde fritt og bundet cellekomponent er i likevekt) være veldefinert, noe som er viktig for en nøyaktig bestemmelse av K_a . Ved å plote de kalorimetriske dataene etter ITC til en passende bindingsmodell (ett-, to- eller flerseters) kan K_a , ΔH og n bestemmes direkte. Flere injeksjoner burde også utføres etter metning, ettersom varmesignalet etter metning tilsvarer titrantens fortynningsvarme [62].

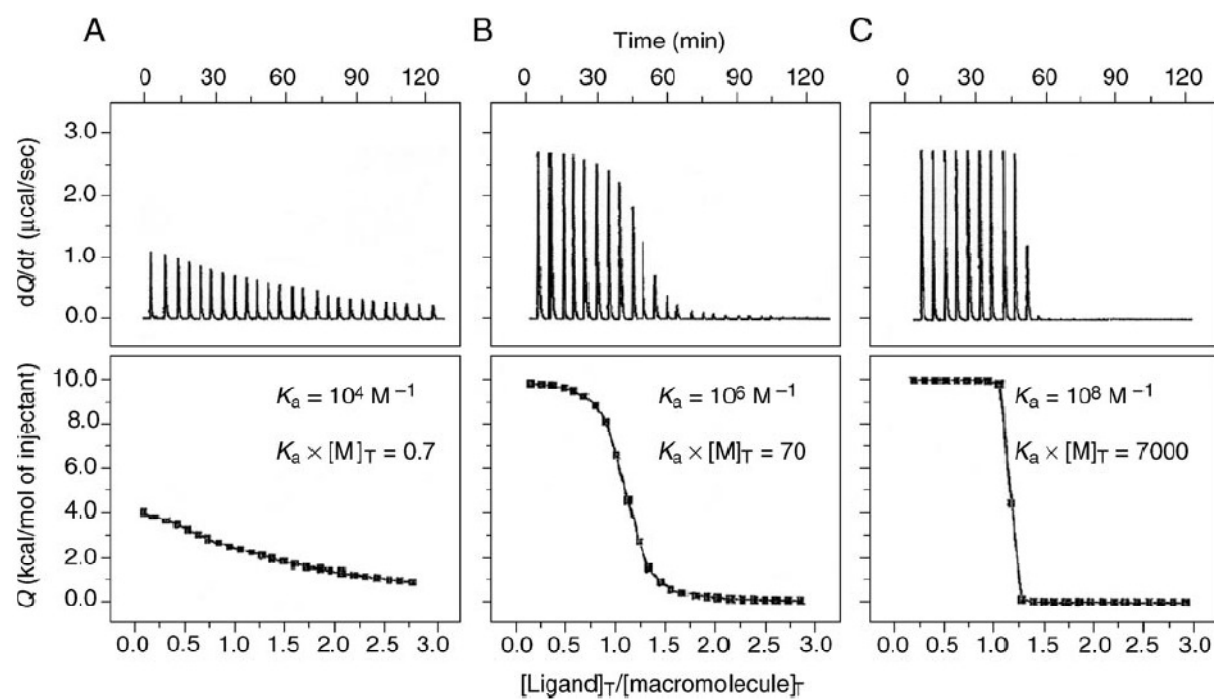
Bindingskonstanten er betegnet som lav; $K_a < 10^4 \text{ M}^{-1}$, moderat; $10^4 \text{ M}^{-1} < K_a < 10^8 \text{ M}^{-1}$ og høy; $K_a > 10^8 \text{ M}^{-1}$. Dersom den skal bestemmes er det viktig at konsentrasjonen til prøveløsningene er nøyaktig bestemt. Figur 1.9 viser bindingskonstantens effekt på formen til titerkurven. Høy K_a -verdi viser til tett binding, noe som resulterer i metning ved første injeksjonene, slik at bindingsisotermen får en rektangulær form. Den mangler derfor datapunkt i ekvivalensregionen slik at estimatet for K_a blir upålitelig. ΔH kan fremdeles bestemmes nøyaktig. Ved lav K_a -verdi fås en flat bindingsisoterm, slik at bestemmelsen av både K_a og ΔH blir upålitelig. I begge tilfeller mister titreringen sin karakteristiske kurvering, slik at informasjon som er nødvendig for å finne K_a mistes. Ut fra dette er det ønskelig å ha en moderat K_a -verdi. Konstanten c kan brukes for å beskrive det praktiske vinduet til instrumentet som gir en nøyaktig bestemmelse av K_a (Likning 1.2). $[M_T]$ er total konsentrasjon av antall mulige bindingssteder hos cellekomponenten, n er bindingsstøkiometrien, og K_a bindingskonstanten ved interaksjon [62, 65].

$$c = n[M_T]K_a$$

Likning 1.2

Figur 1.9 (for en interaksjon med 1:1 støkiometri) viser at en stor c -verdi korresponderer til en tett binding mellom cellekomponent og titrant, mens en liten c -verdi korresponderer til en svak binding. Verdien for c kan endres ved å endre $[M_T]$, hvis den er innenfor deteksjonsgrensene til kalorimetret. Dersom en høy bindingskonstant observeres, må konsentrasjonen senkes så mye at det gir et lavt forhold mellom signal og støy. Dersom en lav

bindingskonstant observeres må konsentrasjonen være veldig høy for å få metning, noe som kan gi problemer i forhold til løselighet. Det er vist at en c -verdi mellom 1 – 1000 gir en god bestemmelse av K_a [62, 65].



Figur 1.9: Bindingskonstantens effekt på titerkurvens form. Samme parametre (konsentrasjon av reaktanter og ΔH), men ulike K_a -verdier er brukt: **A)** lav, **B)** moderat, og **C)** høy. En c -verdi mellom 1 – 1000 er vist å gi en god bestemmelse av K_a . Hentet fra [62].

1.6.4 DATAPROSESSERING

Den observerte varmen ved binding inkluderer ikke bare varme utviklet ved interaksjon mellom titrant og cellekomponent, den inkluderer også: [63]

- Varme som kommer fra ITC-apparaturen
- Titrantens fortynningsvarme.
- Cellekomponentens fortynningsvarme.

Fortynningsvarmen til titranten er den mest signifikante, ettersom startkonsentrasjonen er 10 – 20 ganger høyere enn konsentrasjonen av cellekomponenten. Den kan korrigeres for ved å erstatte celleinnholdet med ren buffer, for så å trekke fortynningsvarmen til titranten fra varme frigitt eller absorbert ved interaksjon mellom titrant og cellekomponent.

1.7 Fluorescens

1.7.1 PRINSIPP

Fluorescens observeres først og fremst fra aromatiske molekyler (såkalte fluroforer), og skjer ved at molekylene eksiteres ved absorpsjon av elektromagnetisk stråling ved en spesifikk bølgelengderegion. Den eksiterte fluroforen avgir så den absorberte energien i form av fotoner, ved en lavere, spesifikk bølgelengderegion. Ulike fluroforer har ulike bølgelengder hvor absorpsjon av energi er mest effektiv (absorpsjonsmaksimum), og korresponderende bølgelengder hvor maksimum mengde absorbert energi blir emittert (emisjonsmaksimum). For å oppnå maksimal fluorescensintensitet er det derfor viktig å ha en energikilde som eksiterer fluroforen ved dens absorpsjonsmaksimum, samt ha emisjonsfilter som detekterer fotonene som emitteres [66].

1.7.2 FLUORESCENSMERKING AV PROTEINER

Alexa Fluor farger er et eksempel på en mye brukt aminreaktiv flurofor, som produserer sterke og fotostabile konjugat [67]. Ved fluorescensmerking av biomolekyler er det viktig med tilstrekkelig merking, samtidig som molekylenes kritiske funksjonelle egenskaper som løselighet og selektiv binding opprettholdes [68]. Lysin, som er den primære aminosyren som modifiseres ved alexamerking, er den femte mest vanlige aminosyren i humane proteiner. Alle lysiner blir ikke modifisert ved merking, men dette er heller ikke ønskelig, da opprettholdelse av et proteins funksjonelle egenskaper avhenger av ikke for høy merkingsgrad. Ved lav merkingsgrad (bortsett fra for små proteiner med få lysiner) kan en polydispers blanding av fluorescensmerkede proteiner fås [67]. Ved høy merkingsgrad kan utfelling av proteiner observeres, i tillegg til at deres selektive binding kan endres [69]. Det er viktig å fjerne uinkorporert farge etter merking, da det kan påvirke videre eksperimenter og gi unøyaktige fluorescensmålinger [67].

1.7.3 DETEKSJON

Fordelen med fluorescensmerking er at proteinene lettere kan visualiseres og kvantifiseres, ettersom proteinsignalet blir amplifisert [70]. Fluorescensintensiteten avhenger av fluorescenskonsentrasjon, absorbans, samt eksitasjonskilde og emisjonsfilter brukt ved deteksjon. I fortynnede løsninger er fluorescensintensiteten lineær proporsjonal med fluroforkonsentrasjonen, gitt ut fra Lambert Beers lov. Dersom intensiteten blir for høy vil ikke forholdet lengre være lineært, da molekylene begynner å absorbere fluorescens fra

hverandre. Fluorescensprosessen er syklisk, og dersom fluorofoeren ikke blir ødelagt vil den eksiteres og detekteres kontinuerlig. At fluorofoerer kan generere mange tusen detekterbare fotoner er fundamentet for den høye sensitiviteten ved fluorescensdeteksjon. Sensitiviteten til fluorescensinstrument kan forsterkes ved å øke styrken til eksitasjonskilden, eller amplifisere detektorsignalet [66].

Det finnes primært fire hovedtyper fluorescensinstrument: spektrofotometer og mikroplatelesere, som måler gjennomsnittlig fluorescens; fluorescensmikroskop, som gir 2D- og 3D-bilder av det fluorescensmerkede objektet; fluorescensskannere, som måler fluorescens som en funksjon av koordinater i 2D; og flowcytometri, som måler fluorescens per celle i en flytende strøm av væske. Hvert instrument har sine fordeler og ulemper, og stiller ulike krav til fluorescensprøven [67].

Konfokal laser skanning mikroskopi (KLSM) er et verktøy som gir bilde og 3D-rekonstruksjon av objekter med høy oppløsning. Instrumentet har ulike lasere, som kan eksitere ulike fluorofoerer ved deres absorpsjonsmaksimum. Dette skjer ved punktilluminering, ved hjelp av et "pinhull". Fluorescensen som kommer fra illuminasjonspunktet blir sendt til detektoren, der bølgelengdeområdet av interesse velges ved hjelp av et emisjonsfiltr. Det er dette som gir KLSM den gode oppløsningen, da fluorescens fra andre punkt på objektet ikke er i fokus, og dermed ikke blir detektert. For å få informasjon fra hele objektet skanner laseren over prøven i x-y retning, og ved å bevege fokuset vertikalt (i z-retning) fås flere skiver av objektet, slik at et 3D-bilde kan produseres [71].

Fluorescensmikroplatelesere kan måle fluorescensintensiteten til mange prøver samtidig. Prøvene plasseres i brønnplater, med prøvevolum på 100 – 200µl. Ønsket eksitasjonsbølgelengde velges ved hjelp av et optisk filter eller en monokromator, og det emitterte lyset fra fluorofoeren samles opp ved hjelp av emisjonsfilter. Dette sendes til en lysdetektor, som omgjør fluorescensen til et målbart signal [66].

DEL 2 STUDIEDESIGN

Lite er kjent i forhold til proteiners interaksjon med alginat, noe som er viktig å ha kjennskap til ved immobilisering av celler og proteiner i alginatkuler. Hensikten med denne oppgaven var derfor å studere alginat – protein interaksjoner. En interaksjon med albumin og fibrinogen ble undersøkt ettersom proteinene er vist å adsorbere til biomaterialer *in vivo*, noe som henholdsvis kan redusere og initiere en immunrespons. En interaksjon med insulin ble undersøkt ettersom proteinet er sekresjonsprodukt ved innkapsling av insulinproduserende celler. Lysozym ble brukt som positiv kontroll, da proteinet er kjent å vekselvirke med alginat. Det ble tatt utgangspunkt i fysiologiske betingelser (pH og ionestyrke) slik at forholdene samsvarer med det alginatkuler opplever ved transplantasjon.

Ettersom alginat er negativt ladet, er det naturlig å tro at elektrostatiske krefter har betydning ved alginat – protein interaksjoner. For å undersøke elektrostatiske krefters innflytelse ved interaksjon ble proteinenes elektrostatiske overflatepotensial modellert ved hjelp av APBS. ITC ble videre benyttet for bestemmelse av entalpi, entropi og bindingsstyrke ved proteinenes interaksjon med alginat i løsning. Proteinbinding til alginatkuler ble kvantifisert ved konsentrasjonsmålinger på nanodrop spektrofotometer og mikroplateleser, og visualisert i mikroskop (KLSM og lysmikroskop). Det ble tatt utgangspunkt i tomme alginatkuler, for å fokusere på biomaterialets rolle ved interaksjon.

DEL 3 MATERIALER OG METODER

3.1 Materialer

Alginat

Alginat (LF10/60) ekstrahert fra *Laminaria hyperborea* ble kjøpt fra FMC Biopolymer (Drammen, Norge) og brukt som kilde til alginat ved ITC. Alginat (UP-LVG) ekstrahert fra *L. hyperborea*, rensset av NovaMatriX og kjøpt fra FMC Biopolymer (Drammen, Norge), ble brukt til produksjon av alginatkuler. Deres kjemiske karakteristikk er gitt i Tabell 3.1. Tabellen viser alginatens fraksjon av G (F_G) og M (F_M), samt diader og triader av disse (F_{GG} , F_{MM} , F_{MGM} etc.). $N_{G>1}$ angir polymerenes gjennomsnittlige G-blokk lengde.

Tabell 3.1: Kjemisk komposisjon av alginat (LF10/60 og UP LVG) fra *L. hyperborea* (FMC Biopolymer/ NovaMatriX), funnet ved $^1\text{H-NMR}$.

Navn	F_G	F_M	F_{GG}	$F_{GM/MG}$	F_{MM}	$F_{GGM/MGG}$	F_{MGM}	F_{GGG}	$N_{G>1}$	DP_n
LF10/60	0,66	0,34	0,54	0,12	0,21	0,04	0,09	0,49	13	50
UP-LVG	0,67	0,33	0,55	0,12	0,21	0,05	0,09	0,50	12	-

Proteiner

Lysozym fra eggehvite fra høns (HEL) (MERCK, Tyskland), humant lysozym fra melk (HML) (Sigma-Aldrich, United Kingdom), insulin fra svin og okse (SINS og BINS) (Sigma-Aldrich, Danmark), serum albumin fra okse, fraksjon V (BSA) (Sigma-Aldrich, USA), humant serum albumin, fraksjon V (HSA) (Sigma-Aldrich, Tyskland), og humant fibrinogen (HFiB), fraksjon I, type I: 98 % clottable protein (Sigma-Aldrich, USA), ble brukt ved studiet av proteininteraksjon med natriumalginat (alginatløsning) og/ eller kalsiumalginat (alginatkuler). Viktige karakteristikk for proteinene er vist i Tabell 3.2. Proteinenes isoelektriske punkt (pI), molekylvekt (M_w) og ekstensjonskoeffisient ble beregnet ut fra aminosyresekvensen til en monomer av proteinene (Vedlegg A). R_G for HEL, BSA og HFiB ble hentet fra Tyn og Gusek (1990) [26], mens R_G for BINS ble hentet fra Rogers *et al.* [72]. Det antas at HML, HSA og SINS har R_G i samsvar med henholdsvis HEL, BSA og BINS.

Tabell 3.2: Isoelektrisk punkt (pI), molekylvekt (M_w), treghetsradius (R_G) og ekstensjonskoeffisient til en monomer¹ av proteiner brukt i studiet av alginat – protein interaksjoner.

Protein	pI (teoretisk)	M_w [kDa] (monomer)	R_G [Å]	Ekstensjonskoeffisient [(M·cm) ⁻¹]
HEL	11,3	14,3	15,2	37970
HML	11,0	14,7	-	36940
SINS	5,2	5,7	-	5960
BINS	5,2	5,7	10,3	5960
HSA	5,5	66,5	-	42925
BSA	5,5	66,5	29,8	34445
HFiB	6,8	165	142	257750

¹ For HFiB er verdien for R_G til en dimer av proteinet, ettersom HFiB forekommer som en dimer i løsning.

Løsningsmiddel til alginat og proteiner

PBS (10mM fosfat (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄), 144mM NaCl (I=160mM)) pH 7,0 ble brukt til oppløsning av proteiner og alginat, dersom ikke annet er oppgitt. (Se Vedlegg B for beregninger). Bufferen ble oppløst i MQ-vann, sterilfiltrert ved hjelp av Nalgene[®] (Nalgene Nunc International Corp., 2001) (filterdimensjon: 0,22µm), og lagret ved romtemperatur.

Fluorescensmerking av proteiner

Alexa Fluor[®] 546 (Alexa Fluor[®] 546 Protein Labeling Kit, Invitrogen) ble brukt for merking av proteiner med fluorescens, i forbindelse med kvantifisering av adsorbert protein til alginatkuler på mikroplateleser. Fluoroforens eksitasjons- og emisjonsmaksimum er henholdsvis 554 og 573 nm, som spesifisert fra leverandøren.

Polyklonalt FITC-merket antistoff til HFiB fra sau (IgG-fraksjon) (Millipore, California, USA), og monoklonalt FITC-merket antistoff til HML fra mus (IgG-fraksjon) (Invitrogen, USA), ble brukt for bedre visualisering av adsorbert protein (HFiB og HML) til alginatkuler. Eksitasjons- og emisjonsmaksimum til FITC er henholdsvis 495 og 521 nm, som spesifisert fra leverandøren.

Andre kjemikalier

Kjemikalier brukt til produksjon av PBS, alginatløsning, gelingsløsning, samt løsning til oppbevaring av alginatkuler, ble kjøpt fra Merck (CaCl₂, BaCl₂, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ og NaCl), Sigma-Aldrich (MOPS (3-(N-morfolino)propansulfonsyre), og Prolabo (D-mannitol).

3.2 Metoder

3.2.1 PROTEINMODELLERING

De ulike proteinenes overflate og elektrostatiske overflatepotensial (Tabell 3.3), ble modellert ved hjelp av 3D-struktur visualiseringsprogram (PyMOL og APBS). Dette ble gjort for å få et inntrykk av deres overflateladning i forhold til elektrostatiske krefters betydning for alginat – protein interaksjoner.

Data brukt ved modellering

Strukturene brukt ved proteinmodellering (PDB-filer, se Tabell 3.3) ble hentet fra Protein Data Bank (PDB) [73]. PyMOL (versjon 0.99rc6) fra DeLano Scientific [74] ble brukt til visualisering, mens APBS (versjon 0.5.1) [75], med input fra PDB2PQR (versjon 1.7) [76, 77] og PROPKA (versjon 2.0) [78], ble brukt for å beregne proteinenes elektrostatiske overflatepotensial. Alle modelleringene viser proteinene i form av en monomer, bortsett fra HFiB som ble modellert som en dimer.

Tabell 3.3: Proteiner som har fått sin overflate og sitt elektrostatiske overflatepotensial modellert ved hjelp av PyMOL og APBS. RMSD angir proteinstrukturenes grad av nøyaktighet.

Protein	PDB ID	RMSD [Å]	Annet	Referanse
HML	1REX	1,5	-	[79]
HEL	2ZQ3	1,6	-	[80]
HINS	3EXX	1,35	-	[81]
SINS	1ZNI	1,5	-	[82]
BINS	2INS	2,5	B1(Phe) mangler	[83]
HSA	1E78	2,6	Brukt til generell modellering av serum albumin	[84]
HFiB	3GHG	3,3	α -kjeden er delvis protolysert	[85]

Overflatemodellering (PyMOL)

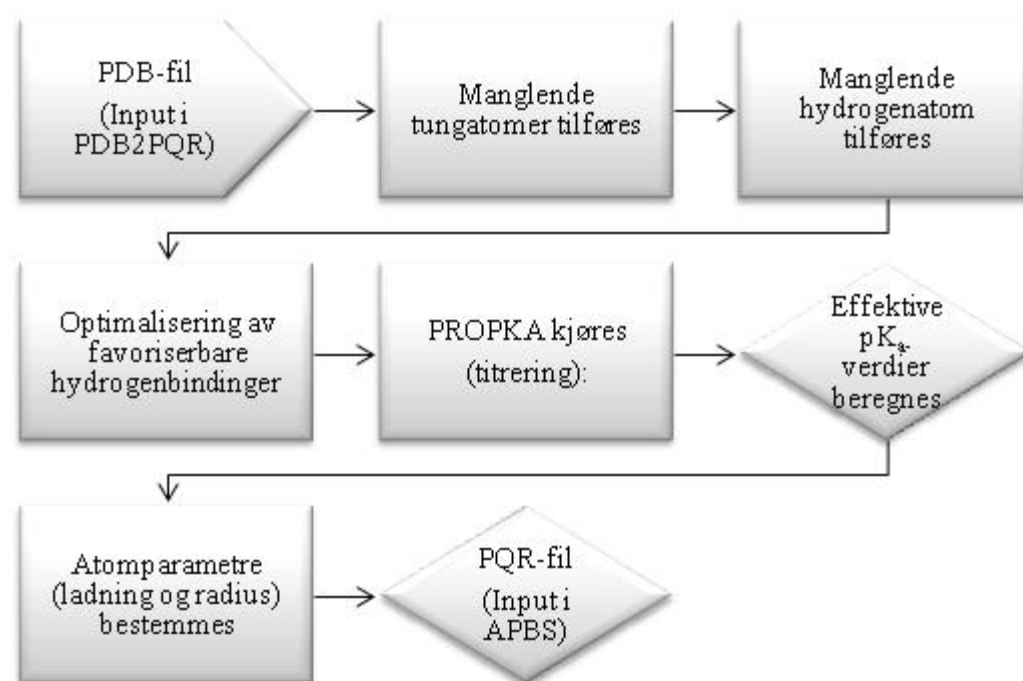
Ut fra proteinenes PDB-fil ble deres overflateladning visualisert ved hjelp av PyMOL. Følgende parametre i PyMOL ble brukt:

- Proteinenes løsningsmiddeltilgjengelige overflate ble gjort synelig, gitt ut fra en radius på 1,4 Å. (1,4 Å er estimert radius til et vannmolekyl).

- Proteinenes overflate ble farget hvit.
- Sure aminosyrer (Asp, Glu, Tyr, Cys og C-term) ble farget røde.
- Basiske aminosyrer (His, Arg, Lys og N-term) ble farget blå.

Modellering av elektrostatisk overflatepotensial (APBS)

For at APBS skal kunne gi et realistisk bilde av proteinenes elektrostatiske overflatepotensial, må proteinenes komplette strukturelle data (manglende tungatomer og hydrogenatomer), samt atomparametre (atomladning og -radius) være bestemt. Proteinenes PDB-fil inneholder ikke informasjon om dette, og filen må derfor omgjøres til en PQR-fil. Dette ble gjort ved hjelp av PDB2PQR (se Figur 3.1), med input fra PROPKA som beregner aminosyrenes effektive pK_a -verdi ut fra løsningsmidlets pH-verdi [77].



Figur 3.1: Flow-diagram for omgjøring av PDB- til PQR-fil ved hjelp av PDB2PQR og PROPKA. Hentet og modifisert fra [77].

APBS trenger også informasjon om løsningsmidlets ionekonsentrasjon (se Vedlegg B) og dielektriske konstant ($\epsilon_s = 80$), samt proteinenes dielektriske konstant ($\epsilon_p = 10$). De dielektriske konstantene ble valgt ut fra kjent litteratur [45]. Fysiologiske betingelser (pH 7,0, I=160mM) ble valgt i de eksperimentelle metodene brukt for å undersøke alginat – protein interaksjoner. PBS (10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 144mM NaCl (I≈155 – 175mM), pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0) ble derfor brukt som ”input” for løsningsmiddel i modelleringene, for å

reprodusere det eksperimentelle miljøet så bra som mulig. Løsningsmiddel og motjoner vil skjerme polare og ladde aminosyrer på overflaten av proteiner, slik at proteinenes elektrostatiske overflatepotensial blir svakere [44].

For å illustrere proteinenes elektrostatiske overflatepotensial ble følgende parametre i APBS brukt:

- Molekylær overflate ble satt til løsningsmiddeltilgjengelig overflate, gitt ut fra en radius på 1,4 Å.
- Proteinene ble farget ut fra potensialet til den løsningsmiddeltilgjengelige overflaten.
- Fargeskaleringen ble satt til $\pm 4 kT/e$

3.2.2 INTERAKSJON MELLOM PROTEINER OG NATRIUMALGINAT (ITC)

De termodynamiske parametrene ved interaksjon mellom natriumalginat og proteiner, HEL (lysozym fra høns), SINS (insulin fra svin), BINS (insulin fra okse), BSA (serum albumin fra okse) og HFiB (humant fibrinogen), ble undersøkt ved ITC.

Trinnvis syrehydrolyse av alginat

Natriumalginat ble syrehydrolysert ved trinnvis syrehydrolyse før bruk. Alginat (1,0 g) ble løst i MQ-vann (1 l) ved hjelp av magnetrører (1 time), for så å bli pH-justert til pH 5,6. Løsningen ble deretter satt i vannbad (95 °C, 1 time), avkjølt i kaldt vann (40 min), og pH-justert til pH 3,8. Etter dette ble løsningen på nytt satt i vannbad (95 °C, 1 time), avkjølt i kaldt vann (40 min), og pH-justert til pH 6,8. Alginatet ble tilslutt frysetørka (2 dager).

For å fjerne salter fra alginatet, ble syrehydrolysert alginat (1,0 g) løst i MQ-vann (100 ml), og dialysert mot MQ-vann i dialyseslange (cutoff 12 – 14kDa), i 24 timer (3 skift). Konduktiviteten var 0,6 μ S ved siste måling (MQ-vann = 0,4 μ S). Løsningen ble frystørka (2 dager) og oppbevart i kjøleskap (4 °C).

H^1 -NMR av det syrehydrolyserte alginatet ble utført av Wenche I. Strand, på Bruker Avance DPX 300. Alginat (9,0 mg) ble løst i D₂O (600 μ l), TTHA (20 μ l) og referanse (5 μ l), og resultatene viste at det var nedbrutt til $\overline{DP}_n \approx 50$.

Prøveforberedelse til ITC

Natriumalginat og protein ble oppløst i PBS (pH 7,0, I=160mM), filtrert ved hjelp av sprøytefilter (0,20 μ m), for så å bli dialysert mot PBS over natt (ingen skift), i dialyseslange

(cutoff 12 – 14kDa)². Dette ble gjort for å minimere forskjeller i sammensetning mellom løsningene [63]. (Før oppløsning av alginat i PBS ble polymeren tørket i eksikator, for å fjerne vann). Proteinkonsentrasjoner ble beregnet ut fra absorbansmålinger (A_{280}) på Nanodrop spektrofotometer (ND-1000, versjon 3.7.1) [86]. (Se Vedlegg C for beregninger av alginat- og proteinkonsentrasjoner). Valg av buffer ved ITC er viktig. Dersom det ved interaksjon blir tatt opp eller frigitt protoner vil et ekvivalent antall protoner også tas opp eller frigis fra bufferen. Dersom bufferen har en stor ioniseringsentalpi vil den målte bindingsentalpien reflektere både bufferionisering og interaksjonen mellom molekylene. PBS har lav ioniseringsentalpi, og vil ikke påvirke termodynamikken ved interaksjon [63].

Protein og alginat ble vekselvis brukt i celle og injektor, der konsentrasjonene brukt ved titrering er vist i Tabell 3.4. Titranten burde ideelt sett være omtrent 10 – 20 ganger høyere enn cellekomponenten, slik at metning mellom molekylene forekommer [62, 63].

Tabell 3.4: Protein- og alginatkonsentrasjoner (mM) brukt ved ITC.

	HEL titrert i alginat	Alginat titrert i HEL	Alginat titret i SINS	Alginat titrert i BINS	BSA titret i alginat	Alginat titret i HFiB
Proteinkonsentrasjon[mM]	0,193	0,097	0,074	0,027	0,199	0,031
Alginatkonsentrasjon [mM]	0,020	0,240	0,670	0,670	0,020	0,670

ITC-apparatur

ITC-målingene ble utført ved hjelp av et VP-ITC MicroCalorimeter (MicroCalTM). Prøvecelle (1,4 ml) og sprøyte (injektor) (300µl) ble fylt med alginat eller protein, og det ble utført 30 injeksjoner à 10µl med et tidsintervall på 240 sek, der varme absorbert eller frigitt ved interaksjon ble målt. Sprøyten rørte i løsningen med 290rpm, og eksperimentene ble utført ved 298 K. Kalorimetret ble kontrollert av VPView 2000, versjon 1.4.8[®] (MicroCalTM). Fortynningsvarmen til titranten ble funnet ved å erstatte cellekomponenten med PBS (løsningsmiddel).

Mellom hvert forsøk der protein og alginat ble titrert mot hverandre, ble celle og sprøyte vasket med Decon 90 og MQ-vann. Vaskemidlet ble kobla til sug og sugeflaske, og celle og sprøyte ble skylt med vaskemiddel (80 ml) og MQ-vann (160 ml).

Analysen av de kalorimetriske dataene ble utført ved hjelp av MicroCalorimeter Origin[®] versjon 7.0, fra OriginLab Corporation [87]. De kalkulerte protein- og alginatkonsentrasjonene ble innført i programmet, og resultatene ble tilpasset en

² For insulin ble dialyseslange med cutoff 5 – 8kDa brukt.

bindingsmodell (ett- to- eller flerseters) ved hjelp av en 100-iteration teknikk. Bindingskurven ble tilpasset de integrerte dataene, helt til hver iterering ikke gjorde at kjikvadratfaktoren (χ^2/DoF) ble signifikant reduserte. Se Vedlegg D for rådata etter titreringene.

3.2.3 INTERAKSJON MELLOM PROTEINER OG ALGINATKULER

Adsorpsjon av fluorescensmerket og umerket protein, HEL (lysozym fra høns), HML (humant lysozym), HSA (humant serum albumin) og HFiB³ (humant fibrinogen), til overflaten av alginatkuler ble kvantifisert på henholdsvis mikropateleser og nanodrop, og visualisert på KLSM og lysmikroskop.

Produksjon av alginatkuler

Alginat (1,8 % (w/v)) med D-mannitol (0,3M), ble laget ved å løse natriumalginat (0,3612 g) i MQ-vann (10 ml) ved hjelp av magnetrører over natt, for så å tilsette D-mannitol (1,0931 g) løst i MQ-vann (10 ml). Løsningen ble pH-justert til pH 7,3 og sterilfiltrert ved hjelp av Nalgene (filterenhet: 0,22 μm). Arbeidet ble utført i romtemperatur, og løsningen ble lagret ved 4 °C.

Alginatkuler ble laget ved å dryppe natriumalginatløsningen i en gelingsløsning (50mM CaCl₂, 1mM BaCl₂, 0,15M D-mannitol og 10mM MOPS buffer, pH 7,3), mens løsningen ble rørt med magnetrører. Kulene ble holdt i gelingsløsningen 10 minutter etter siste dråpe, for så å bli vasket i 3 x 10 ml NaCl (0,9 %). Kulene ble oppbevart i NaCl (0,9 %) med CaCl₂ (2mM) pH 7,4, ved 4 °C. Gelingsløsning samt løsning til vask og oppbevaring av alginatkuler ble oppløst i MQ-vann, laget og lagret ved romtemperatur, og sterilfiltrert ved hjelp av Nalgene (filterenhet: 0,22 μm).

Kulestørrelsen ble kontrollert ved bruk av en elektrostatisk kulegenerator, (elektrisk potensial: 7 kV, alginatflow: 10 ml/ time, nål av stål med ytre diameter 0,35 mm, omtrent 2 cm distanse mellom nålspiss og gelingsløsning). De produserte kulene hadde en diameter på 550 μm , funnet ut fra et gjennomsnitt av 20 kuler ved hjelp av lysmikroskop (Nikon ECLIPSE TS100, Japan) med software Nis-Elements F (versjon 3.0, Laboratory Imaging s.r.o).

Fluorescensmerking av proteiner med Alexa Fluor 546

Proteiner (2 mg) ble løst i PBS (pH 7,0, I=160mM) (1 ml), og merket med Alexa Fluor[®] 546 (ut fra Alexa Fluor[®] 546 Protein Labeling Kit, Invitrogen). Proteinløsningene ble

³ Alginatkuler ble ikke inkubert i umerket HFiB

filtrert ved hjelp av sprøytefilter (filterenhet: 0,20µm), og arbeidet med løsningene ble utført i NuncrørTM (Nalgene Nunc International, Danmark), da rørene er vist å adsorbere proteiner i liten grad. De fluorescensmerkede proteinene ble oppbevart mørkt, ved 4 °C, i nuncrør.

Bio-Rad BioGel®P-30 fine size exclusion purification resin, brukt for å skille fluorescensmerket protein fra uinkorporert farge, var kun ment for proteiner med $M_w > 40\text{kDa}$. For HEL og HML ($M_w \approx 14,5\text{kDa}$) ble dette derfor utført ved dialyse mot PBS (10mM fosfat, pH 7,3) (Dulbecco `A`, Oxoid, United Kingdom), i dialyseslange (cutoff 12 – 14 kDa), 2 døgn (6 skift).

Proteinkonsentrasjoner

Tabell 3.5 viser proteinkonsentrasjoner (merket og umerket⁴ protein) brukt ved inkubering av alginatkuler i proteinløsninger. Proteinkonsentrasjoner (mg/ml) og proteinenes grad av merking med Alexa Fluor 546, ble funnet ut fra absorbansmålinger (henholdsvis A_{280} og A_{280}/A_{554}) på nanodrop. (se Vedlegg C og E for beregninger). Konsentrasjoner av HFiB og HSA ble valgt ut fra normale humane serumkonsentrasjoner (HFiB: 2 – 4 mg/ml, HSA: 30 – 50 mg/ml) og fortynninger av disse [28, 29]. Merkingsskittet var kun designet for å merke 2 mg/ml protein, slik at HFiB og HSA måtte fortynnes med umerket protein for å få høye nok sluttkonsentrasjoner. Relevante lysozymkonsentrasjoner ble funnet etter utprøving av metoden. Proteinenes fluorescenskonsentrasjon ble valgt slik at de var innenfor deteksjonsgrensen til plateleseren ($2 \cdot 10^{-12}$ M).

Tabell 3.5: Proteinkonsentrasjoner (mg/ml) av merket og umerket protein brukt ved inkubering med alginatkuler, samt proteinenes merkingegrad med Alexa Fluor 546 og en eventuell fortynning med umerket protein.

Protein	Konsentrasjoner (mg/ ml)	Merkingegrad (Alexa Fluor 546)	Merket:umerket protein
HEL (merket)	0,025, 0,05, 0,1, 0,2	0,37	-
HEL (umerket)	0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 8,0	-	-
HML (merket og umerket)	0,025, 0,05, 0,1, 0,2	0,37	-
HFiB (merket)	0,025, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0	5,23	1:10, 1:50, 1:50, 1:50, 1:100
HSA (merket og umerket)	1, 5, 10, 25, 50	2,82	1:100, 1:100, 1:100, 1:200, 1:200

⁴ NaCl (0,9 %) med CaCl₂ (2mM) (pH 7,4, I=160mM) ble brukt til oppløsning av umerket HEL og HML. Proteinløsningene ble behandlet på samme måte som de fluorescensmerkede proteinene.

Inkubering av proteiner med alginatkuler

Fluorescensmerket protein (300µl) ble tilsatt nuncrør, med 30 alginatkuler per rør. Prøvene ble inkubert i Rotator PTR-60 (Grant, United Kingdom), med kontinuerlig rotasjon (40rpm), mørkt, i én time (romtemperatur). Etter inkubering ble supernatanten overført til nuncrør, og kulene ble vasket fem ganger med PBS (pH 7,0, I=160mM). For fluorescensmerket HSA og HFiB ble ett kulesett preinkubert i BSA (300µl, 0,1 %). Dette ble gjort for å unngå en eventuell uspesifikk proteinbinding til nuncrør, samt undersøke om det reduserte en sekundær proteinbinding.

Inkubering av kuler i umerket protein ble gjort på samme måte som inkubering av kuler i fluorescensmerket protein. Ett kulesett for HEL og HSA ble preinkubert i BSA.

Kvantifisering av proteinadsorpsjon

Ved hjelp av mikroplateleser (FLUOstar omega, BMG LABTECH, software versjon 1.30, firmware versjon 1.20) ble adsorpsjon av fluorescensmerket protein til alginatkuler kvantifisert. Dette ble gjort ved å måle fluorescensintensiteten til proteinløsninger (100µl) før og etter inkubering med alginatkuler. Ut fra standardkurver for fluorescensintensitet mot kjente proteinkonsentrasjoner (proteinløsninger før inkubering med alginatkuler), ble de ukjente proteinkonsentrasjonene beregnet (se Vedlegg E). Emisjonsfilter på 544 – 590 nm ble brukt, med "gain" = 500.

96-brønnplater (Corning® flat bottom) ble brukt til fluorescensmålinger på plateleseren. For å unngå uspesifikk proteinbinding til platene, ble de inkubert i BSA (200µl, 0,1 %) i én time, for så å bli vasket fem ganger med PBS (pH 7,0, I=160mM).

Adsorpsjon av umerket protein til alginatkuler ble kvantifisert ut fra absorbansmålinger (A_{280}) på nanodrop (Vedlegg C). Bundet protein ble målt som tap av protein etter inkubering med alginatkuler, (samme prinsipp som kvantifisering av fluorescensmerket protein).

Merking av proteiner med FITC-merket antistoff

For bedre visualisering av adsorbert protein (HFiB og HML) til alginatkuler, ble FITC-merket antistoff til proteinene tilsatt. 75µl FITC-merket antistoff (fortynnet 1:50 med NaCl (0,9 %) med CaCl_2 (2mM), pH 7,4) ble tilsatt hvert rør, og rørene ble inkubert i Rotator PTR-60, med kontinuerlig rotasjon (40rpm), mørkt, i én time, ved romtemperatur. Etter

inkubering ble kulene vasket fem ganger med NaCl (0,9 %) med CaCl₂ (2mM) (pH 7,4, I=160mM).

Visualisering av proteinadsorpsjon

To ulike konfokal laser skanningmikroskop ble brukt for visualisering av proteinbinding (fluorescensmerkede proteiner) til alginatkuler. Alle setninger for mikroskop og bildetaking ble PC-styrt. Bildene som ble tatt viser optiske snitt gjennom ekvator på kulene, slik at kulekjernene er visualisert. 1) Zeiss LSM 510, med C-Apochromat 10x/45 vannobjektiv, W-PI 10x/23 okular, og software LSM 510, (versjon 2.02, Carl Zeiss, Oberkochen, Tyskland). Setninger for bildetaking var som følger: for visualisering av proteiner merket med Alexa Fluor 546 ble en 543-nm HeNe-laser brukt, med 560 nm long pass (LP) emisjonsfilter. For visualisering av FITC-merket antistoff ble en 488-nm argonlaser brukt, med emisjonsfilter på 505 – 530 nm. 2) Leica TCS SP5, med 10x/0,4 HCX PL APO CS tørrobjectiv, HC PLAN s 10x/25 okular, og software LAS AF (versjon 1.0, Leica Microsystems CMS GmbH, Tyskland). Setninger for bildetaking var som følger: for visualisering av proteiner merket med Alexa Fluor 546 ble en 561-nm DPSS laser brukt, med emisjonsfilter på 565 – 650 nm. For visualisering av FITC-merket antistoff ble en 488-nm argonlaser brukt, med emisjonsfilter på 500 – 550 nm.

Adsorpsjon av umerket protein til alginatkuler ble visualisert i lysmikroskop, med 4x/0,13 PhL DL objektiv og C-W 10x/22 okular (Nikon ECLIPSE TS100, Japan), og software Nis-Elements F (versjon 3.0, Laboratory Imaging s.r.o).

DEL 4 RESULTATER

4.1 Proteinmodellering

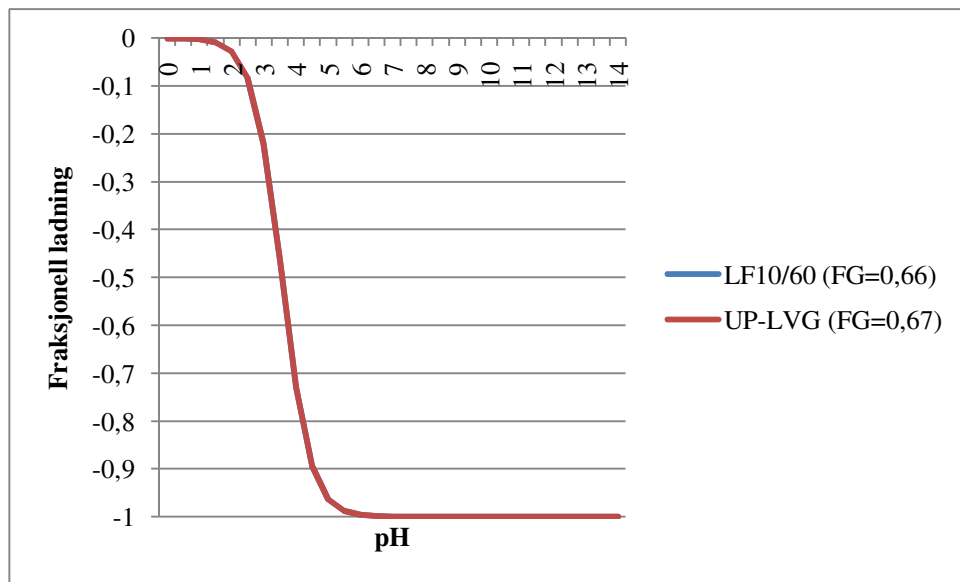
HEL (lysozym fra høns), HML (humant lysozym), SINS (insulin fra svin), BINS (insulin fra okse), HINS (humant insulin), HSA (humant serum albumin) og HFiB (humant fibrinogen), ble modellert med tanke på overflate og elektrostatisk overflatepotensial ved hjelp av PyMOL og APBS, ut fra kjent 3D-struktur (Tabell 3.3). (Se Vedlegg F for modellering av ikke-humane proteiner). PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl ($I \approx 155 - 175\text{mM}$)) pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 ble brukt som "input" for løsningsmiddel i modelleringene. Fysiologiske betingelser (pH 7,0, $I=160\text{mM}$) ble valgt i de eksperimentelle metodene brukt for å undersøke alginat – protein interaksjoner. Det var derfor spesielt ønskelig å studere proteinenes overflateladning ved disse forholdene, for å undersøke elektrostatiske krefters innflytelse på alginat – protein interaksjoner.

Proteinenes titerkurve ble laget for å få en oversikt over deres teoretiske isoelektriske punkt (pI), samt overflateladning ved ulike pH-verdier. Se Vedlegg G for beregninger. Teoretisk pI vil ikke være den samme som observert pI, da proteiners lokale miljø og struktur endrer aminosyrenes pK_a -verdi [40, 42].

Ved hjelp av SIM-alignment på ExPASy Proteomic Server [88] ble aminosyresekvensen til proteiner fra human kilde vs. ikke human-kilde sammenlignet. Metoden sammenligner to og to aminosyresekvenser mot hverandre, noe som gir et inntrykk av hvor like sekvensene er (i %).

4.1.1 ALGINAT

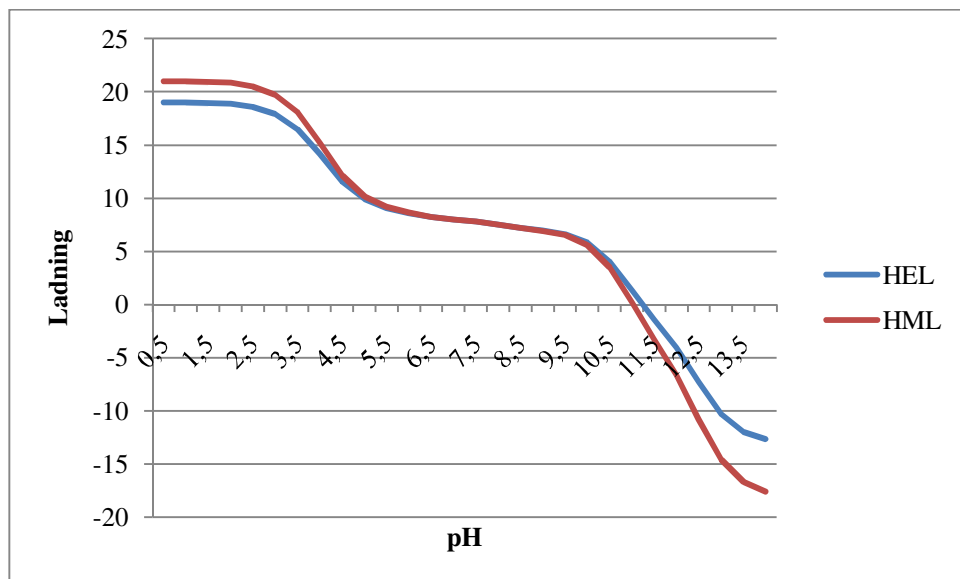
Figur 4.1 viser den teoretiske titerkurven til alginat brukt ved ITC (LF10/60) og alginat brukt til produksjon av alginatkuler (UP-LVG). Figuren viser polymerenes fraksjonelle negative ladning ved pH 1 – 14. Figuren viser at alginatene først er fullstendig negativt ladet ved pH $\sim 5,5$. Alginatenes titerkurver er identiske, noe som var forventet ettersom deres sammensetning av monomerer nesten er identisk ($F_G = 0,66$ (LF10/60) og $F_G = 0,67$ (UP-LVG)).



Figur 4.1: Teoretisk titerkurve til alginat brukt ved ITC (LF10/60) og alginat brukt til produksjon av alginatkuler (UP-LVG). Figuren viser polymerenes fraksjonelle negative ladning ved pH 1 – 14.

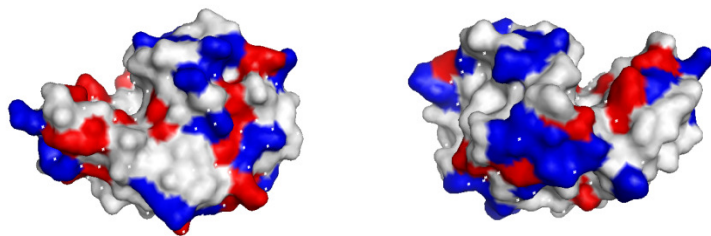
4.1.2 LYSOZYM

Figur 4.2 viser den teoretiske titerkurven til HEL og HML, med proteinenes ladning ved pH 1 – 14. Figuren viser at titerkurvene er like, bortsett fra ved høy og lav pH. pI for HEL og HML er henholdsvis ~ 11,3 og 11,0, noe som samsvarer bra med proteinenes observerte pI på omtrent 11 [89, 90].

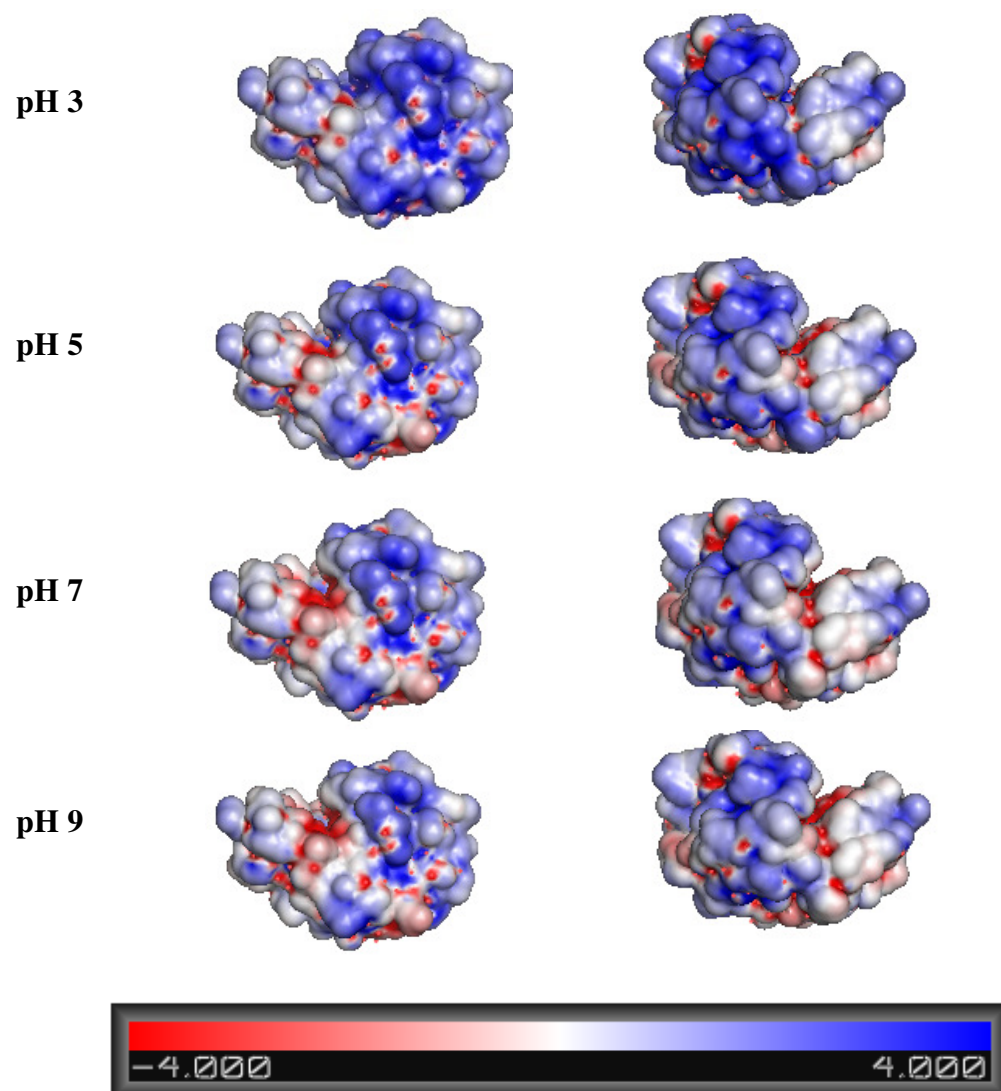


Figur 4.2: Teoretisk titerkurve til HEL og HML (pH 1 – 14). Alle titerbare aminosyrer er tatt i betraktning, bortsett fra cysteinene, som danner disulfidbroer.

Figur 4.3 viser lokasjonen til potensielt ladde aminosyrer på fremsiden og baksiden til overflaten av HML. Figur 4.4 viser bilde av proteinets elektrostatiske overflatepotensial ved pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 (fremsiden og baksiden). Tilsvarende er vist for HEL i Vedlegg F (Figur F.1). De to proteinene har lik form, med et tydelig positivt elektrostatiske overflatepotensial ved pH 7. Dette korrelerer bra med proteinenes titerkurve, som viser at de er netto positivt ladet (ettersom $\text{pH} < \text{pI}$). Sammenligningen av proteinenes aminosyresekvens ved SIM-alignment viser at de er 61 % like. Tidligere studier viser at lysozym interagerer med alginat ved pH 7 [51], og resultatene etter proteinmodelleringen indikerer at elektrostatiske krefter har betydning for en interaksjon.



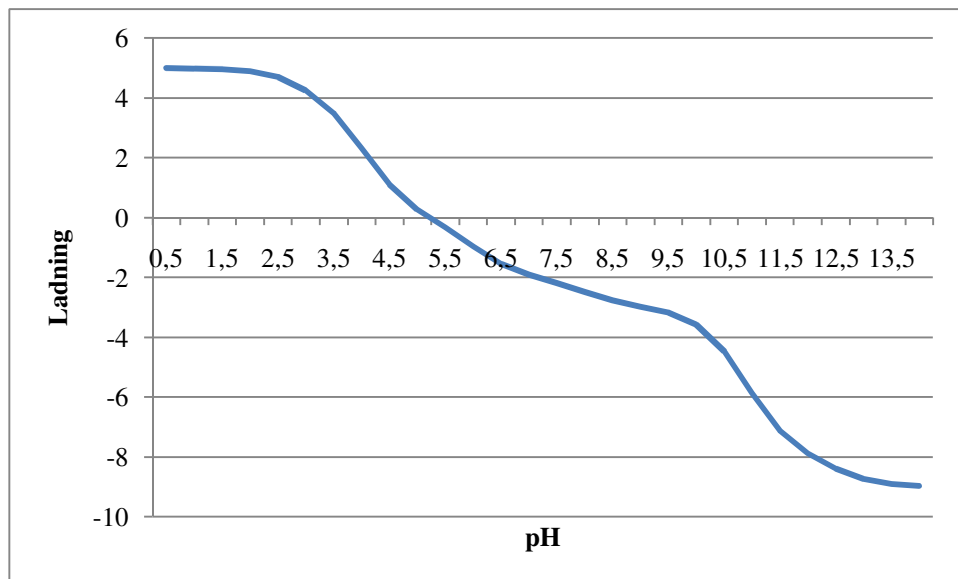
Figur 4.3: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på framsida og baksiden av HML, laget ved hjelp av PyMol ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 1REX). Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå.



Figur 4.4: Elektrostatisk overflatepotensial til framsida og baksiden av HML (pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0). Negative regioner er farget røde, mens positive regioner er farget blå. Kalkuleringene ble gjort ved hjelp av APBS ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 1REX). PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) ble benyttet som løsningsmiddel, med dielektrisk konstant $\epsilon_s = 80$. Proteinet ble behandlet med dielektrisk konstant $\epsilon_p = 10$. Fargeskaleringen ble satt til $\pm 4 \text{ kT/e}$.

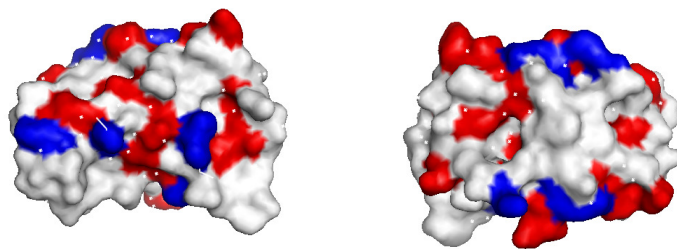
4.1.3 INSULIN

Figur 4.5 viser den teoretiske titerkurven til SINS, BINS og HINS, med deres ladning ved pH 1 – 14. Ettersom proteinene har et likt antall ladde aminosyrer er deres titerkurve identisk, med pI $\sim 5,2$. Dette samsvarer bra med proteinenes observerte pI, som er omtrent 5,5 [91, 92].

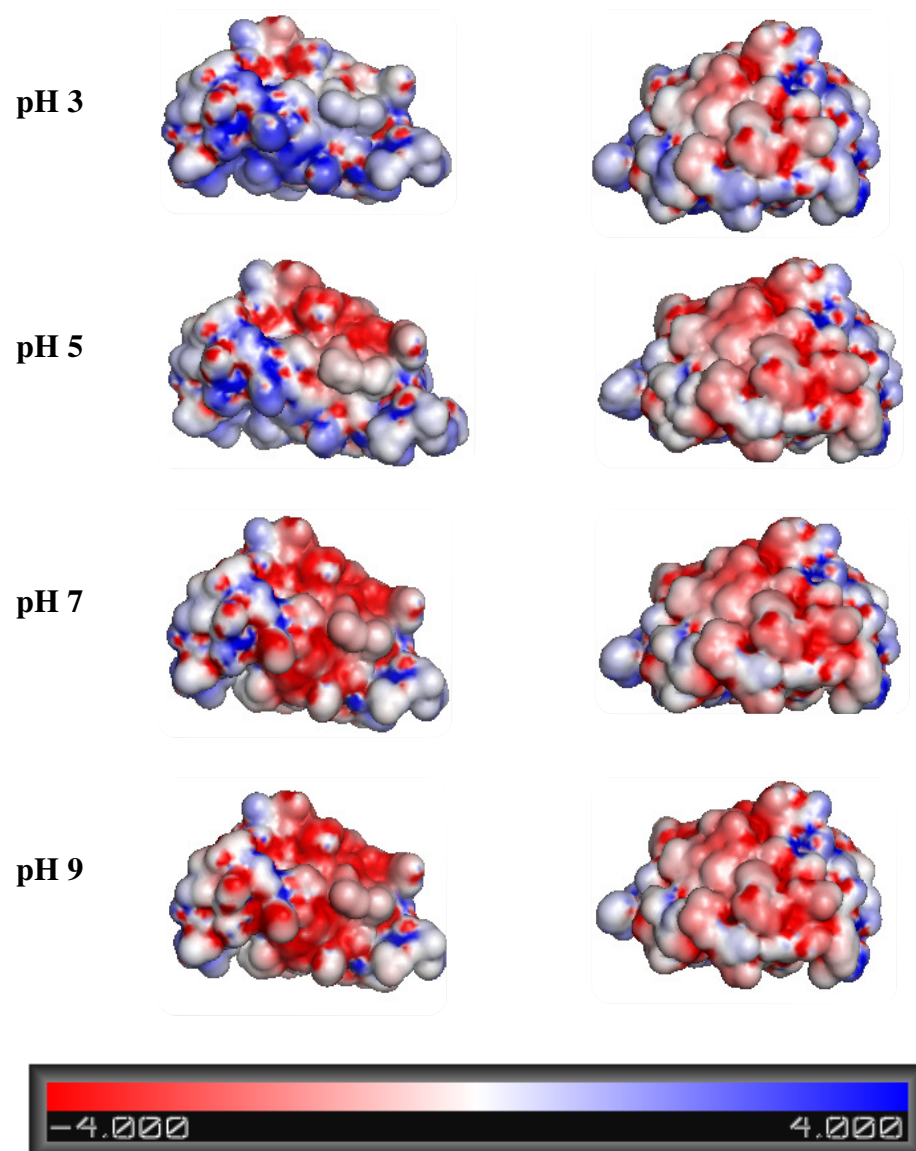


Figur 4.5: Teoretisk titerkurve til SINS, BINS og HINS (pH 1 – 14). Alle titerbare aminosyrer er tatt i betraktning, bortsett fra cysteinene, som danner disulfidbroer.

Figur 4.6 viser lokasjonen til potensielt ladde aminosyrer på framsida og baksiden til overflaten av HINS. Figur 4.7 viser bilde av proteinets elektrostatiske overflatepotensial ved pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 (framsiden og baksiden). Tilsvarende er vist for BINS og HINS i Vedlegg F (Figur F.2 og F.3). De tre proteinene har forholdsvis lik form, med et negativt overflatepotensial ved pH 7. Dette korrelerer bra med proteinenes titerkurve, som viser at de er netto negativt ladet (ettersom $pH > pI$). SIM-alignment av proteinenes aminosyresekvens viser at de er 96 – 100 % like. Proteinene har en liten overflate ($M_w \approx 5,7\text{kDa}$, $R_G \approx 10,3\text{\AA}$) [26], med få positive overflaterregioner ved pH 7. Dette indikerer at elektrostatiske krefter ikke har stor betydning ved en eventuell interaksjon med alginat.



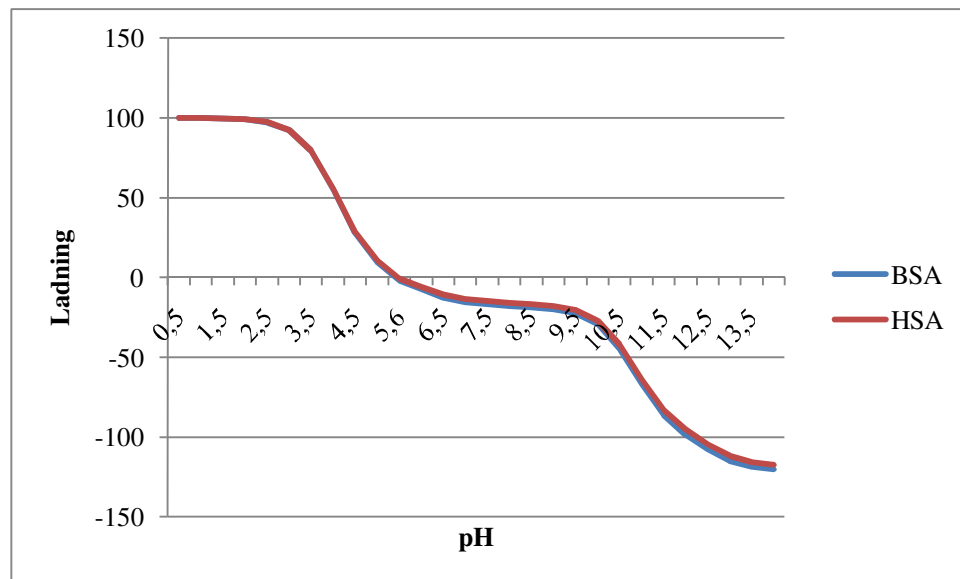
Figur 4.6: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på framsiden og baksiden av HINS, laget ved hjelp av PyMol ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 3EXX). Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå.



Figur 4.7: Elektrostatisk overflatepotensial til fremsiden og baksiden av HINS (pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0). Negative regioner er farget røde, mens positive regioner er farget blå. Kalkuleringene ble gjort ved hjelp av APBS ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 3EXX). PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) ble benyttet som løsningsmiddel, med dielektrisk konstant $\epsilon_s = 80$. Proteinet ble behandlet med dielektrisk konstant $\epsilon_p = 10$. Fargepotensialskalaen ble satt til ± 4 kT/e.

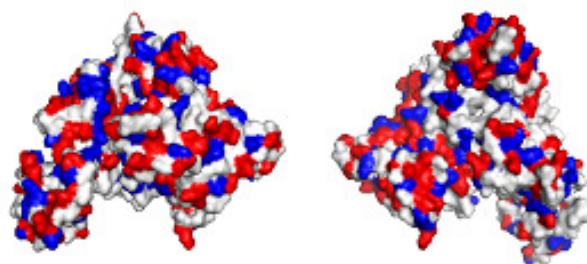
4.1.4 ALBUMIN

Figur 4.8 viser den teoretiske titerkurven til BSA og HSA, med proteinenes ladning ved pH 1 – 14. Figuren viser at titerkurvene er nesten identiske, med pI $\sim 5,5$. Dette samsvarer bra med deres observerte pI, som er omtrent 5 [93-95].

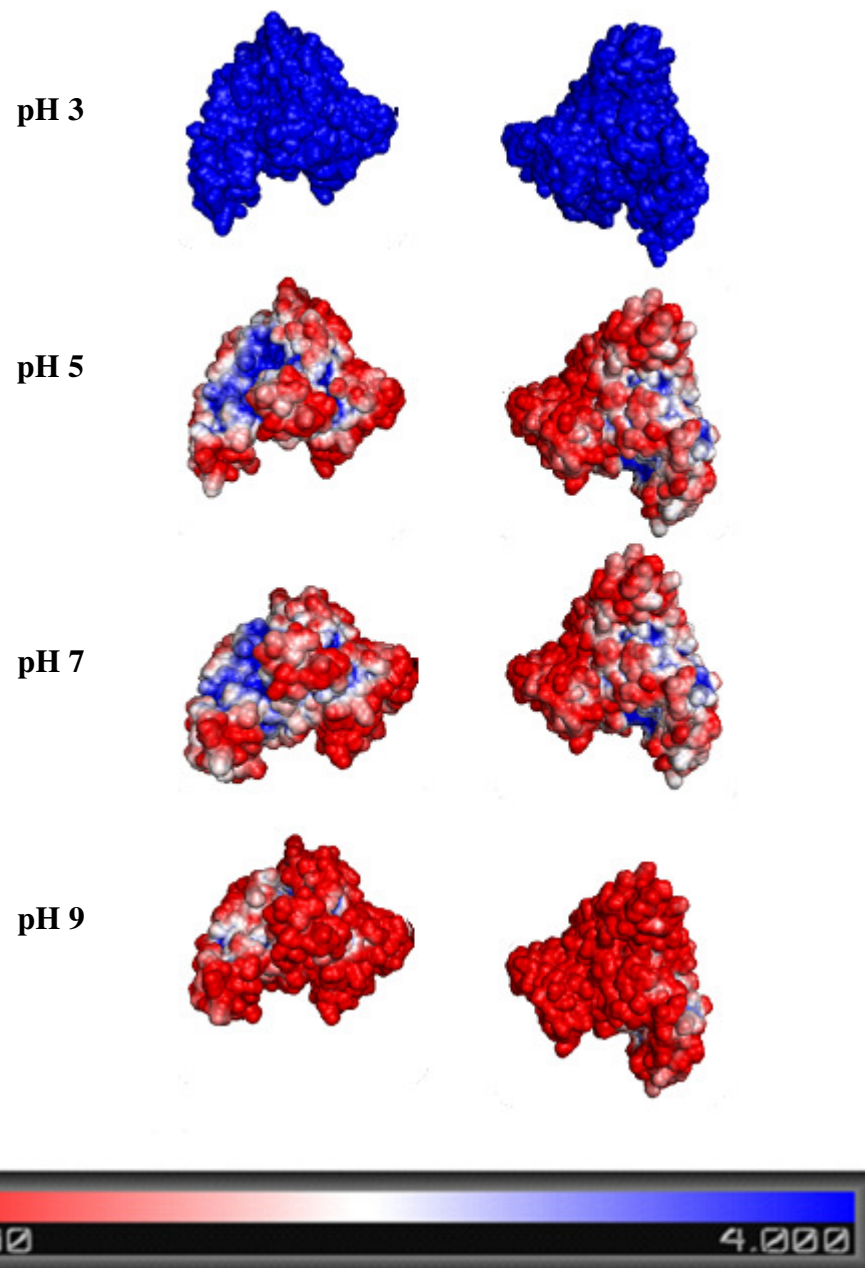


Figur 4.8: Teoretisk titerkurve til BSA og HSA (pH 1 – 14). Alle titerbare aminosyrer er tatt i betraktning, bortsett fra 34 cysteiner som danner disulfidbroer.

Figur 4.9 viser lokasjonen til potensielt ladde aminosyrer på fremsiden og baksiden til overflaten av HSA, mens Figur 4.10 viser bilde av proteinets elektrostatiske overflatepotensial ved pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 (fremsiden og baksiden). HSA har et negativt overflatepotensial ved pH 7, noe som korrelerer bra med dets titerkurve (ettersom $\text{pH} > \text{pI}$). Proteinene har allikevel en stor overflate ($M_w \approx 66,5\text{kDa}$, $R_G \approx 29,8\text{\AA}$) [26], med enkelte positive regioner selv ved $\text{pH} > \text{pI}$. Dette indikerer at elektrostatiske krefter kan ha innvirkning på en mulig interaksjon med alginat. BSA ble ikke modellert da det var vanskelig å finne PDB-fil for proteinet. BSA forventes å ha samme overflateelektrostatikk som HSA, ettersom proteinenes titerkurver er nesten identiske. For de andre proteinene var det i tillegg en sterk korrelasjon mellom titerkurve og elektrostatiske overflatepotensial. SIM-alignment av proteinene viser at deres aminosyresekvens er 76 % like.



Figur 4.9: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på fremsiden og baksiden av HSA, laget ved hjelp av PyMol ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 1E78). Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå.

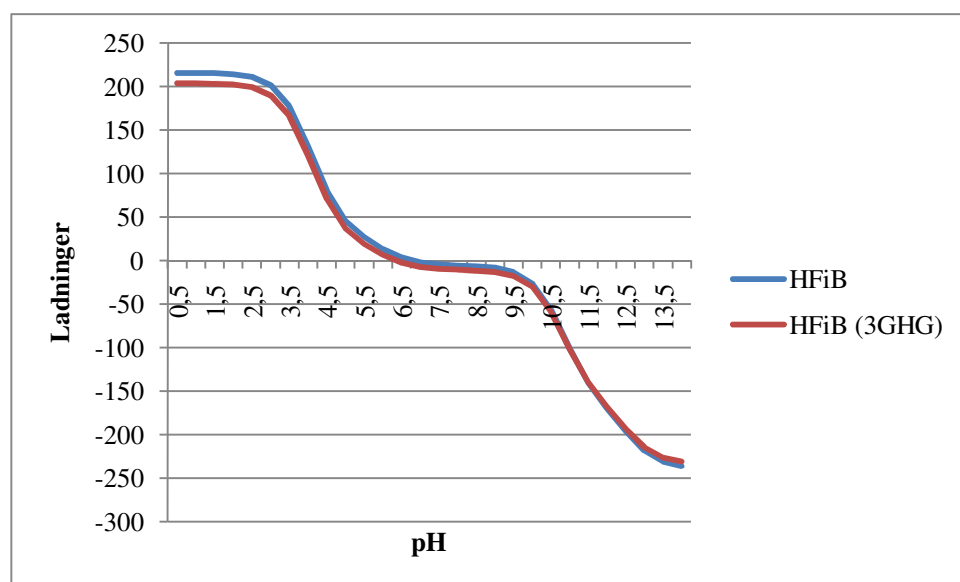


Figur 4.10: Elektrostatisk overflatepotensial til fremsiden og baksiden av HSA (pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0). Negative regioner er farget røde, mens positive regioner er farget blå. Kalkuleringene ble gjort ved hjelp av APBS ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 1E78). PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) ble brukt som løsningsmiddel, med dielektrisk konstant $\epsilon_s = 80$. Proteinet ble behandlet med dielektrisk konstant $\epsilon_p = 10$. Fargepotensialskalaen ble satt til $\pm 4 \text{ kT/e}$.

4.1.5 FIBRINOGEN

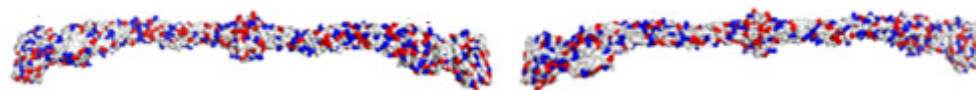
Figur 4.11 viser den teoretiske titerkurven til HFiB brukt i det eksperimentelle studiet av proteinets interaksjon med alginat, samt HFiB brukt ved modellering har proteinet (PDB

ID 3GHG), hvor α -kjeden er delvis protolysert⁵. Figuren viser at titerkurvene er like, med pI henholdsvis $\sim 6,8$ og $\sim 6,4$, noe som er litt høyere enn proteinets observerte pI på 5,4 [96].



Figur 4.11: Teoretisk titerkurve til HFiB brukt i det eksperimentelle studiet av proteinets interaksjon med alginat, og HFiB brukt ved modellering av proteinet (PDB ID 3GHG). Alle titerbare aminosyrer er tatt i betraktning, bortsett fra cysteinene som danner disulfidbroer.

Figur 4.12 viser lokasjonen til potensielt ladde aminosyrer på fremsiden og baksiden av overflaten til HFiB. Proteinets elektrostatiske overflatepotensial lot seg ikke modellere ved hjelp av APBS, mest sannsynlig på grunn av feil med modelleringsprogrammet. For de andre proteinene var det en sterk korrelasjon mellom proteinenes titerkurve og elektrostatiske overflatepotensial. Ut fra titerkurven til HFiB forventes proteinet derfor å være netto negativ ladet ved pH 7. Proteinets har en stor overflate ($M_w \approx 340\text{kDa}$, $R_G \approx 142\text{\AA}$) [26], og andre studier viser at HFiB har enkelte positive overflaterregioner selv ved $\text{pH} > \text{pI}$ [97]. Dette indikerer at elektrostatiske krefter kan ha betydning for en mulig interaksjon med alginat.



Figur 4.12: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på fremsiden og baksiden av HFiB, laget ved hjelp av PyMOL, ut fra kjent 3D-struktur (PDB ID 3GHG). Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå.

⁵ Fant ikke PDB-fil for HFiB uten protolysert α -kjede

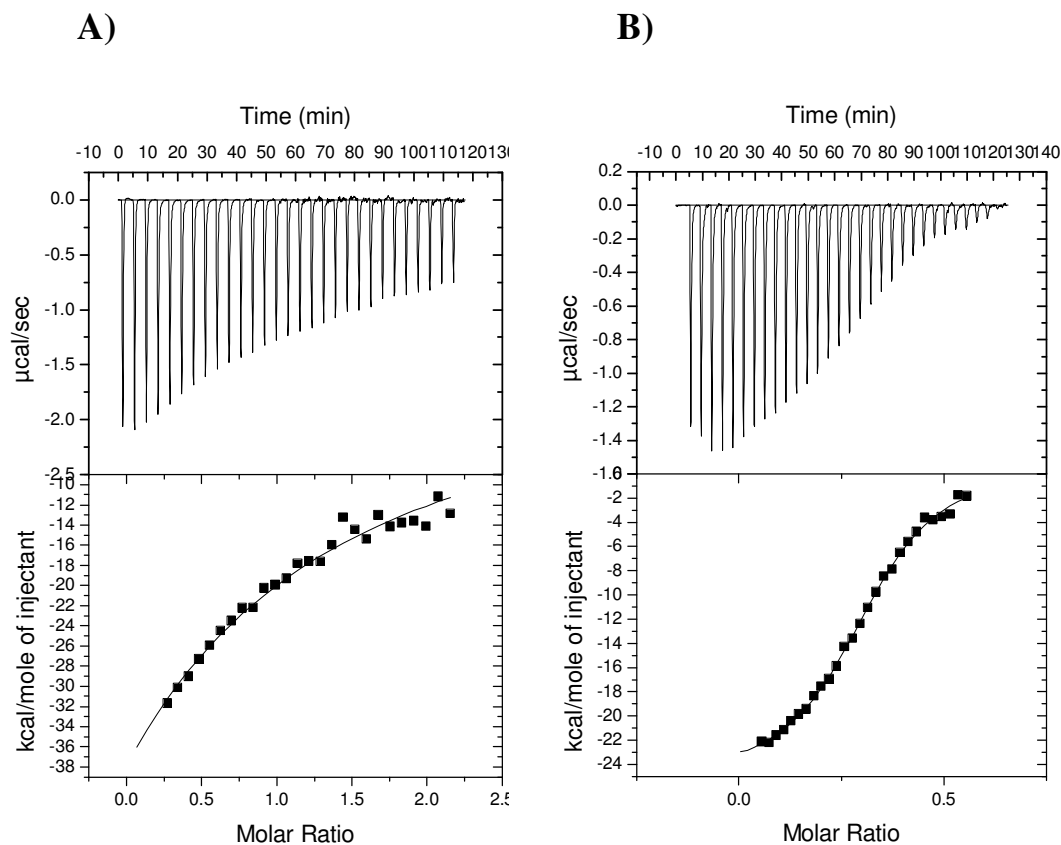
4.2 Interaksjon mellom proteiner og natriumalginat (ITC)

En løsning av alginat ble titrert i en løsning av protein, (HEL (lysozym fra høns), SINS (insulin fra svin), BINS (insulin fra okse), BSA (serum albumin fra okse), og HFiB (humant fibrinogen)), eller omvendt. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. De genererte termodiagrammene ble analysert av Origin 7.0 software (OriginLab Corporation). Støkiometri, ΔH og K_a ved interaksjon ble funnet ved å tilpasse de genererte dataene til en ett- eller flerseters bindingsmodell, ved hjelp av en 100-itereringsteknikk.

I termodiagrammene etter titreringene (Figur 4.13 – 4.16) representerer hver topp i det øverste bildet en injeksjon av titrant i cellekomponent. Det nederste bildet viser plottet av varme utviklet ved interaksjon, korrigert for fortynningsvarmen til titranten, mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent. Se Vedlegg D for rådata.

4.2.1 *LYSOZYM*

Figur 4.13 viser titreringen av HEL i alginat (A) og alginat i HEL (B). For begge titreringene ble de tre første injeksjonene av titrant i cellekomponent fjernet ved tilpassningen av dataene til en bindingsmodell. Dette ble gjort fordi rådataen etter titreringen viste unøyaktigheter i disse målingene. Titreringene ble tilpasset henholdsvis en ett- og toseters bindingsmodell, der den heltrukne linja i Figur 4.13 A og B (nederste bilde) viser den beste kurvetilpassninga. Interaksjonen mellom molekylene er eksoterm, da titerkurvene viser at varmetviklingen er negativ.



Figur 4.13: ITC-profil **A)** Titrering av HEL (0,19mM) i alginat (0,02mM). **B)** Titrering av alginat (0,24mM) i HEL (0,097mM). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel, og forsøket ble kjørt ved 25 °C. For A) og B) viser det øverste bildet rådata til en sekvensiell injeksjon av titrant (10 μl) i cellekomponent. Det nederste bildet viser plottet av varme utviklet ved titrering, korrigert for fortynningsvarmen til titranten, mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent. Dataen ble tilpasset en ett seters (HEL i alginat) og toseters (alginat i HEL) bindingsmodell, der den heltrukne linja viser den beste tilpasninga.

Tabell 4.1 viser de termodynamiske parametrene for titreringene. Det er verdt å merke seg den store usikkerheten som ligger i parametrene (spesielt for alginat titrert i HEL, bindingssete 1), noe som gjør kvantifisering av interaksjonen usikker. Resultatene er allikevel tatt med, ettersom de gir en viss beskrivelse av systemet ved interaksjon. Interaksjonen for titreringen av HEL i alginat drives av favoriserbar entalpi (ΔH er høy og negativ), mens entropien er ufavoriserbar (ΔS er høy og negativ). Bindingskonstanten viser at styrken på interaksjonen er moderat [62], mens bindingsstøkiometrien (n) viser at ett HEL binder to alginattråder. Dette samsvarer med en toseters bindingsmodell, noe som derfor ble brukt for titreringen av alginat i HEL. Resultatene fra titreringen av alginat i HEL viser at interaksjonen på bindingssete 1 er drevet av favoriserbar entalpi (ΔH_1 er høy og negativ), mens entropien er ufavorisert ($\Delta S_1 = 0$). Bindingsstøkiometrien (n_1), samt en negativ

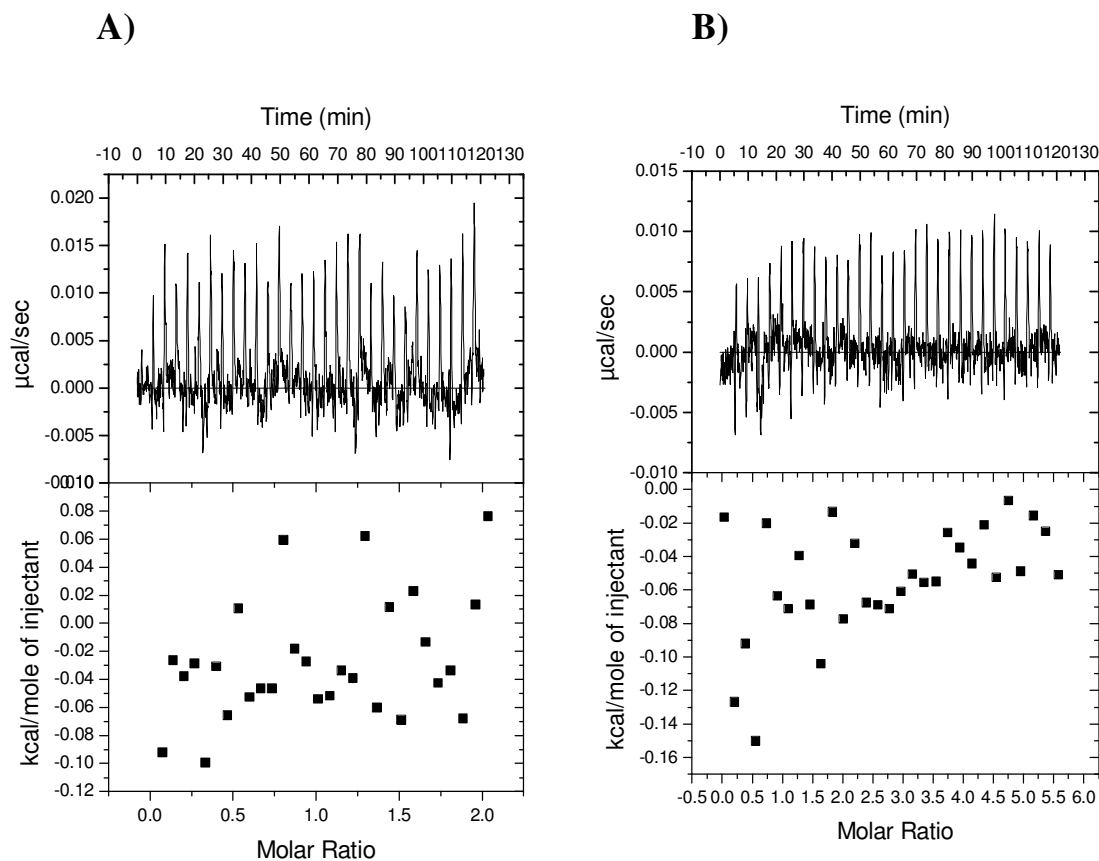
bindingskonstant (K_{a1}) tilsier at interaksjonen ikke er favorisert. Interaksjonen på bindingssete 2 er også drevet av favoriserbar entalpi (ΔH_2 er høy og negativ), mens entropien er ufavorisert (ΔS_2 er høy og negativ). Bindingskonstanten (K_{a2}) viser at styrken på interaksjonen er moderat [62], mens bindingsstøkiometrien (n_2) viser at én alginattråd binder to HEL. Det er signifikant forskjell på proteinets interaksjon med alginat på bindingssete 1 og 2, noe som tilsier at HEL har ett bindingssete som er mer favorisert i forhold til eventuelt andre. Begge titreringene viser at interaksjonen mellom molekylene er spontan ($\Delta G < 0$).

Tabell 4.1: Termodynamiske parametre for interaksjon mellom alginat og HEL (HEL titrert i alginat og alginat i HEL).

	ΔS [cal/ K·mol]	ΔH [cal·mol ⁻¹]	ΔG [cal·mol ⁻¹]	K_a [M ⁻¹]	n (titrant:celle.)
HEL i alginat	- 789	(- 2,4 ± 5,5) × 10 ⁵	(- 0,06 ± 5,50) × 10 ⁵	(2,0 ± 1,0) × 10 ⁴	0,5 ± 1,0
Alginat i HEL binding 1	0	- 5,0 × 10 ⁶ ± 2,0 × 10 ¹¹	- 5,0 × 10 ⁶ ± 2,0 × 10 ¹¹	- 26,0 ± 1,0 × 10 ⁵	0,1 ± 5,0 × 10 ³
Alginat i HEL binding 2	- 59,0	(- 2,5 ± 0,4) × 10 ⁴	(- 7,5 ± 4,0) × 10 ⁴	(3,0 ± 35) × 10 ⁶	0,4 ± 0,1

4.2.2 INSULIN

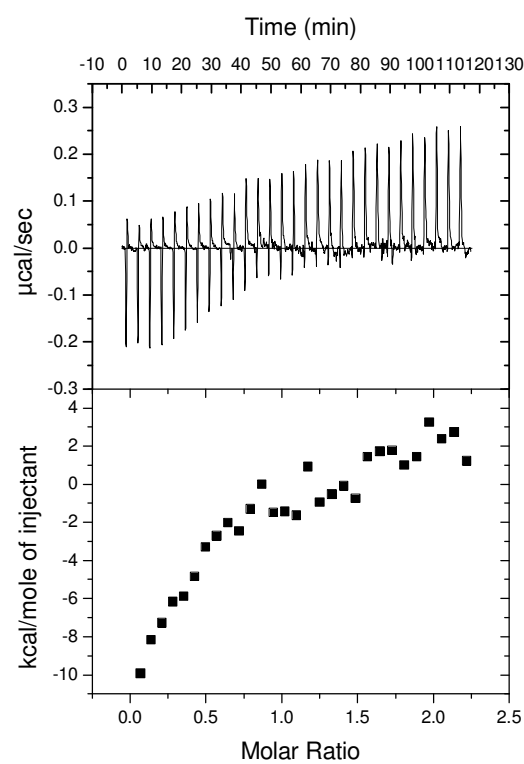
Figur 4.14 A) og B) viser titreringen av alginat i henholdsvis SINS og BINS. En svak varmeutvikling observeres, men den er neglisjerbar ettersom den er under sensitiviteten til kalorimetret (0,1µcal) [62]. Modelleringen av proteinenes elektrostatiske overflatepotensial viser at de har få positive overflateregioner ved pH 7,0 (Figur G.2 – G.3). Et fravær av elektrostatiske tiltrekkende krefter mellom molekylene, kan være en av årsakene til at proteinet ikke interagerer med alginat.



Figur 4.14: ITC-profil. **A)** Titrering av alginat (0,67mM) i SINS (0,074mM). **B)** Titrering av alginat (0,67mM) i BINS (0,027mM). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel, og forsøketne ble kjørt ved 25 °C. For A) og B) viser det øverste bildet rådata for en sekvensiell injeksjon av titrant (10µl) i cellekomponent. Det nederste bildet viser plottet av varme utviklet ved titrering, korrigert for fortynningsvarmen til titranten, mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent. En neglisjerbar varmeutvikling observeres.

4.2.3 ALBUMIN

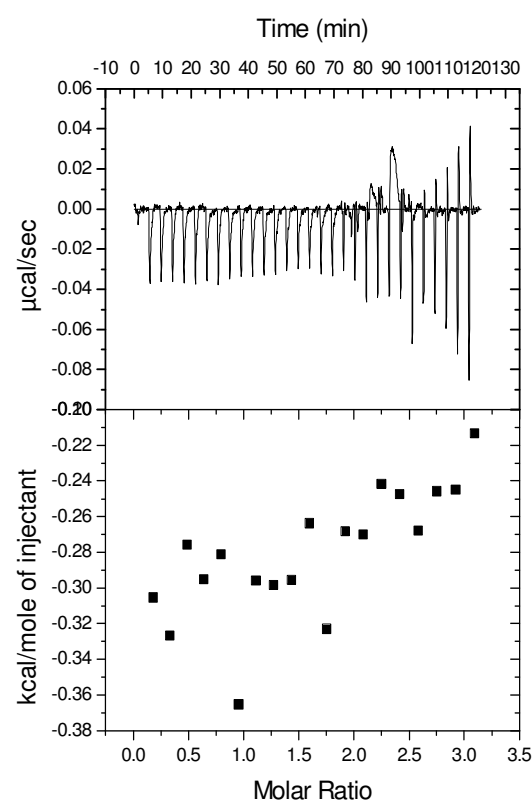
Figur 4.15 viser titreringen av BSA i alginat. Dataene lot seg vanskelig tilpasse en spesifikk bindingsmodell, da det ga termodynamiske parametre med stor usikkerhet. Resultatene viser at BSA interagerer svakt med alginat. Interaksjonen virker å være uspesifikk og tilfeldig, noe som kan forklares ut fra titreringens positive og negative varmeutvikling. Modelleringen av proteinets elektrostatiske overflatepotensial viser at det er netto negativt ladet ved pH 7,0 (Figur 4.10). Det har allikevel enkelte positive overflateregioner, noe som indikerer at elektrostatiske krefter kan ha betydning for den observerte interaksjonen. At proteinet har enkelte positive overflateregioner med mulighet for interaksjon med alginat, korrelerer bra med den svake og tilfeldige interaksjonen som ble observert.



Figur 4.15: ITC-profil. Titrering av BSA (0,2mM) i alginat (0,02mM). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel, og forsøket ble kjørt ved 25 °C. Det øverste bildet viser rådata for en sekvensiell injeksjon av titrant (10 μ l) i cellekomponent. Det nederste bildet viser plottet av varme utviklet ved titrering, korrigert for fortynningsvarmen til titranten, mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent. Figuren viser at det skjer en interaksjon mellom molekylene, men dataen gir ingen god kurvetilpasning.

4.2.4 FIBRINOGEN

Figur 4.16 viser titreringen av alginat i HFiB. Oppløsningen av HFiB i PBS gav mye luftbobler, som var vanskelig å fjerne før titrering til tross for degassing i én time. De siste injeksjonene i Figur 4.16 viser unøyaktige målinger på grunn av luftboblene, og ble derfor ikke tatt med i det nederste plottet. Figuren viser at det er en svak interaksjon mellom HFiB og alginat, svakere enn for interaksjonen mellom BSA og alginat (Figur 4.15). De kalorimetriske dataene er for små til å bli tilpasset en bindingsmodell. Ut fra proteinets titerkurve er HFiB netto negativt ladet ved pH 7,0 (Figur 4.11). Tidligere studier viser at proteinet har enkelte positive overflaterregioner [97], noe som indikerer at elektrostatiske krefter kan ha betydning for den svake interaksjonen som ble observert.



Figur 4.16: ITC-profil. Titrering av alginat (0,67mM) i HFiB (0,031mM). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel, og forsøket ble kjørt ved 25 °C. Det øverste bildet viser rådata for en sekvensiell injeksjon av titrant (10 μ l) i cellekomponent. Det nederste bildet viser plottet av varme utviklet ved titrering, korrigert for fortynningsvarmen til titranten, mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent. Figuren viser at det er en svak interaksjon mellom molekylene, men dataen gir ingen god kurvetilpasning.

4.3 Interaksjon mellom proteiner og alginatkuler

Adsorpsjon av alexamerkede proteiner, (HEL (lysozym fra høns), HML (humant lysozym), HSA (humant serum albumin) og HFiB (humant fibrinogen)), til overflaten av alginatkuler ble kvantifisert ved fluorescensmålinger på mikroplateleser (se Vedlegg E for beregninger). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Visualisering av proteinbindingen ble gjort på KLSM. Det viser optiske snitt gjennom ekvator på kulene, og fluorescensintensiteten mellom bilder av samme protein kan sammenlignes, ettersom settingene på KLSM var like. Visualiseringen gir ikke et kvantitativt mål på proteinbinding. FITC-merket antistoff ble brukt for bedre visualisering av adsorbent HML og HFiB til alginatkuler. Uspesifikk binding av FITC-merket antistoff til alginatkuler ble kontrollert ved å inkubere kulene i antistoff, uten protein til stedet.

For å unngå uspesifikk proteinbinding til brønnplater brukt ved fluorescensmålinger på plateleseren, ble platene vasket med BSA. For å avdekke uspesifikk proteinbinding til nuncrør som alginatkulene ble oppbevart i, ble kuler (for HSA og HFiB) preinkubert i BSA. Dette ble også gjort da det var ønskelig å undersøke om preinkuberingen reduserte en sekundær proteinbinding.

Adsorpsjon av umerket protein (HEL, HML og HSA) til alginatkuler ble kvantifisert ved absorbansmålinger (A_{280}) på nanodrop spektrofotometer (se Vedlegg C). NaCl (0,9 %) med CaCl_2 (2mM) (pH 7,4, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel for HEL og HML, mens PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel for HSA. For HEL og HSA ble kuler preinkubert i BSA.

På nanodrop og plateleseren ble mengde protein (mM) bundet til alginatkuler målt som tap av protein etter inkubering med 30 alginatkuler, i én time. Eksperimentelle betingelser (pH og ionestyrke) ved de to metodene var i tillegg like. Kvantifisert proteinbinding på nanodrop og plateleser er derfor sammenlignbare. (Forsøkene ble kun gjort i én parallell, og er dermed ikke blitt reproduisert).

4.3.1 *LYSOZYM*

Kvantifisering av proteinbinding

Tabell 4.2 viser mengde bundet fluorescensmerket lysozym (HML og HEL) til alginatkuler etter inkubering av protein med alginatkuler, kvantifisert på plateleser. Ettersom standardkurven for HML bare var lineær opp til 0,1 mg/ml (se Vedlegg E) ble det ikke beregnet proteinbinding for konsentrasjoner over dette. Hvorfor standardkurven ikke var lineær er uklart, da standardkurven til HEL (med samme fluorescenskonsentrasjon som HML) var lineær i hele konsentrasjonsområdet. Resultatene fra plateleseren viser at fluorescensmerket HEL og HML binder alginatkulene i forholdsvis like stor grad, med økende binding for økende konsentrasjoner. Vask av brønnplater med BSA gjorde at litt mindre HEL og HML ble kvantifisert bundet til kulene. BSA påvirket allikevel ikke fluorescensmålingene i stor grad, noe som indikerer at uspesifikk proteinbinding til brønnplater skjer i liten grad.

Tabell 4.2: Binding av alexamerket lysozym (mM) til alginatkuler (30 stykk), med og uten vask av brønnplater med BSA, kvantifisert på plateleser. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel.

Utgangskonsentrasjon HEL og HML (mM)	$1,7 \cdot 10^{-3}$ (0,025 mg/ml)	$3,4 \cdot 10^{-3}$ (0,05 mg/ml)	$6,9 \cdot 10^{-3}$ (0,1 mg/ml)	$1,4 \cdot 10^{-2}$ (0,2 mg/ml)
Bundet, merket HML (mM) (u/BSA)	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	-
Bundet, merket HML (mM) (m/BSA)	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-3}$	-
Bundet, merket HEL (mM) (u/BSA)	$9,8 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$
Bundet, merket HEL (mM) (m/BSA)	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-3}$

Tabell 4.3 og 4.4 viser mengde bundet umerket lysozym til alginatkuler etter inkubering av protein med alginatkuler, kvantifisert på nanodrop. Det kan synes som om mindre HML binder alginatkulene ved målingene på nanodrop i forhold til plateleseren, (en tiendedel umerket sammenlignet med merket HML). Dette kan forklares ved at nanodrop har en usikkerhet på $\pm 6,9 \cdot 10^{-3}$ mM ($\pm 0,1$ mg/ml), noe som gjør de målte bindingsverdiene for HML usikre. For HEL korrelerer målingene på nanodrop bra med målingene på plateleseren, ettersom en økende proteinbinding for økende konsentrasjoner observeres. (Konsentrasjonene av umerket HEL var høyere enn konsentrasjonene av merket HEL). Preinkubering av alginatkulene i BSA ga redusert binding av HEL for høye konsentrasjoner av HEL (> 2 mg/ml).

Tabell 4.3: Binding av umerket HML (mM) til alginatkuler (30 stykk) kvantifisert på nanodrop. NaCl (0,9 %) med CaCl_2 (2mM) (pH 7,4, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel.

Utgangskonsentrasjon HML (mM)	$1,7 \cdot 10^{-3}$ (0,025 mg/ml)	$3,4 \cdot 10^{-3}$ (0,05 mg/ml)	$6,9 \cdot 10^{-3}$ (0,1 mg/ml)	$1,4 \cdot 10^{-2}$ (0,2 mg/ml)
Bundet, umerket HML (mM) (u/BSA)	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$

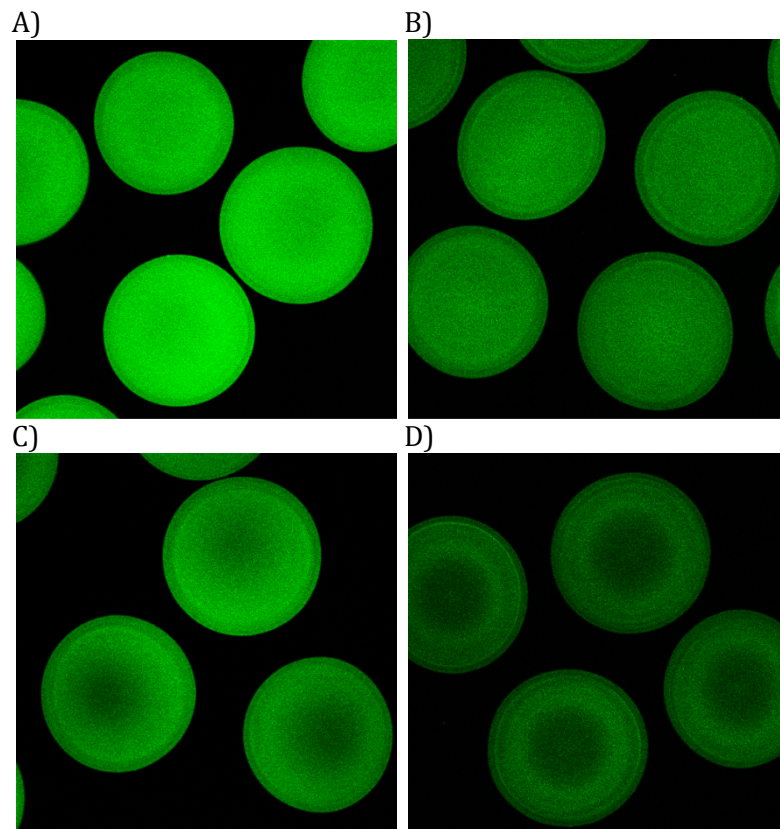
Tabell 4.4: Binding av umerket HEL (mM) til alginatkuler (30 stykk), med og uten preinkubering av alginatkuler i BSA, kvantifisert på nanodrop. NaCl (0,9 %) med CaCl₂ (2mM) (pH 7,4, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel.

Utgangskonsentrasjon HEL (mM)	$1,7 \cdot 10^{-3}$ (0,25 mg/ml)	$3,4 \cdot 10^{-2}$ (0,5 mg/ml)	$6,9 \cdot 10^{-2}$ (1,0 mg/ml)	$1,4 \cdot 10^{-1}$ (2,0 mg/ml)	$2,7 \cdot 10^{-1}$ (4,0 mg/ml)	$5,6 \cdot 10^{-1}$ (8,0 mg/ml)
Bundet, umerket HEL (mM) (u/BSA)	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$4,9 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$3,1 \cdot 10^{-2}$	$4,5 \cdot 10^{-2}$
Bundet, umerket HEL (mM) (m/BSA)	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$4,2 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$

Visualisering av proteinbinding

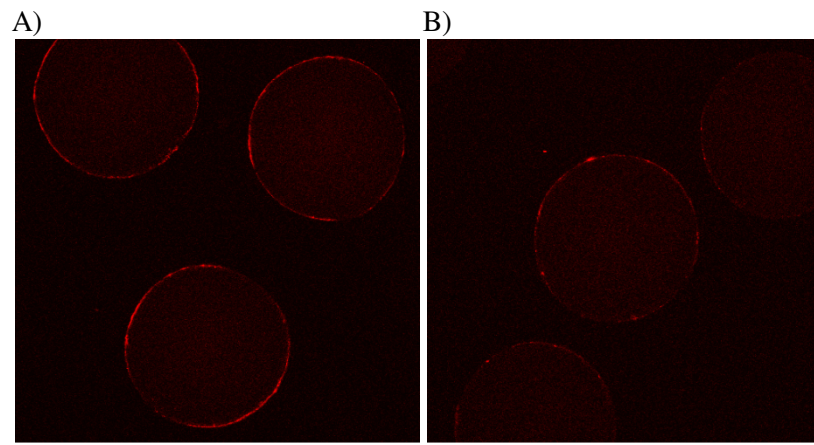
Fluorescensmerket HML bundet til alginatkuler ble ikke detektert på KLSM. Monoklonalt FITC-merket antistoff til HML ble derfor tilsatt for å øke signalet på proteinbindingen, men dette ga heller ingen visualisering på KLSM. At binding av merket HML ikke ble detektert på KLSM samsvarer ikke med målingene på plateleseren, som viste at proteinet binder alginatkulene (Tabell 4.2).

Figur 4.17 viser binding av umerket HML til alginatkuler (med samme proteinkonsentrasjoner som fluorescensmerket HML), visualisert med FITC-merket antistoff til HML på KLSM. Proteinene binder alginat på kuleoverflaten og inni kulene, og det er en tydelig intensitetsøkning med økende proteinkonsentrasjon. Dette viser at HML binder alginatkulene. (Ingen signal ble observert for kuler inkubert i FITC-merket antistoff til HML, uten HML tilstede).



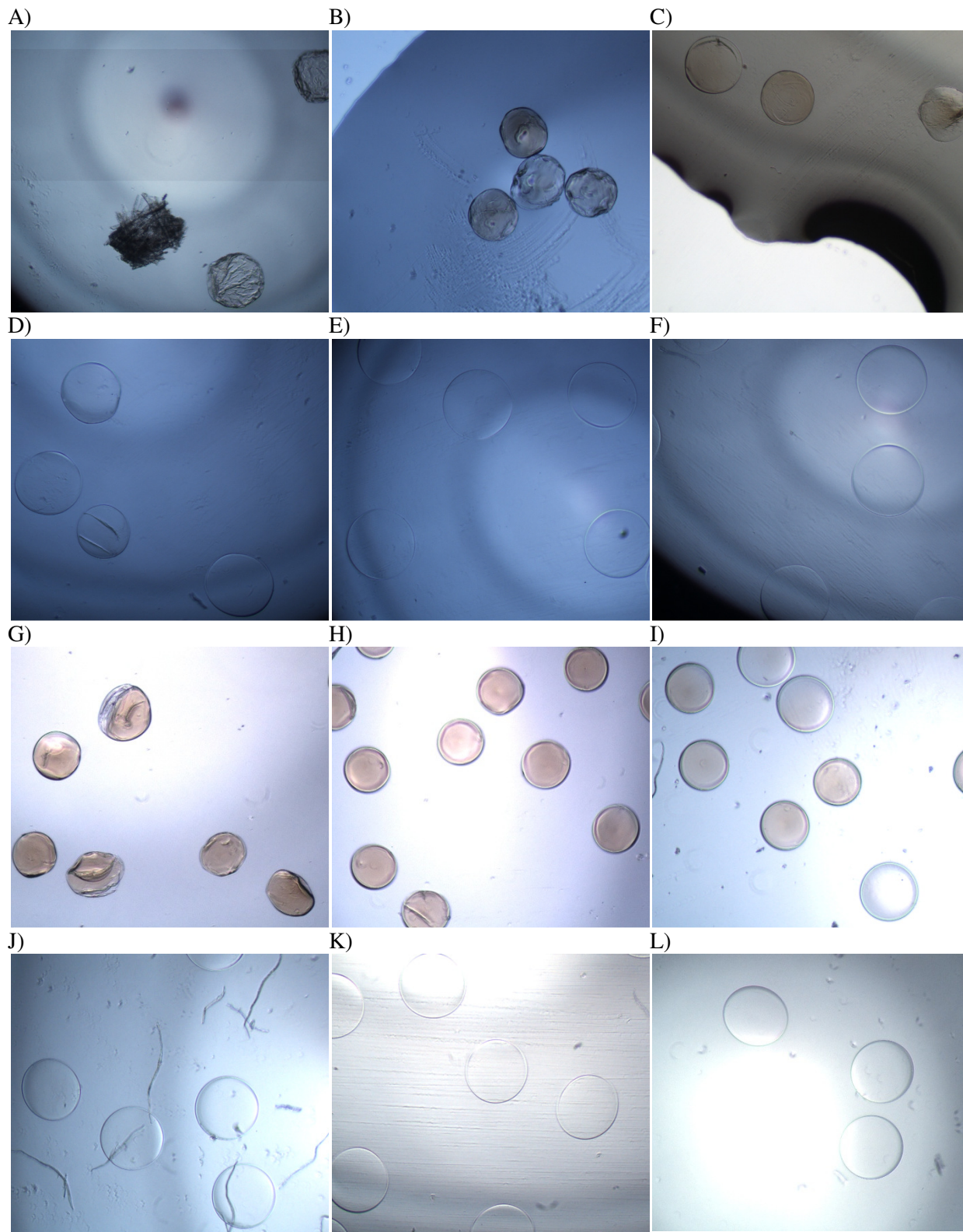
Figur 4.17: Binding av umerket HML til alginatkuler, visualisert med FITC-merket antistoff til HML på KLSM. Proteinkonsentrasjoner: A) 0,2, B) 0,1, C) 0,05, og D) 0,025 mg/ml. NaCl (0,9 %) med CaCl_2 (2mM) (pH 7,4, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Bildene viser optiske snitt gjennom ekvator på kulene, og kulene er forstørret 100x. (Visualisert på Zeiss LSM 510).

Figur 4.18 viser binding av fluorescensmerket HEL til alginatkuler visualisert på KLSM. Proteinet binder svakt til kuleoverflaten ved høye proteinkonsentrasjoner (0,2 og 0,1 mg/ml). Merkingegraden til HEL med alexa var bare 0,38, slik at figuren ikke gir et fullstendig bilde på interaksjonen. Hvorfor fluorescensmerket HEL men ikke HML ble detektert på KLSM er uklart, ettersom kvantifiseringen av proteinbinding på plateleseren (Tabell 4.2) viser at de binder alginatkulene i like stor grad.



Figur 4.18: Binding av alexamerket HEL til alginatkuler visualisert på KLSM. Proteinkonsentrasjoner: A) 0,2 og B) 0,1 mg/ml. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Bildene viser optiske snitt gjennom ekvator på kulene, og kulene er forstørret 100x. (Visualisert på Zeiss LSM 510).

Figur 4.19 viser bindingen av umerket HEL (med og uten preinkubering av alginatkuler i BSA) visualisert i lysmikroskop. Figuren viser en tydelig binding av HEL til overflaten av kulene, med kulekollapser ved høye proteinkonsentrasjoner. Preinkuberingen av kulene i BSA ga mindre synelig proteinbinding på kuleoverflaten. Dette samsvarer med den kvantifiserte proteinbindingen på nanodrop (Tabell 4.4).



Figur 4.19: Binding av umerket HEL til alginatkuler visualisert i lysmikroskop. De seks øverste bildene viser kuler preinkubert i BSA, med proteinkonsentrasjoner: A) 8,0, B) 4,0, C) 2,0, D) 1,0, E) 0,5 og F) 0,25 mg/ml. De seks nederste bildene viser kuler ikke preinkubert i BSA, med proteinkonsentrasjoner: G) 8,0, H) 4,0, I) 2,0, J) 1,0, K) 0,5, og L) 0,25 mg/ml. NaCl (0,9 %) med CaCl_2 (2mM) (pH 7,4, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Kulene er forstørret 40x. (Visualisert i Nikon ECLIPSE TS100)

4.3.2 ALBUMIN

Kvantifisering av proteinbinding

Tabell 4.5 viser mengde bundet fluorescensmerket HSA til alginatkuler etter inkubering av protein med alginatkuler, kvantifisert på plateleser. Ettersom standardkurven til HSA bare var lineær opp til 25,0 mg/ml (se Vedlegg E), ble det ikke beregnet bindingsverdier for konsentrasjoner over dette. Resultatene fra plateleseren viser at HSA binder alginatkulene, men i mindre mengde enn lysozym selv om utgangskonsentrasjonen til HSA var høyere enn lysozym. Det er store svingninger i proteinbinding ved de laveste konsentrasjonene, noe som setter spørsmålsteget ved målingene. Preinkubering av kulene i BSA påvirket fluorescensmålingene i liten grad, noe som tyder på at en uspesifikk proteinbinding til nuncrør ikke forekommer.

Tabell 4.5: Binding av alexamerket HSA (mM) til alginatkuler (30 stykk), med og uten preinkubering av alginatkuler i BSA, kvantifisert på plateleser. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel.

Utgangskonsentrasjon HSA (mM)	0,015 (1,0 mg/ml)	0,075 (5,0 mg/ml)	0,15 (10,0 mg/ml)	0,34 (25,0 mg/ml)	0,75 (50,0 mg/ml)
Bundet, merket HSA (mM) (u/BSA)	$3,5 \cdot 10^{-3}$	(negativ binding)	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-3}$	-
Bundet, merket HSA (mM) (m/BSA)	$3,8 \cdot 10^{-3}$	(negativ binding)	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-2}$	-

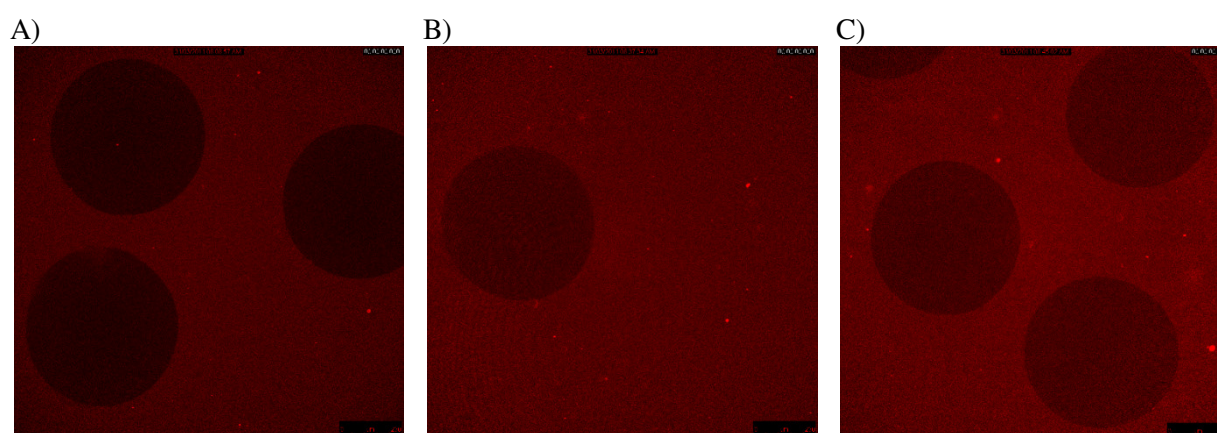
Tabell 4.6 viser mengde bundet umerket HSA til alginatkuler etter inkubering av protein med alginatkuler, kvantifisert på nanodrop. Resultatene viser at HSA binder kulene, med økende proteinbinding for økende konsentrasjoner. Målingene har en usikkerhet på $\pm 1,5 \cdot 10^{-3}$ mM ($\pm 0,1$ mg/ml), noe som gjør de laveste målte bindingsverdiene usikre. Det kan synes som om mer HSA binder alginatkulene ved målingene på nanodrop i forhold til plateleseren. Preinkubering av alginatkulene i BSA påvirket målingene på nanodrop i liten grad, noe som tyder på at uspesifikk proteinbinding til nuncrør ikke forekommer.

Tabell 4.6: Binding av umerket HSA (mM) til alginatkuler (30 stykk), med og uten preinkubering av alginatkuler i BSA, kvantifisert på nanodrop. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel.

Utgangskonsentrasjon HSA (mM)	0,015 (1,0 mg/ml)	0,075 (5,0 mg/ml)	0,15 (10,0 mg/ml)	0,34 (25,0 mg/ml)	0,75 (50,0 mg/ml)
Bundet, umerket HSA (mM) (u/BSA)	0,0	0,0	$6,0 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$
Bundet, umerket HSA (mM) (m/BSA)	0,0	$6,0 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-2}$

Visualisering av proteinbinding

Figur 4.20 viser binding av fluorescensmerket HSA til alginatkuler visualisert på KLSM. Bildene viser lite eller ingen proteinbinding til overflaten av kulene. For de høyeste proteinkonsentrasjonene (vist i Figur 4.20) var fluorescenssignalet høyere på utsiden i forhold til innsiden av kulene, noe som tyder på at proteinet ikke entrer kulene. Preinkubering av kulene i BSA ga ikke stor forskjell i synelig proteinbinding på KLSM, noe som samsvarer bra med resultatene fra plateleseren (Tabell 4.5). Ettersom proteinet ble fortynnet med umerket HSA (se Tabell 3.5 i Materialer og Metoder) gir ikke bildene en fullstendig visualisering av proteinbindingen. Det ble ikke gjort forsøk med FITC-merket antistoff til HSA, da det var vanskelig å få tak i.



Figur 4.20: Binding av alexamerket HSA til alginatkuler visualisert på KLSM. Proteinkonsentrasjoner: A) 50 mg/ml (kuler preinkubert i BSA), B) 50 mg/ml (kuler ikke preinkubert i BSA), og C) 25 mg/ml (kuler ikke preinkubert i BSA). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Bildene viser optiske snitt gjennom ekvator på kulene, og kulene er forstørret 100x. (Visualisert i Leica TCS SP5).

4.3.3 FIBRINOGEN

Kvantifisering av proteinbinding

Tabell 4.7 viser mengde bundet fluorescensmerket HFiB til alginatkuler etter inkubering av protein med alginatkuler, kvantifisert på plateleser. Resultatene viser at det

skjer en svak proteinbinding (svakere enn HSA). Det er ikke stor forskjell på proteinbinding med og uten preinkubering av alginatkuler i BSA, noe som tyder på at en uspesifikk proteinbinding til nuncrør ikke forekommer.

Tabell 4.7: Binding av alexamerket HFiB (mM) til alginatkuler (30 stykk), med og uten preinkubering av kulene BSA, kvantifisert på plateleser. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel.

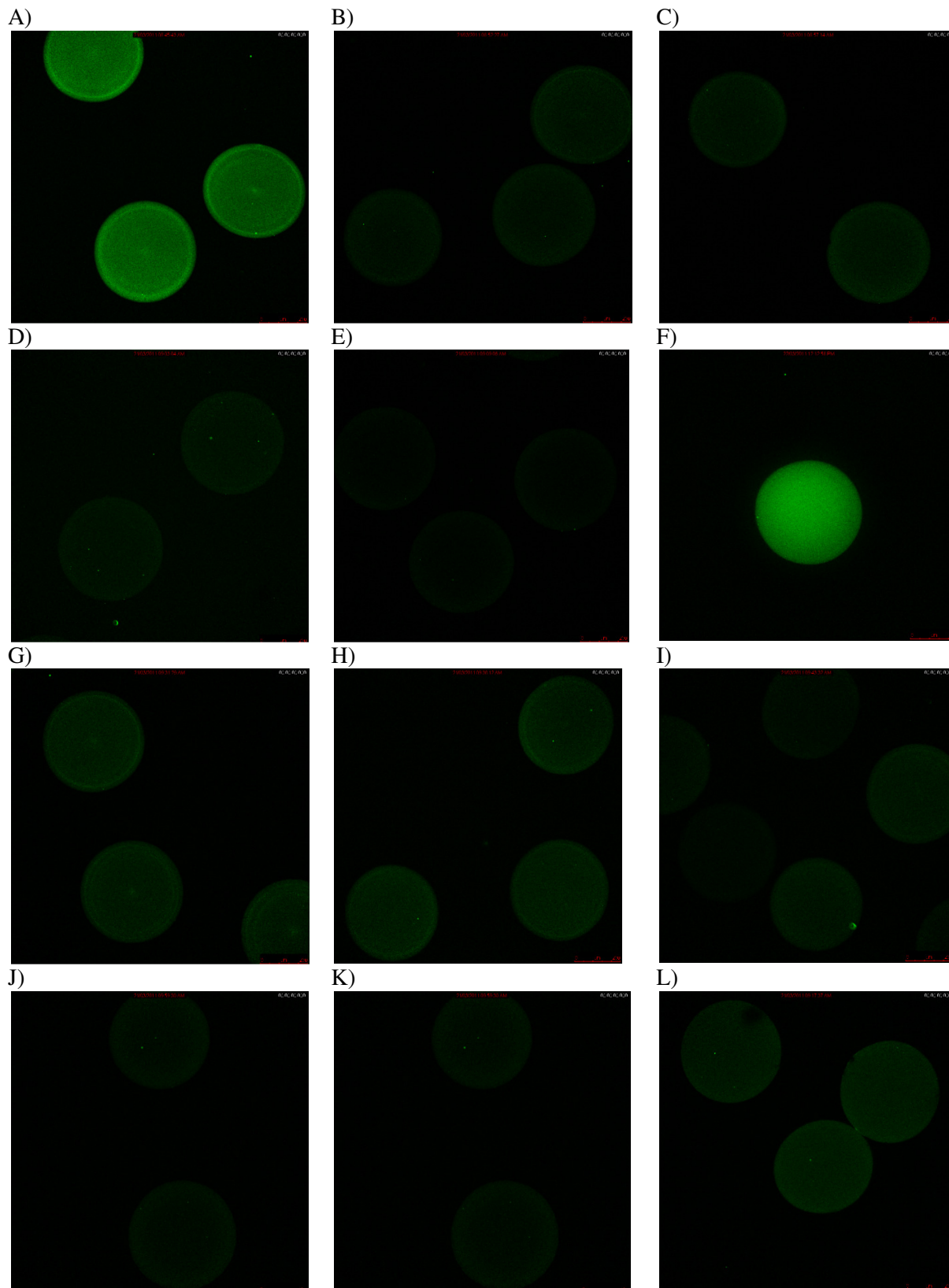
Utgangskonsentrasjon HFiB (mM)	$1,5 \cdot 10^{-4}$ (0,025 mg/ml)	$3,0 \cdot 10^{-3}$ (0,5 mg/ml)	$6,1 \cdot 10^{-3}$ (1,0 mg/ml)	$1,2 \cdot 10^{-2}$ (2,0 mg/ml)	$1,8 \cdot 10^{-2}$ (3,0 mg/ml)
Bundet, HFiB (mM) (u/BSA)	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$4,2 \cdot 10^{-4}$	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$
Bundet, HFiB (mM) (m/BSA)	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$4,9 \cdot 10^{-4}$	$3,6 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$

Visualisering av proteinbinding

Fluorescensmerket HFiB bundet til alginatkuler ble ikke detektert på KLSM. Dette kan skyldes for lav konsentrasjon fluorescensmerket HFiB, ettersom proteinet ble fortynnet med umerket HFiB (se Tabell 3.5 i Materialer og Metoder). Polyklonalt FITC-merket antistoff til HFiB ble tilsatt for å øke signalet på proteinbindingen på KLSM. Figur 4.21 viser resultatet etter bindingen. For kuler preinkubert i BSA, har kuler inkubert i anti-HFiB uten HFiB til stedet det høyest fluorescenssignalet. Det indikerer at antistoffet binder uspesifikt til BSA, noe som er sannsynlig ettersom antistoffet til HFiB (fra sau) er fra en annen art enn BSA (okse). Fluorescensintensiteten synker med synkende konsentrasjoner av HFiB, noe som indikerer at bindingen av antistoff også påvirkes av konsentrasjonen av HFiB.

For kuler som ikke var preinkubert i BSA, er fluorescensintensiteten for alle konsentrasjoner av HFiB (samt kuler inkubert i anti-HFiB uten HFiB tilstede) relativt like, men lavere enn for kuler preinkubert i BSA. At kuler inkubert i anti-HFiB uten HFiB tilstede gir fluorescenssignal, viser at antistoffet også binder uspesifikt til selve alginatkulene.

Ut fra visualiseringen på KLSM er det vanskelig å anslå om HFiB binder alginatkulene, på grunn av uspesifikk antistoffbinding til BSA og alginatkuler. Resultatene fra plateleseren viser allikevel at proteinet binder svak til kulene.



Figur 4.21: Binding av alexamerket HFIB til alginatkuler, visualisert med FITC-merket antistoff til HFIB på KLSM. De seks øverste bildene viser kuler preinkubert i BSA, med proteinkonsentrasjoner: A) 3,0, B) 2,0, C) 1,0, D) 0,5 og E) 0,025 mg/ml, og F) blank. De seks nederste bildene viser kuler som ikke var preinkubert i BSA, med proteinkonsentrasjoner: G) 3,0, H) 2,0, I) 1,0, J) 0,5 og K) 0,025 mg/ml, og L) blank. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Bildene viser optiske snitt gjennom ekvator på kulene, og kulene er forstørret 100x. (Visualisert i Leica TCS SP5).

DEL 5 DISKUSJON

5.1 Karakterisering av alginat – protein interaksjoner

5.1.1 LYSOZYM

Interaksjon med natriumalginat i løsning

De termodynamiske parametrene for interaksjonen mellom HEL (lysozym fra høns) og alginat ble undersøkt ved ITC, som måler varme absorbert eller frigitt ved interaksjon. Figur 4.13 A) og B) viser henholdsvis termodiagrammet for en titrering av HEL i alginat, og omvendt. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Resultatene viser at det er en klar interaksjon mellom molekylene, men kvantifisering var vanskelig på grunn av stor usikkerhet i måleverdiene. Resultatene er allikevel tatt med, da de gir en viss beskrivelse av systemet ved interaksjon. At HEL interagerer med alginat ved ITC korrelerer bra med proteinets elektrostatiske positive overflatepotensial ved pH 7,0 (Figur F.1, Vedlegg F), som indikerer at det virker elektrostatiske tiltrekkende krefter mellom molekylene. Tidligere studier viser i tillegg at proteinet interagerer med alginat [98].

Dataene etter titreringen av HEL i alginat ble tilpasset en ettseters bindingsmodell (Figur 4.13 A), men resultatene indikerer at proteinet har to bindings seter for alginat ($n=0,5$, se Tabell 4.1). Dataene etter titreringen av alginat i HEL ble derfor tilpasset en toseters bindingsmodell (Figur 4.13 B). Dette ga heller ingen tydelig svar på bindingsforholdet mellom molekylene, men det ser ut som om proteinet har ett bindings sete som er mer favorisert i forhold til eventuelt andre, ettersom det er signifikant forskjell på interaksjonen mellom HEL og alginat på bindings sete 1 og 2 (se Tabell 4.1). Ut fra lysozyls katalytiske rolle *in vivo*, som er å kutte bindinger mellom sukkerringe [24, 25], er det naturlig å tro at proteinets aktive sete er det favoriserte bindingssetet for alginat. HEL's elektrostatiske overflatepotensial viser at proteinet har flere positive overflateregioner med mulighet for interaksjon med alginat (Figur F.1). Det er derfor vanskelig å fastslå om det aktive setet er det favoriserte bindingssetet for alginat. At HEL ikke ser ut til å ha ett spesifikt bindings sete for alginat, forklarer vanskelighetene som var med og tilpasse titreringene til én enkelt bindingsmodell.

Det at bindingsstøkiometrien (n) ikke er heltall tyder i tillegg på unøyaktige konsentrasjonsberegninger [99]. Nøyaktige konsentrasjoner av titrant og cellekomponent er viktig for bestemmelse av de termodynamiske parametrene og K_a , ettersom varme utviklet eller absorbert ved interaksjon er proporsjonal med mengde bundet ligand [62, 65]. Én

feilkilde i forhold til konsentrasjonsberegningene er alginatets vanninnhold, som (etter frysetørking, samt tørking av alginat i eksikator) ble anslått å være 10 %. Alginatkonsentrasjonene ble i tillegg beregnet ut fra \overline{DP}_n til syrehydrolysert alginat (funnet ved H^1 NMR), der DP ble rundet av til nærmeste heltall. Proteinkonsentrasjoner ble kalkulert ut fra absorbansmålinger (A_{280}) på nanodrop spektrofotometer (ND-1000), som har en usikkerhet på $\pm 0,1$ mg/ml. Proteinets ekstensjonskoeffisient brukt i konsentrasjonsberegningene ble funnet ut fra dets aminosyresekvens, ved hjelp av ProtParam på ExPASy Proteomic Server [100]. Ekstensjonskoeffisienten er teoretisk og nødvendigvis ikke nøyaktig, noe som vil kunne påvirke konsentrasjonsberegningene. Nøyaktige absorbansmålinger på nanodrop tar utgangspunkt i at proteinprøven er representativ for hele prøvevolumet. For å minimere feilkilden ble gjennomsnittet av tre prøver tatt fra ulike plasser i løsningen.

En annen faktor som har bidratt til de usikre resultatene er forholdet mellom konsentrasjonen av titrant og cellekomponent ved titrering. For å oppnå en komplett bindingsisoterm burde titranten være 10 – 20 ganger høyere enn cellekomponenten. Dette er nødvendig for å oppnå fullstendig titrering (metning av cellekomponenten med titrant), som er viktig ved bestemmelse av de termodynamiske parametrene og K_a (se Figur 1.8 i Introduksjon) [62, 63]. For HEL titrert i alginat var konsentrasjonen av HEL ti ganger høyere enn alginat (Tabell 3.4). Titrerkurven viser allikevel at det ikke er metning mellom molekylene (Figur 4.14 A), noe som betyr at det var for lite titrant tilstede i forhold til antall bindingssteder hos alginat. For alginat titrert i HEL var konsentrasjonen av alginat 25 ganger høyere enn HEL (Tabell 3.4), og her begynner titreringen å gå mot metning (Figur 4.14 B). Flere injeksjoner burde allikevel utføres etter metning, ettersom varme utviklet etter metning representerer fortynningsvarmen til titranten [62].

De termodynamiske parametrene som beskriver interaksjonen mellom HEL og alginat viser at entalpien (som er høy og negativ) er drivkraften bak interaksjonen (Tabell 4.1). Den totale entalpiendringen er et resultat av binding(er) som dannes mellom HEL og alginat, samt frigjøring av løsningsmiddel fra molekylens overflate. For at to molekyler skal kunne interagere med hverandre må flere lag løsningsmiddel først fjernes, noe som krever energi. Jo høyere dielektrisk konstant løsningsmidlet har, (her: $\epsilon_s = 80$), desto mer vil en interaksjon være skjermet ettersom mer energi trengs for å fjerne løsningsmidlet [44]. En negativ ΔH indikerer at styrken på bindingskomplekset mellom HEL og alginat er sterkere enn bindingen som var med løsningsmidlet, og at interaksjonen mellom molekylene først og fremst skjer via hydrogenbindinger og Van der Waals interaksjoner [48]. Løsningsmidlets ionestyrke har også

betydning for interaksjonen som observeres. Ved høy ionestyrke vil motioner kondensere til overflateladninger på molekylene, slik at det dannes et elektrisk dobbeltlag rundt dem. Dette reduserer deres elektrostatiske overflatepotensial, slik at de elektrostatiske kreftene som virker mellom molekylene avtar [44]. I forhold til HEL er elektrostatiske langttrekkende tiltrekkende krefter viktige for å bringe proteinet sammen med alginat (slik at de kan interagere via korttrekkende krefter), ettersom molekylene er av motsatt ladning. Modelleringen av HEL's elektrostatiske overflatepotensial viser at proteinet har flere positive overflaterregioner (Figur F.1). Det er derfor naturlig å tro at elektrostatiske krefter har betydning for en molekylær interaksjon, til tross for den høye ionestyrken brukt i studiet ($I=160\text{mM}$).

Systemets totale endring i entropi (som er høy og negativ) er ufavoriserbar, som en følge av at systemet blir mer ordnet ved interaksjon. Den totale entropiendringen er et resultat av en reduksjon i antall frihetsgrader for molekylene som interagerer, samt frigjøring av løsningsmiddel. At ΔS er negativt betyr at ordningen av molekylene ved interaksjon ikke oppveies ved en frigjøring av løsningsmiddel (som blir mer uordnet). Alginatmolekyler i en løsning kan beskrives som tilfeldige, fleksible kjeder. Ved binding av HEL blir kjedene mindre fleksible, slik at deres grad av frihet reduseres. Størrelsen på entropitapet øker med økende kjedelengde (DP), og har mest sannsynlig mye å si for den negative entropien som observeres (ettersom $\overline{DP}_n = 50$). Entropitapet oppveies dog i form av en økt favoriserbar entalpi, da flere koordinasjonsbånd mellom HEL og alginat kan dannes. Interaksjonen mellom molekylene er derfor spontant ($\Delta G < 0$, se Tabell 4.1). Ionestyrken vil også ha betydning for alginatkjedenes entropi. Den er relativt høy i dette studiet, valgt ut fra fysiologiske betingelser. Alginatkjeder er fleksible ettersom det virker elektrostatiske frastøtende krefter mellom polymerens negativt ladde monomorer. Ved høy ionestyrke vil motioner skjerme disse ladningene, slik at de frastøtende kreftene mellom monomere avtar, noe som reduserer kjedenes fleksibilitet [38].

Binding til alginatkuler

Ettersom HEL interagerer med natriumalginat ved ITC, var det forventet at lysozym (HEL: lysozym fra eggehvite fra høns, og HML: humant lysozym fra melk) også skulle adsorbere til alginatkuler. Proteinenes positive elektrostatiske overflatepotensial indikerer i tillegg at de har affinitet for alginat (Figur 4.4 og F.1). Binding av alexamerket lysozym til alginatkuler ble kvantifisert ut fra fluorescensmålinger på mikroplateleser, med PBS (pH 7,0 og $I=160\text{mM}$) som løsningsmiddel. Binding av umerket lysozym ble kvantifisert ved absorbansmålinger på nanodrop, med NaCl (0,9 %) med CaCl_2 (2mM) (pH 7,4 og $I=160\text{mM}$)

som løsningsmiddel. Proteinbindingen ble visualisert i mikroskop (KLSM og lysmikroskop). En tydelig proteinbinding til alginatkuler ble observert ved de ulike analysemetodene, med kulekollaps ved høye proteinkonsentrasjoner. (Det må presiseres at ingen av forsøkene for kvantifisering av protein – alginat interaksjoner ble gjort i flere paralleller, noe som ville gitt mer pålitelige resultater).

Proteinbinding til alginatkuler (kvantifisert på nanodrop og plateleser) ble målt som tap av protein etter inkubering med alginatkuler, noe som bare gir et indirekte mål på proteinbinding. På plateleseren ble proteinbinding prøvd målt på selve alginatkulene, men da kulene var vanskelig å plassere i monolag ble det knyttet stor usikkerhet til målingene. Resultatene fra nanodrop og plateleseren viser at det skjer en økende proteinbinding for økende proteinkonsentrasjoner (se Tabell 4.2 – 4.4). Det var liten forskjell i binding av de to proteinene, selv om resultatene fra nanodrop indikerer at mindre umerket HML binder kulene i forhold til fluorescensmerket HML. At mindre proteinbinding ble målt på nanodrop kan forklares ved at mengde bundet HML er under usikkerheten til målemetoden ($\pm 0,1$ mg/ml), noe som gjør kvantifiseringen usikker. I forhold til målingene på plateleseren tar nøyaktige fluorescensmålinger utgangspunkt i at proteinprøven er representativ for hele prøvevolumet. For lysozym ble det observert utfelling av rosa fargestoff (som kan ha vært uinkorporert farge), noe som kan ha påvirket fluorescensmålingene. Det er viktig å fjerne uinkorporert farge etter merking, da det kan påvirke videre eksperimenter og gi unøyaktige fluorescensmålinger [67]. Ved fluorescensmerkingen av lysozym kunne ikke proteinene separeres fra uinkorporert farge ved hjelp av kolonne i merkingskitet, da proteinene var for små. Fargen ble derfor fjernet ved dialyse, etter anbefaling i merkingskitet.

I forsøk på å unngå uspesifikk proteinbinding til brønnplater brukt ved fluorescensmålinger på plateleseren, ble platene vasket med BSA. For å unngå uspesifikk proteinbinding til nuncrør hvor alginatkuler ble oppbevart, ble ett sett kuler (for umerket HEL) preinkubert i BSA. Preinkuberingen påvirket ikke fluorescensmålingene i stor grad. Dette indikerer at en uspesifikk proteinbinding til materialene ikke forekommer, og at en preinkubering av alginatkuler i BSA ikke reduserer en sekundær proteinbinding.

Binding av alexamerket HEL til alginatkuler ble visualisert på KLSM (Figur 4.18), noe som viser at proteinet binder til overflaten av kulene. Etersom proteinets grad av merking med fluorescens bare var 0,38, gir ikke visualiseringen et fullstendig bilde på interaksjonen. (På grunn av begrensede materialer ble det ikke gjort forsøk med FITC-merket antistoff til HEL, som ville gitt en bedre visualisering av proteinbindingen). Binding av umerket HEL til alginatkuler ble visualisert i lysmikroskop (Figur 4.19). Figuren viser at proteinet interagerer

sterkt med kuleoverflaten, noe som resulterer i kulekollaps ved høye proteinkonsentrasjoner, mest sannsynlig på grunn av kondensering av proteinet med alginat. (Proteinkonsentrasjoner av umerket HEL er mye høyere enn alexamerket HEL). Kulekollaps er også observert ved binding av positivt ladet poly-L-lysin (PLL) til alginatkuler [98]. Binding av PLL øker med økende alginatkonsentrasjon på overflaten av kulene, det vil si en økende negativt ladet overflate [101]. Ved høye konsentrasjoner av PLL kondenserer molekylet til gelnettverket i alginat, slik at kulene kollapse. Dette indikerer at elektrostatiske interaksjoner har betydning ved interaksjon mellom alginat og positivt ladde molekyler, ettersom det virker elektrostatiske tiltrekkende krefter mellom dem.

Binding av umerket HML til alginatkuler visualisert med FITC-merket antistoff til HML på KLSM (Figur 4.17), viser at proteinet binder kulene, med økende proteinbinding for økende konsentrasjoner. Bildene gir ingen kvantitativ bestemmelse av proteinbinding, men viser at proteinet binder overflaten av kulene, i tillegg til at det diffunderer inn i kulene. Diffusjon av proteiner inn i alginatkuler avhenger først og fremst av kulenes porestørrelse (som avhenger av type alginat og gelingsion brukt), alginatkonsentrasjon på overflaten, proteinenes størrelse og form (R_G), og proteinenes elektrostatiske overflatepotensial (som påvirkes av pH og ionestyrke) [51, 54, 102]. I dette studiet ble høy-G alginat brukt for produksjon av alginatkuler, som danner et gelnettverk med porestørrelser mellom 50 – 1500 Å [103]. HEL og HML er små, positivt ladde proteiner ($M_w \approx 14,5\text{kDa}$ og $R_G \approx 15,2\text{Å}$) [26], noe som gjør at de enkelt kan diffundere inn i kulene på grunn av favorisert størrelse og overflateladning.

Binding av alexamerket HML til alginatkuler ble (til forskjell fra alexamerket HEL) ikke visualisert på KLSM. Hvorfor fluorescensmerket HEL men ikke HML ble detektert på KLSM er uklart, ettersom målingene på plateleseren viser at proteinene binder kulene i like stor grad (se Tabell 4.2). Ut fra modelleringen av proteinenes elektrostatiske overflatepotensial (Figur 4.4 og F.1) er det i tillegg forventet at proteinene interagerer med alginat på samme måte, da de har lik struktur og overflateladning.

På nanodrop ble proteinenes grad av merking med alexa målt til å være 0,38. Ved fluorescensmålinger på plateleseren ble det allikevel observert lavere fluorescensintensitet for HML i forhold til HEL (se Vedlegg E), selv om samme protein-/ fluorescenskonsentrasjoner ble benyttet. Det kan derfor tenkes at fluorescenskonsentrasjonen til HML er lavere enn HEL, og at binding av HML til alginatkuler ikke ble visualiseres på grunn av for lav fluorescenskonsentrasjon. I forsøk på å øke signalet for bindingen av HML til alginatkulener ble FITC-merket monoklonalt antistoff til HML tilsatt. Dette ga allikevel heller ingen

visualisering på KLSM. Kitet brukt for proteinmerking er optimalisert for IgG ($M_w \approx 150\text{kDa}$) som har 90 lysiner, der om lag 30 av disse modifiseres ved merking [67]. Det er ikke ønskelig at alle lysiner skal modifiseres, slik at proteiners funksjonelle egenskaper som løselighet og binding opprettholdes [67]. HML ($M_w \approx 14,5\text{kDa}$) har til sammenligning bare 5 lysiner, i tillegg til at merkingsgraden til HML (0,38) heller ikke var innenfor anbefalingen til merkingskitet (2 – 7 mol farge per mol protein). Det kan derfor tenkes at merkingen av proteinet med fluorescens har endret dets bindingsegenskaper med alginatkuler og/ eller antistoff. Ettersom merkingsgraden til HML bare var 0,38, burde allikevel umerket HML binde antistoffet. En endelig forklaring på hvorfor alexamerket HEL men ikke HML ble detektert på KLSM er derfor vanskelig å gi, og kan ha skyldtes feil i eksperimentet.

5.1.2 INSULIN

Interaksjon med natriumalginat i løsning

De termodynamiske parametrene for interaksjonen mellom insulin (SINS: insulin fra svin, og BINS: insulin fra okse) og alginat ble undersøkt ved ITC, med PBS (pH 7,0, $I=160\text{mM}$) som løsningsmiddel. Figur 4.14 viser termodiagrammene etter titreringene. Sensitiviteten til ITC-instrumentet er $0,1\mu\text{cal}$, slik at det ved interaksjon må være en varmeendring på $1\mu\text{cal}$ per injeksjon [62]. Varmeutviklingen ved interaksjon mellom insulin og alginat kan derfor antas å være neglisjerbar, noe som tilsier at molekylene ikke interagerer. Proteinenes interaksjon med alginatkuler ble derfor ikke undersøkt (som for lysozym, HSA og HFiB), da det er naturlig å tro at insulin heller ikke vil interagere med alginat i form av kuler.

Resultatet fra ITC korrelerer bra med proteinenes elektrostatiske overflatepotensial (Figur F.2 – F.3), som viser at de er netto negativt ladet ved pH 7,0. Insulin har i tillegg en liten overflate, med få positive regioner. Den høye ionestyrken brukt i studiet ($I=160\text{mM}$) vil redusere elektrostatiske frastøtende krefter mellom molekylene, men ettersom proteinet har få positive overflaterregioner vil det ikke virke elektrostatiske tiltrekkende krefter mellom dem. Dette kan forklare hvorfor en interaksjon med alginat ikke er favorisert. En interaksjon mellom alginat og HINS (humant insulin) ble ikke undersøkt, men modelleringen av HINS, SINS og BINS viser at proteinene har forholdsvis lik struktur og overflateladning (Figur 4.7, F.2, og F.3). Det kan derfor antas at HINS heller ikke interagerer med alginat. En sammenligning av proteinenes aminosyresekvens viser i tillegg at de er svært lik (96 – 100 %).

Diffusjon av insulin ut av alginatkuler ble ikke undersøkt i dette studiet, noe som har relevans i forhold til innkapsling av insulinproduserende celler i alginat. Studier gjort i forhold til transplantasjon av insulinproduserende celler i alginat viser at proteinet diffunderer ut av kulene, da blodsukkernivået stabiliseres etter transplantasjon [104, 105]. Martinesen *et al.* (1989, 1992) har studert diffusjon av BSA ut fra alginatkuler [51, 54]. Studiene viser at proteinets diffusjonshastighet øker med økende pH > pI. En pH-økning gjør at proteinets netto negative ladning øker, slik at elektrostatiske frastøtende krefter til alginat øker. Dette viser at elektrostatiske frastøtende krefter (det vil si et proteins ladning) har betydning for hastigheten proteinet diffunderer ut fra alginatkuler. Frigjøring av positivt ladde proteiner fra alginatkuler vil være redusert, ettersom de vil interagere med kulematerialet. Dersom en mer kontrollert frigjøring av proteiner fra alginatkuler er ønskelig, vil en interaksjon være nødvendig (til en viss grad).

Ved fysiologiske betingelser er insulin negativt ladet, noe som tilsier at elektrostatiske frastøtende krefter har betydning for proteinets diffusjon ut fra alginatkuler (som for BSA). Insulin er i tillegg et lite protein ($M_w \approx 5,5\text{kDa}$), og en studie av Tanka *et al.* (1984) viser at små proteiner ($M_w < 2 \cdot 10^4$) diffunderer relativt fritt ut fra alginatkuler [102].

5.1.3 ALBUMIN

Interaksjon med natriumalginat i løsning

De termodynamiske parametrene for interaksjonen mellom BSA (serum albumin fra okse) og alginat ble undersøkt ved ITC, med PBS (pH 7,0, I=160mM) som løsningsmiddel. Figur 4.15 viser termodiagrammet for titreringen, som indikerer at det er en svak interaksjon mellom molekylene. Dataene etter titreringen lot seg vanskelig tilpasse en spesifikk bindingsmodell, slik at interaksjonen bare kan beskrives kvalitativt. Termodiagrammet etter titreringen viser at varmeutviklingen ved interaksjon både var eksoterm og endoterm. Dette tilsier at interaksjonen mellom molekylene er kompleks og uspesifikk, og at proteinet har ulike overflaterregioner hvor alginat kan binde. Dette forklarer hvorfor interaksjonen vanskelig lot seg tilpasse en spesifikk bindingsmodell.

Proteinstrukturen til HSA (humant serum albumin) ble brukt for modellering av BSA's elektrostatiske overflatepotensial. Den viser at proteinet er netto negativt ladet ved pH 7,0 (Figur 4.10). Ettersom titerkurven til HSA og BSA er nesten identiske (Figur 4.8), i tillegg til at deres aminosyresekvens er 76 % like, er det naturlig å tro at proteinene har lik overflateelektrostatikk. En negativ overflateladning indikerer at en interaksjon mellom BSA

og alginat ikke er favorisert, ettersom det vil virke elektrostatiske langtrekkende frastøtende krefter mellom molekylene. Den svake interaksjonen som ble observert kan forklares ut fra proteinets store overflate ($M_w \approx 66,5 \text{ kDa}$, $R_G \approx 29,8 \text{ \AA}$) [26], hvor det har enkelte positive mikroregioner, selv ved $\text{pH} > \text{pI}$. Dette muliggjør en interaksjon via elektrostatiske korttrekkende krefter. Den svake interaksjonen mellom BSA og alginat ved ITC samsvarer bra med en studie gjort av Neiser *et al.* (1998) [106]. Neiser *et al.* viser at interaksjonen mellom BSA og natriumalginat (ved $\text{pH} > \text{pI}$) øker med økende ionestyrke, ved lav ionestyrke (maks ved $I=20 \text{ mM}$). Ved lav ionestyrke vil elektrostatiske langtrekkende frastøtende krefter mellom BSA og alginat skjermes, slik at molekylene kan interagere ved korttrekkende krefter, via BSA's positive overflateregioner. Ved $I > 20 \text{ mM}$ ble en redusert interaksjon observert, noe som kan forklares ved at korttrekkende elektrostatiske krefter skjermes ved høy ionestyrke. Motoner vil kondensere til ladninger på alginat og BSA slik at det dannes et elektrisk dobbeltlag av ioner rundt molekylene. Dette reduserer molekylenes elektrostatiske overflatepotensial slik at en interaksjon reduseres [44]. Studiet av Neiser *et al.* viser også at interaksjonen mellom BSA og alginat reduseres ved økt pH over pI, ettersom proteinets netto negative ladning øker [106]. Dette viser viktigheten av positive overflateregioner ved interaksjon mellom BSA og alginat.

Løsningsmidlet (dens dielektriske konstant, ϵ) har også innvirkning på styrken på den observerte interaksjonen. Konsentrasjonen av motoner vil være høyere rundt BSA og alginat i forhold til løsningsmidlet. For å utligne denne konsentrasjonsforskjellen trenger løsningsmidlet inn mellom molekylene, noe som reduserer de tiltrekkende kreftene mellom dem. Jo høyere dielektrisk konstant løsningsmidlet har, desto mer vil en interaksjon skjermes, ettersom mer energi trengs for å fjerne løsningsmidlet ved interaksjon [44]. I dette studiet er løsningsmidlets dielektriske konstant relativt høy ($\epsilon_s = 80$).

Binding til alginatkuler

Binding av alexamerket og umerket HSA til alginatkuler ble kvantifisert på plateleser og nanodrop, og visualisert på KLSM, ut fra samme prinsipp som lysozym. PBS ($\text{pH} 7,0$, $I=160 \text{ mM}$) ble brukt som løsningsmiddel. Ut fra den svake interaksjon mellom BSA og natriumalginat ved ITC, samt HSA's elektrostatiske negative overflatepotensial ved $\text{pH} 7$ (Figur 4.10), var kun en svak interaksjon mellom HSA og alginatkuler forventet. Resultatene fra studiet viser at proteinet binder svakt til kulene, med økt binding for økende konsentrasjoner (Tabell 4.5 – 4.6).

På grunn av lite tilgjengelig fluorescensmerket protein i forhold til ønskede fysiologiske konsentrasjoner, måtte fluorescensmerket HSA fortynnes med umerket protein. Ved kvantifisering av proteinbinding til alginatkuler ble det tatt utgangspunkt i at merket og umerket HSA interagerer med alginat på samme måte. Ved fluorescensmerking skal store proteiners funksjonelle egenskaper i utgangspunktet ikke endres, dersom merkingsgraden ikke er for høy [68]. Merkingsgraden til HSA (2,62) var innenfor anbefalingen til merkingskitet (2 – 7), slik at antakelsen om at merket og umerket protein interagerer på samme måte er realistisk. I forhold til målingene på plateleseren ble det observert store svingninger i proteinbinding ved lave proteinkonsentrasjoner, noe som setter spørsmålsteget ved målingene. Årsaken til svingningene kan være fortynningen av merket HSA med umerket protein. Fluorescenskonsentrasjonene var svært lave, slik at en unøyaktig fortynning kan gi utslag i målingene. Det er mulig at proteinet binder kulene for svakt i forhold til målemetodens nøyaktighet, selv om fluorescenskonsentrasjonene var innenfor plateleserens deteksjonsgrense.

Binding av umerket HSA til alginatkuler ble kvantifisert på nanodrop, som har en usikkerhet på $\pm 0,1$ mg/ml. Det gjør de laveste målte bindingene usikre, men ved høye proteinkonsentrasjoner ble proteinbinding observert (i litt større grad enn på plateleseren). Visualisering av kuler inkubert i HSA i mikroskop viste ingen tegn til kulekollaps, noe som viser at en eventuell proteinbinding ikke påvirker kulenes stabilitet. En studie av Neiser *et al.* (1998, 1999) (pH > pI, I < fysiologisk I) [106, 107] viser at binding av BSA til alginatkuler faktisk styrker kulene, på grunn av effektive kryssbindinger med alginat og kalsium. Økt pH og ionestyrke reduserer kryssbindingen slik at den observerte økte styrken reduseres, ettersom elektrostatiske tiltrekkende krefter mellom molekylene avtar.

Binding av alexamerket HSA til alginatkuler visualisert på KLSM (Figur 4.20) viser at proteinet binder kulene i liten grad, og at det ikke entrer kulene ettersom fluorescensintensitet på utsiden er høyere enn på innsiden. Dette samsvarer bra med en studie gjort av Tanka *et al.* (1984) [102], hvor diffusjon av BSA inn og ut av alginatkuler er undersøkt (pH > pI, I > fysiologisk I). Studiet av Tanka *et al.* viser at BSA ikke entrer kulene, og at det kun interagerer svakt med overflaten. Dette kan forklares ved den høye ionestyrken, og pH > pI, som gjør at elektrostatiske tiltrekkende krefter mellom BSA og alginat ikke er favorisert/reduseres. Tanka *et al.* viser også at proteinet diffunderer ut fra kulene, på grunn av negative elektrostatiske frastøtende krefter med alginat (som tidligere forklart). Diffusjon av proteiner inn og ut av alginatkuler avhenger ikke bare av overflateladning, men også av kulenes porestørrelse og proteinenes størrelse og form (R_G) [51, 54, 102]. Albumin er et stort protein

($M_w \approx 66,5\text{kDa}$, $R_G \approx 29,8 \text{ \AA}$) [26], men det vil ikke være ekskludert fra alginatkulene (som har porestørrelser mellom 50 – 1500Å) [103]. En diffusjon av proteinet ut fra alginatkuler er allikevel vist å være redusert i forhold til mindre proteiner [102].

For å avdekke en eventuell uspesifikk proteinbinding til nuncrør som kulene ble oppbevart i, ble ett kulesett preinkubert i BSA før inkubering med HSA. Resultatene indikerer at en uspesifikk proteinbinding til nuncrør ikke forekommer, ettersom preinkuberingen ikke påvirket fluorescensmålingene i stor grad. (Proteinadsorpsjon til nuncrør skal i utgangspunktet skje i liten grad). Preinkubering av alginatkuler i BSA ble også gjort for å undersøke det reduserte en sekundær proteinbinding, ettersom biomaterialer dekket med albumin er vist å redusere en immunrespons ved transplantasjon. Preinkuberingen med BSA påvirket ikke bindingen av HSA i stor grad. Dette virker realistisk ettersom BSA i seg selv interagerer med alginat i liten grad.

5.1.4 FIBRINOGEN

Interaksjon med natriumalginat i løsning

De termodynamiske parametrene for interaksjonen mellom HFiB (humant fibrinogen) og alginat ble undersøkt ved ITC, med PBS (pH 7,0, I=160mM) som løsningsmiddel. Figur 4.16 viser termodiagrammet for titrering, som indikerer at det er en svak interaksjon mellom molekylene (svakere enn for BSA). De kalorimetriske dataene var for små til å bli tilpasset en bindingsmodell.

Titreerkurven til HFiB viser at proteinet er netto negativt ladet ved pH 7,0 (Figur 4.11). En interaksjon med alginat er derfor ikke favorisert, ettersom det vil virke elektrostatiske langtrekkende frastøtende krefter mellom molekylene. Den høye ionestyrken brukt i studiet gjør at de frastøtende kreftene skjermes, og den svake interaksjonen mellom molekylene kan forklares ved at proteinet har enkelte positive regioner på overflaten (selv ved pH > pI) [97]. En interaksjon kan derfor skje via korttrekkende krefter. Den høye ionestyrken som er brukt vil dog redusere denne interaksjonen (som for albumin).

Binding til alginatkuler

Binding av alexamerket HFiB til alginatkuler ble kvantifisert på plateleser, ut fra samme prinsipp som lysozym. PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel. Ut fra den svake interaksjon mellom HFiB og alginat ved ITC, samt proteinets netto negative ladning ved pH 7,0 (Figur 4.11), var kun en svak interaksjon mellom HFiB og alginatkuler

forventet. Resultatene fra bindingsforsøket viser at proteinet interagerer svakt med kulene (svakere enn HSA) (Tabell 4.7).

Fluorescensmerket HFiB måtte fortynnes med umerket protein, på grunn av lite tilgjengelig fluorescensmerket protein i forhold til ønskede fysiologiske konsentrasjoner. Ved kvantifisering av proteinbinding til alginatkulene på plateleseren ble det (som for HSA) antatt at merket og umerket HFiB interagerer med kulene på samme måte. Det er realistisk å tro at fluorescensmerkingen ikke har påvirket proteinets funksjonelle egenskaper, da proteinets merkingsgrad (5,23) var innenfor anbefalingen til merkingskitet (2 – 7).

At HFiB adsorberer svakt til alginatkuler kan sammenlignes med en studie gjort av Xie *et al.* (2010), hvor proteinets adsorpsjon til ACA-kapsler (alginat-kitosan-alginat) er undersøkt (pH > pI og I << fysiologisk I) [108]. Studiet av Xie *et al.* viser at proteinets binding til alginatkuler øker med økende mengde positive ladninger på kuleoverflaten (kitosan). Dette viser at elektrostatiske tiltrekkende krefter har betydning for styrken på den observerte interaksjonen. Ettersom HFiB er negativt ladet er en interaksjon med alginat derfor ikke favorisert, som tidligere forklart.

Bindingen av alexamerket HFiB til alginatkuler ble ikke detektert på KLSM. Dette kan forklares ved proteinets svake binding og lave fluorescenskonsentrasjon (ettersom alexamerket HFiB ble fortynnet med umerket protein, som for HSA). Polyklonalt FITC-merket antistoff til HFiB ble tilsatt for å styrke signalet fra proteinbindingen, noe som ga uklare resultater ved visualisering på KLSM (Figur 4.21). For kuler preinkubert i BSA viste kuler inkubert i anti-HFiB (uten HFiB tilstede) det høyeste fluorescenssignalet. Dette indikerer at antistoffet binder uspesifikt til BSA, noe som er naturlig å tro ettersom antistoffet til HFiB (IgG1 fra sau) ikke var fra samme art som BSA (okse). Som negativ kontroll burde kulene vært preinkubert i serum albumin fra sau, for å se om det hadde gitt en uspesifikk binding. For kuler preinkubert i BSA sank fluorescensintensiteten med synkende konsentrasjoner av HFiB, noe som indikerer at bindingen av antistoff også påvirkes av konsentrasjonen av HFiB. For kuler som ikke ble preinkubert i BSA var fluorescensintensiteten for alle konsentrasjoner av HFiB (samt kuler inkubert i anti-HFiB uten HFiB tilstede) relativt like, men lavere enn for kuler preinkubert i BSA. At kuler inkubert i anti-HFiB (uten HFiB til stede) ga fluorescenssignal, viser at antistoffet også binder uspesifikt til selve alginatkulene.

Det ble ikke observert tegn til kulekollaps ved (en eventuell) binding av HFiB til alginatkuler. Dette kan forklares ved den svake interaksjonen som ble observert, i tillegg til at negativt ladde molekyler ikke kondenserer til alginat på samme måte som positivt ladde

molekyler. Som for HSA ble ett sett kuler preinkubert i BSA før inkubering med HFiB, for å unngå uspesifikk proteinbinding til nuncrør (hvor kulene ble oppbevart). Resultatene indikerer at en uspesifikk proteinbinding ikke forekommer, og at en preinkubering med BSA har liten påvirkning på den sekundære bindingen av HFiB.

5.2 Evaluering av metoder brukt i studiet

Alginatkuler som modellsystem

Modellsystemet brukt i studiet (alginatkuler laget av høy-G alginat, gelet med Ca^{2+} og Ba^{2+}) er mye brukt for immobilisering av celler ved NTNU. Alginatkulene er vist å være biokompatible ved implatering i mus [60], og nyere studier i en human helblodmodell viser at kulene ikke gir komplementaktivering (som har betydning ved en immunrespons) [8]. At alginatkuler synes å være kompatible i blod kan forklares ut fra polymerens negative ladning (og dermed hydrerte overflate), som gjør at proteinadsorpsjon ikke er favorisert [12]. De fleste serumproteiner er i tillegg negativt ladet ved fysiologisk pH, slik at det vil virke elektrostatiske frastøtende krefter mellom proteinene og alginat [10].

Resultatene etter studiet av protein – alginat interaksjoner viser at proteiners overflateladning har betydning for deres mulige interaksjon med alginat. Elektrostatiske krefter kan strekke seg flere ångstrøm ut i løsningen, noe som er med på å føre molekyler sammen for interaksjon (dersom molekylerne er motsatt ladet). Ionestyrken har betydning i forhold til den observerte styrken på interaksjonen, da den vil kunne skjerme elektrostatiske krefter mellom molekyler (tiltrekkende og frastøtende). Studiet viser at APBS gir en god visualisering av proteiners elektrostatiske overflatepotensial, da det var god korrelasjon mellom observert og antatt proteinbinding til alginat. Dette kan forklares ved APBS implementerer eksperimentelle forhold (løsningsmidlets pH og ionestyrke, samt dielektriske konstanter) som har betydning proteinenes overflateelektrostatikk.

Eksperimentelle metoder

ITC ble benyttet for å bestemme vekselvirkningen ved interaksjon mellom en løsning av proteiner og alginat. Etter titrering av to molekyler mot hverandre ved ITC, blir dataene tilpasset en spesifikk bindingsmodell (ett- to- eller flerseters) for bestemmelse av de termodynamiske parametrene ved interaksjon. Metoden tar derfor utgangspunkt i at molekylerne som titreres mot hverandre har spesifikke bindingssteder for hverandre. At proteinenes interaksjon med alginat ved ITC var vanskelig å kvantifisere, kan således

forklares ved at deres interaksjon med alginat var for svak og uspesifikk. ITC gir allikevel en indikasjon på om det skjer en interaksjon eller ikke. Styrken på de ulike proteinenes interaksjon med alginat var i tillegg sammenlignbare.

Molekyler som interagerer ved ITC er oppløst i et løsningsmiddel, noe som gjør at de kan orientere seg i forhold til hverandre på en måte som favoriserer interaksjon. For albumin og HFiB er dette en fordel, slik at de kan interagere med alginat via sine positive mikroregioner. Andre metoder som måler interaksjon mellom to molekyl (for eksempel "Atomic force microscopy" (AFM) [109]), tar ofte utgangspunkt i at molekylene interagerer via bestemte områder. Et alternativ til ITC kan være "Quartz crystal microbalance" (QCM), som også tar utgangspunkt i at molekylene er i løsning. Metoden kvantifiserer interaksjonen mellom to biomolekyl med stor grad av nøyaktighet (den kan kvantifisere bundet protein i nanogram).

Proteinbinding til alginatkuler ble i første omgang kvantifisert på nanodrop. Metoden har en usikkerhet på $\pm 0,1$ mg/ml, slik at en målt proteinbinding under 0,1 mg/ml gir usikre resultater. Albumin og HFiB viste en svak interaksjon med natriumalginat ved ITC. På grunn av den store usikkerheten til målingene på nanodrop, kombinert med proteinenes forventede svake binding til alginatkuler, ble proteinene merket med fluorescens. Dette ble gjort for å øke signalstyrken og bedre deteksjon ved måling av proteinadsorpsjon til alginatkuler. Mikroplateleser ble brukt for kvantifisering av proteinbinding til alginatkuler. Metoden er tidligere brukt til samme formål av Tam *et al.* (2009) [110], hvor proteinbinding til alginatkuler ble målt direkte på kulene. Kvantifisering av proteinbinding direkte på kulene ble forsøkt gjort i dette studiet, men ettersom kulene var vanskelig å plassere i monolag ble det knyttet stor usikkerhet til målingene. Proteinbindingen ble derfor målt som tap av protein etter inkubering med alginatkuler (samme prinsipp som nanodrop). Dette gir kun et indirekte mål på bindingen, noe som kan ha påvirket de kvantitative resultatene. For å redusere usikkerheten knyttet til uspesifikk proteinbinding til materialer brukt ved kvantifisering av proteinbindingen (brønnplater og nuncrør), ble utstyret vasket med BSA. Resultatene viste at proteinbinding til utstyret skjer i liten grad. Den indirekte kvantifiseringen av proteinbinding forventes derfor å gi realistisk mål på proteinbinding til alginatkuler.

Bindingsresultatene fra plateleseren samsvarte ikke alltid med visualisert proteinbindingen på KLSM. En visualisering på KLSM gir ikke et kvantitativt mål på proteinbinding, men metoden gir et inntrykk av distribusjon av bundet protein inni og uten på kulene. For HFiB ble detektert proteinbinding på plateleseren, men ikke på KLSM. Proteinene måtte fortynnes med umerket protein for å få ønskede konsentrasjoner.

Fluorescenskonsentrasjonene var derfor svært lave, slik at en unøyaktig fortynning kan ha gitt utslag i målingene. Sammen med proteinets svake interaksjon med alginat, kan det tenkes at fluorescenssignalet var for svakt for deteksjon på KLSM. For HML ble det også observert binding av alexamerket protein på plateleseren, men ikke på KLSM. Det kan tenkes at fluorescensmerkingen av proteinet kan ha påvirket dets bindingsegenskaper med alginat, ettersom merkingskitet var optimalisert for IgG ($M_w \approx 150\text{kDa}$), som er et mye større protein enn HML ($M_w \approx 14,5\text{kDa}$). Fluorescensmerking av små proteiner vil lett kunne endre deres bindingsegenskaper, ettersom de har en liten overflate.

Fluorescensmerkingen ga derfor ikke den ønskede økte signalstyrken ved proteinbinding til alginatkuler. Dette kan dels forklares ved at enkelte proteiner (lysozym) ikke var tilpasset merkingskitet, og fordi bare små mengder protein kunne merkes slik at HFiB og HSA måtte fortynnes med umerket protein for ønskede konsentrasjoner. Proteinenes svake interaksjon med alginat gjorde det derfor vanskelig å kvantifisere interaksjonen.

5.3 Videre perspektiv

Ved kvantifisering av proteinbinding til alginatkuler ble kulene inkubert i proteinløsninger i én time, ettersom det var ønskelig å studere initiell proteinadsorpsjon til kulene. (Betingelsen ble valgt ut fra en liknende proteinadsorpsjonsstudie av Tam *et al.*, (2009) [110]). Proteinadsorpsjon til overflaten av biomaterialer er vist å skje med en gang overflaten kommer i kontakt med en proteinløsning [34]. Proteiner som er til stede i størst konsentrasjon vil binde først (det vil si albumin og fibrinogen i humant serum), for så å bli byttet ut med proteiner som har høyere affinitet for overflaten. Det vil allikevel være interessant å øke inkuberingstiden da proteinadsorpsjon ikke er en statisk prosess, ettersom utbytting av proteiner skjer over tid (Vroman effekten) [31].

Proteinkonsentrasjoner av HFiB og albumin brukt ved inkubering med alginatkuler ble valgt ut fra normale humane serumkonsentrasjoner [28, 29], i tillegg til at fysiologiske betingelser ble valgt (pH 7, $I=160\text{mM}$). Inkubering av kulene i helblod, som inneholder de fleste celler og proteiner som er avgjørende ved betennelsesreaksjoner, vil gi et modellsystem som er mer likt det kulene opplever ved transplantasjon [8].

Alginatkulene ble prøvd preinkubert i BSA, blant annet fordi biomaterialer dekket med albumin er vist å kunne redusere en immunrespons. Det var derfor ønskelig å undersøke om en preinkubering i BSA reduserte en sekundær proteinbinding. BSA interagererte ikke med kulene i stor grad under de gitte forholdene, (pH 7 og $I=160\text{mM}$), og preinkubering reduserte

derfor ikke en sekundær proteinbinding. Andre studier viser at BSA binder alginatkuler i større grad ved redusert pH og ionestyrke [106], på grunn av favoriserte elektrostatiske interaksjoner mellom molekylene. Det vil derfor være interessant å se om en preinkubering med BSA under forhold som gir sterkere proteinbinding, reduserer en sekundær binding av andre proteiner.

Kuletypen benyttet i dette studiet (kuler laget av høy-G alginat, gelet med Ca^{2+} og Ba^{2+}) er mye brukt for immobilisering av celler ved NTNU. Ulike kule typer tas allikevel i bruk av andre forskningsgrupper, noe som gjør det interessant å sammenligne proteinbinding mellom disse. Dette vil gi et inntrykk av hvordan valg av alginat, gelingsion, og overflatemodifisering har betydning for proteinbinding.

KONKLUSJON

I denne oppgaven ble interaksjonen mellom alginat og ulike proteiner studert. En interaksjon med albumin, fibrinogen og insulin ble undersøkt, da proteinene har relevans i forhold til bruk av biopolymeren som immobiliseringsmateriale. Lysozym ble brukt som positiv kontroll ettersom proteinet er kjent å vekselvirke med alginat.

Lysozym, albumin og fibrinogen interagerer med alginat (i form av løsning og kuler) etter synkende styrke: lysozym (positivt ladet) >> albumin (negativt ladet) > fibrinogen (negativt ladet). Binding av lysozym ga kulekollaps ved høye proteinkonsentrasjoner, på grunn av kondensering til gelnettverket i alginat. Albumin og fibrinogen viste å interagere svakt med biopolymeren, noe som kan forklares ved at proteinene har enkelte positive overflate-regioner selv ved $\text{pH} > \text{pI}$. Den høye ionestyrken brukt i studiet ($I=160\text{mM}$) bidrar til å redusere de tiltrekkende kreftene mellom molekylene. Ingen interaksjon ble observert mellom insulin (negativt ladet) og alginat, noe som kan forklares ved at proteinet har få positive overflate-regioner.

Studiet indikerer at elektrostatiske tiltrekkende krefter har betydning ved alginat – protein interaksjoner, og at proteinenes overflateladning har betydning for deres mulige interaksjon med alginat. APBS viste å gi et realistisk bilde på proteinenes elektrostatiske overflatepotensial. Dette kan forklares ved at modelleringen implementerer eksperimentelle forhold (pH , ionestyrke etc.) som har betydning for proteiners overflateelektrostatikk. De eksperimentelle metodene brukt i studiet ga i flere tilfeller bare et kvalitativt mål på proteinenes interaksjon med alginat. Dette skyldes mest sannsynlig proteinenes svake (nanodrop og plateleser) og uspesifikke (ITC) interaksjon til alginat, i forhold til målemetodenes nøyaktighet.

REFERANSER

1. Smidsrød, O. and G. Skjåk-Brk, *Alginate as immobilization matrix for cells*. Trends in Biotechnology, 1990. **8**: p. 71-78.
2. Mørch, Ý., *Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy*, in *Department of Biotechnology*. 2008, NTNU: Trondheim.
3. Zhao, Y., et al., *Interactions between bovine serum albumin and alginate: An evaluation of alginate as protein carrier*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **332**(2): p. 345-353.
4. Pitt, C., *The controlled parenteral delivery of polypeptides and proteins*. International journal of pharmaceuticals, 1990. **59**(3): p. 173-196.
5. Gombotz, W.R. and D.K. Pettit, *Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery*. Bioconjugate chemistry, 1995. **6**(4): p. 332-351.
6. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1009.
7. Alsberg, E., et al., *Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering*. Journal of Dental Research, 2001. **80**(11): p. 2025.
8. Rokstad, A.M., et al., *Alginate microbeads are complement-compatible in contrast to polycation containing microcapsules revealed by a human whole blood model*. Acta Biomaterialia, 2011.
9. de Vos, P., et al., *Tissue responses against immunisolating alginate PLL capsules in the immediate posttransplant period*. Journal of biomedical materials research, 2002. **62**(3): p. 430-437.
10. Wang, Y.X., et al., *Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility*. Pharmaceutical research, 2004. **21**(8): p. 1362-1373.
11. Schmidt, D.R., H. Waldeck, and W.J. Kao, *Protein Adsorption to Biomaterials*. Biological Interactions on Materials Surfaces, 2009: p. 1-18.
12. Chen, S., Li, L., Zhao, C and Xheng, J., *Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling biomaterials*. Elsevier, 2010. **Polymer 51**: p. 5283-5293.
13. Lu, D.R. and K. Park, *Protein adsorption on polymer surfaces: calculation of adsorption energies*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 1989. **1**(4): p. 243-260.

14. Haug, A. and N.i.f.t.-o. tareforskning, *Composition and properties of alginates*. 1964: NTH Trykk.
15. Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrod, *A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis*. Acta Chemica Scandinavica, 1966. **20**(1): p. 183-190.
16. Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrod, *Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid*. Acta Chemica Scandinavica, 1967. **21**(3): p. 691-704.
17. Smidsroed, O. and A. Haug, *A light scattering study of alginate*. Acta Chemica Scandinavica, 1968. **22**(3).
18. Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrød, *Uronic acid sequence in alginate from different sources*. Carbohydrate Research, 1974. **32**(2): p. 217-225.
19. Smidsrod, O. and A. Haug, *Dependence upon the gel-sol state of the ion-exchange properties of alginates*. Acta Chemica Scandinavica, 1972. **26**(5).
20. Smidsrød, O., *Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state*. Faraday Discussions of the Chemical Society, 1974. **57**: p. 263-274.
21. Smidsrød, R., *The relative extension of alginates having different chemical composition* I*. Carbohydrate Research, 1973. **27**(1): p. 107-118.
22. Grant, G.C., Morris, E. R., Rees, D. A., Smith, P. J. C. and Thom, D., *Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model*. Febs Letters, 1973. **32**: p. 195-198.
23. Donati, I., et al., *New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium-Alginate Gels*. Biomacromolecules, 2005. **6**(2): p. 1031-1040.
24. Rupley, J., *The binding and cleavage by lysozyme of N-acetylglucosamine oligosaccharides*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 1967. **167**(1009): p. 416-428.
25. Vernon, C.A., *The Mechanisms of Hydrolysis of Glycosides and Their Revelance to Enzyme-Catalysed Reactions*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 1967. **167**(1009): p. 389-401.
26. Tyn, M.T. and T.W. Gusek, *Prediction of diffusion coefficients of proteins*. Biotechnology and bioengineering, 1990. **35**(4): p. 327-338.
27. Tang, L., A. Lucas, and J. Eaton, *Inflammatory responses to implanted polymeric biomaterials: role of surface-adsorbed immunoglobulin G*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1993. **122**(3): p. 292.

28. Merskey, C., G. Kleiner, and A. Johnson, *Quantitative estimation of split products of fibrinogen in human serum, relation to diagnosis and treatment*. *Blood*, 1966. **28**(1): p. 1.
29. Sugio, S., et al., *Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution*. *Protein engineering*, 1999. **12**(6): p. 439.
30. Boehm, T.K., H. Sojar, and E. DeNardin, *Concentration-dependent effect of fibrinogen on IgG-specific antigen binding and phagocytosis*. *Cellular immunology*, 2010. **263**(1): p. 41-48.
31. Vroman, L., *Effect of adsorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids*. 1962.
32. Tang, L., Y. Wu, and R. Timmons, *Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 1998. **42**(1): p. 156-163.
33. Szaba, F. and S. Smiley, *Roles for thrombin and fibrin (ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo*. *Blood*, 2002. **99**(3): p. 1053.
34. Tang, L. and J. Eaton, *Fibrin (ogen) mediates acute inflammatory responses to biomaterials*. *The Journal of experimental medicine*, 1993. **178**(6): p. 2147.
35. Tang, L. and J. Eaton, *Natural responses to unnatural materials: A molecular mechanism for foreign body reactions*. *Molecular Medicine*, 1999. **5**(6): p. 351.
36. Wiley-Blackwell, J.W., *Textbook of Diabetes*. *The Annals of Pharmacotherapy*.
37. Lim, F. and A. Sun, *Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas*. *Science (New York, NY)*, 1980. **210**(4472): p. 908.
38. Smidsrød, O., & Moe, S. T., *Biopolymerkjemi*. 1995, Trondheim: Tapir Forlag.
39. Neves Petersen, M.T., et al., *Surface and electrostatics of cutinases*, in *Lipases, Part A*. 1997.
40. Neves-Petersen, M. and S. Petersen, *Protein electrostatics:: A review of the equations and methods used to model electrostatic equations in biomolecules-Applications in biotechnology*. *Biotechnology Annual Review*, 2003. **9**: p. 315-395.
41. Sinha, N. and S. Smith-Gill, *Electrostatics in protein binding and function*. *Current Protein and Peptide Science*, 2002. **3**(6): p. 601-614.
42. Baptista, A., et al., *Electrostatic studies of carbohydrate active enzymes*. *Progress in Biotechnology*, 1995. **10**: p. 181-204.
43. Berg, J.M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. , *Biochemistry*. 6th edition ed. 2007: W. H. Freeman and Company. 1026.

44. Shaw, D.J. and R. Williams, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. 1968: Butterworths.
45. Nakamura, H., *Roles of electrostatic interaction in proteins*. Quarterly Reviews of Biophysics, 1996. **29**(01): p. 1-90.
46. Wagoner, J. and N. Baker, *Solvation forces on biomolecular structures: a comparison of explicit solvent and Poisson-Boltzmann models*. Journal of computational chemistry, 2004. **25**(13): p. 1623-1629.
47. Norde, W., *Adsorption of proteins from solution at the solid-liquid interface*. Advances in colloid and interface science, 1986. **25**: p. 267-340.
48. Freire, E., *Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization*. Drug Discovery Today: Technologies, 2004. **1**(3): p. 295-299.
49. Varki A, C.R., Esko J, et al., ed. *Essentials of Glycobiology*. 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York).
50. Thu, B., et al., *Inhomogeneous alginate gel spheres: An assessment of the polymer gradients by synchrotron radiation induced x ray emission, magnetic resonance microimaging, and mathematical modeling*. Biopolymers, 2000. **53**(1): p. 60-71.
51. Martinsen, A., I. Storrø, and G. Skjåk Bræk, *Alginate as immobilization material: III. Diffusional properties*. Biotechnology and bioengineering, 1992. **39**(2): p. 186-194.
52. Mørch, Y.A., et al., *Effect of Ca²⁺, Ba²⁺, and Sr²⁺ on alginate microbeads*. Biomacromolecules, 2006. **7**(5): p. 1471-1480.
53. Strand, B., et al., *Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties*. Journal of microencapsulation, 2002. **19**(5): p. 615-630.
54. Martinsen, A., G. Skjåk Bræk, and O. Smidsrød, *Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads*. Biotechnology and bioengineering, 1989. **33**(1): p. 79-89.
55. Svanem, B.I.G., et al., *Cloning and expression of three new Azotobacter vinelandii genes closely related to a previously described gene family encoding mannuronan C-5-epimerases*. Journal of bacteriology, 1999. **181**(1): p. 68.
56. Ertesvåg, H., et al., *A family of modular type mannuronan C 5 epimerase genes controls alginate structure in Azotobacter vinelandii*. Molecular microbiology, 1995. **16**(4): p. 719-731.
57. Strand, B., et al., *Microcapsules made by enzymatically tailored alginate*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2003. **64**(3): p. 540-550.

58. Mørch, Y., et al., *Molecular engineering as an approach to design new functional properties of alginate*. *Biomacromolecules*, 2007. **8**(9): p. 2809-2814.
59. Gill, R.G., *Use of small animal models for screening immunoisolation approaches to cellular transplantation*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001. **944**(Bioartificial organs III: Tissue Sourcing, Immunoisolation, and Clinical Trials): p. 35-46.
60. Omer, A., et al., *Long-term normoglycemia in rats receiving transplants with encapsulated islets*. *Transplantation*, 2005. **79**(1): p. 52.
61. Ladbury, J. and M. Williams, *Application of isothermal titration calorimetry in exploring the extended interface*. *Protein Interactions*, 2007: p. 231-254.
62. Freire, E., *Isothermal titration calorimetry*. *Current Protocols in Cell Biology*, 2004. **17**: p. 1-17.8.
63. Pierce, M., C. Raman, and B. Nall, *Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions*. *Methods*, 1999. **19**(2): p. 213-221.
64. Ladbury, J.E., *Application of isothermal titration calorimetry in the biological sciences: Things are heating up!* *Biotechniques*, 2004. **37**(6): p. 885-887.
65. Leavitt, S. and E. Freire, *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry*. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001. **11**(5): p. 560-566.
66. Lakowicz, J.R. and B.R. Masters, *Principles of fluorescence spectroscopy*. *Journal of Biomedical Optics*, 2008. **13**: p. 029901.
67. Johnson, I., Spence, M. T. Z., ed. *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11th ed. 2010, Neuroscience (Life Technologies).
68. Teske, C.A., et al., *Changes in retention behavior of fluorescently labeled proteins during ion-exchange chromatography caused by different protein surface labeling positions*. *Biotechnology and bioengineering*, 2007. **98**(1): p. 193-200.
69. Dowlut, M., D.G. Hall, and O. Hindsgaul, *Investigation of Nonspecific Effects of Different Dyes in the Screening of Labeled Carbohydrates against Immobilized Proteins*. *The Journal of Organic Chemistry*, 2005. **70**(24): p. 9809-9813.
70. Vora, G.J., et al., *Comparison of detection and signal amplification methods for DNA microarrays*. *Molecular and cellular probes*, 2008. **22**(5-6): p. 294-300.
71. Wilhelm, S., Gröbler, B., Gluch, M., and Heinz, H. *Principles Confocal Laser Scanning Microscopy*.

72. Rogers, S.S., et al., *Optical microscopy of growing insulin amyloid spherulites on surfaces in vitro*. Biophysical journal, 2006. **90**(3): p. 1043-1054.
73. Berman, H., K. Henrick, and H. Nakamura, *Announcing the worldwide protein data bank*. Nature Structural & Molecular Biology, 2003. **10**(12): p. 980.
74. DeLano, W.L., *The PyMOL Molecular Graphics System* 2002, DeLano Scientific: Palo Alto, CA, USA.
75. Baker, N., et al., *Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(18): p. 10037.
76. Dolinsky, T., et al., *PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(Web Server issue): p. W522.
77. Dolinsky, T., et al., *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(Web Server Issue): p. W665.
78. Li, H., A. Robertson, and J. Jensen, *Very fast empirical prediction and rationalization of protein pKa values*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2005. **61**(4): p. 704-721.
79. PDB ID: 1REX
Muraki, M., et al., *Origin of Carbohydrate Recognition Specificity of Human Lysozyme Revealed by Affinity Labeling*^{†,‡}. Biochemistry, 1996. **35**(42): p. 13562-13567.
80. PDB ID: 2ZQ3
Aibara, S., Suzuki, A., Kidera, A., Shibata, K., Yamane, T., DeLucas, L.J., Hirose, M., *The crystal structure of the orthorhombic form of hen egg white lysozyme at 1.6 angstroms resolution*.
81. PDB ID: 3EXX
Prugovecki, B., Dodson, E., Dodson, G., Matkovic-Calogovic, D., *Structure of the T6 human insulin derivative with nickel at 1.35 Å resolution*.
82. PDB ID: 1ZNI
Bentley, G., et al., *Structure of insulin in 4-zinc insulin*. Nature 1976: p. 261.

83. PDB ID: 2INS
Smith, G., et al., *The structure of Des-Phe B1 bovine insulin*. Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry, 1982. **38**(12): p. 3028-3032.
84. PDB ID: 1E78
Bhattacharya, A., S. Curry, and N. Franks, *Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(49): p. 38731.
85. PDB ID: 3GHG
Kollman, J., et al., *Crystal structure of human fibrinogen*. Biochemistry, 2009. **48**(18): p. 3877-3886.
86. Nanodrop Technologies, I., *ND-1000 Spectrophotometer v 3.7 User's manual*. Wilmington, USA: NanoDrop Technologies, Inc, 2008.
87. MicroCal™, *ITC data analysis in Origin, tutorial guide*. Northampton MicroCal™, 2010.
88. Huang, X. and W. Miller, *A time-efficient, linear-space local similarity algorithm* 1*. Advances in Applied Mathematics, 1991. **12**(3): p. 337-357.
89. Croguennec, T., et al., *Iron and citrate interactions with hen egg white lysozyme*. Food Chemistry, 2000. **68**(1): p. 29-35.
90. Parry, R.M., R.C. Chandan, and K.M. Shahani, *Isolation and characterization of human milk lysozyme*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1969. **130**: p. 59-65.
91. Ul, N., *Isoelectric points and conformation of proteins: I. Effect of urea on the behavior of some proteins in isoelectric focusing*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure, 1971. **229**(3): p. 567-581.
92. Thomsen, A.E., et al., *Studies on human insulin adsorption kinetics at an organic-aqueous interface determined using a label-free electroanalytical approach*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. **63**(2): p. 243-248.
93. Evenson, M.A. and H.F. Deutsch, *Influence of fatty acids on the isoelectric point properties of human serum albumin*. Clinica Chimica Acta, 1978. **89**(2): p. 341-354.
94. Peters, T., *Serum albumin*. 1985: Academic Press New York.
95. Morrissey, P.A., Mulvihill, D.M., O'Riordan, D. , *Functional properties of blood proteins*. London: Elsevier Applied Science. Biochemistry of Food Proteins, 1992: p. 125-166.

96. Stenhagen, E., *Electrophoresis of human blood plasma: Electrophoretic properties of fibrinogen*. Biochemical Journal, 1938. **32**(4): p. 714.
97. Feng, L. and J.D. Andrade, *Structure and adsorption properties of fibrinogen surfaces*, 1995. **29**(31): p. 33-34.
98. Thu, B., et al., *Alginate polycation microcapsules:: II. Some functional properties*. Biomaterials, 1996. **17**(11): p. 1069-1079.
99. Freyer, M.W. and E.A. Lewis, *Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions*. Methods in cell biology, 2008. **84**: p. 79-113.
100. Gasteiger, E., et al., *ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(13): p. 3784.
101. Thu, B., et al., *Alginate polycation microcapsules:: I. Interaction between alginate and polycation*. Biomaterials, 1996. **17**(10): p. 1031-1040.
102. Tanaka, H., M. Matsumura, and I. Veliky, *Diffusion characteristics of substrates in Ca alginate gel beads*. Biotechnology and bioengineering, 1984. **26**(1): p. 53-58.
103. Andresen, I.L., et al. *Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater*. 1977: ACS Publications.
104. De Vos, P., et al., *Why do microencapsulated islet grafts fail in the absence of fibrotic overgrowth?* Diabetes, 1999. **48**(7): p. 1381.
105. Duvivier-Kali, V., et al., *Complete protection of islets against allojection and autoimmunity by a simple barium-alginate membrane*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1698.
106. Neiser, S., K.I. Draget, and O. Smidsrød, *Gel formation in heat-treated bovine serum albumin-sodium alginate systems*. Food hydrocolloids, 1998. **12**(2): p. 127-132.
107. Neiser, S., K. Draget, and O. Smidsrød, *Interactions in bovine serum albumin-calcium alginate gel systems*. Food hydrocolloids, 1999. **13**(6): p. 445-458.
108. Xie, H.G., et al., *Effect of surface wettability and charge on protein adsorption onto implantable alginate chitosan alginate microcapsule surfaces*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010. **92**(4): p. 1357-1365.
109. Leckband, D., *Measuring the forces that control protein interactions*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 2000. **29**(1): p. 1-26.
110. Tam, S., et al., *Adsorption of human immunoglobulin to implantable alginate poly L lysine microcapsules: Effect of microcapsule composition*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2009. **89**(3): p. 609-615.

111. Hilger, C., et al., *Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic determinants of bovine serum albumin*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2001. **123**(3): p. 387-394.
112. Benson, D., et al., *GenBank: update*. *Nucleic Acids Research*, 2004. **32**(Database Issue): p. D23.
113. Bahadori, B., et al., *The fibrinogen gamma 10034C> T polymorphism is not associated with Peripheral Arterial Disease*. *Thrombosis Research*, 2010. **126**(4): p. 350-352.
114. McEntyre, J. and J. Ostell, *The NCBI handbook [Internet]*. 2002: Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
115. Dean, J.A.E.a.L., N. A., *Lange's handbook of chemistry*. 1999.

VEDLEGGSLISTE

- Vedlegg A: Aminosyresekvenser
- Vedlegg B: PBS
- Vedlegg C: Alginat- og proteinkonsentrasjoner
- Vedlegg D: Rådata fra ITC
- Vedlegg E: Fluorescensintensitetsmålinger – standardkurver
- Vedlegg F: Modellering av ikke-humane proteiner
- Vedlegg G: Titrerkurver

Vedlegg A. Aminosyresekvenser

Tabell A.1 – A.13 viser aminosyresekvensene til en monomer av proteiner brukt i studiet av alginat – protein interaksjoner. (HEL (lysozym fra høns), HML (humant lysozym), SINS (insulin fra svin), BINS (insulin fra okse), HINS (humant insulin), BSA (serum albumin fra okse), HSA (humant serum albumin), og HFiB (humant fibrinogen)). Proteinenes aminosyresekvens ble brukt for bestemmelse av proteinenes ekstensjonskoeffisient og molekylvekt (brukt ved konsentrasjonsberegninger), og SIM-alignment (for bestemmelse av prosentvis likhet mellom humane proteiner og deres respektive ikke-humane proteiner).

Lysozym

Tabell A.1 – A.2 viser aminosyresekvensen til henholdsvis HEL [80] og HML [79], hentet fra Protein Data Bank [73]. I løsningsform forekommer lysozym som en monomer.

Tabell A.1: Aminosyresekvensen til HEL (129 aminosyrer).

KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGSTD
YGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMN
AWVAWRNRCKGTDVQAWIRGCLR

Tabell A.2: Aminosyresekvensen til HML (130 aminosyrer).

KVFERCELARTLKRLGMDGYRGISLANWMCLAKWESGYNTRATNYNAGDRST
DYGIFQINSRYWCNDGKTPGAVNACHLSCSALLQDNIADAVACAQRVVRDPQG
IRAWVAWRNRCQNRDVRQYVQGCGR

Insulin

Tabell A.3 – A.5 viser aminosyresekvensen til henholdsvis SINS [82], BINS [83] og HINS [81], hentet fra Protein Data Bank [73]. (A og B tilsvarer kjede A og B hos insulin). I løsningsform forekommer insulin som en monomer eller heksamere.

Tabell A.3: Aminosyresekvensen til SINS (51 aminosyrer).

A:GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
B:FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

Tabell A.4: Aminosyresekvensen til BINS (51 aminosyrer).

A:GIVEQCCASVCSLYQLENYCN
B:FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKA

Tabell A.5: Aminosyresekvens til HINS (51 aminosyrer).

A:GIVEQCCTSICSLYQLENYCN
B:FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT

Serum albumin

Tabell A.6 – A.7 viser aminosyresekvensen til henholdsvis BSA [111], hentet fra NCBI GenBank [112], og HSA [84], hentet fra Protein Data Bank [73]. I løsnning forekommer albumin som en monomer.

Tabell A.6: Aminosyresekvensen til BSA (583 aminosyrer).

DTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIQAFSQQCPFDEHVKLVNELTEFAKTCV
ADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEPERNECFLSHK
DDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADKKFWGKLYEIAARRHPYFYAPPELLYYANK
YNGVVFQEQCAEDKGACLLPKIETMREKVLTSARQRLRCASIQKFGERALKA
WSVARLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYIC
DNQDTISSKLKECCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCKNY
QEAKDAFLGSFLYEYSRRHPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYST
VFDKLVHLDVDEPQNLKQNCQDFEKLGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVE
VSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLILNRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTE
SLVNRPCFSALEVDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLPDTEKQIKKQTALVELL
KHKPKATEEQLKTVMENFVAFVDKCCAADDKEACFVEGPKLVVSTQTALA

Tabell A.7: Aminosyresekvens til HSA (585 aminosyrer).

DAHKSEVAHRFKDLGEEHFKALVLIQAFSQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTC
VADESAENCCKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHK
DDNPNLRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPPELLFFAKR
YKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKASSAKQRLKASLQKFGERAFKA
WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE
NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA
EAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLLRALAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV
SRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCQLHEKTPVSDRVTKCCTE
SLVNRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVK
HKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL

Fibrinogen

Tabell A.8 – A.10 viser aminosyresekvensen til henholdsvis α -, β - og γ -kjeden til HFiB brukt i det eksperimentelle studiet av proteinets interaksjon med alginat [113], hentet fra NCBI Referanse Sekvens Database [114]. Tabell H.11 – H.13 viser aminosyresekvensen til henholdsvis α - β - og γ - kjeden til HFiB brukt ved modellering av proteinet (PDB ID

3GHG) [85], hentet fra Protein Data Bank [73]. (α -kjeden er delvis protolysert). I løsningsform forekommer HFiB en dimer av α -, β - og γ -kjedene.

Tabell A.8: Aminosyresekvensen til α -kjeden til HFiB brukt i det eksperimentelle studiet av proteinets interaksjon med alginat (644 aminosyrer).

MFSMRIVCLVLSVVGTAWTADSGEGDFLAEGGGVVRGPRVVERHQSACKDSDW
PFCSDDEDWNYKCPSCGRMKGLIDEVNDQFTNRINKLKNLSLFEYQKNNKDSHSL
TTNIMEILRGDFSSANNRDNTYNRVSEDLRSRIEVLKRKVIEKVQHIQLLQKNVR
AQLVDMKRLEVDIDIKIRSCRGSCSRALAREVDLKDYEQQKQLEQVIAKDLLP
SRDRQHLPLIKMKPVPDLVPGNFKSQKVPPEWKALTDMPQMRMELERPGG
NEITRGGSTSYGTGSETESPRNPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNPSSGTGGTAT
WKPSSGPGSTGSWNSGSSGTGSGNQNPGSPRPGSTGTWNPSSSERGSAGHW
TSESSVSGSTGQWHSESGFRPDSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNVSPGTRRE
YHTEKLVTSGDKELRTGKEKVTSGSTTTTRRSCSKTVTKTVIGPDGHKEVTKE
VVTSEDGSDCPEAMDGLTSLGIGTLDGFRHRHPDEAAFFDTASTGKTFPGFFSP
MLGEFVSETESRGSESGIFTNTKESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYKQFTSSTSYNR
GDSTFESKSYKMADEAGSEADHEGTHSTKRGHAKSRPVIRGIHTSPLGKPSLSP

Tabell A.9: Aminosyresekvensen til β -kjeden til HFiB brukt i det eksperimentelle studiet av proteinets interaksjon med alginat (461 aminosyrer).

QGVNDNEEGFFSARGHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGGYRARPAAATQK
KVERKAPDAGGCLHADPDLGVLCPTGCQLQEALLQQERPIRNSVDELNNNVE
AVSQTSSSSFYMYLLKDLWQKRQKQVDNENNVNEYSSELEKHQLYIDETV
NSNIPTNLRVLRILENLRSKIQLKLESDVSAQMEYCRTPCTVSCNIPVVSKECE
EIRKGGTSEMYLIQPDSSVKPYRVYCDMNTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRK
WDPYKQGFQGNVATNTDGNKCYGLPGEYWLGNKISQLTRMGPTELLIEMED
WKGDKVKAHYGGFTVQNEANKYQISVNKYRGTAGNALMDGASQLMGENRT
MTIHNGMFFSTYDRDNDGWLTSDPRKQCSKEDGGGWWYNRCHAANPNGRY
YWGGQYTWDMAKHGTDGVDVWMNWKGSWYSMRKMSMKIRPFFPQQ

Tabell A.10: Aminosyresekvensen til γ -kjeden til HFiB brukt i det eksperimentelle studiet av proteinets interaksjon med alginat (411 aminosyrer).

YVATRDNCCILDERFGSYCPTTCGIADFLSTYQTKVDKDLQSLEDILHQVENKT
SEVKQLIKAIQLTYNPDESSKPNMIDAATLKSRLKMLEEIMKYEASILTHDSSIRY
LQEIYNSNNQKIVNLKEKVAQLEAQCQEPCKDTVQIHDTGKDCQDIANKGAK
QSGLYFIKPLKANQQFLVYCEIDGSGNGWTVFQKRLDGSVDFKKNWIQYKEG
FGHLSPTGTTEFWLGNEKIHLISTQSAIPYALRVELEDWNGRTSTADYAMFKV
GPEADKYRLTYAYFAGGDAGDAFDGDFGDDPSDKFFTSNMGMQFSTWDND
NDKFEKNCAEQDGSWWMNKCHAGHLNGVYYQGGTYSKASTPNGYDNGII
WATWKTRWYSMKKTTMKIIPFNRLTIGEGQQHHLGGAKQAGDV

Tabell A.11: Aminosyresekvensen til α -kjeden til HFiB brukt ved proteinmodellering (562 aminosyrer).

ADSGEGDFLAEGGGVRGPRVVERHQSACKDSDWPFCSDEDWNYKCPSGCRMK
GLIDEVNQDFTNRINKLKNSLFEYQKNNKDSHSLTTNIMEILRGDFSSANNRDNT
YNRVSEDLRSRIEVLKRKVIEKVQHIQLLQKNVRAQLVDMKRLEVDIDIKIRSCR
GSCSRALAREVDLKDYEDQQKQLEQVIAKDLLPSRDRQHLPLIKMKPVPDLVP
GNFKSQLQKVPPEWKALTDMPQMRMELERPGGNEITRGGSTSYGTGSETESPR
NPSSAGSWNSGSSGPGSTGNRNPSSGTGGTATWKPGSSGPGSTGSWNSGSSGT
GSTGNQNPSPRPGSTGTWNPSSSERGSAGHWTSSESVSGSTGQWHSESGSFRP
DSPGSGNARPNPDWGTFFEEVSGNVSPGTRREYHTEKLVTSKGDKELRTGKEK
VTSGSTTTTRRSCSKTVTKTIVIGPDGHKEVTKEVVTSEDGSDCPEAMD LGT LSG
IGTLDGFRHRHPDEAAFFDTASTGKTFFPGFFSPMLGEFVSETESRGSESGIFTNTK
ESSSHHPGIAEFPSRGKSSSYS

Tabell A.12: Aminosyresekvensen til β -kjeden til HFiB brukt ved proteinmodellering (461 aminosyrer).

QGVNDNEEGFFSARGHRPLDKKREEAPSLRPAPPISGGGYRARPAAKAAATQKK
VERKAPDAGGCLHADPDLGVLCPTGCQLQEALLQQERPIRNSVDELNNNVEAV
SQTSSSSSFQMYLLKDLWQKRQKQVKNENNVNEYSSELEKHQLYIDETVNSN
IPTNLRVLRILENLRSKIQLKLESDVSAQMEYCRTPCTVSCNIPVVS GKECEEIIR
KGGTSEMYLIQPDSSVKPYRVYCDMNTENGGWTVIQNRQDGSVDFGRKWDP
YKQGFQGNVATNTDGKNYCGLPGEYWLGN DKISQLTRMGPTELLIEMEDWKGD
KVKAHYGGFTVQNEANKYQISVNKYRGTAGNALMDGASQLMGENRTMTIHN
GMFFSTYDRDNDGWLTSDPRKQCSKEDGGGWWYNRCHAANPNGRYYWGGQ
YTWDMAK HGTDDGVVWMNWKGSWYSMRKMSMKIRPFFPQ Q

Tabell A.13: Aminosyresekvensen til γ -kjeden til HFiB brukt ved proteinmodellering (411 aminosyrer).

YVATRDNCCILDERFGSYCPTTCGIADFLSTYQTKVDKDLQSLEDILHQVENKTS
EVKQLIKAIQLTYNPDESSKPNMIDAATLKS RKM LEEIMKYEASILTHDSSIRYL
QEIYNSNNQKIVNLKEKVAQLEAQCQEPCKDTVQIHDITGKDCQDIANKGAKQS
GLYFIKPLKANQQFLVYCEIDGSGNGWTVFQKRLDGSVDFKKNWIQYKEGFGH
LSPTGTTEFWLGNEKIHLISTQSAIPYALRVELEDWNGRTSTADYAMFKVGPEA
DKYRLTYAYFAGGDAGDAFDGDFGDDPSDKFFTSHNGMQFSTWDNDNDKFE
GNCAEQDGSWWMNKCHAGHLNGVYYQGGTYSKASTPNGYDNGIHWATWKT
RWYSMKKTTMKIIPFNRLTIGEGQQHHLGGAKQAGDV

Vedlegg B. PBS

PBS (10mM fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), 144mM NaCl) ble brukt som løsningsmiddel i det eksperimentelle studiet av alginat - protein interaksjoner (pH 7,0), samt ved proteinmodellering (pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0). Likning 1.1 (se Introduksjon) ble brukt for å finne mengdeforholdet av syre og base ved de ulike pH-verdiene. Tabell B.1 viser konsentrasjonen av NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 og NaCl i bufferen ved de ulike pH-verdiene. Løsningsmidlets ionekonsentrasjon (Tabell B.2) er nødvendig input for modelleringen av proteinenes elektrostatiske overflatepotensial ved APBS, og kan enkelt beregnes ut fra verdiene i Tabell B.1. Ettersom K_a -verdiene til syre-base-paret er lave vil deres dissosiasjon være neglisjerbar, og ble derfor ikke tatt med i beregningene.

Tabell B.1: Konsentrasjon (mM) av Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 og NaCl i PBS (pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0).

pH	NaH_2PO_4 [mM]	Na_2HPO_4 [mM]	NaCl [mM]
3,0	10,0	0,0	144,0
5,0	9,9	0,1	144,0
7,0	6,1	3,9	144,0
9,0	0,2	9,8	144,0

Tabell B.2: Ionekonsentrasjon (mM) til PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl), pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0.

pH	Na^+ [mM]	Cl^- [mM]	H_2PO_4^- [mM]	HPO_4^{2-} [mM]
3,0	154,0	144,0	10,0	0,0
5,0	154,0	144,0	9,9	0,1
7,0	158,0	144,0	6,1	3,9
9,0	164,0	144,0	0,2	9,8

Løsningsmidlets ionestyrke har betydning for proteinenes elektrostatiske interaksjon med alginat, da ioner vil skjerme ladninger på overflatene slik at deres elektrostatiske overflatepotensial reduseres. Tabell B.3 viser bufferens ionestyrke (I) ved de ulike pH-verdiene, beregnet ut fra Likning B.1. C_i er konsentrasjon av ion nr. i , og z_i er ionets ladning.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i (C_i z_i^2)$$

Likning B.1

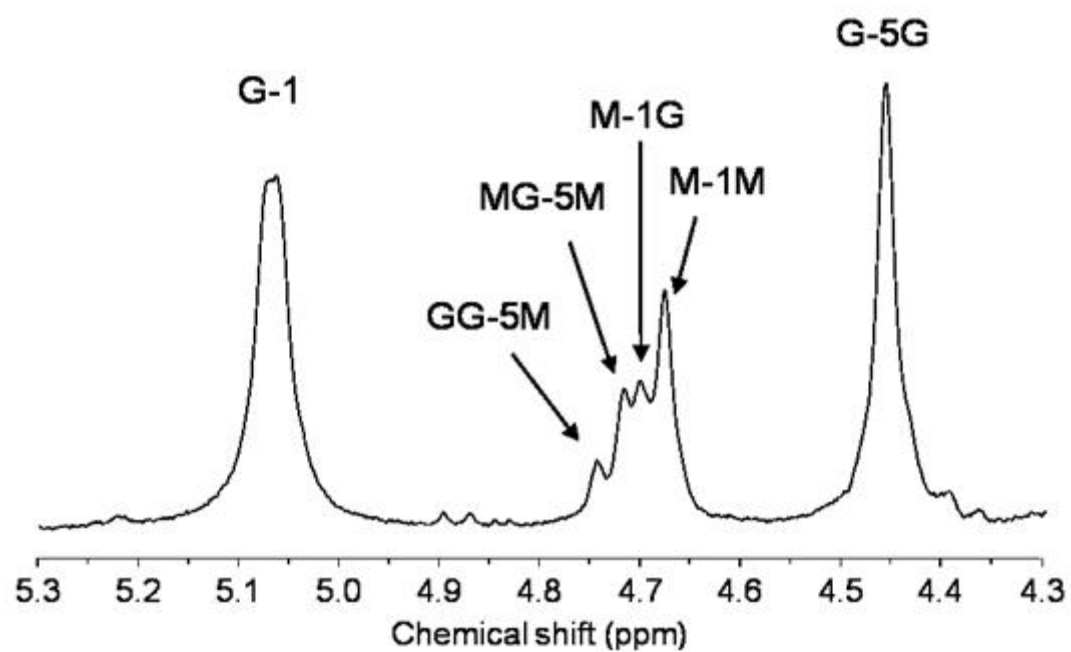
Tabell B.3: Ionestyrke (mM) til PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl), pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0.

pH	Na⁺ [mM]	Cl⁻ [mM]	H₂PO₄⁻ [mM]	HPO₄²⁻ [mM]	Ionestyrke [mM]
3,0	77,0	72,0	5,0	0,0	154
5,0	77,0	72,0	5,0	0,0	154
7,0	79,0	72,0	3,0	8,0	162
9,0	82,0	72,0	0,0	20,0	174

Vedlegg C. Alginat- og proteinkonsentrasjoner

Alginat

Alginat brukt ved ITC (LF10/60) ble syrehydrolysert til $\overline{DP}_n \approx 50$, funnet av Wenche I. Strand ved ^1H NMR (Figur C.1). Alginatet ble dialysert mot MQ-vann, frysetørka og tørket i eksikator før utveiing, slik at vanninnholdet ble anslått til å være 10 %.



Figur C.1: ^1H -NMR-spekter av syrehydrolysert alginat brukt ved ITC.

Likning C.1 ble brukt for å beregne alginatets gjennomsnittlig molekylvekt (g/mol). Ettersom $\overline{DP}_n = 50$, gir det en gjennomsnittlig molekylvekt på 8,82kDa. Alginatkonsentrasjoner (M) ble beregnet ved hjelp av Likning C.2.

$$M_{W_n} = [n \times M_{W(G \text{ og } M)}] - [(n - 1) \times M_{W(H_2O)}] \quad \text{Likning C.1}$$

$$c = \frac{m}{M_{W_n}} \times \frac{1}{V} \quad \text{Likning C.2}$$

M_{W_n} = Molekylvekt til polymer med DP = n (g/mol)

$M_{W(G \text{ og } M)}$ = Molekylvekt til G og M (194,1 g/mol)

$M_{W(H_2O)}$ = Molekylvekt til vann (18,0 g/mol)

c = molar konsentrasjon (M)

m = masse av polysakkarid (g)

V = volum til polysakkaridløsning (l)

Proteiner

Tabell C.1 viser proteinene som ble brukt i studiet av protein – alginat interaksjoner. Proteinkonsentrasjonene ble kalkulert ved hjelp av Likning C.3 (molare konsentrasjoner) og Likning C.4 (konsentrasjoner i mg/ml) [115]. Det ble tatt utgangspunkt i at proteinene er i løsning som en monomer¹.

$$A_{\lambda} = \varepsilon \times c \times l$$

Likning C.3

$$\text{Konsentrasjon (mg/ml)} = \frac{A_{\lambda}}{\varepsilon} \times M_w$$

Likning C.4

A_{λ} = Absorbans ved bølgelengde λ (280)

ε = Ekstensjonskoeffisient til en monomer av proteinet ($M^{-1}cm^{-1}$)

c = Molar konsentrasjon av protein (M)

l = Lengde på lysvei (cm)

M_w = Molekylvekt til en monomer av proteinet

Proteinkonsentrasjonene ble beregnet ut fra absorbansmålinger ($A_{280\text{ nm}}$) på nanodrop spektrofotometer (ND-1000, versjon 3.7.1). Målingene ble gjort i duplikat, og har en usikkerhet på $\pm 0,1$ mg/ml. Proteinenes teoretiske ekstensjonskoeffisient ble funnet ved hjelp av ProtParam, på ExPASy Proteomics Server [100], med proteinenes aminosyresekvens som input (Vedlegg A). Lengden på lyset til den returnerte absorbansen er 1 cm [86].

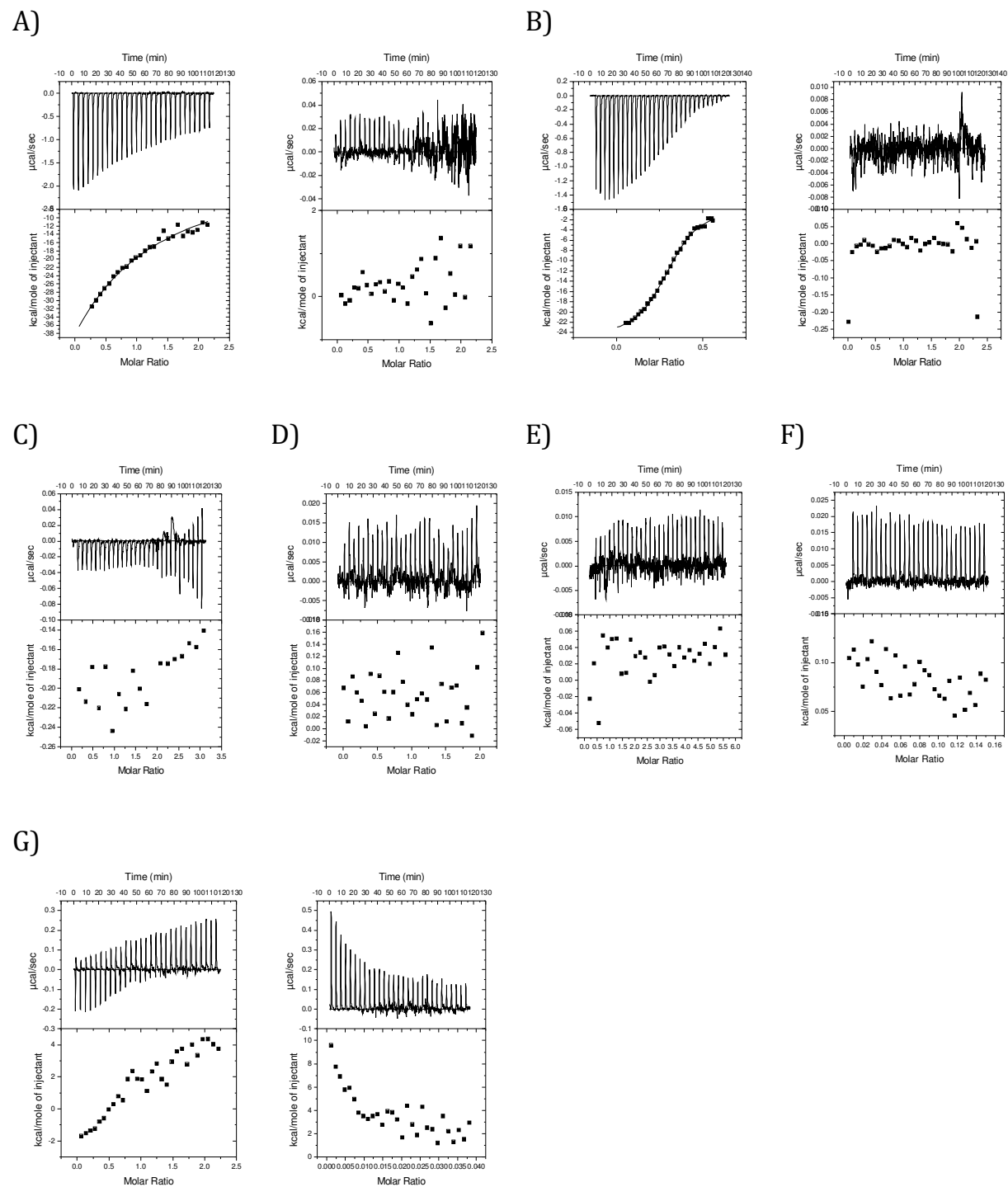
¹ Dette vil gi unøyaktige konsentrasjonsberegninger for fibrinogen og insulin, ettersom proteinene er i løsning henholdsvis som en dimer og monomer/heksamer.

Tabell C.1: Ekstensjonskoeffisient og molekylmasse til en monomer av proteiner brukt i studiet av protein – alginat interaksjoner.

Protein	Molekylvekt [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	Ekstensjonskoeffisient [$(\text{M}\cdot\text{cm})^{-1}$]
HEL	14313,1	37970
HML	14700,6	36940
SINS	5765,6	5960
BINS	5721,5	5960
BSA	66462,9	42925
HSA	66472,2	34445
HFIB	164888,9	257750

Vedlegg D. Rådata fra ITC

Vekselvirkningsvarmen ved interaksjon mellom alginat og proteiner, (HEL (lysozym fra høns), SINS (insulin fra svin), BINS (insulin fra okse), BSA (serum albumin fra okse) og HFiB (humant fibrinogen)), ble målt ved ITC. Se Materialer og Metoder (Tabell 3.4) for konsentrasjoner. Alginat ble titrert i protein (eller omvendt), med PBS (pH 7,0, I=160mM) som løsningsmiddel. For hver titrering ble fortynningsvarmen til titranten funnet ved å erstatte cellekomponenten med løsningsmiddel. Rådata etter titreringene (termodiagram for hver titrering med deres tilhørende fortynningsvarme) er vist i Figur D.1. Det øverste panel for hvert bilde viser varme utviklet ($\mu\text{cal/ sek}$) ved titrering, der hver topp korresponderer til én titrantinjeksjon. Det ned nederste panelet viser bindingsisotermen H (kcal/ mol titrant), plottet mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent.



Figur D.1: Rådata fra ITC-titrering av alginat i protein (eller omvendt), med PBS (pH 7,0, I=160mM) som løsningsmiddel. A) HEL titrert i alginat (med fortynningsvarme), B) alginat titrert i HEL (med fortynningsvarme), C) alginat titrert i HFiB, D) alginat titrert i SINS, E) alginat titrert i BINS, F) fortynningsvarmen til alginat titrert i HFiB SINS og BINS, og G) BSA titrert i alginat (med fortynningsvarme). Det øverste panel for hvert bilde viser varme utviklet ($\mu\text{cal/sek}$) mot tiden (min), hvor hver topp korresponderer til én titrantinjeksjon. Det ned nederste panelet viser bindingsisotermen H (kcal/ mol titrant), plottet mot det molare forholdet av titrant og cellekomponent.

Vedlegg E. Fluorescensintensitetsmålinger – standardkurver

Fluorescensmerking av proteiner med Alexa Fluor 546[®]

Proteiner, (HEL (lysozym fra høns), HML (humant lysozym), HSA (humant serum albumin) og HFiB (humant fibrinogen)), ble merket med Alexa Fluor 546 (Alexa Fluor[®] 546 Protein Labeling Kit, Invitrogen) for å øke signalstyrken og bedre deteksjon ved kvantifisering av proteinadsorpsjon til alginatkuler. Proteinkonsentrasjoner og proteinenes grad av merking med alexa (antall mol farge per mol protein) ble kalkulert ved hjelp av Likning E.1 og E.2 (gitt i protokollen til merkingskitet). Det ble tatt utgangspunkt i at proteinene er i løsningsform som en monomer. (Dette gir unøyaktige konsentrasjoner for HFiB, ettersom proteinet er i løsningsform som en dimer).

$$c = \frac{[A_{280} - (A_{554} \times 0,12)]}{\varepsilon(\text{protein})} \quad \text{Likning E.1}$$

$$\text{Merkingsgrad} = \frac{A_{554}}{\varepsilon(\text{alexa}) \times c(\text{protein})} \quad \text{Likning E.2}$$

A_λ = Absorbans ved bølgelengde λ

ε = Ekstensjonskoeffisient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

c = Molar konsentrasjon av protein (M)

Proteinkonsentrasjoner ble beregnet ut fra absorbansmålinger på nanodrop spektrofotometer (ND-1000, versjon 3.7.1). Målingene ble gjort i duplikat, og har en usikkerhet på $\pm 0,1$ mg/ml. Proteinenes teoretiske ekstensjonskoeffisient (se Tabell C.1, Vedlegg C) ble funnet ved hjelp av ProtParam, på ExPASy Proteomics Server [100], med proteinenes aminosyresekvens som input (Vedlegg A). Ekstensjonskoeffisienten til Alexa ($104000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) var gitt i merkingskitet.

Fluorescensintensitetsmålinger

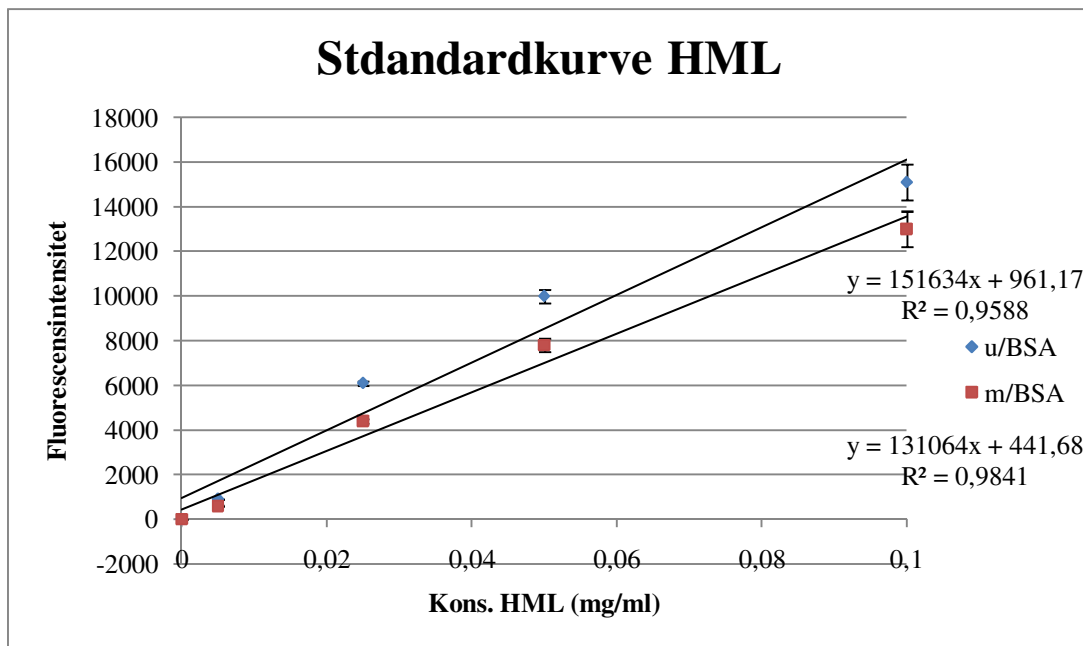
Ut fra kjente konsentrasjoner av fluorescensmerket protein, ble standardkurver for fluorescensintensitet mot proteinkonsentrasjoner laget (Figur E.1 – E.4) (Rådata ikke vist). Standardkurvene ble laget ut fra tre paralleller, bortsett fra for HEL der kun en parallell ble

benyttet. Målingene ble gjort i brønnplater på mikroplateleser (FLUOstar omega, BMG LABTECH, software versjon 1.30, firmware versjon 1.20). PBS (pH 7,0, I=160mM) ble brukt som løsningsmiddel for proteinene. Alle fluorescensmålinger ble derfor korrigert for fluorescensintensiteten til PBS. Proteinbinding til alginatkuler ble målt som tap av protein etter inkubering med alginatkuler. Likningen for standardkurvene ble benyttet for å kvantifisere proteinbindingen.

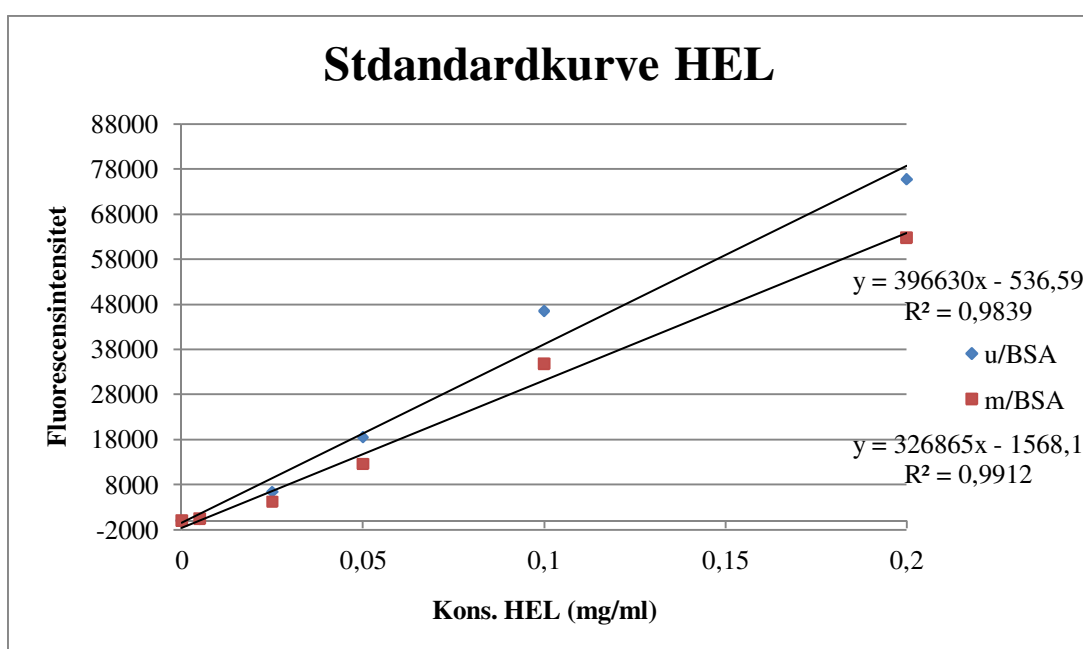
Lysozym

Figur E.1 og E.2 viser standardkurven til henholdsvis HML og HEL, med fluorescensintensitet mot kjente proteinkonsentrasjoner (0 – 0,2 mg/ml). For å undersøke om det skjedde en uspesifikk proteinbinding til brønnplater brukt ved fluorescensmålinger på plateleseren, ble platene vasket med BSA. Figurene viser at vask med BSA ga litt lavere fluorescensmålinger enn målingene utført uten vask med BSA. Dette tyder på at uspesifikk proteinbinding til brønnplatene ikke forekommer.

Standardkurven til HML flatet ut etter 0,1 mg/ml (måling ikke vist), slik at den ikke kan brukes for konsentrasjonsbestemmelser over dette. Hvorfor standardkurven ikke er lineær i hele konsentrasjonsområdet er uklart, ettersom standardkurven til HEL (med samme fluorescenskonsentrasjoner som HML, ettersom deres grad av merking med fluorescens er den samme) var lineær i hele området. En annen observasjon er at fluorescensintensiteten til målingene av HML var lavere enn HEL. Det ble observert utfelling av fargestoff for HEL og HML før intensitetsmålingene, noe som kan ha betydning for denne observasjonen.



Figur E.1: Standardkurve til HML laget ut fra fluorescensmålinger fra kjente konsentrasjoner av alexamerket HML. Grafene viser fluorescensmålinger utført med og uten vask av brønnplater med BSA.

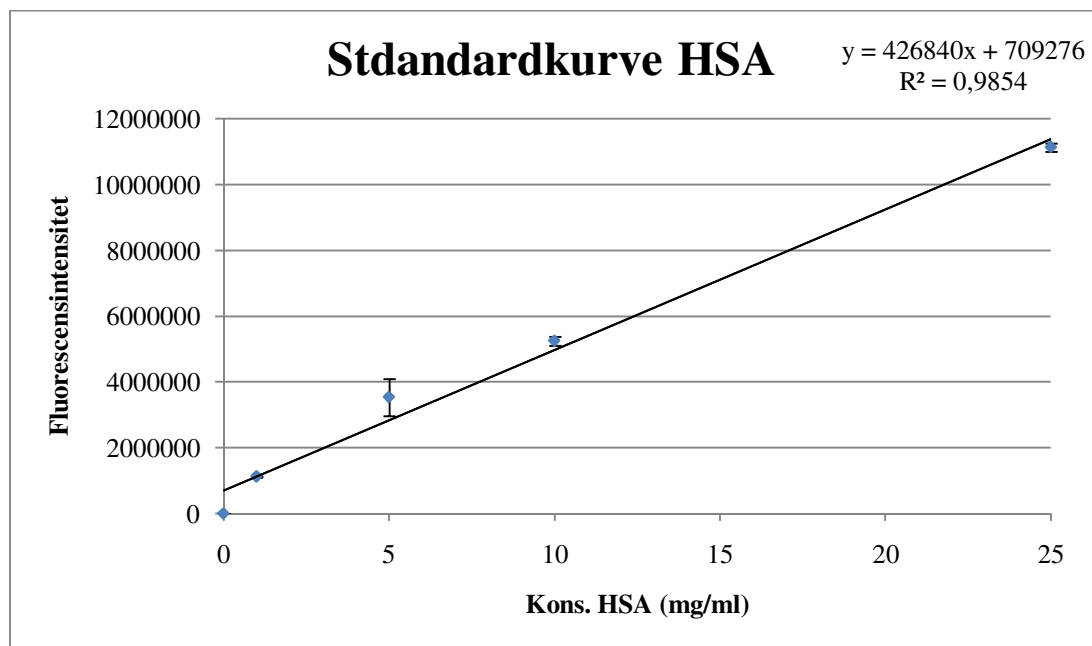


Figur E.2: Standardkurve til HEL laget ut fra fluorescensmålinger fra kjente konsentrasjoner av alexamerket HEL. Grafene viser fluorescensmålinger utført med og uten vask av brønnplater med BSA.

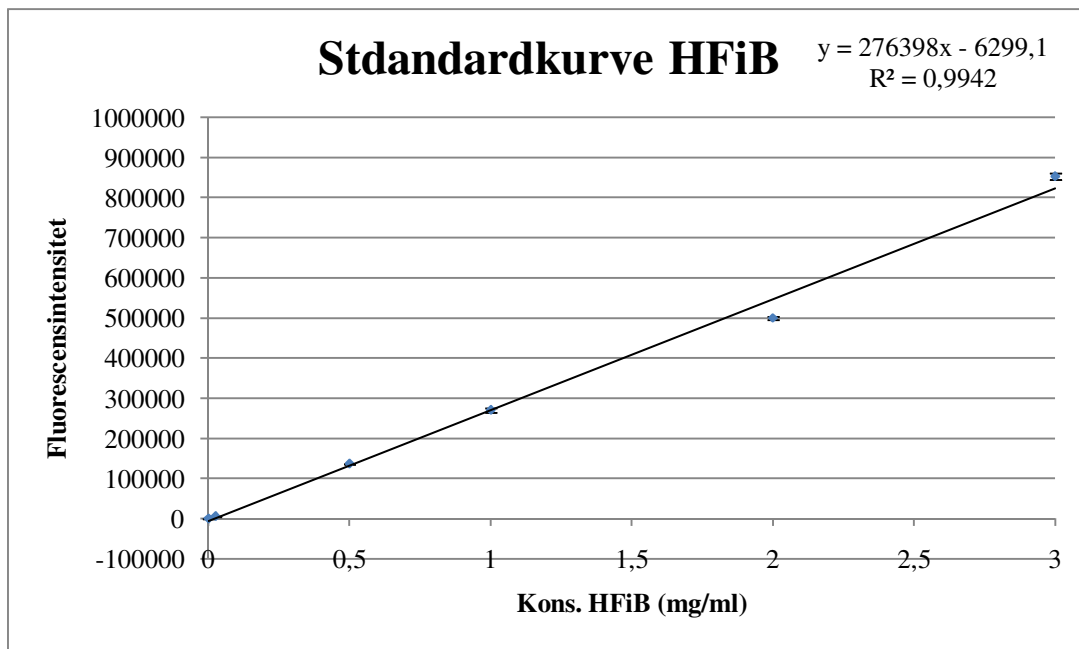
HSA og HFiB

Figur E.3 – E.4 viser standardkurven til henholdsvis HSA og HFiB, med fluorescensintensitet mot kjente proteinkonsentrasjoner (HSA: 0 – 50 mg/ml, HFiB: 0 – 3 mg/ml). Brønnplater brukt ved fluorescensmålinger på plateleseren ble vasket med BSA.

Alexamerket HSA og HFiB måtte fortynnes med umerket protein for å få ønskede fysiologiske konsentrasjoner (se Tabell 3.5 i Materialer og Metoder). Det er gått ut fra at merket og umerket protein interagerer med alginatkuler i like stor grad, og fluorescensmålingene ble derfor ganget opp med fortynningsfaktoren for hver konsentrasjon. Standardkurven til HSA flatet ut etter 25 mg/ml (måling ikke vist), noe som gjør at den ikke kan brukes for konsentrasjonsbestemmelser over dette. Som for HML er det uklart hvorfor standardkurven ikke er lineær i hele konsentrasjonsområdet, da fluorescenskonsentrasjonen er i samme størrelsesorden som for HEL (hvor standardkurven er lineær i hele konsentrasjonsområdet). Det er derfor ikke naturlig å tro at fluorescensintensiteten til HSA er for høy, for å ha et lineært forhold mellom fluorescensintensitet og fluorescenskonsentrasjoner.



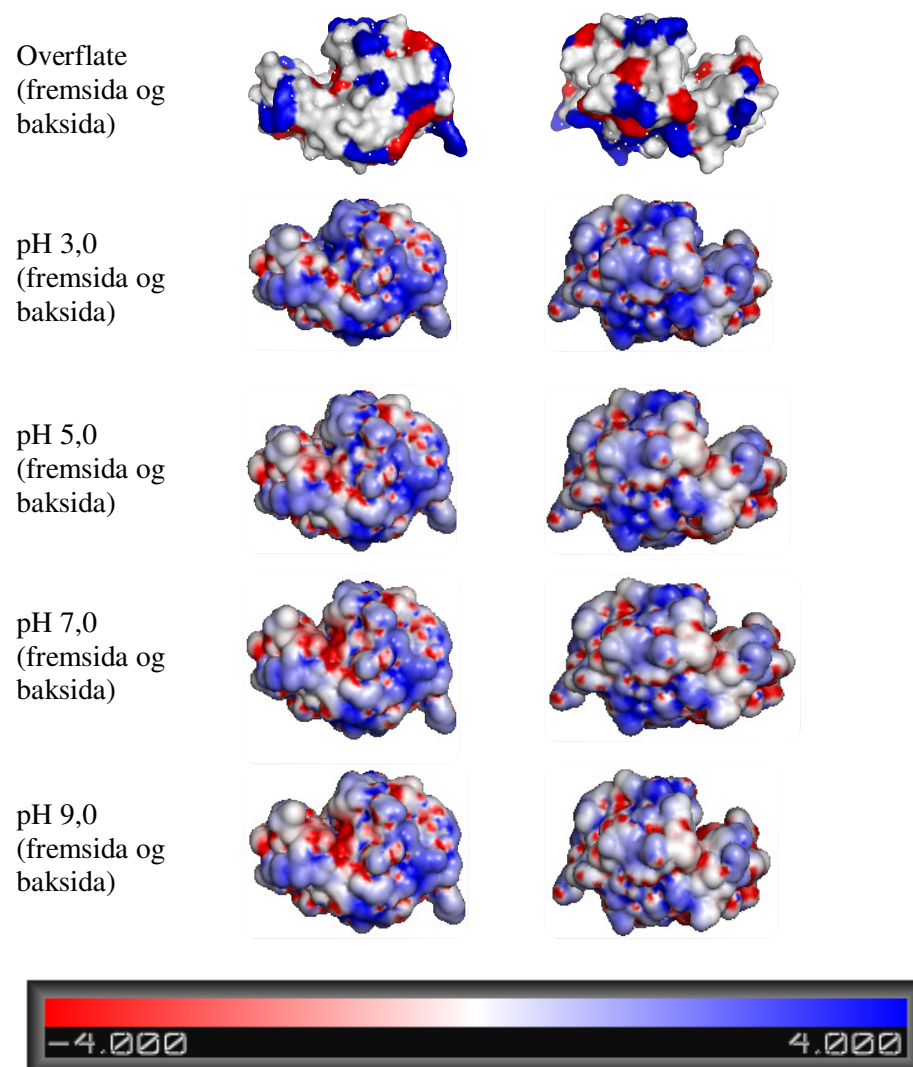
Figur E.3: Standardkurve til HSA laget ut fra fluorescensmålinger fra kjente konsentrasjoner av alexamerket HSA. Brønnplater ble vasket med BSA.



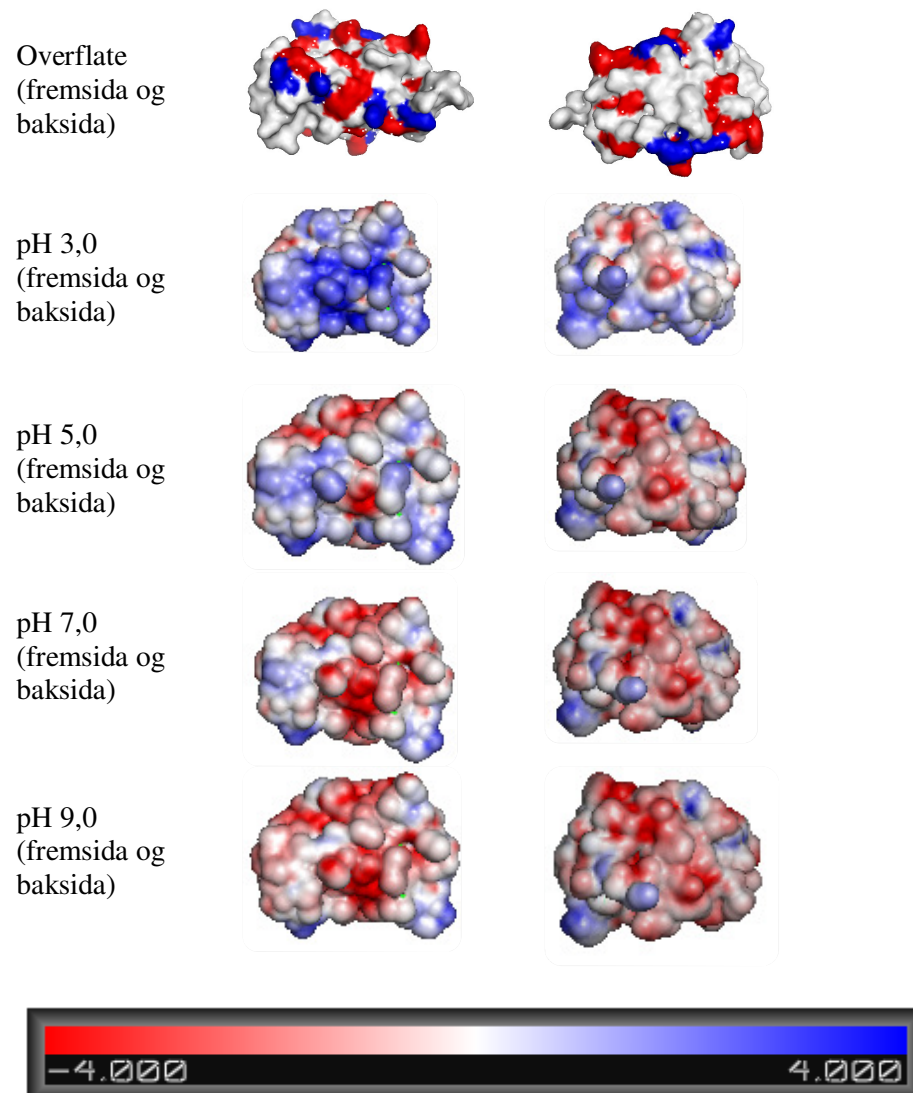
Figur E.4: Standardkurve til HFiB laget ut fra fluorescensmålinger fra kjente konsentrasjoner av alexamerket HFiB. Brønnplater ble vasket med BSA.

Vedlegg F. Modellering av ikke-humane proteiner

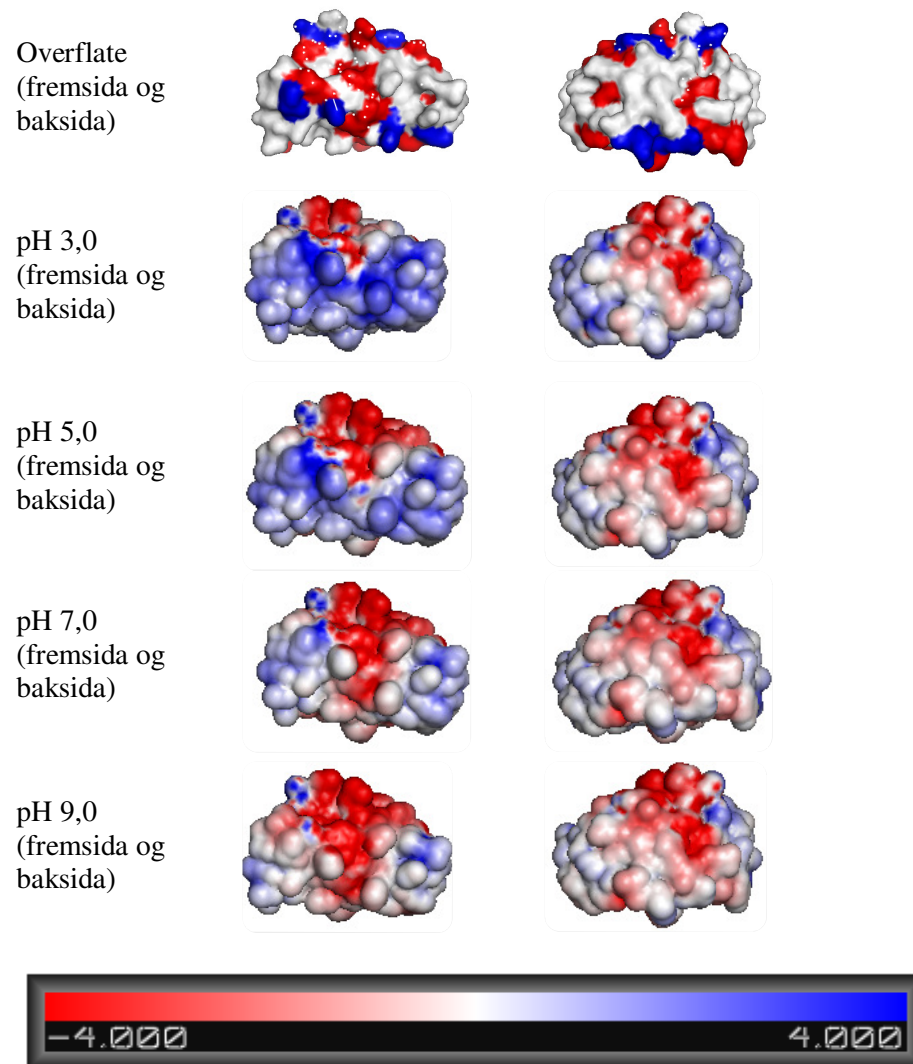
Ikke-humane proteiner (HEL (lysozym fra høns), SINS (insulin fra svin) og BINS (insulin fra okse)), fikk sin overflate og sitt elektrostatiske overflatepotensial modellert på samme måte som de humane proteinene. (Se Tabell 3.3 i Materialer og Metode). PyMol ble brukt til visualisering, mens APBS med input fra PDB2PQR og PROPKA, ble brukt for å beregne proteinenes elektrostatiske overflatepotensial. PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 ble brukt som løsningsmiddel. Figur F.1 (HEL), F.2 (SINS) og F.3 (BINS) viser modelleringen av proteinenes overflate og elektrostatisk overflatepotensial.



Figur F.1: Øverste rad: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på framsida og baksiden av HEL, modellert ved hjelp av PyMol. Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå. Øvrige rader: Modelling av HELs elektrostatisk overflatepotensial (framside og bakside) ved hjelp av APBS. PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 ble brukt som løsningsmiddel. Løsningsmidlets dielektrisk konstant (ϵ_s) = 80, mens proteinets dielektrisk konstant (ϵ_p) = 10. Fargeskaleringen ble satt til ± 4 kT/e. Negative regioner er farget røde, mens positive regioner er farget blå.



Figur F.2: Øverste rad: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på framsida og baksiden av SINS, modellert ved hjelp av PyMol. Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå. Øvrige rader: Modelling av SINS's elektrostatisk overflatepotensial (framside og bakside) ved hjelp av APBS. PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 ble brukt som løsningsmiddel. Løsningsmidlets dielektrisk konstant (ϵ_s) = 80, mens proteinets dielektrisk konstant (ϵ_p) = 10. Fargeskaleringen ble satt til ± 4 kT/e. Negative regioner er farget røde, mens positive regioner er farget blå.



Figur F.3: Første rad: Lokasjon av potensielt ladde aminosyrer på framsida og baksiden av BINS, modellert ved hjelp av PyMol. Sure aminosyrer er farget røde, mens basiske aminosyrer er farget blå. Øvrige rader: Modellering av BINS's elektrostatisk overflatepotensial (framside og bakside) ved hjelp av APBS. PBS (10mM fosfat, 144mM NaCl) pH 3,0, 5,0, 7,0 og 9,0 ble brukt som løsningsmiddel. Løsningsmidlets dielektrisk konstant (ϵ_s) = 80, mens proteinets dielektrisk konstant (ϵ_p) = 10. Fargeskaleringen ble satt til ± 4 kT/e. Negative regioner er farget røde, mens positive regioner er farget blå.

Vedlegg G. Titrerkurver

Likning G.1 (for sure aminosyrer) og G.2 (for basiske aminosyrer) [38] ble brukt for å beregne titrerkurve til alginat og proteiner. X og Y er henholdsvis mengden sure og basiske aminosyrer i proteinene. (Monomerene i alginat kan ses på som sure aminosyrer).

$$\sum_{pH=1}^{14} X * \left(\frac{-1 + (10^{-(pH-pKa)})}{1 + (10^{-(pH-pKa)})} \right) \quad \text{Likning G.1}$$

$$\sum_{pH=1}^{14} Y * \left(\frac{(10^{-(pH-pKa)})}{1 + (10^{-(pH-pKa)})} \right) \quad \text{Likning G.2}$$

Alginat

Alginat ekstrahert fra *Laminaria hyperborea*, med 66 % G og 34 % M (LF10/60), ble brukt som kilde til alginat ved ITC. Alginat ekstrahert fra *L. hyperborea*, med 67 % G og 33 % M (UP LVG), ble brukt til produksjon av alginatkuler. Deres kjemiske karakteristikk er funnet ved H^1 -NMR (se Tabell 3.1). M og G har pK_a -verdi på henholdsvis 3,65 og 3,38 [18].

Proteiner

Tabell G.1 viser distribusjonen av ladde aminosyrer for en monomer av HEL (lysozym fra høns), HML (humant lysozym), insulin (fra svin, okse og menneske), BSA (serum albumin fra okse), HSA (humant serum albumin), HFiB (humant fibrinogen), og HFiB 3GHG. (For modellering av HFiB er HFiB med PDB ID 3GHG brukt, hvor α -kjeden er delvis protolysert). Cysteiner som inngår i disulfidbroer i proteinene ble ikke tatt med i betraktning, da de er nøytrale og dermed ikke påvirker proteinenes ladning.

Tabell G.1: Distribusjon av ladde aminosyrer for HEL, HML, insulin (fra svin økse og menneske), BSA, HSA, HFiB, og HFiB (3GHG).

Aminosyrer	pK_a	HEL	HML	Insulin	BSA	HSA	HFiB	HFiB (3GHG)
Asp (D)	4,1	7	8	0	40	36	93	92
Glu (E)	4,1	2	3	4	59	62	94	92
Arg (R)	12,5	11	14	1	23	24	77	74
Lys (K)	10,8	6	5	1	59	59	105	100
His (H)	6,0	1	1	2	17	16	33	29
Cys (C)	8,3	-	-	-	1	1	-	-
Tyr (Y)	10,9	3	6	4	20	18	50	48
N-term	8,0	1	1	1	1	1	1	1
C-term	3,1	1	1	1	1	1	1	1