

Förfarande för isolering av katjoniska nukleoproteiner

Sammandrag

Föreliggande uppfinning avser skumfraktionering som metod för avskiljning av nukleoprotein under samtidig koncentration av växtextrakt, utan DNA- eller stärkelsekontamination. Cellkärneproteiner från växter utvinnes först genom extraktion med utspädd syra eller i hög saltkoncentration. Luft införs därefter som bubblor i växtextraktet till skumbildning. Skummet kollapsar spontant som en koncentrerad blandning av växtkärneproteiner innehållande naturliga antiinfektösa histoner, vilka är både antimikrobiella och antivirala. Uppfinningen avser en process för isolering av nukleoproteiner från växtriket, användningen av dessa som biocider eller icke terapeutiska läkemedel, innehållande antiinfektiva nukleoproteinisolat. Växthistoner, framställda genom skumfraktionering, utgör en i princip obegränsad källa för naturliga, biologiskt nedbrytbara peptidantibiotika och antivirala medel.

Beskrivning

Globala hot som utbrott av influensa och bioterrorism har ytterligare exemplifierat behovet och betydelsen av handhygien för att förhindra spridningen av infektioner. Alla dessa faktorer har bidragit till att öka användningen av desinfektionsmedel i icke-traditionella miljöer som t.ex. skolor, högskolor, företag, restauranger, snabbmatskedjor och livsmedelsfabriker. Det finns ett behov av bättre hushållsdesinfektionsmedel, sårvårdsprodukter, förebyggande mat- eller vattentillsatser eller biologiskt nedbrytbara rengöringsmedel som inte förorenar miljön, ackumuleras i näringskedjan eller ökar risken för antibiotikaresistens, ett betydande problem i industriell fjäderfäuppfödning eller under lagring och transport av färskvaror. Norovirus och salmonella kontaminering är de främsta orsakerna till livsmedelsburna sjukdomsutbrott, med fjäderfä, nötkött och bladgrönsaker som vanligaste inblandade livsmedel. En infekterad slaktkyckling förorenad med bakterier, kan under sköljning i hemmet sprida bakterier på arbetsytor upp till en meters radie. Brittiska livsmedelsverket, Food Standards Agency, fann nyligen att 65% av allt färskt kycklingkött i handeln är smittade med *Campylobacter*-bakterien, som står för en tredjedel av alla livsmedelsburna sjukdomar och ofta orsakar svår diarré.

Campylobacter orsakar uppskattningsvis 30,000 fall av matförgiftning varje år enbart i Storbritannien, medförande 15,000 sjukhusvistelser inklusive 80 dödsfall, mer än vad enteropatogena *E.coli* åstadkommer. Nivåerna av de icke biologiskt nedbrytbara och därmed kontroversiella antibakteriella tillsatserna triclosan och triclocarban i urinen av människor i USA har stigit med över 40% på två år. Båda substanserna kan komma in i kretsloppet genom användning av förorenat avloppsvatten eller gödningsmedel i jordbruket.

Alla eukaryota cellkärnor innehåller lika stora inbördes proportioner av DNA (desoxyribonukleinsyra), histoner och icke-histoner under bildande av kromatin som är det fysiologiskt relevanta makromolekylära komplexet av genom. Histoner är katjoniska nukleoproteiner med en mycket hög andel av de positivt laddade aminosyrorna arginin och lysin, vilka paketerar och kompakterar DNA av motsatt negativ laddning i ett 1:1 förhållande till en enhet som kallas nukleosom. Histonmodifieringar är också ryggraden i epigenetisk reglering och transkription. Animala histoner tillhör de först studerade proteinerna, delvis på grund av att dessa relativt lätt kan rentas från fågelblod. Förutom att vara strukturella proteiner, har histoner från kalv rapporterats vara antibiotiska med bred verkan av Hirsch JG, J. Exp. Med 108, 925-944, 1958, genom en mekanism som inte är känd. Dessutom hämmas vissa icke-höljebärande virus såsom adenovirus, norovirus och tobakmosaikvirus av histoner

(Ladygina ME et al., Vopr Virusol, 1978 Nov-Dec (6): 686-90; Tamura M. et al., Arch Virol., 148, 1659-70, 2003). Norovirus beräknas leda till 23 miljoner fall av akut gastroenterit i USA varje år. Vanlig förkylning är bara vanligare än vinterkräksjuka orsakad av norovirus.

Histoner är bland de mest konserverade eukaryota proteinerna, de är påfallande lika mellan arterna, bestående av en familj med fem grundläggande proteiner med isoelektriska punkter omkring pH 10,6 samt med en molekylvikt i intervallet 10 till 30 kDa, till exempel finns det bara två skillnader i aminosyrasekvens av histon H4 mellan arter och kreatur. Sådana bevarade sekvenser tyder på att dessa histoner har viktiga funktioner omfattande alla aminosyror. Histoner fälls ut ur lösning efter tillsats av natriumhydroxid till pH 10,6 och mer specifikt av sojalecitin vid pH 7,5 (Chargaff E. och Ziff M., J. Biol. Chem. 131, 25-34, 1939). Bildande av salt-liknande föreningar med fosfolipider som lecitin i biologiska membran skulle vara anledningen till att histoner i höga koncentrationer är toxiska för däggdjur endotelceller vid sepsis (Xu, J. et al. Nature Medicine 15, 1318-1321, 2009).

Växter och djur har utvecklat antimikrobiella (poly)peptider, som kan bilda porer i cytoplasmamembran av invaderande mikroorganismer. Människors hud och andra epitelbarriärer är rika källor för egentillverkade peptidantibiotika som åstadkommer ett extraordinärt infektionsmotstånd i dessa vävnader. Allmänt beskrivna som defensiner, har dessa peptider som gemensamt att vara både katjoniska och amfifila samtidigt, med detergent-liknande verkan via direkta biofysiska störningar av bakteriella cellmembran. Följaktligen är verkningsmekanismen bakteriedödande snarare än bakteriostatisk, till skillnad från de flesta befintliga antibiotika med ursprung från svampar, vilka riktar sin verkan mot bakteriernas intracellulära biokemiska vägar. Direkt upplösning av bakteriecellmembran minimerar risken att resistenta bakterier uppstår. Därför efterliknar defensiner och histoner det tidiga medfödda immunitetsväret som skyddar individen före ett sekundärt antikroppsbaserat immunförsvar som utvecklas dagar eller veckor efter primärinfektion. En sådan första försvarslinje är det enda immunsystemet för hos många arter, inklusive insekter och groddjur, och anmärkningsvärt väl bevarat under evolutionen. I växtriket motsvaras polypeptiddefensiner av thioniner, som i huvudsak är anti-svampmedel. Samma försvarsprincip förefaller att upprepas i alla flertalet organismer, även gällande bakterierna själva, där katjoniska peptider förekommer som konkurrensbegränsande faktorer för näring och överlevnad (bacteriociner). Alla andra antibakteriella peptider som beskrivits hittills är inducerbara och transkriptionellt reglerade.

Lärdomar från naturens eget försvar mot bakterier, har medfört att katjoniska polypeptider nu övervägs som nya klasser av antibiotika och antivirala medel, förutsatt att sådana skulle kunna göras tillgängliga i kommersiella kvantiteter. Detta har hittills inte kunnat realiserats med något biologiskt material som råvara på grund av för låga halter, inte heller med alternativet rekombinant genteknik på grund av egentoxicitet mot producerande mikroorganism under jäsning. Med tanke på att histoner är strukturellt nästan identiska mellan arterna, inklusive alla levande växter, föreligger en extraordinär möjlighet genom direkt extraktion och användning av antiinfektösa histoner från växtriket, enligt EP 1420646. Djur- och växthistoner är helt utbytbara mot varandra i nukleosomen (Liberati-Langenbuch J. et al. BBRC 94, 1161-1168, 1980), och deras respektive antimikrobiella aktivitet är likaledes oskiljbar.

EP 1420646, utfärdat till Rothman, beskriver att växthistoner som i stor utsträckning syntetiseras under celledelning, är starka bredspektrum och defensin-mimetiska antibiotika vars biologiska aktivitet är jämförbara med tetracykliner. Histoner är ospecifika, precis som

1 alla andra tidigare beskrivna bacteriociner, defensiner eller thioniner. Dessutom är
2 växthistoner effektiva mot både gram (+) positiva och gram (-) negativa bakterier, en ovanlig
3 egenskap bland peptidantibiotika. Växthistoner kan således utföra flera uppgifter, förutom att
4 vara DNA:s förpackningsmaterial. Dissocierat växtkromatin blir ett antibiotikum eftersom
5 extraherade eller fria histoner kan ersätta eller komplettera endogena histoner eller ex vivo i
6 andra sammanhang. Konsekvensen av EP1420646 är att flera av våra vanligaste ätliga varor
7 kan vara råvarakälla till peptidantibiotika, bekämpningsmedel, konserveringsmedel i mat eller
8 som neutraceuticals. Ett särskilt fördelaktig källa för storskalig produktion av histoner är
9 spannmål som utgångsmaterial på grund av deras relativt stora genom-storlekar, många mer
10 än 3,000 Mb/1C, motsvarande en avkastning av 500 g histoner från en hektar. Men viss
11 komplexitet, instabilitet under processen samt närvaro av stärkelse gör separation och
12 isolering av nukleoproteiner till en komplicerad och ekonomiskt krävande process.

13
14 Moderna protokoll för histonutvinning är baserade på löslighet av histoner i syror, antingen i
15 utspädd saltsyra eller 0,1 - 0,2M svavelsyra som dissocierar nukleinsyror från histoner men
16 fäller flesta andra nukleära proteiner och nukleinsyror. Alternativt dissocierar hög salthalt vid
17 extraktion med 2M - 4M natriumklorid också kromatin vid bibehållet neutralt pH. Den
18 viktigaste nackdelen med saltextraktion är att cellulära enzym och proteaser kan vara aktiva
19 under längre tid än med syraextraktionmetoden. Det är därför viktigt med proteashämmare
20 ingår reningen. Enligt föreliggande uppfinning erhålles en god proteaskontroll genom närvaro
21 av natriumbisulfit samt värme, > 55 ° C under extraktionen.

22
23 Standardiserade histonutvinningsprotokoll låter sig inte lätt översättas till växter på grund av
24 naturlig stärkelse som orsakar klibbighet och olöslighetproblem. Dessutom innehåller
25 växthistonpreparationer olika polyfenoler som grumlar eller fäller ut separerade proteiner.
26 Under arbete med sådana extraktioner, noterades det att de flesta preparationer skummade
27 spontant utan särskild agitation, och att detta skum lätt adhererade till glas och plastytor,
28 vanligtvis ett oönskad beteende i proteinkemi.

29
30 Överraskningsvis konstaterades det att själva skummet i sig egentligen utgör den eftersträlvade
31 nukleoproteinblandningen med högt histoninnehåll, under det att DNA, polyfenoler och
32 stärkelse förblir i den ursprungliga lösningen. Anledningen till detta är att katjoniska
33 histonmolekyler beter sig som naturliga detergent, ett fenomen som tilltar under
34 reningsförloppet på grund av ökande denaturering med åtföljande hydrofobicitet.

35
36 Resultatet av denna oväntade iakttagelse är en mycket effektiv process för att isolera
37 växtnukleoproteiner under samtidig lösning av stärkelseproblemet.
38 Uppfinningen medger en automatisk industriell utvinning process som möjliggör en
39 synnerligen enkel och snabb isolering av växtnukleoprotein till låg kostnad.

40
41 Förfarandet enligt föreliggande uppfinning möjliggör en ett-steg nukleoproteinrening från
42 lösningar med låg proteinhalt utan ytterligare tillsatser, vilket uppnås genom att helt enkelt
43 försätta ett syra- eller saltat växtextrakt under skumbildning med luft, kväve eller vattenånga,
44 varvid skumfraktionen tillvaratages som den slutliga produkten. Denna är samtidigt utan
45 DNA- och stärkelse kontamination, tillika avsaltad och koncentrerad, allt i samma fäng, vilket
46 antyder möjligheten till utvidgad användning av ett stort antal växtlivsmedel, djurfoder,
47 vegetabiliska oljeväxtrester, biprodukter från bränsle- eller dryck etanolprocesser som
48 utgångsmaterial för nukleoproteinproduktion i stor skala. Växtnukleoproteinskum kan lätt
49 framställas från utspädda biomassor inklusive sådana vars arvsmassa har lägre c-värden, med
50 proportionellt följande lägre histoninnehåll, mindre än 3,000 Mbp/1C (haploid storlek av

genom), vilket möjliggör en ekonomisk genomförbar extraktion av de fyra största grödorna (konventionella eller genetiskt modifierade organismer), raps (1,100 Mbp), sojaböner (1,100 Mbp), majs (2,500 Mbp), bomullsfrö (2,800 Mbp). Även mindre genom från tomat (1,000 Mbp), äpple (750 Mbp), vinrankor (500 Mbp), vanliga rester från juice- och vinindustrier, blir realistiska mål för utvinning av antiinfektösa nukleoproteinisolat enligt föreliggande uppfinning, som alltså kompenserar för låga C-värden.

Historiskt har olika flotationseparationsmetoder använts inom avloppsrening och mineralindustri bearbetning. Skumfraktionering som en kemisk reningsmetod rapporterades första gången av Sebba (J. Colloid interface Sci., 35 (4), 643, 1971) som 10-100 µm mikrobubblor eller kolloidala gasaphroner skapade under intensiv omrörning av en utspädd tensid i en proteinlösning. Proteiner bindes till att bubbel gas/vätska gränssnittet genom hydrofobicitet och elektrostatik under koncentration i skummet. Lalchew et al. (Biotechnology and Bioengineering, 24, 2253-2262, 1982) utförde skumseparation av DNA och proteiner från laboratorieblandningar av kalvbräss kromatin i saltlösningar. I ett senare skede, användes skumfraktionering som proteinrening av Jauregi et al. (Chemical Engineering Journal 65 (1), 1-11, 1997). US Patent nr 3.969.336, utfärdat till Criswell, beskriver skumfraktionering av vassleproteiner.

En särskilt fördelaktig utföringsform av denna uppfinning är kontinuerlig tillförsel av tryckluft som matas till ett växtextrakt innehållande dissociert kromatin. Alternativt kan en grovrening av växthistoner åstadkommas genom att helt enkelt behandla valfri biomassa med utspädd syra under proteasskydd med natriumbisulfit utan föregående preparation av cellkärnor eller kromatin, följt av blåsning med gas eller vattenånga vid pH > 5,8 i en apparatur som annars förekommer vid kontinuerlig flotation i vattenreningsverk.

Enligt föreliggande uppfinning, behöver processen inget ytterligare tvättmedel för skumbildning eftersom histoner har karaktären av självskummande detergent, i motsats till andra kända gasaphron metoder som är beroende av extra tvättmedel för skumbildning. Denaturerad och termoresistent växthistoner enligt uppfinningen skummar alltmer under isolering utan att påverka deras antiinfektiva egenskaper.

En mer omfattande förståelse av uppfinningen kan erhållas genom att betrakta följande exempel. Det bör dock förstås att dessa exempel inte avses att vara ett alltför begränsande av uppfinningen på något sätt.

Exempel 1

100 g vetegroddar (Kungsörnen, Sverige) homogeniserades under 10 min med full hastighet med hjälp av en Braun hushållsmixer i 400 ml kranvatten innehållande 0,5% (w/v) Triton X-100. Ytterligare 100 ml vattenledningsvatten tillsattes under omrörning i 10 min. Överblivna cellrester avlägsnades med centrifugering vid lågt varvtal, 4,000 x g under 5 minuter. Supernatanten fälldes med avseende på kromatin genom droppvis tillsats av 3M ammoniumsulfat till en slutlig koncentration av 0,05 M. Kromatinet pelleterades genom centrifugering vid 4,000x g i 10 min. Supernatanten dekanterades bort och kvarvarande pellet suspenderades i 100 ml 0,1 x natriumcitrat buffert innehållande 5 mM natriumbisulfit. En sådan 100 ml batch med grovrenat växtkromatin dissocierades till beståndsdelarna nukleinsyra respektive kromosomala proteiner genom tillsats av 25 ml 0,5M svavelsyra till en slutlig koncentration av 0,1M svavelsyra, före omrörning under 6 timmar i kyla. Det sålunda dissocierade växtkromatinmaterialet är emellertid fortfarande en komplex blandning av DNA-molekyler, olika histoner och icke-histoner, dessvärre förorenade med stärkelse

vilket framgår av en stark blå reaktion med jod och som resulterar i grumlighet och andra komponenter som motstår centrifugering. Efter justering av pH till 7,0 med NaOH, utfördes skumfraktionering i en 250 ml graderat mätglas försedd med en airstone (Aqua Fizzzz™, USA) matad med fuktad tryckluft, vid 0,90 cm/sek ytgashastighet, under 15 minuter vid rumstemperatur. De stigande bubblorna på toppen av anläggningen tillvaratogs i 0,1% ättiksyra och frystorkades. Frystorkade preparat är lösliga i destillerat vatten eller saltlösning. Ingen stärkelse upptäcktes med jodprov. En intensiv reaktion med Fast Green kunde motverkas av heparin, vilket tyder på förekomst av basiska katjoniska proteiner. Bubbelfraktionerna uppvisar fällningsbildande egenskaper med 0,1% sojalecitin vid pH 7,5. Sådana olösliga salt-liknande komplex med fosfolipider löses av dimetyleter, 95% etanol vid 60°C eller 2-pentanon. Testerna indikerar således förekomst av histoner i den nukleoproteinmix som bildar skum.

Skumfraktionerade katjoniska växt nukleoproteinfraktioner enligt ovan har framgångsrikt testats med avseende på antiinfektösa egenskaper med Hygicult® (Orion Diagnostica Oy, Finland) system för hygienkontroll i köksmiljöer, varvid biologisk aktivitet har konstaterats mot både grampositiva och gramnegativa bakterier.

Exempel 2

Ett enklare nukleoproteinpreparat framställs på ett mycket enkelt sätt genom att direkt behandla utgångsmaterialet av någon biomassa med utspädd syra utan den inledande kromatinreningen enligt Exempel 1. Således inkuberades 100 g färska vetegroddar över natten under omrörning i rumstemperatur med 500 ml 0,4M svavelsyra, därefter justeras med NaOH till pH 6,0 innan skumfraktionering som i exempel 1. Skummet uppvisar tydliga antiinfektösa egenskaper i Hygicult®-analyser.

Exempel 3

Konsumentvetegroddar från en hälsokostaffär (100 g) suspenderades i 400 ml 4M NaCl i under natten i kylskåp och homogeniserades därefter under 10 minuter i en Braun mixer. Den höga saltkoncentrationen skiljer kromatin i sina beståndsdelar, DNA och proteiner. Homogenatet späddes stegvis med destillerat vatten till 0,3 M NaCl, filtrerades genom en 0,3 mm nylon sil, och filtratet (vid 0,3M NaCl) har underkastades ett skumfraktioneringsförfarande vid pH 6,0 under liknande parametrar som i exempel 1. Den tillvaratagna skumfraktion är antimikrobiell.

Exempel 4

ExPro rapsmjöl (200 g, AarhusKarlshamn, Sverige), en biprodukt efter utvinning av rapsolja, var homogeniserades under 4 timmar i 2,000 ml 4M NaCl varefter detsamma spädes ytterligare till 0,3 M innan växtmaterialet försattes med vattenånga. Detta utfördes genom att rikta en 19 bar ångstråle från en espresso maskin (Jura Impressa 501, Schweiz) mot homogenat-vätskeytan tills skummning. Översvämmande skum uppsamlades i 0,1% ättiksyra före frysning vid -20°C. Produkten är en löslig växthistonblandning, utan kontamination av DNA eller stärkelse, vilken har en stark antimikrobiell aktivitet i Hygicult® testsystemet.

Exempel 5

Sjuttio liter drank (DDGS), en biprodukt (vattenhalt 90 %, 416 g protein/kg efter torkning, pH 3,9) efter etanol jäsning (Nöbbelöv, Sverige), försattes med fast natriumklorid till 0,3M och ångades vid cirka pH 6,0 under 30 minuter, varvid det genererades 10 liter skum med en proteinhalt av 2 mg protein/ ml efter kollaps av bubblorna. Den biologiska aktiviteten avseende avseende antimikrobiell verkan av närvarande växtnukleoproteiner är intakt efter detta stränga förfarande.