

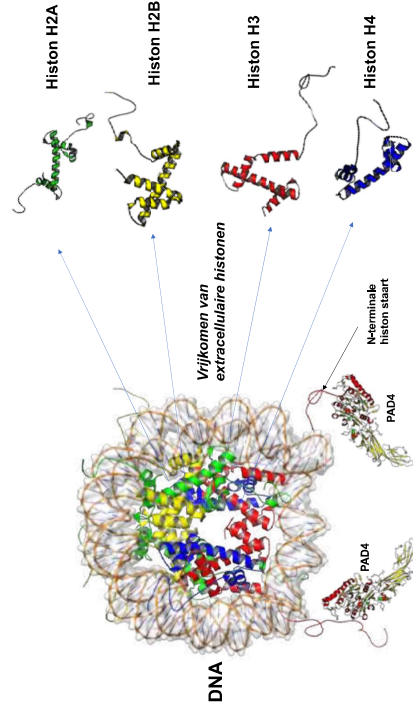
Histonen

Wolven in schaapskieren

Wolven in schaapskieren, zo zou je histonen kunnen omschrijven. Histonen zijn standaard onderwerp van het biologieonderwijs en staan bekend als de eiwitten waaromheen het DNA zit opgewonden in elke cel van het menselijk lichaam die een celkern bevat. Al sinds de ontdekking in 1884 door de Duitse biochemicus en pionier op het gebied van de genetica, Albrecht Kossel, worden histonen bestudeerd, met name vanwege de rol die ze vervullen bij de DNA-replicatie en de regulatie van onze genen. Mede vanwege de ontdekking van de histonen als kerneiwitten ontving Kossel in 1910 de Nobelprijs voor zijn verdiensten in de vakgebieden van de fysiologie en geneeskunde.

Histonen vormen een groep van sterk basische eiwitten waarvan er vijf varianten bestaan. De kernhistonen omvatten de isotypes histon 2A, histon 2B, histon 3 en histon 4, die samen een octameer vormen, die bestaat uit twee kopieën van elk van de isotypes. Om de octameer zijn 14,6 baseparen van het genomisch DNA gewonden. Daarnaast is er het zogenaamde 'linker histon' dat fungeert als een

soort anker dat over de octameer en het DNA ligt en beiden bij elkaar houdt en daarmee vaste structuur aan het octameer-DNA complex geeft. Het complex van alle histonen samen met het eromheen gewonden DNA is wat we het 'nucleosoom' noemen. Onze chromosomen zijn dan ook als het ware kralenkettingen van nucleosomen, waarbij de histonen de kralen vormen, gemaakt van eiwit.



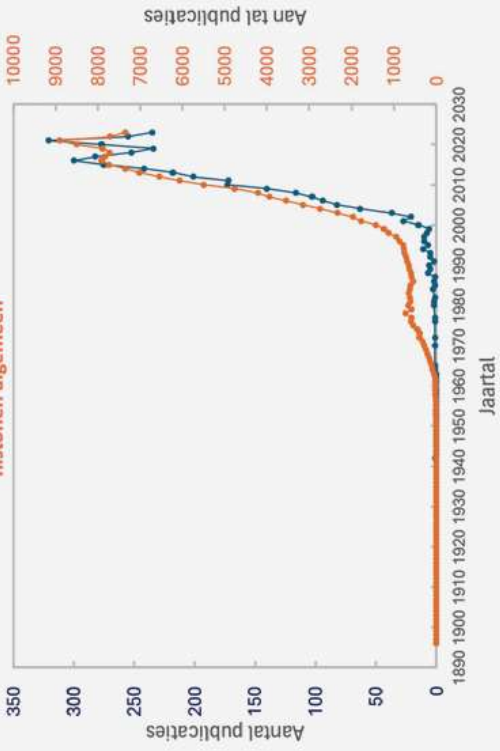
Figuur 1: Octameer organisatie van histonen in het nucleosoom. Duidelijk herkenbaar zijn de kernhistonen histon 2A, 2B, 3 en 4, waaromheen het DNA gewonden zit. De N-terminale staarten van de histonen steken uit de kern van deze structuur en vormen aangrijpingspunt voor tal van posttranslationale modificaties. Zo kan het enzym PAD4 de N-terminale staarten acetyleren, wat de aanpak kan geven tot de vorming van Neutrophil Extracellular Traps (NETs).

OVER DE AUTEURS

Dr. Nicolaes en Wichapong

beiden biochemici, zijn werkzaam aan de Universiteit Maastricht en houden zich bezig met translatie-onderzoek dat zich richt op de mechanismen die een rol spelen bij ontstekings- en thromboinflammatie. systemische ontsteking en sepsis. Hun passie is het transleren van kennis naar tastbare nieuwe medicijnen en diagnostica. De methoden die gebruikt worden zijn expliciet 3D-structuur-gedreven, dat wil zeggen dat vraagstellingen rationeel benaderd worden door gebruik van computermodellen, kunstmatige intelligentie en 'computational drug design' en vandaar worden in vitro experimenten opgezet in systemen die bestaan uit gezuiverde componenten of ook wel in cell-based systemen. De meest succesvolle projecten worden doorgezet tot aan een in vivo fase, waarbij door samenwerking, nieuwe bioactieve moleculen worden getest in diersystemen. Naast hun werk als academici zijn ze de initiatiefnemers van een jonge drug design startup 'Hilmerk-BV' genaamd.

aantallen publicaties over histon-gemedieerde cytotoxiciteit en histonen algemeen



Figuur 2: Resultaat van een PubMed search met als zoekopdracht: histone (in blauw) en histone cytotoxicity (in oranje) gedurende de jaren 1890-2023, weergegeven zijn de aantallen verschenen publicaties per jaar. Merk het verschil in de beide Y-assen op. Wat aangeeft dat de toxiciteit van histonen een nieuw en onderbelicht eigenschap van histonen is.

ANTIMICROBIËLE WERKING

Illustratief voor de essentiële rol in de biologie is dat histonen een extreem hoge mate van conservering hebben voor wat betreft hun aminozuurvolgorde, wanneer histonen van verschillende diersoorten worden vergeleken. Dit is een indicatie voor het belang dat deze eiwitten hebben voor het goed functioneren van het organisme.

Lange tijd is ervan uitgegaan dat histonen hun essentiële rol vervullen binnen de genregulatie en DNA-replicatie. Dit is zonder meer waar, maar al in 1942 verscheen er een studie die een andere, schijnbaar volledig onverwante eigenschap van histonen beschreef: in deze studie werd aangeoond dat gezuiverde histonen, al bij relatief lage concentraties, antibacteriële eigenschappen bezitten en *Escherichia coli* bacteriën konden doden. Enkele latere studies hebben deze initiële observaties van de directe toxische werking van histonen bevestigd, echter zonder dat deze

leidden tot een algemene belangstelling voor histonen als cytotoxische moleculen. Histonen komen immers voor in de celkern en de toxiciteit werd gezien als een in vitro fenomeen en een fysiologische relevantie lag niet voor de hand.

VERGELIJKING

Dit wordt geïllustreerd door bovensstaand figuur (figuur 2) waarin een vergelijking wordt weergegeven tussen de aantallen publicaties die er verschenen tussen 1890 en nu over enerzijds histonen en anderzijds de toxische eigenschappen van histonen. Vanaf de jaren zeventig van de twintigste eeuw was er vrijwel uitsluitend belangstelling voor histonen en hun rol in genregulatie.

Dit veranderde echter na de publicatie van een tweetal studies in het begin van de jaren 2000. Deze studies brachten een kentering in hoe we nu aankijken tegen histonen, en meer in het bijzonder tegen de 'extra-cellulaire histonen' of ook wel 'extra-nucleaire histonen' genoemd.

FYSIOLOGISCHE CONTEXT

Een eerste studie uit 2004, door de groep van Brinkmann en collega's, werkte aan het Max Planck Instituut in Berlijn, toonde aan dat neutrofielen, de meest voorkomende circulerende immuun-cellen, die deel uitmaken van ons aangeboren (innate) immuunsysteem, geactiveerd kunnen raken door de aanwezigheid van pathogenen en dan zogenaamde 'neutrofiel extracellulaire vallen', NETs, kunnen vormen. Zo kunnen neutrofielen hun chromatine uitstoten samen met daaraan gebonden granulaire eiwitten die als een soort extracellulaire vangnetten zowel Gram-positieve and Gram-negatieve bacteriën kunnen vangen (het acronyem NET is dus bijzonder toepasselijk gekozen). Niet alleen worden bacteriën (en later bleek ook schimmels en andere pathogenen) geïmmobiliseerd. Ze worden bovendien actief gedood door aan deze NETs gebonden eiwitten. Die eiwitten zijn ook afkomstig uit de geactiveerde neutrofiel. Het meest voorkomende eiwit-bestanddeel in de NETs wordt gevormd door extracellulaire histonen, die vanwege hun toxische eigenschappen bacteriën kunnen doden. Met het werk van Brinkmann en collega's werden in één klap de eerdere schijnbaar onverwante antimicrobiële eigenschappen van histonen in een fysiologische context geplaatst, namelijk dat deze histonen – wanneer ze de celkern verlaten – een actieve rol kunnen spelen bij de afweer tegen allerlei microben.

NETS EN SEPSIS

De tweede studie verscheen in 2009 en kwam uit de groep van Esmon in Oklahoma City in de Verenigde Staten van Amerika. Deze studie, die in vitro en in vivo data combineerde, liet zien dat de aanwezigheid van extracellulaire histonen in geval van bloedvergiftiging, ook wel sepsis genoemd, een doorslaggevende rol spelen. De auteurs omschreven extracellulaire histonen als de 'major mediators of death' (de belangrijkste mediators voor sterfte): Niet alleen werd aangevoond dat in geval van een bacteriële infectie er histonen in omloop komen, die gebonden kunnen zijn aan NETs, met als doel de invaderende bacteriën te doden, er werd tevens aangevoond dat diezelfde extracellulaire histonen in staat zijn om gezonde cellen in het lichaam van de geïnfecteerde persoon te doden. Hierdoor kan er een vicieuze cirkel ontstaan: NET-gebonden histonen doden niet alleen pathogenen, maar ook gezonde cellen, die op hun beurt ook histonen uit hun kern in omloop brengen, die vervolgens op

hun beurt weer meer gezonde cellen beschadigen en doden, zie figuur 3. Extracellulaire histonen, afkomstig van neutrofielen en de histonen van beschadigde cellen, zijn beiden toxisch voor andere cellen. Hiermee zijn deze histonen niet alleen biomarkers voor de aanwezigheid van immuun activatie en weefselschade (ook wel bestempeld als 'damage associated molecular patterns' (DAMPs), ze zijn daadwerkelijk zelf ook schadelijk en in staat om weefsel te beschadigen.

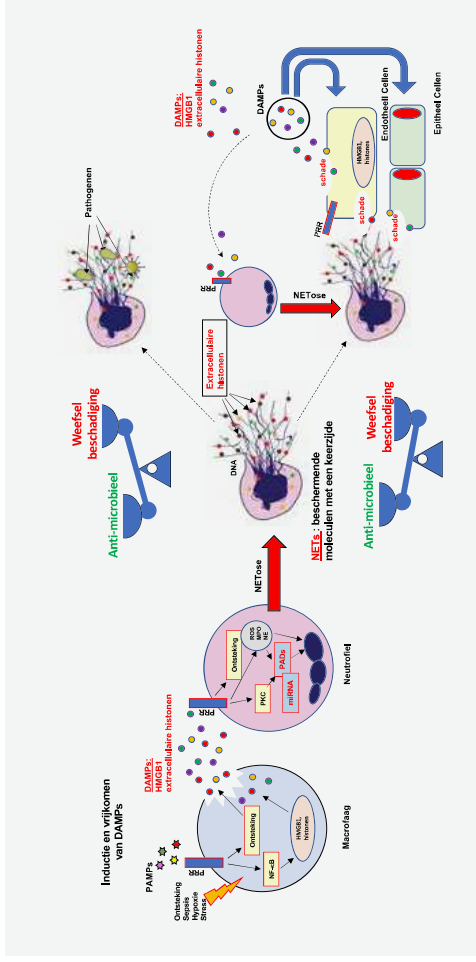
'Onze chromosomen zijn als het ware kralenkettingen van nucleosomen, waarbij de histonen de kralen vormen, gemaakt van eiwit'

De hypothese is dat dit één van de mechanismes is die kan verklaren waarom sepsis een vaak zeer snel ziekteverloop vertoont en verklaren kan hoe weefsels en organen door heel het lichaam kunnen worden aangedaan, zelfs kunnen uitvallen, wat in de ergste gevallen leidt tot de dood. De groep van Esmon liet zien dat het neutraliseren van extracellulaire histonen voldoende is om

proefdierten te redden van een anders lethale dosis aan geïnjecteerde histonen of ook bacteriën¹. Deze ontdekkingen waren de aanzet tot meerdere studies die zich richten op de opheldering van de exacte mechanismen die betrokken zijn bij de schade die extracellulaire histonen in vivo kunnen aanrichten. Inmiddels is ook duidelijk dat er, naast sepsis, een hele groep ziektes en aandoeningen is waarin extracellulaire histonen een rol spelen, zoals bijvoorbeeld in kanker, reizen- en hartinfarcten, brandwonden, wondgenezing, auto-immuunziekten, longziektes als ALI en ARDS, en bij de ziekte van Alzheimer.

GEEN MEDICIJNEN SEPSIS

Het is opmerkelijk dat in tegenstelling tot de vrij beperkte bekendheid met sepsis bij het algemene publiek, het aantal mensen dat jaarlijks sterft aan deze aandoening heel groot is. Wereldwijd worden jaarlijks bijna 50 miljoen mensen getroffen door sepsis waarvan er 11 miljoen mensen overlijden, goed voor bijna 20 procent van de totale



Figuur 3. Toxiciteit door vrijgekomen eiwitten na stimulatie van neutrofielen en macrofagen tijdens een infectie. NETs kunnen pathogenen immobiliseren en doden, hierdoor dragen ze bij aan de afweer. De toxiciteit in NETs is echter willekeurig: wanneer gezonde cellen in aanraking komen met NETs en de hieraan gebonden extracellulaire histonen, kunnen ook deze afsterven en hun kernmateriaal, waaronder histonen, vrijgeven; toxische DAMPs komen vrij. Hierdoor kan een vicieuze cirkel ontstaan die in sepsis kan leiden tot orgaanschade of zelfs de dood.

sterftegevallen.⁴ Hiermee is sepsis in het ziekenhuis doodsoorzaak nummer 1 en brengt deze aandoening niet alleen een grote morbiditeit maar ook een grote mortaliteit, waaraan tevens

een navenant kostenplaatje hangt.⁵ De behandeling van sepsis is veelal gebaseerd op het toedienen van antibiotica of antimycotica, het toedienen van vloeistoffen en middelen die de bloeddruk op peil kunnen houden en daarnaast het ondersteunen van essentiële functies van organen bijvoorbeeld met behulp van dialyse.

Fetelijk bestaat er voor de behandeling van sepsis geen (gerichte) therapie en kunnen bovendien de huidige diagnoses tijdrovend zijn. De huidige methodes en kennis zijn dus niet toereikend: het kan gebeuren dat ondanks een succesvolle behandeling van de bacteriële infectie (en er geen bacteriën meer worden aangetoond) de weefselschadigende mechanismen niet meer gestopt kunnen worden in een sepsis-patiënt en deze een slechte klinische prognose heeft. In geval van sepsische shock is de kans op overlijden groter dan 40 procent. In de wetenschap dat een vroege behandeling een gunstige uitwerking heeft: op herstel en overleving bij sepsis, bestaat er daarom een duidelijke medische noodzaak tot de

ontwikkeling van nieuwe manieren om sepsis te kunnen behandelen.

PRAETORIAN

Vanuit deze gedachte is er een consortium opgezet onder de naam Praetorian. Dit consortium, een door de Europese Unie gesubsidieerd doctoraal netwerk, zal zich richten op het ontwikkelen van nieuwe diagnostica en therapieën die bij de behandeling van sepsis kunnen worden ingezet. Hierbij zullen tien promovendi in vijf verschillende Europese universitaire expertisecentra – Universiteit van Uppsala (Zweden);

'Met het nieuwe arsenaal aan diagnostische en therapeutische moleculen wordt geprobeerd om de vicieuze cirkel te doorbreken en een behandeling mogelijk te maken'



Kanin Wichapong en Gerry Nicolaes schrijven samen de Europese aanvraag en zitten beide in het management board van het consortium.

‘Als histonen de celkern verlaten kunnen ze een actieve rol spelen bij de afweer tegen allerhande microben’

Universiteit van Münster (Duitsland); Universiteit van Parijs; Universiteit van Barcelona en Universiteit van Maastricht – met elkaar samenwerken. Het netwerk is expliciet verschillende specialisten samen: drug design, medicinale chemie, fysiologie, microscopie, biochemie, interne en intensieve geneeskunde, pathologie, microbiologie en zal in staat zijn om nieuwe moleculen te testen zowel in vitro als ook in vivo in zeevarkens, muizen en varkens. Er zal expliciet aandacht besteed worden aan de rol die

NETose speelt in het ontstaan en ontwikkelen van sepsis. Het onderzoek zal zich richten op verschillende doelmoleculen, allen betrokken bij het ontstaan van NETs. Ook de extracellulaire histonen zullen een grote rol spelen bij het onderzoek.

RATIONELE BENADERING

Uitgaande van moderne, door kunstmatige intelligentie ondersteunde methoden van computationele medicijnontwikkeling, zullen nieuwe moleculen – die kunnen dienen als geneesmiddel – gericht worden ontwikkeld. Op basis van de opgedane kennis met nieuwe actieve moleculen kunnen tegelijkertijd nieuwe snelle methodes worden ontwikkeld die gebruikt zullen worden bij de ontwikkeling van nieuwe en snelle diagnosemethodes om sepsis al in een vroeg stadium te kunnen opsporen, zodat een gerichte therapie kan worden ingezet. Immers, een remmer die een hoge affiniteit voor een doeleiwit bezit, kan in principe ook dienen als basis voor de analyse van een dergelijk doeleiwit. Door conjugatie van fluorescente probes, antilichaam fragmenten of chelatoren voor radioactieve

‘De hoop is dat een betere behandeling van sepsis in de nabije toekomst een realiteit kan worden’

probes zullen diagnostische moleculen voor zowel in vitro als in vivo toepassingen worden getest. Met het nieuwe arsenaal aan diagnostische en therapeutische moleculen wordt geprobeerd om de eerder genoemde viceuze cirkel te doorbreken en een behandeling mogelijk te maken die is afgestemd op de individuele patiënt.

De op te leiden promovendi zullen bovendien de mogelijkheid krijgen om in te spelen op de behoeften die er in de kliniek bestaan door betrokkenheid van intensieve care-specialisten als ook (sepsis) patiëntenorganisaties uit Nederland, Zweden, Duitsland en Frankrijk. Alle studenten zullen naast onderzoek en onderwijs aan hun thuisinstituut, ook deelnemen aan onderzoek binnen een andere onderzoeksgroep van het consortium om zo de verweving tussen de verschillende onderzoekslijnen te bevorderen en meerdere aspecten van het preklinische geneesmiddelenonderzoek. Zo zullen bijvoorbeeld de in silico drug design kandidaten ervaring opdoen met in vitro en in vivo modellen en in staat gesteld worden bij te dragen aan de verdere ontwikkeling van nieuwe bioactieve moleculen. Klinische en preklinische projecten worden gekoppeld om optimaal van elkaars kennis gebruik te kunnen maken. Naast de academische inbreng zijn ook commerciële partijen betrokken bij het consortium. Hierdoor wordt niet alleen gewaarborgd dat eventuele nieuwe therapeutica en diagnostica snel hun weg kunnen vinden naar de kliniek. Tevens wordt hierdoor kennis vanuit de for-profit sector ingebracht, noodzakelijk om nieuwe inzichten en moleculen daadwerkelijk tot bij de patiënt te brengen. Deze kennis is een expliciet deel van de brede opleidingsplannen van de tien betrokken promovendi.

De selectie van kandidaat promovendi is op het moment van dit schrijven bijna afgerond en de beste kandidaten, komend vanuit heel de wereld, starten vanaf de zomer met hun projecten. Aan de Universiteit Maastricht heeft de officiële en feestelijk aftrap in juni plaats gevonden. Met dit initiatief, mogelijk gemaakt door het Horizon programma van de EU, worden dus tien onderzoekers opgeleid, die zich volledig kunnen richten op het grote medische probleem waarvoor sepsis dagelijks de intensieve care units stelt. De hoop is dat een betere behandeling van sepsis in de nabije toekomst een realiteit kan worden.

SEPSIS

Sepsis, in de volksmond ook wel bloedvergiftiging genoemd, is de reactie van het lichaam op een infectie die zo ernstig verloopt dat hierdoor ook gezonde weefsels beschadigd raken. In ernstige gevallen leidt dit tot uitval van organenfuncties en tot de dood. Een studie uit 2017 becijferde dat wereldwijd er jaarlijks bijna 49 miljoen sepsisgevallen zijn, waarvan bijna 20 procent een fatale afloop kende. Sepsis kan iedereen treffen, van jonge kinderen tot ouderen. Het ziekteverloop kan heel snel gaan en een schijnbaar onschuldige infectie kan in sommige gevallen binnen enkele dagen leiden tot een opname op de intensive care. Sepsis en sepsische shock zijn dus zeer ernstige ziektebeelden. Patiënten die op de intensive care worden opgenomen, hebben een kans op overlijden van zo'n 30 tot 40 procent. Ook bij patiënten die een milder verloop van de ziekte hebben, blijven restklachten soms lang bestaan. •

MEER INFORMATIE

Meer informatie over het consortium kan worden gevonden op:



REFERENTIES

1. BF Miller, R Abrams, A Dorfman, M Klein, ANTI-BACTERIAL PROPERTIES OF PROTAMINE AND HISTONE. *Science*. 1942 Nov 6;98(24):427-428-30
2. V Brinkmann, U Reichard, C Goossmann, B Fauler, Y Uhlemann, DS Weiss, Y Weinrauch, A Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5
3. J Xu, X Zhang, R Peiyao, M Menestier, CT Annolli, F Semeraro, FB Taylor, NL Esmon, F Lupu, CT Esmon, *Nat Med*. 2009 Nov;15(11):1318-
21. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis.
4. KE Rudd, SC Johnson, KH Agosta, KA Shackelford, D Tsai, DR Kiewan, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* (London, England). 2020;394(10219):200-11.
5. TO Buchman, SO Simpson, KI Sciarretta, KP Firme, N Sowers, M Collier et al. Sepsis Among Medicare Beneficiaries: 1. The Burden of Sepsis. 2012-2018. *Crit Care Med*. 2020 Mar;48(3):276-288.