

Extracellular histone H3

Citation for published version (APA):

Beurskens, D. M. H. (2020). *Extracellular histone H3: biomarker and therapeutic target for the prevention of tissue damage*. Ridderprint. <https://doi.org/10.26481/dis.20200320db>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20200320db](https://doi.org/10.26481/dis.20200320db)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Summary

The present thesis aimed at studying the role of extracellular histones in processes of tissue injury, with a particular focus on organ preservation and inflammation. A second aim was to investigate the neutralization of extracellular histones in the aforementioned conditions. We specifically looked at activated protein C (APC) and heparin, which were engineered such as to reduce their anticoagulant activities whilst retaining or improving their affinity towards extracellular histones.

Chapter 1 introduces the main topics of this thesis. It gives a general overview on the functions of histone proteins inside and outside the cell. The different modes of extracellular histone release as well as pathological consequences of this release are discussed. APC and heparin, two biomolecules with anticoagulant and cell protective properties, are likewise described. Both are also able to inactivate cytotoxic histones. Reducing the anticoagulant properties of these biomolecules, whilst retaining their cell protective characteristics, could result in safer treatment strategies in several disease states. Finally, the outline and aims of this thesis are given.

Chapter 2 summarizes the diverse properties of the polysaccharide heparin. This compound has been employed as an anticoagulant since its initial discovery. Over the last decades also many nonanticoagulant functions of heparin have been described and these are summarized here. The anti-metastatic, anti-apoptotic and anti-inflammatory functions of heparin provide a variety of applications in, for example, cancer and inflammatory conditions. Elimination of the anticoagulant properties of heparin could circumvent a potential bleeding risk that is associated with the use of conventional heparins in various diseases and result in a safer heparin formulation.

Chapter 3 studies the presence of extracellular histones in donation after circulatory death (DCD) kidneys that were subsequently transplanted. These kidneys are preserved till the time of transplantation using machine perfusion, during which circulating markers can be measured in the machine perfusate. We measured the levels of histone H3 in this perfusate after a 4 hour perfusion period to investigate its potential as a pre-transplant viability marker. We found that higher histone H3 levels were associated with increased rates of non-functioning or delayed functioning kidneys after transplantation. Elevated perfusate histone H3 was also found to be an independent risk factor for one-year graft survival. In addition, these histone levels also correlated with warm ischaemia time, donor creatinine and 3 month serum creatinine. These findings suggest that extracellular histones could potentially be used to assess post-transplantation outcomes.

Chapter 4 investigates the presence of extracellular histones in ischemically damaged kidneys in more detail. For this we first validated an *ex vivo* porcine kidney perfusion model. In this model, different extents of ischemic damage were inflicted upon two

kidneys from the same animal by perfusion at 4 degrees (hypothermic machine perfusion or HMP) or 28 degrees (subnormothermic machine perfusion or SNMP). Using this model, we observed that the appearance of extracellular histones in the perfusate is both time- and ischemia-dependent, with higher levels in the SNMP kidneys than in the HMP kidneys. Overall morphology and brush border integrity in nephrons, as analyzed by microscopy, after 4 hours did not differ between both groups. Immunohistochemical analysis suggested that the extent of cell death was higher in SNMP kidneys as compared to HMP kidneys. The application of heparin during SNMP did not result in a change of total extracellular histone H3 levels in the perfusate. It did, however, result in earlier and increased perfusate levels of a lower molecular weight form of histone H3 as compared to untreated kidneys. The exact origin and implications of this histone product remain to be determined.

Chapter 5 describes glycocalyx degradation in sepsis within 24 hours of intensive care admission. We studied the glycocalyx using non-invasive imaging and analysis of circulating plasma markers. An increase in glycocalyx degradation was observed in non-survivors of sepsis as indicated by both an increased perfused boundary region (PBR) and plasma syndecan-1. The PBR correlated with the permeability marker angiopoietin-2 (Ang-2), but not with syndecan-1 or other markers. PBR and syndecan-1 are therefore independent predictors of sepsis mortality in this cohort. Additional studies should investigate the potential value of the PBR in clinical patient monitoring.

Chapter 6 explores the use of novel APC variants for the proteolytic inactivation of cytotoxic histones *in vitro*. *In silico* docking and molecular dynamics simulations revealed the key residues of APC that are involved in its interaction with histone H3. The interaction between wildtype-APC and histone H3 was then optimized to produce new APC variants that were predicted to have enhanced proteolytic properties towards histones. In these variants, simultaneous mutations were introduced that were predicted to reduce APC's anticoagulant activities. Indeed, the produced APC variants all had reduced anticoagulant activity as compared to wildtype-APC. However, the new APC variants were no better at cleaving histones as compared to both wildtype-APC and the better known 5A-APC variant. This can possibly be explained by the fact that the new APC variants bind too strongly to their substrate or reaction products, resulting in an overall reduced proteolytic activity. Further characterization of these novel variants should assess their potential as therapeutics in histone-mediated diseases.

Finally, the results are critically discussed in Chapter 7. In this chapter, the clinical relevance of the main findings of this thesis are debated in the context of existing literature and current practice.

Samenvatting

Samenvatting

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was gericht op het bestuderen van de rol van extracellulaire histonen in condities geassocieerd met weefselschade, met een specifieke focus op orgaanpreservatie en ontsteking. Een tweede doel was om de neutralisatie van extracellulaire histonen in de bovengenoemde situaties te onderzoeken. We hebben specifiek gekeken naar geactiveerd proteïne C (APC) en heparine, die moleculair veranderd waren om hun antistollende activiteiten te verminderen, terwijl de affiniteit voor extracellulaire histonen behouden of verbeterd werd.

Hoofdstuk 1 introduceert de belangrijkste onderwerpen van dit proefschrift. Het geeft een algemeen overzicht van de functies van histoneiwitten binnen en buiten de cel. De verschillende manieren van extracellulaire histon afgifte evenals de pathologische gevolgen hiervan worden besproken. APC en heparine, twee biomoleculen met antistollende en celbeschermende eigenschappen, worden ook beschreven. Beiden zijn ook in staat cytotoxische histonen te inactiveren. Het verminderen van de antistollende eigenschappen van deze moleculen, terwijl ze hun cel beschermende eigenschappen behouden, zou kunnen resulteren in veiligere behandelingen voor verscheidene aandoeningen. Tenslotte worden de hoofdlijnen en doelstellingen van dit proefschrift besproken.

Hoofdstuk 2 beschrijft de diverse functies van de polysaccharide heparine. Deze stof wordt al sinds z'n ontdekking gebruikt als antistollingsmiddel. De afgelopen decennia worden echter ook verschillende niet-antistollende functies aan heparine toegeschreven, welke in dit hoofdstuk zijn samengevat. De anti-metastatische, anti-apoptotische en ontstekingsremmende functies van heparine zorgt voor een diversiteit aan toepassingen in bijvoorbeeld kanker en ontstekingsziekten. Het wegnemen van de antistollende eigenschappen van heparine dat gepaard gaat met het gebruik van conventionele heparines zou daarom een eventueel bloedingsrisico in deze ziektebeelden kunnen omzeilen.

Hoofdstuk 3 bestudeert de aanwezigheid van extracellulaire histonen in nieren van donoren die zijn overleden na een circulatiestop en welke vervolgens zijn getransplanteerd. Deze nieren worden tot transplantatie bewaard met behulp van machine perfusie, waarbij circulerende markers gemeten kunnen worden in het machine perfusaat. Wij hebben histon H3 levels in dit perfusaat gemeten na 4 uur machine perfusie en onderzochten de bruikbaarheid ervan als marker van orgaankwaliteit vóór transplantatie. Wij vonden dat hogere histon H3 levels geassocieerd waren met het niet of vertraagd functioneren van een nier na transplantatie. Een verhoogd perfusaat histon H3 level vormde ook een onafhankelijke risicofactor voor het 1 jaar overleven van het getransplanteerde orgaan. Daarnaast correleerden deze histon levels ook met warme ischemie tijd, donor creatinine,

en serum creatinine levels na 3 maanden. Deze bevindingen suggereren dat extracellulaire histonen mogelijk gebruikt kunnen worden om zowel functie als overleving van het orgaan na transplantatie te voorspellen.

Hoofdstuk 4 onderzoekt de aanwezigheid van extracellulaire histonen in ischemisch beschadigde nieren in meer detail. Hiervoor hebben we eerst een *ex vivo* varkensnier perfusiemodel gevalideerd. In dit model werden verschillende niveaus van ischemische schade toegebracht aan twee nieren van hetzelfde dier, door de perfusie uit te voeren bij 4 graden (hypotherme machine perfusie of HMP) of bij 28 graden (subnormotherme machine perfusie of SNMP). Met behulp van dit model hebben we waargenomen dat het verschijnen van extracellulaire histonen in het perfusaat zowel tijds- als ischemieafhankelijk is, met hogere levels in SNMP nieren dan in HMP nieren. De algemene morfologie en brush border integriteit in nefronen na 4 uur perfusie, zoals geanalyseerd met behulp van microscopie, verschilden niet tussen beide groepen. Immunohistochemische analyse suggereerde dat de mate van celdood wel hoger was in SNMP nieren in vergelijking met HMP nieren. De toepassing van heparine tijdens SNMP veranderde niet de totale hoeveelheid van extracellulaire histonen in het perfusaat. Het resulteerde echter wel in eerdere en verhoogde perfusaat levels van een histon H3 vorm met een lager moleculair gewicht. De exacte oorsprong en implicaties van dit product moeten nog worden onderzocht.

Hoofdstuk 5 beschrijft de afbraak van de glycocalyx in sepsis binnen 24 uur na opname op de intensive care. We hebben de glycocalyx bestuurd met behulp van niet-invasieve beeldvorming en analyse van circulerende plasma markers. Een toename van de glycocalyx degradatie werd waargenomen bij niet-overlevenden van sepsis zoals blijkt uit een verhoogde perfused boundary region (PBR) en verhoogde syndecan-1 in plasma. De PBR correleerde met de permeabiliteitsmarker angiopoëtin-2 (Ang-2), maar niet met syndecan-1 of andere markers. PBR en syndecan-1 zijn dus onafhankelijke voorspellers van sepsis mortaliteit in dit cohort. Aanvullende studies zullen de potentiële waarde van de PBR in het klinisch monitoren van patiënten verder moeten onderzoeken.

Hoofdstuk 6 verkent het gebruik van unieke APC-varianten voor de proteolytische inactivatie van cytotoxische histonen *in vitro*. *In silico* moleculaire simulatie studies onthulden de belangrijkste residuen in APC die betrokken zijn bij de interactie met histon H3. De interactie tussen wildtype-APC en histon H3 werd vervolgens geoptimaliseerd om nieuwe APC-varianten te produceren waarvan werd voorspeld dat ze verbeterde proteolytische eigenschappen hadden met betrekking tot histonen. In deze varianten werden gelijktijdige mutaties geïntroduceerd waarvan werd voorspeld dat ze APC's antistollende activiteiten zouden verminderen. De geproduceerde APC-varianten hadden allen inderdaad een verminderde antistollende activiteit in vergelijking met wildtype-APC. De nieuwe APC varianten waren echter niet beter in het knippen van histonen in vergelijking met zowel wildtype-APC als de bekende 5A-APC variant. Dit kan mogelijk

worden verklaard doordat de nieuwe APC-varianten grofweg te sterk binden aan hun substraat of reactieproducten, wat resulteert in een algeheel verminderde proteolytische activiteit. Verdere karakterisering van deze nieuwe varianten zou daarom hun potentieel als therapeutica in histon-gemedieerde ziekten moeten beoordelen.

Tot slot worden de resultaten kritisch bediscussieerd in Hoofdstuk 7. In dit hoofdstuk wordt ook de klinische relevantie van de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift besproken in de context van bestaande literatuur en de huidige praktijk.