

VU Research Portal

Discovery of the wound-healing capacity of salivary histatins

Oudhoff, M.J.

2010

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Oudhoff, M. J. (2010). *Discovery of the wound-healing capacity of salivary histatins*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

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

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Nederlandse samenvatting

Een bijzondere eigenschap van de mond is dat wondgenezing er over het algemeen sneller gaat dan in de huid. Maar een wond in de mond geneest niet alleen sneller, dit proces gaat ook met minder ontsteking gepaard en het heeft minder vaak littekenvorming tot gevolg. Dat speeksel hierbij een belangrijke rol speelt, werd al heel lang aangenomen. Echter, de exacte componenten die hiervoor verantwoordelijk zijn, zijn lang onbekend gebleven. De voornaamste reden hiervoor was dat er onvoldoende technieken waren om speeksel, een zeer complex en moeilijk te bestuderen vloeistof, op moleculair niveau te karakteriseren. Het onderzoek in dit proefschrift beschrijft de ontdekking van een nieuw wondgenezings-bevorderende component uit humaan speeksel: histatine. Naast de ontdekking van histatine als wondgenezings-bevorderende component, is een aanzienlijk deel van dit proefschrift gewijd aan onderzoek naar werkingsmechanisme van histatine.

Het tweede hoofdstuk beschrijft de ontdekking van histatine als wondhelende component in speeksel. We hebben in het laboratorium geprobeerd om wond genezing na te bootsen. Een belangrijk onderdeel van wondgenezing is re-epithelialisatie, het dichtgroeien van een wond doordat het aan de wond grenzende, gezonde, epitheel over de wond groeit en zodoende de wond sluit. Het model dat we in het laboratorium hebben ontwikkeld is als volgt: op een petrischaal worden epitheelcellen (de cellen die verantwoordelijk zijn voor het dichtgroeien van een wond) opgekweekt zodat ze de hele bodem van de petrischaal bedekken. Dan wordt een kras (de wond) gemaakt in de dichte laag epitheelcellen. Vervolgens kan worden gemeten hoe snel de kras weer dichtgroeit. Als zo'n kras behandeld was met speeksel groeide zij veel sneller dicht dan een kras zonder behandeling. Met andere woorden, speeksel stimuleert ook "genezing" van wonden die in het laboratorium gemaakt worden. De vervolgvraag was simpel: wat in speeksel zorgt er nu voor dat de kras sneller dichtgroeit? Deze vraag hebben we beantwoord door speeksel in afzonderlijke fracties te scheiden met behulp van vloeistofchromatografie. Uiteindelijk kwamen we er achter dat er maar één component actief was in speeksel. De fractie met dit molecuul hebben we geanalyseerd en het bleek enkel histatine te bevatten. Naast de ontdekking van histatine als wondgenezings-bevorderende component, bepaalden we ook in dit hoofdstuk dat wondgenezing zoals we dat in het laboratorium doen afhankelijk is van een specifiek activeringssysteem in de epitheel cel, genaamd Erk1/2.

Het derde hoofdstuk is een vervolgstudie welke dieper ingaat op een aantal zaken waar we in het eerste hoofdstuk niet aan toegekomen waren. In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat ook bij cellen die direct uit de mond komen, de celmigratie gestimuleerd wordt. In het tweede hoofdstuk hebben we voor de experimenten namelijk uitsluitend gebruik gemaakt van epitheelcellen die afkomstig waren van een cellijn. Een cellijn heeft als voordeel dat zij eeuwig doorgroeit, maar als nadeel dat ze niet altijd representatief zijn voor de mens. Bij primaire cellen, cellen die dus direct uit de mond komen, is dit meer het geval. Ook onderzochten we mucinen, de eiwitten die speeksel plakkerig maken, en hun rol in wondgenezing. Uit onze bevindingen kunnen we echter niet afleiden of mucinen nu wel of niet een prominente rol spelen in de wondgenezing van de mond.

In het vierde hoofdstuk bestuderen we het effect van histatine in een complex wondmodel dat in artificiële huid gemaakt is. Ook hier zien we versnelde wondgenezing door histatine. Een volgende stap is om het te testen in dier of mens, iets wat hopelijk in de nabije toekomst gedaan zal worden. Daarnaast wordt in dit hoofdstuk gekeken welk gedeelte van histatine nu het werkzame deel is. We hebben het kleinste stuk molecuul (het minimale domein) geïdentificeerd dat nodig is voor activatie van het wondhelingsproces, en doen een bijzondere vondst. Door het cyclisch maken van het normaal gesproken lineaire histatine verhogen we de activiteit maar liefst 1000 keer. Deze bijzondere vinding schrijven we toe aan het feit dat cyclische peptiden makkelijker een binding aangaan met de receptor op een epitheel cel. De receptor is als het ware een schakelaar welke op haar beurt ervoor zorgt dat de cel wordt 'aangezet' om te gaan migreren. Uiteindelijk leiden deze processen tot versnelde wondgenezing.

Histatine is mogelijk niet het enige molecuul in zijn soort dat wondgenezingsbevorderende eigenschappen bezit. In hoofdstuk vijf vergelijken we histatine met LL-37, het meest bestudeerde molecuul van het type waar histatine ook onder geschaard wordt. We vonden dat histatine waarschijnlijk op een andere manier cellen stimuleert dan LL-37. In tegenstelling tot LL-37 bleek histatine niet toxisch, ook niet bij extreem hoge concentraties. Verder heeft histatine geen invloed op ontstekingsreacties van cellen, terwijl LL-37 hier wel een duidelijk effect op had. We concluderen dan ook dat histatine eigenlijk niet thuis hoort in het type moleculen waar LL-37 wel toe behoort.

In hoofdstuk zes bekijken we een specifiek onderdeel van de regulering van de histatine activiteit, namelijk de opname van histatine door de cel. Door histatine op te nemen kan een cel ervoor zorgen dat er niet continu activering plaatsvindt. Immers, de activerende component (histatine) wordt weggenomen uit de omgeving door deze cellulaire opname. Zodoende reguleert een cel haar activering. Een interessante bevinding is dat de opname van histatine zich niet verhoudt met de activering. Met andere woorden, de mate waarin histatine cellen activeert verhoudt zich niet met de snelheid waarmee histatine wordt opgenomen. We vermoeden dat voor de opname een primaire interactie nodig is met de receptor (de eerder genoemde schakelaar), terwijl voor de activering een secundaire interactie nodig is.

Na onze bijzondere vinding in hoofdstuk 4, dat cyclisch histatine veel actiever is dan lineair histatine, zouden we graag vervolgonderzoek doen naar cyclische varianten. Echter, het maken van cyclisch histatine op de traditionele manier is zo complex en intensief, dat het vervolgonderzoek onmogelijk is. Daarom hebben we een nieuwe methode ontwikkeld om histatine cyclisch te maken, met behulp van een specifiek enzym. Dit is beschreven in hoofdstuk 7. Deze methode beperkt zich niet tot histatine, en zal dus ook in andere onderzoeksgebieden gebruikt kunnen worden. Met deze methode in handen, konden we snel en nauwkeurig laten zien dat het cyclisch histatine een hogere affiniteit heeft voor de cellulaire receptor, en dat dit dus waarschijnlijk de reden is dat het beter werkt dan de lineaire variant.

Dit proefschrift beschrijft de ontdekking en karakterisering van histatine, een molecuul dat exclusief in speeksel aanwezig is, en niet in andere lichaamsvloeistoffen zoals zweet. Tevens hebben we tot dusver geen mogelijk negatieve effecten op wondgenezing kunnen vinden. En, we laten zien dat door een verandering in de molecuul structuur aan te brengen (lineair naar cyclisch) het molecuul veel effectiever wordt.