



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Biochemical and molecular studies of atypical nevi

Nieuwpoort, A.F. van

Citation

Nieuwpoort, A. F. van. (2011, March 16). *Biochemical and molecular studies of atypical nevi*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/16632>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/16632>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Nederlandse samenvatting

Het aantal gevallen van huidkanker, waaronder melanoom, neemt nog steeds toe in de westerse wereld. Melanoom ontstaat uit pigment producerende cellen, melanocyten. De belangrijkste factoren die het risico op het verkrijgen van een melanoom verhogen zijn lichte huids-, oog- en haarkleur, verbranding op jonge leeftijd en de aanwezigheid van meerdere moedervlekken. Moedervlekken zijn goedaardige opeenhopingen van melanocyten in de huid. Naast normale, goedaardige moedervlekken bestaan er nog onrustige (dysplastische / atypische) moedervlekken (nevus, meervoud nevi). Nevi en in het bijzonder atypische nevi worden gezien als voorloper stadium van het melanoom. In de ontwikkeling naar melanoom onderscheidt men vaak de volgende stappen: een normale melanocyt groeit uit tot een nevus. Deze nevus kan zich ontwikkelen tot een atypische nevus die zich, soms na jaren, kan ontwikkelen tot een melanoom dat zich uiteindelijk kan verspreiden naar andere organen (uitzaaien).

Dit proefschrift beschrijft de resultaten van fundamenteel biochemisch onderzoek, genexpressie onderzoek (genomics) en eiwit onderzoek (proteomics) om verschillen tussen normale melanocyten en atypische melanocyten te bepalen. Hierdoor wordt meer inzicht verkregen in de biologische processen die een rol spelen in de vroege vorming van het melanoom, de verandering van een normale melanocyt in een atypische melanocyt.

In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift is het belangrijkste specifieke biochemische proces kenmerkend voor de melanocyt, de pigment aanmaak, nader bestudeerd. Twee soorten pigment kunnen worden onderscheiden, het lichte feomelanine en het donkere eumelanine. In gekweekte melanocyten van individuen met een licht en een donker huid type werd locatie van de pigment aanmaak, de totale hoeveelheid en het soort pigment bestudeerd.

In de gekweekte melanocyten blijken beide soorten pigment in hetzelfde organel, het melanosoom gevormd te worden, waarbij het lichte huidtype een voorkeur heeft voor de productie van feomelanine, een situatie die overeenkomt met de intacte huid in een persoon. Hiermee toonden we aan dat ons kweekmodel gebruikt kan worden voor verdere pigment gerelateerde studies.

In **hoofdstuk 3** is de hoeveelheid en het soort pigment in archief materiaal van de verschillende melanoom ontwikkelingsstadia, te weten normale nevi, atypische nevi en melanoom bepaald. We konden aantonen dat atypische melanocyten het meeste feomelanine bevatten in vergelijking met normale melanocyten, normale nevi en melanoom. Eerder onderzoek wees uit dat vooral tijdens de feomelanine productie de zogenaamde tussenproducten (intermediären) uit het melanosoom kunnen lekken. Deze feomelanine intermediären zijn bijzonder reactief en kunnen met componenten zoals eiwitten, ferritine, maar ook andere organellen zoals het mitochondrion (de energiefabriek van de cel), in het cytoplasma van de melanocyt reageren. Bij deze reactie worden reactieve zuurstof deeltjes (reactive oxygen species, ROS) gevormd. ROS zijn zeer reactief en kunnen op hun beurt schade aan de cel, waaronder het erfelijk materiaal van de cel, het DNA, toebrengen. We zijn de eerste onderzoeksgroep die laat zien dat atypische melanocyten in vergelijking met normale melanocyten een verhoogd feomelanine productie, ijzer niveau en een verhoogd niveau aan ROS hebben. Daarnaast konden we aantonen dat atypische melanocyten een toename laten zien in oxidatieve stress gerelateerde DNA schade (**hoofdstukken 3 en 4**).

Als in een cel teveel oxidatieve DNA schade optreedt, kan dit schadelijk zijn en uiteindelijk tot geprogrammeerde cel dood leiden. Cellen bezitten daarom beschermingsmechanismen, o.a. in de vorm van antioxidant enzymen, om ROS niveaus te verlagen. Voor de aanmaak van één van deze enzymen, glutathion, wordt dezelfde bouwsteen (aminozuur) gebruikt als bij de productie van feomelanine.

Onze hypothese is dan ook dat verhoogde feomelanine productie kan leiden tot een verlaging van glutathion. In de atypische melanocyten, met een verhoogde feomelanine synthese, is er inderdaad sprake van een verlaging van glutathion (**hoofdstuk 4**). Deze verlaging van glutathion kan bijdragen aan de toename van ROS in de atypische melanocyt en uiteindelijk leiden tot oxidatieve DNA schade. Cellen hebben herstelmechanismen om DNA schade te verwijderen. Echter deze herstelmechanismen zijn niet in staat alle DNA schade te repareren. Dit kan leiden tot een werkelijk verandering (mutatie) in genen in het DNA die een atypische melanocyt de mogelijkheid geeft zich te ontwikkelen tot melanoom. Echter het aantal bekende genmutaties in de vroege melanoom ontwikkelingsstadia zijn beperkt en zijn tot nu toe slechts voor een klein aantal genen onderzocht.

In **hoofdstuk 5** hebben we gebruik gemaakt van de microarray techniek om meer inzicht te verkrijgen in genexpressie verschillen die mogelijk ten grondslag liggen aan DNA schade van duizenden genen tussen normale en atypische melanocyten. Door nu de verschillen in genexpressie van normale en atypische melanocyten van een individu te vergelijken kunnen genen worden gevonden die betrokken zijn bij de overgang van een normale naar een atypische melanocyt. De verschillen in genexpressie die tussen normale en atypische melanocyten van dezelfde persoon werden gevonden waren klein. Echter een nauwkeuriger gen ontologie (GO) analyse, waarbij wordt gekeken naar verschillen tussen groepen genen in plaats van individuele genen, toonde aan dat in atypische melanocyten de meest significante (verlaagde) genexpressie werd gevonden in de categorie “organellen”. Dit betrof vooral genen die een rol spelen bij de functie van mitochondria. De verlaging van deze genen wijst er op dat mitochondria in atypische melanocyten niet goed functioneren.

Door dit niet goed functioneren, kunnen ROS uit het mitochondrion lekken en dragen zo bij aan de oxidatieve stress niveaus in de cel. Daarnaast kunnen zowel de feomelanine intermediären als ROS met de mitochondria zelf reageren waardoor er afwijkingen in de morfologie kunnen ontstaan, hetgeen inderdaad voor atypische melanocyten en melanoom cellen kon worden aangetoond. Daarnaast werden in atypische melanocyten genen verlaagd tot expressie gevonden die een rol spelen bij de regulatie van de zuurgraad (pH) van organellen. Dit kan van belang zijn voor de intermediären van de pigment synthese die reactiever zijn bij een hogere pH. Deze verhoogde reactiviteit van de feomelanine intermediären kan dan weer leiden tot verhoogde oxidatieve stress levels in de atypische melanocyt. Het is gebleken dat de belangrijkste overeenkomst tussen de verschillende categorieën die met de GO-analyse gevonden werden, die van oxidatieve stress is. Dit is een aanwijzing voor de belangrijke rol van oxidatieve stress bij de transitie van een normale naar atypische melanocyt.

Functies in een cel worden uiteindelijk door eiwitten en enzymen uitgevoerd. Het eiwit ondergaat hiervoor meestal nog een bewerking. Ook veranderingen in deze bewerkingen kunnen melanoom ontwikkeling dirigeren.

Vanwege het feit dat veranderingen in eiwitten niet terug te vinden zijn op genexpressie niveau hebben we eiwitexpressie verschillen bekeken van dezelfde cellen zoals deze gebruikt zijn in hoofdstuk 5 (**hoofdstuk 6**). Hierbij hebben we gebruik gemaakt van een techniek waarmee we de expressieverschillen van een groot aantal eiwitten van normale en atypische melanocyten van 1 persoon in 1 experiment hebben bestudeerd. Ook uit deze eiwitstudie blijkt dat de atypische melanocyt in vergelijking met de normale melanocyt een lagere capaciteit heeft om met oxidatieve stress om te gaan en bevestigt de bevindingen van onze biochemische studies en genexpressie studie.

Daarnaast toonde de eiwit analyse ook aan dat atypische melanocyten, in tegenstelling tot normale melanocyten, een lager niveau aan eiwitten hebben die een rol spelen bij de vorming en organisatie van het cytoskelet in de cel. Het cytoskelet van de cel speelt o.a. een rol bij de vorm en mobiliteit van de cel. Anderen hebben onderzocht dat ROS een effect op het cytoskelet heeft en dit zou in een later stadium een rol bij uitzaaiing kunnen spelen. Het was al bekend dat de intermediären van de feomelanine synthese ook een effect kunnen hebben op het cytoskelet van de cel. Vooral in atypische melanocyten kan dit van belang zijn omdat daar een verhoging van feomelanine synthese plaatsvindt.

De inhoud van dit proefschrift toont aan dat oxidatieve stress, vooral veroorzaakt door de verhoogde feomelanine pigment productie aanwezig is in de vroege stadia van melanoomontwikkeling. Deze oxidatieve stress kan leiden tot oxidatieve DNA schade en uiteindelijk DNA mutaties, die er voor zorgen dat een atypische melanocyt die zich uiteindelijk verder kan ontwikkelen tot een melanoom. Oxidatieve DNA schade is duidelijk aangetoond in de atypische melanocyt, echter de uiteindelijke DNA mutaties in kritische melanoomgenen dienen nog steeds te worden aangetoond. Opvallend is wel dat melanoomcellen in staat zijn te overleven in aanwezigheid van hoge oxidatieve stress niveaus. Zoals gezegd kunnen hoge oxidatieve stress niveaus toxisch zijn voor de cel zijn. Omdat melanoom cellen toch kunnen overleven onder deze condities, wordt door anderen gesuggereerd dat melanoom cellen een antioxidant netwerk hebben ontwikkeld. Dit antioxidant netwerk is in staat de ROS levels te beperken waardoor de melanoom cel toch kan overleven onder deze ongunstige condities. Wat dit antioxidant netwerk precies omvat, is nog niet geheel duidelijk. Echter dit netwerk zou op termijn een nieuwe mogelijkheid bieden voor therapeutische interventie van late melanoom progressie stadia, een interventie die zeer gewenst is om het overlijden aan melanoom terug te dringen.