



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Modelling metastatic melanoma in zebrafish**

Groenewoud, A.

### **Citation**

Groenewoud, A. (2022, June 7). *Modelling metastatic melanoma in zebrafish*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3307649>

Version: 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/1887/3307649>

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

## Nederlandse samenvatting

### **Etiologie van kanker**

Kanker is een complexe, cellulaire ziekte. Kanker ontstaat als een cel in het lichaam door middel van een reeks mutaties, ontsnapt uit de gecontroleerde cyclus van celdeling en celdood. Twee mutaties kunnen genoeg zijn om zowel geprogrammeerde celdood als ongeremde celdeling te bevorderen. Elke normale cel heeft oncogenen en tumorsuppressorgen. Oncogenen (bijvoorbeeld onderdelen van de RAS-RAF-MEK-ERK signaaltransductie route) zijn genen die ervoor zorgen dat celdeling versneld wordt. Een tumorsuppressorgen (bijvoorbeeld P53 eiwit) doet het omgekeerde en kan het vermeerderen van cellen stilleggen. Het uitschakelen van de functie van deze genen heeft daarom een pro-tumor-werking. Een kankercel is een ontspoorde cel met gemuteerde oncogenen en/of tumorsuppressorgen die veel meer, sneller en ongecontroleerd zal delen en niet reageert op controlemechanismen die normaliter invloed hebben op gezonde cellen. Kanker ontstaat na een opstapeling van meerdere fouten en mutaties, door middel van bijvoorbeeld mutaties in het eiwit P53, aangevuld met een mutatie die verantwoordelijk is voor het versneld en ongeremd delen van de cellen (bijvoorbeeld door een activerende mutatie in een RAS- of RAF-eiwit als onderdeel van de RAS-RAF-MEK-ERK signaaltransductieroute). De tumor die hieruit gevormd wordt is een evolutionaire microkosmos waarin een continue strijd is tussen verschillende populaties cellen. Dit zorgt ervoor dat kankercellen zich aan een toenemende selectiedruk aanpassen, wat uiteindelijk tot uitzaaiingen zal leiden.

### **Melanoomontwikkeling en cel van herkomst**

Melanoom is een type kanker dat ontstaat uit melanocyten. Deze gepigmenteerde cellen functioneren in de huid als een producent van melanine, een pigment dat door middel van opname in keratinocyten de onderliggende huidcellen beschermt tegen ultraviolette straling (UV). Deze UV-straling zorgt in de huid voor DNA-schade door middel van de productie van intracellulaire reactieve zuurstof (ROS). Deze DNA-schade leidt tot een toename van DNA-mutaties en is direct gekoppeld aan een toename in huidkanker.

Cutane (huid) melanoom is de meest voorkomende vorm van melanoom, en komt het vaakst voor onder Kaukasische (blanke) populatie, en blauwe/groene ogen en een verhoogde kans op verbranden in de zon, zijn risicofactoren. Andere, zeldzamere vormen van melanomen zijn, onder andere melanoom van de conjunctiva en van de uvea. Deze vormen een zeldzamere subgroep van melanomen, en ontwikkelen zich in het oog. Conjunctivale melanomen delen veel karakteristieken van cutane melanomen (dezelfde aandrijvende mutaties i.e. RAS/RAF en worden gekenmerkt door een UV specifiek DNA-schadepatroon). Uveale melanoom ontwikkelt zich uit de melanocyten van de uvea (het *choroides*/vaatvlies, het *corpus cilliare*/straalvormig lichaam en de iris). Dit zeldzame melanoom-subtype heeft weinig overeenkomsten met andere melanomen. De aandrijvende mutaties zijn voornamelijk GNA<sub>Q</sub> en GNA11<sup>11</sup>, GTPases die een hyperactivatie van onder andere RAS bewerkstelligen. Bovendien zijn er geen duidelijke UV DNA-schadepatronen te herkennen en zijn deze tumoren, in tegenstelling tot huidmelanomen, niet sterk gemuteerd. In het geval van uveaal melanoom is er een duidelijke scheiding te maken tussen hoog- en laag-risicopatiënten. Hier is het gebrek aan expressie van BRCA associated protein 1 (BAP1) een zeer sterke indicator van een slechte prognose. Eveneens is het verlies van een kopie van chromosoom 3 (monosomie 3) een prognostische marker voor slecht ziekteverloop.

### **Metastase**

Kankerpatiënten sterven voornamelijk (>90%) aan metastatische kanker (uitzaaiing) en niet aan de primaire tumor. Dit komt doordat metastatische kankercellen in staat zijn om op nieuwe locaties in het lichaam te nestelen en uit te groeien van enkele cellen tot nieuwe metastatische kolonies. Metastase vindt plaats door het infiltreren van bloed- of lymfevaten (intravasatie) om vervolgens uit deze vaten uit te treden. Deze nieuwe metastatische kolonies infiltreren de omringende weefsels en verstoren de functie van de organen, die geïnfilteerd raken door de metastases.

### **Diermodellen in de ontwikkeling van anti-kanker en anti-metastatische behandelingen**

Metastase is een uiterst complex en moeilijk bestudeerbaar proces. Het grootste gedeelte van de zogenaamde “metastatische cascade” vindt plaats buiten de observatiecapaciteiten van de geneeskunde, zowel binnen experimentele als klinische setting. Deze observatie en daarmee analyse wordt bemoeilijkt door het ontraceerbare

en willekeurige aspect van metastatische kankercellen. Naast een aantal mogelijke risico-organen, specifiek voor een bepaalde soort primaire tumor - voornamelijk bepaald door de aanwezige afferente bloedvaten van het aangedane orgaan - is de uiteindelijke metastatische locatie van de meeste tumoren niet te voorspellen. Dit gebrek aan informatie bemoeilijkt het ontwikkelen van behandelingen die zich focussen op bestrijding van metastatische kanker; het stadium waarvoor aanvullende behandelingen juist hard nodig zijn.

Diermodellen vormen hier een noodzakelijke brug tussen het klassieke *in vitro* laboratoriumonderzoek, welke slechts cel-intrinsieke afwijkingen of gedereguleerde cel-cel interacties aan kunnen tonen, en *in vivo* onderzoek, waarbij cel-cel interacties van een hogere complexiteit getest kunnen worden. Bij dit onderzoek worden muizen of, in deze thesis, de zebravislarf (*Danio Rerio*) gebruikt voor het nabootsen van de complexe metastatische cascade, met alle biologische, fysische interacties die een rol spelen in patiënten.

De zebravislarf, een snel ontwikkelende, *ex utero* bevruchte gewervelde met van nature doorzichtige weefsels, stelt ons in staat om niet alleen fluorescente kankercellen tot op het niveau van een enkele cel te volgen gedurende de metastase, maar laat ons ook snel en gemakkelijk nieuwe potentiële behandelingen testen in een levend organisme.

### **Ontwikkeling van ortho- en ectopische modellen voor oogmelanoom**

Om metastatische tumoren te bestrijden moet de intrinsieke complexiteit van de ontwikkeling van metastase zo nauwkeurig mogelijk nagebootst worden. In de zebravis kan zowel het primaire stadium als het metastatische stadium van conjunctivale en uveale melanomen gerecapituleerd worden door het injecteren van kankercellen in de retro-orbitale ruimte (achter het oog) (**Hoofdstuk 2**). Deze methode van injectie maakt het mogelijk om een onderscheid te maken in de efficiëntie van experimentele behandeling, zowel op de primaire tumor als op de metastatische tumor (**Hoofdstuk 3**).

## Reactieve zuurstof in metastase

Hoewel metastase ten grondslag ligt aan het verergeren van het ziektebeeld van patiënten, met uiteindelijk de dood tot gevolg, is het een bijzonder inefficiënt proces. Geschat is dat slechts 1-5% van alle uitzaaiende (disseminerende) kankercellen uiteindelijk een metastase vormt. Deze inefficiëntie verklaart het verschil tussen de vaak grote hoeveelheden disseminerende kankercellen en een kleine (maar alsnog vaak dodelijke) hoeveelheid metastasen. De sterfte van deze disseminerende kankercellen wordt veroorzaakt door een aantal factoren waaraan de cellen van de primaire tumor niet voldoende zijn aangepast. Een van de factoren die als externe selectiedruk functioneert, is reactieve zuurstof (ROS). Daarnaast speelt in het geval van metastaserende melanoomcellen (en andere RAS gedreven tumoren), ferroptose een specifieke rol. Ferroptose is een ijzerafhankelijk celdoodmechanisme, waarbij ROS de oxidatie van vetzuurmoleculen (het hoofdbestanddeel van het celmembraan) - aandrijft, met celdood tot gevolg.

Er zijn tot op heden geen diermodellen die de uitgezaaide vorm van uveaal melanoom recapituleren. Wanneer *in vitro* gecultiveerde cellen in de bloedsomloop van zebravissen geïnjecteerd worden, sterven deze cellen binnen 24 uur, in tegenstelling tot zowel cutane- als conjunctivale melanoomcellen. Wanneer primaire uveale melanoomcellen (opgezuiverd uit zowel muizen als patiënt gederiveerde xenografts (patient derived xenografts, PDX) geïnjecteerd worden, zijn deze in staat om langdurig te circuleren in de bloedsomloop van zebravissen en vormen na enkele dagen metastases. *In vitro* cultivatie van deze cellen in suspensiekweek stelt deze cellen in staat om hun tumorigene potentieel te behouden. Adherente kweek doet dit tumorigene potentieel teniet binnen enkele dagen. Het induceren van ferroptose door middel van inhibitie van hetzij glutathion peroxidase 4 (GPX4) of door de inhibitie van een van de componenten van systeem Xc<sup>-</sup> (SCL7A11) bleek in staat om metastaserende uveale melanoomcellen significant te reduceren (**Hoofdstuk 4**). Ten slotte waren wij in staat om te demonsteren dat GPX4 levels in uveaal melanoom correleren met een verhoogde expressie van *BAP1*, wat een indicator is voor een slechte prognose en een sterk verhoogde kans op metastase. In **Hoofdstuk 4** poneren wij om deze reden dat een zebravismodel van uveaal melanoom kan functioneren als een hulpmiddel waarmee patiëntenmateriaal van primaire uveaal melanoom getest

kan worden op de ontvankelijkheid voor ferroptose-inducerende substanties, voordat deze patiënten een metastase gevormd hebben.

### **Melanine en reactieve zuurstof in (pan)melanoma**

De meeste melanomen worden gekenmerkt door een hoge productie van melanine. Deze kleurstof wordt binnen in melanocyten - de cel die als voorloper van melanoom fungeert - geproduceerd. Deze kleurstof fungeert intracellulair als een reservoir van antioxidanten. Deze gaan de schadelijke werking van UV-straling tegen. In melanoomcellen zijn ROS gekoppeld aan een reductie in metastatisch potentieel. Hier zorgt de verhoging van ROS voor het doden van cellen die ontsnappen aan de primaire tumor, waardoor de totale efficiëntie van het metastatische proces sterk wordt teruggedrongen. Recente ontdekkingen hebben een verband gelegd tussen de verhoging van ijzer ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en ROS aangedreven celdood, met name ferroptose. Dit vrije ijzer, dat sterk verhoogd is zowel in bloed als in lymfe (de twee voornaamste routes van metastase), zorgt tijdens het proces van ferroptose voor een kettingreactie (met als eindproduct de oxidatie van de lipiden waaruit het celmembraan bestaat) welke celdood tot gevolg heeft. In **Hoofdstuk 5** tonen wij de mechanistische verbinding aan tussen melaninebiosynthese (productie van een antioxidant) en ferroptoseresistentie, en een pan melanoom-cel lijnpanel (zowel huid- als oogmelanomen). Na de observatie dat alle ongepigmenteerde oogmelanoomcellijnen geïmplantéerd in zebrawislarven binnen 24 uur sterven (**Hoofdstuk 4**), vonden wij een correlatie tussen pigmentatie en een langere tijd dat deze cellen in de bloedsomloop van zebrawislarven overleven. Vervolgens toonden wij aan dat het verstoren van deze biosynthese (zowel op chemische als genetische wijze) het metastatische potentieel van deze kankercellen significant vermindert. Uiteindelijk waren wij in staat om te demonstreren dat ongepigmenteerde cellen niet alleen minder metastatisch vermogen hebben, maar dat deze ook ontvankelijk zijn voor behandeling door middel van chemische inductie van ferroptose.

### **Toegankelijkheid, disseminatie van onderzoeksmateriaal en herhaalbaarheid van wetenschappelijk onderzoek.**

Zebrawisonderzoek is dankzij de intrinsieke optische transparantie van de larven, vaak gebaseerd op analyse van afbeeldingen. Gedurende het uitvoeren van het onderzoek in deze dissertatie, zijn er vele honderden (zo niet duizenden) foto's van

zebravislarven gemaakt die geïnjecteerd waren met een wijde selectie aan kankercellen van velerlei verschillende kankertypes. Wetenschappers over de hele wereld bezitten op deze manier een grote hoeveelheid materiaal dat onderdeel is van een onderzoek, maar niet volledig met de wetenschappelijke gemeenschap gedeeld wordt.

In wetenschappelijk onderzoek is herhaalbaarheid van een onderzoek, evenals het dissemineren en het vergroten van het maatschappelijk draagvlak, vaak een onbesproken en onderbenut onderdeel. Door middel van websites en data archieven, zoals besproken in **Hoofdstuk 6**, kunnen deze doelen gecombineerd worden. XePhiR.org fungeert hier als een verzamelpunt voor zebra-viskankermodellen vanuit verschillende laboratoria van over de hele wereld en koppelt protocollen, ruwe data en meta data, om zo de toegangsdrempel tot individuele zebra-vis modellen te verlagen.

Concluderend, heeft het in dit proefschrift beschreven onderzoek geleid tot nieuwe inzichten in de vorming van metastase van verschillende melanoom subtypes. Op grond van de verkregen resultaten suggereren wij dat zowel het blokkeren van melanine biosynthese, als het induceren van ferroptose (of de combinatie van beide) als een potentiële nieuwe behandeling van verschillende types metastatische melanomen kan fungeren.