



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Harnessing zebrafish xenograft models for ocular melanoma treatment discovery

Yin, J.

Citation

Yin, J. (2023, December 5). *Harnessing zebrafish xenograft models for ocular melanoma treatment discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3665682>

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/1887/3665682>

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



Appendices

Nederlandse Samenvatting

Acknowledgements

Curriculum Vitae

List of Publications

Nederlandse samenvatting

Melanoom is een kankertype dat ontstaat uit melanocyten, pigmentproducerende cellen die afkomstig zijn uit de neurale lijst en die een belangrijke rol spelen in oa. de huid, het binnendoor, het oog, en de leptomeningen. Het meest voorkomende type melanoom is het huidmelanoom, gevolgd door oogmelanoom, de meest voorkomende primaire maligniteit in het oog bij volwassenen. Ondanks een gemeenschappelijke melanocytair oorsprong, zijn het huid- en oogmelanoom zeer verschillende ziekten, zowel wat betreft de genetische veranderingen die de ziekte veroorzaken als hun biologische gedrag. Vanwege de relatief lage incidentie van oogmelanomen heeft het meeste onderzoek zich tot nu toe gericht op huidmelanomen. Dit heeft geleid tot een beperkt begrip en beperkte behandelmogelijkheden van oogmelanomen. Met het ontwikkelen van nieuwe modellen voor oogmelanoom willen wij bijdragen aan een beter begrip van oculaire maligniteiten, waardoor de diagnose en behandeling ervan mogelijk verbeterd zou worden.

De meerderheid van de oculaire melanomen (82%) ontstaat in de uvea (Uveaal melanoom, UM). UM ontwikkelt zich meestal in het uveale weefsel van het oog: dit betreft het vaatvlies (choroidea), het trilhaarlichaam (corpus ciliare) en het regenboogvlies (de iris). Daarnaast kunnen oogmelanomen ook ontstaan in het bindvlies (Conjunctivaal melanoom, CoM). Zowel UM als CoM zijn maligniteiten van melanocyten, maar ze hebben verschillende oorzaken met verschillende risicofactoren en vereisen verschillende behandelingen.

Daarom hebben we in **Hoofdstuk 1** de verschillende genetische profielen en voorkomende kenmerken van UM en CoM samengevat. UM mist de meest typische mutaties geassocieerd met cutaan melanoom (BRAF, NRAS en NF1) en wordt in plaats daarvan gekenmerkt door een andere set genen met oncogene of functieverliesmutaties, zoals in het BAP1-gen. Tot nu toe is BAP1 geïdentificeerd als het belangrijkste gen bij het zeldzame erfelijke UM. CoM vertoont daarentegen enige overlap in de genetische achtergrond met huidmelanoom: mutaties in BRAF worden geïdentificeerd in 25-35% van CoM, waarvan de overgrote meerderheid V600E is. Om ons begrip van oogmelanoom verder uit te breiden, is er behoefte aan onderzoeksmethoden die rekening houden met de verschillen tussen UM en CoM.

In **Hoofdstuk 2** beschrijven we een nieuw zebrafish xenograft screening platform voor de snelle in vivo beoordeling van gerichte geneesmiddelen tegen CoM. We hebben fluorescerende CoM-cellijnen geplaatst in transgene zebrafishes met een kleurreporter voor bloedvaten. De cellen werden op twee plekken geïnjecteerd: een ectopische, hematogene enting via de ductus van Cuvier en een orthotopische enting via een retro-orbitale injectie. Op basis van onze resultaten concludeerden we dat zowel de retro-orbitale als de ductus Cuvier injectie geschikt waren voor het bestuderen van CoM: de orthotopische injectie resulteerde in lokale primaire groei,

terwijl ectopische injectie de metastasering nabootste. Vervolgens hebben we de intraveneuze entingstrategie van CoM gebruikt voor het screenen van medicijnen. We valideerden het systeem met de succesvolle behandeling van de BRAFV600E mutatie-specifieke remmer vemurafenib tegen de BRAF-gemuteerde cellijn CRMM1, en zagen dat deze behandeling de groei van de NRAS-gemuteerde cellijn CRMM2 niet beïnvloedde. Met het genereren van deze modellen hebben we een CoM xenograft platform gecreëerd dat high-throughput screening van doelgerichte therapieën tegen deze ziekte in een *in vivo* context mogelijk maakt.

Hoewel drug screens nuttige hulpmiddelen zijn om nieuwe geneesmiddelen te ontdekken met een potentieel hoge doorvoer, maakt ook een beter begrip van de biologie van CoM de rationele ontwikkeling van doelgerichte therapieën mogelijk. Momenteel zorgt de behandeling van primair CoM met radiotherapie, enucleatie of andere modaliteiten bij meer dan 90% van de patiënten voor lokale tumorcontrole. Een vroege diagnose is echter essentieel voor het succes van deze interventies, omdat CoM zich na uitzaaiing snel aanpast en zich onttrekt aan doelgerichte therapieën. Lokaal recidief en metastasevorming zijn de belangrijkste complicaties van CoM en het proces waardoor dit gebeurt, wordt nog steeds niet volledig begrepen.

Daarom is het belangrijk om twee cruciale processen te begrijpen: angiogenese en intravasatie, opeenvolgende stappen in tumorgroei. Angiogenese is van vitaal belang omdat het zorgt voor de noodzakelijke bloedtoevoer, waardoor tumoren zuurstof en voedingsstoffen krijgen om te groeien. Vervolgens komt intravasatie om de hoek kijken, waardoor kankercellen de bloedbaan of lymfevaten kunnen binnendringen en zich mogelijk door het lichaam kunnen verspreiden. Inzicht in deze processen is cruciaal voor het ontrafelen van de mechanismen achter het vermogen van CoM om zich te verspreiden en voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingen.

In **Hoofdstuk 3** tonen wij aan dat zebrafish xenotransplantaat CoM-modellen effectief kunnen worden gebruikt om het angiogenese-potentieel en de rol van de lokale immuunrespons te bestuderen. Door kankercellen in de perivitellineruimte (PVS) te plaatsen, zagen wij dat CoM-cellen een sterke angiogene respons kunnen induceren. Onze bevindingen tonen dat gemetastaseerde CoM-cellen sterk glycolytisch zijn en lactaat afscheiden, wat macrofagen aantrekt en polariseert naar een M2-achtig, proangiogene fenotype. Deze macrofagen leiden vervolgens tot een verhoging van het niveau van proangiogene factoren zoals VEGF, TGF- β en IL-10 in de tumoromgeving, waardoor er vaatgroei ontstaat richting de getransplanteerde CoM-cellen.

Het gebruik van cellijnen, zoals in onze studie, brengt echter beperkingen met zich mee, vooral gezien de aanzienlijke heterogeniteit in mutatietypen en celtypen die tussen patiënten en ook binnen tumoren wordt waargenomen. Wij onderzochten deze heterogeniteit door zebrafish xenotransplantaten afkomstig van verschillende oogtumoren te bestuderen. Wij wilden onderzoeken of dit model kon worden gebruikt

om gepersonaliseerde patiënt avatars voor oogmelanoom te ontwikkelen. Deze aanpak zou mogelijk de weg kunnen effenen voor op maat gemaakte behandelingen die nauw aansluiten bij de unieke situatie van elke patiënt, met als vooruitzicht gepersonaliseerde behandeling van oogmelanoom.

Naar aanleiding van deze aanpak beschrijven wij in **Hoofdstuk 4** de plaatsing in de zebravis van xenotransplantaten die zijn afgeleid van patiënten (PDXs) om een robuust en betrouwbaar platform voor UM-onderzoek en screening van mogelijke anti-UM-geneesmiddelen te bouwen. Wij hebben eerst methoden ontwikkeld om levensvatbare weefsels te isoleren en te bewaren, gevolgd door kweken van sferoïden, afgeleid van een primair UM. Alle monsters vormden in kweek sferoïden en kleurden positief voor melanocyt-specifieke markers. Deze sferoïden werden gelabeld met een fluorescerende kleurstof en daarna in de zebravissen ingebracht met een intraveneuze injectie. Dit leidde tot een reproduceerbaar fenotype met de moleculaire kenmerken van het oorspronkelijke UM. Behandeling met navitoclax (BCL-2/BCL-x1-remmer) en everolimus (mTORC1-remmer) valideerde het zebravis-patiënttumor model als een veelzijdig preklinisch hulpmiddel voor het screenen van anti-UM-geneesmiddelen en als een preklinisch platform om gepersonaliseerde geneesmiddelresponsen te voorspellen. In de toekomst kunnen deze methoden worden gebruikt om de implementatie van gepersonaliseerde behandelings te vergemakkelijken.

Eén van de leerpunten uit ons zebravis PDX-onderzoek was dat de combinatiebehandeling met navitoclax en everolimus de tumorgroei significant verminderde in vergelijking met behandelingen met maar één middel, mogelijk vanwege de toxische effecten van die geneesmiddelen bij hogere concentraties toonden. De toediening van chemotherapeutische middelen gaat doorgaans gepaard met aanzienlijke niet-selectieve toxiciteit en immunosuppressie. Daarom is er veel interesse in het ontdekken van alternatieve therapieën tegen oculaire melanomen zonder dergelijke bijwerkingen, zowel als combinatiebehandeling of als op zichzelf staande behandeling, waaronder immunotherapie en doelgerichte therapie. In ons laatste onderzoek richtten wij ons op het begrijpen van het mogelijke effect van één van deze potentieel nieuwe doelgerichte therapieën: Ginsenosiden.

Ginsenosiden, de actieve verbindingen uit ginsengextract, zijn veelbelovende kandidaten voor de behandeling van oogmelanoom, maar het mechanisme waarmee ginsenosiden de tumorgroei remmen is nog steeds onbekend. In **Hoofdstuk 5** laten wij zien hoe wij het effect van de gezuiverde ginsenosiden Rg3, CK en PPD op CoM-cellijnen en CoM-geënte zebravissen hebben getest. We ontdekten dat de ginsenosiden CK en PPD consistent de groei van CoM remden, zowel *in vivo* als *in vitro*. Echter, ginsenoside Rg3 verminderde de hoeveelheid CoM cellen alleen in zebravissen en niet *in vitro*. Deze tegenstelling bracht ons op het idee dat deze verbinding mogelijk enzymatische veranderingen ondergaat in het behandelde dier. Inderdaad bleken getransplanteerde CoM-cellen een lokale ontsteking te induceren,

die de expressie en activiteit van Glucosylceramidase Beta 2 (Gba2) in het weefsel rond het xenotransplantaat verhoogde. Gba2 was nodig voor de werking van Rg3 en CK, maar niet voor PPD: door Gba2 te remmen werd het effect van ginsenosiden Rg3 en CK, maar niet dat van PPD, tenietgedaan. Overexpressie van GBA2 in CoM-cellijnen leidde tot een herstel van het antitumor effect van Rg3, wat aantoonde dat GBA2 een sleutelrol speelt in de afbraak van ginsenoside.

Dit proefschrift beschrijft de opzet van een xenotransplantatieplatform in zebrafishlarven waarbij oogmelanoomcellijnen en organoïden afkomstig van primaire tumoren worden ingeïmplanteerd. Wij hebben nieuwe modellen gegenereerd om de doeltreffendheid van geneesmiddelen tegen zowel UM als CoM te testen, en om de tumor-intrinsieke biologische eigenschappen van deze maligniteiten te bestuderen, zoals het angiogene potentieel. Dit verbetert niet alleen ons begrip van deze tumoren, maar biedt ook de mogelijkheid om effectievere behandelingen te ontwikkelen. Ook hebben we de effecten van ginsenosiden getest in een vitro en zebrafish model en het belang benadrukt van het testen van potentiële antimelanoomgeneesmiddelen in modelsystemen die de tumoromgeving nabootsen die in patiënten wordt aangetroffen. Door deze modellen verder te verfijnen en uit te breiden, komen we dichtbij de verwezenlijking van op maat gemaakte benaderingen voor de gepersonaliseerde behandeling voor de verschillende soorten oogmelanoom, wat nieuwe hoop biedt voor patiënten die met deze uitdagende ziektes worden geconfronteerd.