



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Scientific and clinical implications of heterogeneity in uveal melanoma

Lange, M.J. de

Citation

Lange, M. J. de. (2024, June 13). *Scientific and clinical implications of heterogeneity in uveal melanoma*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3762814>

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/1887/3762814>

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



8



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Achtergrond

Celdeling is het proces waarbij twee identieke kopieën uit één cel gevormd worden. Dit proces verloopt niet altijd foutloos met als gevolg dat er met elke celdeling fouten worden geïntroduceerd. Deze fouten, geclassificeerd als mutaties, zijn op zichzelf vaak onschadelijk, maar over tijd kunnen deze accumuleren en tot afwijkend gedrag van de cel leiden. Onder selectiedruk kan er een 'optimale' combinatie van mutaties uitgeselecteerd worden die ten grondslag ligt aan tumorvorming.

Analyses van grote patientenpopulaties focussen zich op veelvoorkomende tumormutaties en beogen om een link te leggen tussen deze mutaties, tumorgedrag en uiteindelijk overleving van de patiënt. Deze analyses zijn niet eenvoudig omdat het resultaat beïnvloed wordt door therapie of door vermenging van de tumor met gezond weefsel. Deze factoren beïnvloeden de accurate meting van de genetische opmaak van de tumor zodanig dat er geen betrouwbare conclusies over de samenstelling van de tumor getrokken kunnen worden. Met behulp van state-of-the-art technieken, zoals 'deep sequencing', zijn er toch pogingen gedaan om het genetische landschap van tumoren in kaart te brengen en te kijken naar de oorsprong van deze mutaties. Hieruit concludeert men dat een tumor niet alleen gekarakteriseerd wordt door de aan- of afwezigheid van bepaalde mutaties, maar ook door het percentage cellen waarin deze mutaties voorkomen. De diversiteit die hieruit voorkomt noemen we ook wel **heterogeniteit** en is zeer belangrijk om de complexiteit van tumoren in verband met de behandeling daarvan, te kunnen begrijpen. In dit proefschrift focussen we ons op de heterogeniteit van oogmelanomen en gebruiken daarbij een belangrijke nieuwe methode die absolute kwantificatie van mutaties mogelijk maakt. Digitale PCR (dPCR) is de 3^e generatie van DNA amplificatie (PCR) waarbij de conventionele kwalitatieve PCR evolueert naar een absoluut kwantitatieve methode. Deze techniek helpt met het genetisch ontleden van een tumor om zo, onder andere, een uitspraak te kunnen doen over de volgorde waarin mutaties tot tumorformatie hebben geleid.

Het oogmelanoom

Een uniek model om heterogeniteit te bestuderen is het oogmelanoom. Dit komt vooral doordat het oogmelanoom veelal groeit in een a-cellulaire ruimte waar normaliter alleen het glasvocht zich bevindt. Metingen die gedaan worden op oogmelanomen worden dus enkel en alleen gedaan op cellen die onderdeel van het oogmelanoom en zijn omgeving uitmaken. Het oogmelanoom is een tumor in het oog die ontstaat uit melanocyten, de pigment producerende cellen in de uvea dat zich uitstrekt tot en met de iris. Tot op zekere hoogte is het oogmelanoom vergelijkbaar met het huidmelanoom want ze ontstaan beide uit de melanocyt. Hun genetische opmaak is echter volledig anders en waar het

huidmelanoom wordt gekarakteriseerd door veelvoorkomende *BRAF* mutaties daar wordt het oogmelanoom gekarakteriseerd door vergelijkbare mutaties in de *GNAQ* en *GNA11* genen. Moleculair gezien maakt dit oogmelanomen genetisch homogeen maar dit wil niet zeggen dat ze ook op dezelfde manier ontstaan zijn. In dit proefschrift (hoofdstuk 5) zijn we hier dieper op in gegaan en hebben onderzocht welke factoren aan mutaties in *GNAQ/11* ten grondslag kunnen liggen. Binnen deze groep van punt mutaties hebben we bijvoorbeeld gezien dat er een onderscheidende rol voor (blauw) licht en oogkleur is bij het ontstaan van mutaties. Dit is voor *GNAQ/11* onderzocht, maar het is niet onwaarschijnlijk dat dit ook geldt voor de mutaties die later in de ontwikkeling van het oogmelanoom ontstaan. Het oogmelanoom ontstaat zowel op licht beschienen delen als op gedeeltes waar geen licht komt en het oogmelanoom onderscheidt zich daarmee van het huidmelanoom. Binnen één anatomische locatie op de huid worden geen plekken gevonden die zo verschillend door licht beïnvloed worden als in het oog. De vraag wat de rol van UV-straling is op de vorming van huidmelanomen kan daardoor niet op een vergelijkbare wijze benaderd worden. Dit is niet alleen van belang voor preventie, maar ook omdat het mutatiepatroon van het melanoom mogelijk specifieke behandelmogelijkheden bloot legt.

Genetische heterogeniteit

Zoals aangegeven groeit het oogmelanoom in het niet cellulaire gedeelte van het oog waardoor analyses kunnen worden gedaan op samples met een hoge tumorpuurheid. De genetische heterogeniteit die we in de tumor onderzocht hebben kan worden gezien als een fylogenetische boom waarin de eerste mutaties de stam van de boom vormen en de mutaties die later in de ontwikkeling ontstaan de takken representeren (hoofdstuk 3). We hebben beschreven hoe dit kan leiden tot verschillende klonen, met kloonspecifieke set mutaties, die binnen een tumor kunnen bestaan. Het is waarschijnlijk dat de meest voorkomende mutaties ook het eerst hebben plaats gevonden. Volgens deze theorie is het waarschijnlijk dat het oogmelanoom zijn oorsprong vindt in de *GNAQ/11*-mutaties (aanwezig in 85% van alle oogmelanoomgevallen wereldwijd). We weten dat deze mutatie hoogstwaarschijnlijk niet voldoende is om een melanoom te veroorzaken aangezien deze al voorkomt in moedervlekken in het oog. Er zijn dus additionele veranderingen (mutaties of chromosomale aberraties) nodig die tot de uiteindelijke tumorvorming moeten leiden. Veel van deze zogenaamde secundaire hits zijn beschreven. Sommige worden geassocieerd met een goede prognose (chromosoom 6p winst) terwijl andere veranderingen met een slechte prognose (monosomie 3, chromosoom 8q winst) in verband worden gebracht. We hebben gezien dat er een grote diversiteit aan veranderingen te vinden is binnen de tumoren met een goede prognose, maar binnen de tumoren met een slechte prognose is het patroon beperkt tot enkele terugkerende veranderingen. Als we vanuit het oogpunt van een tumor kijken, kunnen we hieruit concluderen dat er veel mogelijkheden zijn om uit te groeien tot

een oogmelanoom, maar dat er bij metastasering strikte voorwaarden vervuld moeten worden.

Cellulaire heterogeniteit

Een ander belangrijk aspect binnen de heterogeniteit van oogmelanomen is de cellulaire heterogeniteit. Het melanoom bestaat immers niet alleen uit tumorcellen maar ook uit bijvoorbeeld cellen van het immuunsysteem. De rol van immuun cellen bij de ontwikkeling van tumoren is een interessant discussiepunt, en dat is voor oogmelanomen niet anders. Het is vaak onduidelijk of het immuunsysteem de tumor herkent als lichaamsvreemd of dat de tumor actief het immuunsysteem gebruikt om juist verder te kunnen groeien. Talloze studies beschrijven de relatie tussen genetische veranderingen en de aan- of afwezigheid van het immuunsysteem. Deze relatie zou oorzakelijk kunnen zijn, maar het zou ook kunnen dat het simpelweg simultane processen zijn. In hoofdstuk 3 beschrijven we voor oogmelanomen dat de toestroom van immuuncellen samen valt met de progressie van de tumor. Maar we laten ook zien dat dit proces niet stapsgewijs gaat, zoals je zou verwachten als een specifieke mutatie gelinkt zou zijn aan de toestroom van immune cellen. In hoofdstuk 4 laten we zien dat cytokine CXCL10 mogelijk de drijvende kracht is achter deze toestroom van lymfocyten en dat dit een continu proces is dat toevalligerwijs samenvalt met een slechte prognose. Het lijkt er sterk op dat voor oogmelanomen, de aanwezigheid van immuuncellen een gevolg is van de tumor en dus geen oorzaak.

Van het lab naar de kliniek

Een van de doelen is om deze kennis over de heterogeniteit van oogmelanomen, te gebruiken voor gepersonaliseerde behandelingen. Voorheen is wel gepoogd om tumorgenetica hiervoor te gebruiken, maar de bestaande technieken waren toen slechts toereikend om de aan- of afwezigheid van een bepaalde genetische afwijking te tonen en niet om het percentage cellen waarin deze afwijking aanwezig is te bepalen. De kennis over de genetische opmaak van de tumor bleef hierdoor beperkt en gepersonaliseerde behandelingen een uitdaging. In hoofdstuk 2 beschrijven we hoe digitale PCR gebruikt kan worden om gemengd weefsel te analyseren. Digitale PCR is veel preciezer dan de conventionele PCR omdat het absolute kwantificatie van tumorcellen mogelijk maakt. Daardoor hebben we een chronologische volgorde kunnen aanbrengen in het ontstaan van specifieke mutaties in het oogmelanoom. In een tumorcel hopen verschillende mutaties gedurende een langere periode op en de aanname is dat de fractie cellen met een mutatie, een maat is voor het moment waarop deze mutatie ontstaan is. In hoofdstuk 6 beschrijven we een mogelijke behandeling voor oogmelanomen in de vorm van Dasatinib dat een breed scala aan kinases kan remmen. We zien dat sommige melanomen goed reageren op deze behandeling en anderen helemaal niet terwijl ze allemaal het *GNAQ/11*-oncogen dragen. Het is mogelijk dat mutaties die later in de ontwikkeling van het oogmelanoom ontstaan,

ongevoeligheid voor Dasatinib kunnen verklaren en dan is het heel belangrijk om deze mutaties met de hoogst mogelijke gevoeligheid te kunnen detecteren. Patientten waarin de ongevoelig kloon ontstaan is zouden dan alternatieve behandelingen kunnen overwegen.