

Nederlandse samenvatting

In dit proefschrift met de titel; ‘de cellulaire immune response in melanoom patiënten-inzichten in patiënt gerichte behandeling’ zijn de resultaten beschreven uit het onderzoek naar de rol van apoptoseresistentie van melanoomcellen en de rol van de aan- of afwezigheid van verschillende onderdelen van de cellulaire immuun response mede in relatie tot prognose in melanoompatiënten.

Een melanoom is een kwaadaardige moedervlek die soms uit het niets kan ontstaan, maar vaak voortkomt uit een al langer bestaande moedervlek. Vaak betreft het dan moedervlekken die al enigszins afwijkend waren (“onrustige” moedervlekken) of grote moedervlekken die al bij de geboorte aanwezig waren. Een melanoom is de belangrijkste veroorzaker van huidkankergerelateerde sterfgevallen ondanks dat van alle patiënten met huidkanker maar 4% gediagnosticeerd wordt met een melanoom.

De prognose van patiënten met een melanoom is afhankelijk van verschillende variabelen, waarvan de dikte van de tumor één van de belangrijkste is; hoe dikker het melanoom des te slechter is de prognose. Andere belangrijke variabelen zijn o.a. geslacht en leeftijd van de patiënt, de locatie van de primaire tumor, uitzaaiing van tumorcellen in de lymfeklieren (metastasen). Ondanks dat er op basis van deze variabelen een prognose kan worden gegeven aan patiënten, kan de ziekte zich toch nog onverwacht openbaren.

Wanneer bij een patiënt een melanoom wordt geconstateerd zal de tumor chirurgisch worden verwijderd. Om op te sporen naar welke lymfeklieren het melanoom eventueel als eerste zal uitzaaien kan bij wat dikkere melanomen een schildwachtprocedure (Sentinel Node Procedure) worden uitgevoerd. Met deze techniek kunnen ook heel kleine uitzaaiingen in de lymfeklieren worden opgespoord, waarna alle andere klieren in dat gebied die ook risico lopen, kunnen worden verwijderd.

Het komt voor (in 2-4 % van alle patiënten met een melanoom en in 9% van de patiënten met lymfeklierinvasie) dat patiënten een uitgezaaid melanoom hebben, maar nooit zijn gediagnosticeerd met een primaire tumor. Hieruit volgt de veronderstelling dat in deze gevallen de primaire tumor “spontaan” is opgeruimd door de aanwezigheid van een actieve afweerreactie (immuun respons) tegen de tumorcellen. Het immunogene karakter van melanomen, dat betekent dat het een afweerreactie kan initiëren waardoor de tumor wordt opgeruimd, en het belang van de afweerreactie in het voorkomen van progressie van deze ziekte, is al in vele studies beschreven.

Tumorcellen lijken erg veel op gewone cellen, maar bevatten toch enkele specifieke tumorantigenen die herkend kunnen worden door het immuunsysteem. Aan de buitenkant van een tumorcel worden specifieke stukjes tumor gepresenteerd (als op een dienblaadje). Het stukje tumor wordt dan een antigeen genoemd. Antigeenpresenterende cellen (APC) zijn gespecialiseerd om deze tumorantigenen op te nemen en gaan dan op zoek naar de juiste witte bloedcel die de tumor kan vernietigen. Het antigeen wordt op de celmembraan van een tumorcel of een antigeen APC aangeboden in een antigeen/MHC complex. MHC staat voor Major Histocompatibility Complex. Door de aanwezigheid van MHC-moleculen is het lichaam in staat onderscheid te maken tussen lichaamseigen en lichaamsvreemd. Er bestaan twee soorten (klassen) MHC-moleculen: klasse I en klasse II. Klasse I MHC-moleculen bevinden zich op alle lichaamscellen behalve op rode bloedcellen. Klasse II MHC-moleculen zijn alleen aanwezig op

het oppervlak van APCs.

T-cellen zijn witte bloedcellen en spelen een rol in de cellulaire afweer, elke T-cel kan reageren op één specifiek vreemd oppervlak antigeen dat wordt aangeboden door een APC en kan worden onderverdeeld in één van de 3 hoofdgroepen: helper T-cellen ($CD4^+$), cytotoxische T-cellen ($CD8^+$), en suppressor T-cellen ($FoxP3^+$). helper T-cellen kunnen antigeen herkennen gepresenteerd door een MHC klasse II molecuul en cytotoxische T-cellen kunnen antigeen herkennen gepresenteerd in MHC klasse I.

De afwezigheid van bepaalde onderdelen van de cellulaire afweer kan een belangrijke oorzaak zijn van het ontstaan van melanoommetastasen en/of resistentie tegen immuuntherapie. Immuuntherapie is een behandeling waarbij het natuurlijke afweerweersysteem van het lichaam versterkt en gemanipuleerd wordt om kanker te bestrijden. Het opruimen van de tumorcellen na behandeling met immuuntherapie is grotendeels afhankelijk van de inductie van apoptose, oftewel geprogrammeerde celdood, in de tumorcel. Tumorcellen kunnen vaak toch overleven doordat ze een bepaalde manier hebben gevonden om de inductie van apoptose te voorkomen of te blokkeren. Dus het kan zijn dat er een actieve afweerreactie tegen de tumorcellen is maar dat de tumorcellen toch niet worden opgeruimd.

Het herkennen van een niet-functionerend apoptotisch programma in melanoomcellen en het detecteren van andere mogelijke oorzaken voor het “falen” van de immuun respons om de tumorcellen op te ruimen, kunnen mogelijk helpen bij het verhelpen van resistentie tegen immuuntherapie. Hierdoor kunnen patiënten doelgericht en effectiever worden behandeld en zal de prognose van patiënten verbeteren.

In **hoofdstuk 2** beschrijven we dat de aanwezigheid van een hoog percentage geactiveerde granzyme B^+ (GrB^+) cytotoxische T-cellen in primaire melanomen geassocieerd is met een gunstige klinische prognose. De aanwezigheid van deze geactiveerde cytotoxische T-cellen in de primaire tumor impliceert het mogelijk immunogene karakter van de primaire tumor. Deze hypothese wordt versterkt doordat er een significante correlatie gevonden is tussen de expressie van “intact” MHC klasse I moleculen en de aanwezigheid van geactiveerde die cytotoxische T-cellen. PI9 remt granzyme B en daarmee het celdood inducerende effect van geactiveerde cytotoxische T-cellen. We hebben aangetoond dat expressie van PI9 in gemetastaseerde tumorcellen ongunstig is in patiënten met een uitgezaaid melanoom en expressie van PI9 zou daarom een goede verklaring kunnen zijn voor een slechte klinische respons op immuun vaccinatie therapie.

In **hoofdstuk 3** gaat over een test met verschillende antilichamen getest om expressie van c-FLIP te kunnen detecteren in lymfoom- en melanoom cellen. Expressie van c-FLIP kan het apoptotische programma blokkeren waardoor tumorcellen niet kunnen worden opgeruimd. Aantonen van dit eiwit in tumorcellen zou dus een verklaring kunnen zijn voor een slechte prognose. Slechts twee van de vier geteste antilichamen bleken hiervoor geschikt. Met behulp van deze antilichamen is duidelijke expressie van c-FLIP aangetoond in grootcellig B-cel lymfomen en in Hodgkin lymfomen. Echter, met deze antilichamen is het niet gelukt expressie van c-FLIP op eiwitniveau aan te tonen in melanoomcellen terwijl expressie van c-FLIP op mRNA niveau wel gedetecteerd is in melanoomcellen (zie hoofdstuk 5). De expressie van c-FLIP in melanomen is blijkbaar te laag om te kunnen detecteren met behulp van de nu beschikbare antilichamen. Waarschijnlijk is expressie van c-FLIP in melanoom cellen dan ook

geen verklaring voor een slechte uitkomst na behandeling.

In **hoofdstuk 4** doen we verslag van de gunstige prognose voor patiënten met een laag stadium melanoom die geassocieerd is met de aanwezigheid van geactiveerde (GrB^+) tumorinfiltrerende T-cellen (TILs). De aanwezigheid van GrB^+ TILs is gecorreleerd met de expressie van een “intact” MHC klasse I molecuul. In dit hoofdstuk laten we zien dat zowel de aanwezigheid van GrB^+ TILs en CD4^+ TILs als ook ‘intacte’ antigeenpresentatie met MHC klasse I en MHC klasse II in primaire melanomen een gunstige variabele is. Op basis van deze variabelen zou een betere prognose aan de patient kunnen worden mee gegeven.

In **hoofdstuk 5** staan expressie profielen centraal van apoptosegerelateerde genen in geïsoleerde melanoomcellen van patiënten die behandeld zijn met immuun vaccinatie therapie. Deze profielen hebben we vergeleken met de reactie van de patienten op de behandeling met immuun vaccinatie therapie. Uit deze experimenten bleek dat de intrinsieke apoptose route continue is geactiveerd in groot deel van de melanomen, maar dat deze route uiteindelijk is onderbroken. Hierdoor kan de tumorcel dus niet in apoptose gaan en blijft de tumor cel leven. Dit zou kunnen verklaren waarom patienten niet goed reageren op immuuntherapie. Onderbreking van de intrinsieke apoptoseroute bleek echter niet gerelateerd aan een slechte uitkomst na immuun vaccinatie therapie. Een intacte intrinsieke apoptose route is waarschijnlijk dus geen vereiste voor cytotoxische T-cellen om de tumorcellen te kunnen doden.

In **Hoofdstuk 6** hebben we onderzocht of de aanwezigheid helper T-cellen (CD4^+), cytotoxische T-cellen (CD8^+), en suppressor T-cellen (FoxP3^+) de aanwezigheid van SLN metastases kunnen voorspellen in stadium I/II melanoom patiënten. Hierin vonden we dat de afwezigheid van geactiveerde GrB^+ cytotoxische T-cellen sterk is geassocieerd met de aanwezigheid van SLN metastasen.

De cellulaire afweer, weergegeven door aanwezigheid van geactiveerde (GrB^+) TILs in de primaire tumor is een belangrijke prognostische variabele in melanoom patiënten. Het herstellen van de cellulaire afweer en de gevoeligheid van tumorcellen voor deze immuun respons dmv immuuntherapie kan de effectiviteit van de behandeling verbeteren en de prognose van patiënten met een melanoom begunstigen.